



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ»

ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΛΥΔΙΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος (Επιβλέπων)

Κυριάκου Δέσποινα (Μέλος)

Τζέτη Μαρία (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



LABORATORY OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS

POST GRADUATE MASTER PROGRAM
«HUMAN GENETICS»

GENETICS AND PHARMACOGENETICS OF OSTEOSARCOMA

LYDIA ANASTASOPOULOU

Larissa

2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ορισμός	4
1.2 Επιδημιολογία	4
1.3 Ταξινόμηση και Εντόπιση	5
1.4 Κλινικά χαρακτηριστικά	
1.5 Αιτιοπαθογένεια	6
1.5.1 Προδιαθεσικοί Παράγοντες	6
1.5.2 Διαταραχή διαφοροποίησης οστεοβλαστών-Ογκογένεση	7
1.6 Διάγνωση	9
1.7 Σταδιοποίηση	10
1.8 Θεραπεία	10
1.9 Πρόγνωση	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ	
2.1 Μελέτες γενετικής συσχέτισης σε γονιδιωματική κλίμακα (GWAS)	14
2.2 Χρωμοσωμική αστάθεια και οστεοσάρκωμα	16
2.3 Διαταραχές ογκοκατασταλτικών γονιδίων	
2.3.1 Ο ρόλος του p53	19
2.3.2 Ο ρόλος των RB και RECQL4	21
2.4 Διαταραχές ογκογονιδίων	23
2.5 Διαταραχή γονιδίων της οστικής ομοιόστασης	25
2.6 Διαταραχή γονιδίων της ανάπτυξης	26
2.7 Γονίδια που σχετίζονται με τη διήθηση και τη μετάσταση του οστεοσαρκώματος	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ	

3.1 Η επιστήμη της φαρμακογενετικής	29
3.2 Φαρμακογενετική και οστεοσάρκωμα	30
3.3 Φαρμακογενετική και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου	32
3.3.1 Πρωτεΐνες μεταφορείς (ABCB1/P γλυκοπρωτεΐνη)	33
3.3.2 Επιδιόρθωση του DNA (ERCC)	34
3.4 Φαρμακογενετική και τοξικότητα	35
3.4.1 Επαγόμενη από τη σισπλατίνη ωτοτοξικότητα	35
3.4.2 Επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα	36
3.4.3 Τοξικότητα της μεθοτρεξάτης	37
3.5 Πολυμορφισμοί σε ένζυμα φάσης 1 (CYP)	38
3.6 Πολυμορφισμοί σε ένζυμα φάσης 2 (Τρανσφεράσες της S γλουταθειόνης GST)	40
3.7 Μελλοντικοί στόχοι Φαρμακογενετικής	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οστεοσάρκωμα αποτελεί τον συχνότερο κακοήγη όγκο των οστών σε εφήβους ηλικίας 15-19 ετών και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ανώριμου οστού από τα καρκινικά κύτταρα λόγω διαταραχής της τελικής διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Επιπλέον, αυξημένη συχνότητα οστεοσαρκώματος παρατηρείται και σε ορισμένα οικογενή σύνδρομα όπως το Li-Fraumeni και το ρετινοβλάστωμα. Με βάση πληθώρα μελετών έχει γίνει πλέον γνωστό ότι πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος. Συγκεκριμένα η απορρύθμιση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 αλλά και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB1) ενοχοποιούνται για την εμφάνιση της νόσου. Διαταραχές των γονιδίων της οστικής ομοιόστασης και της ανάπτυξης διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Όσον αφορά στην αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος αυτή περιλαμβάνει τη χειρουργική παρέμβαση σε συνδυασμό με ένα τριπλό χημειοθεραπευτικό σχήμα που αποτελείται από τη μεθοτρεξάτη, τη δοξορουβικίνη και τη σισπλατίνη. Η ανταπόκριση όμως των ασθενών σε αυτό το σχήμα καθώς και οι παρενέργειες των χημειοθεραπευτικών αυτών φαρμάκων ποικίλουν. Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα επιδιώκει να δώσει η επιστήμη της φαρμακογενετικής η οποία μελετά την επίδραση γενετικών παραγόντων στην απόκριση των ασθενών στη φαρμακευτική αγωγή και ειδικότερα την επίδρασή τους στο μεταβολισμό και τη δράση των φαρμάκων. Στο οστεοσάρκωμα η φαρμακογενετική έχει στραφεί είτε στη μελέτη της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων, είτε στην μελέτη της καρδιοτοξικότητας και της ωτοτοξικότητας αυτών. Όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα των φαρμάκων μελετήθηκε η σχέση αυτής με γενετικές παραλλαγές σε πρωτεΐνες μεταφορείς των φαρμάκων (πρωτεΐνη ABCB1), σε πρωτεΐνες που ενέχονται στην αποτοξίνωση των φαρμάκων (πρωτεΐνες οικογένειας γλουταθειόνης-S-τρανσφερασών) και σε γονίδια που παίζουν ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA (γονίδια ERCC). Επίσης η επιστήμη της φαρμακογενετικής όσον αφορά στο οστεοσάρκωμα έχει στραφεί και στη μελέτη πολυμορφισμών σε ένζυμα φάσης 1 όπως είναι τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (CYP) αλλά και σε ένζυμα φάσης 2 όπως είναι αυτά της οικογένειας της γλουταθειόνης-S-τρανσφερασών (GST). Οι πολυμορφισμοί στα ένζυμα αυτά ενοχοποιούνται για ανεπιθύμητες παρενέργειες της φαρμακευτικής αγωγής καθώς και για εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτήν. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs4646437 στο γονίδιο *CYP3A4* έχει συσχετισθεί σε μετα-αναλύσεις με θετική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών καθώς φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερη αντίσταση στη θεραπεία. Παρόλη όμως την πρόοδο της επιστήμης της φαρμακογενετικής ακόμα δεν είναι έχει εφαρμοσθεί σε ευρεία κλίμακα στην κλινική πράξη η ανάλυση του γενετικού προφίλ του

κάθε ασθενούς, ώστε να επιτευχθεί η εξατομικευμένη θεραπεία, η οποία και παραμένει μελλοντικός στόχος της φαρμακογενετικής στο οστεοσάρκωμα.

Abstract

Osteosarcoma (OS) constitutes the most frequent malignant tumor of the bone in young adults with ages 15-19 years old and is characterized by the production of bone tissue from the malignant cells due to terminal differentiation of osteoblasts. Increased frequency of OS is observed in familial genetic syndromes, as Li-Fraumeni and retinoblastoma. Multiple studies have shown that genetic polymorphisms play a role in the etiopathogenesis of OS. More specifically, deregulation of tumor suppressor protein p53 and retinoblastoma protein (RB1) have been associated with OS development. In addition, genes responsible for bone homeostasis and development have been also associated with OS. Osteosarcoma therapy includes surgery, in combination with a triple chemotherapy including methotrexate, doxorubicine and cisplatin. Patients' response to the above chemotherapy regimen as well as possible adverse reactions vary among patients. Pharmacogenetics investigates the role of genetic factors in the response of each patient to therapy and in the metabolism of the specific therapeutic agents. In OS, pharmacogenetics investigates the response of the patients to the observed ototoxicity and cardiotoxicity due to the above chemotherapy. Studies have associated genetic variations in drug-transporters as ABCB1, UGT transferases, and ERCC genes with the response to OS chemotherapy. In addition, there are pharmacogenetic studies regarding polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) metabolizing enzymes and also in phase II as GST family enzymes. Genetic polymorphisms in these enzymes have been associated with adverse effects in chemotherapy and chemotherapy resistance. Specifically, rs4646437 in *CYP3A4* gene has been associated in meta-analysis with positive outcome in survival and reduced chemotherapy resistance. However, despite the advances in pharmacogenetics, the analysis of the genetic profile of each patient for personalized therapy is not applicable in the clinic yet. Personalized therapy will remain a challenging target of pharmacogenetics in osteosarcoma.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

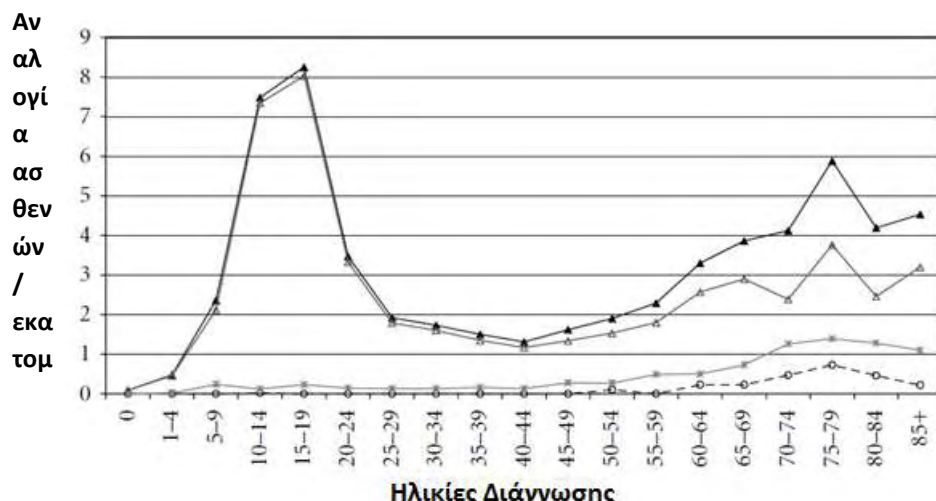
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο καρκίνος των οστών και των αρθρώσεων συγκαταλέγεται στις σπάνιες ασθένειες. Οι τρεις συχνότεροι πρωτοπαθείς κακοήθεις όγκοι των οστών είναι το οστεοσάρκωμα, το χονδροσάρκωμα και το σάρκωμα Ewing. Το οστεοσάρκωμα ή όπως αναφέρεται από ορισμένους συγγραφείς οστεογενετικό σάρκωμα, χαρακτηρίζεται από την άμεση παραγωγή ανώριμου οστού από τα καρκινικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα τα μεταλλαγμένα κύτταρα, τα οποία είναι μεσεγχυματικής προέλευσης, παρουσιάζουν οστεοβλαστική διαφοροποίηση και αυτό έχει ως απόρροια την παραγωγή οστού εξ αυτών. [1]

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το οστεοσάρκωμα αποτελεί το 0,2% όλων των κακοηθειών και το 20% του συνόλου των οστικών νεοπλασιών. Κατέχει την όγδοη θέση στους παιδικούς καρκίνους, με βάση τη συχνότητα εμφάνισής του, και αποτελεί το 5% όλων των παιδικών καρκίνων και το 55% των οστικών παιδικών και εφηβικών κακοηθειών στις ΗΠΑ. [2] & [3] Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περίπου 800 νέες περιπτώσεις οστεοσαρκώματος με τις μισές από αυτές να αφορούν παιδιά και εφήβους. Το οστεοσάρκωμα σπάνια διαγιγνώσκεται σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και εμφανίζει χαρακτηριστική δικόρυφη ηλικιακή κατανομή. Η πρώτη κορυφή παρατηρείται στα παιδιά και εφήβους 15-19 ετών και η δεύτερη, μικρότερη κορυφή, στους ηλικιωμένους 75-79 ετών. Στις ενδιάμεσες ηλικιακές ομάδες, 25-65 ετών, η συχνότητα μειώνεται αισθητά και εμφανίζει πλατό. (Εικόνα 1) Αυτό το μοντέλο δικόρυφης ηλικιακής κατανομής έχει παρατηρηθεί παγκοσμίως. Αναλυτικότερα στις ηλικίες 15-19 ετών η συχνότητα εμφάνισης του όγκου είναι 8 περιστατικά ανά 1.000.000 άτομα ανά έτος ενώ η συχνότητα εμφάνισης στα άτομα 75-79 ετών είναι 6 περιστατικά ανά 1.000.000 άτομα ανά έτος. Φαίνεται μέσα από πληθώρα μελέτες, ότι με την πάροδο των ετών η συχνότητα του οστεοσαρκώματος στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ έχει αρχίσει να αυξάνεται κυρίως στις νεαρές ηλικίες και να μειώνεται στα ηλικιωμένα άτομα. [3] Στις ΗΠΑ δεδομένα από το πρόγραμμα SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) έδειξαν ότι η συχνότητα του οστεοσαρκώματος διαφέρει στις διάφορες ηλικιακές ομάδες ανάλογα με τη φυλή. Αρχικά στα παιδιά και τους εφήβους η συχνότητα του όγκου φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα άτομα ασιατικής καταγωγής. Στην ηλικιακή ομάδα των 25-29 ετών φαίνεται ότι η μαύρη φυλή

εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα. Τέλος στα άτομα άνω των 60 ετών η συχνότητα είναι μεγαλύτερη στους Καυκάσιους. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι υπήρχε μεγαλύτερη συχνότητα παιδικού οστεοσαρκώματος στην Ιταλία, στην Λατινική Αμερική και σε 2 χώρες τις Αφρικής, το Σουδάν και την Ουγκάντα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες χώρες. Τα λιγότερα περιστατικά παρατηρούνται στην Δυτική Αυστραλία. Εκτός βέβαια από τη φυλετική διαφορά όσον αφορά στη συχνότητα του όγκου ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα, φαίνεται πως το οστεοσάρκωμα, στο σύνολο των περιστατικών, εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στη μαύρη φυλή σε σχέση με τους Καυκάσιους, με συχνότητες 6,8/1.000.000/ έτος και 4,6/1.000.000/έτος αντίστοιχα. [3-5] Επίσης είναι γνωστό πως ο κακοήθης αυτός όγκος εμφανίζεται ελαφρώς συχνότερα στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, με συχνότητα 5,4/1.000.000/ έτος έναντι 4/1.000.000/ έτος. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι αποτελεί την έκτη αιτία θανάτου σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών και πιο συγκεκριμένα ευθύνεται για το 8,9% των θανάτων από καρκίνο στα παιδιά. [6]



Εικόνα 1: Συχνότητα οστεοσαρκώματος ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Δικόρυφη κατανομή [3]

1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ & ΕΝΤΟΠΙΣΗ

Το οστεοσάρκωμα (ΟΣ) μπορεί να διακριθεί σε 2 μεγάλες κατηγορίες: το πρωτοπαθές όταν δεν προϋπάρχει νόσος των οστών, και το δευτεροπαθές, όταν συνυπάρχουν άλλες διαταραχές όπως νόσος Paget ή μετά από ακτινοβολία. Το πρωτοπαθές ΟΣ μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε οστό, όμως η πλειοψηφία εντοπίζεται στη μετάφυση των μακρών οστών των άκρων. Με μεγαλύτερη συχνότητα προσβάλλει τα οστά που παρουσιάζουν τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης όπως το άνω άκρο του μηριαίου οστού (30%), το εγγύς άκρο της κνήμης (15%) και το εγγύς άκρο του βραχιονίου (15%). [7] Ωστόσο στους ηλικιωμένους το οστεοσάρκωμα εμφανίζεται συχνότερα στο σκελετό και στα οστά του κρανίου. [5]



Με βάση τα ιστολογικά ευρήματα μπορεί να διακριθεί σε διάφορες υποκατηγορίες όπως το οστεοβλαστικό, το χονδροβλαστικό, το ινοβλαστικό και το τηλεαγγειεκτασικό οστεοσάρκωμα. Ωστόσο το μοριακό υπόβαθρο της κάθε υποκατηγορίας δεν είναι πλήρως κατανοητό και για αυτό το λόγο μέχρι σήμερα όλες οι κατηγορίες επιδέχονται την ίδια θεραπευτική αντιμετώπιση. [8] Όλες οι παραπάνω κατηγορίες χαρακτηρίζονται ως υψηλού βαθμού κακοήθειας οστεοσαρκώματα καθώς είναι ιδιαίτερα επιθετικά και δύσκολα αντιμετωπίσιμα, διότι το 45% των ασθενών εμφανίζουν μεταστάσεις παρόλη την εφαρμογή εντατικών και πολλαπλών θεραπευτικών σχημάτων. [6]

1.4 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η κλινική εικόνα εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Οι περισσότεροι ασθενείς με οστεοσάρκωμα αναφέρουν ως πρωταρχικό σύμπτωμα το επίμονο άλγος στην πάσχουσα περιοχή πριν ακόμα εκδηλωθεί κάποιο οίδημα στα μαλακά μόρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πόνος και το οίδημα εμφανίζονται συχνότερα είτε έπειτα από τραυματισμό της πάσχουσας περιοχής είτε μετά από έντονη φυσική δραστηριότητα. Κατά την έναρξη της νόσου, ο πόνος στην πληγείσα περιοχή μπορεί να είναι διαλείπων και αρκετά ασαφής καθώς επίσης και εντονότερος κατά τη νύχτα. Ωστόσο, με τη πάροδο του χρόνου, τείνει να γίνεται σταδιακά πιο έντονος και επίμονος. [2] Μετά την έναρξη των παραπάνω συμπτωμάτων παρατηρείται τοπική αύξηση της θερμοκρασίας και ορισμένες φορές όταν ο όγκος εντοπίζεται στα κάτω άκρα ο ασθενής παρουσιάζει χωλότητα. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει ενδέχεται να πιέζει γειτονικές δομές με αποτέλεσμα ο ασθενής να έχει ένα αίσθημα πίεσης. Παραδείγματος χάριν, αν συμπιέζει ένα νεύρο μπορεί να προκαλέσει νιγμούς ή/και μυϊκή αδυναμία. Τέλος, ορισμένοι ασθενείς μπορεί να μην εμφανίσουν κανένα από τα παραπάνω συμπτώματα και να προσέλθουν πρώτη φορά στον ιατρό λόγω ύπαρξης παθολογικού κατάγματος στην περιοχή του όγκου. Μελέτες έχουν δείξει ότι έως και το 15% των παιδιατρικών ασθενών με οστεοσάρκωμα, θα εμφανίσουν κάποιο παθολογικό κάταγμα. [1]

1.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.5.1 Προδιαθεσικοί παράγοντες

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι το οστεοσάρκωμα σχετίζεται με το ρυθμό ανάπτυξης του ατόμου αλλά και με ορισμένους γενετικούς και περιβαλλοντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες. Ωστόσο τα περισσότερα περιστατικά οστεοσαρκώματος είναι σποραδικά. [2] Ως εκ τούτου γίνεται σαφές ότι η αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος παραμένει μέχρι σήμερα ασαφής. Διάφοροι εξωγενείς-περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε οξίδιο του βυριλλίου, οι ορθοπαιδικές ενδοπροθέσεις και ο ιός FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins) είναι γνωστό ότι ευθύνονται για την εκδήλωση οστεοσαρκώματος σε πειραματόζωα. [9] & [4] Ο ρόλος τους όμως στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα είναι ακόμα άγνωστος. Επίσης το γενετικό υλικό του πολυόμα-ιου SV40 (Simian Virus 40) έχει ανιχνευθεί στο 50% των ασθενών με οστεοσάρκωμα ωστόσο παραμένει ασαφές αν αυτό παίζει κάποιο ρόλο στην ογκογένεση του οστεοσαρκώματος. [10] Η έκθεση σε ακτινοβολία έχει μελετηθεί ενδελεχώς και έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση διάφορων κακοηθειών ωστόσο δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εκδήλωση πρωτοπαθούς οστεοσαρκώματος. [7] & [2]

Με γνώμονα τη γνώση ότι ο όγκος εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στην παιδική-εφηβική ηλικία, όπου παρατηρείται και ο ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης, συμπεραίνουμε ότι η αύξηση και ανάπτυξη παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος. Επιπλέον γνωρίζουμε πως στην εφηβεία οι ορμόνες του φύλου, η αυξητική ορμόνη καθώς και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (Insulin Growth Faktor 1-IGF1) βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδά τους. Επομένως γίνεται κατανοητό πως όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι πιθανό να παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος. [3] Το γεγονός ότι το οστεοσάρκωμα μπορεί να εμφανιστεί δευτερογενώς στο 1% των ασθενών με νόσο Paget, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο ανώμαλος ανασχηματισμός του οστού, που παρατηρείται στη νόσο Paget, πιθανώς να παίζει ρόλο και στην αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα οικογενή σύνδρομα εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση στην εκδήλωση οστεοσαρκώματος. Ασθενείς με οικογενές ρετινοβλάστωμα (κακοήθης όγκος του οφθαλμού) ενδέχεται να εμφανίσουν οστεοσάρκωμα σε ποσοστό περίπου 8%. [5] Επίσης ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni (σύνδρομο με αυξημένη προδιάθεση στην εκδήλωση κακοηθειών) και Rothmund-Thomson (συγγενείς ανωμαλίες των οστών, των μαλλιών, φωτοευαισθησία, υπογοναδισμό, και καταρράκτη) έχουν 12% και 30% πιθανότητα εκδήλωσης οστεοσαρκώματος αντίστοιχα. [5] & [3] Τέλος δύο ακόμα σύνδρομα που έχουν συσχετισθεί με αυξημένη εμφάνιση του όγκου είναι το σύνδρομο Werner (σύνδρομο προγηρίας) και το Blooms (σύνδρομο με χαμηλό ανάστημα, φωτοευαισθησία και αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης κακοηθειών) [5] & [2]

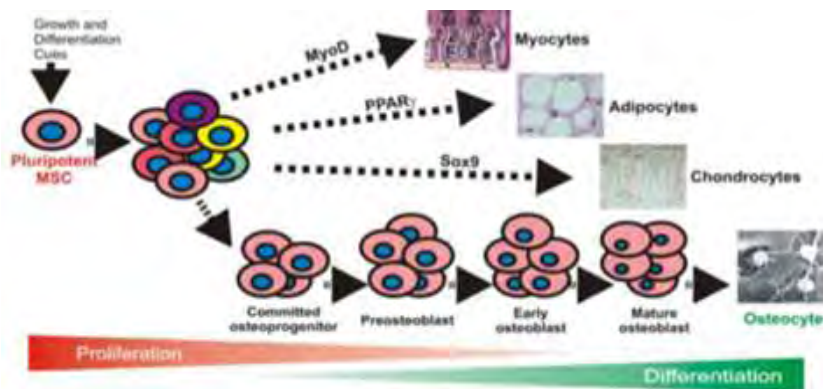
1.5.2 Διαταραχή διαφοροποίησης οστεοβλαστών-Ογκογένεση

Πλέον θεωρείται ότι το οστεοσάρκωμα είναι μια ασθένεια που οφείλεται σε διαταραχή στη τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, η οποία μπορεί να επισυμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της οστικής διαφοροποίησης. Πληθώρα γενετικών και επιγενετικών παραγόντων ευθύνονται για αυτή τη διαταραχή της τελικής διαφοροποίησης των οστεοβλαστών και υπάρχουν διάφορα γεγονότα που υποστηρίζουν το συγκεκριμένο μοντέλο αιτιοπαθογένειας.

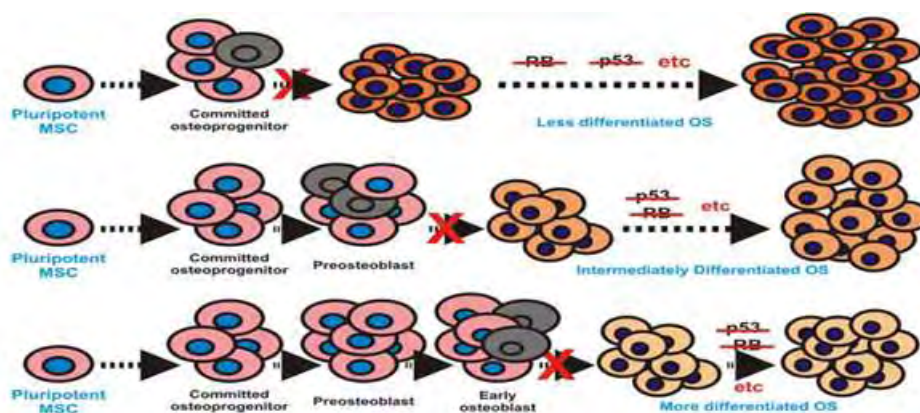
[2] Προκειμένου να γίνει κατανοητό αυτό το μοντέλο αιτιοπαθογένειας, οφείλουμε να αναφερθούμε επιγραμματικά στους μοριακούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στην οστεογένεση. Η οστεογένεση προκύπτει από μια καλά συντονισμένη αλληλουχία γεγονότων, τα οποία αφορούν κατά κύριο λόγο τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων. [11] Υπάρχουν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων και των προγονικών κυττάρων των οστεοβλαστών. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς φαίνεται να είναι ο RUNX-2 και ο Osterix. [12] Όσον αφορά σε αυτούς τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες, πρόκειται για τους κύριους μεταγραφικούς ρυθμιστές του σχηματισμού του σκελετού, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Αλλαγές στην έκφραση του RUNX-2 οδηγούν σε διαταραχή στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και αυτό δύναται να έχει σαν επακόλουθο την εκδήλωση οστεοσαρκώματος όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα στη συνέχεια. [13]

Η διαταραχή στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μπορεί να είναι απόρροια και της απώλειας δύο πολύ σημαντικών πρωτεϊνών, της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος RB1 και της πρωτεΐνης p53. Εκτός από τον γνωστό ογκοκατασταλτικό ρόλο που έχουν και τα δύο αυτά γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα φαίνεται, όπως θα δούμε στη συνέχεια, ότι η απώλεια της λειτουργικότητάς τους οδηγεί σε διαταραγμένη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και τελικά στην εκδήλωση οστεοσαρκώματος. [2] & [14] *Εικόνα 3*

Η διαταραχή της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών υπογραμμίζεται και από το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που προάγουν την οστεογένεση, όπως οι οστεομορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs), στα περισσότερα κύτταρα του όγκου αδυνατούν να προάγουν την τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και απεναντίας ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. [2] & [12]



Εικόνα 2: Διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς κυτταρικές σειρές [2]



Εικόνα 3: Γένεση του Οστεοσαρκώματος [2]

1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση του οστεοσαρκώματος στις μέρες μας γίνεται συνήθως στα αρχικά στάδια της νόσου, πριν ακόμα εμφανιστούν εξωδιαμερισματικές μεταστάσεις. Η διερεύνηση του όγκου περιλαμβάνει διαδοχικές εξετάσεις, οι οποίες πρέπει να γίνονται με ορισμένη σειρά. Ο κλινικός έλεγχος ακολουθείται από τον ακτινολογικό, ο οποίος παρέχει πολύτιμες πληροφορίες. Στις απλές ακτινογραφίες παρατηρούνται οστεολυτικά στοιχεία με εστίες οστικής πυκνώσης, λόγω της δημιουργίας νέου οστού. Η οστεολυτική εξεργασία διαβρώνει το φλοιό του οστού και επεκτείνεται στα μαλακά μόρια. Εξαιτίας της υπερδιέγερσης του περιστέου και της δημιουργίας νέου οστού δημιουργείται το χαρακτηριστικό για τον όγκο τρίγωνο Godman. Στη συνέχεια, η αξονική τομογραφία βοηθάει στον ακριβή προσδιορισμό των οστικών ορίων του όγκου, ενώ η μαγνητική τομογραφία αποκαλύπτει τυχόν επέκταση του όγκου εντός των μαλακών μορίων καθώς και την ύπαρξη μεταστάσεων. Χρήσιμη

κρίνεται και η διενέργεια αγγειογραφίας καθώς και δυναμικού σπινθηρογραφήματος των οστών.

Οριστική όμως διάγνωση επιτυγχάνεται μόνο έπειτα από τη διενέργεια είτε κλειστής είτε προτιμότερα ανοικτής βιοψίας. Η βιοψία δια λεπτής βελόνας (FNA) θα πρέπει να αποφεύγεται καθότι ενέχει τον κίνδυνο είτε υποδιάγνωσης του οστεοσαρκώματος είτε εσφαλμένης διάγνωσης [1] & [3]

1.7 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση του οστεοσαρκώματος και όλων των κακοηθειών των οστών, κατά Enneking, βασίζεται στη δυνατότητα επέκτασης αυτών. Η σταδιοποίηση του όγκου καθορίζει το θεραπευτικό σχήμα και τη πρόγνωση του ασθενούς και έχει ως εξής:

Στάδιο IA: Ενδοδιαμερισματικός όγκος μικρού βαθμού κακοήθειας

Στάδιο IB: Εξωδιαμερισματικός όγκος, μικρού βαθμού κακοήθειας, χωρίς μεταστάσεις

Στάδιο IIA: Ενδοδιαμερισματικός όγκος υψηλού βαθμού κακοήθειας

Στάδιο IIB: Εξωδιαμερισματικός όγκος υψηλού βαθμού κακοήθειας, χωρίς μεταστάσεις

Στάδιο IIIA: : Ενδοδιαμερισματικός όγκος με μεταστάσεις ανεξαρτήτου βαθμού κακοήθειας
[1]

1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία εκλογής του οστεοσαρκώματος θεωρείται πως είναι ο συνδυασμός χειρουργικής θεραπείας και χημειοθεραπείας. Η χειρουργική θεραπεία περιλαμβάνει την ευρεία εκτομή του όγκου ή σε πιο προχωρημένες καταστάσεις τον ακρωτηριασμό του μέλους είτε δια της υπερκείμενης άρθρωσης είτε πάνω από αυτή. Παρά τον πολύ καλό τοπικό έλεγχο της νόσου που επέφερε η χειρουργική εκτομή του όγκου, περισσότεροι από 80% των ασθενών εμφάνιζαν υποτροπές με τη μορφή πνευμονικών μεταστάσεων. Ο μεγάλος αυτός αριθμός υποτροπών υποδείκνυε ότι οι περισσότεροι ασθενείς είχαν πιθανώς μικρομεταστατική νόσο κατά τη διάγνωση και συνεπώς η χρήση μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας κρίνεται εξαιρετικά σημαντική για την αντιμετώπιση αυτών. [15] Βέβαια από το 1980 ο Rosen και οι συνεργάτες του εισήγαγαν την ιδέα, πέραν της μετεγχειρητικής, και της προεγχειρητικής θεραπείας του οστεοσαρκώματος. Η προεγχειρητική θεραπεία προσφέρει δύο σημαντικά οφέλη. Αφενός μειώνει το μέγεθος του όγκου καθιστώντας την εκτομή του ευκολότερη, και αφετέρου προσδίδει στους ογκολόγους τη δυνατότητα εκτίμησης της ιστολογικής ανταπόκρισης του νεοπλάσματος στη χημειοθεραπεία και της αξίας που αυτή έχει. [16]

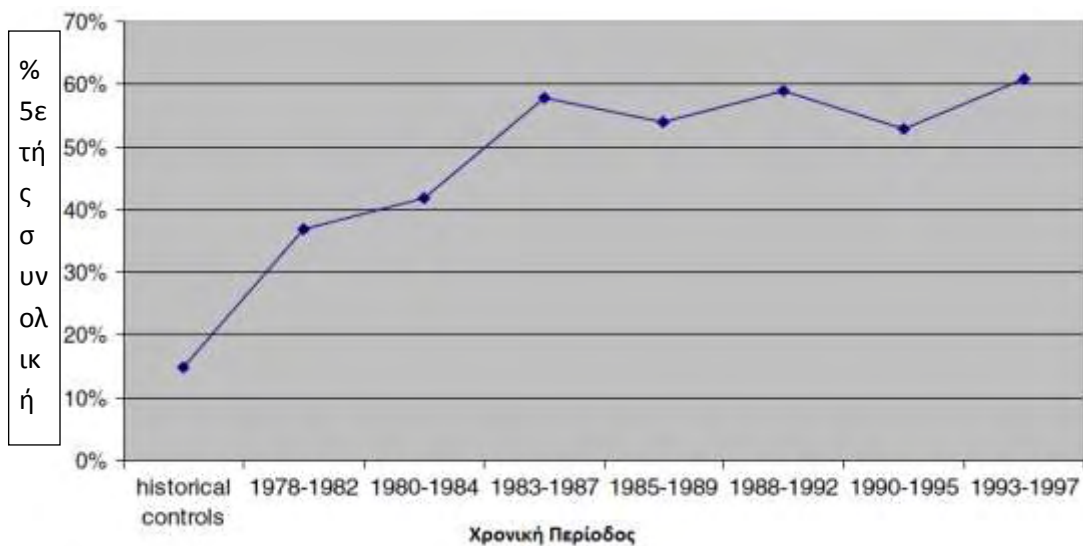
Με βάση τα αποτελέσματα πληθώρας κλινικών μελετών, τρία χημειοθεραπευτικά φάρμακα θεωρούνται θεραπεία πρώτης γραμμής για το οστεοσάρκωμα. Αυτά είναι η μεθοτρεξάτη, η δοξορουβικίνη και η σισπλατίνη. Εκτός βέβαια από αυτά, στην θεραπευτική φαρέτρα υπάρχουν και η ιφοσαμίδη, η καρβοπλατίνη και η ετοποσίδη. Στη μεγαλύτερη κλινική δοκιμή, που έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής, μεταξύ ασθενών με οστεοσάρκωμα από την Ευρώπη και την Αμερική (EURAMOS-1), το τριπλό θεραπευτικό σχήμα που αναφέρθηκε παραπάνω δόθηκε στους ασθενείς προεγχειρητικά για 10 εβδομάδες. Στη χειρουργική επέμβαση που ακολούθησε, μετά τις 10 εβδομάδες, το 50% των ασθενών είχε <10% βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του όγκου που είχε εξαιρεθεί. Αυτό προσδιορίστηκε ιστολογικά και υπεδείκνυε ότι οι μισοί ασθενείς της μελέτης είχαν πολύ καλή ανταπόκριση στην συγκεκριμένη προεγχειρητική θεραπεία. [17] & [18] Στη μεγάλη αυτή κλινική δοκιμή ελέγχθηκε και η αποτελεσματικότητα άλλων παραγόντων, όπως η ιντερφερόνη α 2b (IFNα-2b), η ιφοσαμίδη και η ετοποσίδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως αυτοί οι παράγοντες δεν είχαν κανένα όφελος στο ελεύθερο νόσου χρονικό διάστημα των ασθενών σε σχέση με το τριπλό θεραπευτικό σχήμα. Τελευταία έχουν γίνει προσπάθειες, με στόχο την επίδραση στο μικροπεριβάλλον του οστού και κατ' επέκταση του όγκου, μέσω της χρήσης διφωσφονικών όπως το ζολεδρονικό οξύ, αλλά ακόμα αυτές βρίσκονται στα πρώιμα στάδια των κλινικών δοκιμών. [8] Τέλος ο συνδυασμός αναστολέων της αγγειογένεσης, όπως η σοραφενίμπη, με αναστολείς του mTOR, όπως το everolimus, φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενος καθώς έχει καλά αποτελέσματα σε μια πρόσφατη κλινική δοκιμή φάσης 2. [19] Βέβαια όλες αυτές οι νέες στρατηγικές αντιμετώπισης του οστεοσαρκώματος απαιτούν ακόμα πολλή μελέτη και θα χρειαστεί αρκετός χρόνος μέχρι να ενσωματωθούν στη θεραπευτική φαρέτρα των ογκολόγων. [8]

Επομένως γίνεται κατανοητό πως το τριπλό χημειοθεραπευτικό σχήμα, της μεθοτρεξάτης, της δοξορουβικίνης και της σισπλατίνης, παραμένει μέχρι και σήμερα το βασικό σχήμα θεραπείας. Αν και είναι το πιο αποτελεσματικό σχήμα, με βάση τις κλινικές δοκιμές, στη θεραπεία του οστεοσαρκώματος, έχει παρατηρηθεί ότι η ευαισθησία των ασθενών σε αυτά τα φάρμακα όσον αφορά τόσο στην αντικαρκινική τους δράση όσο και στις ανεπιθύμητες ενέργειες τους, διαφέρει έντονα μεταξύ των ασθενών με οστεοσάρκωμα. [8] & [20] Κρίνεται συμπερασματικά επιτακτική η ανάγκη πρόβλεψης των ασθενών που πιθανόν να μην ανταποκριθούν καλά στο χημειοθεραπευτικό σχήμα καθώς και των ασθενών που θα επωφεληθούν από αυτό. [8] Για την επίτευξη αυτού θα πρέπει αρχικά να κατανοηθεί σε βάθος το μοριακό-γενετικό υπόβαθρο του όγκου καθώς επίσης και το γενετικό προφίλ του κάθε ασθενούς. Επομένως υπογραμμίζεται η σημασία της φαρμακογενωμικής με την ανεύρεση μοριακών δεικτών, ο οποίοι δύναται να προβλέπουν ποιοι ασθενείς θα

ανταποκριθούν στο χορηγούμενο θεραπευτικό σχήμα και ποιοι ενδέχεται να παρουσιάσουν φαρμακοεπαγόμενες τοξικές παρενέργειες. [21] & [6]

1.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πρόγνωση των ασθενών με οστεοσάρκωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας πριν την εισαγωγή της χημειοθεραπείας, το 1970, ήταν εξαιρετικά δυσμενής. Μετά την προσθήκη όμως της χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με την χειρουργική αντιμετώπιση, η πενταετής επιβίωση των ασθενών, χωρίς μεταστάσεις, αυξήθηκε από 10-20% σε 60-65%. (Εικόνα 4) Παρόλα αυτά, αυτός ο ρυθμός αύξησης της πενταετούς επιβίωσης έχει μείνει σταθερός και εκτός αυτού αρκετοί ασθενείς υποτροπιάζουν παρόλη την εντατική θεραπεία. [8] & [20] Η καλή χειρουργική αντιμετώπιση φαίνεται να παίζει ρόλο στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης κάτι ανάλογο όμως δεν συμβαίνει με τη χορήγηση πολλαπλών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. [20] Διάφοροι προγνωστικοί παράγοντες έχουν κατά καιρό προταθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο οστεοσάρκωμα. Ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας θεωρείται η παρουσία μεταστατικής νόσου κατά τη διάγνωση. Η ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία είναι ένας ακόμη πολύ σημαντικός προγνωστικός παράγοντας, καθώς οι ασθενείς που ανταποκρίνονται καλά στο προεγχειρητικό σχήμα μπορούν να επιτύχουν υψηλά ποσοστά συνολικής επιβίωσης, της τάξης του 80%. [16] Επίσης έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης καθώς και της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH), αποτελούν χρήσιμους προγνωστικούς δείκτες. [1] Σε μια μελέτη που έγινε το 2005 εξετάστηκε η προγνωστική αξία της LDH και αποδείχθηκε ότι ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα LDH κατά τη διάγνωση είχαν 60% 5ετή ελεύθερη νόσου επιβίωση, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα LDH ήταν 39%. [22] Άλλοι μοριακοί αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες που έχουν κατά καιρούς αναφερθεί είναι η αυξημένη έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης, οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, η υπερέκφραση πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP) και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MDR1 (multidrug resistance protein 1). [23-26] Τέλος, πολύ πρόσφατες έρευνες μελετούν τα micro-RNAs που κυκλοφορούν στον ορό του αίματος σαν πιθανούς προγνωστικούς μοριακούς δείκτες για τους ασθενείς με οστεοσάρκωμα. [27]



Εικόνα 4: Πενταετής συνολική επιβίωση [20]

1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

2.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Τα τελευταία χρόνια διενεργούνται μελέτες με ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος προκειμένου να διερευνηθεί η συμβολή της γενετικής ποικιλότητας στην παθολογία διαφόρων νοσημάτων. Συγκεκριμένα, οι μελέτες συσχέτισης σε γονιδιωματική κλίμακα (GWAS) διερευνούν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, οι οποίοι προδιαθέτουν για την εμφάνιση μιας πάθησης. Αναφορικά με το οστεοσάρκωμα, αρκετές μελέτες συσχέτισης έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία 15 χρόνια. Παρόλο όμως που τα ευρήματα υποδεικνύουν έναν σημαντικό αριθμό πολυμορφισμών σε γονίδια που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος, σημαντικός περιορισμός των μελετών είναι το περιορισμένο μέγεθος της ομάδας μελέτης, δεδομένου ότι το οστεοσάρκωμα συνιστά μία σπάνια μορφή καρκίνου. [28]

Μεγάλη συνεργατική μελέτη του 2013, η οποία διεξήχθη σε 941 ασθενείς οστεοσαρκώματος και 3291 υγιή άτομα που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου, υπέδειξε 3 μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν με τον κίνδυνο εμφάνισης του οστεοσαρκώματος. Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς rs7591996 και rs10208273 που αφορούν σε γονίδια της χρωμοσωμικής περιοχής 2p25.2, ενώ η ισχυρότερη συσχέτιση παρατηρήθηκε στον πολυμορφισμό rs1906953 στο ιντρόνιο 7 του γονιδίου του μεταβοτροφικού υποδοχέα του γλουταμινικό 4 (GRM4) που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.3. Η σημαντικότητα του τελευταίου πολυμορφισμού στην γενετική προδιάθεση της νόσου έγκειται στο γεγονός ότι ο υποδοχέας GRM4 συμμετέχει στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και αναστολή του καταρράκτη του κυκλικού AMP (cAMP), για το οποίο μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχει στην παθολογία του οστεοσαρκώματος. Συγκεκριμένα, η συμβολή του στην πάθηση πραγματοποιείται μέσω της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης του οστεοσαρκώματος ,Prkar1a ,η οποία εξαρτάται από την cAMP κίνηση και συμμετέχει στην ογκογένεση.Το παραπάνω υποδηλώνει τη σημαντικότητα της πρωτεΐνης αυτής στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου [29] & [30]

Επιπλέον μελέτες αναφέρουν συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης οστεοσαρκώματος, 12 πολυμορφισμών σε γονίδια που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια και μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA με την πλειονότητα αυτών να αφορούν τα γονίδια FANCM και GH1. Ειδικότερα, 4 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου

FANCM (ομάδα γονιδίων που σχετίζονται με την αναιμία Fanconi) συσχετίστηκαν με διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης οστεοσαρκώματος εκ των οποίων ο ένας πολυμορφισμός εντοπιζόταν στο εξόνιο 14 οδηγώντας σε μη-συνώνυμη αλλαγή από βαλίνη σε λευκίνη, ενώ οι άλλες τρεις απαντώνται σε περιοχές ιντρονίων. Τα παραπάνω γονίδια ενέχονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη γονιδιακή αστάθεια που αποτελεί και χαρακτηριστικό γνώρισμα της πάθησης. [31]

Δύο επιπλέον μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης 1, (Growth Hormone 1 - GH1), φαίνεται να ενέχονται στη γενετική προδιάθεση της νόσου με τον έναν πολυμορφισμό να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοσαρκώματος συσχετίστηκε ο πολυμορφισμός rs7956547 του γονιδίου του IGF1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του IGF1 παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του οστού και στην ομοιόστασή του, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασής του έχουν βρεθεί σε ιστούς οστεοσαρκώματος. [32] Η έκφρασή του επάγεται από την αυξητική ορμόνη, ενώ η ανάπτυξη οστεοσαρκώματος κατά την εφηβεία έχει συνδεθεί με την απελευθέρωση της ορμόνης. Η ανάπτυξη των οστεοσαρκωματικών κυττάρων εξαρτάται από τον παράγοντα IGF1, ενώ μελέτες υποστηρίζουν ότι αναστολή της αυξητικής ορμόνης σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα του IGF1 στον ορό και αναστολή της ανάπτυξης του όγκου. [33] Επιπλέον, δεδομένα που προέρχονται από πειραματικά μοντέλα σκύλων, τα οποία αναπτύσσουν οστεοσάρκωμα με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του ανθρώπου, δείχνουν ότι οι μεγαλόσωμες φυλές παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης οστεοσαρκώματος, προτείνοντας ότι πολυμορφισμοί του IGF1 απουσιάζουν από τις μεγαλόσωμες φυλές υποδεικνύοντας τον προστατευτικό τους ρόλο στη πάθηση. [28]

Έρευνες έχουν επίσης αναδείξει τη συσχέτιση πολυμορφισμών στα γονίδια του υποδοχέα 2 του IGF2, του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR), του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού b (TGFBR1) και του MDM2 με την πιθανότητα οστεοσαρκώματος. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα για τα προαναφερθέντα γονίδια ήταν αντικρουόμενα μεταξύ των μελετών. Αναφορικά με το γονίδιο MDM2, το οποίο συμμετέχει σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, ο πολυμορφισμός rs1690916 συσχετίστηκε σημαντικά με μειωμένο κίνδυνο οστεοσαρκώματος, ενώ αντιθέτως 3 πολυμορφισμοί σε περιοχές των ιντρονίων του γονιδίου MDM2 συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας [28] & [31]

Επιπροσθέτως, μελέτες διερεύνησαν πολυμορφισμούς σε γονίδια με μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς σε σύνδρομο προδιάθεσης του καρκίνου με αυξημένη συχνότητα οστεοσαρκώματος. Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων, συμπεριλαμβάνονταν α) το γονίδιο TP53, μεταλλάξεις του οποίου ευθύνονται για το σύνδρομο Li-Fraumeni, β) τα γονίδια WRN και BLM, μεταλλάξεις των οποίων ενοχοποιούνται για τα σύνδρομα Werner και Bloom, αντιστοίχως, καθώς επίσης και τα γονίδια RECQL4 και RPS19/RPS24 των οποίων

μεταλλάξεις οδηγούν στο σύνδρομο Rothmund-Thomson και στην αναιμία Diamond-Blackfan, αντιστοίχως. Παρόλο που ασθενείς με τα παραπάνω σύνδρομα παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοσαρκώματος, κανένας πολυμορφισμός στα αντίστοιχα γονίδια δεν συσχετίστηκε με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. [34]

Μελέτες συσχέτισης σε γονιδιωματική κλίμακα έχουν διεξαχθεί και σε πειραματικά μοντέλα σκύλων, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την προδιάθεση του οστεοσαρκώματος και στον άνθρωπο, δεδομένου ότι ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της νόσου παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των δύο ειδών. Ειδικότερα, μελέτη του 2007 που πραγματοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές φυλές σκύλων, έδειξε ότι πολυμορφισμοί σε γονίδια των αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, CDKN2A/B, συσχετίζονται σημαντικά με την δημιουργία του οστεοσαρκώματος. Το παραπάνω εύρημα ενισχύεται από δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα γονίδια CDKN2A/B, που κωδικοποιούν κινάσες οι οποίες εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, RB, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθολογία του οστεοσαρκώματος. [28]

Παρόλα τα παραπάνω ευρήματα, μελλοντικές μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με οστεοσάρκωμα, θα παρέχουν μια εις βάθος εικόνα σχετικά με το ρόλο της γενετικής ποικιλότητας στην προδιάθεση της νόσου, ενώ επίσης θα ανοίξουν το δρόμο για καλύτερη πρόγνωση ή διάγνωση του οστεοσαρκώματος.

2.2 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Πληθώρα μελετών έχει διερευνήσει γενετικές ανωμαλίες στο οστεοσάρκωμα τόσο σε γονιδιακό όσο και σε χρωμοσωμικό επίπεδο, προτείνοντας ότι η πάθηση χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γονιδιακής αστάθειας και ειδικότερα από χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal Instability, CIN), η οποία αφορά σε έλλειψη ή επιπλέον παρουσία μεγάλων χρωμοσωμικών τμημάτων. Η γενετική αυτή αστάθεια οδηγεί σε πολύπλοκες δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες, καθώς επίσης και σε μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των κυττάρων διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος. [35]

Εκτός των πολύπλοκων γενετικών αλλαγών στο οστεοσάρκωμα, φαίνεται ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες απαντώνται σε περιοχές συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων (Πίνακας 1). [36] Μέθοδοι κυτταρογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στο οστεοσάρκωμα αφορούν στην παρουσία επιπλέον χρωμοσωμικού υλικού στα χρωμοσώματα 1, 6 και 8, καθώς επίσης και σε απώλεια τμημάτων των χρωμοσωμάτων 9, 10, 13 και 17. Επίσης, συχνό εύρημα είναι η μερική ή ολική έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 6, ενώ οι πιο κοινές χρωμοσωμικές

αναδιατάξεις που εντοπίζονται στο οστεοσάρκωμα αφορούν τις χρωμοσωμικές περιοχές 1p11-13, 1q10-12, 1q11, 1q21-22, 4q27-33, 6p23-25, 7p13-22, 7q11-36, 11p10-5, 11p14-15, 12p13, 14p11-13, 15p11-13, 17p12,13, 19p13 και 22q11-13. [37]

Επιπροσθέτως, μελέτες με τη χρήση της μεθόδου του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH) αναφέρουν ότι στο οστεοσάρκωμα παρατηρείται ενίσχυση των χρωμοσωμικών περιοχών 1q21, 3q26, 6p, 6p12.1, 6p12-21, 8p, 8q12.21.3, 8q22-q23, 8q24.2, 12q12-13, 12q13-14, 14q24-qter, 17p11-12, Xp11.2-21 και Xq12 [36, 37], ενώ αλληλούχιση του DNA έδειξε ότι ελλείψεις παρατηρούνται στα χρωμοσώματα 2q, 6p, 8p, 10p και 17p13. Επιπλέον, κυτταρογενετική ανάλυση πρωτογενών οστεοσάρκωμάτων και κυτταρικών σειρών εντόπισε 531 χρωμοσωμικές αναδιατάξεις με κυριότερη στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 20, καθώς και 300 εύθραυστα σημεία, ενώ συχνά παρατηρούνται και αναδιατάξεις στην περιοχή του κεντρομεριδίου στα χρωμοσώματα 1, 6, 13, 14, 17 και 20.

Genomic region	Event	Frequency	Effected genes	
			Tumour suppressor gene(s)	Oncogene(s)
1q10-q12, 1q21-q31	Amp	6-59%		
3q13.31	Del, LOH	6-80%	<i>LSAMP</i>	
5q21	LOH	62%	<i>APC</i>	
6p12-p21	Gain, Amp	16-75%		<i>RUNX2, CDC31, VEGFA, PIM1</i>
6p22.3	Gain, Amp	60%		<i>E2F3</i>
7p21	Del	36%		
7p21	Amp	14%		<i>TWIST</i>
7q31	Del	41%		<i>MET</i>
7q31	Amp	9%		
8q24.21	Amp	7-67%		<i>MYC</i>
8q24.4	Mut	<5%	<i>RECQL4</i>	
8q24.4	Gain	33%	<i>RECQL4</i>	
9p21	Del	5-21%	<i>p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B</i>	
10q26	LOH	60%	<i>BUB3, FGFR2</i>	
12q13	Amp	41%		<i>PRIM1</i>
12q14	Amp	10%		<i>CDK4</i>
12q15	Amp	3-25%		<i>MDM2</i>
13q14.2	LOH	19-67%	<i>RB1</i>	
13q14.2	Mut	25-35%	<i>RB1</i>	
16q23.1-q23.2	Del	30%	<i>WWOX</i>	
17p11.2-p12	Amp	20-78%		<i>COPS3, PMP22, MAPK7</i>
17p13.1	Del, LOH	29-42%	<i>TP53</i>	
17p13.1	Mut	10-39%	<i>TP53</i>	
18q (MCR 18q21-q23)	Del	31-64%		

Πίνακας 1: Συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε περιπτώσεις σποραδικού οστεοσάρκωματος [36]

MCR, minimal common region; Del, deletion; Amp, amplification; Mut, mutation

Μεταξύ των πιο εκτενώς μελετημένων χρωμοσωμικών περιοχών περιλαμβάνονται οι 13q14.2, 17p13.1 και 8q24.4 όπου εδράζονται τα γονίδια RB, p53 και RECQL4, αντιστοίχως,

τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου, όπως θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω. Αριθμητικές ανωμαλίες στις υπόλοιπες χρωμοσωμικές περιοχές που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα, αφορούν περιοχές όπου εντοπίζονται γονίδια, τα οποία σχετίζονται με μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ή γονίδια που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων, συμπεριλαμβάνεται το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα E2F3, αυξημένα επίπεδα του οποίου έχουν συνδεθεί με βλάβες στο DNA και αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων στον καρκίνο. Επιπλέον, στις παραπάνω περιοχές συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια P1M1, VEGFA, CDC5L, RUNX2, BUB2 και FGFR2, τα οποία είναι γνωστό ότι ενέχονται σε μηχανισμούς της ογκογένεσης. Οι προαναφερθείσες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικής αστάθειας, παρατηρούνται σε μεγάλο ποσοστό σποραδικών οστεοσαρκωμάτων της τάξεως του 60%, ενώ επίσης έχουν βρεθεί και σε ποσοστό 2-12% σπάνιων περιπτώσεων οστεοσαρκωμάτων, όπως είναι το μικροκυτταρικό και το τηλαγγειεκτασιακό οστεοσάρκωμα. [37]

Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις σε γονίδια που ενέχονται στον έλεγχο της μίτωσης, καθώς και η απορρύθμιση της έκφρασής τους, θεωρούνται αιτιογενείς παράγοντες της χρωμοσωμικής αστάθειας. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων RB και p53 *in vivo* επάγει τη CIN [38, 39]. Δεδομένου του σημαντικού ρόλου των προαναφερθέντων γονιδίων σε διαδικασίες ογκογένεσης, πληθώρα μελετών έστρεψε το ερευνητικό της ενδιαφέρον στη συσχέτιση μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια με το οστεοσάρκωμα.

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, μεταλλάξεις του γονιδίου TP53, που κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, έχουν συσχετιστεί σημαντικά με υψηλά επίπεδα γενωμικής αστάθειας που παρατηρούνται στο οστεοσάρκωμα. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος HOS, SAOS2, U2OS και MG63, υπέδειξαν ότι μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη λειτουργία της p53 πρωτεΐνης οδηγώντας σε CIN με σημαντικές αριθμητικές ανωμαλίες στο οστεοσάρκωμα. Συναφή ήταν και τα ευρήματα σχετικά με τη συμβολή των μεταλλάξεων του γονιδίου RB στη νόσο, όπου μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ποντικών έδειξαν ότι μεταλλάξεις του RB ενέχονται στο οστεοσάρκωμα προκαλώντας διαταραχές ελέγχου της μίτωσης, καθώς και απώλεια ετεροζυγωτίας, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της παθοφυσιολογίας της νόσου. [40] & [41]

Επιπροσθέτως, δομικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στο οστεοσάρκωμα λόγω της χρωμοσωμικής αστάθειας, φαίνεται ότι αποδίδονται σε υπερέκφραση του γονιδίου RECQL4, το οποίο κωδικοποιεί μία DNA ελικάση, ενώ ο ρόλος των μεταλλάξεων στο παραπάνω γονίδιο στην ογκογένεση παραμένει έως και σήμερα υπό διερεύνηση.

Ένας επιπλέον μηχανισμός χρωμοσωμικής αστάθειας αφορά στη διατήρηση των τελομερών ή την απώλεια αυτών, γεγονός που έχει συσχετιστεί με μειωμένη πιθανότητα καλής έκβασης σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. [42] Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των τελομερών, κατέχει το ένζυμο της τελομεράσης, η δράση της οποίας ενέχεται στην επιμήκυνση της κυτταρικής ζωής, καθώς επίσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Μελέτες αναφορικά με την παθολογία του οστεοσαρκώματος υποστηρίζουν ότι ενεργοποίηση της τελομεράσης σχετίζεται με τη χρωμοσωμική αστάθεια που παρατηρείται στη νόσο. Επιπλέον, εκτός της δράσης της τελομεράσης, σύνηθες φαινόμενο σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα είναι και ο μηχανισμός εναλλακτικής επιμήκυνση των τελομερών (Alternative Lengthening of Telomeres, ALT). Η ενεργοποίηση της τελομεράσης και η διαδικασία ALT συμβάλλουν στη διατήρηση των τελομερών στην πάθηση, με την τελευταία διεργασία να απαντάται συνήθως σε οστεοσαρκώματα που δεν σχετίζονται με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, αλλά με πιο περίπλοκες χρωμοσωμικές ανωμαλίες. [43-45] Έρευνες έχουν δείξει ότι γυναίκες με μικρότερο μήκος τελομερών εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οστεοσαρκώματος, ενώ η συντήρηση αυτών σε κυτταρικό επίπεδο έχει συνδεθεί με κακή έκβαση σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. [46] Επιπλέον, απώλεια της ενεργοποίησης της τελομεράσης ή παρουσία της διεργασίας ALT έχει συσχετιστεί με καλή πρόγνωση του οστεοσαρκώματος. Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν την τελομεράση καθώς και τα ένζυμα που καταλύουν τη διαδικασία ALT πιθανούς θεραπευτικούς στόχους του οστεοσαρκώματος.

2.3 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

2.3.1 Ο ρόλος του γονιδίου p53

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού του κυττάρου και ενεργοποιείται από μηνύματα που αφορούν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης αλλά και βλαβών του DNA. Μελέτες αναφορικά με την παθοφυσιολογία του οστεοσαρκώματος υποστηρίζουν ότι η απορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 ενοχοποιείται για την εμφάνιση της νόσου. Αυτό οφείλεται πιθανότατα σε μεταλλάξεις του γονιδίου *TP3* ή σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες στην περιοχή 17p13.1, όπου εδράζει το γονίδιο *TP3* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, που επηρεάζουν τη λειτουργία της. [36]

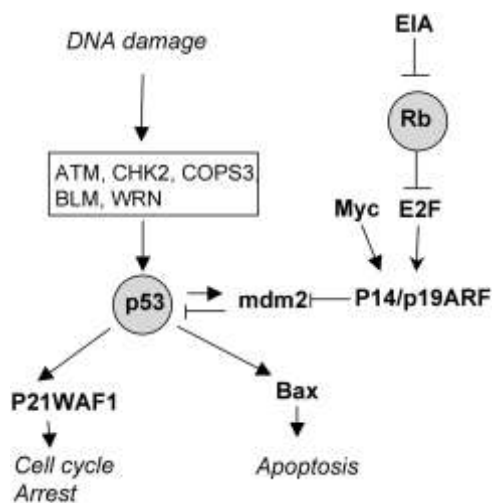
Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, άτομα με το σύνδρομο Li-Fraumeni τα οποία παρουσιάζουν μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς στο γονίδιο *TP53*, εμφανίζουν

μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης οστεοσαρκώματος. [47] Πιο συγκεκριμένα, το 12,6% των ασθενών με Li Fraumeni θα εμφανίσουν οστεοσάρκωμα κάποια στιγμή της ζωής τους. [48] Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 300 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 που ευθύνονται για την εκδήλωση οστεοσαρκώματος. Το 70% αυτών επισυμβαίνουν σε περιοχές εξωνίων και πάνω από το 75% αυτών είναι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που οδηγούν στη παραγωγή ελλειμματικής p53 πρωτεΐνης. [49] Οι παραπάνω μεταλλάξεις αφορούν σε απώλεια αλληλομόρφου (75-80%), αναδιατάξεις (10-20%), καθώς και σημειακές μεταλλάξεις (20-30%). Απώλεια ετεροζυγωτίας ή ελλείψεις στην χρωμοσωμική περιοχή 17p13.1 έχουν εντοπιστεί σε περιπτώσεις σποραδικού οστεοσαρκώματος σε ένα ποσοστό της τάξεως του 29-42%, ενώ μεταλλάξεις του TP53 παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 10-39% των ενήλικων ασθενών και σε ποσοστό 65-90% παιδιατρικών περιστατικών οστεοσαρκώματος.[50] & [51] &[5] Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι 9.5% των ασθενών ηλικίας κάτω των 30 ετών με σποραδικό οστεοσάρκωμα ήταν φορείς είτε σπάνιων μεταλλάξεων της γεννητικής γραμμής σε εξόνια του TP53 είτε των Li-Fraumeni σχετιζόμενων μεταλλάξεων, ενώ αντιθέτως οι παραπάνω μεταλλάξεις απουσίαζαν από ασθενείς που ανέπτυξαν οστεοσάρκωμα σε προχωρημένη ηλικία, προτείνοντας ότι μεταλλάξεις του TP53 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του οστεοσαρκώματος. [28]

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι άμεση απενεργοποίηση της έκφρασης του TP53 αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού p53. Λειτουργική απενεργοποίηση της p53 σε μεταφραστικό επίπεδο μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της ρύθμισης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Ειδικότερα, το ογκογονίδιο MDM2 αποτελεί έναν καλά μελετημένο αναστολέα της p53 γιατί επάγει την αποδόμησή της αλλά και την καταστολή της σε μεταγραφικά επίπεδα. [52] Συχνό εύρημα των πρωτογενών οστεοσαρκωμάτων, σε ποσοστό 2-25%, είναι η ενίσχυση του γενετικού τόπου όπου εδράζεται το γονίδιο MDM2 (12q15), ενώ σε μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε μεταστατικούς ασθενείς. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι υπερέκφραση του MDM2 στο οστεοσάρκωμα, παρέχει μία εναλλακτική προσέγγιση αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατι [28]

Αλληλεπίδραση του γονιδίου MDM2 έχει βρεθεί με τους αναστολείς των εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών (CDKI). Συγκεκριμένα, η CDKI INK4A παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς κωδικοποιεί τις p16INK4A και p14ARF, η τελευταία εκ των οποίων αναστέλλει τη δράση του MDM2 με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της p53. [52] Μελέτες έχουν δείξει ότι ομόζυγες ελλείψεις του γενετικού τόπου INK4A/ARF απαντώνται σε ποσοστό 10%, ενώ επίσης διαταραχές των p16^{INK4A}, p14^{ARF} και p15^{INK4B} έχουν διαπιστωθεί σε ποσοστό 19%, 9% και 3% των οστεοσαρκωμάτων, αντιστοίχως.

Πρόκειται κυρίως για διαταραχές που αφορούν στη μεθυλίωση, ανεμηνεύσιμες και παρεμηνεύσιμες μεταλλάξεις, ενώ απώλεια της έκφρασης της $p16^{INK4A}$ έχει συσχετιστεί με μειωμένη επιβίωση σε παιδιά με οστεοσάρκωμα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ρύθμιση του p53 στο οστεοσάρκωμα.

Κοντά στο γενετικό τόπο που εδράζεται το γονίδιο της p53, το *TP53*, εντοπίζεται η περιοχή 17p11.2-p12, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Στη συγκεκριμένη περιοχή παρατηρούνται ανωμαλίες οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένο αριθμό αντιγράφων των γονιδίων *COPS3*, *PMP22* και *MAPK7*, γεγονός που εμφανίζεται στο 20-78% των όγκων. Διαταραχές των παραπάνω γονιδίων έχουν ιδιαίτερη σημασία, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο επάγοντας την αποδόμηση της p53 από το πρωτεάσωμα συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην παθολογία του οστεοσαρκώματος. [28] & [53]

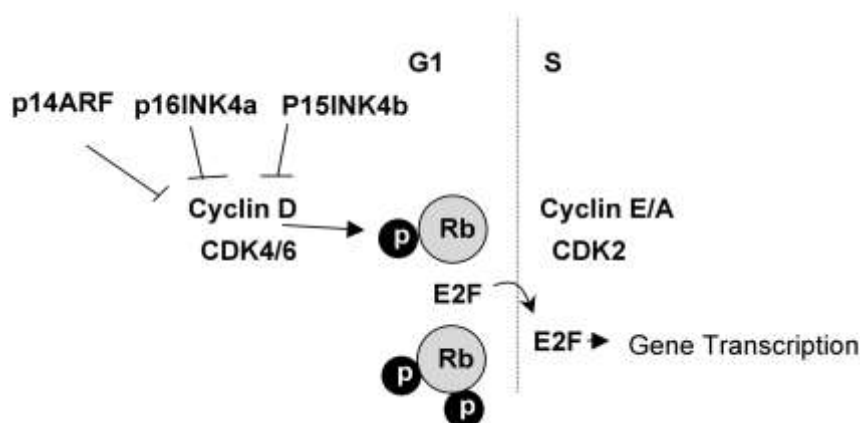
2.3.2 Ο ρόλος των γονιδίων *RB* και *RECQL4*

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος, *RB*, αποτελεί ένα από τα καλά μελετημένα γονίδια στην ογκογένεση, ενώ μεταλλάξεις του έχουν συσχετιστεί με την παρουσία του οστεοσαρκώματος. Ο ρόλος του συγκεκριμένου γονιδίου έγκειται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα κωδικοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη RB, η οποία αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, καθώς εμποδίζει την εξέλιξη του στο σημείο ελέγχου G1/S. Συγκεκριμένα, προσδένεται και εμποδίζει τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση, μια διαδικασία η οποία απαιτεί έλεγχο από τις κυκλίνες αλλά και κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Η πρωτεΐνη RB1 φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο κυκλινών

D1/CDK4 με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα δεσμευμένα μόρια E2F και να διεγείρεται η διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Οι κινάσες CDKs με τη σειρά τους ελέγχονται από μία ομάδα CDK αναστολέων, οι οποίοι εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της RB1 πρωτεΐνης από τις CDKs. Μελέτες υποστηρίζουν ότι μεταλλάξεις των CDK κινασών, καθώς επίσης και ενίσχυση των CDK γονιδίων, απαντώνται στο οστεοσάρκωμα, προτείνοντας έναν εναλλακτικό μηχανισμό απενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού RB1. [54] Μελέτες έχουν δείξει ότι απενεργοποίηση του RB1 είναι σύνηθες φαινόμενο σε περιπτώσεις σποραδικών οστεοσαρκωμάτων, ενώ όταν η αδρανοποίηση λαμβάνει χώρα στη γαμετική σειρά, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται σημαντικά. [55]

Απώλεια ετεροζυγωτίας ή έλλειψη του γενετικού τόπου όπου εδράζεται το γονίδιο *RB1* (13q14.2) εντοπίζεται σε ένα ποσοστό 19-67% των όγκων σε ασθενείς με την κληρονομημένη μορφή ρετινοβλαστώματος, υποδηλώνοντας ότι η αδρανοποίηση και των δύο *RB1* είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος. Από την άλλη μεταλλάξεις του γονιδίου απαντώνται σε ποσοστό 25-35%, οι οποίες αφορούν σημειακές μεταλλάξεις (10%) και αναδιατάξεις (30%). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ασθενείς με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα έχουν 300 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης οστεοσαρκώματος από τον γενικό πληθυσμό. [56]

Επιπλέον, γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται στο οστεοσάρκωμα έχουν συνδυαστεί με έλλειψη κυτταρικού ελέγχου και των υπόλοιπων συστατικών του μονοπατιού *RB1* [28, 36]. Κατ' επέκταση, ενίσχυση του γενετικού τόπου 12q13-14 όπου εντοπίζεται το γονίδιο *CDK4*, απαντάται σε ποσοστό 10% των όγκων, ενώ διαταραχές γονιδίων που ρυθμίζουν τη δράση του *RB1* όπως *CDKN2A/p16/INK4A*, *p14/ARF* και *CDKN2A/p16* έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος, καθώς οδηγούν σε αδρανοποίηση του *RB*. Τα παραπάνω γονίδια απαντώνται στην περιοχή 9p21, ελλείψεις της οποίας παρατηρούνται στο 5-21% των περιπτώσεων με οστεοσάρκωμα (Εικόνα 6). [57]



Εικόνα 6: Ρύθμιση του RB στο οστεοσάρκωμα. [57]

Αναφορικά με την πρωτεΐνη RECQL4, αυτή ανήκει στην οικογένεια των RecQ DNA ελικάσων. Η λειτουργία της έγκειται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA καθώς και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσής του, ενώ επίσης ενέχεται στη διατήρηση της ακεραιότητας του τελομερικού και μιτοχονδριακού DNA. Διαταραχές του γονιδίου *RECQL4* έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος. Συγκεκριμένα, απώλεια της λειτουργίας του *RECQL4* λόγω μεταλλάξεων σε άτομα με το σύνδρομο Rothmund-Thomson έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οστεοσαρκώματος, αλλά στην περίπτωση του σποραδικού οστεοσαρκώματος μεταλλάξεις του εμφανίζονται σε ποσοστό μικρότερο του 5%. Επιπλέον, αυξημένος αριθμός αντιγράφων αλλά και αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της RECQL4 έχουν περιγραφεί ως σύνηθες εύρημα της σποραδικής μορφής της νόσου. [58]&[59]

2.4 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, διαταραχές ογκογονιδίων είναι συνυφασμένες με την παθολογία του οστεοσαρκώματος. [37] Ειδικότερα, το πρωτο-ογκογονίδιο MYC που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24.12-24.13, εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο οστεοσάρκωμα και κυρίως σε μεταστατικές περιπτώσεις. Πρόκειται για ομάδα γονιδίων που ελέγχουν τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1, ενώ επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών νεοπλασιών και συμπαγών όγκων στον άνθρωπο. Δεδομένα από πειραματικά μοντέλα οστεοσαρκώματος δείχνουν ότι μικρό ποσοστό της τάξεως του 1% διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο MYC στα λεμφοκύτταρά τους, αναπτύσσουν οστεογενή σαρκώματα, καθώς φαίνεται ότι ο ενισχυτής EmSRa επάγει την έκφραση του MYC σε ανώριμους οστεοβλάστες. [60]&[61]

Ένα επιπλέον ογκογονίδιο που εμπλέκεται με τη νόσο είναι το FOS. Λειτουργικά η πρωτεΐνη c-fos διμερίζεται με μέλη της οικογένειας των Jun κινασών δημιουργώντας το σύμπλοκο μεταγραφής AP-1, ενώ επίσης ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και μετασχηματισμού. Υπερέκφραση του γονιδίου c-fos έχει αναφερθεί στο 61% των οστεοσαρκωμάτων, ενώ αυξημένα είναι τα επίπεδα έκφρασής του στο 42% των μεταστατικών περιστατικών.[61]&[62] Πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών, ενισχύουν την υπόθεση για εμπλοκή του c-fos γονιδίου στο οστεοσάρκωμα. Ποντίκια που εκφράζουν το γονίδιο κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της

μεταλλοθειονίνης (MT-c-fos-LTR) εμφάνισαν αλλοιώσεις στα μακρά οστά τους μετά από χρονικό διάστημα 2-3 εβδομάδων από τη γένεσή τους, ενώ το 15% των ζώων ηλικίας 9-10 μηνών ανέπτυξαν οστεοσάρκωμα. [63]

Επιπλέον, κυτταρικές σειρές, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί από c-fos επαγόμενους όγκους, εκφράζουν υψηλά επίπεδα εξωγενούς c-fos, καθώς επίσης και μορίων χαρακτηριστικών των κυττάρων των οστών όπως οστεοποντίνη, αλκαλική φωσφατάση και κολλαγόνο τύπου I. Όλες οι κυτταρικές σειρές ήταν ογκογονικές *in vivo*, ενώ ποσοστό αυτών έδωσε γένεση για οστεοσάρκωμα με έκφραση εξωγενούς c-fos, υποδεικνύοντας ότι αυξημένη του έκφραση διεγείρει μονοπάτια ελέγχου της ανάπτυξης σε οστεοβλαστικά κύτταρα, ενώ επίσης τροποποιεί το φαινότυπο των οστεβλαστών. Επιπλέον, ποντίκια με απώλεια του λειτουργικού c-fos, έχει δείχθει ότι αναπτύσσουν οστεοπέτρωση (osteopetrosis) προτείνοντας ότι το γονίδιο *FOS* είναι σημαντικό για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οστού. [64]

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ποντίκια με έλλειψη της ριβοσωμικής πρωτεΐνης κινάσης S6 (RSK2) αναπτύσσουν οστεοπενία που σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της Phex, μιας ενδοπεπτιδάσης που ενέχεται στη ρύθμιση της ορυκτοποίησης των οστών. Έρευνες έχουν αναφέρει ότι σε περιπτώσεις έλλειψης της RSK2, η ανάπτυξη c-fos εξαρτώμενου οστεοσαρκώματος απορρυθμίζεται. Επιπροσθέτως, απώλεια της φωσφορυλίωσης του c-fos έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασής του, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση των οστεοβλαστών. [65] Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις μεταξύ RSK2 και c-fos φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό του οστεοσαρκώματος σε ποντίκια, ενώ επίσης πιθανώς να σχετίζεται και με την ανάπτυξή του στον άνθρωπο.

Περαιτέρω έρευνες έχουν υποδείξει τρία επιπλέον ογκογονίδια, διαταραχές των οποίων εμπλέκονται στην παθολογία της νόσου. Πρόκειται για το γονίδιο *GLI1* που κωδικοποιεί μια σχετιζόμενη με το γλοίωμα πρωτεΐνη, το γονίδιο της πρωτεϊνικής κινάσης επαγόμενης από μιτογόνα, *MAPK7*, και το γονίδιο της περιφερικής μυελίνης, *PMP22/GAS3*. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με το γονίδιο *GLI1*, διαταραχές της έκφρασής του έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις των οστών, καθώς αυξημένα επίπεδά του έχουν αναφερθεί σε σαρκώματα συμπεριλαμβανομένου και του οστεοσαρκώματος. Επιπλέον, ανωμαλίες στο γενετικό τόπο που εδράζεται το γονίδιο *MAPK7* απαντώνται σε ποσοστό 53% των ασθενών, ενώ διαταραχές στη χρωμοσωμική περιοχή του *PMP22/GAS3* σχετίζονται με υψηλού βαθμού οστεοσαρκώματα. [66]

2.5 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΟΣΤΙΚΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθοφυσιολογίας του οστεοσαρκώματος αποτελεί η απορρύθμιση της διαφοροποίησης των οστών. Το παραπάνω αποτέλεσε κίνητρο για ερευνητικές ομάδες να επικεντρώσουν το ενδιαφέρον τους στη διερεύνηση του ρόλου πρωτεϊνών της οστικής ομοιόστασης στο οστεοσάρκωμα. Μεταξύ των γονιδίων που ενέχονται στην οστική ομοιόσταση, συμπεριλαμβάνεται το RUNX2 που συνιστά γνωστό ρυθμιστή της ανάπτυξης του οστού. Το RUNX2 είναι μεταγραφικός παράγοντας που επάγει την έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών του φαινοτύπου των οστεοβλαστών όπως τα γονίδια της οστεοκαλσίνης, της αλκαλικής φωσφατάσης και το γονίδιο του κολλαγόνου τύπου I. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της RB αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί το RUNX2, ενώ απώλεια της pRB εξασθενεί την τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών *in vitro*. Συνέπεια των παραπάνω είναι το γεγονός ότι το RUNX2 ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου επάγοντας τον αναστολέα της κινάσης CDK2, τον p27^{KIP1}, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οστού *in vitro* και *in vivo*, ενώ η έκφρασή του έχει δείχθει να χάνεται στο αποδιαφοροποιημένο οστεοσάρκωμα στον άνθρωπο. Αναφορικά με το ρόλο του RUNX2 στην ογκογένεση, φαίνεται ότι αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία. Μελέτες έχουν δείξει ότι το RUNX2 συνεργάζεται με το ογκογονίδιο c-MYC και επάγει λέμφωμα σε ποντίκια, καθώς επίσης πιθανότατα διεγείρει και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.[67-69] Βασισμένες στα παραπάνω οι ερευνητές υποθέτουν ότι πιθανώς να εμπλέκεται και στην παθολογία του οστεοσαρκώματος συμμετέχοντας σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

Ένα επιπλέον γονίδιο με σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στο σχηματισμό του οστού, είναι το osterix (*Osx*). Μελέτες έχουν δείξει ότι το RUNX2 ενεργοποιεί το γονίδιο *Osx* υποδεικνύοντας ότι το τελευταίο αποτελεί γονίδιο-στόχο του RUNX2. Επιμόλυνση κυττάρων οστεοσαρκώματος με το γονίδιο *Osx* σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου *in vitro*, καθώς επίσης οδήγησε σε μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης όγκου και μετάστασης *in vivo* [68]. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ρόλο του *Osx* και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, δεδομένου ότι επαγωγή του *Osx* σε στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών σε αρουραίους, οδήγησε σε αύξηση του πολλαπλασιασμού τους, καθώς επίσης σε αύξηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης και της ικανότητας για δημιουργία οζιδίων οστού .[70]

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οστού, η έκφραση του RUNX2 φαίνεται ότι προηγείται της εμφάνισης του οστεοβλαστικού φαινοτύπου κατά 4 ημέρες. Έρευνες έχουν δείξει ότι κύτταρα που εκφράζουν RUNX2, εκφράζουν επίσης τις πρωτεΐνες της οικογένειας Twist (Twist-1, Twist-2), ενώ η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων χαρακτηριστικών των οστεοβλαστών παρατηρείται μετά τη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών Twist. Τα

παραπάνω καθιστούν την αναστολή της έκφρασης των *Twist* πρωτεϊνών υποχρεωτικό γεγονός που προλαμβάνει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Το γονίδιο *Twist*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7, έχει διερευνηθεί για γονιδιακές ανωμαλίες σε περιπτώσεις παιδιατρικού οστεοσαρκώματος. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι διαταραχές του *Twist* σχετίζονται με τη νόσο, ενώ επίσης απώλειά του συσχετίστηκε με κλινικά χαρακτηριστικά του οστεοσαρκώματος όπως η κακή έκβασή του. [71]&[72]

2.6 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΟ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Το ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με την παθολογία του οστεοσαρκώματος έχει επίσης στραφεί στη μελέτη γονιδίων της ανάπτυξης. Ειδικότερα, μελέτες έχουν δείξει ότι απώλεια ετεροζυγωτίας του υποδοχέα 2 του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (Fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2) στο γενετικό τόπο 10q26 σχετίζεται με υψηλού βαθμού οστεοσαρκώματα, καθώς επίσης χρωμοσωμική του αναδιάταξη έχει βρεθεί σε κύτταρα οστεοσαρκώματος σε αρουραίους. Ο FGFR2 παίζει ρόλο-κλειδί στη μορφογένεση του οστού, ενώ μεταλλάξεις του συνδέονται με σκελετικές δυσπλασίες. Παρ'όλες τις ενδείξεις ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο του FGFR2 πιθανώς προδιαθέτουν στην ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος, ο ακριβής του ρόλος στην παθολογία της νόσου παραμένει αδιευκρίνιστος. [73]

Διαδικασίες που αφορούν στην ανάπτυξη του οστού, περιλαμβάνουν επίσης τη δράση γονιδίων της οικογένειας των μορφογενετικών πρωτεϊνών του οστού (Bone morphogenetic proteins, BMPs). Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ή τους υποδοχείς τους, οδηγούν σε σκελετικές ανωμαλίες και νεοπλασίες, ενώ υπερέκφραση του υποδοχέα BMPR-II έχει συσχετιστεί με φτωχή πρόγνωση μεταστατικών όγκων των οστών. [74] Επιπροσθέτως, έρευνες υποστηρίζουν ότι με υψηλού βαθμού οστεοσάρκωμα στον άνθρωπο σχετίζεται το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (Transforming growth factor beta, TGF-β), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη. Έκφραση και των τριών ισομορφών του γονιδίου, TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3, έχει βρεθεί στο οστεοσάρκωμα με τα επίπεδα των TGF-β1 και TGF-β3 να είναι μεγαλύτερα του TGF-β2, ενώ η έκφραση του TGF-β3 έδειξε ισχυρή συσχέτιση με την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η αυξημένη έκφραση του TGF-β2 και TGF-β3, καθώς και του αγγειακού αυξητικού παράγοντα ενδοθηλιακών κυττάρων (Vascular endothelial growth factor, VEGF) σχετίζονται με το βαθμό του οστεοσαρκώματος, ενώ μόνο η έκφραση του VEGF συνδέθηκε με την επιβίωση. [75]

Διαταραχές των γονιδίων *wingless* (*Wnt*) έχουν επίσης διερευνηθεί για το ρόλο τους στο οστεοσάρκωμα. Τα γονίδια *Wnt* κωδικοποιούν μία ομάδα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν αρκετές διαδικασίες της ανάπτυξης και καρκινογένεσης, ενώ έκφραση αυτών αλλά και των υποδοχέων τους (*Fz18*, *Fz110*, *LRP5*) έχει βρεθεί σε προγονικά κύτταρα των οστών. Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται ότι γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης που επάγεται από τα *Wnt* γονίδια, ενέχονται στην εμφάνιση οστεοσαρκώματος. Ειδικότερα, ο πυρηνικός εντοπισμός της β-κατενίνης, γονιδίου-στόχου των *Wnt*, σχετίζεται με μεταστατικό οστεοσάρκωμα, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα *LRP5* έχουν παρατηρηθεί στο οστεοσάρκωμα και έχουν συνδεθεί με μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Τέλος, έκφραση του αγωνιστή των *Wnt*, *DKK3*, οδήγησε σε περιορισμό της διήθησης και κινητικότητας του οστεοσαρκώματος στις κυτταρικές σειρές *SAOS2*. [76-78]

2.7 ΔΙΗΘΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑΤΟΣ

Η μετάσταση αποτελεί την κύρια αιτία της θνησιμότητας στο οστεοσάρκωμα. Οι πρωταρχικοί όγκοι γίνονται επιθετικοί όταν χάνουν την επαφή τους με το γονικό ιστό, ενώ πολλαπλά βήματα εμπλέκονται στη διήθηση και μετάσταση του όγκου συμπεριλαμβανομένου της απόσπασης των κυττάρων από τον πρωταρχικό όγκο, διήθηση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, αγγειογένεση, εξάπλωση και πολλαπλασιασμός σε νέες τοποθεσίες. Στις παραπάνω διεργασίες ενέχονται πολλά γονίδια που παίζουν κυρίως ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, στην προσκόλληση των κυττάρων στην θεμέλια ουσία αλλά και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών. [2]&[79]

Ένα από τα γονίδια που συμμετέχει στις παραπάνω διαδικασίες, είναι το γονίδιο της νευροϊνωμάτωσης, *NF2*. Πρόκειται για ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *merlin*, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τις πρωτεΐνες *ERM* (*erzin*, *radixin*, *moesin*) και δρα ως ογκοκατασταλτική. Ποντικοί με γονότυπο *Nf2^{-/-}* πεθαίνουν νωρίς στην εμβρυογένεση σε αντίθεση με ποντικούς *Nf2^{+/+}* οι οποίοι αναπτύσσουν μεταστατικούς όγκους συμπεριλαμβανομένου του οστεοσαρκώματος με μεγάλης διάρκειας λανθάνουσες περιόδους. [79] Η πρωτεΐνη *merlin* συμμετέχει στην αναστολή της ανάπτυξης μέσω σηματοδοτικών μηνυμάτων από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Σε περιπτώσεις μεγάλης κυτταρικής πυκνότητας, η *merlin* υποφωσφορυλιώνεται και εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη ως απόκριση στο υαλουρονικό, έναν βλεννοπολυσακχαρίτη που περιβάλλει τα κύτταρα. Η ανασταλτική της δράση εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις με την *CD44*, ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα του υαλουρονικού. Αντιθέτως, όταν η κυτταρική πυκνότητα μειώνεται, η *merlin* φωσφορυλιώνεται και σχηματίζει σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες *erzin*, *moesin* και *CD44*. Ως εκ τούτου, το σύμπλοκο λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο ή πολλαπλασιασμό.[2] Έχει βρεθεί ότι σε περισσότερα αποδιαφοροποιημένα οστεοσαρκώματα,

παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της CD44. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη merlin ελέγχει τη σταθεροποίηση της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Απώλεια αυτής της λειτουργίας οδηγεί σε αλλοιωμένη μορφογένεση του ιστού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, καθώς και σε ογκογένεση και μετάσταση σε ενήλικους ιστούς, υποδηλώνοντας και τον πιθανό της ρόλο στην παθολογία του οστεοσαρκώματος. Ο ρόλος της στη νόσο ενισχύεται περαιτέρω από δεδομένα που δείχνουν αλληλεπίδρασή της με ένα βασικό μόριο του οστεοσαρκώματος και συγκεκριμένα υποστηρίζουν ότι το αμινοτελικό άκρο της merlin αυξάνει τη σταθερότητα της p53 αναστέλλοντας την αποδόμησή της που επάγεται από το γονίδιο MDM2. [80-82]

Μία επιπλέον πρωτεΐνη που ενέχεται στη μετάσταση του οστεοσαρκώματος είναι η erzin, η οποία έχει συσχετιστεί με κακή έκβαση σε περιπτώσεις παιδιατρικού οστεοσαρκώματος. Σε πειραματικό μοντέλου ποντικού, το οποίο είχε δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας κύτταρα που διαφοροποιούνταν σε μεταστατικά, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της erzin σε πολύ επιθετικά και μεταστατικά κύτταρα συγκριτικά με τα λιγότερο επιθετικά, προτείνοντας ότι η erzin παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του οστεοσαρκώματος.[81] Επιπλέον της erzin, μία ακόμη πρωτεΐνη η DCC, η οποία ενέχεται στην κυτταρική διαφοροποίηση και σε αναπτυξιακές διαδικασίες, έχει συσχετιστεί με τη νόσο. Τα μέχρι στιγμής ευρήματα δείχνουν ότι η DCC παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης ή και απώλεια αυτών σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος αλλά και σε υψηλού βαθμού οστεοσαρκώματα. [83]

Σύμφωνα με τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, φαίνεται ότι στη μετάσταση στο οστεοσάρκωμα, εμπλέκονται και γονίδια που σχετίζονται με αποικοδομητικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 (MMP-2 και MMP-9), τα οποία έχουν συσχετιστεί με την μεταστατική ικανότητα των κυττάρων.[84] Ειδικότερα, φαίνεται ότι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (Tumor necrosis factor, TNF α) επάγει την έκφραση της MMP-9 σε κύτταρα του οστεοσαρκώματος προωθώντας τη μετάσταση. Επιπλέον, η έκφραση των παραπάνω μεταλλοπρωτεϊνών στο οστεοσάρκωμα στον άνθρωπο επάγεται και από την ενδοθηλίνη-1 (ET-1) μέσω του πυρηνικού παράγοντα NF κ B. Η ET-1 δρα ως αυτοκρινής μεσολαβητής, ενώ αναστολή του ET-A υποδοχέα έχει προστατευτικό ρόλο καθώς μειώνει τη διήθηση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος. [85]&[86] Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα της MMP-1 συσχετίζονται με πτωχή πρόγνωση στο οστεοσάρκωμα, ενώ υπερέκφραση του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-1 συνδέεται με κακή κλινική έκβαση στους ασθενείς. Τα επίπεδα του αναστολέα έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό ασθενών με οστεοσάρκωμα, ενώ φαίνεται ότι προωθεί την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα. Η παραπάνω

ιδιότητα του αναστολέα είναι ανεξάρτητη των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς έχει βρεθεί ότι πρόσδεσή του σε άγνωστο υποδοχέα επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf1/FAK στο οστεοσάρκωμα [87]&[88]. Τα παραπάνω υποδηλώνουν έναν διπλό ρόλο του TIMP-1 στη νόσο είτε προστατευτικό, αναστέλλοντας τη δράση των MMP-2 και MMP-9 είτε ανασταλτικό για την κυτταρική επιβίωση.

2. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

3.1 Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Η φαρμακογενετική συνιστά έναν ταχύτατα αναπτυσσόμενο κλάδο, ο οποίος μελετά την επίδραση γενετικών παραγόντων στην απόκριση των ασθενών στη φαρμακευτική αγωγή και ειδικότερα την επίδρασή τους στο μεταβολισμό και τη δράση των φαρμάκων. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1959 από το Γερμανό γενετιστή Vogel προκειμένου να περιγράψει την ύπαρξη γενετικών διαφορών που σχετίζονται με τη δράση των φαρμάκων. Ειδικότερα, η ανάπτυξη της φαρμακογενετικής έγκειται στην παρατήρηση ότι πρωτεΐνες και ένζυμα τα οποία ρυθμίζουν την αντίδραση του ατόμου στα φάρμακα, εμφανίζουν λειτουργικές διαφορές που οφείλονται σε γενετικούς πολυμορφισμούς. [89]&[90]

Σκοπός της φαρμακογενετικής είναι να μελετήσει τις φαρμακολογικές και τοξικολογικές επιδράσεις των ατομικών γενετικών διαφορών μέσα από το λεπτομερή χαρακτηρισμό της μοριακής και βιοχημικής τους δράσης. Η θεραπευτική σημαντικότητα της φαρμακογενετικής έγκειται στην ανάλυση του γενετικού προφίλ του κάθε ασθενούς, ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας η οποία θα εξασφαλίσει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, καθώς επίσης θα περιορίσει τις ανεπιθύμητες παρενέργειες (Εικόνα 7) [89]



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του στόχου της φαρμακογενετικής

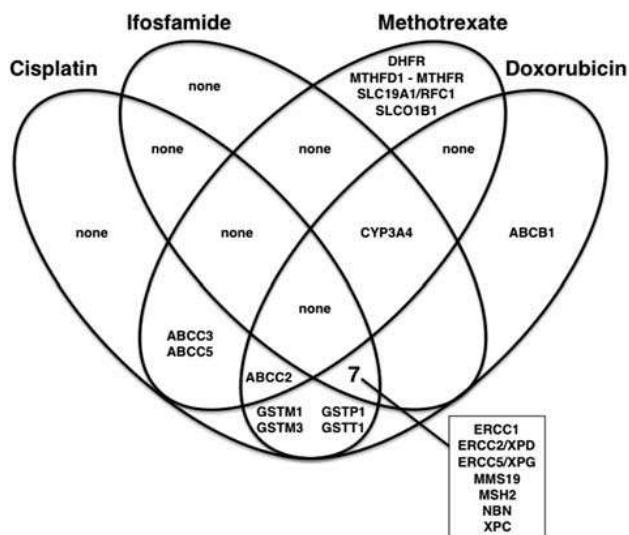
Ο θεραπευτικός στόχος της φαρμακογενετικής έγκειται στην ανάπτυξη βιοδεικτών οι οποίοι αφενός θα συμβάλλουν στη διερεύνηση της μη ικανοποιητικής απόκρισης του

ασθενούς στη φαρμακευτική αγωγή και αφετέρου στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης που εμφανίζει ο ασθενής στα φάρμακα, παρέχοντας πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα τους. [89] Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, φαίνεται ότι υπάρχει μία πληθώρα γενετικών πολυμορφισμών οι οποίοι επηρεάζουν την ανταπόκριση των ασθενών στα φάρμακα επηρεάζοντας τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική τους. Πρόκειται για γενετικούς πολυμορφισμούς που επιδρούν στην απορρόφηση του φαρμάκου και στην κατανομή του στους διάφορους ιστούς, καθώς επίσης επηρεάζουν το μεταβολισμό και την απέκκρισή του. Επιπλέον, μελέτες έχουν υποδείξει έναν σημαντικό αριθμό πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα βιομετατροπής των φαρμάκων, καθώς και πρωτεΐνες που δρουν ως αντλίες εκροής/εισροής και επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων, όπως πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των ABC και SLC μεταφορέων, οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια. [90]&[91]

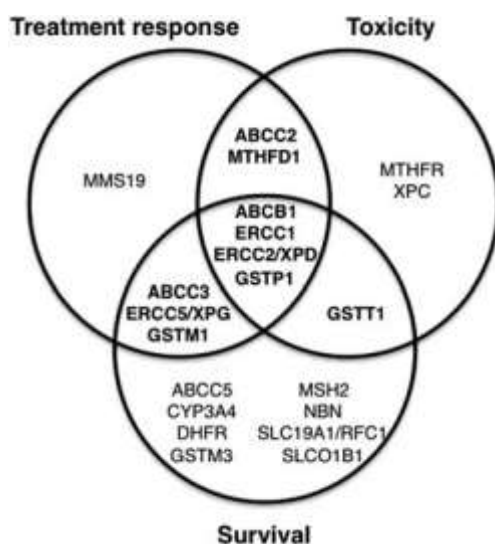
3.2 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΣΑΡΚΩΜΑ

Η φαρμακογενετική της θεραπείας του καρκίνου επικεντρώνεται στην μεταβλητότητα της ανταπόκρισης του φαρμάκου, ανάλογα με το «γενετικό προφίλ» του ατόμου, σε σχέση με την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα. [21] Στην περίπτωση του οστεοσαρκώματος, η αποτελεσματικότητα, ως επί το πλείστο, διερευνάται ως επιβίωση και ιστολογική απόκριση του όγκου σε προ-χειρουργική χημειοθεραπεία, ενώ μελέτες σχετικά με την τοξικότητα επικεντρώνονται στην ωτοτοξικότητα και καρδιοτοξικότητα. Μέχρι σήμερα, διαφορετικές προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων των μελετών ανάλυσης υποψηφίων γονιδίων, μελετών ανάλυσης του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS) και μελετών ανάλυσης βασισμένες σε σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να διερευνηθούν φαρμακογενετικοί δείκτες στο οστεοσάρκωμα. [8] Η πλειοψηφία των μελετών επικεντρώθηκε σε γονίδια που εμπλέκονται στη φαρμακοκινητική της MAP θεραπείας, η οποία περιλαμβάνει μεταφορείς και ένζυμα που μεταβολίζουν το φάρμακο, ενώ ένας αριθμός ερευνών εστίασε στη φαρμακοδυναμική κυρίως της σισπλατίνης, αντικαρκινικού χημειοθεραπευτικού φαρμάκου που προκαλεί βλάβες στη λειτουργία του κυττάρου παρεμποδίζοντας το πολλαπλασιασμό, τη διαίρεση και την επιβίωσή του. Ο απώτερος στόχος της φαρμακογενετικής στο οστεοσάρκωμα είναι η δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης, το οποίο θα ενσωματώνει τις γενετικές πληροφορίες που θα επιτρέπουν τη διασταύρωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου, καθώς και το σχεδιασμό εξατομικευμένης θεραπείας. Για το παραπάνω σκοπό, οι φαρμακογενετικές μελέτες στο οστεοσάρκωμα διερεύνησαν είτε την επίδραση της φαρμακογενετικής στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου είτε την επίδρασή της στην τοξικότητα της φαρμακευτικής αγωγής, υποδεικνύοντας συσχέτιση ενός σημαντικού αριθμού

πολυμορφισμών σε γονίδια, που συμμετέχουν στο μεταβολισμό ή στην απέκκριση του φαρμάκου, με το οστεοσάρκωμα. (Εικόνα 8 & Εικόνα 9) [21]



Εικόνα 8: Γονίδια των οποίων πολυμορφισμοί έχουν συσχετιστεί με την απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία, καθώς και με την επιβίωσή τους ή/και την τοξικότητα στο οστεοσάρκωμα σε σχέση με τη φαρμακευτική αγωγή. [21]



Εικόνα 9: Γονίδια των οποίων πολυμορφισμοί έχουν συσχετιστεί με κλινικό αποτέλεσμα στην απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία, καθώς και στην επιβίωση την τοξικότητα. [21]

3.3 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Φαρμακογενετικές μελέτες στο οστεροσάρκωμα έχουν εστιάσει κυρίως σε υποψήφια γονίδια τα οποία ενέχονται στη μεταφορά του φαρμάκου, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA καθώς και σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης. Συνοπτικά οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [8]

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά φαρμακογενετικών μελετών για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα.

No. of osteosarcoma patients (of total)	Ethnic origin: nationality	Drugs*	Outcome investigated	Genes investigated	Associated variant(s)	(Possible) functional role of genetic variant
n = 91	NS; Spanish	M, A, P (VCR, CTX, ACD)	HR, EFS	ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, XPA, XPC	ERCC2 rs13181	Unknown (controversial)
n = 130	NS; Italian	M, A, P, I	EFS, OS	ERCC1, ERCC2, ERCC5	ERCC2 rs13181 ERCC2 rs1799793	Unknown (controversial) DNA repair capacity ↓
n = 66 ^b	Caucasian; Slovenian	A, P (M, I, C)	HR, EFS, OS	ERCC1, ERCC2, GSTM1, GSTP1, GSTT1, NBN, RAD51, XRCC3	ERCC2 rs1799793 GSTP1 rs1138272 NBN CGA haplotype	DNA repair capacity ↓ Unknown DNA repair capacity ↓
n = 182	NS; Chinese	M, A/P, CTX, VCR	CR, PFS, OS	CCNH, ERCC5, ERCC6, MMS19L, XPC	ERCC5 rs1047768 MMS19L rs29001322	Unknown Unknown
n = 172	NS; Chinese	NS	HR, OS	ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, XPA, XPC	ERCC1 rs11615 ERCC1 rs2298881	ERCC1 expression ↓ ERCC1 expression ↓
n = 185	NS; Chinese	M, A, P	CR, OS	MMS19L, XPC, ERCC5	ERCC5 rs2296147 MMS19L rs29001322	Putative p53 recognition site Unknown
n = 260	NS; Chinese	P, other NS	HR, OS	ERCC1, ERCC2	ERCC1 rs11615	ERCC1 expression ↓
n = 146	Asian; Chinese	NS	OS	ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5	ERCC1 rs11615 ERCC2 rs1799793	ERCC1 expression ↓ DNA repair capacity ↓
n = 115	NS; Chinese	P, other NS	CR, OS	ERCC2	ERCC2 rs1799793	DNA repair capacity ↓
n = 267	NS; Chinese	M, A, P	EFS, OS	ERCC1, ERCC2	ERCC1 rs11615 ERCC2 rs13181	ERCC1 expression ↓ Unknown (controversial)
n = 186	NS; Chinese	P, other NS	HR, OS	ERCC1, ERCC2	ERCC1 rs11615 ERCC2 rs1799793	ERCC1 expression ↓ DNA repair capacity ↓
n = 214	NS; Chinese	P, other NS	HR, OS	ERCC1, ERCC2, NBN, RAD51, XRCC3	ERCC1 rs11615	ERCC1 expression ↓
n = 168	NS; Chinese	M, A, P, CTX, VCR	CR, OS	CCNH, ERCC5, MMS19L, XPC	ERCC5 rs2296147 MMS19L rs29001322	Putative P53 recognition site Unknown
n = 80	White, Asian, brown, black unspecified; Brazilian	C, A, P, I	OS	GSTM1, GSTM3, GSTT1	GSTM1 null GSTM3*8 GSTT1 null	No enzyme activity Enzyme availability ↑ No enzyme activity
n = 66 ^b	Caucasian; Slovenian	A, P (M, I, C)	EFS, OS	REV1, REV3L	REV1 rs3087403 REV3L CGG haplotype	Unknown Unknown
n = 187	NS; Chinese	M, A, P, I	CR, OS	ERCC1, ERCC2, GSTP1	ERCC2 rs13181 GSTP1 rs1695	Unknown (controversial) Enzyme activity ↓
n = 159	NS; Chinese	C, A, P, I	EFS, OS	GSTM1, GSTP1, GSTT1	GSTP1 rs1695	Enzyme activity ↓
n = 146	NS; Chinese	M, A, P (ACD, VCR)	HR, OS	GSTM1, GSTP1, GSTT1	GSTP1 rs1695	Enzyme activity ↓
n = 62	NS; Norwegian	M, A, P, I (E)	OS, distant relapse	ABCG2, DHFR, MTHFR, RFC1	RFC1 rs1051266 DHFR rs1053129	MTX uptake ↓ Unknown
n = 186	NS; Chinese	M, A, P (ACD, VCR)	HR, PFS, OS	ABCB1, ABCB1, ABCB3, GSTM1, GSTP1, GSTT1	ABCB1 rs1128503 ABCB3 rs4148416 GSTP1 rs1695	Unknown, controversial Unknown Enzyme activity ↓
n = 162	NS; Chinese	M, A, P (ACD, VCR)	HR, OS	ABCB1, GSTM1, GSTP1, GSTT1	ABCB1 rs1128503 GSTP1 rs1695	Unknown, controversial Enzyme activity ↓
n = 182	Asian; Chinese	M, A, P (ACD, VCR)	PFS, OS	ABCB1, ABCB3, ABCG2	ABCB1 rs1045642	P-glycoprotein activity ↓
n = 208	NS; Chinese	M, A, P (ACD, VCR)	HR, DFS, OS	ABCB1, ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCG2	ABCB1 rs1128503 ABCB3 rs4148416	Unknown, controversial Unknown
n = 177	Caucasian; Dutch	(M) A, P (I, E)	HR, PFS	54 genes from A and P pharmacological pathways	FASL rs763110 MSH2 rs4638843 ABCC5 rs939338 CASP3 rs2720376 CYP3A4 rs4646437	FASL expression ↓ Unknown ABCC5 expression ↑, AP resistance CASP3 expression ↓ Unknown
n = 91	NS; Spanish	M, A, P (VCR, CTX, ACD)	HR, EFS, OS	24 genes from M, A, P, VCR, CTX pharmacological pathways	ABCB1 rs4148737 ABCB1 rs1128503 ABCB1 rs10276036 ABCC3 rs4148416	Unknown Unknown (controversial) Unknown Unknown
n = 50	Caucasian, Afro-Caribbean, Indian/Asian; English	M, A, P	HR, PFS	21 genes from M, A, P pharmacological pathways	GSTP1 rs1695 ABCC2 rs717620 MTHFD1 rs1950902	Enzyme activity ↓ ABCC2 efflux activity ↓ Unknown

Συντομεύσεις: NS=μη καθορισμένο, HR=ιστολογική απόκριση, OS=συνολική επιβίωση, EFS=επιβίωση χωρίς παρενέργειες, PFS=επιβίωση χωρίς εξέλιξη, DFS=επιβίωση χωρίς ασθένεια, CR=κλινική απόκριση (πλήρης/μερική απόκριση έναντι σταθερής/προοδευτικής νόσου), M=μεθοτρεξάτη, A=δοξορουβικίνη, P=σιπλατίνη, I=ιφωσφαμίδη, E=ετοποσίδη, VCR=βινκριστίνη, CTX=κυκλοφωσφαμίδη, ACD=ακτινομυκίνη D, C=καρβοπλατίνη.

3.3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ-ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ

Πολλές ερευνητικές ομάδες μελέτησαν το ρόλο γενετικών παραλλαγών σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς των φαρμάκων στην αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος. Σε μία πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα Caronia και συν., αξιολογήθηκαν 346 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σε 24 γονίδια που εμπλέκονται στα μεταβολικά μονοπάτια MAP, βινκριστίνης και κυκλοφωσφαμίδης. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs4148416 του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη-μεταφορέα ABCC3 (ATP-binding cassette 3), καθώς και οι 3 πολυμορφισμοί rs4148737, rs1128503 και rs10276036 του γονιδίου ABCB1 συσχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση και την επιβίωση χωρίς παρενέργειες. Η πρωτεΐνη ABCC3 εντοπίζεται στο ήπαρ, στη χοληδόχο κύστη, το έντερο και τους νεφρούς και είναι γνωστός μεταφορέας της μεθοτρεξάτης, ενώ επίσης ενέχεται και στη μεταφορά των φαρμάκων σιπλατίνη, δοξορουβικίνη και βινκριστίνη που χορηγούνται για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος [92]

Η πρωτεΐνη ABCB1 κωδικοποιεί την P-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ενέχεται στην απέκκριση των φαρμάκων μέσω της χολής και του νεφρού, ενώ επίσης αυξημένη έκφρασή της έχει παρατηρηθεί σε πολλούς όγκους συμπεριλαμβανομένων ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα οστεοσαρκωμάτων. Παρόλο που η P-γλυκοπρωτεΐνη είναι γνωστός μεταφορέας της μεθοτρεξάτης, δοξορουβικίνης και βινκριστίνης, σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος δεν έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος της στην αντίσταση της μεθοτρεξάτης. [93] Επίσης σύμφωνα με φαρμακογενετικές μελέτες, η πρωτεΐνη ABCB1 χρήζει κλινικής σημασίας καθώς υπερέκφρασή της αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό αντίστασης στην δοξορουβικίνη σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι σε ασθενείς με υψηλού βαθμού μη-μεταστατικό οστεοσάρκωμα, οι οποίοι ακολούθησαν συμβατικά πρωτόκολλα χημειοθεραπείας, υπερέκφραση της ABCB1 πρωτεΐνης συσχετίστηκε με αντίστροφο κλινικό αποτέλεσμα καθιστώντας την ABCB1 σημαντικό προγνωστικό δείκτη. [94] Πειραματικά δεδομένα οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι προαναφερθέντες πολυμορφισμοί επηρεάζουν την εκροή των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και κατ' επέκταση την αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής. Ωστόσο μέχρι και σήμερα, άγνωστες παραμένουν οι λειτουργικές συνέπειες των παραπάνω πολυμορφισμών. Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύθηκαν περαιτέρω

σε μία μελέτη που διεξήχθη σε πληθυσμό Κινέζων, όπου φορείς του αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού rs1128503 του γονιδίου της *ABCB1*, καθώς και άτομα με το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού rs4148416 στο γονίδιο της *ABCC3* παρουσίαζαν χαμηλή ιστολογική απόκριση και αυξημένο κίνδυνο για επιδείνωση του οστεοσαρκώματος, ενώ επίσης συσχετίστηκαν με υψηλότερο κίνδυνο θανάτου. Παρόλα αυτά, αντικρουόμενα ήταν τα αποτελέσματα δύο μεταγενέστερων μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε πληθυσμό Κινέζων, οι οποίες υπέδειξαν ότι το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs1128503 της *ABCB1* σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου, ενώ συσχέτιση δεν βρέθηκε αναφορικά με το πολυμορφισμό rs4148416 της *ABCC3*. [93]&[94]&[96]

Ο ρόλος του γονιδίου της *ABCB1* αποτέλεσε την αφορμή ώστε το συγκεκριμένο γονίδιο να γίνει στόχος κλινικών μελετών οι οποίες έχουν προχωρήσει στη φάση III. Στόχος των μελετών είναι η αναστολή της *ABCB1* με τη χρήση αναστολέων όπως η ουσία CTB-1, η κουρκουμίνη, καθώς και αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Τα ευρήματα που προέρχονται από ανθρώπινα μοντέλα οστεοσαρκώματος με τη χρήση κυτταρικών σειρών, παρέχουν σημαντικές ενδείξεις και ανοίγουν το δρόμο σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να αποκλειστούν πιθανές ανεπιθύμητες παρενέργειες καθώς και η πρόκληση τοξικότητας. [95]

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 62 ασθενείς με οστεοσάρκωμα επικεντρώθηκε σε γονίδια που ενέχονται με το μεταβολισμό της μεθοτρεξάτης. Σύμφωνα με τα ευρήματα της τελευταίας μελέτης, συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της επιβίωσης μετά από χημειοθεραπεία με μεθοτρεξάτη και τον μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs1051266 στο γονίδιο του μειωμένου μεταφορέα φολικού (*RFC1*) [97]

3.3.2 ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Μεγάλος αριθμός μελετών για το οστεοσάρκωμα επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της φαρμακογενετικής σχετικά με γονίδια που ενέχονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Ειδικότερα, ένα σύνολο μελετών εστίασε σε πολυμορφισμούς των γονιδίων της ομάδας excision repair cross-complementation group *ERCC1*, *ERCC2* και *ERCC5* και τη σχέση τους με την απόκριση των ασθενών στη φαρμακευτική αγωγή της δοξορουβικίνης, σισπλατίνης και ισοφωσφαμίδης. Αναφορικά με το γονίδιο *ERCC1*, μελέτες υπέδειξαν συσχέτιση του πολυμορφισμού rs11615 με το οστεοσάρκωμα, αλλά μόνο σε πληθυσμούς Κινέζων. Σύμφωνα με τα ευρήματα, ο γονότυπος CC σχετίζεται με καλή απόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία με σισπλατίνη και υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης συγκριτικά με το γονότυπο TT. Συσχέτιση επίσης βρέθηκε και με δύο άλλους μονονουκλεοτιδικούς

πολυμορφισμούς του γονιδίου *ERCC1*. Πιο συγκεκριμένα, φορείς του αλληλομόρφου A του πολυμορφισμού rs3212986 φαίνεται να εμφανίζουν λευκοπενία μετά από θεραπεία με δοξορουβικίνη, ενώ φορείς του αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού rs229881 και συγκεκριμένα άτομα με γονότυπο AC ή CC παρουσιάζουν πτωχή απόκριση στη χημειοθεραπεία συγκριτικά με το γονότυπο AA. [21]&[101]

Συσχέτιση επιπλέον βρέθηκε και με πολυμορφισμούς του γονιδίου *ERCC2*. Συγκεκριμένα, ασθενείς με γονότυπο TT του πολυμορφισμού rs13181 φαίνεται να παρουσιάζουν καλύτερη απόκριση στη θεραπεία με δοξορουβικίνη, σισπλατίνη ή ιφωσφαμίδη, ενώ πάσχοντες με γονότυπο GG παρουσίασαν μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς επανεμφάνιση της νόσου. Επιπλέον, άτομα με το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs1799793 παρουσίαζαν καλύτερη απόκριση στα χημειοθεραπευτικά και είχαν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση. Καλύτερη απόκριση των ασθενών με οστεοσάρκωμα στη σισπλατίνη παρατηρήθηκε και στα άτομα με γονότυπο TT των πολυμορφισμών rs2296147 και rs1047768 του γονιδίου *ERCC5*. [21]&[8] Τέλος, μία επιπλέον μελέτη διερεύνησε πολυμορφισμούς των γονιδίων *REVI* και *REV3*, τα οποία κωδικοποιούν DNA πολυμεράσες. Ασθενείς με οστεοσάρκωμα που έφεραν τους πολυμορφισμούς rs3087403 και rs462779 για τα γονίδια *REVI* και *REV3*, αντιστοίχως, παρουσίασαν μειωμένη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία με σισπλατίνη καθώς και μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης. [102]

3.4 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Η δυνατότητα ελέγχου της τοξικότητας που μπορεί να προκληθεί από τη χημειοθεραπεία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της θεραπείας του καρκίνου. Ασθενείς με οστεοσάρκωμα που ακολουθούν το θεραπευτικό σχήμα MAP συχνά υποφέρουν από σοβαρές παρενέργειες που συνήθως είναι δόσοεξαρτώμενες. Οι συνέπειες αυτές αφορούν κυρίως σε ναυτία, μυελοκαταστολή και ανοσοκαταστολή, ενώ πιο εξειδικευμένες παρενέργειες περιλαμβάνουν τοξικότητα των νεφρών, νεύρων, ήπατος, καρδιάς και αυτιών. Για τους παραπάνω λόγους, η ύπαρξη φαρμακογενετικών βιοδεικτών αποτελεί χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να προβλέπεται η αντίδραση των ασθενών στις φαρμακευτικές αγωγές. [8]&[16]

3.4.1 ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗ ΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η ωτοτοξικότητα συνιστά παρενέργεια της θεραπευτικής αγωγής με σισπλατίνη. Παρατηρείται σε ποσοστό 40-60% των ασθενών και χαρακτηρίζεται από μόνιμη, αμφίπλευρη, αισθητήρια απώλεια της ακοής. Έξι φαρμακογενετικές μελέτες, οι οποίες

συμπεριέλαβαν στην ομάδα μελέτης και ασθενείς με οστεοσάρκωμα, διερεύνησαν πολυμορφισμούς σε γονίδια με βάση την έκφραση και τη λειτουργία τους εσωτερικά των αυτιών. Ο κύριος μηχανισμός των βλαβών που προκαλούνται από τη σισπλατίνη αφορά σε βλάβες του DNA και ευαισθησία σε κοχλιακά κύτταρα ως απόκριση στο οξειδωτικό stress. Συσσώρευση τοξικών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) οδηγεί σε μείωση των κοχλιακών αντιοξειδωτικών ενζύμων συμπεριλαμβανομένων και των τρανσφερασών GST. Σύμφωνα με τη μελέτη των Peters και συν. φαίνεται ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των τρανσφερασών σχετίζονται με την ωτοτοξικότητα μετά από χορήγηση σισπλατίνης σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο GSTM3*B παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σε ασθενείς χωρίς απώλεια ακοής, υποδηλώνοντας έναν προστατευτικό ρόλο του. Επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στο γονίδιο της μεγαλίνης, rs2075252, συσχετίζεται με την ωτοτοξικότητα μετά από σισπλατίνη στο οστεοσάρκωμα σε παιδιά. Η μεγαλίνη εκφράζεται από τα περιθωριακά κύτταρα του κοχλία και κωδικοποιεί έναν ενδοκυτταρικό υποδοχέα ο οποίος προσδένει τη σισπλατίνη.[103]&[104]

Μελέτη που διεξήχθη σε 32 ασθενείς με οστεοσάρκωμα υπέδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs2228001 στο γονίδιο *XPC* σχετίζεται με ωτοτοξικότητα, προτείνοντας ότι ο πολυμορφισμός μειώνει την ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA καθιστώντας τα κύτταρα στο εσωτερικό του αυτιού επιρρεπή στην επίδραση της σισπλατίνης. Επιπλέον, πολυμορφισμοί του γονιδίου *Otos*, που κωδικοποιεί την οτοσπινραλλίνη, μία πρωτεΐνη που ενέχεται στη λειτουργία του κοχλία, συνδέονται με την ανταπόκριση στη σισπλατίνη σε πειραματικά μοντέλα ζώων. Συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ πολυμορφισμών των γονιδίων *SLC31A1* και *SLC22A2* που συμμετέχουν στη μεταφορά της σισπλατίνης με το οστεοσάρκωμα στα παιδιά . [105]&[106]

3.4.2 ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η καρδιοτοξικότητα αποτελεί πρόβλημα στη θεραπεία με δοξορουβικίνη και φαίνεται να προκαλείται από το οξειδωτικό stress στα καρδιομυοκύτταρα, ενώ η προδιάθεση για ανάπτυξη επαγόμενης από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητας εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο και τη χορηγούμενη δόση. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας εμφανίζεται σε νεαρά άτομα και σε γυναικείο πληθυσμό. [8] Ο πολυμορφισμός rs1695 στο γονίδιο της τρανσφεράσης *GSTP1* συσχετίστηκε με το κλάσμα εξώθησης σε 50 ασθενείς οστεοσάρκωματος που ακολουθούσαν το θεραπευτικό σχήμα MAP. Μεγαλύτερη μελέτη σε 487 παιδιατρικά περιστατικά, έδειξε συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου της αναγωγάσης του καρβονυλίου (Carbonyl reductase 3,

CRB3) και καρδιοτοξικότητας από δοξορουβικίνη, αλλά δεν παρατηρήθηκε σύνδεση σε ασθενείς οστεοσαρκώματος στους οποίους χορηγήθηκε μεγάλη δόση του φαρμάκου. Περαιτέρω μελέτες υπέδειξαν επίσης έναν αριθμό πολυμορφισμών στα γονίδια *SLC28A3*, *UGT1A6*, *SLC22A7* και *SLC22A17*, οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων στους ασθενείς με οστεοσάρκωμα και αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιοτοξικότητας μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης. [8]&[16]

3.4.3 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΤΡΕΞΑΤΗΣ

Υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης έχουν ενοχοποιηθεί για τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένης της μυελοκαταστολής, της νεφρικής ανεπάρκειας και της ηπατοτοξικότητας. Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται προκειμένου να αποφευχθεί η επαγόμενη από τη μεθοτρεξάτη τοξικότητα είναι ο θεραπευτικός έλεγχος των επιπέδων της μεθοτρεξάτης στο πλάσμα των ασθενών με τη χρήση της λευκοβορίνης. [107]

Φαρμακογενετικές μελέτες υποστηρίζουν ότι γενετικές παραλλαγές των γονιδίων της αναγωγής του μεθυλενοτετραϋδροφολικού (*MTHFR*) και των πρωτεϊνών-μεταφορέων και *ABCB1* και *ABCC2* επηρεάζουν την τοξικότητα που προκαλείται από τη μεθοτρεξάτη. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός του γονιδίου *MTHFR*, rs1801131, όπου παρατηρείται αντικατάσταση της αδενίνης από κυτοσίνη στη θέση 1298, καθώς επίσης και οι πολυμορφισμοί 3435T>C και 3562T>A των γονιδίων *ABCB1* και *ABCC2*, αντιστοίχως, σχετίζονται με την πρόκληση αναιμίας, λευκοπενίας και βλεννογονίτιδας σε ασθενείς οστεοσαρκώματος που χορηγείται μεθοτρεξάτη [108]&[109]

Ειδικότερα, το γονίδιο *MTHFR* κωδικοποιεί ένα ένζυμο-κλειδί στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση του φολικού και συνήθως συνδέεται με περιπτώσεις ηπατοτοξικότητας μετά από χορήγηση μεθοτρεξάτης σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Επιπλέον, ένας ακόμα πολυμορφισμός του γονιδίου *MTHFR*, 677C>T, σχετίζεται με την πρόκληση ηπατοτοξικότητας στο οστεοσάρκωμα, ενώ επίσης έχει βρεθεί ότι αυξημένη συχνότητα του πολυμορφισμού 677C>T σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφοράσης της αλανίνης στους πάσχοντες. Μελέτες επίσης διερεύνησαν πολυμορφισμούς και στα γονίδια *RFC1* και *SLCO1B1* και έδειξαν συσχέτιση με τα επίπεδα της μεθοτρεξάτης στο πλάσμα των ασθενών καθώς και με παρενέργειες του φαρμάκου, χωρίς όμως η συσχέτιση να είναι στατιστικά σημαντική. [110]&[111]

2.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ I

Τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων της φάσης I ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 (CYP). Το μεγαλύτερο ποσοστό του μεταβολισμού των φαρμάκων λαμβάνει μέρος στο ήπαρ, αλλά έκφραση των παραπάνω ενζύμων έχει επίσης βρεθεί στο λεπτό έντερο, στους πνεύμονες, στο πλακούντα και στα νεφρά. Μέχρι και σήμερα, έχουν εντοπιστεί 57 γονίδια που κωδικοποιούν τα παραπάνω ένζυμα στον άνθρωπο, τα περισσότερα από τα οποία είναι ιδιαίτερα πολυμορφικά με περισσότερα από 400 αλληλόμορφα. [112] Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τις αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος, αποτελούν στόχους της δεύτερης φάσης του μεταβολισμού των φαρμάκων, τα οποία τελικά μετατρέπονται σε ανενεργά πολικά προϊόντα που απεκκρίνονται μέσω των νεφρών. Αναφορικά με την αντικαρκινική φαρμακευτική αγωγή, τα ένζυμα CYP ενέχονται τόσο σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης, όσο και στην ενεργοποίηση των προ-φαρμάκων καθιστώντας τα θεραπευτικά αποτελεσματικά. [112]&[113]

Αρκετά ένζυμα της οικογένειας CYP εμπλέκονται σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης φαρμάκων όπως η δοξορουβικίνη, η σισπλατίνη και η ισοφωσφαμίδη, που χορηγούνται για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος (Πίνακας 3). [92]&[114]

Πίνακας 3 : Ένζυμα της οικογένειας CYP που ενέχονται στο μεταβολισμό φάσης I των φαρμάκων στο οστεοσάρκωμα [92]

Enzyme	Substrate drug(s)	
	Detoxification/inactivation	Activation
CYP1A2	Etoposide	
CYP1B1	Docetaxel	
CYP2A6		Ifosfamide
CYP2B1	Docetaxel	Ifosfamide
CYP2B6	Doxorubicin, ifosfamide	Ifosfamide
CYP2C8	Paclitaxel	Ifosfamide
CYP2C9		Ifosfamide
CYP2C19		Ifosfamide
CYP2D6	Vinorelbine, doxorubicin	
CYP2E1	Vinorelbine, cisplatin, etoposide	
CYP3A4	Doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, docetaxel, etoposide, vinca alkaloids, trabectedin, ifosfamide	Ifosfamide
CYP3A5	Doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, docetaxel, etoposide, vinca alkaloids, ifosfamide	Ifosfamide
GSTs	Doxorubicin, cisplatin, vinca alkaloids, etoposide, ifosfamide	
UGTs	Doxorubicin, epirubicin, etoposide	

GST: Glutathione S transferase; UGT: Uridine diphospho-glucuronosyltransferase.

Ειδικότερα, η ισοφωσφαμίδη μεταβολίζεται από αρκετά ένζυμα της οικογένειας CYP καταλήγοντας είτε στην ενεργοποίησή τους είτε σε αποτοξίνωση. Στην πραγματικότητα, προκειμένου να γίνουν θεραπευτικά ενεργά, η ισοφωσφαμίδη θα πρέπει να μεταβολιστεί στο ήπαρ μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης, οι οποίες στην πλειοψηφία τους καταλύονται από τα ένζυμα CYP3A4, CYP3A5, καθώς επίσης και από τα CYP2A6, CYP2BQ, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 και CYP2C19. Από την άλλη πλευρά, τα ένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 είναι επίσης υπεύθυνα για την απενεργοποίηση των μεταβολιτών που προέρχονται από το μεταβολισμό της ισοφωσφαμίδης [92]

Η γενετική ποικιλομορφία στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα του κυτοχρώματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διαφορές που παρατηρούνται στη φαρμακοκινητική των φαρμάκων, γεγονός που πιθανώς ενοχοποιείται για ανεπιθύμητες παρενέργειες της φαρμακευτικής αγωγής ή για την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε φάρμακα.

Ιδιαίτερη κλινική σημασία κατέχουν πολυμορφισμοί στα παραπάνω γονίδια, οι οποίοι έχουνδειχθεί ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στο οστεοσάρκωμα. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης της ερευνητικής ομάδας Dhaini και συν., ποσοστό της τάξης του 83% ιστών οστεοσαρκωμάτων βρέθηκε θετικό στην έκφραση των ενζύμων CYP1A1, CYP3A4 και CYP3A5, ενώ έκφραση των CYP1A2 και CYP1B1 εντοπίστηκε στο 67% των περιπτώσεων [114] Παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη δε διερεύνησε πολυμορφισμούς στα παραπάνω γονίδια, προτείνει ωστόσο, ότι πιθανότατα τα γονίδια των ενζύμων CYP κατέχουν λειτουργικό ρόλο στην παθολογία του οστεοσαρκώματος.

Πρόσφατη μελέτη από τους Hagleitner και συν. διερεύνησε μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς σε 54 γονίδια που ενέχονται στο μεταβολισμό της σισπλατίνης και δοξορουβικίνης σε ένα σύνολο 177 ασθενών με οστεοσάρκωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολυμορφισμοί σε 5 γονίδια σχετίζονται με 5-ετή επιβίωση χωρίς παρενέργειες. Μεταξύ των γονιδίων αυτών, ήταν το γονίδιο CYP3A4, όπου ο πολυμορφισμός rs4646437 του γονιδίου φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην επιβίωση. Ειδικότερα, η μελέτη υπέδειξε ότι ο προαναφερθείς πολυμορφισμός σχετίζεται με το οστεοσάρκωμα, δεδομένου ότι οδηγεί σε μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα με αποτέλεσμα μικρότερη αντίσταση στη θεραπεία. [115]

Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια των CYP ενζύμων σχετίζονται και με την ευαισθησία και τις παρενέργειες των φαρμάκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φαρμακογενετική διερεύνηση αυτών των γονιδίων θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες με σκοπό τη βελτιστοποίηση της πρόβλεψης σχετικά με την ανταπόκριση στο φάρμακο, και την τοξικότητά του. [116] Τα παραπάνω σε συνδυασμό με μελλοντικές μελέτες θα έχουν ως αποτέλεσμα καλύτερη πρόγνωση, θεραπεία και ποιότητα ζωής των ασθενών με οστεοσάρκωμα.

3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ II

Τα ένζυμα που ενέχονται στη φάση II του μεταβολισμού των φαρμάκων, παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετατροπή φαρμακολογικά ενεργών δραστικών ουσιών καθώς και ξενοβιοτικών σε εύκολα εκκρινόμενες μορφές. Η δράση τους έγκειται στην αποτοξίνωση κυτταροτοξικών φαρμάκων και ως εκ τούτου αλλοιώσεις που μειώνουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα πιθανώς να οδηγούν σε τοξικές παρενέργειες. Τα ένζυμα της φάσης II που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων για το οστεοσάρκωμα, ανήκουν κυρίως στις οικογένειες της γλουταθειόνης-S-τρανσφερασών (GST) και των ουριδινοδιφωσφορικών γλυκουρονοσυλτρανσφερασών (UGT). [117]&[92]

Πολλά μέλη της οικογένειας γλουταθειόνης-S-τρανσφερασών (Glutathione-S-Transferase, GST) έχουν μελετηθεί σε σχέση με την ιστολογική απόκριση και την επιβίωση των ασθενών με οστεοσάρκωμα. Η γνώση ότι τα ένζυμα GST ενέχονται στην αποτοξίνωση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σισπλατίνης και δοξορουβικίνης που χορηγούνται για το οστεοσάρκωμα, αλλά και θεραπευτικών σχημάτων με ετοποσίδη, ισοφωσφαμίδη και βινκριστίνη, οδήγησε στην υπόθεση ότι παραλλαγές των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τρανσφεράσες GST επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των παραπάνω φαρμάκων μειώνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδά τους. [118]&[119] Ένα σύνολο 9 μελετών διερεύνησε το ρόλο ελλείψεων στα γονίδια *GSTM1* και *GSTT1* στο οστεοσάρκωμα, καθώς επίσης και τον πολυμορφισμό GSTP1 Ile105Val. [8], [122]&[123] Μελέτη στη Βραζιλία σε 80 μη μεταστατικούς ασθενείς οστεοσαρκώματος, έδειξε συσχέτιση με πολυμορφισμό τύπου ολικής έλλειψης του γονιδίου *GSTM1* με αυξημένη υποτροπή στους πνεύμονες, ενώ η παρουσία έστω και ενός αλληλομόρφου *GSTM1* συσχετίστηκε με καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.[98] Επιπλέον, ασθενείς με έλλειψη του γονιδίου *GSTT1* παρουσίαζαν υψηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης, ενώ άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο GSTM3*A του πολυμορφισμού rs1799735, ο οποίος επηρεάζει την ποσότητα ή ποιότητα του παραγόμενου ενζύμου, παρουσίαζαν χαμηλότερο προσδόκιμο επιβίωσης. [8] Επιπροσθέτως, κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι το αλληλόμορφο GSTM3*B βρέθηκε να έχει προστατευτικό ρόλο σε μία μικρή ομάδα ασθενών με οστεοσάρκωμα και συνδέθηκε με την παρουσία μεταστάσεων στο διαγνωστικό στάδιο. [122]

Επιπροσθέτως, φαρμακογενετικές μελέτες εστίασαν και στο ένζυμο GSTP1 για το οποίο συσχέτιση βρέθηκε με τον πολυμορφισμό rs1695. Συγκεκριμένα, ασθενείς με γονότυπο AG/GG εμφανίζουν πτωχή ιστολογική απόκριση (νέκρωση<90%), μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης καθώς επίσης και λευκοπενία και καρδιοτοξικότητα μετά από θεραπεία με δοξορουβικίνη. [100] Επιπροσθέτως, ο γονότυπος GG συνδέθηκε πάλι με πτωχή ιστολογική

απόκριση στη χημειοθεραπεία, υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας και χειρότερη συνολική επιβίωση [8]&[99]. Επιπλέον, μία ακόμη παραλλαγή του γονιδίου *GSTP1*, rs1138272, φαίνεται να σχετίζεται με την πάθηση και ειδικότερα ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο T (γονότυποι CT/TT) παρουσιάζουν μικρότερη συνολική επιβίωση. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να επηρεάζει την ανταπόκριση στη θεραπεία με σισπλατίνη [124], [125]

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό *GSTP1* Ile105Val, πτωχή ιστολογική απόκριση στη χημειοθεραπεία αναφέρθηκε σε 4 μελέτες, ενώ συσχέτιση βρέθηκε και με την εμφάνιση λευκοπενίας και καρδιοτοξικότητας σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα .[122]&[123] Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι στο οστεοσάρκωμα έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *GSTP1*, τα οποία έχουν συσχετιστεί με αντίσταση σε αντικαρκινικά φάρμακα και χειρότερη επιβίωση .[120]

Όσο αφορά τις τρανσφεράσες UGT, πρόκειται για οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες αδρανοποιούν πολλά μόρια συμπεριλαμβανομένων και χημειοθεραπευτικών ουσιών. Κύρια υποστρώματά τους, είναι τα προϊόντα της φάσης I του μεταβολισμού των φαρμάκων όπου συμμετέχουν τα ένζυμα CYP. [121] Έκφραση των τρανσφερασών UGT έχει βρεθεί σε ιστούς με οστεοσάρκωμα, ενώ φαίνεται ότι κυρίως εμπλέκονται στην αποτοξίνωση της δοξορουβικίνης, επιρουβικίνης και ετοποσίδης. Μελέτες που συμπεριέλαβαν και φάρμακα τα οποία χορηγούνται για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος, έδειξαν ότι πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τις UGT τρανσφεράσες, τροποποιούν την τοξικότητα αλλά και την ανταπόκριση του ασθενούς στα φάρμακα. [126] Τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, ωστόσο δεδομένου ότι συμπεριελάμβαναν φάρμακα της θεραπείας του οστεοσαρκώματος, κρίθηκαν να έχουν κλινική σημασία και για το οστεοσάρκωμα. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στους οποίους χορηγήθηκε σισπλατίνη και ιρινοτεκάνη, ο γονότυπος UGT1A1*6/*6 βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με υψηλότερη τοξικότητα και μικρότερη συνολική επιβίωση. Σε παιδιά με οξεία λευχαιμία τα οποία λάμβαναν μεθοτρεξάτη, κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου συσχετίστηκαν με το αλληλόμορφο UGT1A1*28, πιθανότατα λόγω ενισχυμένης αναστολής της UGT1A1 λόγω του φαρμάκου. Επιπλέον, μελέτη σε παιδιά που έπασχαν από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, έδειξε ότι πάσχοντες ομόζυγοι για το αλληλόμορφο UGT1A1*28 παρουσίαζαν μικρότερη κάθαρση από ετοποσίδα . [127]&[128]

Όλα τα παραπάνω προτείνουν τη χρήση πολυμορφισμών σε γονίδια των UGT και GST τρανσφερασών, ως πιθανούς δείκτες προκειμένου να επιτευχθεί εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών με καρκίνο συμπεριλαμβανομένων και αυτών με οστεοσάρκωμα στο εγγύς μέλλον.

3.7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Παρόλο που η φαρμακευτική αγωγή του οστεοσαρκώματος και η χημειοθεραπεία του καρκίνου έχει βελτιωθεί σε μεγάλο ποσοστό τις τελευταίες δεκαετίες, ο στόχος θανάτωσης των καρκινικών κυττάρων χωρίς τοξικές συνέπειες δεν έχει ακόμα επιτευχθεί. Η εξέλιξη της φαρμακογενετικής και οι εφαρμογές της στο πεδίο των φαρμάκων για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος θα επιτρέψουν τη βελτίωση της θεραπείας, λαμβάνοντας υπόψη τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των ενζύμων που ενέχονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. [92]

Η πλειοψηφία των φαρμακογενετικών μελετών στο οστεοσάρκωμα επικεντρώθηκε σε περιορισμένο αριθμό υποψήφιων γονιδίων που ενέχονται στη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική του θεραπευτικού σχήματος MAP. Αυτές οι μελέτες έχουν αποδώσει σημαντικά αποτελέσματα υποδεικνύοντας ότι γενετικοί πολυμορφισμοί εμπλέκονται στην αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αλλά και στην τοξικότητά τους. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή των ευρημάτων στην κλινική πράξη αποτελεί μέχρι σήμερα πρόκληση. Οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε μικρό δείγμα ελέγχου δεδομένου ότι το οστεοσάρκωμα αποτελεί μία σπάνια μορφή καρκίνου των οστών, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες για ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Στόχος των φαρμακογενετικών μελετών, είναι η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων, προκειμένου να παρέχουν μια πιο σαφή εικόνα σχετικά με τη συνεισφορά των γενετικών πολυμορφισμών στην απάντηση των ασθενών στη θεραπεία με απώτερο στόχο τη βελτιστοποίησή της και την εξατομίκευσή της. [92]&[16]

Τέλος, περαιτέρω φαρμακογενετικές μελέτες θα πρέπει να διευρύνουν το φάσμα των υποψήφιων γονιδίων που στοχεύουν, συμπεριλαμβάνοντας γονίδια που ενέχονται στη πλειονότητα των μεταβολικών και κυτταρικών διεργασιών, ενώ απαραίτητη είναι και η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου των γονιδίων και των παραλλαγών τους στην παθογένεση του οστεοσαρκώματος. Τα παραπάνω θα επιτρέψουν την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων και την ανεύρεση φαρμακογενετικών βιοδεικτών, οι οποίοι θα επιτρέψουν την καλύτερη πρόγνωση της νόσου. [8]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Piero Picci, “Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma)” Orphanet Journal of Rare Diseases (2007), 2:6
2. Ni Tang et. al, “Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation” Clin Orthop Relat Res (2008) 466:2114–2130
3. Sharon A. Savage and Lisa Mirabello, “Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology”, Sarcoma, Volume 2011, Article ID 548151
4. Ottaviani G and Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. Cancer Treat Res. (2009);152:15-32
5. K. Rickel et. al, “Molecular genetics of osteosarcoma”, Bone, 2016, pii: S8756-3282(16)30313-1
6. Marieke L. Kuijjer et. al, “Genome-wide analyses on high-grade osteosarcoma: Making sense of a genomically most unstable tumor” Int. J. Cancer (2013): 133, 2512–2521
7. Ander Abarrategi et. al, “Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies” Stem Cells International , Volume 2016
8. Vos HI et. al, “The role of pharmacogenetics in the treatment of osteosarcoma”, Drug Discov Today, 2016, 21(11):1775-1786
9. Fucks B and “Etiology of osteosarcoma”. Clin Orthop Relat Res, 2002 Apr;(397):40-52.
10. Mazzoni E et. al, “ Significant association between human osteosarcoma and simian virus 40.” Cancer. 2015 Mar 1;121(5):708-15
11. Haydon et al. “Osteosarcoma and Osteoblastic Differentiation” Clinical Orthopaedics and Related Research, (2007) Number 454, pp. 237–246
12. Matsubara T. et al, “BMP2 Regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during Osteoblast Differentiation” Journal of Biolog. Chem. 2008 Octob. Vol 283, No 43, pp 29119-29125
13. Li N. et. al, “RUNX2 and Osteosarcoma” Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(7):881-7.
14. Quist T. et al, “The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse” Oncogene, 2015 Aug 6;34(32): 4278-4284
15. Neyssa Marina et. al, “Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma” The Oncologist (2004) 9:422-441

16. Leo Kager et. al, “Can pharmacogenomics help to improve therapy in patients with high-grade osteosarcoma?” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2015)
17. CM Hattinger et al. “Pharmacogenomics of genes involved in antifolate drug response and toxicity in osteosarcoma” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2016)
18. J. S. Whelan et. al, “EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment” *Annals of Oncology* (2015) 26: 407–414
19. Giovanni Grignani et. al, “Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial” *Lancet Oncol* 2015; 16: 98–107
20. Jakob K. Anninga et. al, “Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand?” *European Journal of Cancer* 47 (2011) 2431–2445
21. Serra M, Hattinger CM, “The pharmacogenomics of osteosarcoma”, *The Pharmacogenetics Journal*, 2017, 17:11-20
22. Bacci et. al, “Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in osteosarcoma of the extremity: experience at Rizzoli on 1421 patients treated over the last 30 years.” *Tumori* 2004 Sep-Oct;90(5):478-84.
23. Yan Gao et. al, “Evaluation of P-Glycoprotein (Pgp) Expression in Human Osteosarcoma by High-Throughput Tissue Microarray” *Journal Of Orthopaedic Research* Month 2016
24. Gayathri T. et. al, “Heat shock protein expression analysis in canine osteosarcoma reveals HSP60 as a potentially relevant therapeutic target” *Cell Stress and Chaperones* (2013) 18:607–622
25. Zhe Chen et. al, “TP53 Mutations and Survival in Osteosarcoma Patients: A Meta-Analysis of Published Data” *Disease Markers* Volume 2016
26. D. Matthew Gianferante et. al, “Germline and somatic genetics of osteosarcoma — connecting aetiology, biology and therapy” *Nature Reviews, Endocrinology*, March 2017
27. Li H et. al, “MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma.” *Oncol Lett.* 2015 Sep;10(3):1662-1668
28. Morrow J, Khanna C, “Osteosarcoma genetics and epigenetics: emerging biology and candidate therapies”, *Crit Rev Oncog*, 2015, 20(3-4):173-97
29. Savage SA, et.al, “Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma.” *Nat Genet.* 2013; 45(7):799–803.
30. Molyneux SD, et.al, “Prkar1a is an osteosarcoma tumor suppressor that defines a molecular subclass in mice.” *J Clin Invest.* 2010; 120(9):3310–25.

31. Mirabello L, Yu K, et al., A comprehensive candidate gene approach identifies genetic variation with osteosarcoma. *BMC Cancer*, 2011, 11:209
32. Burrow S, et.al, Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol* 1998, 69:21-27.
33. Kappel C, et.al, Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulinlike growth factor I for in vitro growth. *Cancer Res* 1994, 54:2803-2807.
34. Shimamura A, Alter B: Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Blood Reviews* 2010
35. S. Selvarajah,M. et al., “Identification of cryptic microaberrations in osteosarcoma by high-definition oligonucleotide array comparative genomic hybridization,” *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 179, no. 1, pp. 52–61, 2007.
36. Martin JW, et.al, “The Genetics of osteosarcoma”, *Sarcoma*, 2012, 2012;2012:627254
37. Kansara M, Thomas DM, “Molecular pathogenesis of osteosarcoma”, *DNA Cell Biol.* 2007, 26(1)1-18
38. T. VanHarn, et al., “Loss of Rb proteins causes genomic instability in the absence of mitogenic signaling,” *Genes and Development*, vol. 24, no. 13, pp. 1377–1388, 2010.
39. M. B. Weiss, et al., “Deletion of p53 in human mammary epithelial cells causes chromosomal instability and altered therapeutic response,” *Oncogene*, vol.29, no. 33, pp. 4715–4724, 2010.
40. M. Overholtzer, et al., “The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 20, pp. 11547–11552, 2003.
41. K. Al-Romaih, et.al, “Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities”, *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 15;144 (2):91-9
42. J. W. Shay and W. E. Wright, “Role of telomeres and telomerase in cancer,” *Seminars in Cancer Biology*, vol. 21, no.6, pp. 349–353, 2011.
43. G. A. Ulaner, et al., “Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing’s sarcomas and osteosarcomas,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 41, no. 2, pp. 155–162, 2004.
44. G. A. Ulaner, et al., “Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 8, pp. 1759–1763, 2003.

45. C. Scheel, et al., “Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas,” *Oncogene*, vol. 20, no. 29, pp.3835–3844, 2001.
46. L. Mirabello, et al., “Telomere length and variation in telomere biology genes in individuals with osteosarcoma,” *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, vol. 2, no. 1, pp. 19–29, 2011.
47. D. Malkin, et al., “Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms,” *Science*, vol. 250, no. 4985, pp. 1233–1238, 1990.
48. Hernán Correa “Li–Fraumeni Syndrome” *J Pediatr Genet* 2016;5:84–88.
49. Yu-Hsuan Lin et al. “Osteosarcoma: Molecular Pathogenesis and iPSC Modeling” *Trends Mol Med*. 2017 Aug;23(8):737-755
50. A. Patino-Garcia, et.al, “Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators and tumor suppressor genes in pediatric osteosarcomas,” *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 25, no. 5, pp. 362–367, 2003.
51. M. Sztan, Z. Papai, M. Szendroi et al., “Allelic Losses from Chromosome 17 in Human Osteosarcomas,” *Pathology Oncology Research*, vol. 3, no. 2, pp. 115–120, 1997.
52. T. Tsuchiya, et.al, “Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma,” *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 120, no. 2, pp. 91–98, 2000.
53. Hansen MF, “Genetic and molecular aspects of osteosarcoma”, *J Musculoskel Neuron Interact*, 2002, 2(6):554-560
54. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:699-703.
55. F. L. Wong, et al., “Cancer incidence after retinoblastoma: radiation dose and sarcoma risk,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 278, no. 15, pp. 1262–1267, 1997
56. Tomohiro Fujiwara et al. “Second primary osteosarcomas in patients with retinoblastoma” *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2015, 45(12) 1139–1145
57. J. A. L’opez-Guerrero, et. al, “Deregulation of the G1 to Sphase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma,” *Diagnostic Molecular Pathology*, vol. 13, no. 2, pp. 81–91, 2004.
58. L. L. Wang et al., “Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene Rothmund-Thomson syndrome,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 9, pp. 669–674, 2003.
59. G. Maire, et.al, “Recurrent RECQL4 imbalance and increased gene expression levels are associated with structural chromosomal instability in sporadic osteosarcoma,” *Neoplasia*, vol. 11, no. 3, pp. 260–268, 2009.
60. Ikeda S., et.al, (1989). Amplification of both c-myc and c-raf-1 oncogenes in a human osteosarcoma.*Jpn. J. Cancer Res.* 80, 6–9.

61. Gamberi G., et al. (1998). C-myc and cfos in human osteosarcoma: Prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* 55, 556–563.
62. Wu J.X., et.al, (1990). The proto-oncogene cfos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene* 5, 989–1000
63. Ruther, (1987). Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* 325, 412–416
64. Johnson, R.S et. al (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71, 577–586.
65. David, J.P., et al. (2005). Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J. Clin. Invest.* 115, 664–672.
66. Van Dartel, et. al, (2002). Amplification of 17p11.2 approximately p12, including PMP22, TOP3A, and MAPK7, in high-grade osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 139, 91–96.
67. Thomas, D.M., et. al (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol. Cell* 8, 303–316.
68. Thomas, D.M., et. al (2004). Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J. Cell Biol.* 167, 925–934.
69. Blyth, K., et. al (2006). Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer Res.* 66, 2195–2201.
70. Cao, Y., et. al, . (2005). Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res.* 65, 1124–1128.
71. Bialek, P. , *et al.* (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell* 6, 423–435.
72. Entz-werle, et al. (2005). Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int. J. Cancer* 117, 349–355.
73. Mendoza, S., et. al, (2005). Allelic loss at 10q26 in osteosarcoma in the region of the BUB3 and FGFR2 genes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 158, 142–147.
74. Yoshikawa, H et. al, (2004). Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J. Orthop. Sci.* 9, 334–340
75. Jung, S., et. al, (1995). Expression and significance of TGFb isoform and VEGF in osteosarcoma. *Orthopedics* 28, 735.
76. Boland, G.M., et. al, . (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses 76. osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* 93, 1210–1230.

77. Hoang, B.H., et. al (2004). Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int. J. Cancer* 109, 106–111.
78. Bang-Hoang, H., et. al, (2004). Dickkopf3 inhibits invasion and motility of SAOS2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res.* 64, 2734–2739.
79. Mc Clatchey, et.al. (1998). Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev.* 12, 1121–1133.
80. Peng, T.S., et.al, . (2005). [The role of CD44 in the proliferation, adhesiveness and invasiveness of osteosarcoma cell lines]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 34, 362–366
81. Khanna, C. et.al, . (2004). The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat. Med.* 10, 182–186.
82. Kim, H., et al. (2004). Merlin neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53. *J. Biol. Chem.* 279, 7812–7818
83. Horstmann M.A., et.al, (1997). Frequent reduction or loss of DCC gene expression in human osteosarcoma. *Br. J. Cancer* 75, 1309–1317.
84. Bjornland K., et. al, (2005). Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J. Surg. Res.* 127, 151–156.
85. Kawashima Aet. al, (1994). Expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) induced by tumour necrosis factor alpha correlates with metastatic ability in a human osteosarcoma cell line. *Virchows Arch.* 424, 547–552.
86. Felx M., et. al, (2006). Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Jun;110(6):645-54.
87. Uchibori M., et. al, (2006). Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* 28, 33–42.
88. Hornebeck W., et. al, (2005). Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 87, 377–383
89. Relling MV, Evans WE, “Pharmacogenomics in the clinic”, *Nature*, 2015, 526(7573):343-50
90. Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM, “Pharmacogenetics goes genomic”. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(12):937-47
91. Weinshilboum RM, Wang L, “Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation”, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006, 7:223-45.

92. Hattinger CM, Serra M, “Role of pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in treating osteosarcoma”, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11(9):1449-63
93. Serra M , Hattinger CM, “ Polymorphisms of genes related to metotrexate response and toxicity in high-grade osteosarcoma ” *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, Nov. 2016
94. Caronia, D. et al. (2011) Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. *PLoS One* 6, e26091
95. Hattinger CM et. al , “Advances in emerging drugs for osteosarcoma” *Expert Opin Emerg Drugs*, 2015, 20(3):495-514
96. Xiaohui, S. et al. (2014) Effect of ABCB1 polymorphism on the clinical outcome of osteosarcoma patients after receiving chemotherapy. *Pak. J. Med. Sci.* 30, 886–890
97. Liu, S. et al. (2014) Predictive potential of ABCB1, ABCC3, and GSTP1 gene polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy. *Tumour Biol.* 35, 9897–9904
98. Salinas-Souza, C. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in osteosarcoma patients. *Pharmacogenet. Genomics* 2010 Aug;20(8):507-15
99. Li Jz et. al, Effect of variation of ABCB1 and GSTP1 on osteosarcoma survival after chemotherapy. *Genet Mol Res* 2014; 13: 3186–3192
100. Goricar K, et. al, Genetic variability of DNA repair mechanisms and glutathione-S-transferase genes influences treatment outcome in osteosarcoma. *Cancer Epidemiol* 2015; 39: 182–188
101. Sun Y, et. al, Genetic polymorphisms in nucleotide excision repair pathway influences response to chemotherapy and overall survival in osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 7905–7912.
102. Goricar, K. et al. Translesion polymerase genes polymorphisms and haplotypes influence survival of osteosarcoma patients. (2015) *Omics* 19, 180–185
103. Peters, U. et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. (2000) *Anticancer Drugs* 11, 639–643
104. Ross, C.J. et al. (2009) Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat. Genet.* 41, 1345–1349
105. Spracklen, T.F. et al. (2014) Genetic variation in Otos is associated with cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics* 15, 1667–1676
106. Zhuo, X.L. et al. (2008) Adenoviral-mediated up-regulation of Otos, a novel specific cochlear gene, decreases cisplatin-induced apoptosis of cultured spiral ligament fibrocytes via MAPK/mitochondrial pathway. *Toxicology* 248, 33–38

107. Windsor, R.E. et al. (2012) Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer* 118, 1856–1867
108. CM. Hattinger et al. “Candidate germline polymorphisms of genes belonging to the pathways of four drugs used in osteosarcoma standard chemotherapy associated with risk, survival and toxicity in non-metastatic high-grade osteosarcoma” (2016) *Oncotarget* Vol.7 No.38
109. Jabeen, S. et al. (2015) Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. *Pharmacogenomics J.* 15, 385–390
110. Chen, X. et al. (2015) Quantitative assessment of the association between ABC polymorphisms and osteosarcoma response: a meta-analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16, 4659–4664
111. Goricar, K. et al. (2014) Influence of the folate pathway and transporter polymorphisms on methotrexate treatment outcome in osteosarcoma. *Pharmacogenet. Genomics* 24, 514–521
112. Ekhart C, et al. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolizing enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35(1):18-31
113. McFadyen MC et al. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2004;3(3):363-71
114. Dhaini HR, et al. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 2003;21(13):2481-5
115. Hagleitner MM, et al. A first step towards personalized medicine in osteosarcoma: Pharmacogenetics as predictive marker of outcome after chemotherapy based treatment. *Clin Cancer Res* 2015. [Epub ahead of print]
116. Biason P, Toffoli G. Sarcomas and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 2005;6(6):585-601
117. Jancova P, et al. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010;154(2):103-16
118. Hayes JD et al. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88
119. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30(6):445-600
120. Pasello M, et al. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 2008;68(16):6661-8
121. Ouzzine M, et al. The UDPglucuronosyltransferases of the bloodbrain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci* 2014;8:349

122. Peters U, et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Drugs* 2000;11(8):639-4
123. Salinas-Souza C, et. al. Glutathione S-transferase polymorphisms in osteosarcoma patients. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20(8):507-15
124. Teng JW, Yang ZM, Li J, Xu B. Predictive role of Glutathione S-transferases (GSTs) on the prognosis of osteosarcoma patients treated with chemotherapy. *Pak J Med Sci* 2013;29(5):1182-6
125. Goricar K, et al. Genetic variability of DNA repair mechanisms and glutathione-S-transferase genes influences treatment outcome in osteosarcoma. *Cancer Epidemiol* 2015;39(2):182-8
126. O'Donnell PH, Ratain MJ. Germline pharmacogenomics in oncology: decoding the patient for targeting therapy. *Mol Oncol* 2012;6(2):251-9
127. Kishi S, Cheng C, French D, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* 2007;109(10):4151-7
128. Kishi S, et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103(1):67-72