

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ:

- Εργαστήριο Γενικής Ιστολογίας και εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
- Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ.
- Εργαστήριο Στοματολογίας, Τομέας Παθολογίας και Χειρουργικής του Στόματος, Οδοντιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ.

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΣΥΣΤΑΛΤΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ARP2/3 ΣΤΟ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΟΥ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ
ΣΤΟΜΑΤΙΚΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ.**

ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΝΑ

ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ/ MSc

ΑΘΗΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια **Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη**

Αναπληρωτής Καθηγητής **Τόσιος Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής **Γούτας Νικόλαος**

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια **Κουλούκουσα-Γιαννιού Μυρσίνη**

Αναπληρωτής Καθηγητής **Τόσιος Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής Καθηγητής **Γούτας Νικόλαος**

Αναπληρωτής Καθηγητής **Βλαχοδημητρόπουλος Δημήτρης**

Επίκουρη Καθηγήτρια **Πιπέρη Ευαγγελία**

Επίκουρος Καθηγητής **Πετσίνης Βασίλειος**

Επίκουρη Καθηγήτρια **Χαβάκη Σοφία**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1.

Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα Στόματος

Αιτιοπαθογέννεια -Αιτιοπαθολογία

Κλινική Εικόνα

Ιστοπαθολογική Εικόνα

Σταδιοποίηση- Πρόγνωση -Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Κεφάλαιο 2.

Μετανάστευση και διήθηση

Κυτταροσκελετός ακτίνης

Δομή και πολυμερισμός κυτταροσκελετού ακτίνης

Ρύθμιση του κυτταροσκελετού ακτίνης

Το Agr σύμπλεγμα (Agr 2/3 complex)

Οργάνωση και λειτουργίες τουκυτταροσκελετού

Νηματοπόδια

Ελασματοπόδια

Κεφάλαιο 3.

Κυτταροσκελετός Ακτίνης και καρκίνος

Απρ 2/3 και καρκίνος

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.

Υλικό και Μεθοδολογία

Υλικό

Κλινικά στοιχεία

Μεθοδολογία

Ιστοπαθολογική αξιολόγηση

Μέθοδος ανοσοιστοχημικής χρώσης

Μέθοδοι αξιολόγησης ανοσοιστοχημικής χρώσης

Κεφάλαιο 2.

Στατιστικές μέθοδοι

Αποτελέσματα

Συσχετίσεις

Κεφάλαιο 3.

Συζήτηση

Βιβλιογραφία

SUMMARY

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στοματικού βλεννογόνου αποτελεί περισσότερο από το 90% του συνόλου των κακοήθων νεοπλασμάτων του στόματος και περίπου 2-4% του συνόλου των καρκίνων του σώματος (1). Η μέση πενταετής επιβίωση των ασθενών υπολογίζεται σε 35%, περίπου, και εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Ειδικότερα, στα καρκινώματα που διαγιγνώσκονται σε προχωρημένα στάδια (TNM III-IV) η πενταετής επιβίωση υπολογίζεται σε 15-20%, ενώ στα πρώιμα στάδια (TNM I-II) ανέρχεται στο 60% ή 70% περίπου, και σε μερικές ανατομικές εντοπίσεις, όπως στο κάτω χείλος, φτάνει το 90% με 95%.

Ο πλέον καθοριστικός παράγοντας για την πρόγνωση είναι η μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων και η χορήγηση λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων (2). Έτσι, η μέση πενταετής επιβίωση απουσία μεταστάσεων από περίπου 81%, ελαττώνεται σε 42% όταν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις, και σε 17% όταν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η παρουσία των μεταστάσεων επηρεάζει άμεσα τον θεραπευτικό σχεδιασμό, όπως την ανάγκη για τραχηλικό λεμφαδενικό καθαρισμό ή συμπληρωματική ακτινο- ή χημειο-θεραπεία. Η πρόβλεψη του μεταστατικού δυναμικού ενός ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος θα μπορούσε να συμβάλει στην καλλίτερη αντιμετώπιση των ασθενών.

Η κυτταρική κίνηση αποτελεί προϋπόθεση για την διήθηση και τη μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με πολλές ενδείξεις, ο πολυμερισμός της ακτίνης παρέχει τη δύναμη που απαιτείται για να προωθηθεί η μεμβράνη και να κινηθεί το κύτταρο (3,4,5,6). Ρόλο κλειδί στην κυτταρική κίνηση κατέχει το σύμπλεγμα Arp 2/3, το οποίο είναι ο μόνος γνωστός παράγοντας που επάγει το σχηματισμό νέων ινιδίων ακτίνης από μονομερή ακτίνης (7,8,9), είναι παρόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (10), και η δράση του αποτελεί το σημείο σύγκλισης σηματοδοτικών μονοπατιών από μικρού μεγέθους GTPάσες (11).

Το σύμπλεγμα Arp 2/3 απομονώθηκε αρχικά από τον μικροοργανισμό *Acanthamoeba castellanii* (8,12). Συγκροτείται από επτά υπομονάδες, δύο από

τις οποίες έχουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας της δευτεροταγούς δομής τους με το μόριο της ακτίνης, υποδηλώνοντας πως οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να δρουν ως «εκκινητές» του πολυμερισμού των μονομερών της ακτίνης, μιμούμενες την ακραία περιοχή ενός ινιδίου ακτίνης. Σήμερα υπάρχουν αρκετά δομικά και βιοχημικά στοιχεία ώστε να υποστηρίξουν με σαφήνεια την εμπλοκή του συμπλέγματος Agr 2/3 στη δημιουργία δικτυωτών δομών ινιδίων ακτίνης, οι οποίες ωθούν το κύτταρο προς τα εμπρός. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις που συνδέουν το σύμπλεγμα Agr 2/3 και με άλλες λειτουργίες του κυτταροσκελετού.

Η αυξημένη κινητικότητα είναι ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Οι μελέτες που συσχετίζουν το σύμπλεγμα Agr 2/3 με τον καρκίνο είναι περιορισμένες. Σε γαστρικούς καρκίνους βρέθηκε ελαττωμένη έκφραση μιας υπομονάδας του συμπλέγματος Agr 2/3, της p41-Arc (13). Σε νεότερη έρευνα των ίδιων συγγραφέων (14) αναφέρεται πως σε ιστούς αλλά και κυτταρικές σειρές γαστρικών καρκίνων παρατηρείται μειωμένη έκφραση όλων των υπομονάδων του συμπλέγματος Agr 2/3. Η ελάττωση της έκφρασής τους μπορεί να οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση από άλλα συσχετιζόμενα με ογκογένεση γονίδια (14). Αν και ο ρόλος του συμπλέγματος Agr 2/3 δεν είναι ξεκάθαρος, αναμένεται ότι η μειωμένη έκφραση του σχετίζεται με άτυπη κυτταρική μορφολογία.

Σε νεοπλάσματα του παχέως εντέρου βρέθηκε ότι η έκφραση των υπομονάδων Agr2 και Agr3 του συμπλέγματος αυξανόταν ανάλογα με το βαθμό ατυπίας του νεοπλάσματος, τόσο στα κύτταρα στρώματος όσο και στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, φτάνοντας ως και το 92% στην περίπτωση διηθητικού καρκινώματος (15). Η έκφραση των Agr2 και Agr3 στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την συσσώρευση της πρωτεΐνης p53 στον πυρήνα τους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τόσο τα καρκινικά όσο και τα κύτταρα στρώματος παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του συμπλέγματος Agr 2/3, συμβάλλοντας πιθανώς στην αυξημένη κινητικότητά τους και αυξάνοντας το μεταστατικό δυναμικό τους.

Αναλύσεις σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από κυτταρικές σειρές καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το σύμπλεγμα Agr 2/3 στην προσεκβολή ψευδοποδίων που

συμβάλλουν στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων (invadopodia). Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται ραγδαίος πολυμερισμός της ακτίνης και προσεκβολή των ψευδοποδίων μετά από έκθεση στον επιδερμικό παράγοντα αύξησης (EGF). Όταν αυτό συντελείται, το σύμπλεγμα Arp 2/3 επιστρατεύεται στο ακραίο όριο του κυττάρου παράλληλα με νεοσχηματισμένες θέσεις πολυμερισμού και επέκτασης του δικτύου των ινιδίων της ακτίνης. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει ξεκάθαρα το ρόλο του συμπλέγματος Arp 2/3 στην λειτουργία της κυτταροκίνησης των καρκινικών κυττάρων (16). Επιπλέον, έχει δειχθεί πώς για να σχηματιστούν οι δομές αυτές των «επεκτατικών ψευδοποδίων» (invadopodia) είναι απαραίτητος όλος ο άξονας του σηματοδοτικού μονοπατιού Arp 2/3- WASP-cofilin (17, 18).

Οι παραπάνω μελέτες παρέχουν σαφείς ενδείξεις για τη συσχέτιση του συμπλέγματος Arp 2/3 με τον καρκίνο, αν και δεν δίνουν κάποια επεξήγηση για πιθανούς μηχανισμούς. Η εμπλοκή του στον καρκίνο του στόματος δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί.

Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι η αιτία για την πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο. Κάθε καρκίνος, με ελάχιστες εξαιρέσεις, μπορεί να δώσει μεταστάσεις. Η μεταστατική διασπορά σε πολλά κακοήγη νεοπλάσματα γίνεται μέσω των λεμφαγγείων (19, 20-33).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανοσοϊστοχημική μελέτη στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στοματικού βλεννογόνου της έκφρασης του συμπλέγματος Arp 2/3 που ενδέχεται να σχετίζεται με τη διήθηση και την μεταστατική διασπορά. Η επιλογή του νεοπλάσματος βασίζεται στο ότι το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα έχει μεγάλη τάση λεμφογενούς διασποράς. Η πρόβλεψη της μεταστατικής ικανότητας του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος έχει κλινική σημασία στην πρόγνωση και τον θεραπευτικό σχεδιασμό.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή καρκίνου της στοματικής κοιλότητας και ένα από τα συχνότερα κακοήγη νεοπλάσματα, κυρίως στους άνδρες αλλά και στις γυναίκες. Εμφανίζεται συνήθως σε ηλικίες μεγαλύτερες των 60 ετών αν και δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που προσβάλει νεαρότερα άτομα. Κλινικοί, ιστοπαθολογικοί αλλά και πληθώρα άλλων, ίσως ακόμα αγνώστων, παραγόντων συμβάλουν στην πρόγνωση και την πορεία του νεοπλάσματος και καθορίζουν σε μικρό ή μεγάλο βαθμό την εξέλιξη της νόσου.

Το μέγεθος του όγκου, η ύπαρξη λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων, ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης του νεοπλάσματος, ο τύπος διήθησης, η αντίδραση του ξενιστή, η έκφραση ή μη ογκοκατασταλτικών ή ογκογόνων γονιδίων και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, η ενεργοποίηση ή μη της αποπτωτικής διαδικασίας, οι αγγειογενετικοί μηχανισμοί αποτελούν κάποιους από τους παράγοντες που συμμετέχουν και καθορίζουν το βαθμό κακοήθειας του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και κατ'επέκταση την πρόγνωσή του. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα της περιοχής.

11,3				
Ελλάδα	244	1,2 2,3	107 0,6 1,0	669 1,5
14,2				
Γυναίκες				
Παγκόσμια	92524	1,5 2,5	44545 1,3 1,2	209581 1,4
8,5				
Περισσότερο				
αναπτυγμένες χώρες	28391	1,1 2,3	8811 0,7 0,6	80194 1,1
15,0				
Λιγότερο				
αναπτυγμένες χώρες	64133	1,9 2,6	35734 1,7 1,5	129387 1,7
6,7				
Ελλάδα	195	1,2 1,3	66 0,6 0,4	509 1,2
10,5				

Επίπτωση: Σ: Συνολικός αριθμός νέων περιπτώσεων ανά έτος, %: Ποσοστό επί του συνόλου των νέων περιπτώσεων καρκίνου ανά έτος, ASR: Αριθμός νέων περιπτώσεων ανά 100.000 ανά έτος (age-standardized rate) για όλες τις ηλικίες

Θνησιμότητα: Συνολικός αριθμός θανάτων ανά έτος, %: Ποσοστό επί του συνόλου των θανάτων ανά έτος, ASR: Αριθμός θανάτων ανά 100.000 ανά έτος (age-standardized rate) για όλες τις ηλικίες

Επιπολασμός: Συνολικός αριθμός ζώντων ατόμων με νόσο (1 έτος/5 έτη) για ενήλικες, %: Ποσοστό επί του συνόλου ζώντων ατόμων με νόσο (1 έτος/5 έτη) για ενήλικες,

A: Αναλογία ανά 100.000 άτομα

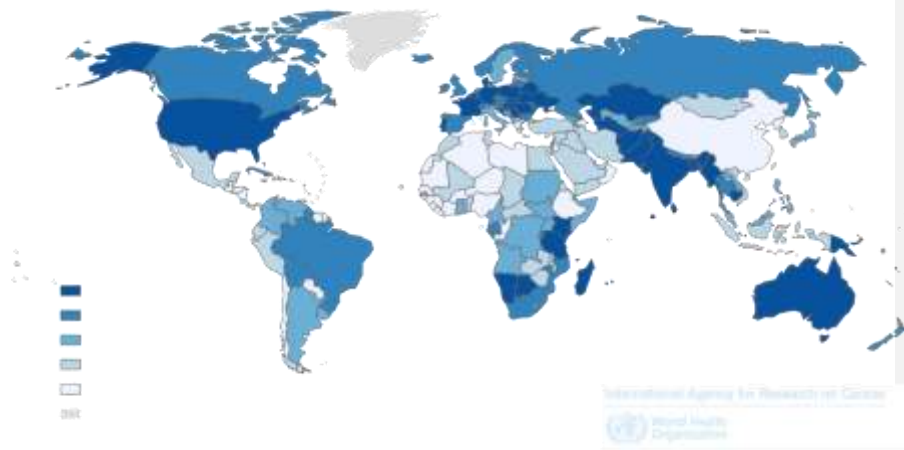
Στην Ευρώπη επικρατεί μεγάλη ετερογένεια στα ποσοστά του ΑΚΣ, με πιο υψηλά ποσοστά να παρατηρούνται στους άντρες και στις χώρες της κεντρικής και νότιας Ευρώπης, ενώ τα χαμηλότερα παρατηρούνται σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης και της Μεγάλης Βρετανίας.

Υπολογίζεται ότι 26000 νέες περιπτώσεις διαγνώσκονται κάθε χρόνο στις ΗΠΑ και περίπου 6500 ασθενείς χάνουν τη ζωή τους ετησίως εξαιτίας της νόσου (34-38).

Στις ΗΠΑ λειτουργούν επιτυχώς εδώ και δεκαετίες προγράμματα επιδημιολογικής μελέτης με ακριβή καταγραφή στοιχείων για ένα μεγάλο φάσμα του πληθυσμού (39-42) Για το 2008 καταγράφηκαν 15.250 νέα περιστατικά ΑΚΣ για τους άνδρες και 7.650 για τις γυναίκες (43). Αυτό που παρουσιάζει ενδιαφέρον πάντως είναι η μείωση στα ποσοστά θνησι μότητας σε σύγκριση με το 1990 κατά 1,63 ανά 100.000 άτομα για τους άνδρες και 0,56 ανά 100.000 άτομα για τις γυναίκες, που αποδίδεται σε αλλαγές στις συνήθειες στην κατανάλωση καπνού και οίονοπνεύματος. Αν και ο γυναικείος πληθυσμός εμφανίζει χαμηλότερα ποσοστά επίπτωσης από τους άνδρες, η επίπτωση στις γυναίκες έχει παρουσιάσει έντονη αυξητική τάση. Στη νότια Αμερική τα στοιχεία είναι ανάλογα της Βόρειας Αμερικής ενώ η επίπτωση στη Βραζιλία είναι από τις υψηλότερες παγκοσμίως με το Σαν Πάολο να φτάνει τα 13,2 κρουσμάτα στα 100.000 άτομα ετησίως.

Στην Ασία, τα ποσοστά είναι ιδιαίτερα υψηλά. Είναι ενδιαφέρον ότι η υψηλότερη επίπτωση για τους άνδρες παγκόσμια (20,6/100,000) έχει καταγραφεί σε περιοχές του Πακιστάν. Ο ινδικός πληθυσμός εμφανίζει υψηλά ποσοστά κινδύνου, γεγονός που έχει αποδοθεί στις ξεχωριστές συνήθειες χρήσης προϊόντων καπνού (betel quid). Τα ποσοστά είναι επίσης υψηλά για τις γυναίκες και σε κάποιες περιοχές υπερβαίνουν αυτά των ανδρών. Πάντως, τα τελευταία χρόνια ο ρυθμός εμφάνισης ΑΚΣ κυρίως στην Κίνα και στην Ινδία εμφανίζει πτωτική τάση και για τα δύο φύλα, σε αντίθεση με την Ιαπωνία όπου παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων.

Στην Αφρική, τα επιδημιολογικά στοιχεία παρουσιάζουν σοβαρές ελλείψεις και θεωρούνται ανακριβή και αναξιόπιστα.



source: Globocan 2012 (IARC), cancer of the lip and oral cavity,

(τα χρώματα σε σειρά από το πιο σκούρο μπλε στο πιο ανοιχτό :5,1 /3,8-5,1/2,5-3.8/1.9-2,5/ <1.9/ no data)

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος προσβάλλει συνήθως τις μέσες και μεγαλύτερες ηλικίες, αν και συχνά ένας ανησυχητικός αριθμός περιστατικών καταγράφεται σε νεαρότερες ηλικίες (38-40).

Διακρίνεται από άποψη εντόπισης σε καρκίνωμα των χειλέων, της αμιγούς στοματικής κοιλότητας και του στοματοφάρυγγα, με τις δύο τελευταίες εντοπίσεις να είναι οι συνηθέστερες στους άνδρες από ότι στις γυναίκες σε αναλογία 2:1 (35,41,42).

Χαρακτηριστικό είναι ότι τα τελευταία πενήντα χρόνια παρατηρείται μείωση του λόγου αυτού, δεδομένου ότι οι γυναίκες εκτίθενται στον ίδιο βαθμό σε γνωστούς καρκινογόνους παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα και το αλκοόλ (37,38).

Το καρκίνωμα των χειλέων προσβάλλει συνηθέστερα τους λευκούς άνδρες και συνδέεται άμεσα με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, καθώς και με την

τοπική επαφή του τσιγάρου ή της πίπας (2,10). Τα τελευταία χρόνια έχει πάψει να αποτελεί τη συχνότερη περιοχή εμφάνισης, λόγω του ότι όλο και λιγότερα άτομα ασχολούνται με εξωτερικές εργασίες (αγρότες, κτηνοτρόφοι) και κατ'αυτό τον τρόπο δεν εκτίθενται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην επιβλαβή υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (35,37).

Η αιτιοπαθολογική σχέση μεταξύ ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος και καπνίσματος είναι εξαιρετικά εδω και πολλά χρόνια. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του στόματος είναι 5-9 φορές μεγαλύτερος στους καπνιστές από ότι στους μη καπνιστές και αυξάνει σε 17 φορές σε βαρείς καπνιστές των 80 και άνω τσιγάρων ημερησίως (35,44-50).

Το ποσοστό των ασθενών με καρκίνο του στόματος που καπνίζουν (περίπου 80%) είναι 2-3 φορές μεγαλύτερο από ότι στον γενικό πληθυσμό. Επιπρόσθετα, ασθενείς που έχουν υποστεί θεραπευτική αγωγή για τη νόσο και συνεχίζουν να καπνίζουν, έχουν 2-6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν κάποια δεύτερη κακοήθεια στο ανώτερο αναπνευστικό ή πεπτικό σύστημα, από ότι εκείνοι που έχουν διακόψει το κάπνισμα (43,51).

Η χρήση μαριχουάνας θεωρείται ως ένας ενδεχόμενος κίνδυνος για την ανάπτυξη του καρκίνου του στόματος, ιδίως σε νεαρούς ενήλικες (36,40,52). χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν αυτή τη συσχέτιση.

Η μάσηση του καπνού φαίνεται να σχετίζεται επίσης με την ανάπτυξη καρκίνου στην περιοχή του στόματος (53). Σε μία μελέτη σε γυναίκες των νότιων πολιτειών στις ΗΠΑ, που έκαναν χρήση καπνού (snuff and chewing tobacco) υπολογίστηκε ότι διέτρεχαν τέσσερις φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος (54). Η περιοχή εντόπισης των βλαβών σχετιζόταν άμεσα με την περιοχή τοποθέτησης του καπνού.

Παρόλα αυτά η οποιαδήποτε χρήση καπνού δεν συνοδεύεται από τον ίδιο υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, όσο με το κάπνισμα αυτό καθ'αυτό (55,56).

Το αλκοόλ θεωρείται επίσης ένας σημαντικός παράγοντας κίνδυνου, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με το κάπνισμα. Σε μελέτες έχει διαπιστωθεί η συνεργική δράση του αλκοόλ με το κάπνισμα. Βαρείς καπνιστές και ποτές εμφανίζουν μέχρι και 100 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας, σε αντίθεση με βαρείς μόνο ποτές όπου ο κίνδυνος παραμένει αρκετά υψηλός, αλλά σαφώς μικρότερος (3-9 φορές) (46,47,49,50).

Στη Γαλλία μία μελέτη έδειξε ότι εξαιρετικά βαρείς χρηστές αλκοόλ (περισσότερο από 100gr αλκοόλης ημερησίως) έχουν 30 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στόματος και του στοματοφάρυγγα (48).

Πολλές επίσης τοπικές συνήθειες διαφόρων λαών, όπως των Ινδών που κάνουν χρήση – μάσηση φύλλων betel-quid και areca-nut, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του στόματος (57-59). Η χρήση αυτών των παραγώγων των φυτών οδηγεί σταδιακά σε μία προκαρκινική βλάβη που ονομάζεται υποβλεννογόνια ίνωση, η οποία παρουσιάζει στην Ινδία ποσοστό 7,6% κακοήθους εξάλλαγής (58).

Σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (human papilloma virus-HPV) παίζει ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του στόματος και του φάρυγγα (60-64). Ορισμένοι τύποι αυτού του ιού, όπως ο HIV-16 έχει ανευρεθεί σε ποσοστό 22% και ο HPV-18 σε 14% των περιπτώσεων καρκίνου του στόματος (61).

Όπως και σε άλλες περιπτώσεις κακοηθειών του ανθρωπίνου οργανισμού, διάφορες διαιτητικές συνήθειες και η ελλιπής λήψη φρούτων και λαχανικών μπορεί επίσης να σχετίζονται σε κάποιο βαθμό με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της στοματικής κοιλότητας (65,66).

Αριθμός μελετών συνηγορεί στο γεγονός ότι ο ομαλός λειχήνας και ιδιαίτερα η διαβρωτική μορφή του, μπορεί να έχει σχέση (ως προκαρκινική βλάβη) με την ανάπτυξη ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος αν και κάποιοι ερευνητές αμφισβητούν τη πιθανή άμεση συσχέτιση των δύο αυτών νοσημάτων και θεωρούν ότι απλά τυγχάνει να συνυπάρχουν λόγω αυξημένης τους συχνότητας (67,68,69).

Η σιδηροπενική αναιμία και ιδιαίτερα το σύνδρομο Plummer-Vinson ή Paterson-Kelly θεωρείται ως προκαρκινική κατάσταση, με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος, του στοματοφάρυγγα και του οισοφάγου (70-71).

Η ανοσοκαταστολή φαίνεται να προδιαθέτει στην εμφάνιση καρκίνου του στόματος. Ανάπτυξη καρκινώματος του κάτω χείλους έχει αναφερθεί σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, όπως επίσης και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας σε νεαρούς ασθενείς με AIDS (72-75).

Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν σημαντικούς ενδογενείς παράγοντες στην ανάπτυξη κακοηθειών.

Φυσιολογικά ανενεργά πρωτοογκογονίδια μπορεί να μεταλλαχθούν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα από τη δράση ιών, ακτινοβολιών και χημικών καρκινογόνων, με το προϊόν της μετάλλαξης να οδηγεί σε καρκινογένεσεις. Μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση αυτών ή σε παραγωγή αλλοιωμένου σήματος με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση ανάπτυξης κακοήθων όγκων.

Τέτοιες μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *ras*, *c-myc*, *cerb-B* καθώς και στα *p53* και *E-cadherin* ογκοκατασταλτικά γονίδια ενοχοποιούνται για την εμφάνιση καρκίνου του στόματος (35,37,39,43).

Ασθενείς που πάσχουν από σύφιλη φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο, σχεδόν τέσσερις φορές περισσότερο από ότι ο μέσος πληθυσμός, ανάπτυξης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στη γλώσσα. Σήμερα φυσικά με τα νέα φάρμακα που εφαρμόζονται στη θεραπεία της μολυσματικής νόσου, οι περιπτώσεις εμφάνισης κακοήθειας στα άτομα με τριτογόνιο σύφιλη είναι ελάχιστες (35,37,41,43).

Η σιδηροπενική αναιμία και ιδιαίτερα το σύνδρομο Plummer-Vinson ή Paterson-Kelly θεωρείται ως προκαρκινική κατάσταση, με αυξημένο κίνδυνο

εμφάνισης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος, του στοματοφάρυγγα και του οισοφάγου (70,71).

Η ανοσοκαταστολή φαίνεται να προδιαθέτει στην εμφάνιση καρκίνου του στόματος. Ανάπτυξη καρκινώματος του κάτω χείλους έχει αναφερθεί σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, όπως επίσης και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας σε νεαρούς ασθενείς με AIDS (72-75).

Τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν σημαντικούς ενδογενείς παράγοντες στην ανάπτυξη κακοηθειών.

Φυσιολογικά ανενεργά πρωτοογκογονίδια μπορεί να μεταλλαχθούν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα από τη δράση ιών, ακτινοβολιών και χημικών καρκινογόνων, με το προϊόν της μετάλλαξης να οδηγεί σε καρκινογενέσεις. Μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση αυτών ή σε παραγωγή αλλοιωμένου σήματος με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση ανάπτυξης κακοήθων όγκων.

Τέτοιες μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *ras*, *c-myc*, *cerb-B* καθώς και στα *p53* και *E-cadherin* ογκοκατασταλτικά γονίδια ενοχοποιούνται για την εμφάνιση καρκίνου του στόματος (35,37,41,43).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η κλινική εικόνα του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος διαφέρει και συχνά μιμείται άλλες κλινικές οντότητες. Ένα πρώιμο διηθητικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να έχει τη μορφή λευκής (λευκοπλακία), ερυθρής πλάκας (ερυθροπλακία) ή και το συνδυασμό αυτών (λευκοερυθροπλακία, κηλιδωτή λευκοπλακία – μη ομοιογενής λευκοπλακία) (35).

Με την πρόοδο της νόσου εμφανίζεται είτε ως ενδοφυτική βλάβη, ως έλκωση του βλεννογόνου με επηρμένα και σκληρά στη ψηλάφηση όρια, λόγω της εν τω βάθει διήθησης των παρακειμένων ιστών, είτε ως εξωφυτική βλάβη με θηλωματώδη και ανώμαλη εξωτερική επιφάνεια, με λευκή ως φυσιολογική χροιά ανάλογα με το πόσο της παραγόμενης κερατίνης (35).

Αρκετά συχνά οι εξωφυτικοί όγκοι παρουσιάζουν έλκωση λόγω νέκρωσης ή και τραυματισμού.

Καταστροφή του υποκειμένου οστού μπορεί να παρατηρηθεί σε βλάβες των γνάθων, με τη μορφή ακτινοδιαγραφικών περιοχών με μη ομαλά όρια, ανώμαλη απορρόφηση ριζών των παρακειμένων οδόντων, ενώ συχνά παρατηρούνται τα δόντια να «πλέουν» μέσα στις ακτινοδιαπερατές βλάβες (35).

Η ύπαρξη πόνου δεν αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη του κατά πόσο μια βλάβη μπορεί να είναι κακοήθης ή μη. Στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οι πρώιμες αλλοιώσεις του είναι απολύτως ασυμπτωματικές ή δίνουν αμβληγρά συμπτώματα στον ασθενή. Συνήθως και δυστυχώς όταν η νόσος έχει προχωρήσει σημαντικά και έχει διηθήσει σε βάθος παρακείμενους ιστούς και νευρικά στελέχη παρουσιάζεται ο πόνος, ο οποίος και κινητοποιεί τον ασθενή να επισκεφθεί κάποιον ειδικό (68,76).

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα των χειλέων και ιδιαίτερα του κάτω χείλους (ποσοστό εμφάνισης 90%) εμφανίζεται κυρίως σε άτομα που εκτίθενται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Σχετίζεται άμεσα με μια βλάβη που ονομάζεται ακτινική χειλίτιδα και επίσης εντοπίζεται σε σημεία όπου συχνά εφάπτεται το τσιγάρο και η πίπα. Εμφανίζεται με τη μορφή έλκωσης με σκληρία στα όριά της που καλύπτεται με εφελκίδα από την αυξημένη παραγωγή κερατίνης. Η εντόπιση στο κάτω χείλος ήταν παλαιότερα η συχνότερα εμφανιζόμενη ιδιαίτερα σε λευκά άτομα, όμως με τον περιορισμό της έκθεσης των ατόμων στην ηλιακή ακτινοβολία και την όλο και λιγότερο ενασχόληση με εξωτερικές εργασίες, έχει μειωθεί σημαντικά ο αριθμός των περιπτώσεων εμφάνισης στην περιοχή αυτή (35,37,43).

Η πιο συχνή περιοχή εμφάνισης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στη στοματική κοιλότητα είναι η γλώσσα, με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 40-50%. Τα 2/3 αυτών των περιπτώσεων εντοπίζονται στην κάτω επιφάνεια και στα οπίσθια πλάγια χείλη, 20% περίπου στα πρόσθια πλάγια χείλη και μόνο 4% στη ραχιαία επιφάνειά της (35,37). Οι βλάβες εμφανίζονται

συνήθως με τη μορφή ανώδυνων ελκών με έντονη σκληρία και υπεργεργμένα χείλη και σπανιότερα ως εξωφυτικές αλλοιώσεις (35,37).

Η δεύτερη σε σειρά συχνότητας περιοχή εντόπισης είναι το έδαφος του στόματος με ποσοστά που αγγίζουν το 35% με τάση αύξησης ιδίως μεταξύ των γυναικών (35,37,43,56). Συνήθως το καρκίνωμα αναπτύσσεται σε έδαφος προϋπάρχουσας λευκοπλακίας ή ερυθροπλακίας. Το έδαφος του στόματος αποτελεί την περιοχή που συνδέεται συχνότερα με την εμφάνιση μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες καθώς και σε άλλα απομακρυσμένα όργανα (35).



Εικόνα1:

Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα με εντόπιση στην κάτω επιφάνεια της γλώσσας





Εικόνα 2: Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα με εντόπιση στο έδαφος του στόματος

Η γλώσσα και το έδαφος του στόματος αποτελούν τις περιοχές με τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου λόγω του ότι οποιαδήποτε καρκινογόνος ουσία παραμένει και δρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αναμεμειγμένη με το σάλιο που λιμνάζει στην περιοχή και επιπρόσθετα λόγω του ότι ο βλεννογόνος στις περιοχές αυτές είναι λεπτότερος, μη κερατινοποιημένος, με μικρότερη δυνατότητα αντίστασης στα καρκινογόνα (35,47).

Λιγότερο συχνές θέσεις εντόπισης αποτελούν τα ούλα και ο φατνιακός βλεννογόνος, κυρίως στην οπίσθια περιοχή της κάτω γνάθου, όπου το νεόπλασμα μπορεί να μιμείται στα πρώτα του στάδια κάποια καλοήγη αντιδραστική βλάβη ή περιοδοντική αλλοίωση που στη συνέχεια επεκτείνεται και οδηγεί σε οστεολυτικές διεργασίες με σημαντική απώλεια οστού και κινητικότητα των παρακειμένων δοντιών (35,37).

Άλλες περιοχές εντόπισης είναι οι παρειές, η μαλακή και σκληρή υπερώα και ο στοματοφάρυγγας όπου και εμφανίζονται συμπτώματα όπως δυσφαγία, δυσκαταποσία και πόνος που αντανακλά συνήθως στο αυτί (35,37).

Γενικότερα, όσο βαθύτερα στη στοματική κοιλότητα και στο στοματοφάρυγγα εντοπίζονται οι βλάβες και όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος

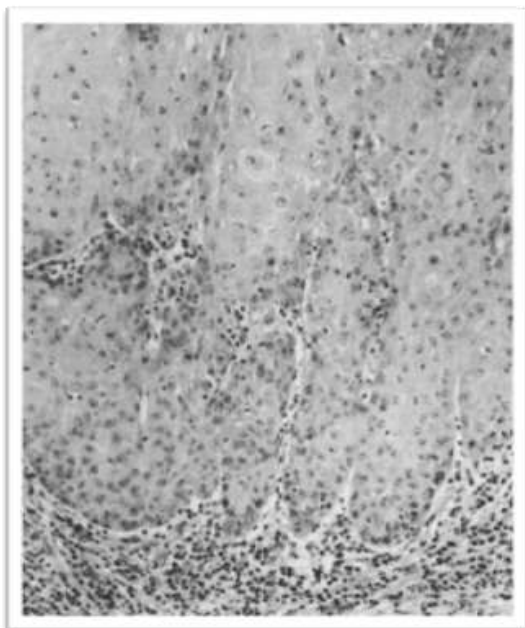
του όγκου τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα για την ύπαρξη λεμφογενούς διασποράς κατά τη στιγμή της πρώτης κλινικής διάγνωσης.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

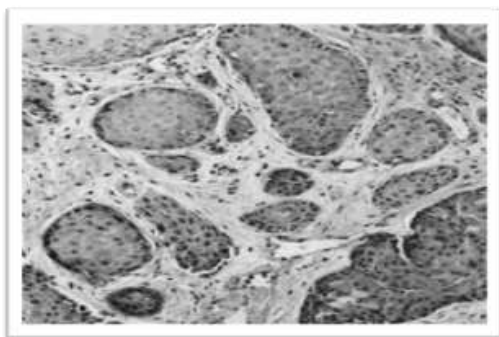
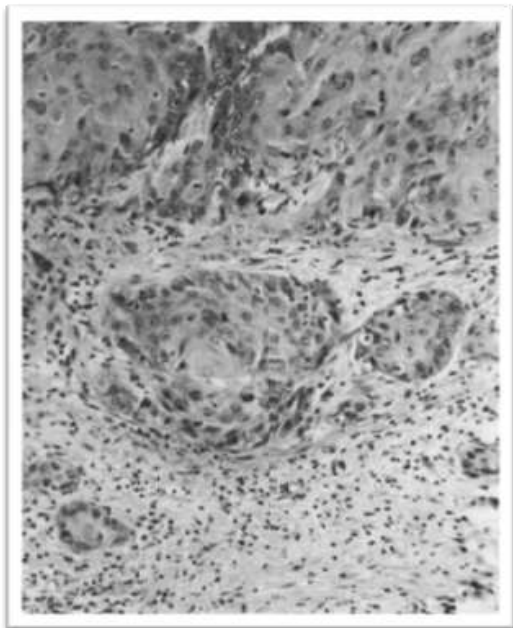
Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται στο έδαφος προϋπάρχοντος ή μη δυσπλαστικού επιθηλίου και χαρακτηρίζεται ιστοπαθολογικά από την ύπαρξη νησίδων ή και χορδών νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων που διηθούν το υποκείμενο χόριο και τους υποβλεννογόνιους ιστούς και τα οποία έχουν χαρακτήρες που προσομοιάζουν με τα κύτταρα της ακανθώτης στιβάδας του επιθηλίου (35).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν χαρακτήρες ατυπίας με μεγάλους πυρήνες, διαταραχή αναλογίας πυρήνα – κυτταροπλάσματος, πλειομορφία στο μέγεθος και στο σχήμα τους όπως και στους πυρήνες τους, μεγάλο αριθμό μιτώσεων, ανώμαλες μιτώσεις, εστιακό σχηματισμό κερατίνης, μαργαριταροειδείς ή κεράτινες σφαίρες (35).

Ανάλογα με το βαθμό που τα κύτταρα του όγκου μοιάζουν ή όχι με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα και παράγουν ή όχι κερατίνη γίνεται και η εκτίμηση του **βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης (grading)** του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σε τρεις ή τέσσερις βαθμίδες (grade I-III ή grade I-IV). Οι λιγότερο διαφοροποιημένοι ή αδιαφοροποίητοι όγκοι λαμβάνουν τους υψηλότερους βαθμούς στην ταξινόμηση αυτή. Για παράδειγμα καλά διαφοροποιημένα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα με κύτταρα που μοιάζουν σημαντικά με τα φυσιολογικά και παράγουν κερατίνη έχουν βαθμό (grade) I. Αντίθετα όγκοι με μεγάλη κυτταρική και πυρηνική πλειομορφία χωρίς να εμφανίζουν κερατινοποίηση έχουν βαθμό (grade) III ή IV και χαρακτηρίζονται ως χαμηλής διαφοροποίησης ή αναπλαστικοί. Όγκοι με ιστολογική εικόνα μεταξύ αυτών των βαθμών χαρακτηρίζονται ως βαθμού (grade) II ή μέτρια διαφοροποιημένοι (35).

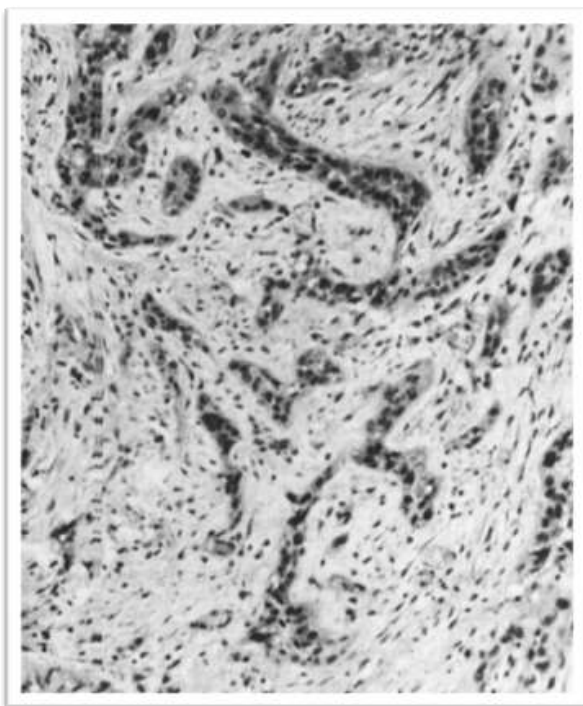
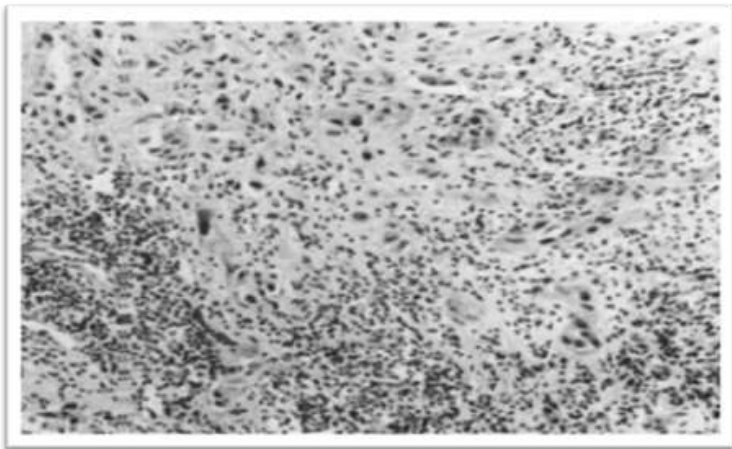


Εικόνα 3: Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα υψηλής διαφοροποίησης. Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης X200



Εικόνα 4: Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα μέσης διαφοροποίησης.

Χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης X200



**Εικόνα 5: Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης. Χρώση
αιματοξυλίνης – ηωσίνης X200**

Ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο στην πρόγνωση και αντιμετώπιση της νόσου και λαμβάνεται σοβαρά υπόψη μαζί με άλλες παραμέτρους κατά το στάδιο της θεραπείας.

Κατά την ιστοπαθολογική εκτίμηση ενός ακανθοκυτταρικού καρκινώματος, ιστολογικά στοιχεία όπως το βάθος διήθησης, το μέγεθος του όγκου, το όριο διήθησης του όγκου, η λεμφαγγειακή διήθηση, η περινευρική διήθηση, η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή είναι σημαντικά στοιχεία τα οποία σχετίζονται σύμφωνα με κάποιους ερευνητές με την πρόγνωση και την πορεία τη νόσου (76-83).

Ως **βάθος διήθησης (tumour thickness ή depth of invasion)** ενός ακανθοκυτταρικού καρκινώματος θεωρείται η διάσταση της βλάβης που μετράται με τη βοήθεια οπτικής μικρομετρικής κλίμακας από την επιφάνεια του όγκου (όταν πρόκειται για εξωφυτική βλάβη) ή τη βάση της έλκωσης μέχρι το βαθύτερο σημείο διήθησης του όγκου (78,79).

Σε περιπτώσεις καταστροφής του επιθηλίου το βάθος διήθησης υπολογίζεται από μια νοητή γραμμή στην επιφάνεια του υγιούς βλεννογόνου μέχρι το μέγιστο βάθος των ιστών όπου εντοπίζονται νεοπλασματικά κύτταρα (79).

Σημαντικό ιστολογικό στοιχείο είναι επίσης το **όριο διήθησης του όγκου (deep invasive tumour front)**, η περιοχή δηλαδή εισβολής των νεοπλασματικών κυττάρων στους ιστούς του ξενιστή, που στηρίζεται στη μορφή διήθησης, το βαθμό κερατινοποίησης, την πλειομορφία των πυρήνων, την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή και τον αριθμό των μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο υψηλής μικροσκόπησης (High power field) (82,84,85).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ				
	1	2	3	4
ΒΑΘΜΟΣ ΚΕΡΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	Υψηλού βαθμού κερατινοποίηση (>50% των νεοπλασματικών κυττάρων)	Μετρίου βαθμού κερατινοποίηση (20-50% των νεοπλασματικών κυττάρων)	Μικρού βαθμού κερατινοποίηση (5-20% των νεοπλασματικών κυττάρων)	Μηδαμινή κερατινοποίηση (0-5% των νεοπλασματικών κυττάρων)
ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΠΛΕΙΟΜΟΡΦΙΑ	Μικρής έκτασης πυρηνική πλειομορφία (>75% ώριμα κύτταρα)	Μέτριας έκτασης πυρηνική πλειομορφία (50-75% ώριμα κύτταρα)	Μεγάλης έκτασης πυρηνική πλειομορφία (25-50% ώριμα κύτταρα)	Διάχυτη και εκτεταμένη πυρηνική πλειομορφία (0-25% ώριμα κύτταρα)
ΤΥΠΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ	Απωθούντα και καλά περιγεγραμμένα διηθητικά όρια	Διήθηση με τη μορφή ευρέων χορδών και ταινιών	Διήθηση με μορφή λεπτών χορδών και μικρών ομάδων κυττάρων (n<15)	Διάχυτη διήθηση με μικρές ομάδες κυττάρων (n<15) ή μεμονωμένα κύτταρα
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΞΕΝΙΣΤΗ (ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗ)	Έντονη	Μέτρια	Μικρή	Μηδαμινή
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΙΤΩΣΕΩΝ / ΟΠΤΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΥΨΗΛΗΣ ΜΕΓΕΘΥΝΣΗΣ	0-1	2-3	4-5	>5

Πίνακας 2: Ιστολογικά χαρακτηριστικά κατηγοριοποίησης του ορίου διήθησης του όγκου για το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας. (Από: Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most

important area of prognostication. Oral Diseases 4:70-77, 1998 Anneroth et al. Malignant grading, system of oral squamous cell carcinoma. Scand J Dent Res 95:200-49, 1987)

Όσον αφορά στη μορφή διήθησης, αυτή διακρίνεται σε τέσσερις τύπους. Στον 1^ο έχουν ευρεία καλά περιγεγραμμένη και απωθούσα τους ιστούς διήθηση, στον 2^ο έχουμε ταινιοειδή διήθηση με τη μορφή χορδών, μικρών προεκβολών, στον 3^ο τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν σε μικρές ομάδες (< 15 κύτταρα η κάθε μία) ή σε χορδές και στον 4^ο έχουμε διάχυτη διήθηση από μικρές ομάδες κυττάρων ή «κατά μόναν», διάσπαρτα νεοπλασματικά κύτταρα.

Οι Brandwein – Gensler και συν. (83) περιγράφουν και 5^ο τύπο που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δορυφορικών διηθητικών νησίδων του όγκου, που απέχουν από τα όρια του κυρίως όγκου τουλάχιστον 1mm.

Ο βαθμός κερατινοποίησης στη μελέτη του ορίου διήθησης του όγκου σχετίζεται με το ποσοστό των κερατινοποιημένων κυττάρων. Ο 1^{ος} βαθμός αντιστοιχεί σε >50% κερατινοποιημένα κύτταρα, ο 2^{ος} σε 20-50% κερατινοποιημένα κύτταρα, ο 3^{ος} σε 5-20 % κερατινοποιημένα κύτταρα και ο 4^{ος} σε μηδαμινή κερατινοποίηση- ποσοστό 0-5 % των κυττάρων.

Το μέτρο της πλειομορφίας των πυρήνων σχετίζεται με το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων (> 75%, 50-75%, 25-50% και 0-25 %) που παρουσιάζουν χαρακτηριστικές ώριμων επιθηλιακών κυττάρων.

Όσον αφορά στην ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή, αυτή διακρίνεται σε τέσσερις βαθμούς που κυμαίνονται από την έντονη φλεγμονώδη αντίδραση μέχρι και τη μηδενική.

Ο αριθμός των μιτωτικών διαιρέσεων ανά υψηλό οπτικό πεδίο μικροσκόπησης, διακρίνεται επίσης σε τέσσερις βαθμούς, ο καθένας από τους οποίους αντιστοιχεί σε αριθμό μιτώσεων 0-1, 2-3, 4-5 και >5.

Η ιστολογική εκτίμηση της παρουσίας και της έκτασης της λεμφαγγειακής διήθησης αποτελεί σημαντικό στοιχείο της δραστηριότητας του όγκου και του εν δυνάμει μεταστατικού δυναμικού του (86). Χαρακτηρίζεται από αθροίσεις

καρκινικών κυττάρων εντός του αυλού των αγγείων ή από τη διήθηση του εξωτερικού τοιχώματος των αγγείων και την καταστροφή των επενδυτικών ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η περινευρική διήθηση χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων εντός του περινευρικού διαστήματος ή του επινευρίου. Συνήθως παρατηρείται μερική ή και πλήρης περίσφιξη του νεύρου (82). Τα χαμηλής κακοήθειας ακανθοκυτταρικά καρκινώματα σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά περινευρικής διήθησης λόγω της μεγαλύτερης ικανότητας μικρών κυτταρικών ομάδων ή μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων να διηθούν το περινεύριο (87). Χαρακτηριστικό είναι ότι το βάθος διήθησης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος συνδέεται σε σημαντικό βαθμό με την περινευρική διήθηση (82,87). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι όσο βαθύτερα διηθεί το νεόπλασμα του υποβλεννογόνιους ιστούς τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να διηθήσει νευρικές ίνες και στελέχη νεύρων.

Η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή (λεμφοκυτταρική διήθηση) στον κακοήγη όγκο σχετίζεται, με σχέση αντιστρόφως ανάλογη, με την πιθανότητα μετάστασής του καθώς και με την τοπική υποτροπή του (88). Διακρίνεται σε τρεις τύπους από τους οποίους: α) στον πρώτο η λεμφοκυτταρική διήθηση είναι έντονη και εμφανής ιστολογικά από την ύπαρξη πυκνού και εκτεταμένου ορίου λεμφοκυτταρικού ιστού, β) στον δεύτερο η ύπαρξη του λεμφοκυτταρικού ιστού είναι περιοχική και ασυνεχής στο όριο υγιούς και νεοπλασματικού ιστού και γ) στον τρίτο παρατηρείται περιορισμένη ή ακόμη και πλήρης απουσία λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (83-85).

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος - η κλινική δηλαδή εκτίμηση της έκτασης της νόσου- αποτελεί την προϋπόθεση τόσο για τη σωστότερη θεραπευτική αντιμετώπιση όσο και για την πρόγνυσή της.

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα σταδιοποιείται συνήθως με το **σύστημα TNM** όπου T (primary Tumour) το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας, N (Nodal involvement) η προσβεβλημένοι επιχώριοι λεμφαδένες και M (distant Metastasis) οι απομακρυσμένες μεταστατικές εστίες (22,56-59). Το σύστημα TNM περιγράφεται εκτενώς στους πίνακες 3 και 4:

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ (T)
TX	Μη ύπαρξη πληροφοριών για τον πρωτοπαθή όγκο
T0	Μη εύρεση του πρωτοπαθούς όγκου
TIS	Καρκίνωμα in situ
T1	Βλάβη μικρότερη από 2cm σε διάμετρο
T2	Βλάβη διαμέτρου μεταξύ 2cm-4cm
T3	Βλάβη μεγαλύτερη από 4cm σε διάμετρο
T4	Βλάβη μεγαλύτερη από 4cm σε διάμετρο με εμπλοκή του ιγμορείου, των πτερυγοειδών μυών, της βάσης της γλώσσας ή του δέρματος
	ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ (N)
NX	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατό να εκτιμηθούν
N0	Απουσία μετάστασης σε επιχώριους λεμφαδένες
N1	Ύπαρξη θετικού ομόπλευρου λεμφαδένα μικρότερης διαμέτρου από 3cm
N2	Ύπαρξη θετικού ομόπλευρου λεμφαδένα διαμέτρου μεταξύ 3cm-6cm (N2a) ή πολλαπλών θετικών ομόπλευρων λεμφαδένων όχι μεγαλύτερης διαμέτρου από 6cm (N2b)
N3	Ομόπλευροι θετικοί λεμφαδένες μεγαλύτεροι από 6cm (N3a) ή αμφοτερόπλευροι (N3b) ή ετερόπλευροι θετικοί λεμφαδένες (N3c)

	ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ (M)
MX	Μη εκτίμηση ύπαρξης απομακρυσμένων μεταστάσεων
M0	Μη ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων
M1	Ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 3: Το σύστημα TNM για την κλινική ταξινόμηση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος (Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE Oral and Maxillofacial Pathology. WB Saunders Company, 1st ed. 1995)

ΣΤΑΔΙΟ	T ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	N ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	M ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3 ή T1,T2,T3	N0	M0
		N1	M0
IV	T4 ή T1,T2,T3	N0 ή όποιο N2 ή N3	M0 ή οποίο M1

Πίνακας 4: Κλινική σταδιοποίηση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος σύμφωνα με το σύστημα TNM (Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE Oral and Maxillofacial Pathology. WB Saunders Company, 1st ed. 1995)

Μια Γερμανο-αυστρο-ελβετική ομάδα μελέτης των όγκων της Γναθοπροσωπικής χώρας (**DOSAK**) πρότεινε μία τροποποίηση του συστήματος TNM για τον ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (93). Στην τροποποίηση αυτή λαμβάνεται υπόψη στο μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T) τόσο η διάμετρος όσο και το βάθος διήθησης και στους προσβεβλημένους λεμφαδένες (N) τόσο η διάμετρος αυτών όσο και ο βαθμός καθήλωσής τους. Τα κλινικά και ιστοπαθολογικά κριτήρια του συστήματος αυτού παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6:

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ (T)
T1	Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου <20mm και πάχους <5mm
T2	Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου <20mm και πάχους 5-20 mm ή όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου >20mm και πάχους <5mm
T3	Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου <20mm και πάχους >20mm ή όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου 20-40mm και πάχους 5-20mm ή όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου >40mm και πάχους 5-10mm
T4	Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου >20mm και πάχους >20mm ή όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου >40mm και πάχους >10mm
	ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΗ ΔΙΗΘΗΣΗ (N)
NX	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατό να εκτιμηθούν
N0	Απουσία μετάστασης σε επιχώριους λεμφαδένες
N1	Θετικοί κινητοί λεμφαδένες μεγαλύτερης διάστασης μέχρι 1cm
N2a	Θετικοί κινητοί λεμφαδένες μεγαλύτερης διάστασης 1-2cm
N2b	Θετικός καθηλωμένος λεμφαδένας μεγαλύτερης διάστασης μέχρι 3cm
N2c	Θετικοί κινητοί λεμφαδένες μεγαλύτερης διάστασης από 2cm
N3	Θετικός καθηλωμένος λεμφαδένας μεγαλύτερης διάστασης από 3cm

Πίνακας 5: Κλινική ταξινόμηση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας κατά DOSAK

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M
	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
0	Tis	N0	M0

I	T1	N0	M0
	T1	N1	M0
II	T1	N2a	M0
	T1	N2b	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T2	N2a	M0
	T2	N2b	M0
III	T1	N2c	M0
	T2	N2c	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2a	M0
	T3	N2b	M0
	T3	N2c	M0
IVa	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IVb	Όποιο T	N3	M0
	T4	N2a	M0
	T4	N2b	M0
	T4	N2c	M0
IVc	Όποιο T	Όποιο N	M1

Πίνακας 6: Κλινική σταδιοποίηση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας κατά DOSAK

Η πρόγνωση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σχετίζεται άμεσα με πληθώρα παραγόντων κυρίως όμως εξαρτάται από το στάδιο της νόσου (35,79,94-96).

Η πενταετής επιβίωση στους ασθενείς με καρκίνο του στόματος αγγίζει το 76% όταν δεν διαπιστώνονται μεταστάσεις κατά τη διάγνωση (στάδιο I, II). Το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 41% όταν υπάρχουν μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες (στάδιο III), ενώ παρατηρείται δραματική μείωση – ποσοστό περίπου 9%-όταν παρατηρούνται απομακρυσμένες μεταστατικές εστίες κάτω από την περιοχή των οστών της κλείδας (35,79,94-96).

Παρά τις εξελίξεις στον τομέα της χειρουργικής αντιμετώπισης, της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας η πενταετής επιβίωση συνολικά για τους ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος δεν έχει παρουσιάσει σημαντική βελτίωση τις τελευταίες δεκαετίες και το ποσοστό παραμένει σχετικά χαμηλό, περίπου 50 με 55% (36,42).

Από άποψη εντόπισης, το καρκίνωμα των χειλέων και ιδιαίτερα του κάτω χείλους παρουσιάζει πολύ μικρό ποσοστό υποτροπής μετά την αρχική θεραπεία, που αγγίζει το 8%, ενώ η πενταετής επιβίωση είναι αρκετά υψηλή (95-100%) (35,36,96). Το ίδιο δυστυχώς δεν ισχύει για βλάβες που εντοπίζονται στο άνω χείλος όπου τα ποσοστά υποτροπής και πενταετούς επιβίωσης των ασθενών είναι 25% και 58% αντίστοιχα (35,36,96).

Όσον αφορά στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας αυτό παρουσιάζει σχετικά χαμηλά ποσοστά πενταετούς επιβίωσης που κυμαίνονται μεταξύ 27% και 47% γεγονός που οφείλεται στα υψηλά ποσοστά διήθησης των τραχηλικών λεμφαδένων (20% - 56%) που αγγίζουν και το 80% σε βλάβες της περιοχής της βάσης της γλώσσας (35,36,40,97,98).

Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα ποσοστά των υποκλινικών μεταστάσεων του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της γλώσσας που αγγίζουν το 21% - 47% (97,99). Αντίθετα οι μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα δεν είναι ιδιαίτερα

συχνές στο καρκίνωμα της γλώσσας (4,7% - 10%) αν και σε μελέτες το ποσοστό των απομακρυσμένων λεμφαδενικών και αιματογενών μεταστάσεων αγγίζει το 35,4% και 58,5%, αντίστοιχα (99,100).

Ανάλογα είναι και τα ποσοστά στον καρκίνο του εδάφους του στόματος όπου η πενταετής επιβίωση των ασθενών κυμαίνεται μεταξύ 33%- 52% (35,36,44,101).

Η περινευρική διήθηση στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά (54%-73%) μεταστατικών εστιών στους επιχώριους λεμφαδένες (87). Ενώ επίσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και σχετικά υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (54%) (82,101).

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονιστεί ότι οι ασθενείς με καρκίνο του στόματος ή του στοματοφάρυγγα έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης δεύτερης πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας στο ανώτερο αναπνευστικό και πεπτικό σύστημα ταυτόχρονα ή σε μετέπειτα χρόνο, σε ποσοστό 9%-25% (35,36,102).

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος σχετίζεται άμεσα με το κλινικό στάδιο της νόσου και συνίσταται σε ευρεία χειρουργική εξαίρεση της βλάβης, ακτινοθεραπεία ή και σε συνδυασμό των δύο (35). Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται συνήθως επικουρικά για τη μείωση του μεγέθους του όγκου (35,102,103). Η σύγχρονη άποψη γύρω από τη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο του στόματος απαιτεί την ύπαρξη ογκολογικού συμβουλίου και τη συμμετοχή μιας πληθώρας ιατρικών ειδικοτήτων για την πληρέστερη αντιμετώπιση της νόσου. Εκτός από τους γναθοχειρουργούς, πλαστικούς χειρουργούς, στοματολόγους, ακτινοθεραπευτές – ογκολόγους , σημαντικό μέρος στη θεραπεία αλλά και στη μεταθεραπευτική πορεία των ασθενών παίζουν και οι γενικοί οδοντίατροι, οι παθολόγοι, οι γναθοπροσωπικοί προσθετολόγοι, οι λογοθεραπευτές και οι διατροφολόγοι (104).

Σημαντικά όπλα στη διάγνωση του καρκίνου του στόματος, στην εκτίμηση της έκταση της νόσου, των μεταστάσεων αλλά και της μετεγχειρητικής πορείας των ασθενών αποτελούν η αξονική τομογραφία (CT-scans), η μαγνητική τομογραφία (MRI), αλλά και το PET-scan (Positron emission tomography), που μπορούν με

μεγάλη ακρίβεια να ανιχνεύσουν πρωτοπαθείς βλάβες, μεταστατικές εστίες ή και πιθανές εστίες υποτροπής μεγέθους λίγων χιλιοστών (105,106).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΣΗ

Η μετανάστευση των κυττάρων είναι θεμελιακή στη ζωή, οδηγώντας τη μορφογενεση των ιστών, την ομοιοσταση και την άμυνα.

Η κυτταρική μετανάστευση απαιτεί δυναμική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με μορια που της παρέχουν μηχανική υποστήριξη για την διασπαση του μετώπου και την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον.

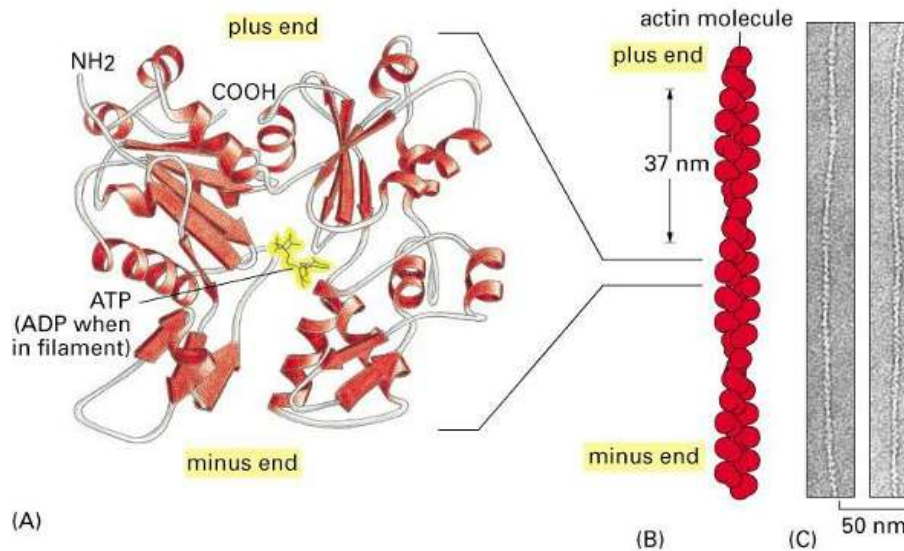
ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ

Η ικανότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων να οργανώνουν τα πολυάριθμα συστατικά στο εσωτερικό τους, να προσλαμβάνουν ποικίλλα σχήματα, να διαιρούνται και να πραγματοποιούν συγχρονισμένες κινήσεις εξαρτάται από τον κυτταροσκελετό ακτίνης, ένα περίπλοκο δίκτυο πρωτεϊνικών ινιδίων που εκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα. Ο κυτταροσκελετός ακτίνης όχι μόνο στηρίζει το μεγάλο όγκο του κυτταροπλάσματος των ευκαρυωτικών κυττάρων αλλά είναι και μια δυναμική δομή που συνεχώς αναδιοργανώνεται ως απόκριση στο εξωτερικό περιβάλλον.

Σχηματίζεται από χιλιάδες υπομονάδες ακτίνης που συναρμολογούνται σε εύκαμπτα πρωτεϊνικά νημάτια τα οποία σχηματίζουν πολύπλοκες δομές μεγάλης κλίμακας. Εκατοντάδες επικουρικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη συναρμολόγηση και σύνδεση των νηματίων ακτίνης με άλλες δομές του κυττάρου και μεταξύ τους (107).

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΑΚΤΙΝΗΣ

Ο κυτταροσκελετός ακτίνης αποτελείται από νημάτια F-ακτίνης (F: filamentous), με διάμετρο περίπου 7nm, που σχηματίζονται από τον πολυμερισμό μορίων μονομερούς G-ακτίνης (G: globular) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών. Η υπομονάδα τους είναι η ακτίνη, μια σφαιρική πρωτεΐνη 375 αμινοξέων, η οποία έχει μια θέση πρόσδεσης για ένα νουκλεοτίδιο (ATP ή ADP). Το νημάτιο ακτίνης αποτελείται από 2 παράλληλα πρωτοϊνίδια, που αποτελούνται από μονομερή ακτίνης, τα οποία περιελίσσονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια δεξιόστροφη έλικα που επαναλαμβάνεται κάθε 37 nm και μπορεί να έχει μήκος κάποιες δεκάδες μm. Παρουσιάζει δομική πολικότητα με ένα συν και ένα πλην άκρο. (Εικόνα 13) Η ακτίνη είναι εξαιρετικά συντηρημένη στους ευκαρυώτες. Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν την ακτίνη, οι άνθρωποι έχουν 6. Οι αμινοξικές αλληλουχίες ακτίνης διαφόρων ειδών είναι κατά 90% ταυτόσημες. Μικρές όμως παραλλαγές μεταξύ τους προκαλούν τεράστιες λειτουργικές διαφορές. Τα σπονδυλωτά έχουν 3 διαφορετικά είδη ακτίνης, την α- ακτίνη, η οποία εκφράζεται στα μυικά κύτταρα, και τις β- και γ-ακτίνη που απαντώνται μαζί σε σχεδόν όλα τα μη μυικά κύτταρα. Μια πιθανή εξήγηση της συντήρησης των αλληλουχιών της ακτίνης είναι η ανάγκη πρόσδεσης εκατοντάδων ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε αυτήν. Μια επιθυμητή αλλαγή στην αλληλεπίδραση με μια πρωτεΐνη θα προκαλούσε εκατοντάδες ανεπιθύμητες αλλαγές στην αλληλεπίδραση με άλλες. Έτσι είναι πιο επικερδές για το κύτταρο να διατηρήσει την ακτίνη και να αλλάζει τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

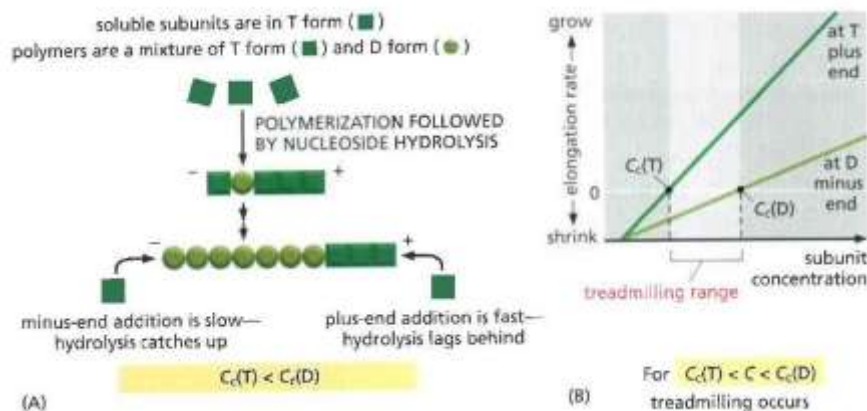


Σχέδιο 1. Η δομή ενός μονομερούς και ενός νηματίου ακτίνης. Α) Το μονομερές έχει μια θέση πρόσδεσης για ένα νουκλεοτίδιο (ATP ή ADP) στο κέντρο του., Β) Η διάταξη των μονομερών σε ένα νημάτιο ακτίνης, όλες οι υπομονάδες έχουν τον ίδιο προσανατολισμό., Γ) Ηλεκτρονιομικροφωτογραφία νηματίων ακτίνης. [Alberts (a)]

Ο πολυμερισμός της ακτίνης ξεκινάει με την ενεργοποίηση των μονομερών ακτίνης (activation) και τη δημιουργία του αρχικού πυρήνα πολυμερισμού (nucleation). Η δημιουργία του πυρήνα δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, είναι αργή και αποτελεί το ρυθμιστικό βήμα για τη διαδικασία του πολυμερισμού. Κατά αυτήν την φάση 3 υπομονάδες ακτίνης σχηματίζουν έναν αρχικό, σταθερό, τριμερή πυρήνα στον οποίο στη συνέχεια προστίθενται ταχέως μονομερή για την επιμήκυνση του νηματίου. Μετά από μια αρχικά λανθάνουσα φάση σχηματισμού του πυρήνα (lag phase) το νημάτιο αυξάνει σε μήκος εκθετικά με την προσθήκη υπομονάδων στα 2 του άκρα (elongation phase) μέχρι που φτάνει σε μια σταθερή κατάσταση κατά την οποία προστίθενται και αφαιρούνται υπομονάδες από τα 2 του άκρα με τον ίδιο ρυθμό (steady state phase). Τότε η συγκέντρωση των ελεύθερων μονομερών είναι ίση με την κριτική συγκέντρωση C_c . Τα κύτταρα εκμεταλλεύονται την απαίτηση της δημιουργίας πυρήνων, χρησιμοποιώντας ειδικές πρωτεΐνες που

καταλύουν τη δημιουργία τους σε συγκεκριμένα σημεία, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη θέση συναρμολόγησης νέων νηματίων ανάλογα με τις ανάγκες τους. Το νημάτιο που χαρακτηρίζεται από πολικότητα εμφανίζει διαφορετικό ρυθμό προσθήκης και αφαίρεσης μονομερών από τα δυο του άκρα, με αποτέλεσμα το ένα άκρο (συν ή αμβλύ άκρο ή barbed end) να επιμηκύνεται και να συρρικνώνεται ταχύτερα από το άλλο (πλην ή αιχμηρό άκρο ή pointed end). Όταν η μεταβολή ελεύθερης ενέργειας είναι αρνητική ($\Delta G < 0$), δηλαδή όταν η συγκέντρωση ελεύθερων μονομερών είναι μεγαλύτερη από την κριτική τους συγκέντρωση, η επιμήκυνση προχωράει αυθόρμητα, ενώ αποπολυμερισμός συμβαίνει στην αντίθετη περίπτωση όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας είναι θετική. Το κύτταρο συζεύγει τις παραπάνω αυθόρμητες διαδικασίες για να εκτελέσει άλλες ενεργοβόρες λειτουργίες του, πχ η επιμήκυνση τους κυτταροσκελετού ακτίνης θα οδηγήσει στη δημιουργία προσεκβολής που θα αποτελέσει το προπορευόμενο άκρο ενός μετακινούμενου κυττάρου. Η ακτίνη εκτός από δομική πρωτεΐνη είναι ταυτόχρονα και ένζυμο. Συνεπώς ταχέως μετά την προσθήκη ενός μονομερούς στο αυξανόμενο ινίδιο επέρχεται υδρόλυση του ATP που μεταφέρει. Η φωσφορική ομάδα αποβάλλεται, ενώ το ADP παραμένει ενσωματωμένο στο ινίδιο. Συνεπώς η ακτίνη μπορεί να είναι σε T διαμόρφωση (προσδεμένη με ATP) ή D διαμόρφωση (προσδεμένη με ADP). Η απελευθέρωση ελεύθερης ενέργειας από την υδρόλυση του νουκλεοτιδίου ευνοεί ενεργειακά την αποκοπή ενός μονομερούς από το άκρο του D πολυμερούς παρά από το άκρο του T πολυμερούς. Συνεπώς η κριτική συγκέντρωση των D πολυμερών είναι μεγαλύτερη από αυτή των T πολυμερών [$C_c(D) > C_c(T)$]. Αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πολυμερών που βρίσκονται σε T μορφή και τη συρρίκνωση αυτών που βρίσκονται στην D μορφή. Στα κύτταρα οι περισσότερες ελεύθερες υπομονάδες είναι στην T μορφή. Επίσης η συγκέντρωση του ATP είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή του ADP. Όσο περισσότερο παραμένουν οι υπομονάδες στο ινίδιο τόσο πιθανότερο είναι να υδρολυθούν. Το αν ένα άκρο θα είναι στην T ή D διαμόρφωση εξαρτάται από το ρυθμό της υδρόλυσης σε σχέση με την προσθήκη υπομονάδων. Εφόσον το ινίδιο αυξάνει ταχέως είναι πιθανό να γίνει προσθήκη υπομονάδας πριν την υδρόλυση του ATP της προηγούμενης έτσι ώστε το άκρο που αυξάνει να

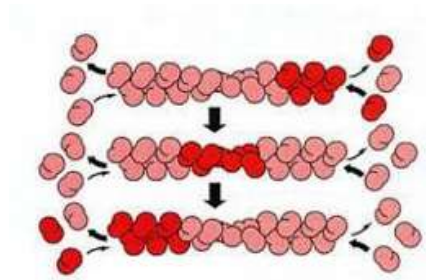
είναι στην T διαμόρφωση σχηματίζοντας το ATP cap. Εάν ο ρυθμός προσθήκης είναι αργός τότε η υδρόλυση έχει ήδη συμβεί και το άκρο είναι σε D μορφή. Ο ρυθμός προσθήκης υπομονάδων στο άκρο του ινιδίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ελεύθερων υπομονάδων και τη σταθερά προσθήκης, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη για το συν άκρο παρά για το πλην, λόγω διαφορετικής δομικής διαμόρφωσης των 2 άκρων. Έτσι λοιπόν σε μια ενδιάμεση συγκέντρωση ελεύθερων υπομονάδων (C) είναι δυνατόν η προσθήκη υπομονάδων στο συν άκρο να είναι ταχύτερη από την υδρόλυση τους προσδίδοντας του T διαμόρφωση, ενώ στο πλην άκρο η υδρόλυση να είναι ταχύτερη από την προσθήκη προσδίδοντας του D διαμόρφωση. Δεδομένου ότι $C_c(D) > C_c(T)$, δηλαδή η D μορφή έχει τάση για αποσυναρμολόγηση, ενώ η T διαμόρφωση έχει τάση για συναρμολόγηση, αν $C_c(D) > C > C_c(T)$, δηλαδή σε μια ενδιάμεση συγκέντρωση ελεύθερων μονομερών, τότε το ινίδιο ταυτόχρονα προσθέτει υπομονάδες στο συν άκρο και αφαιρεί από το πλην, μια ιδιότητα που ονομάζεται treadmilling και είναι χαρακτηριστική των νηματίων ακτίνης.



Σχέδιο 2. Το treadmilling ενός νηματίου ακτίνης είναι δυνατόν εξαιτίας της υδρόλυσης του τριφωσφορικού νουκλεοσιδίου που ακολουθεί την προσθήκη μιας υπομονάδας. Α) Υπομονάδες σε T-διαμόρφωση πολυμερίζονται και στα 2 άκρα ενός αναπτυσσόμενου νηματίου και στη συνέχεια υφίστανται υδρόλυση. Καθώς το νημάτιο μεγαλώνει η

προσθήκη υπομονάδων στο συν άκρο είναι ταχύτερη από την υδρόλυση, για αυτό είναι σε T-διαμόρφωση. Το αντίθετο συμβαίνει στο πλην άκρο του οποίου οι υπομονάδες είναι σε D-διαμόρφωση. B) Σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις 30 υπομονάδων $[Cc(D)>C> Cc(T)]$, όπου το συν άκρο μεγαλώνει, ενώ το πλην συρρικνώνεται, συμβαίνει το treadmilling. [Alberts (a)]

Η υδρόλυση του ATP προκαλεί τις μεταβολές στην ελεύθερη ενέργεια των αντιδράσεων πολυμερισμού-αποπολυμερισμού στα συν και πλην άκρα των ινιδίων επιτρέποντας το treadmilling. Η επιμήκυνση του συν άκρου είναι ίση με τη συρρίκνωση του πλην άκρου, και ενώ συμβαίνει ταχεία ανακύκλωση υπομονάδων το μήκος του ινιδίου παραμένει σταθερό. Το treadmilling επιτρέπει την ταχεία αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης ως απόκριση σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα.



Σχέδιο 3. Κατά το treadmilling υπομονάδες συναρμολογούνται στο συν άκρο (δεξιά) και αποσυναρμολογούνται από το πλην άκρο (αριστερά). Ενώ συμβαίνει ταχεία ροή μονομερών στο νημάτιο αυτό διατηρεί σταθερό το μήκος του, ιδιότητα γνωστή ως treadmilling. [Alberts (a)]

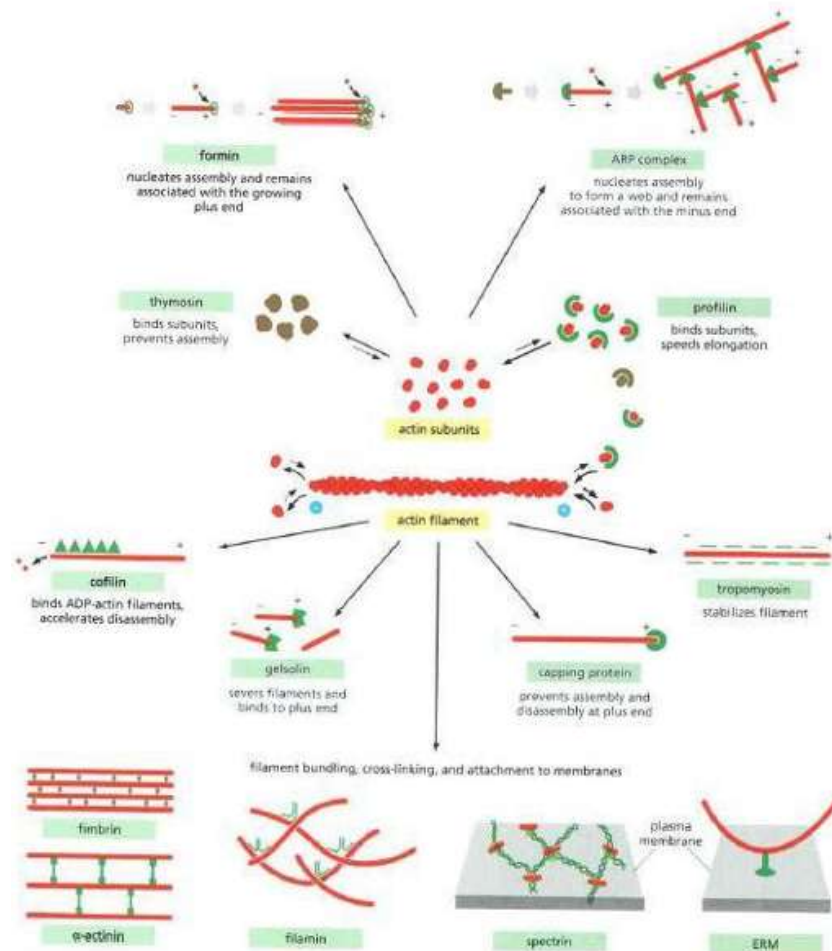
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΑΚΤΙΝΗΣ

Τα κύτταρα ρυθμίζουν το μήκος, τον αριθμό, τη γεωμετρία και τη σταθερότητα των ινιδίων κυρίως ρυθμίζοντας τις συνδέσεις ανάμεσα στα νημάτια αλλά και μεταξύ νηματίων και συστατικών του κυττάρου οδηγώντας στο σχηματισμό περίπλοκων δομών. Η παραπάνω ρύθμιση γίνεται κυρίως

μέσω των επικουρικών πρωτεϊνών που προσδένονται είτε στα νημάτια ακτίνης είτε στις ελεύθερες υπομονάδες ακτίνης (actin binding proteins-ABPs). Κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους.

Πρωτεΐνες που καταλύουν τη δημιουργία του αρχικού πυρήνα πολυμερισμού
Η δημιουργία των νηματίων ακτίνης συμβαίνει κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Συνεπώς η περιφέρεια του κυττάρου παρουσιάζει τη μεγαλύτερη πυκνότητα ινιδίων ακτίνης. Τα στρώμα ακριβώς κάτω από την κυτταρική μεμβράνη ονομάζεται κυτταρικός φλοιός (cell cortex) και τα νημάτια ακτίνης που τον αποτελούν καθορίζουν το σχήμα και την κίνηση του κυττάρου. Εξωτερικά σήματα ρυθμίζουν το σχηματισμό των νηματίων ακτίνης πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης και του επιτρέπουν την αλλαγή στο σχήμα και την πλαστικότητα του ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα.

ACTIN FILAMENTS



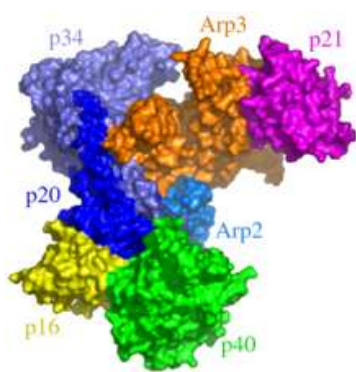
Σχέδιο 4. Μερικές βασικές επικουρικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού ακτίνης. Τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν πάνω από 100 διαφορετικές ABPs, ενώ υπάρχει περίπτωση πολλές ακόμη σημαντικές πρωτεΐνες να μην έχουν ανακαλυφθεί ακόμη. [Alberts (a)]

ΤΟ ARP ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ (Η ARP2/3 COMPLEX)

Είναι ένα σύμπλεγμα 7 πρωτεϊνών που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του κυταροσκελετού. Η δομή δυο από τις υπομονάδες, τα ARP2 και ARP3, μοιάζει στη δομή του μονομερους της ακτίνης και λειτουργούν σαν πυρήνες για τα νέα ινίδια ακτίνης.

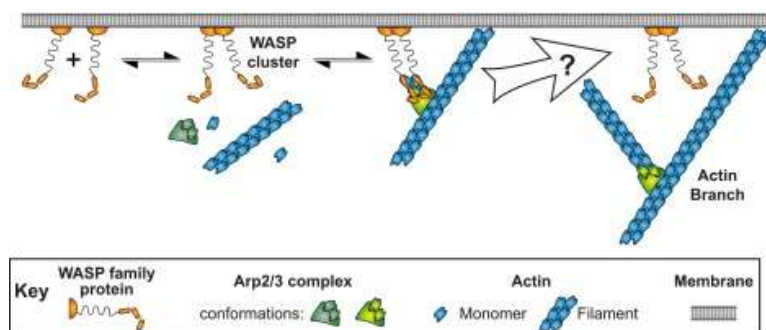
Το Arp2/3, ονομασθηκε αφού ειχε αναγνωριστεί το 1994 με χρωματογραφία από το *Acanthamoeba castellanii* (12), το οποίο ειχε απομονωθεί το 1989 σε έρευνα για πρωτείνες που συνδέονται με ινίδια ακτίνης στη *Drosophila melanogaster* embryos. Το σύμπλεγμα (Actin related proteins) συνδέεται στα ήδη υπάρχοντα (μητρικά) ινίδια και σηματοδοτεί την ανάπτυξη θυγατρικών ινιδίων. Οι διακλαδώσεις του δικτύου της ακτίνης δημιουργούνται από την αντίδραση αυτών των νέων ινιδίων, που συνδέεται με ένα μόριο ακτίνης και δρα ως πυρήνας πολυμερισμού για το σχηματισμό διακλαδιζόμενων νηματίων ακτίνης. Το σύμπλεγμα προσκολλάται σε ένα σημείο στο πλάι ενός προϋπάρχοντα νηματίου ακτίνης και οδηγεί στο σχηματισμό ενός νέου νηματίου που αναπτύσσεται σε γωνία 70° σε σχέση με το αρχικό.

Η αναδιαμόρφωση του κυταροσκελετού της ακτίνης είναι πολύ σημαντική για τη φαγοκυτταρική αλυσίδα και την ενδοκυτταρική κινητικότητα.



Σχέδιο 5. Atomic structure of bovine Arp2/3 complex [1] (PDB code: 1k8k). Color coding for subunits: Arp3, orange; Arp2, marine (subunits 1 & 2 not resolved and thus not shown); p40, green; p34, ice blue; p20, dark blue; p21, magenta; p16, yellow.

Το Arp2/3 παραμένει συνδεδεμένο με το πλην άκρο του νέου ινιδίου και ευοδώνει την ταχεία αύξηση του συν άκρου. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται πηκτοειδή διακλαδιζόμενα δίκτυα. Το Arp2/3 σχετίζεται με δομές στο προπορευόμενο άκρο μεταναστευτικών κυττάρων (όπως τα ελασματοπόδια), όπου παρατηρείται ραγδαίος πολυμερισμός των νηματίων ακτίνης. Το Arp2/3 σύμπλεγμα συνδέεται με τα πλην άκρα και τα σταθεροποιεί. Η λειτουργία του Arp2/3 ενεργοποιείται από μέλη του [Wiskott-Aldrich syndrome family protein](#) (WASP, N-WASP, WAVE, and WASH proteins). Το V τμήμα της WASP πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με τα μονομερή της ακτίνης, ενώ το τμήμα CA αλληλεπιδρά με το συμπλοκο Arp2/3 για να δημιουργήσει ένα πυρήνα. Παρόλα αυτά κανούργια τμήματα πολυμερών ίσως να μην είναι αρκετά να αλληλεπιδράσουν και να ενωθούν με προυπάρχοντα ινίδια. Έτσι πρώτα συνδέεται το συμπλοκο Arp2/3, σε προυπάρχοντα ινίδια. Πρωτεΐνες 'καπακιά' περιορίζουν το πολυμερισμό της ακτίνης στη περιοχή που ενεργοποιείται από το συμπλοκο Arp2/3, ενώ οι ακρες των ινιδίων προστατεύονται από τον αποπολυμερισμό και έτσι προστατεύεται το ινίδιο.

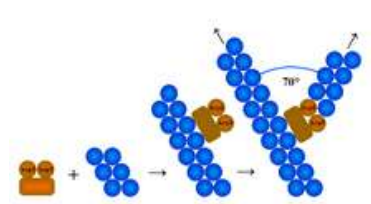


Σχέδιο 6. Pathway of Arp2/3 complex mediated actin branch formation activated by WASP protein dimers on the inside surface of a cell membrane, as deduced from previous studies.

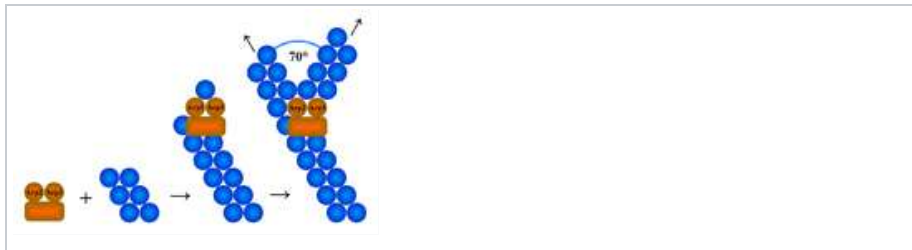
Το σύμπλοκο Arp2/3 εμφανίζεται να έχει σημαντική και ποικίλη λειτουργία στον κυτταροσκελετό. Το σύμπλοκο βρίσκεται σε κυτταρικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από δυναμική, όπως την πινοκυττώση, τη φαγοκυτταρώση, στις ακρες κυττάρων που κινούνται φιαχνοντας ελασματοπόδια.

Το σύμπλοκο επίσης φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς που βοηθούν στη κυτταρική πολικότητα και τη μετανάστευση ινοβλαστών σε μοντέλα επούλωσης τραυμάτων. Σε εντεροπαθολογικούς οργανισμούς όπως η Λιστέρια και η Συγγέλλα, το σύμπλοκο οδηγεί το πολυμερισμό της ακτίνης και της κίνησης. Επίσης φαίνεται να ρυθμίζει την ενδοκυττάρια κινητικότητα σε λυσοσώματα, μιτοχόνδρια κ.α

Ακόμα μελέτες δείχνουν πως το σύμπλοκο εμπλέκεται στην πολικότητα και επέκταση των φυτών όπως και οι μεταλλάξεις του Arp2/3 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τριχώματος.



Σχέδιο 7.Side branching model of the Arp2/3 complex. Activated Arp2/3 complex binds to the side of a "mother" actin filament. Both Arp2 and Arp3 form the first two subunits in the new "daughter" filament.



Σχέδιο 8.Barbed end branching model of the Arp2/3 complex. Activated Arp2/3 competes with capping proteins to bind to the barbed end of an actin filament. Arp2 remains bound to the mother filament, while Arp3 is outside. The two Arp subunits form the first subunits of each branch and the two branches continue to grow by addition of G-actin to each Arp

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ

Το κύτταρο απαρτιώνει τις διαδικασίες α) του πολυμερισμού και αποπολυμερισμού, β) της ρύθμισης και τροποποίησης των νηματίων από ρυθμιστικές πρωτεΐνες, και γ) της δράσης των κινητήριων πρωτεϊνών των νηματίων του κυτταροσκελετού ώστε να διεκπεραιώσει σύνθετες λειτουργίες, όπως ο καθορισμός του σχήματος του κυττάρου, ο ερπυσμός και η κυτταρική διαίρεση, αλλά και ο σχηματισμός μεγάλων σταθερών δομών όπως οι μύες του σώματος προκαλούν κινήσεις μεγάλης κλίμακας. Η κυτταρική κίνηση εξυπηρετείται κατά κανόνα από τον ερπυσμό πάνω σε επιφάνειες. Κατά την εμβρυογένεση η τελική δομή του οργανισμού διαμορφώνεται από την πληθώρα κυτταρικών πληθυσμών που μεταναστεύουν σε διάφορες περιοχές στόχους καλύπτοντας μεγάλες αποστάσεις. Η κυτταρική μετανάστευση είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αφού ο αυξητικός κώνος θα καθοδηγήσει τους νευράξονες στις συνάψεις τους. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα μετακινούνται προς περιοχές λοίμωξης και εγκοιλώνουν ξένους εισβολείς ως μέρος της ανοσολογικής απάντησης. Οι οστεοκλάστες δημιουργούν κανάλια στα οστά που πληρούνται από οστεοβλάστες, εξασφαλίζοντας τη συνεχή ανακύκλωση οστού. Οι ινοβλάστες μεταναστεύουν δια του συνδετικού ιστού αναδιαμορφώνοντας τον και επιδιορθώνοντας σημεία ιστικού τραυματισμού. Τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου μεταναστεύουν κορυφαία ώστε να αντικαταστήσουν αυτά που χάνονται στις άκρες των λαχνών. Δυστυχώς η κυτταρική κίνηση έχει σημαντικό ρόλο και στον καρκίνο αφού τους ίδιους μηχανισμούς χρησιμοποιούν και τα καρκινικά κύτταρα για να διηθήσουν γειτονικούς ιστούς, να μετακινηθούν μέσω αγγείων και λεμφαγγείων και να δώσουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένες θέσεις του σώματος (107).

Ο ερπυσμός των κυττάρων είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από την αναδιοργάνωση του πλούσιου σε ακτίνη κυτταρικού φλοιού. Γίνεται σε 4 στάδια:

α) δημιουργία προεκβολών στο μέτωπο ή οδηγό άκρο του,

β) προσκόλληση των προεκβολών στην επιφάνεια πάνω στην οποία θα μετακινηθεί το κύτταρο, και

γ) έλξη προς το σημείο προσκόλλησης το οποίο παρασύρει το κυτταρικό σώμα προς αυτή την κατεύθυνση,

δ) απόσυρση του ουραίου άκρου.

Στο προπορευόμενο άκρο (leading edge) των μεταναστευτικών κυττάρων τα νημάτια ακτίνης διατάσσονται με το συν άκρο τους προς την περιφέρεια και το πλυν προς το κυτταρόπλασμα και σχηματίζουν διάφορες προσεκβολές οι οποίες διαμεσολαβούν την κυτταρική κίνηση, όπως:

α) **τα νηματοπόδια (filopodia)** είναι λεπτές προσεκβολές, σα δάχτυλα ή κεραίες, που αποτελούνται από σφιχτά διατεταγμένες παράλληλες δέσμες F-ακτίνης και εντοπίζονται στο προπορευόμενο άκρο των κυττάρων που μεταναστεύουν. Αποτελούν προέκταση των ελασματοποδίων και έχουν ρόλο ανιχνευτή εξωτερικών ερεθισμάτων του μικροπεριβάλλοντος (χημειοτακτικών μορίων ή θρεπτικών συστατικών) που θα καθοδηγήσουν την κυτταρική κίνηση. Τα πολύ κοντά νηματοπόδια που είναι σχεδόν εμπεδωμένα στον κυτταρικό φλοιό ή το προπορευόμενο άκρο ονομάζονται microspikes. Κατά την ανιχνευση του μικροπεριβάλλοντος και τη μετανάστευση στις άκρες των νηματοποδίων συσσωρεύονται μόρια προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες και οι καντχερίνες καθώς και πλήθος πρωτεϊνών του συμπλέγματος των εστιακών συνδέσεων (talin, FAK, paxillin). Τελικό αποτέλεσμα της δράσης των παραπάνω μορίων είναι η δημιουργία ώριμων εστιακών συνδέσεων που στη συνέχεια θα αναδιοργανωθούν και δημιουργήσουν συμπλέγματα εστιακών συνδέσεων – συσταλών δομών. Το Cdc42 της οικογένειας των Rho GTP-ασών είναι ο κύριος διαμεσολαβητής για το σχηματισμό νηματοποδίων και δρα ενεργοποιώντας το Atp-2/3 σύμπλεγμα μέσω του N-WASP είτε μέσω του IRSp53, μιας μεγάλης στηρικτικής (scaffolding) πρωτεΐνης πάνω στη οποία προσδένονται οι Cdc42, WAVE-2, ENA/VASP πρωτεΐνες και επάγει τόσο το σχηματισμό νηματοποδίων όσο και ελασματοποδίων (108,109)

β) **τα ελασματοπόδια (lamellipodia)** είναι επίπεδες, σαν σεντόνι ή σαν πέπλο, προεκβολές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση και την κυτταρική κίνηση πάνω σε ένα υπόστρωμα. Παράγουν κατεξοχήν την κινητήρια δύναμη των κυττάρων. Η τοπική ενεργοποίηση των RhoGTPασών, κατά κύριο λόγο του Rac1 που είναι το κατεξοχήν υπεύθυνο μόριο για το σχηματισμό των ελασματοποδίων, ενεργοποιεί τα WAVE-Arp2/3. Το Arp2/3 σύμπλεγμα αποτελεί το κατεξοχήν σύμπλοκο για τη διακλάδωση των νηματίων ακτίνης στα ελασματοπόδια. Κατά το σχηματισμό τους τα νημάτια ακτίνης υφίστανται treadmilling με το συν άκρο στο μέτωπο και το πλην συνδεδεμένο με ARP σύμπλεγμα που ευοδώνει το σχηματισμό δισδιάστατων πλεγμάτων. Ο πολυμερισμός και η αύξηση νέων νηματίων ακτίνης στο προπορευόμενο άκρο ωθεί την κυτταρική μεμβράνη προς τα εμπρός. Ένα άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγει το σχηματισμό ελασματοποδίων περιλαμβάνει την οικογένεια των PAK (p21 activated kinase) κινασών οι οποίες αποτελούν κατιόντα τελεστικά μόρια των Rac/Cdc42 και 38 εμπλέκονται στην αγκυροβόληση των ελασματοποδίων αυξάνοντας τα επίπεδα της MLC (myosin light chain). Επίσης ενεργοποιούν το LIMK/cofilin μονοπάτι με σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των ελασματοποδίων. Πληθώρα άλλων επικουρικών πρωτεϊνών συμμετέχουν στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των ελασματοποδίων (110).

Τα dorsal membrane ruffles (DCR) είναι βραχύβιες προεκβολές των κυττάρων που σχηματίζονται στο προπορευόμενο άκρο, προέρχονται από τροποποίηση άκαμπτων στατικών νηματίων ακτίνης και χαλαρώνουν τον κυτταροσκελετό, διευκολύνοντας το σχηματισμό ελασματοποδίων. Είναι πλούσια σε επικουρικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού ακτίνης όπως οι Arp2/3 και WASP. Μπορεί να εκκρίνουν μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), και έχουν ρόλο στη μακροπινοκύττωση. Ο σχηματισμός τους απαιτεί την ενεργοποίηση των Rac1, Cdc42 (109). Η προσκόλληση πάνω στην εξωκυττάρια ουσία είναι το επόμενο κρίσιμο βήμα και διαμεσολαβείται από τη σύνδεση με ειδικά μόρια προσκόλλησης, τις ιντεγκρίνες. Όσο πιο ισχυρή είναι η προσκόλληση τόσο πιο αργά κινείται το κύτταρο (πχ νευρώνας), ενώ όσο πιο ασθενής τόσο ταχύτερα (πχ κερατινοκύτταρο). Τελικά η έλξη

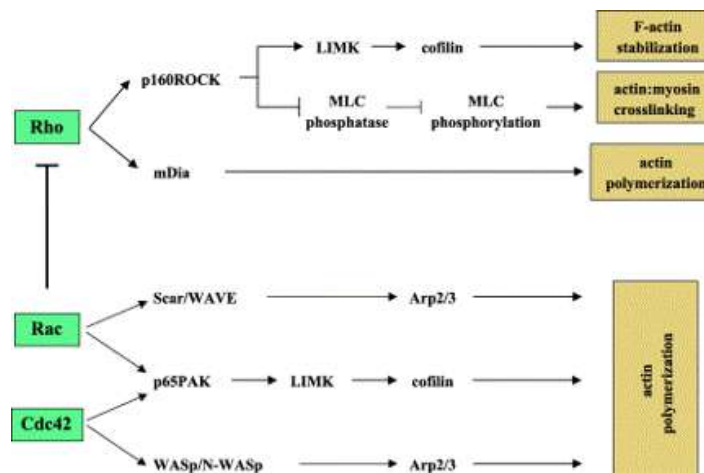
επέρχεται από τη συστολή που προκαλεί η μυοσίνη και ωθεί το κυτταρικό σώμα προς τα εμπρός.

Οι Stress fibers είναι συσταλτές δομές που περιέχονται σε μη μυϊκά κύτταρα και αποτελούνται από συμπλέγματα ακτομυοσίνης (contractile bundles). Η δημιουργία τους διαμεσολαβείται από τις φορμίνες ή το Arp-2/3 σύμπλεγμα. Ο ρόλος τους είναι η παροχή δυνάμεων συστολής που θα οδηγήσει την κίνηση του κυτταρικού σώματος και του οπισθίου τμήματος. Το Rho ρυθμίζει τη συναρμολόγηση των συσταλτών ινιδίων ακτομυοσίνης και τη συστολή τους μέσω της ROCK/Rho κινάσης (111). Οι Rock επίσης ενεργοποιούν τη LIMK απενεργοποιώντας την κοφιλίνη οδηγώντας σε σταθεροποίηση τα νημάτια ακτίνης με τη μυοσίνη και την παραγωγή δυνάμεων συστολής. Είναι σαφές ότι η δράση του Rho είναι αντίθετη του Rac. Ο συγχρονισμός της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού σε προπορευόμενο άκρο, σώμα και ουρά θα επιτρέψουν την κίνηση προς μια κατεύθυνση (112).

Η κυτταρική μετανάστευση στηρίζεται στη πολικότητα των κυττάρων που θα διακρίνει το εμπρός από το πίσω μέρος τα οποία εμφανίζουν διαφορετική δραστηριότητα (πολυμερισμός-αποπολυμερισμός) με τελικό αποτέλεσμα την κατευθυνόμενη κίνηση. Η πολικότητα του κυττάρου παίζει ρόλο όχι μόνο στην κυτταρική κίνηση αλλά και στην οργάνωση του κυταροσκελετού όσον αφορά το σχήμα, την οργάνωση και τις μηχανικές ιδιότητες του κυττάρου.

Τα μέλη της οικογένειας των Rho-GTPασων (Cdc42, Rac, Rho) είναι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, υπεύθυνα για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού κατά την κυτταρική μετανάστευση και την εγκαθίδρυση πολικότητας των κυττάρων. Επηρεάζουν τις περισσότερες βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων (γονιδιακή έκφραση, ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας, κυτταρικός κύκλος), αλλά η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η κυτταρική κίνηση είναι οι καλύτερα μελετημένες (113). Δρουν ως μοριακοί διακόπτες και εναλλάσσονται μεταξύ GDP (ανενεργού) ή GTP (ενεργού) κατάστασης. Απαρτιώνουν και μεταδίδουν σήματα από υποδοχείς χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων οι οποίοι θα οδηγήσουν σε ενεργοποίηση κατιόντα τελεστικά μόρια. Τα Rac1, Cdc42 ενεργοποιούν την p65PAK κινάση (p21activated kinase) και την οικογένεια

των WASP/WAVE πρωτεϊνών, μόρια με δράση στον πολυμερισμό του κυτταροσκελετού ακτίνης στο προπορευόμενο άκρο και το σχηματισμό νηματοποδίων και ελασματοποδίων. Το RhoA ενεργοποιεί τη p160ROCK κινάση υπεύθυνη για τη συναρμολόγηση δομών ακτο-μυοσίνης με δράση στη συσταλτικότητα του κυττάρου. Η PAK και η ROCK ρυθμίζουν επίσης την ανακύκλωση των εστιακών συνδέσεων αφού φωσφορυλιώνουν τη LIMK απενεργοποιώντας την κοφιλίνη. (Εικόνα 17) Ο σχηματισμός των παραπάνω δομών στα μεταναστευτικά κύτταρα καθοδηγείται από τον χωροχρονικά ρυθμιζόμενο πολυμερισμό του κυτταροσκελετού ακτίνης και προάγει τη μετανάστευση και τη διήθηση. Οι Rho-GTPάσες ρυθμίζονται αυστηρά από 3 είδη πρωτεϊνών, τα GEFs (guanine nucleotide exchange factors) που προάγουν την ανταλλαγή GDP με GTP, με αποτελέσματα την ενεργοποίησή τους, τα GAPs (GTPase activating proteins) που έχουν τον αντίθετο ρόλο, και τα GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) που μπλοκάρουν τον κύκλο της GTPάσης δεσμεύοντας την GDP μορφή των Rho-GTPασών.



Σχέδιο 9. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Rho-GTPασών και το αποτέλεσμα της ενεργοποίησής τους στην οργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης (114).

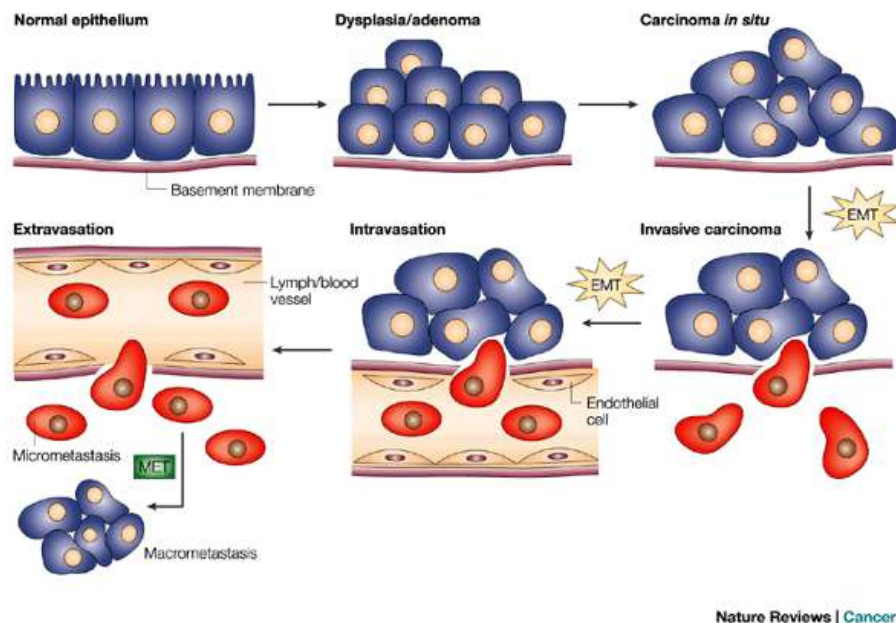
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ ΑΚΤΙΝΗΣ & ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να κινούνται εντός των ιστών με αποτέλεσμα τη διήθηση και τη μετάσταση. Η κυτταρική κίνηση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται και σε μη καρκινικά κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί είναι κοινói τόσο για τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά κύτταρα. Ο κυτταροσκελετός ακτίνης με τη βοήθεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών αναδιοργανώνεται και παράγει την απαραίτητη κινητήριου δύναμη για την κυτταρική μετανάστευση (115). Η κυτταρική μετανάστευση πυροδοτείται από την κλίση συγκέντρωσης χημειοτακτικών παραγόντων (πχ αυξητικοί παράγοντες) οι οποίοι μεταδίδουν σήματα μέσω υποδοχέων επιφανείας που οδηγούν σε ενδοκυττάριας απαντήσεις, όπως η πόλωση και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

Μετάσταση ονομάζεται η διασπορά των καρκινικών κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δευτεροπαθών όγκων σε απομακρυσμένες θέσεις. Οι μεταστάσεις είναι υπεύθυνες για το 90% των θανάτων από καρκίνο (116). Προκειμένου να συμβεί αυτό θα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα να απελευθερωθούν από τον πρωτοπαθή όγκο, να αποκτήσουν ικανότητες μετανάστευσης, να διηθήσουν τους πέριξ ιστούς και να εισέλθουν στην κυκλοφορία μέσω της οποίας θα διασπαρούν και τελικά θα εξαγγειωθούν σε απομακρυσμένες εστίες. Εκεί θα αναπτυχθούν ξανά και θα δημιουργήσουν τη νέα μεταστατική εστία. Η απόσπαση κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο και η διήθηση των περιβάλλοντων ιστών στην περίπτωση των καρκινωμάτων (όγκοι επιθηλιακής αρχής) απαιτεί τη διάσπαση των κυτταρικών συνδέσεων (διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης και εστιακών συνδέσεων) και την απόκτηση αυξημένης ικανότητας κυτταρικής κίνησης-μετανάστευσης φαινόμενο γνωστό ως EMT. Στη συνέχεια τα καρκινικά κύτταρα μετακινούνται με τη βοήθεια προσεκβολών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (νηματοποδίων, ελασματοποδίων,

ινβαντοποδίων) μέσω ενός χημειοτακτικού μονοπατιού που διανοίγεται με τη βοήθεια πρωτεασών που αποδομούν την ECM.



(Εικόνα 6) (112,117,118).

Τελικά τα καρκινικά κύτταρα θα σχηματίσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις που, σε αρκετές περιπτώσεις, θα φέρουν τα ίδια επιθηλιακά χαρακτηριστικά με τον πρωτοπαθή όγκο. Αυτή η μετατροπή των μεσεγχυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά ξανά είναι φαινόμενο αντίστροφο της EMT και ονομάζεται MET (mesenchymal to epithelial transition).

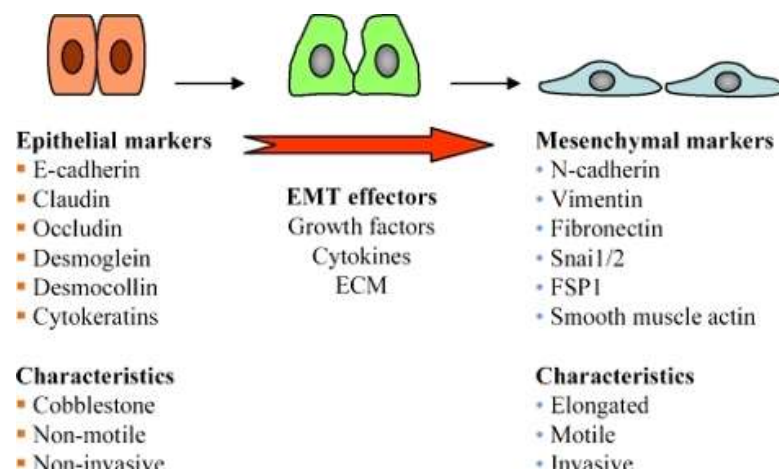
Όλες οι παραπάνω διαδικασίες βασίζονται κατά κύριο λόγο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης των κυττάρων. Έχειδειχθεί πειραματικά ότι μεταβολές έκφρασης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές στην ικανότητα διήθησης/μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία στη θεραπευτική του καρκίνου (119,112)

Η EMT είναι το φαινόμενο κατά το οποίο πολωμένα, ακίνητα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους (μέσω διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης) καθώς και με την βασική μεμβράνη (μέσω

εστιακών συνδέσεων) χάνουν αυτές τις συνδέσεις, χάνουν την πολικότητα τους, αποκτούν μεσεγγυματικά χαρακτηριστικά και ατρακτοειδές σχήμα και αρχίζουν να κινούνται μεμονωμένα και να διηθούν το στρώμα. (Εικόνα 6) Η EMT ενέχεται τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως η εμβρυογένεση και η επούλωση των ιστών, όσο και σε παθολογικές όπως ο καρκίνος. Έχουν οριστεί 3 τύποι EMT :

- α) τύπος I, που αφορά την εμβρυογένεση και την οργανογένεση (γαστρίδιωση, μετανάστευση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, σχηματισμός της καρδιάς, του μυοσκελετικού και περιφερικού νευρικού συστήματος καθώς και κρανιοπροσωπικών δομών),
- β) τύπος II, που χαρακτηρίζει την επούλωση και αναγέννηση των ιστών καθώς και την ίνωση, και
- γ) τύπος III, που σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση (120).

Η διαφορά ανάμεσα στα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα είναι ότι τα πρώτα χάνουν την εξάρτησή τους από τα φυσιολογικά σήματα κυτταρικής ανάπτυξης και αναπτύσσονται αυτόνομα. Αυτή η αυτονομία προκύπτει τόσο από τη γενετική και επιγενετική αστάθεια τους όσο και από τις αλλαγές στην ανταπόκριση στα σήματα του μικροπεριβάλλοντος, δηλαδή την EMT. Μάλιστα το αντίστροφο φαινόμενο, δηλαδή η MET διαμεσολαβεί επίσης φυσιολογικές καταστάσεις όπως η εμβρυογένεση του νεφρού και παθολογικές όπως οι μεταστάσεις, αλλά είναι πολύ λιγότερο μελετημένο (119).

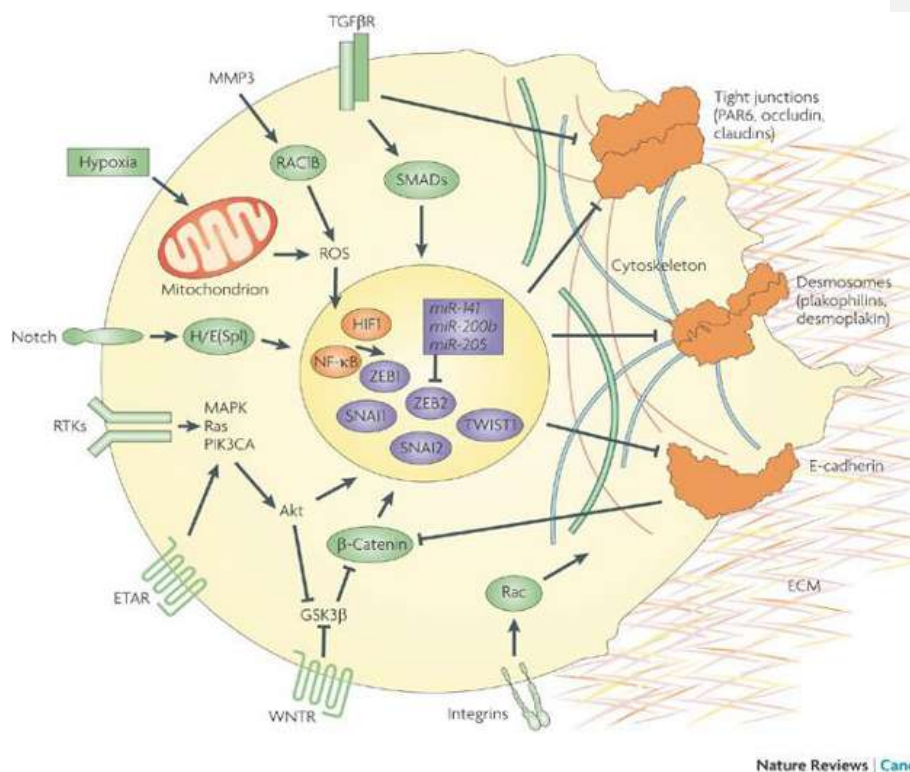


Εικόνα 7: Σύνοψη των αλλαγών στη μορφολογία, στους μοριακούς δείκτες και στη λειτουργία κυττάρων κατά την EMT (121).

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης της EMT συμπεριλαμβάνουν πολλαπλά εξωκυττάρια σήματα και υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία συχνά δημιουργούν κυκλώματα θετικής ανατροφοδότησης μεταξύ τους. Ο TGF- β μπορεί να επάγει EMT μέσω πολλών μηχανισμών, όπως η φωσφορυλίωση των SMADS και πρωτεϊνών που αφορούν την διακυτταρική προσκόλληση και την πολικότητα των κυττάρων (πχ το Par6A). Επίσης μπορεί να επηρεάσει και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τη Notch, Wnt σηματοδότηση και τη σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών. Η Wnt σηματοδότηση μπορεί να οδηγήσει σε EMT μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης και πρωτεασωμικής αποδόμησης της β -κατενίνης από τη GSK-3 β . Ως αποτέλεσμα η β -κατενίνη απελευθερώνεται σε 52 αυξημένα επίπεδα στο κυτταρόπλασμα και οδηγείται στον πυρήνα επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που επάγουν την EMT. Η Notch σηματοδότηση μπορεί να επάγει EMT μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF- κ B ή τροποποιώντας τη δραστηριότητα του TGF- β . Πολυάριθμοι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης RTKs που συνδέονται με αυξητικούς παράγοντες έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην EMT. Η υποξία επάγει την EMT μέσω αυξορύθμισης των HIF1a, SNAI1, TWIST1, ενεργοποίησης των Notch, NF- κ B μονοπατιών κι αναστολής της GSK-3 β . Αλλαγές της ECM έχουν επίσης την ικανότητα να επάγουν EMT. Όπως

διαφαίνεται τα μόρια που διαμεσολαβούν την EMT αποτελούν συστατικά των σηματοδοτικών μονοπατιών του στρώματος, δηλαδή του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου (119,122,109,123)

Η EMT επάγει δραστικές αλλαγές στο μοριακό προφίλ των κυττάρων, οι οποίες αφορούν τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης, δηλαδή τις καντχερίνες. Έτσι λοιπόν η έκφραση του διακυτταρικού προσκολλητικού μορίου της E-καντχερίνης που απαντάται στα επιθήλια χάνεται και αντικαθίσταται από τη N-καντχερίνη που απαντάται σε μεσεγχυματικά κύτταρα (cadherin switch). Η απώλεια έκφρασης της E-καντχερίνης μπορεί να συμβεί: - λόγω μετάλλαξης του γονιδίου της (όπως συμβαίνει σε διάχυτα καρκινώματα στομάχου και lobular καρκινώματα μαστού) και - λόγω καταστολής της μεταγραφής της (το συνηθέστερο) μέσω επιγενετικών αλλαγών (epigenetic silencing) όπως: α) υπερμεθυλίωσης του DNA, γεγονός που επιτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες (Snail, Slug, ZEB1,-2, Twist, E47) των οποίων η έκφραση αυξάνει μέσω σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες, Wnt και Notch σηματοδότηση, και β) ρύθμισης της μεταγραφής από microRNAs (mir-200, mir-205 κ.α) με στόχο τα ZEB-1,-2 (123). Η μειορύθμιση της έκφρασης της E-καντχερίνης οδηγεί σε απώλεια των adherens junctions και σε απελευθέρωση μορίων από το σύμπλεγμα προσκόλλησης, πχ της β-κατενίνης, που δρα στον πυρήνα αλληλεπιδρώντας με Tcf/Lef μεταγραφικούς παράγοντες και επάγοντας την έκφραση γονιδίων που επάγουν τον κυτταρικό, πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διήθηση (cyclin D1, MMPs, L1-CAM, S100A4), του p-120 με αποτελέσματα την αποσταθεροποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων μέσω δράσης στο Rho και την προσεκβολή ελασματοποδίων μέσω Rac, κ.α. (εικόνα 7) Η κλινική σημασία της EMT έγκειται στο ότι είναι υπεύθυνη α) για 53 τη διήθηση και τη μετάσταση, β) για τη δημιουργία καρκινικών stem κυττάρων, και γ) για την αντίσταση στην απόπτωση και τη θεραπεία. (119,122,123)



Εικόνα 8: Απλοποιημένη σύνοψη των σηματοδοτικών μονοπατιών στην EMT, των μορίων που την ενεργοποιούν και των επιδράσεων της στις κυτταρικές συνδέσεις και την ECM (123).

Παρόμοιο διττό ανατομικό και λειτουργικό ρόλο με των καντχερινών έχουν και οι ιντεγκρίνες οι οποίες συνδέουν το κύτταρο με την ECM. Οι β-ιντεγκρίνες συνδέονται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης και σηματοδοτούν μέσω του σχηματισμού του τριπλού συμπλέγματος ILK-PINCH-PARVIN (IPP complex), καθώς και μέσω FAK και SFKs (Src Family Kinases).

Κύριος ρόλος των ιντεγκρινών είναι η ρύθμιση της σταθερότητας των εστιακών συνδέσεων και η προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης ως απάντηση στη 54 σηματοδότηση από αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες (εικόνα 8). Τα καρκινικά κύτταρα παρόλο που έχουν αποκτήσει αυτονομία σε σχέση με τη σηματοδότηση από την ECM επωφελούνται επιπρόσθετα από τη

σηματοδότηση από αυτή μέσω των ιντεγκρινών τόσο κατά την έναρξη όσο και την εξέλιξη του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα έχει φανεί ότι χάνουν μόρια ιντεγκρινών με αποτέλεσμα τη μείωση της προσκόλλησης στην ECM, αλλά και αλλάζουν τον τύπο των ιντεγκρινών τους προς εκείνους που προάγουν τη μετανάστευση και την επιβίωση (124,125,126). Η ILK (integrin linked kinase) αποτελεί κομβικό μόριο του συμπλέγματος IPP, η δραστηριότητα της αυξάνει κατά τη σηματοδότηση από τις ιντεγκρίνες αλλά και από αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες, υποξία και ρυθμίζεται από τα PIs. Σηματοδοτεί μέσω ενεργοποίησης των GSK-3, AKT/PKB, Η ενεργοποίηση της AKT/PKB επάγει την κυτταρική επιβίωση. Η ενεργοποίηση της GSK-3 οδηγεί στην ενεργοποίηση των AP-1 και catenin-LEF μεταγραφικών παραγόντων που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις MMP-9 και cyclin-D1 αντίστοιχα. Αυτές επάγουν τη διήθηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ILK επίσης έχει δράση στην κυτταρική μετανάστευση και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, αφού ενεργοποιεί το α-PIX (GEF για τα Rac-1 και Cdc42) καθώς και την κοφιλίνη μέσω Src. Υψηλά επίπεδα της ILK καταστέλλουν την έκφραση της E-καντχερίνης μέσω υπερέκφρασης του Snail και ευοδώνουν την EMT με συνέπεια αυξημένη διήθηση και μετάσταση (127,128). Η σύνδεση των ιντεγκρινών με κολλαγόνο τύπου I οδηγεί σε EMT αφού μειώνει την έκφραση της E-καντχερίνης και αυξάνει την έκφραση της N-καντχερίνης. Επίσης οι ιντεγκρίνες είναι υπεύθυνες για τη σωστή χωροθέτηση των πρωτεασών στο κύτταρο, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία για τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων (109). Η FAK (focal adhesion kinase) είναι μια non-receptor τυροσινική κινάση που εμπλέκεται στη σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών και RTKs για τη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, του κυτταρικού σχήματος και της κινητικότητας των κυττάρων. Αλληλεπιδρά με RTKs (EGFR και PDGFR), την ezrin, το p130Cas, την παξιλίνη και την ταλίνη και η άυξηση της έκφρασης της έχει κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Η Nck-2 είναι μια SH2/SH3 πρωτεΐνη υποδοχέας που αλληλεπιδρά με την PINCH-1 του IPP συμπλέγματος και ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες. Έχει ογκογενετικό ρόλο αφού εμπλέκεται στο σχηματισμό ινβαντοποδίων μέσω των N-WASP και Arp2/3. Η PINCH-1 πρωτεΐνη του IPP 55 συμπλέγματος αλληλεπιδρά με την ILK με σημαντικό ρόλο στην

κυτταρική κινητικότητα και επιβίωση. Παρουσιάζει αυξορρόθμιση ιδίως στο invasion front των όγκων (126). Συνολικά οι ιντεγκρίνες εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου με τους εξής μηχανισμούς:

- ♣ Διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσεων (είτε μέσω διάσπασης και ουβικωτίωσης του συμπλέγματος E-καντχερίνη-β-κατενίνη αφού φωσφορυλιωθεί από τις RTKs, SFKs είτε μέσω υπερέκφρασης του SNAIL/SLUG που καταστέλλει την έκφραση της E-καντχερίνης)

- ♣ Ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGF-β από τις ανβ6, ανβ8 ιντεγκρίνες.

- ♣ Ευόδωση της μετανάστευσης που διαμεσολαβείται κυρίως μέσω της FAK (ενεργοποίηση Rac, ανακύκλωση εστιακών συνδέσεων, ενεργοποίηση ERK/MAPK με δράση στη συστολή των ινών ακτομυοσίνης, ενεργοποίηση JNK με δράση στην παξιλλίνη)

- ♣ Αναδιαμόρφωση της ECM μέσω ενεργοποίησης των MMPs. (η MMP2 ενεργοποιείται από τις ανβ3 ιντεγκρίνες και οι MMP2, MMP9 από την JNK μέσω της FAK).

- ♣ Αύξηση της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων μέσω της α4β6 ιντεγκρίνης που αλληλεπιδρά με RTKs.

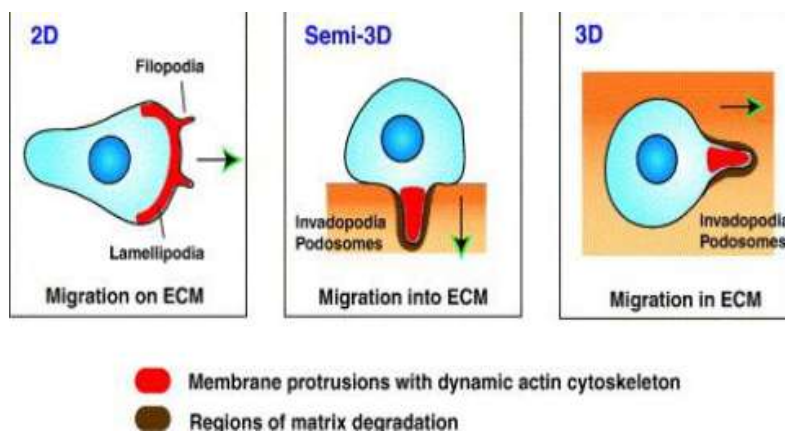
- ♣ Επαγωγή αγγειογένεσης μέσω ενεργοποίησης ιντεγκρινών από τον VEGF.

- ♣ Αντίσταση στην απόπτωση μέσω ενεργοποίησης του PI3K/AKT μονοπατιού από τη FAK και της ενεργοποίησης του αντιαποπτωτικού Bcl-2 γονιδίου από τις ιντεγκρίνες.

- ♣ Αποίκιση απομακρυσμένων οργάνων και συνεπώς μετάσταση μέσω σύνδεσης των καρκινικών κυττάρων με αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια τα οποία σχηματίζουν μεταστατικά μικροέμβολα. Αυτή η σύνδεση διαμεσολαβείται από τις σελεκτίνες και τις ιντεγκρίνες. (124). Η σηματοδότηση διαμέσου των ιντεγκρινών καθώς και των κινασών και υποδοχέων που εμπλέκονται σε αυτήν έχει φανεί πως έχει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο (129). Η υπερέκφραση ή απώλεια έκφρασης των ιντεγκρινών

συμβάλλει στην εξέλιξη καρκινωμάτων, ενώ αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των ιντεγκρινών επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό τη διήθηση και τη μετάσταση (125). Από την άλλη πλευρά μειωμένα επίπεδα ιντεγκρινών προάγουν την αποκόλληση από τον πρωτοπαθή όγκο και τη διήθηση. Παρομοίως και άλλα μόρια του συμπλέγματος των εστιακών συνδέσεων (πχ Nck, PINCH1) παρουσιάζουν μεταβολές έκφρασης στα καρκινικά κύτταρα.

Όλα τα παραπάνω μόρια συμμετέχουν στην κυτταρική απάντηση των καρκινικών κυττάρων κατά την genotoxic injury που προκαλείται από την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία και είναι υπεύθυνα για την αντίσταση στη θεραπεία, γνωστή ως CAM-RR/ CAM-DR (cell adhesionmediated radioresistance/ drug resistance). Κατά τα CAM-RR/ CAM-DR φαινόμενα οι ιντεγκρίνες μεταβάλλουν το πρότυπο και τα επίπεδα έκφρασης τους με αποτέλεσμα αυξημένη επιβίωση, αντίσταση στην απόπτωση και τη θεραπεία (126). Η κυτταρική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων διαμεσολαβείται από προσεκβολές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπως τα νηματόποδια, τα ελασματοπόδια (κατά την κίνηση σε επίπεδα υποστρώματα) και τα ινβαντοπόδια (κατά την κίνηση σε τρισδιάστατο περιβάλλον και τη διήθηση της ECM) (εικόνα 9). Τα ποδοσωμάτια και τα ινβαντοπόδια (podosomes/invadopodia) είναι δυναμικές προσεκβολές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που προκύπτουν από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης και αντιπροσωπεύουν θέσης προσκόλλησης και αποδόμησης της ECM.



Εικόνα 9: Κυτταρική μετανάστευση και κυτταρικές προσεκβολές ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον (117).

Η αναγνώριση τους ανάγεται από περίπου 25 έτη και έκτοτε ακολούθησε εντατική μελέτη αυτών και των σχετιζομένων με αυτές τις δομές πρωτεϊνών, τα ερεθίσματα που προκαλούν τη δημιουργία τους και τη σημασία τους *in vivo*. Τυπικά ο όρος ποδοσωμάτια αναφέρεται σε φυσιολογικά κύτταρα κατά βάση μονοκυτταρικής προέλευσης, όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και οστεοκλάστες, ενώ ο όρος ινβαντοπόδια αφορά καρκινικά κύτταρα (130,131).

Τα ποδοσωμάτια και τα ινβαντοπόδια είναι αρκετά όμοια σε αρχιτεκτονική και λειτουργία, παρόλα αυτά όμως εμφανίζουν και διαφορές όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι τα ινβαντοπόδια παραμένουν σταθερά για πολλές ώρες και διηθούν βαθιά την ECM, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα ποδοσωμάτια. Τα ποδοσωμάτια/ινβαντοπόδια επιτρέπουν το συγχρονισμό της κυτταρικής κίνησης και την αποδόμηση της ECM μέσω έκκρισης MMPs με αποτέλεσμα την κυτταρική μετανάστευση διαμέσου του ιστικού μικροπεριβάλλοντος.

Η φυσιολογική κυτταρική μετανάστευση διαμεσολαβεί διαδικασίες όπως η εμβρυογένεση και η απάντηση στο τραύμα και τη λοίμωξη. Συγκεκριμένα ο ρόλος των ποδοσωματίων έχει μελετηθεί στο remodeling των οστών, στην επιδιόρθωση των αγγείων μέσω μετανάστευσης λείων μυικών κυττάρων και

την ανοσολογική απάντηση μέσω των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων.

Η ανώμαλη κυτταρική μετανάστευση διαμεσολαβεί παθολογικές διαδικασίες όπως αναπτυξιακές, αγγειακές, ανοσολογικές διαταραχές και τη μετάσταση (131,132). Απαραίτητες για την ωρίμανση των ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων είναι η προσέλκυση και η ενεργοποίηση πρωτεασών, υπεύθυνων για την αποδόμηση της ECM.

Αυτές περιλαμβάνουν τις zinc-regulated μεταλλοπρωτεάσες (MMP2, MMP9, MT1-MMP, ADAM sheddases), καθεψίνες, σεπράση και τον urokinase plasminogen activator (130,131,132).

Η διέγερση των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων με αυξητικούς παράγοντες όπως ο PDGF, ο TGFβ και ο EGF οδηγεί σε δημιουργία ποδοσωματίων και ινβαντοποδίων αντιστοίχως, μέσω: - Src και PKCs κινασών, των οποίων η ενεργοποίηση έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και στην αποσυναρμολόγηση των ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων (με υποστρώματα τις Tks5, κοντρακτίνη, AFAP110, p130Cas) - ιντεγκρινών, οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με την ECM, είναι υπεύθυνες για αμφίδρομη σηματοδότηση μεταξύ κυττάρου - ECM, εντοπίζονται στα ποδοσωμάτια/ινβαντοπόδια, ρυθμίζουν το σχηματισμό τους και την αποδόμηση της ECM - ROS, οι οποίες παράγονται ως αποτέλεσμα του αυξημένου stress που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα αλλά και της ενεργοποίησης της Nox (NADPH oxidase) οικογένειας. Η αυξημένη παραγωγή ROS οδηγεί σε διήθηση και μετάσταση ευοδώνοντας το σχηματισμό ινβαντοποδίων, αυξάνοντας την έκκριση μεταλλοπρωτεασών και ενεργοποιώντας τις Src, PKC- microRNAs, (133), τα οποία ρυθμίζουν την εναλλαγή μεταξύ διαφοροποιημένων (συσταλτών) και αποδιαφοροποιημένων (μεταναστευτικών) λείων μυικών κυττάρων και των οποίων η αυξημένη έκφραση σχετίζεται με καταστολή σχηματισμού ποδοσωματίων ενώ η καταστολή τους επάγει το σχηματισμό τους (132).

Η στροφή από την κατάσταση ηρεμίας στο μεταναστευτικό φαινότυπο χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση των εστιακών συνδέσεων και την

προσεκβολή ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων. Σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια σχηματισμού τους παίζουν οι Src/ FAK κινάσες και την προσέλκυση πολλών μορίων ρυθμιστών του κυτταροσκελετού ακτίνης (Tks5, Nck1, Nck2, NWASP, Grb2, contractin, Arp2/3, Rho GTPασες, cofilin, WIP, κ.α.) (117,132).

Η ωρίμανση των ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων απαιτεί την εντόπιση σε αυτά και τη ρύθμιση έκκρισης των MMPs. Αυτό διαμεσολαβείται από μόρια όπως η contractin και η Tks4. Η MT1-MMP παραδίδεται στα ινβαντοπόδια μέσω ενδοκυττάριας ανακύκλωσης, κινητοποίησης από ενδοκυττάρια αποθήκες και εξωκύττωσης.

Η μετανάστευση έχει φανεί πως απαιτεί τη συνεργασία του κυτταροσκελετού ακτίνης και των μικροσωληνίσκων τόσο για το σχηματισμό ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων όσο και για τη μεταφορά κυστιδίων που περιέχουν MMPs. Στην ανακύκλωση των ποδοσωματίων/ινβαντοποδίων έχουν ρόλο η κοντρακτίνη και η AFAP110. Τα ποδοσωμάτια/ινβαντοπόδια, όπως έχει προαναφερθεί, έχουν σημαντικό ρόλο τόσο στην εμβρυογένεση όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως σε γενετικά σύνδρομα, στην αθηροσκλήρωση και στη μετάσταση του καρκίνου. Τόσο τα καρκινικά κύτταρα όσο και τα φυσιολογικά που έχουν υποστεί EMT μοιράζονται κοινούς μεταφραφικούς παράγοντες όπως ο Twist, που ευοδώνει τόσο την EMT όσο και το σχηματισμό ινβαντοποδίων. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Tks4 πρωτεΐνη οδηγεί σε ανώμαλο σχηματισμό ποδοσωματίων με αποτέλεσμα το σύνδρομο Frank-ter-Haar (FTHS) που χαρακτηρίζεται από σκελετικά, καρδιακά, μεταβολικά και οφθαλμικά ελλείμματα.

Μετάλλαξη στο WASP προκαλεί ελαττωματικό σχηματισμό ποδοσωματίων στα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα οδηγώντας στο WAS σύνδρομο. Η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται εκτός των άλλων από εναπόθεση λείων μυικών κυττάρων στον αγγειακό αυλό ως απάντηση στο αγγειακό στρες και αποδίδεται τόσο σε αυξημένο πολλαπλασιασμό αλλά και αυξημένη μετανάστευση αυτών. Τα microRNAs εμπλέκονται στη μετατροπή των λείων μυικών κυττάρων από διαφοροποιημένα κύτταρα σε μεταναστευτικά.

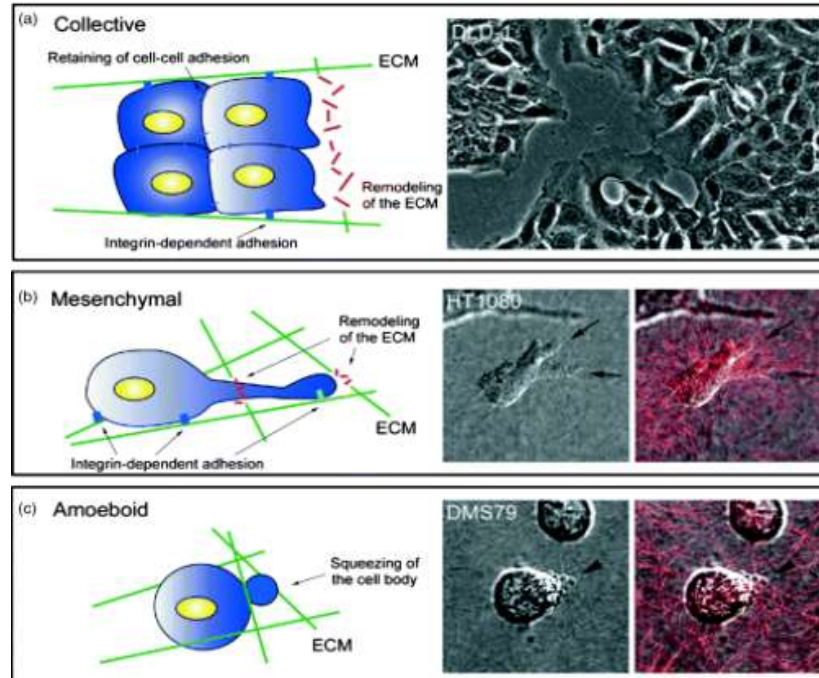
Καταστολή έκφρασης αυτών των microRNAs, πχ με διαγραφή οδηγεί σε αύξηση αριθμού των ποδοσωματίων και 60 πάχυνση του τοιχώματος των αρτηριών. Τεράστιος αριθμός μελετών τόσο σε καρκινικές σειρές όσο και σε ανθρώπινους ιστούς επιβεβαιώνουν την εμπλοκή των ινβαντοποδίων στη διήθηση και τη μετάσταση (132).

Τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν με διάφορους τρόπους. Στους περισσότερους όγκους συνυπάρχουν ταυτόχρονα διάφοροι τύποι κυτταρικής μετανάστευσης. Στην περίπτωση επιθηλιακών όγκων τα κύτταρα μετακινούνται όλα μαζί σαν σεντόνι, λόγω των υπαρχουσών διακυτταρικών συνδέσεων. Αυτός ο τύπος μετανάστευσης ονομάζεται συλλογική μετανάστευση (collective migration) και παρατηρείται επίσης κατά την επιδιόρθωση των ιστών και την αγγειογένεση. Καθώς τα επιθηλιακά κύτταρα αποδιαφοροποιούνται, αρχίζουν να αποσπώνται και να κινούνται ως ανεξάρτητες ομάδες. Πλέον κινούνται με τον τύπο της μεμονωμένης κυτταρικής μετανάστευσης (individual migration). Αυτή η μετάβαση από το συλλογικό στον μεμονωμένο τύπο μετακίνησης είναι EMT και δείκτης καρκινικής εξέλιξης. Όταν καλλιεργηθούν σε τρισδιάστατο υπόστρωμα τα καρκινικά κύτταρα που κινούνται με μεμονωμένο τύπο κυτταρικής μετανάστευσης εμφανίζουν 2 τυπικές μορφολογίες, μια επιμήκη και μια σφαιρική (εικόνα 10). Τα πρώτα κινούνται με μεσεγχυματικό τρόπο μετανάστευσης (mesenchymal migration), ενώ τα δεύτερα με αμοιβαδοειδή

τρόπο

(amoeboid

migration).



Εικόνα 10: Οι διαφορετικοί τύποι της κυτταρικής μετανάστευσης και οι αντίστοιχες μορφολογίες των καρκινικών κυττάρων (112).

Τα κύτταρα που εμφανίζουν μεσεγχυματική μετανάστευση χρησιμοποιούν τον τρόπο με τα 4 βήματα που περιγράφηκε πιο πάνω, με τη διαφορά ότι σε τρισδιάστατο υπόστρωμα υπάρχει και η αποδόμηση της ECM από πρωτεολυτικά ένζυμα μέσω των ινβαντοποδίων. Παρατηρείται στους ινοβλάστες και χαρακτηρίζει το ινοσάρκωμα και το γλοίωμα. Εξαρτάται από τη σηματοδότηση από το Rac. Τα κύτταρα που μετακινούνται με αμοιβαδοειδή τρόπο μετανάστευσης δεν εξαρτώνται από την προσκόλληση κυττάρου - υποστρώματος. Όταν μετακινούνται δια της ECM αλλάζουν σχήμα και στριμώνχονται μέσα από κενά της για να περάσουν. Εξαρτάται από τη σηματοδότηση από Rho/ROCK η οποία οδηγεί στο σχηματισμό blebs, οι οποίες είναι φυσαλιδώδεις προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης με ρόλο στη διήθηση. Αυτός ο τύπος μετανάστευσης συναντάται στα

λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και χαρακτηρίζει τα λεμφώματα και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Η κυτταρική μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων αλλάζει τύπο ανάλογα με τις συνθήκες, γεγονός που καθιστά δύσκολη την αναστολή της κίνησης τους (112, 134, 135).

Η EMT και ο σχηματισμός προσεκβολών που επάγουν την κυτταρική μετανάστευση, των καρκινικών κυττάρων, δεν είναι ανεξάρτητες διαδικασίες. Πέραν του γεγονότος ότι και οι 2 χαρακτηρίζονται από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης διαμεσολαβούνται και από κοινούς μεταγραφικούς παράγοντες ή κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Επίσης η ενεργοποίηση της EMT έχει φανεί ότι αυξάνει το κακοήθες δυναμικό των καρκινικών κυττάρων αφού ενισχύει το σχηματισμό νηματοποδίων μέσω του μονοπατιού ILK/β-parvin/cofilin (136). Δεν είναι όμως απαραίτητα αλληλοσυνδεδεμένες οι διαδικασίες της EMT και της διήθησης αφού έχει παρατηρηθεί σε πολλά πλακώδη καρκινώματα (συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του λάρυγγα) προσεκβολή νηματοποδίων και συλλογική μετανάστευση (collective migration) χωρίς EMT, η οποία επάγεται μέσω της ποδοπλανίνης (137).

Πολλοί επιθετικοί καρκίνοι δεν εμφανίζουν τις μοριακές μεταβολές της EMT υποδεικνύοντας ότι η EMT δεν είναι πάντα απαραίτητη για τη διήθηση (138). Τα παραπάνω δεδομένα αντικατοπτρίζουν τη μεγάλη πολυπλοκότητα των μοριακών μηχανισμών που διαμεσολαβούν την καρκινική εξέλιξη.

APR 2/3 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο όρος «μετάσταση» αναφέρεται στην ανάπτυξη του όγκου σε θέσεις μακράν της αρχικής εστίας. Ουσιαστικά, η μετάσταση διακρίνει τους καλοήθεις από τους κακοήθεις όγκους και είναι το τελικό βήμα στη διαδικασία της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Η μετάσταση αποτελεί τη μείζονα αιτία της αποτυχίας της αντικαρκινικής αγωγής και του θανάτου των

καρκινοπαθών. Αν και οι μεταστατικές («δευτεροπαθείς») εστίες είναι δυνατόν να αναπτυχθούν, λόγω διασποράς των κακοήθων κυττάρων στις κοιλότητες του σώματος, ο όρος "μετάσταση" επιφυλάσσεται γενικά για τη διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της αιματικής ή λεμφικής κυκλοφορίας και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Έχει υπολογισθεί ότι το 60-70% των καρκινοπαθών έχουν κλινικά έκδηλες ή λανθάνουσες (μη εμφανείς) μεταστάσεις κατά τη διάγνωση, οι οποίες επιβαρύνουν την πρόγνωση. Το γεγονός αυτό καθιστά σαφή την ανάγκη καθορισμού αξιόπιστων δεικτών του μεταστατικού δυναμικού στους διάφορους όγκους. Στο σημείο αυτό, η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της μεταστατικής διαδικασίας αναμένεται να προσφέρει πολλές πληροφορίες, αναφορικά με τον καθορισμό γονιδίων που καταστέλλουν και γονιδίων που αυξάνουν το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων.

Ο καρκίνος αναπτύσσεται και εξαπλώνεται διασπώντας τις βασικές μεμβράνες των επιθηλίων και των αγγείων και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Το τελευταίο συνίσταται σε ένα σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνών και υδατανθράκων, το οποίο καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα εκλύουν διασπαστικά ένζυμα (πρωτεϊνάσες) και προάγουν την έκφραση ενζύμων (όπως μεταλλοπρωτεϊνών), ενώ συγχρόνως, καταστέλλουν την έκκριση των ιστικών αναστολέων των πρωτεϊνών από τα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα, με απώτερο σκοπό τη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Το φαινόμενο της μετάστασης περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών σταδίων, από την απόσπαση των νεοπλασματικών κυττάρων από την πρωτοπαθή εστία μέχρι τη μεταστατική διήθηση απομακρυσμένων οργάνων, όπου και πολλαπλασιάζονται για το σχηματισμό της νέας νεοπλασματικής εστίας. Το φαινόμενο της μετάστασης είναι αρκετά πολύπλοκο και σχετίζεται με μηχανικές και αιμοδυναμικές παραμέτρους, με την αγγειοβρίθεια των οργάνων, με τις ιδιότητες των νεοπλασματικών κυττάρων και με παράγοντες του ξενιστή, όπως το ανοσοποιητικό σύστημα, χημικούς παραγόντες και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

Τα επιθηλιακά κύτταρα φυσιολογικά περιχαρακώνονται από βασικές μεμβράνες, οι οποίες τα διαχωρίζουν από το υποκείμενο στρώμα και οι οποίες αποτελούνται από δομικές πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από το στάδιο του ενδοεπιθηλιακού (in situ) στο στάδιο του διηθητικού καρκινώματος, τα νεοπλασματικά κύτταρα διασπούν τις βασικές μεμβράνες και εισέρχονται στο διάμεσο υπόστρωμα. Η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τους φραγμούς των βασικών μεμβρανών και τελικά η νεοπλασματική διήθηση περιλαμβάνει 3 στάδια:

α) το στάδιο της προσκόλλησης, β) το στάδιο της διάσπασης του εξωσκελετικού δικτύου Όπως το κολλαγόνο IV (το κυριότερο συστατικό), τη λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες και γ) το στάδιο της μετανάστευσης.

Στο πρώτο στάδιο το καρκινικό κύτταρο προσκολλάται στη βασική μεμβράνη χρησιμοποιώντας ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς, όπως είναι οι υποδοχείς λαμινίνης και ιντεγκρίνης. Αυτοί οι υποδοχείς αναγνωρίζουν τις γλυκοπρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης που είναι η λαμινίνη, το κολλαγόνο IV και η ινονεκτίνη.

Στο δεύτερο στάδιο προκαλείται στο σημείο προσκόλλησης του καρκινικού κυττάρου μια εντοπισμένη περιοχή λύσης της συνέχειας της βασικής μεμβράνης, λόγω έκλυσης πρωτεϊνών από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και τα παρακείμενα φυσιολογικά, που διασπούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και το βασικό συστατικό της, που είναι τα μόρια προσκόλλησης. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα μόρια προσκόλλησης συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της διαδικασίας της μετάστασης. Ταυτόχρονα, καταστρέφεται η ισορροπία μεταξύ πρωτεϊνών και φυσικών αναστολέων τους που υπάρχουν στον ορό ή στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ή εκκρίνονται από τα παρακείμενα φυσιολογικά κύτταρα. Τα σπουδαιότερα διασπαστικά ένζυμα είναι οι κολλαγενάσες, που διασπούν το κολλαγόνο IV, το κύριο δομικό συστατικό των βασικών μεμβρανών. Το τρίτο στάδιο είναι η μετανάστευση, κατά το οποίο τα καρκινικά κύτταρα διαπερνούν τη βασική μεμβράνη διαμέσου της ζώνης πρωτεόλυσης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Στην αρχή του σταδίου αυτού το καρκινικό κύτταρο εμφανίζει ψευδοπόδια, προκειμένου να επιτύχει την κίνησή του. Ο μηχανισμός της κίνησης του

καρκινικού κυττάρου δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, σημαντικός, όμως φαίνεται ότι είναι ο ρόλος των κυτοκινών.

Σχηματικά, τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας είναι τα εξής:

1. Απώλεια της ενδοκυττάριας προσκόλλησης ενός κυττάρου ή ομάδας κυττάρων που διαχωρίζονται από τον πρωτοπαθή όγκο,
2. Προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης και της αγγειακής διήθησης,
3. Προσκόλληση σε πρωτεΐνες του ορού ή λευκοκύτταρα εντός της κυκλοφορίας,
4. Προσκόλληση στο ενδοθήλιο ή στη βασική μεμβράνη και
5. Μετανάστευση και σχηματισμός μεταστατικού όγκου.

Η μετανάστευση και η κίνηση των κυττάρων παίζει ρόλο πολύ βασικό οδηγώντας τους ιστούς σε μορφογέννεση, προωθώντας πολλές λειτουργίες όπως την αιμόσταση την άμυνα ,την εμβρυική ανάπτυξη αλλά και την καρκινική μετάσταση.

Η κυτταρική κίνηση απαιτεί δυναμική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, με ινίδια που να προσφέρουν μηχανική υποστήριξη της διεύθυνσης μπροστα την σύμπτυξη πίσω αλλά και τη σταθεροποίηση των δομών που δημιουργούνται. Πιο κύρια απο όλα, τα ινίδια της ακτίνης που χτίζουν ελασματοπόδια, έχουν προσανατολισμό προς τα έξω , καθώς οι ελεύθερες άκρες τους που μεγαλώνουν γρήγορα δείχνουν προς τα έξω, επιτρέποντας την ανάπτυξη του δικτύου. Προκειμένου να ξεκινήσει ο πολυμερισμός της ακτίνης και συνεπώς η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα συν ελεύθερα άκρα. Αυτό, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να συμβεί μέσω:

α) αποκάλυψης (uncapping) των άκρων, β) αποκοπής ινιδίων για σχηματισμό νέων συν άκρων, και γ) de novo πολυμερισμό νέων ινιδίων από το Arp2/3 σύμπλεγμα.(163, 117)

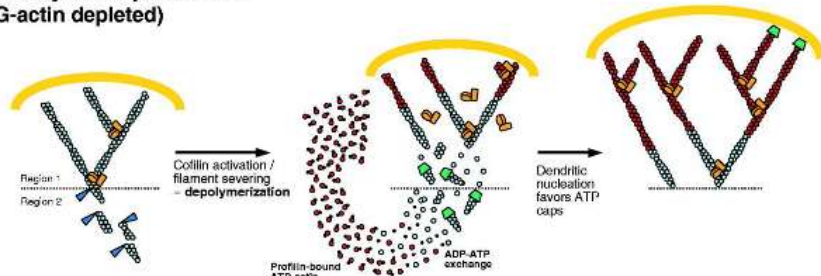
Στο δεύτερο μηχανισμό εμπλέκεται η δράση της κοφιλίνης. **Η κοφιλίνη έχει την ιδιότητα να αποκόπτει τα νημάτια ακτίνης δημιουργώντας απευθείας ελεύθερα συν άκρα (139). Η κοφιλίνη εμφανίζει συνέργεια με το Arp2/3 σύμπλεγμα**, το οποίο εντοπίζεται στις Υ-διακλαδώσεις των νηματίων και καταλύει το σχηματισμό νέων νηματίων (139,140). Και τα δυο συνεντοπίζονται στο προπορευόμενο άκρο μετακινούμενων κυττάρων. Η δράση της κοφιλίνης ενισχύει τη δράση του Arp2/3 συμπλέγματος, αφού το δεύτερο προτιμά να πολυμερίζει τα νέα άκρα που δημιουργεί η κοφιλίνη παρά τα παλιά ADP-άκρα.

Αυτή η διαθεσιμότητα νέων νηματίων ακτίνης αυξάνει την ικανότητα δημιουργίας πυρήνα του Arp2/3 και επιταχύνει τη διακλάδωση στο συν άκρο του μητρικού νηματίου. Υπάρχουν 2 μοντέλα για τη επεξήγηση της δημιουργίας προσεκβολών στα μεταναστευτικά κύτταρα με βάση τη δράση της κοφιλίνης:

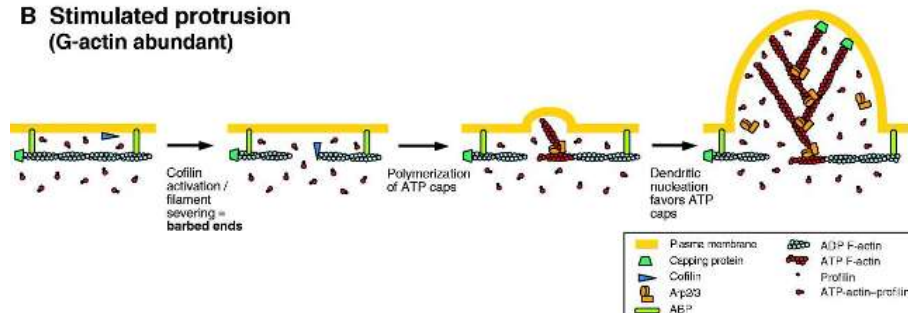
A) The steady-state protrusion model (ή κατά άλλους “The enhanced dissociation model”). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η κοφιλίνη προκαλεί συνεχή ανακύκλωση μορίων ακτίνης, αποπολυμερίζοντας τα νημάτια ακτίνης στη βάση του ελασματοποδίου. Ο αποπολυμερισμός εξυπηρετεί τη διατήρηση steady-state πολυμερισμού στο προπορευόμενο άκρο. Το Arp2/3 εξυπηρετεί τη δημιουργία διακλαδώσεων πλησίον της μεμβράνης. Αυτό το μοντέλο εξηγεί τη συνεχόμενη κίνηση των κερατινοκυττάρων και των ενδοκυττάρων παθογόνων, όταν τα χαμηλά επίπεδα της G-ακτίνης περιορίζουν τον πολυμερισμό.

B) The stimulated protrusion model (ή κατά άλλους “The severing model”). Σύμφωνα αυτό το μοντέλο υπάρχει συνέργεια μεταξύ κοφιλίνης και Arp2/3. Η ενεργοποίηση της κοφιλίνης πλησίον του προπορευόμενου άκρου οδηγεί σε αποκοπή νηματίων δημιουργώντας νέα ελεύθερα συν άκρα στα οποία θα δρα το Arp2/3 σύμπλεγμα για να πολυμερίσει νέα νημάτια. Ο παραπάνω μηχανισμός εξυπηρετεί τη διακεκομμένη κίνηση, όπως των ινοβλαστών και των καρκινικών κυττάρων, όπου η κοφιλίνη εντοπίζεται στην κορυφή των ελασματοποδίων(141).

A Steady-state protrusion (G-actin depleted)



B Stimulated protrusion (G-actin abundant)



Η κοφιλίνη είναι αρκετή για τη δημιουργία νέων ακρών, τον πολυμερισμό της ακτίνης, τον καθορισμό της κυτταρικής κίνησης (142) και την εγκαθίδρυση πολικότητας στο κύτταρο (143). (εικόνα 11)

Και τα δυο μοντέλα (εικόνα 11) μπορεί να λειτουργούν ταυτόχρονα σε ένα κύτταρο, ανάλογα με τις ανάγκες του. Ένα χημειοτακτικό ερέθισμα μπορεί να ενεργοποιεί το πρώτο μοντέλο, ενώ μια διαρκής κίνηση ενεργοποιεί το δεύτερο. Επίσης εξαρτάται από την συγκέντρωση της ελεύθερης G-ακτίνης, αφού το πρώτο μοντέλο λειτουργεί κάτω από συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ελεύθερης ακτίνης, ενώ το δεύτερο σε υψηλής, καθώς και από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο όπως προαναφέρθηκε. Μια ακόμη διαφορά ανάμεσα στα δυο μοντέλα είναι ότι στο δεύτερο μοντέλο η κοφιλίνη είναι αυτή που θα καθορίσει την κατεύθυνση της κυτταρικής κίνησης, δηλαδή έχει άμεσο ρόλο στον πολυμερισμό. Υπερασπιστές του δεύτερου μοντέλου έχουν παρατηρήσει ότι η δράση της κοφιλίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτή οδηγεί σε αποκοπή νηματίων και δημιουργία νέων συν άκρων, σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις τα νηματία είναι σχετικά σταθερά και

παρατηρείται βασικός ρυθμός αποπολυμερισμού μονομερών, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις η κοφιλίνη οδηγεί σε *de novo* πολυμερισμό μονομερών ακτίνης (144).

Δεδομένου ότι η διήθηση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων διαμεσολαβείται από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης που παράγει την κινητήριο δύναμη για την κυτταρική μετανάστευση είναι λογικό οι ρυθμιστικές του πρωτεΐνες (ABPs) να έχουν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει τη συμμετοχή της κοφιλίνης στους μηχανισμούς διήθησης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Η *arp2/3* εμπλέκεται στο σχηματισμό ελασματοποδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική κίνηση, καθώς και στο σχηματισμό ινβαντοποδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διήθηση της ECM, ενώ η καταστολή έκφρασης της οδηγεί σε υποστρόφη τους και μειωμένη διηθητική ικανότητα σε καρκινικές σειρές (31).

Συνεπώς αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της κοφιλίνης και *Arp2/3* σε σχέση με το δυναμικό διήθησης και μετανάστευσης έχουν δειχθεί σε πλήθος καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. Η κοφιλίνη είναι απαραίτητη για την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων ως ανταπόκριση στη διέγερση από τον EGF (145). Υπερέκφραση της κοφιλίνης οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των μεταλλοπρωτεασών MMP-2, -14 σε καρκινικές σειρές μελανώματος (146). Επίσης υπερέκφραση της κοφιλίνης αυξάνει την κυτταρική μετανάστευση κυττάρων γλοιοβλαστώματος (147). Αυξημένα επίπεδα κοφιλίνης παρατηρούνται σε κυτταρικές καρκινικές σειρές υψηλής κακοήθειας όπως η σειρά MTLn3 μαστού (148) και η σειρά γλοιοβλαστώματος C6 (149). Επαγωγή έκφρασης της κοφιλίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου οδηγεί σε αυξημένη μεταναστευτικότητα αυτών των κυττάρων (150), ενώ κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα εμφάνισαν αυξημένη ικανότητα διήθησης και αντίσταση στη ΧΜΘ (151). Πληθώρα *in vitro* μελετών έχουν αναδείξει υψηλά επίπεδα έκφρασης της κοφιλίνης σε διάφορα καρκινώματα όπως NSLCC (151,152), πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου (148), καρκίνωμα ωοθηκών (153,154), ενδοκρινείς όγκους του γαστρεντερικού (155), πλακώδες καρκίνωμα στόματος (166), και καρκίνο παγκρέατος (148).

Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε συσχέτιση με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση της κοφιλίνης συνδέεται με αυξημένο βάθος διήθησης, λεμφαδενικές μεταστάσεις και προχωρημένο στάδιο στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου (148), και με κακή διαφοροποίηση στο καρκίνωμα των ωοθηκών (154), με αυξημένο βάθος διήθησης στους ενδοκρινείς όγκους του γαστρεντερικού (155) και στο NSCLC (151) και χειρότερη επιβίωση στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (151,152) και στο καρκίνωμα των ωοθηκών (153). Παρομοίως έχουν περιγράψει μεταβολές των ρυθμιστών της δραστηριότητας της κοφιλίνης σε καρκινικά κύτταρα όπως πχ της LIMK-1 (156,157,158). Συμπερασματικά η κοφιλίνη αλλά και κατ'επέκταση το Apr2/3 που ακολουθεί στην Υ μορφή της ακτίνης που παραγεται για να δημιουργηθούν ελασματοποδια, εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε πολλά νεοπλάσματα και συνδέεται με επιθετική συμπεριφορά των όγκων και δυσμενή πρόγνωση. Διαιτέρα ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα ότι η απορρύθμιση έκφρασης της κοφιλίνης συνδέεται με την ανοσοσανεπάρκεια η οποία χαρακτηρίζει τον καρκίνο. Η απελευθέρωση υπεροξειδίου από τα μακροφάγα οξειδώνει την κοφιλίνη των Τ-λεμφοκυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν αύξηση της F-ακτίνης και μειωμένη κινητικότητα (159). Επίσης η κοφιλίνη συμμετέχει σε κληρονομικό καρκίνο. Αφορά τις περιπτώσεις συνδρόμου Carney, του πιο κοινού όγκος της καρδιάς, που χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση της LIMK-1 και η φωσφορυλίωση της κοφιλίνης (160).

Η πρωτεΐνη WASP (Wiskott Aldrich Syndrome-WAS Protein) αναγνωρίστηκε το 1994 ως το αίτιο του ομώνυμου συνδρόμου, που χαρακτηρίζεται από έκζεμα, αιμορραγίες λόγω θρομβοκυττοπενίας και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω δυσλειτουργίας των λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία εμφανίζουν παράδοξα ομαλή επιφάνεια (161). Η WASP εντοπίζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Η N-WASP (neural- WASP) είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας, που είναι άφθονη στο νευρικό ιστό, αλλά εντοπίζεται και σε πολλούς άλλους ιστούς του σώματος. Οι WAVE πρωτεΐνες (WASP-family verprolin- homologous proteins) αφορούν 3 μέλη πρωτεϊνών (WAVE 1,-3 που εκφράζονται σε εγκέφαλο και αιμοποιητικό σύστημα και WAVE-2 που εκφράζεται καθολικά). Τα παραπάνω συνολικά 5 μέλη αποτελούν το σύμπλεγμα οικογενειών WASP/WAVE πρωτεϊνών (162).

Οι WASP/WAVE πρωτεΐνες αποτελούνται από περίπου 500 αμινοξέα, έχουν παρόμοια πρωτεϊνική δομή και ομόλογα τους εντοπίζονται σε ποικιλία ευκαρυωτών. Εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα πλησίον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπου αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τα φωσφολιπίδια της (163) όσο και στον πυρήνα. Το έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη τους έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ Rho-GTPασών και κυτταροσκελετού ακτίνης. Προκειμένου να ξεκινήσει ο πολυμερισμός της ακτίνης και συνεπώς η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού θα πρέπει να υπάρχουν διαθέσιμα ελεύθερα συν άκρα. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω :α) uncapping των άκρων, β) αποκοπής ινιδίων για σχηματισμό νέων συν άκρων, και γ) de novo πολυμερισμό νέων ινιδίων από το Arp2/3. Ο τελευταίος μηχανισμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τον ταχύ σχηματισμό δικτύου ακτίνης στο προπορευόμενο άκρο και εκεί ακριβώς δρουν οι WASP/WAVE πρωτεΐνες (164, 117).

Η πρωτεϊνική δομή του N-WASP εμπεριέχει τις εξής περιοχές (162,165): **VCA περιοχή**, που εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο και αποτελείται από την καρβοξυτελική verprolin ομόλογη περιοχή (V ή WASP-homology-2 domain WH2), την ομόλογη περιοχή της κοφιλίνης (C ή central domain) και μια acidic domain (A). Η VCA περιοχή συνδέεται με ένα μονομερές ακτίνης και με το Arp2/3 σύμπλεγμα με αποτέλεσμα το σχηματισμό πυρήνα το πολυμερισμού και τη δημιουργία νηματίων ακτίνης. Συνεπώς το N-WASP έχει την ικανότητα ενεργοποίησης του Arp2/3 συμπλέγματος οδηγώντας στον ταχύ πολυμερισμό νηματίων ακτίνης (166). Όλες οι πρωτεΐνες WASP/WAVE ενεργοποιούν το Arp2/3 σύμπλεγμα δεδομένου ότι όλες διαθέτουν VCA περιοχή, αλλά το N-WASP είναι ο ισχυρότερος ενεργοποιητής (167). Σε συνθήκες ηρεμίας η πρωτεΐνη N-WASP είναι αναδιπλωμένη μέσω αλληλεπίδρασης της VCA με την CRIB και γειτονικές περιοχές και συνεπώς είναι ανενεργή αφού η VCA είναι καλυμμένη και δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το Arp-2/3 σύμπλεγμα. Ο EFG παράγοντας τον ενεργοποιεί και τον ξεδιπλώνει και στη περίπτωση των καρκινικών κυττάρων.

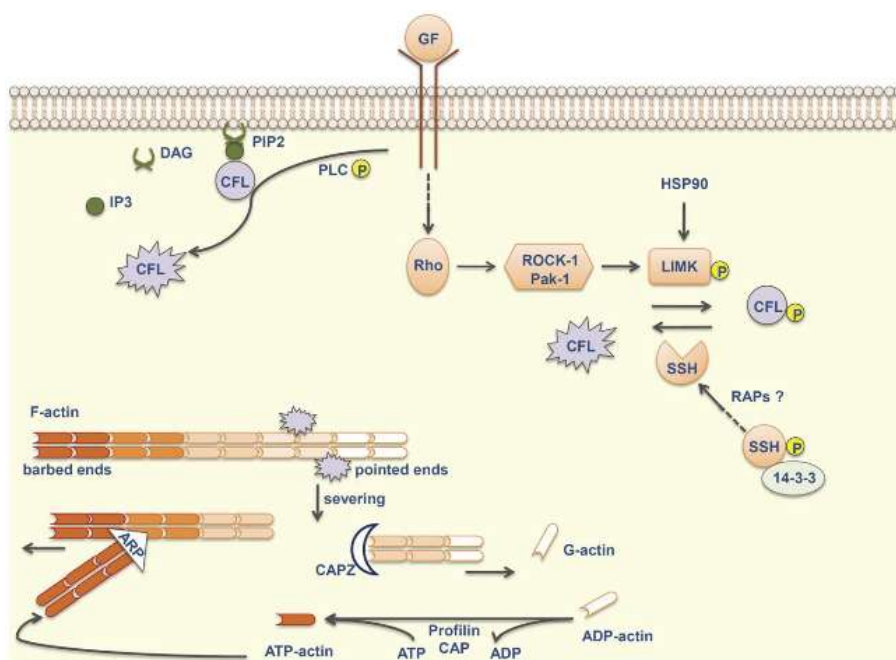
Ποιά είναι η τελικά σχέση όμως του συμπλέγματος με τον καρκίνο και ακόμα περισσότερο με την μετανάστευση των κυττάρων;

Εργασίες πολλές όλα αυτά τα χρόνια έχουν προσπαθήσει να ανακαλύψουν το ρόλο μορίων αλλά και τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται για τον σχηματισμό αυτών των δομών. Παρόλη την αυξημένη γνώση στην βιοχημική δραστηριότητα παραγόντων, που εμπλέκονται στον πολυμερισμό της ακτίνης, στα περιφερικά κύτταρα, οι λεπτομέρειες στη κινητική των ελασματοποδίων είναι ακόμα αντιμαχόμενες. Παρόλα αυτά η ανακάλυψη της εμπλοκής του Atp2/3 συμπλέγματος, στην δημιουργία των ινιδίων ακτίνης είναι δεδομένη από το 1994. Επίσης είναι σαφές πως η ενεργοποίηση του Atp2/3 γίνεται μέσω του συμπλέγματος των πρωτεϊνών WAVE, της κοντακτίνης και της κοφιλίνης.

Σε μελέτη που έγινε σχετικά με την εμφάνιση του atp 2/3 συμπλέγματος σε κυτταρικές σειρές μεταστατικών αδενοκαρκινωμάτων, φάνηκε πως στις ελεύθερες άκρες των ινιδίων ακτίνης των καρκινικών κυττάρων συνδέονται τα μόρια και μέσα σε 3 από τον ερεθισμό τους με EFG η μεμβράνη μετακινείτε 5,2 μm δεξιά (168). Αυτά τα κύτταρα έχουν κάποιες ομοιότητες με τα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται συνέχεια σε κίνηση, αλλά ακόμα περισσότερο με τα αμοιβαδοειδή χημειοτακτικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα λευκοκύτταρα, τα δικτυοενδοθηλιακά. Σε καρκινικά κύτταρα που δεν έχουν υποστεί κάποιο ερέθισμα in vitro, ο κυτταροσκελετός είναι δομημένος περιφερικά σε ένα χαλαρό δίκτυο ινιδίων. Κάποια κύτταρα είναι προσανατολισμένα και είναι διατεταγμένα σε 1-1,5μm, εύρος ανάλογα με τους ινοβλάστες ενώ μετά από ενεργοποίηση με κάποιο παραγοντα όπως EGF, η ένταση και το μήκος του ορθογώνιου δικτύου ινιδίων μεταβάλλεται με την συνδρομή του atp2/3 είτε σε συνέργεια με άλλα μόρια, είτε σταθεροποιώντας τα ινίδια της ακτίνης.

Σε μελέτη συσχέτισης της ηπατικής μετάστασης με την εμφάνιση και παρατήρηση του Atp 2/3 στο εντερικό καρκίνωμα, έχει φανεί πως μπορεί να λειτουργήσει σαν ανεξάρτητος δείκτης κινδύνου για την ηπατική μετάσταση(169). Η μετάσταση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να διασπείρονται σε άλλα όργανα. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το χαλαρό δεσμό στις συνδέσεις των κυττάρων. Το δεύτερο στάδιο είναι η δημιουργία ελασματοποδίων που διεισδύουν και επιτρέπουν την περαιτέρω κυτταρική κίνηση (170,171). Τα ARP και WAVE σύμπλοκα έχουν

παρατηρηθεί στο μέτωπο του καρκίνου του εντέρου (169). Πιστεύεται πως αυτός ο μηχανισμός εμπλέκεται στο δεύτερο στάδιο της μετάστασης καθώς ήταν πολύ σημαντική η εμφάνιση των δύο μορίων στα όρια της διείσδυσης ενώ δεν εμφανιζόταν στα φυσιολογικά κύτταρα. Σε προηγούμενη μελέτη (15) θετική χρώση του Atp2/3 έχει ανιχνευτεί σε μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, και ενδοθυλιακά κύτταρα. Επειδή τα μακροφάγα που εμφανίζουν τα μόρια, έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύουν στους ιστούς, πιστεύεται πως και τα καρκινικά που τα εκφράζουν παρουσιάζουν ανάλογες ιδιότητες και εξηγεί την ικανότητα τους προς μετανάστευση (172,173). Σε άλλη μελέτη για τον καρκίνο του μαστού (174), φάνηκε απόλυτη συσχέτιση της κακής πρόγνωσης της νόσου και της αυξημένης έκφρασης του Atp 2/3. Μάλιστα ενδιαφέρον έχει σε αυτή τη μελέτη η συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και φάνηκε ιδιαίτερα αυξημένη σε μεταστατικά αδενοκαρκινώματα αλλά και σε λεμφαδενικές μεταστάσεις. Σε μελέτες για το γαστρικό καρκίνο και τον καρκίνο του εντέρου φάνηκαν θετικές συσχετίσεις με την υπερέκφραση του Atp2/3 (169,175). Θεωρήθηκαν δε, αντικειμενικοί και αποτελεσματικοί δείκτες για την παθοβιολογία και συμπεριφορά του γαστρικού καρκίνου καθώς η έκφραση των Atp2 και Atp3 εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την διήθηση και την εξέλιξη του καρκίνου. Μάλιστα αναλύσεις σε σχέση με το βάθος της διείσδυσης του καρκίνου του εντέρου έδειξαν πως τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν πιο έντονη την παρουσία του συμπλέγματος, και κυρίως στο μέτωπο του καρκινικού όγκου. Αυτές οι παρατηρήσεις ενίσχυσαν την άποψη της εμπλοκής του Atp2/3. Επειδή βρέθηκε ότι είχαν συμμετοχή και τα κύτταρα της διάμεσης περιοχής στην αυξημένη έκφραση του συμπλόκου, φαίνεται πως και αυτά συμμετέχουν προετοιμάζοντας το έδαφος για την εξέλιξη του καρκινικού όγκου. Πραγματικά οι μυο-ινοβλάστες θεωρούνται επαγόμενα κύτταρα από τον όγκο που επηρεάζουν την συγκράτηση και κίνηση των καρκινικών κυττάρων. Ίσως για αυτό σε περιοχές που παρουσιάζεται ίνωση οι ασθενείς έχουν φτωχότερο προσδόκιμο από αυτούς που έχουν καρκίνο χωρίς σημαντική ίνωση. Σε μελέτη του 2012 (166), σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα στόματος ο ρόλος της κοφιλίνης είναι σημαντικός ως προς τη πρόγνωση και τη βαρύτητα, οπότε μπορούμε να εικάσουμε με αξιώσεις ότι και το Atp2/3 έχει ρόλο σημαντικό να παίζει, όπως φαίνεται και στο σχήμα.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 88 ιστολογικά παρασκευάσματα, τα οποία παρουσίαζαν ιστολογική εικόνα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Όλα τα ιστοτεμάχια αφορούσαν σε διαγνωστικές – μερικές βιοψίες και τα ιστολογικά παρασκευάσματα ελήφθησαν από το αρχείο του Εργαστηρίου της Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη χρονική περίοδο 2005-2008.

Όλα τα παραπάνω ιστοτεμάχια επιλέχθηκαν μετά από μικροσκοπική εξέταση τομών αιματοξυλίνης – ηωσίνης πάχους 5μm. Αφορούσαν σε ποικίλες περιοχές εντόπισης στο στοματικό βλεννογόνο και ιστολογικές διαφοροποιήσεις και ως κριτήρια επιλογής χρησιμοποιήθηκαν η ύπαρξη επαρκούς ιστού, η αντιπροσωπευτική ιστολογική εικόνα των βλαβών και η παραμονή σε μονιμοποιητικό διάλυμα φορμόλης 10% για χρόνο μικρότερο ή ίσο των 24 ωρών, για την επίτευξη όσο το δυνατόν καλύτερης ανοσοϊστοχημικής χρώσης

ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών (ηλικία, φύλο, εντόπιση, ιστολογική διαφοροποίηση) προέρχονται από τα παραπεμπτικά της ιστολογικής εξέτασης που συνόδευαν τις βιοψίες και τους εξαιρεθέντες όγκους και παραθέτονται συγκεντρωτικά στον πίνακα Σ1.

Από τις 88 περιπτώσεις 55,68% ήταν γυναίκες και 42,04% άντρες.

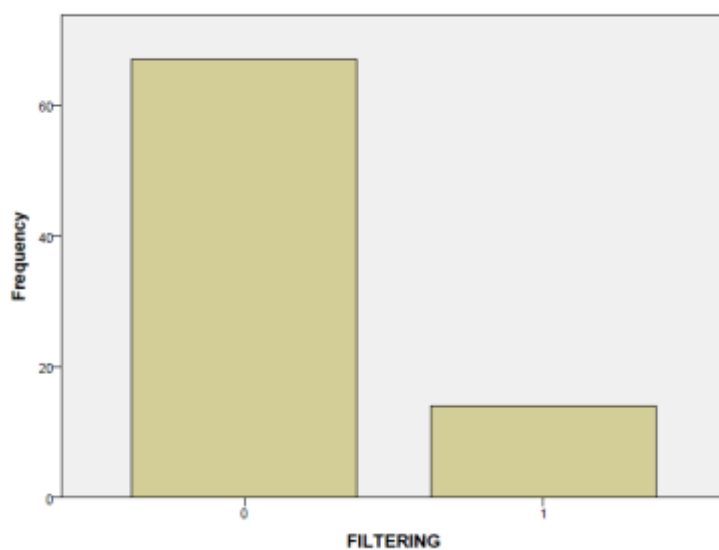
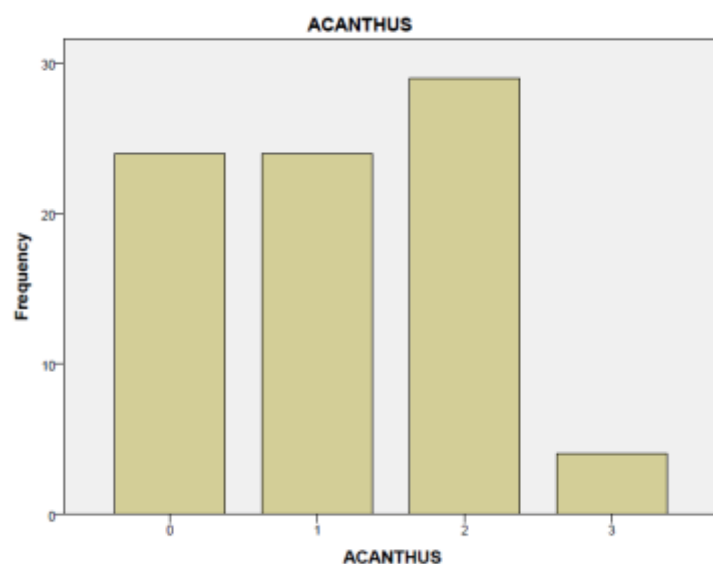
Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από τα 23 μέχρι τα 92 έτη, με μέσο όρο τα 63 έτη με SD=17,42. Σε 2 περιπτώσεις δεν αναφερόταν η ηλικία του ασθενούς.

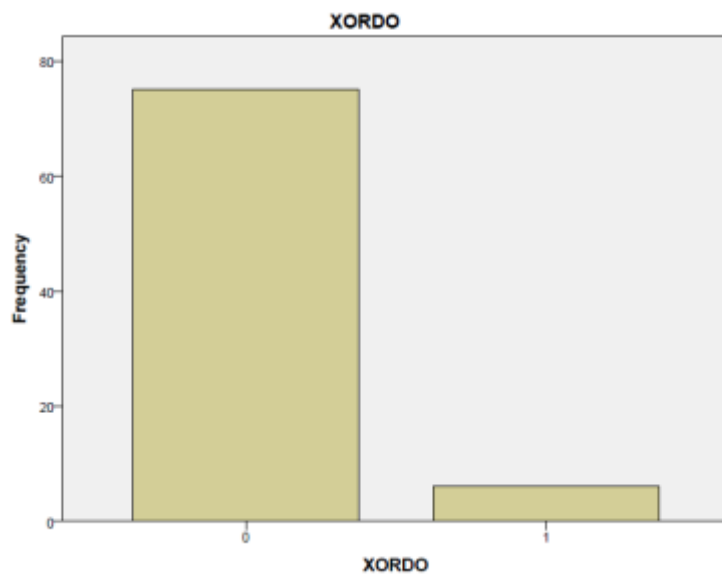
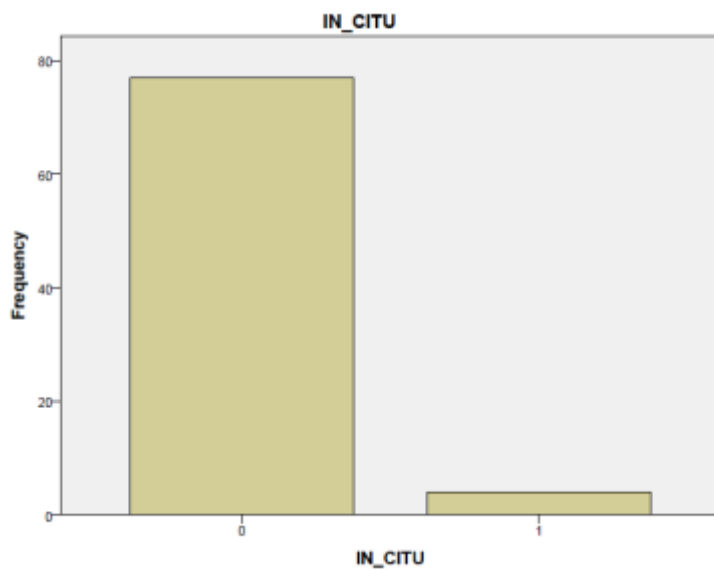
Από πλευράς εντόπισης των βλαβών, 51(57,95%) βρίσκονταν στη γλώσσα, 10(11,36%) στο βλεννογόνο της παρειάς, 9(10,22%) στα ούλα, 8(9,09%) στο βλεννογόνο των χειλέων, 7 (7,95%) στην υπερώα, και 3(3,4%) στο έδαφος του στόματος.

Με βάσει την ιστολογική έκθεση που είχαμε για το κάθε ιστοτεμάχιο, 61 περιπτώσεις ήταν ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, 14 περιπτώσεις ήταν αρχόμενο διηθητικό

ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, 4 περιπτώσεις *in situ* και 9 περιπτώσεις ακροχορδονώδες ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Από τις 61 περιπτώσεις του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος 25 είχαν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης, 31 περιπτώσεις μέσο βαθμό διαφοροποίησης και 5 περιστατικά χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης.





Διάγραμμα 1.Filtering / αρχόμενο διηθητικό καρκίνωμα

Acanthus / OSCC

Insitu /

xordo / ακροχορδωνώδες καρκίνωμα

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η καταγραφή των ιστολογικών χαρακτηριστικών του υλικού της μελέτης έγινε ανεξάρτητα από δύο παρατηρητές, σε τομές 5µm βαμμένες με αιματοξυλίνη – ηωσίνη, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αρχική διάγνωση και να εκτιμηθούν ο βαθμός διαφοροποίησης (Grading) σύμφωνα με τον WHO-Classification of Tumours: Pathology and Genetic - Head and Neck Tumours 2005 (95) Σε περίπτωση μη ομοφωνίας μεταξύ των παρατηρητών, οι τομές επανεξετάστηκαν από κοινού.

Ως προς το βαθμό διαφοροποίησης, από τις 88 περιπτώσεις οι 25 (28,4%) αφορούσαν σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα υψηλής διαφοροποίησης (Grade I), οι 31(35,22%) σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα μέτριας διαφοροποίησης (Grade II) και οι υπόλοιπες 5(5,68%) σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης (Grade III), 14 αρχόμενα διηθητικά, 4 in situ, και 9 ακροχορδονώδη καρκινώματα.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έγινε σε ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε υδατικό διάλυμα φορμόλης 10% και εγκιβωτισμένα σε παραφίνη Paraplast στους 59°C. Από κάθε ιστό ελήφθησαν με μικροτόμο ομοιόμορφες τομές πάχους 5µm, οι οποίες απλώθηκαν σε υδατόλουτρο 59°C και επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες (Superfrost®).

Τέσσερις αλληλοδιάδοχες τομές από κάθε ιστοτεμάχιο χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική χρώση με τα αντισώματα: Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού για Arp2 (E12 dilution 1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc. USA) και Arp3 (A1, 1:50 Santa Cruz Biotechnology Inc. USA). Η διαδικασία της ανοσοϊστοχημικής χρώσης ακολούθησε τα στάδια: 1) της αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης, 2) της πρωτεολυτικής κατεργασίας και της αποκάλυψης των αντιγονικών θέσεων, 3) της δέσμευσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης, 4) της επώασης με το καταλυτικό

αντιδραστήριο, 5) της επώασης των τόμων με τα ειδικά αντισώματα, 6) της χρήσης του χρωμογόνου και της αντίχρωσης και 7) της αφυδάτωσης και της κάλυψης των τομών.

Προκειμένου να επιτευχθεί η αναστολή της ενδογενούς ενεργότητας της υπεροξειδάσης και να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση και κατ'επέκταση η ψευδώς θετική αντίδραση, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) συγκέντρωσης 3% για 30' σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε καλό ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και τρεις αλλαγές με TBS (Tris Buffer Saline: 900ml NaCl + 100ml Tris Buffer) για 5'.

Στη συνέχεια οι τομές καλύφθηκαν με το κατασταλτικό αντιδραστήριο (blocking goat serum) (Dako Cytomation Goat Serum Normal Code No X0907) αραιώσης 1:6 (1blocking serum: 5 TBS) και επώαστηκαν για 30' σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να κατασταλεί η μη ειδική σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος.

Ακολούθησε η απομάκρυνση της περίσσειας του κατασταλτικού αντιδραστηρίου και η εφαρμογή των αντισωμάτων, χωρίς προηγούμενη έκλυση. Η κάθε τομή καλύφθηκε με 100ml από το πρωτογενές αντίσωμα. Οι καλυμμένες τομές επώαστηκαν στους 4°C ολονύκτια (overnight).

Ακολούθησε ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό, τοποθέτηση σε TBS για 5' και ξέπλυμα με Tris Buffer (TB) (1000ml απεσταγμένο H₂O + 6,1gr Tris pH=7,6).

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης μπορεί να επισημανθεί με την εφαρμογή ρυθμιστικού διαλύματος TB (98ml) στο οποίο έχουν προστεθεί 2ml 3,3-διαμινοβενζιδίνης (DAB Dako, Denmark) και 100μl διαλύματος H₂O₂ 30%. Το διάλυμα του χρωμογόνου παρασκευάστηκε λίγο πριν από τη χρήση και οι τομές τοποθετήθηκαν σε αυτό για 15' σε σκοτεινό μέρος. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα την ανάδειξη των αντιγονικών θέσεων στην παρατήρηση με το κοινό μικροσκόπιο.

Με την παρέλευση των 15' ακολούθησε ξέπλυμα με TB και απεσταγμένο νερό και οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης Harris για 1' ώστε να επιτευχθεί η αντίχρωση και η εμφάνιση των κυτταρικών και ιστικών χαρακτηριστικών.

Η αφυδάτωση των ιστών έγινε με διαδοχική τοποθέτηση για 2' σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 80%, 96% και σε δύο διαλύματα 100% και στη συνέχεια σε δύο διαλύματα ξυλόλης για 5'.

Η τεχνική ολοκληρώθηκε με την κάλυψη των τόμων με βάλσαμο του Καναδά και καλυπτρίδα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών του υλικού της μελέτης έγινε ημιποσοτικά για καθένα από τα αντισώματα ARP 2 και ARP3 ανεξάρτητα από δύο έμπειρους παθολογοανατόμους. Σε περίπτωση μη ομοφωνίας μεταξύ των παρατηρητών, οι τομές επανεξετάστηκαν από κοινού.

Συγκεκριμένα η ανοσοϊστοχημική χρώση βαθμολογήθηκε με βάση μία κλίμακα συσχέτισης της έκτασης και της έντασης της χρώσης και περιγράφεται στον πίνακα 7:

-	< 5% αρνητικά καρκινικά κύτταρα
+	5-30% ασθενώς θετικά καρκινικά κύτταρα
++	> 30-60% θετικά καρκινικά κύτταρα
+++	> 60% Έντονα θετικά καρκινικά κύτταρα

Πίνακας 7: Κλίμακα αξιολόγησης ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Η αξιολόγηση έγινε σε όλη την έκταση του ιστού σε μεγέθυνση x100 και περιελήφθηκαν περιοχές όπου δεν υπήρχαν ιστοτεχνικά σφάλματα, παρουσίαζαν θετικούς εσωτερικούς μάρτυρες και πληρούσαν τα ιστολογικά κριτήρια των βλαβών.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν, εσωτερικοί μάρτυρες (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα) ενώ δεν ανιχνεύεται *agr2/agr3* στο φυσιολογικό βλεννογόνο. Ενώ ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από ιστοτεμάχια καρκίνου του κόλον, while substitution of the primary antibodies by bovine serum of the same specificity served as a negative control

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η κατανομή των κατηγορικών μεταβλητών (φύλο, εντόπιση) περιγράφεται μέσω πινάκων μόνης εισόδου ενώ των συνεχών (ηλικία, ιστολογική διαφοροποίηση, μέσω καταλλήλων μέσων θέσης και διασποράς (μέση και τυπική απόκλιση ή διάμεσος και ενδοτεταρτημοριακό εύρος για κανονικά και μη κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές αντίστοιχα).

Ο έλεγχος συσχέτισης μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών πραγματοποιείται μέσω πινάκων διπλής εισόδου και καταλλήλων ελέγχων ανάλογα με τη φύση των μεταβλητών και το Fichers test.

Όλα τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν στο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας του 5% (0,05). Τιμές του *p* (*p*-values) μικρότερες του 0,05 αναφέρονται ως στατιστικά σημαντικές, ενώ αποτελέσματα με *p*-value μεταξύ του 5% και 10% αξιολογούνται ως στατιστικά ενδεικτικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των 88 περιστατικών της μελέτης φαίνονται παρακάτω

Πίνακας 8. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά περιστατικών (N=88)

	N (%)
Ηλικία	
<50	16 (19,75)
50+	63 (77,77)
NA	2 (2,45)
Φύλο	
Ανδρες	37 (42,04)
Γυναίκες	49 (55,68)
Ιστολογική Διαφοροποίηση	
Υψηλή	25 (29,6)
Μέτρια	31 (35,8)
Χαμηλή	5 (4,9)
Πρωιμο διηθητικο	14(17,3)
Incitu	4(4,54)
Ακροχορδονώδεις	9(10,22)
Εντόπιση	
Γλώσσα	51 (57,95)

<i>Ούλα</i>	9 (10,22)	Age (in years)	
<i>Χείλος</i>	8 (9,09)	20-30	6 (6.81)
<i>Υπερώα</i>	7 (7,95)	30-40	6 (6.81)
<i>Έδαφος στόματος</i>	3(3,4)	40-50	4 (4.54)
<i>Παρειά</i>	10(11,36)	50-60	15 (17.04)
		60-70	16 (18.18)
		70-80	26 (29.54)
		80-90	11 (12.5)
		>90	2 (2.27)

Από αυτές 49 (55,68%) αφορούσαν σε γυναίκες και 37 (42,04%) σε άντρες και εύρος ηλικιών από 24 έως 92 έτη. Ο μέσος όρος είναι τα 63 έτη.

Η συχνότερη θέση εντόπισης ήταν η γλώσσα (57,95%) ακολουθούμενη από το βλεννογόνο της παρειάς (11,3%) και τα ούλα (10,22%).

Ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης ήταν μέτριος σχεδόν στο 1/3 των περιπτώσεων 35,8%, υψηλός στο 29,6 % και χαμηλός στο 4,9% των περιπτώσεων.

Ενώ διαχωρήσαμε τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα σε διηθητικά, αρχόμενα διηθητικά, in situ και ακροχορδονώδη, ώστε να εξετάσουμε την ένταση της χρώσης των ap2/3 στις επιμέρους κατηγορίες.

Στην θετική ή αρνητική εκφραση του Ap2/3, και την ποσοτικοποίηση των θετικών αποτελεσμάτων βρήκαμε θετική εκφραση του ap2 στα 79 περιστατικά και του ap3 στα 78.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Η κατανομή των κλινικών και ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών των 88 περιπτώσεων ακανθοκυτταρικού καρκινώματος, καθώς και τα ευρήματα της

ανοσοϊστοχημικής μελέτης για την έκφραση των μορίων ARP2 και ARP3 φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 9.Συσχέτιση Arp2 και Arp3 με τον τύπο του καρκίνου.

	Verrucous (%)	In situ (%)	OSCC (%)	
Arp2				TOTAL
+	0 (0)	2 (2.27)	9(10.2)	11 (12.5)
++	2 (2.27)	0 (0)	23(26.1)	25 (28.4)
+++	4 (4.54)	2 (2.27)	37(42)	43 (48,86)
0	3 (3.4)	0 (0)	6 (6,8)	9 (10.22)
Total	9 (10.22)	4 (4.54)	75(85.22)	88 (100)
P	=0.11	=0.13	=0.27	
Arp3				TOTAL
+	4 (4.54)	2 (2,27)	26(29,5)	32 (36,36)
++	2 (2.27)	2 (2.27)	23(26.1)	27 (30,68)
+++	0 (0)	0 (0)	19(21.6)	19 (21,59)
0	3 (3.4)	0 (0)	7 (8)	10 (11,36)
Total	9 (10.22)	4 (4.54)	75 (85.22)	88 (100)
P	=0.05	=0.7	=0.089	

Σχόλιο [ΜΓ1]:

Πίνακας 10. Συσχέτιση Arp2 και Arp3 με την ιστολογική διαφοροποίηση.

Differentiation	ARP2 (%)				Total
	0	+	++	+++	
High	2(2,7%)	5(6.7%)	14(18.7%)	16(21.3%)	37(49.4%)
Moderate	2(2.7%)	3(4%)	7(9.3%)	20(26.7%)	32(42.7%)
Poor	2(2.7%)	1(1.3%)	2 (2.27%)	1(1.3%)	6(8%)
Total	6(8%)	9(12%)	23(30.7%)	37(49.3%)	75(100%)

· Fisher's p=0.1

Differentiation	ARP3 (%)				Total
	0	+	++	+++	
H	2(2.7%)	14(18.7%)	12(16%)	9(12%)	37(49.4%)

Moderate	3 (4%)	10(13.3%)	9(12%)	10(13.3%)	32(42.6%)
Poor	2	2 (2.7%)	2(2.7%)	0 (0%)	6(8.1%)
Total	7(9.3%)	26(34.7%)	23(30.7%)	19(25.3%)	75(100%)

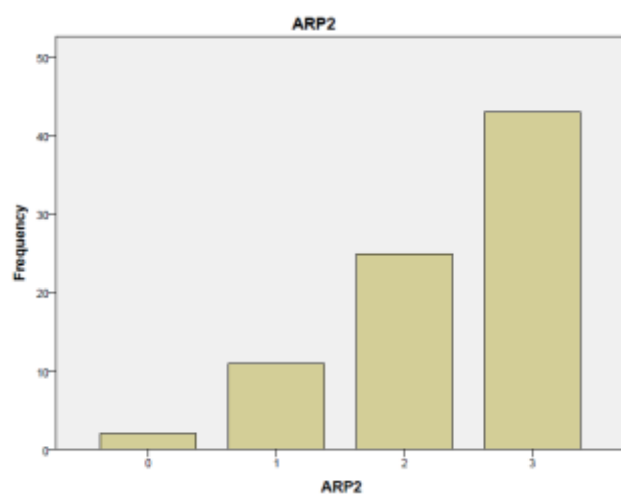
· Fisher's p=0.43

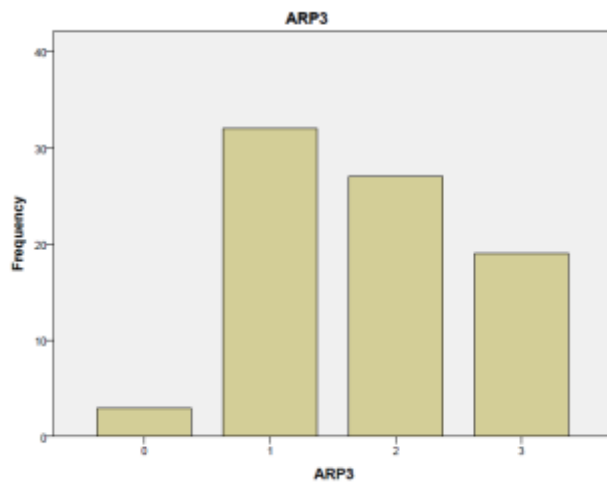
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ARP2 ΚΑΙ ARP3

Στη συσχέτιση που έγινε μεταξύ του arp2 με το arp3, το p value 0,000, γεγονός που υποδηλώνει πως οι δύο μεταβλητές έχουν απόλυτη θετική συσχέτιση. Αυτό εξηγείται από το γεγονός της συνύπαρξης των δύο μορίων στο σύμπλοκο που ενεργοποιεί το σχηματισμό ινιδίων ακτίνης .

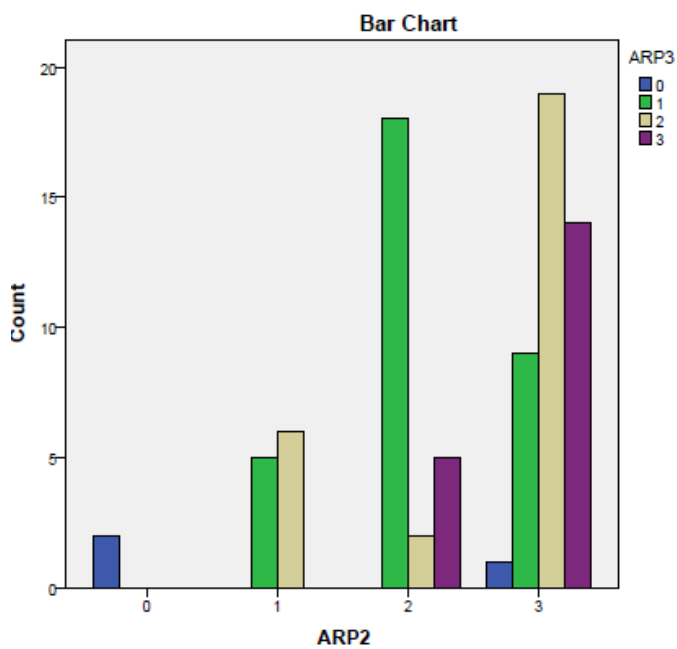
Πίνακας 11. Συσχέτιση Arp2 και Arp3

ARP2	ARP3				TOTAL
	0	+	++	+++	
0	9(10.22%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	9(10.22%)
+	0 (0%)	5(5.68%)	6(6.81%)	0(0%)	11(12.5%)
++	0(0%)	18(20.45%)	2(2.27%)	5(5.68%)	25(28.4%)
+++	1(1.13%)	9(10.22%)	19(21.59%)	14(15.9%)	43(48.86%)
TOTAL	10(11.36%)	32(36.36%)	27(30.68%)	19(21.59%)	88(100%)
Fichers	=0, 00				
p					





Διάγραμμα 2. Σχηματική παράσταση της σχέσης Arp2/Arp3.



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση του Arp2/Arp3

Στη προσπάθεια μας να δούμε τις πιθανές συσχετίσεις των ιστολογικών διαφοροποιήσεων με την έκφραση του Arp2 και Arp3, και για να μπορέσουμε να εξετάσουμε την έκφραση των μορίων με το βαθμό διήθησης, χωρίσαμε τα περιστατικά σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, ακροχορδονώδη και in situ καρκινώματα .

Συσχέτιση ARP2/3 με ιστολογική διαφοροποίηση

Στις συσχετίσεις φάνηκε στατιστικά σημαντική σχέση όπως φαίνεται στους πίνακες στο επίπεδο του 0.5 για τη σχέση του Arp3 με το βαθμό διήθησης.

Φαίνεται πως αν τα περιστατικά των χαρακτηρισμένων ως μη διηθητικά ήταν περισσότερα θα μπορούσαμε να έχουμε κάποιες σαφέστερες ενδείξεις για το αν η αυξημένη έκφραση του μορίου, θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη δυνατότητα διήθησης του καρκίνου.

Όταν κατατάξαμε όλα τα περιστατικά σε ακανθοκυτταρικά χαμηλής , μέτριας και υψηλής διαφοροποίησης στους διηθητικούς όγκους και θέλοντας να ελέγξουμε τη σχέση μεταξύ της διαφοροποίησης και των ARP2, ARP3, όπου η μηδενική μας υπόθεση είναι H_0 : ανεξαρτησία μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών διήθησης (χαμηλή, μέση, υψηλή) και των κατηγοριών των ARP2, ARP3, έναντι της εναλλακτικής H_1 : υπάρχει σχέση εξάρτησης. Χρησιμοποιήσαμε το fisher's exact test εφόσον οι αναμενόμενες τιμές του πίνακά μας είναι <5 .

Η p-value στον έλεγχο με το ARP2 ($p=0.1$) είναι στο επίπεδο του 10%, μεγαλύτερο από το 5% που είναι το επίπεδο σημαντικότητάς μας, συνεπώς δεν απορρίπτουμε την μηδενική μας υπόθεση τείνοντας να δεχτούμε τη ανεξάρτητη σχέση των υπό εξέταση μεταβλητών μας. Παρατηρήσαμε παρόλα αυτά πως το μόριο arp2 είναι στο επίπεδο της ένδειξης συσχέτισης των δύο μεταβλητών.

ARP2

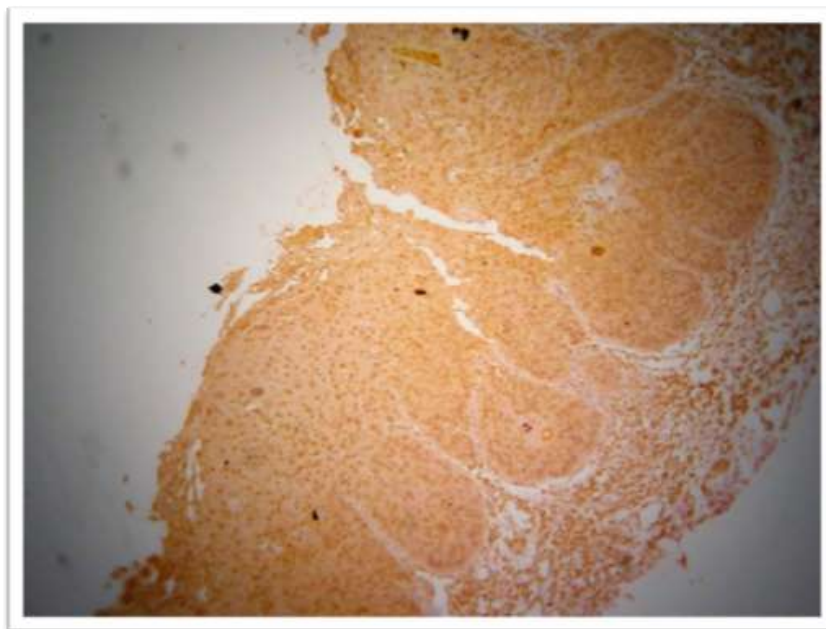
Το μόριο φαίνεται να εκφράζεται ποσοτικά ως ασθενώς θετικά στο 12,5%, θετικό στο 28,4% και ισχυρά θετικό στο 48,86%, ενώ εμφανίστηκε αρνητικό σε ποσοστό 10,22%.

Μάλιστα η ανοσοχρώση που κατανεμόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα (εικ.12,13), δεν παρουσίαζε αξιοσημείωτες διαφορές όσον αφορά στην ένταση και στο ποσοστό των έντονα θετικών κυττάρων στις περιοχές των νεοπλασματικών νησίδων που έφεραν σφαίρες κερατίνης, σε σύγκριση με το παρακείμενο καλυπτικό επιθήλιο, λεμφοκύτταρα, αγγειακό ενδοθήλιο.

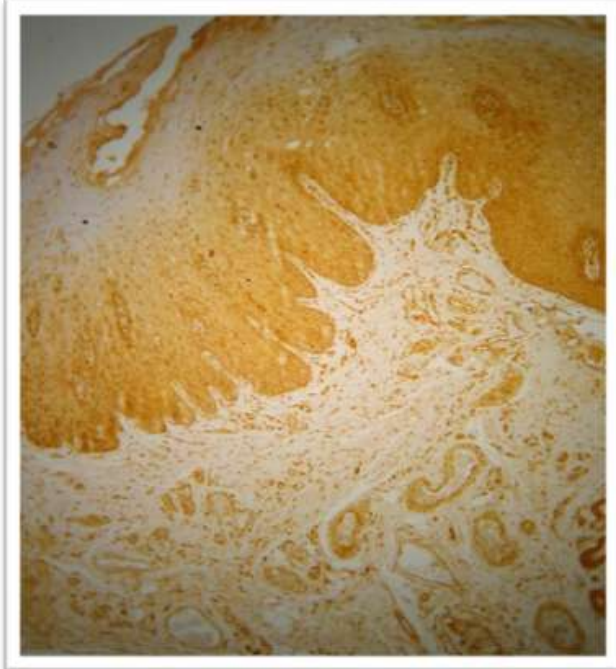


Εικόνα 12.

Φαίνονται εκτός απο τα καρκινικά κύτταρα, θετικά χρωματισμένα λεμφοκύτταρα, αλλά και ενδοθήλια των αγγείων.



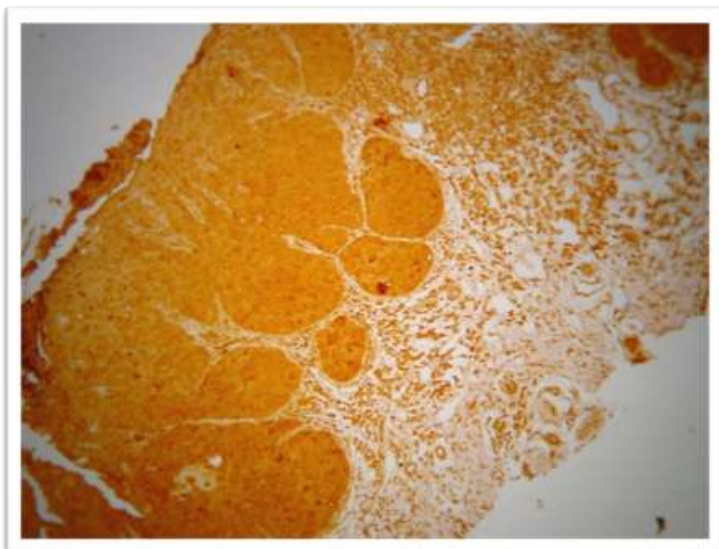
Εικόνα13.Χρώση σε όλο το πλάτος και έκταση του καρκινικού ιστού.



Εικόνα14.Νησίδες εξίσου χρωματισμένες στο μέτωπο διεισδυσης του καρκίνου

Εικόνα 15. Μέτωπο χρωματισμένο απο ζώνη λεμφοκυττάρων.



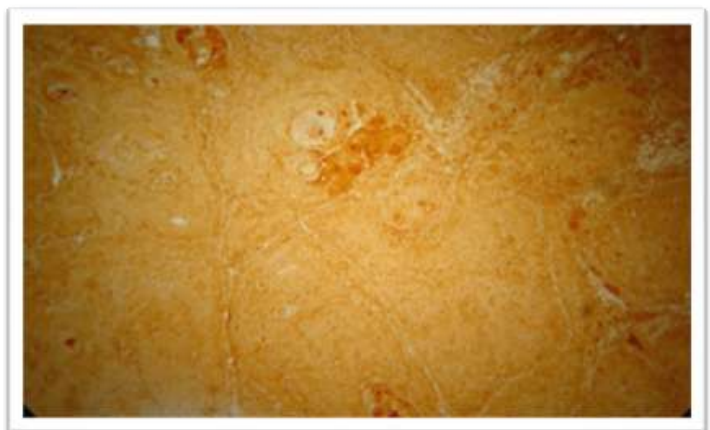


Εικόνα 16,17. Φαίνονται οι θετικοί μάρτυρες.

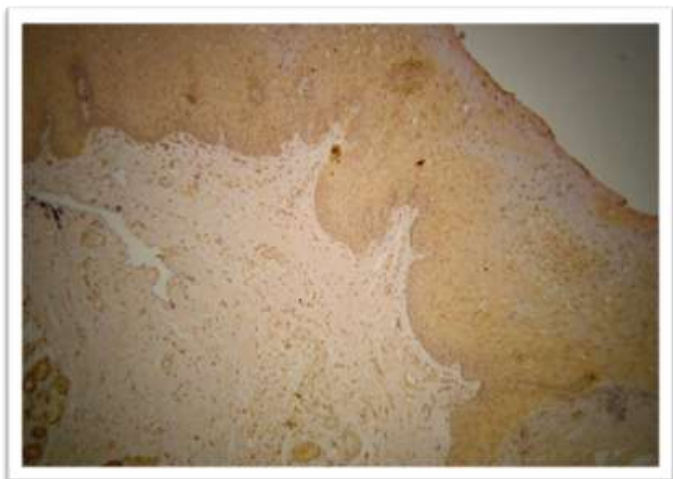


ARP3

Το μόριο φαίνεται να χρωματίζεται ισχυρώς θετικά στο 21,59% (19 περιστατικά), θετικά στο 30,68%(27 περιστατικά) ενώ ασθενώς θετικά ήταν το 36,36%(32 περιστατικά) και αρνητικά στο 11,36%(10 περιστατικά). Η χρώση φαίνεται να ναι εξίσου ομοιόμορφη, στην έκταση του καρκινικού ιστού, βάφοντας κυρίως το κυτταρόπλασμα. Έχοντας και εδώ αντίστοιχα μάρτυρες και βαφοντας χωρίς αξιόλογες διαφορές ως προς το ποσοστό των έντονα ανοσοχρωσμένων κυττάρων, τόσο στην περιοχή των νεοπλασματικών νησίδων και των σφαιρών κερατίνης



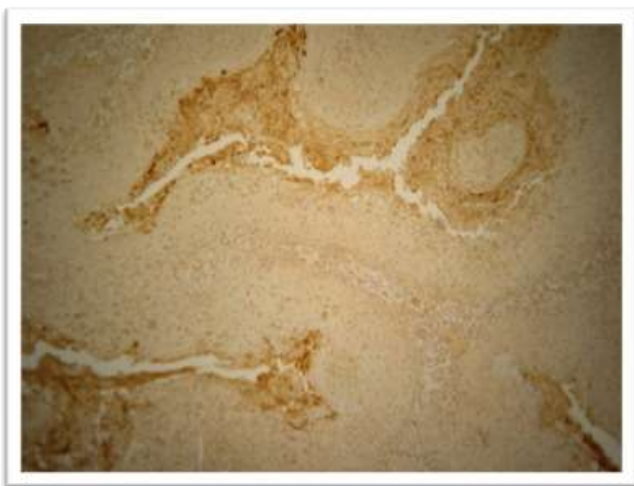
(εικ.18,19)



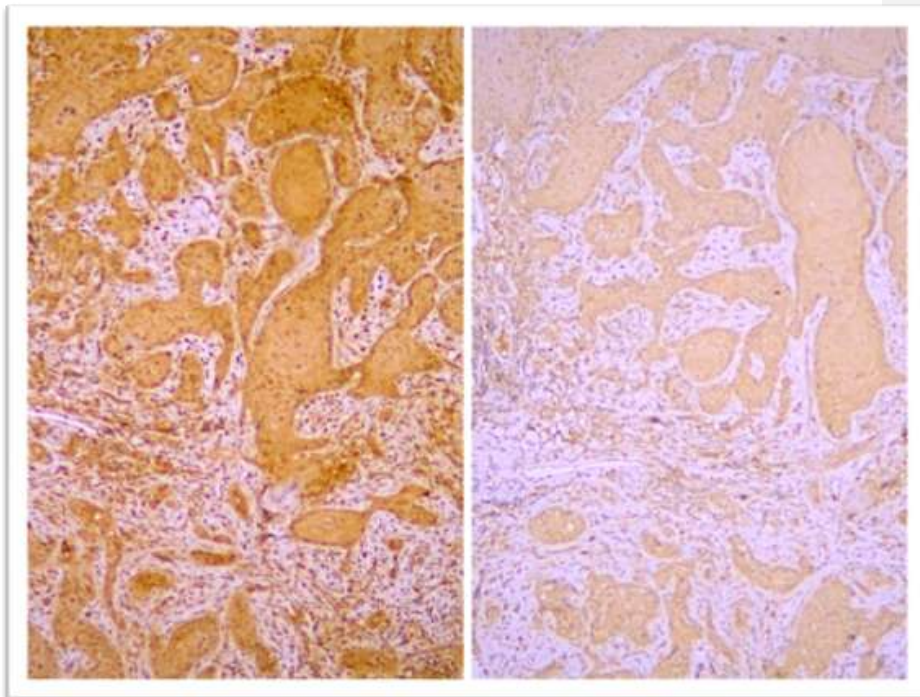
Όπου η χρώση είναι ασθενής φαίνεται πως το φυσιολογικό επιθήλιο δε χρωματίζεται (εικ. 20),

Εικόνα 20.

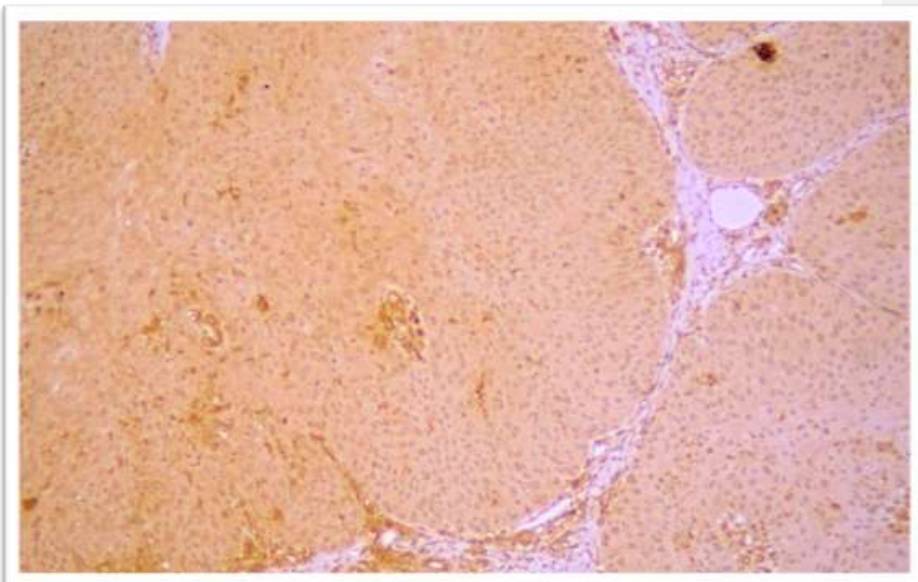
Ενώ στην περίπτωση αρνητικής χρώσης, φαίνονται οι μάρτυρες βαμμένοι αλλά όχι



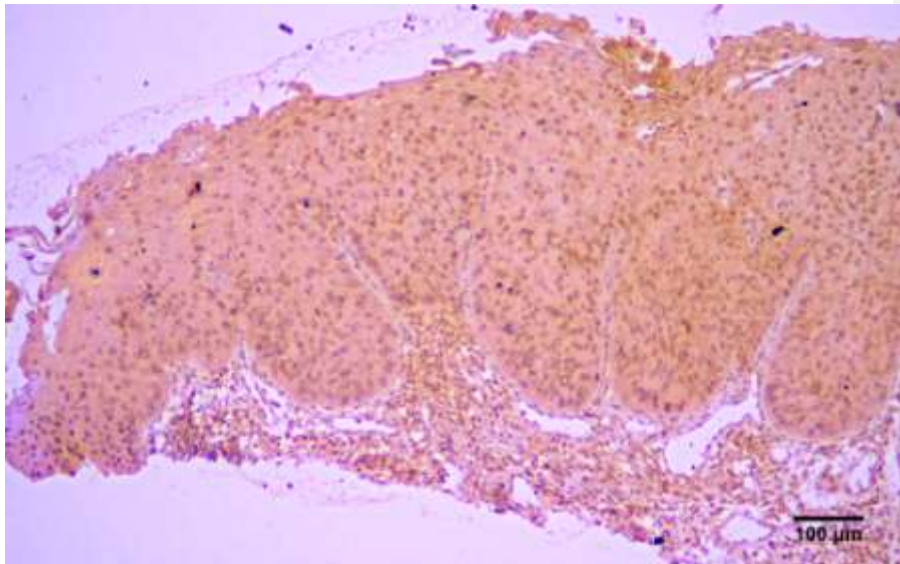
ο καρκινικός ιστός (εικ.21)



Εικόνα 22. SCC Arp2/ Arp3



Εικόνα 23. VSCC Arp2



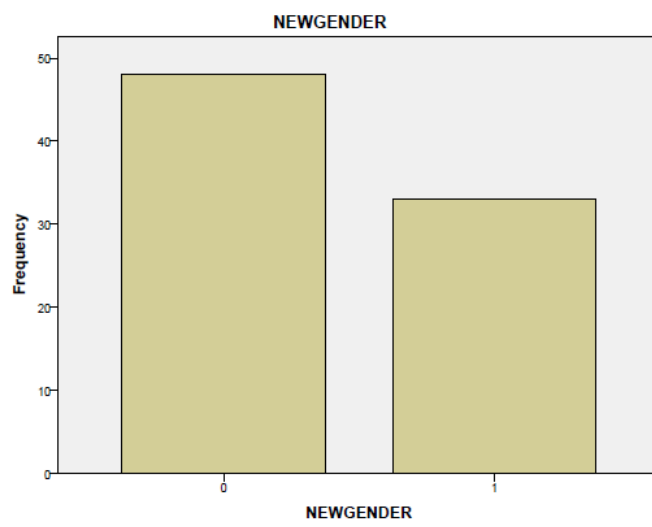
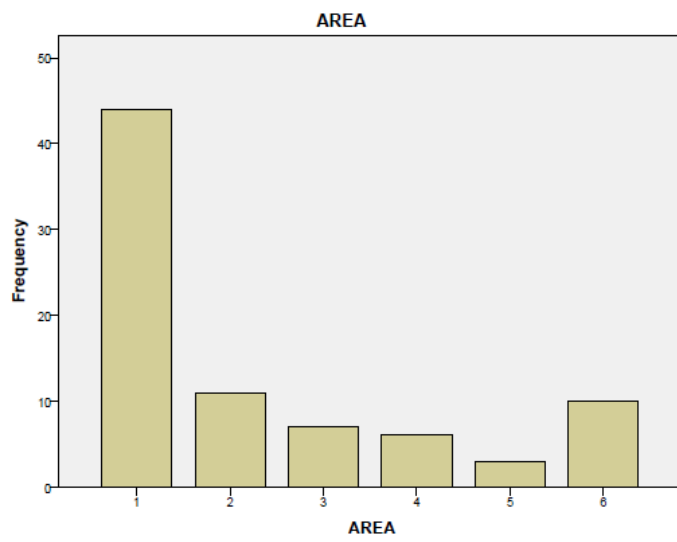
Εικόνα 24. Χρώση σε in situ

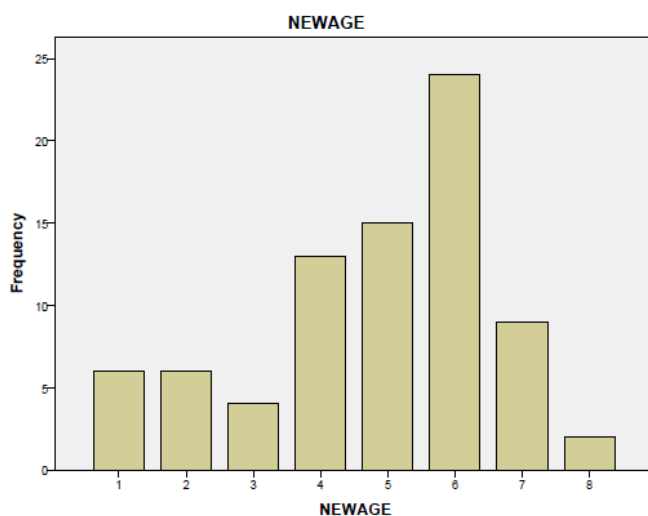
Στους παρακάτω πίνακες έχουμε περιγράψει τα περιστατικά και πως διανέμονται στη περιοχή, το φύλο και την ηλικία

Απο (1-6) είναι με τη σειρά η γλώσσα, τα ούλα, το χείλος, η υπερώα, το έδαφος του στόματος και η παρειά, ενώ 0 είναι οι γυναίκες και 1 οι άντρες .

Οι ηλικίες έχουν ταξινομηθεί σε 8 κατηγορίες ανα δεκαετία ξεκινώντας απο 20-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 και 90+

Ακολουθούν τα διαγράμματα που περιγράφουν ακριβώς τη κατανομή των περιστατικών στις διάφορες περιοχές του στόματος, το φύλο καθώς και το ηλικιακό εύρος.

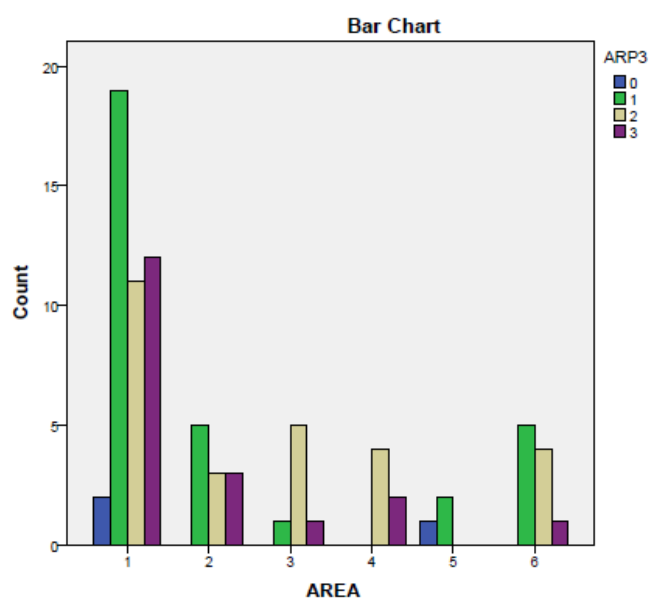
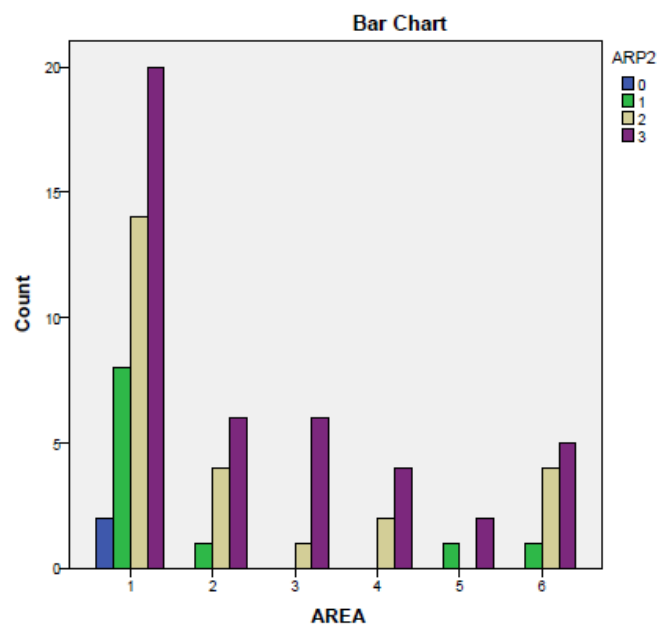


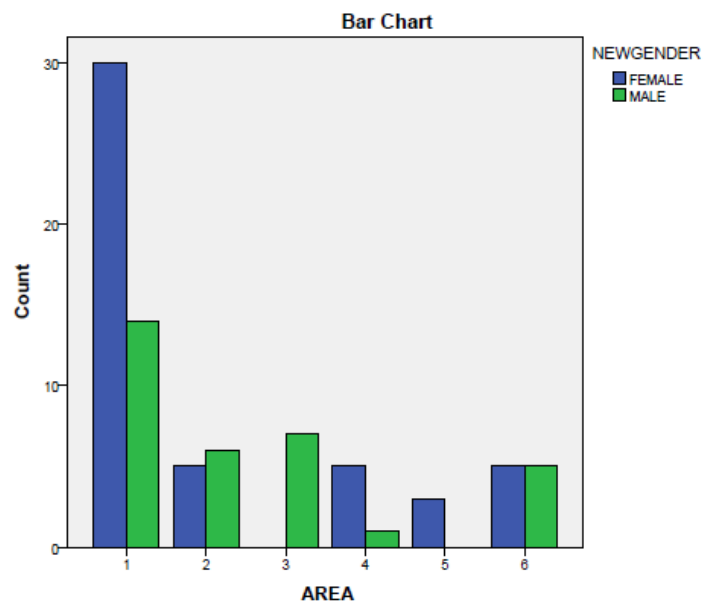
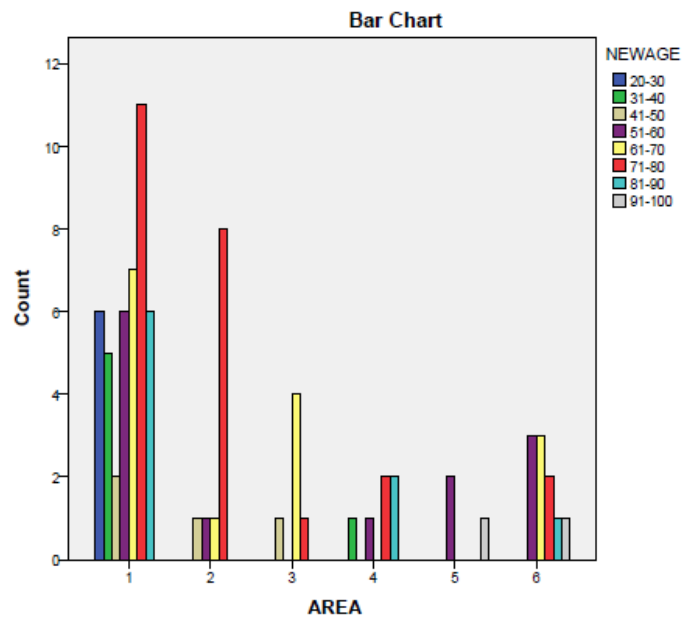


Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται οι σχέσεις ανάμεσα στα Atp2 /Atp3 και τις περιοχές εντόπισης και πως κυμαίνονται τα περιστατικά, ενώ δε φάνηκε κάποια συσχέτιση στατιστικά σημαντική, όπως ήταν αναμενόμενο.

Με τους αριθμούς 1-6, ονοματίζονται οι περιοχές εντόπισης για λόγους ευκολίας, όπως εμφανίζονται στους παραπάνω πίνακες.

Με τους αριθμούς 0-3 χαρακτηρίζεται η απουσία της έκφρασης του μορίου(0), χαμηλή μέτρια και ισχυρή έκφραση (1-3).





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί το σημαντικότερο κακόηθες νεόπλασμα του επιθηλιακού ιστού στην περιοχή της στοματικής κοιλότητας. Εμφανίζεται συνήθως σε ηλικίες μεγαλύτερες των 60 ετών αν και οι περιπτώσεις σε νεαρότερα άτομα έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (34-37).

Πληθώρα εξωγενών (κάπνισμα, αλκοόλ, ακτινοβολίες κ.α) και ενδογενών (μεταλλάξεις, ιοί κ.α) παραγόντων συμβάλουν στη γένεση της κακοήθειας (34-37,176,177).

Το μέγεθος του όγκου, η ύπαρξη λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων, ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης του νεοπλασματος, ο τύπος διήθησης, η αντίδραση του ξενιστή, η έκφραση ή μη ογκοκατασταλτικών ή ογκογόνων γονιδίων και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, η ενεργοποίηση ή μη της αποπτωτικής διαδικασίας, οι αγγειογενετικοί μηχανισμοί αποτελούν κάποιους από τους παράγοντες που συμμετέχουν και καθορίζουν το βαθμό κακοήθειας του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και κατ'επέκταση την πρόγνυσή του (35,37,41,43,78,79,88,89,95,96,178).

Η μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων, φαίνεται πως είναι η βασική αιτία θνησιμότητας σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους. Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να διεισδύσουν στην μεσοκυτταρια περιοχή που αποτελείται από βασικές μεμβράνες, διάμεση καρκινική περιοχή, και αγγειακά τοιχώματα, ώστε να μεταναστεύσουν από την αρχική περιοχή του καρκινικού όγκου, και να καταλήξουν στις απομακρυσμένες εστίες τους. (34,35,36,179)

Αυτή η διαδικασία φαίνεται να διεκπεραιώνεται από την δημιουργία ελασματοποδίων και νηματοπόδια, που δημιουργούνται από τα καρκινικά κύτταρα σαν σεντόνια ή δάκτυλα, διαπερνώντας την περιοχή γύρω από τον όγκο (179,180). Στη στοματοπροσωπική περιοχή, φαίνεται πως τα νηματοπόδια έχουν ανευρεθεί σε διαφορές μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του ακανθοκυτταρικού (181) και καθορίζεται από μια σειρά μορίων που διαμορφώνουν το σχηματισμό της ακτίνης.

Μερικά απο αυτά είναι τα WASP/NWASP το σύμπλοκο ARP2/3, η κοντακτίνη, η SRC κινάση, η F ακτίνη και MT1-MMP.

Τα νηματοπόδια είναι μεμβράνες σαν δάκτυλα που δημιουργούνται από τα καρκινικά κύτταρα όταν μεταναστεύουν. Το μήκος τους μπορεί να φτάσει τα 2μm και η διάμετρος τους απο 0.1-0.8μm. Τα ελασματοπόδια εμφανίζονται σαν επίπεδες μεμβράνες που διεισδύουν τους ιστούς, προσκολλόμενα και τραβώντας τα καρκινικά κύτταρα (181,171,173).

Το σύμπλοκο Arp2/3, είναι ένα επταμελές μόριο που αποτελείται απο δύο βασικές πρωτεΐνες (arp2 ,arp3), που μοιάζουν στη δομή της ακτίνης, και 5 ακόμα πρωτεΐνες (ARPC1,ARPC2,ARPC3,ARPC4,ARPC5). Το σύμπλοκο παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία F διακλαδώσεων υπο γωνία 70 μοιρών, που είναι πολύ σημαντική στη δημιουργία των ελασματοποδίων (171,172,182,183,184). Πρόσφατες μελέτες (185) έχουν δείξει πως η διαταραχή στη δομή του μορίου αλλά και η αναστολή του ήταν κομβική στην αναστολή δημιουργίας των ελασματοποδίων και τη κυτταρική κίνηση.

Το σύμπλοκο Arp2/3, λειτουργεί σα δεσμός ανάμεσα στην κυτταρική ακτίνη και την κορτακτίνη που είναι πρωτεΐνη δεσμευτική της F ακτίνης.

Η οικογένεια των WASP πρωτεϊνών δρουν στη δημιουργία του κυτταροσκελετού διαμέσω του συμπλόκου και πολλές μελέτες καταδεικνύουν γενικά τη δράση των μορίων αυτών στο σχηματισμό ελασματοποδίων ή νηματοποδίων (181,186,187) και στη συμμετοχή των πρωτεϊνών αυτών στη παθογένεια της νόσου.

Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η έκφραση των μορίων Arp2 /Arp3, σε υλικό ακανθοκυτταρικού καρκίνου του στοματικού βλεννογόνου, και γίναν συσχετίσεις με διάφορα κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά.

Μας ενδιέφερε κυρίως η έκφραση των μορίων σε σχέση με την ιστολογική διαφοροποίηση, τη διήθηση προκειμένου να διερευνηθεί η προγνωστική αξία του μορίου στην έκβαση της νόσου. Κατατάξαμε τα περιστατικά βάσει των ιστολογικών εκθέσεων που είχαμε στη διάθεση μας σε χαμηλής, μέσης και υψηλής διαφοροποίησης OSCC, και στη συνέχεια σε ακανθοκυτταρικά, ακροχορδονώδη και in situ ακανθοκυτταρικά καρκινώματα. Απο την ανοσοιστοχημική χρώση βρήκαμε για το arp2 ισχυρή χρώση στο 43% των περιστατικών, μέτρια χρώση στο 25%, ασθενή χρώση στο 11%, ενώ εντελώς αρνητικά ήταν το 10,22% των περιστατικών.

Για το *ap3*, ανάλογα τα ποσοστά ήταν 19%, 27%, 32% και εντελώς αρνητικά το 11,36% των περιστατικών. Οι χρώσεις ήταν κυτταροπλασματικές ,ενώ το 89.7% και 88.6% που βρέθηκε για το *Ap2* και *Ap3* αντίστοιχα, συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία (15,169,174,189). Η ανοσοιστοχημεία είναι μία αξιόπιστη τεχνική για τη μελέτη του *Ap2* and *Ap3* και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για χρώση ιστών ή κυτταρικές σειρές. (15,169,174,175,178,185,188,189,190,194,196). Παρατηρήθηκε μεγάλη έκφραση του μορίου κυρίως για το *ARP2* σε ποσοστά που συμφωνούν με προηγούμενες ανάλογες μελέτες στο καρκίνο του κατώτερου πεπτικού, του καρκίνου του μαστού, το γλοϊώμα, το γαστρικό καρκίνο κα (15,169,174,175,185,190).

Η υπερέκφραση των μορίων *ARP2* και *ARP3* στο ακανθοκυτταρικό καρκίνο του στόματος σε σχέση με τους γύρω φυσιολογικούς ιστούς που δεν το εκφράζουν, υποδηλώνει τη πιθανή συμμετοχή τους στη εξέλιξη της νόσου.

Στις συσχετίσεις που έγιναν με τα λίγα δυστυχώς κλινικά χαρακτηριστικά που είχαμε και αφορούσαν το φύλο, την εντόπιση και την ηλικία δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση, ενώ αν μπορούσαμε να έχουμε παρακολούθηση των περιστατικών ως προς την πενταετή επιβίωση και τα επιμέρους στοιχεία σταδιοποίησης σίγουρα θα μπορούσαμε να εξάγουμε περισσότερα συμπεράσματα που και άλλες μελέτες έχουν καταδείξει. Η υπερέκφραση των *Ap2* και *Ap3*, έχει φανεί πως σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, το βάθος της διήθησης, την αγγειακή διείσδυση, το στάδιο του όγκου και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, (175,188) στο γαστρικό καρκίνο όπως και στον καρκίνο του κατώτερου πεπτικού (15,169), και οι μελέτες έδειξαν πως η υπερέκφραση σχετίζεται με διηθητικό γαστρικό καρκίνο, παρά με *in situ* καρκίνο και τη γαστρίτιδα. Το ίδιο ισχύει και για καρκίνο στο μαστό (174,175) και τον καρκίνο του πνεύμονα με απομακρυσμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις (189). Στο μεταστατικό καρκίνο του κατώτερου πεπτικού, η έκφραση του *ARP2/3* ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις με μεταστάσεις στο ύπαρ, και σε μέτρια διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα (169), ενώ υψηλού βαθμού γλοϊώματα έδειξαν αυξημένη έκφραση *Ap2/3* στα μεταναστευτικά καρκινικά κύτταρα του γλοϊώματος (190). Η ανοσοιστοχημική έκφραση του *ARPC2* συμπεριλήφθηκε σε μια εργασία για διαγνωστικούς δείκτες ικανούς να διαφοροδιαγνώσουν μελανώματα από καλοήγη και άτυπα νευρώματα (197). Η ταυτόχρονη έκφραση του *ARP2* και *WAVE2* αποτέλεσε ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του κατώτερου

πεπτικού με μεταστάσεις στο ήπαρ (169), και πιο συχνά ανιχνεύθηκε σε περιπτώσεις με λεμφαδενικές μεταστάσεις καρκίνου του πνεύμονα και κακή πρόγνωση (189), και επίσης ήταν πιο συχνά ανιχνεύσιμο στα διηθητικά από τα μη διηθητικά καρκινώματα του μαστού με φτωχή πρόγνωση (174). Στη παρούσα μελέτη το Atp2/3 εκφράστηκε περισσότερο στα διηθητικά από τα μη διηθητικά (ακροχορδονώδη και insitu) παρόλο που η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η στατιστικά σημαντική διαφορά που βρέθηκε ανάμεσα στο διηθητικό και ακροχορδονώδες καρκίνωμα για το Atp3, πιθανά να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν αναγνώριση διήθησης για το ακροχορδονώδες καρκίνωμα. Αντίστοιχα έχει παρατηρηθεί σε μελέτη για το γαστρικό καρκίνο (175).

Πιστεύουμε πως αν τα περιστατικά που είχαμε, κυρίως αυτά που κατατάξαμε σε ακροχορδονώδη και in situ ήταν περισσότερα, στο τυχαίο δείγμα των περιστατικών που είχαμε από τη κλινική θα μπορούσαμε να καταδείξουμε ισχυρότερη θετική συσχέτιση της έκφρασης του συμπλόκου με τη διήθηση ή μη του όγκου. Στη συσχέτιση που έγινε ήταν για το Atp3 $p=0,03$.

Η συσχέτιση που κάναμε του συμπλόκου (Atp2 και Atp3) με το βαθμό διαφοροποίησης στα 75 περιστατικά του διηθητικού ακανθοκυτταρικού καρκινώματος δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η συσχέτιση ήταν στο επίπεδο του 10% για το Atp2, γεγονός που αποτελεί ένδειξη συσχέτισης του συμπλόκου και μας δείνει μια καλή αρχή για μελέτη του και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνο του στόματος, παρά το γεγονός πως μελέτες δείχνουν πως στους καρκίνους που προέρχονται από το επιθήλιο ίσως η διείδυση να γίνεται με νηματοπόδια παρά ελασματοπόδια. Αυτό βέβαια δεν υποτιμά την αξία του συμπλόκου, γιατί και σε αυτή τη περίπτωση ο ρόλος του είναι κομβικός αλλά χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου αλλά και των μορίων που συμβάλλουν στη δημιουργία της ακτίνης.

Σε άλλη μελέτη για το ρόλο του συμπλόκου στη μετανάστευση και διήθηση του νευρογλιώματος (190), που είναι εξαιρετικά κακοήθης όγκος, με ασθενείς που δε ξεπερνούν τη διετή επιβίωση, οι μελετητές καταδεικνύουν το σύμπλοκο ως πιθανή στρατηγική θεραπεία. Τα γλοιώματα υψηλότερης διαφοροποίησης γενικά ευκολότερα διασκορπίζονται στους γύρω φυσιολογικούς νευρικούς ιστούς και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής μετά την αρχική θεραπεία και για αυτό οι ασθενείς με υψηλής διαφοροποίησης γλοιώματα έχουν κακή πρόγνωση. Ίσως γιατί τα χαμηλά

διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα, έχουν χάσει σχεδόν εξολοκλήρου την κυτταρική τους σύνδεση και τον προσανατολισμό τους και συγχυτικά μεταναστεύουν μέσα στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό. Αυτό το μοντέλο διήθησης ίσως να ναι διαφορετικό από τη διήθηση καλά διαφοροποιημένων καρκινικών όγκων, που δε σχετίζονται με την εμφάνιση ελασματοποδίων. Στα καλά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα η λειτουργία του arp2/3 συμπλόκου σαφώς παραμένει και ενισχύεται, ενώ ενδείξεις για γονιδιακές μεταλλάξεις στα arp2/3 δεν έχουν παρατηρηθεί. Γι αυτό μπορεί να ευθύνεται το ότι τα κύτταρα έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα μετακίνησης μέσω του σχηματισμού ελασματοποδίων, ενώ η καταστολή του συμπλόκου μέσω δεσμευσης του υποδοχέα τους, μείωσαν την εμφάνιση των ελασματοποδίων. Σε μελέτη Wu et al (171), παρατηρήθηκε επανεμφάνιση των ελασματοποδίων 20 λεπτά μετά την έγχυση βόιου arp2/3 στα κύτταρα που είχαν μπλοκάρει.

Ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον εύρημα από τη μελέτη μας, είναι επίσης η απόλυτη συσχέτιση των μορίων Arp2 και Arp3 μεταξύ τους. Σε αυτή την ανάλυση φάνηκε στατιστικά σημαντική σχέση στο επίπεδο του 0%, που σημαίνει πως όσο αυξάνει η υπερέκφραση του ενός αυξάνει και η τιμή του άλλου, πράγμα που κατά την αποψη μας υποδηλώνει την στενή σχέση των δύο μορίων στο σύμπλοκο και την απόλυτη συνεργασία τους. Εδώ ίσως θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ξανά εν συντομία, ότι τα Arp2 και Arp3 μοιάζουν πολύ στη δομή του μονομερούς της ακτίνης, και λειτουργούν σαν κυτταρικά σημεία για να δεθούν νέα ινίδια ακτίνης και να προωθήσουν το πολυμερισμό της ακτίνης (175). Γενικά στα κύτταρα των θηλαστικών το σύμπλοκο απαιτεί ενεργοποίηση από πυρηνικούς παράγοντες ώστε από το προυπάρχον ινίδιο ακτίνης (μητέρα) να προκύψει η κόρη σε σύνδεση με το μητρικό ινίδιο, σε γωνία 70 μοιρών. Αυτοί οι παράγοντες είναι δύο τύπων. Τύπου 1, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας του WASP, που λειτουργούν άμεσα που προωθούν αλλαγές στη δομή του συμπλόκου προσφέροντας το πρώτο ινίδιο ακτίνης, και Τύπου 2, όπως η κορτακτίνη που λειτουργεί έμμεσα συνεργαζόμενη με τα μορια τύπου 1(190).

Διάφορες αλλαγές στην εκφραση ενός ή περισσότερων υπομονάδων του συμπλόκου Arp2/3, έχουν δείξει διαφόρων ειδών επιθηλιακών κακοηθειών, περιλαμβανομένου του γαστρικού, του εντερικού αλλά και του καρκίνου του πνεύμονα. Σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος (190), αναστολή της δημιουργίας του συμπλέγματος από το

CK666, οδήγησε σε εξαφάνιση των ελασματοποδίων και σημαντικά αναστολή της μετανάστευσης και της ικανότητας διήθησης. Σε κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων κεφαλής-τραχήλου, η σίγαση του AtpC5 γονιδίου, μείωσε το δυναμικό διήθησης (194), ενώ σε σειρές καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων (185), η σίλωση σχεδόν οποιασδήποτε οπομονάδας του συμπλόκου (ειδικά του AtpC4) είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ικανότητας μετανάστευσης των κυττάρων.

Γενικά υψηλή έκφραση του Atp2 συνδέεται με επιθετική συμπεριφορά και φτωχή πρόγνωση (191,188,192,189,15), ενώ η καταστολή του Atp2 και άλλων υπομονάδων μειώνουν τη μετανάστευση στο παγκρεατικό και γαστρικό καρκίνο (15,185,189,191,192). Παρόλα αυτά φαίνεται ότι όλη η κυτταρική κινητικότητα δεν εξαρτάται μόνο από τη δραστηριότητα του Atp2/3 αλλά και την αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα υγρή ιστό (171,191). Μόρια δε, όπως η CK666 και η PLKinase4 (171,190,191,193,194,195) που συνδέονται και αλλάζουν το δεσμό του ARP2 με το ARP3, φαίνεται ότι θα μπορούσαν να διερευνηθούν περισσότερο.

Τροφή για σκέψη και για περαιτέρω έρευνα, θα ήταν η μελέτη περιστατικών με ακανθοκυτταρικό καρκίνο σε διαφορετική σταδιοποίηση και πιθανών ελκών του βλεννογόνου τραυματικής αιτιολογίας και η συσχέτιση τους με το σύμπλοκο ARP2/3 και το WAVE-NWAVE, ώστε να δούμε αν πραγματικά θα μπορούσε να λειτουργήσει σαν προγνωστικός δείκτης αλλά και θεραπευτικά μέσω της αναστολής της έκφρασης του και στο OSCC.

Συμπερασματικά, η έκφραση Atp2 και Atp3, ενδεικτική του σχηματισμού του συμπλέγματος Atp2/3, θεωρήθηκε σημαντική στις περισσότερες περιπτώσεις του OSCCs που εξετάστηκαν. Αν και δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημική έκφρασης του Atp2/Atp3 και του τύπου ή του βαθμού διήθησης του όγκου, η πιο κοινή έκφραση στα διηθητικά OSCCs σε σχέση με τα μη διηθητικά (ακροχορδονώδη καρκινώματα και καρκινώματα in situ) είναι ένδειξη της συμμετοχής του στη βιολογική συμπεριφορά των βλαβών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Αγγελόπουλος ΑΠ, Παπανικολάου Στ, Αγγελοπούλου Ε: Σύγχρονη Στοματική και Γναθοπροσωπική Παθολογία. Λίτσας 2000.
- 2.Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, et al. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 2779-2787.
- 3.Wang Y-L. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J Cell Biol* 1985; 101:597-602.
- 4.Okabe S, Hirokawa N. Incorporation and turnover of of biotin-labelled actin microinjected into fibroblastic cells: an immunoelectron microscopic study. *J Cell Biol* 1989; 109(4 Pt 1): 1581-95.
- 5.Symons MH, Mitchison TJ. Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol* 1991; 114: 503-13.
- 6.Ayscough KR, Stryker J, et al.. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* 1997; 137: 399-416
- 7.Ma L, Rohatgi R, et al.. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 153-62
- 8.Mullins RD, Pollard TD. Rho-family GTPases require the Arp2/3 complex to stimulate actin polymerization in *Acanthamoeba* extracts. *Curr Biol* 1999; 9: 405-15.
- 9.Rohatgi R, Ma L, et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999; 97:221-31.
- 10.Insall R, Muller-Taubenberger A, et al. Dynamics of the Dictyostelium Arp 2/3 complex in endocytosis, cytokinesis and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 50: 115-28.

11. Mullins RD. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 91-6.
12. Machesky LM, Atkinson SJ, et al. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 1994; 127: 107-15.
13. Kaneda A, Kaminishi M, et al. Reduced expression of the Insulin-induced protein 1 and p41 Arp2/3 complex genes in human gastric cancers. *Int J Cancer* 2002; 100: 57-62.
14. Kaneda A, Kaminishi M, et al. Decreased expression of the seven Arp2/3 complex genes in human gastric cancers. *Cancer Lett* 2004; 212: 203-10.
15. Otsubo T, Iwaya K, et al.. Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004; 17: 461-7.
16. Bailly M, Macaluso F, et al. Relationship between Arp2/3 complex and the barbed ends of actin filaments at the leading edge of carcinoma cells after epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 1999; 145: 331-45.
17. Yamaguchi H, Lorenz M, et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* 2005; 168: 441-52.
18. Condeelis JS, Wyckoff JB, et al. Lamellipodia in invasion. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 119-28.
19. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002; 1: 219-227.
20. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004; 25: 387-395.
21. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886; E-pub 25 April 2002.

22. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1315-1320.
23. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999; 154: 385-394.
24. Clarijs R, Ruiter DJ, de Waal RM. Lymphangiogenesis in malignant tumours: does it occur? *J Pathol* 2001; 193: 143-146.
25. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101: 973-978.
26. Jain RK, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 417-421.
27. Kyzas PA, Gellef S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005; 206: 170-177.
29. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-682.
30. Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martin-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2004; 100: 553-560.
31. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 2004; 240: 306-312.
32. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 573-583.

33. Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003; 200: 195-206.
34. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2719. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2002
35. Neville BW, Damm DD, Allen CM et al. Oral and maxillofacial pathology: 337-369. 2nd ed Phila, PA: Saunders 2002
36. Silvermann S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. *J Am Dent Assoc* 132: 7-11, 2001
37. Silvermann S Jr. Epidemiology. In Silvermann S Jr ed. Oral Cancer: 1-6. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc 1998
38. Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 66: 1288-1296, 1990
39. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 37: 401- 418, 2001
40. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1980-1997, with a special analysis for tongue cancer. *ArchOtolaryngol Head Neck Surg* 128: 268-274, 2002
41. Swango PA. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: An epidemiologic overview. *J Public Health Dent* 56: 309-318, 1996
42. Ries LAG, Hankey BF, Miller BA et al. Cancer Statistics Review 1973-1988. National Cancer Institute, NIH Publication No.91-2789, 1991
43. Silverman S Jr, Shillitoe EF. Etiology and Predisposing Factors. In: Silverman S Jr ed. Oral Cancer: 7-24. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc 1998

44. Goldberg HI, Lockwood SA, Wyatt SW et al. Trends and differentials in mortality from cancers of the oral cavity and pharynx in the United States, 1969-1989. *Cancer* 74: 565-572, 1994
45. Caplan DJ, Hertz-Picciotto I. Racial differences in survival of oral and pharyngeal cancer patients in North Carolina. *J Public Health Dent* 58: 36-43, 1998
46. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 72: 1369-1375, 1993
47. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 22: 459-462, 1993
48. Andre K, Schraub S, Mercier M et al. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 31B: 301-309, 1995
49. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48: 3282-3287, 1988
50. Lewin F, Norell SE, Johansson H et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82: 1367-1375, 1998
51. Silverman S Jr, Griffith M. Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc* 85: 637-640, 1972
52. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR et al. Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 1071-1078, 1999
53. Brown RL, Suh JM, Scarborough JE et al. Snuff dippers' intraoral cancer: Clinical characteristics and response to therapy. *Cancer* 18: 2-13, 1965

54. Winn DM, Blot WJ, Shy CM et al. Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States. *N Engl J Med* 321: 745-749, 1981
55. Bouquot JE, Meckstroth RL. Oral cancer in a tobacco-chewing U.S. population – no apparent increased incidence or mortality. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86: 697-706, 1998
56. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: A global perspective. *J Dent Educ* 65: 328-339, 2001
57. Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB et al. Oral submucous fibrosis as a precancerous condition. *Scand J Dent Res* 92: 224-229, 1984
58. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ et al. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent 299 CA A Cancer Journal for Clinicians Oral Cancer and Precancerous Lesions Oral Epidemiol* 13: 340-341, 1985
59. Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC et al. Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *J Oral Pathol Med* 24: 145-152, 1995
60. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. A retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82: 57-68, 1996
61. Sugerman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: Evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 3: 130-147, 1997
62. Lindel K, Beer KT, Laissue J et al. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 92: 805-813, 2001
63. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: Mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 13: 183-188, 2001

64. Mork J, Lie AK, Glatte E et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 313: 1125-1131, 2001
65. Winn DM, Ziegler RG, Pickle LW et al. Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States. *Cancer Res* 44: 1216-1222, 1984
66. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 61: 437S-445S, 1995
67. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada-Nur F et al. A prospective study of findings and management in 299 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72: 665-670, 1991
68. Barnard NA, Scully C, Eveson JW et al. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 22: 421-424, 1993
69. Eisenberg E. Oral lichen planus: A benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 1278-1285, 2000
70. Watts JM. The importance of the Plummer-Vinson syndrome in the etiology of carcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Postgrad Med J* 37: 523-533, 1961
71. Larsson LG, Sandström A, Westling P. Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden. *Cancer Res* 35: 3308-3316, 1975
72. de Visscher JG, Bouwes Bavinck JN, van der Waal I. Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients. Report of six cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26: 120-123, 1997
73. van Zuuren EJ, de Visscher JGAM, Bouwes Bavinck JN. Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. *J Amer Acad Dermatol* 38: 497-499, 1988
74. Flaitz CM, Nichols CM, Adler-Storthz K et al. Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency syndrome virus infection. A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80: 55-62, 1995

75. Flaitz CM, Silverman S Jr. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Associated Malignancies. In Silverman S Jr ed. Oral Cancer: 165-170. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker, Inc 1998
76. Spiro RH, Huvos AG, Wong GY et al. Predictive value of tumor thickness in squamous cell carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth. Am J Surg 152: 314-319, 1986
77. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y et al. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. Head Neck 19: 205-210, 1996
78. Pentenero M, Ganfoldo S, Carrozzo M. Importance of tumor thickness and depth invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. Head Neck 27: 1080-1091, 2005
79. Giacomarra V, Tirelli G, Papanikolla L et al. Predictive factors of nodal metastases in oral cavity and oropharynx carcinomas. Laryngoscope 109: 795-799, 1999
80. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ et al. Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck – analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. Laryngoscope 106: 1170-1175, 1996
81. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Dis 4: 70-77, 1998
82. Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ et al. Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. Laryngoscope 96: 1145-1148, 1986
83. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease – free and overall survival. Am J Surg Pathol 9: 167-178, 2005
84. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. Virchows Arch 427: 277-281, 1995
85. Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. J Oral Pathol Med 29: 291-298, 2000

86. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34: 329-333, 2005
87. Rahima B, Shingaki S, Nagata M et al. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 423-431, 2004
88. Hosal AS, Unal OF, Ayhan A. Possible prognostic value of Histopathologic parameters in patients with carcinoma of the oral tongue. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 197: 216-219, 1998
89. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 66: 109-113, 1990
90. O'Sullivan B, Shah J. New TNM staging criteria for head and neck tumors. *Semin Surg Oncol* 21: 30-42, 2003
91. Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours. 6th ed Willey – Liss, New York 2002
92. Greene FL, Page DL, Fleming ID et al. AJCC cancer staging manual. 6th ed Springer – Verlag, New York 2002
93. Howaldt HP, Kainz M, Euler B et al. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. DOSAK. *J Craniomaxillofac Surg* 27: 275-288, 1999
94. Noguchi M, Kido Y, Kubota H et al. Prognostic factors and relative risk for survival in N1-3 oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis using Cox's hazard model. *Brit J Oral Maxillofac Surg* 37: 433-437, 1999
95. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42: 229-239, 2006
96. Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J et al. Histopathologic, stereolytic, epidemiologic and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 18: 142-152, 1996

97. Kerrebijn JD, Freeman JL, Irish JC et al. Supraomohyoid neck dissection. Is it diagnostic or therapeutic? *Head Neck* 21: 39-42, 1999
98. Woolgar JA. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: Incidence, histopathological features and implications. *Brit J Oral Maxillofac Surg* 37: 181-186, 1999
99. Shintani S, Matsuura H, Hasegawa Y et al. Regional lymph node affects the incidence of distant metastasis in tongue squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 15: 1573-1576, 1995
100. Tagaki M, Kayano T, Yamamoto H et al. Causes of oral tongue cancer treatment failures. Analysis of autopsy cases. *Cancer* 69: 1081-1087, 1992
101. Brown B, Barnes L, Mazariegos J: Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer* 64: 1195-1202, 1989
102. Forastiere A, Goepfert H, Goffinet D et al. NCCN practice guidelines for head and neck cancer. National Comprehensive Network Proceedings. *Oncology* 12: 39-247, 1998
103. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91: 2081-2086, 1999
104. Ord RA, Blanchaert RH Jr. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J Am Dent Assoc* 132: 19S-23S, 2001
105. Som PM, Curtin HD, Mancuso AA. An imaging-based classification for the cervical nodes designed as an adjunct to recent clinically based nodal classifications. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 388-396, 1999
106. Robbins KT. Integrating radiological criteria into the classification of cervical lymph node disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 385-387, 1999
107. Alberts Molecular Biology of the Cell. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 5e Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, Ch 16 pp 965-1052 (a)

108. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jun;9(6):446-54.
109. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):15-33.
110. Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 2002 Mar;12(3):112-20.
111. Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 2007 Oct 15;120(Pt 20):3491-9. Review.
112. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 2005 Jul;96(7):379-86. Review.
113. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247-69. Review.
114. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004 Jan 1;265(1):23-32.
115. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003 Feb 21;112(4):453-65. Review.
116. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):453-8.
117. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta.* 2007 May;1773(5):642-52.
118. Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(4):273-87.
119. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54.
120. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8.
121. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron.* 2008 Dec;1(1):69-83.

122. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008 Jun;14(6):818-29
123. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009
124. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):816-26. Review.
125. Danen EH, van Rheenen J, Franken W, Huveneers S, Sonneveld P, Jalink K, Sonnenberg A. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol*. 2005 May 9;169(3):515-26.
126. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):163-80.
127. Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jan;7(1):20-31.
128. McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci*. 2008 Oct 1;121(Pt 19):3121-32.
129. Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer*. 2010 Dec;10(12):858-70.
130. Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol*. 2007 Mar;17(3):107-17.
131. Gimona M, Buccione R, Courtneidge SA, Linder S. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Apr;20(2):235-41.
132. Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jun 23;12(7):413-26.
133. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal*. 2009 Sep 15;2(88):ra53.

- 134.Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):87-96.
- 135.Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(4):273-87.
- 136.Shibue T, Brooks MW, Weinberg RA. An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell.* 2013 Oct 14;24(4):481-98.
- 137.Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 2006 Apr;9(4):261-72.
- 138.Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):5996-6000; discussion 6000-1. Review.
- 139.Ichetrovkin I, Grant W, Condeelis J. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 2002 Jan 8;12(1):79-84.
- 140.DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J. Cofilin takes the lead. *J Cell Sci.* 2005 Jan 1;118(Pt 1):19-26.
- 141.Chan AY, Bailly M, Zebda N, Segall JE, Condeelis JS. Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. *J Cell Biol.* 2000 Feb 7;148(3):531-42.
- 142.Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science.* 2004 Apr 30;304(5671):743-6.
- 143.Dawe HR, Minamide LS, Bamburg JR, Cramer LP. ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr Biol.* 2003 Feb 4;13(3):252-7.
- 144.Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell.* 2006 Oct 6;24(1):13-23

145. Mouneimne G, Soon L, DesMarais V, Sidani M, Song X, Yip SC, Ghosh M, Eddy R, Backer JM, Condeelis J. Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol.* 2004 Aug 30;166(5):697-708.
146. Dang D, Bamburg JR, Ramos DM. Alpha5beta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. *Exp Cell Res.* 2006 Feb 15;312(4):468-77.
147. Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK. The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2005 Mar;60(3):153-65.
148. Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, Singer RH, Segall JE, Condeelis JS. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res.* 2004 Dec 1;64(23):8585-94.
149. Gunnarsen JM, Spirkoska V, Smith PE, Danks RA, Tan SS. Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression. *Glia.* 2000 Nov;32(2):146-54.
150. Nowak D, Mazur AJ, Popow-Woźniak A, Radwańska A, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M. Subcellular distribution and expression of cofilin and ezrin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Eur J Histochem.* 2010 Apr 13;54(2):e14
151. Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, Soares M, Müller CB, Lopes FM, Zanotto-Filho A, da Cruz Fernandes M, Moreira JC, Shacter E, Klamt F. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2010 Aug 1;116(15):3645-55.
152. Müller CB, de Barros RL, Castro MA, Lopes FM, Meurer RT, Roehle A, Mazzini G, Ulbrich-Kulczynski JM, Dal-Pizzol F, Fernandes MC, Moreira JC, Xavier LL, Klamt F. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Sep;137(9):1309-16.

- 153.Nishimura S, Tsuda H, Kataoka F, Arao T, Nomura H, Chiyoda T, Susumu N, Nishio K, Aoki D. Overexpression of cofilin 1 can predict progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer 1
- 154.Zhou J, Wang Y, Fei J, Zhang W. Expression of cofilin 1 is positively correlated with the differentiation of human epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2012 Dec;4(6):1187-1190.
- 155.Yan B, Yap CT, Wang S, Lee CK, Koh S, Omar MF, Salto-Tellez M, Kumarasinghe MP. Cofilin immunolabelling correlates with depth of invasion in gastrointestinal endocrine cell tumors. *Acta Histochem.* 2010;112(1):101-6.
- 156.McConnell BV, Koto K, Gutierrez-Hartmann A. Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression. *Mol Cancer.* 2011 Jun 18;10:75.
- 157.Davila M, Frost AR, Grizzle WE, Chakrabarti R. LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36868-75.
- 158.Zhang H, Wang Y, Xing F, Wang J, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao Z. Overexpression of LIMK1 promotes migration ability of multidrug-resistant osteosarcoma cells. *Oncol Res.* 2011;19(10-11):501-9.
- 159.Klemke M, Wabnitz GH, Funke F, Funk B, Kirchgessner H, Samstag Y. Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity.* 2008 Sep 19;29(3):404-13.
- 160.Nadella KS, Saji M, Jacob NK, Pavel E, Ringel MD, Kirschner LS. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. *EMBO Rep.* 2009 Jun;10(6):599-605.
- 161.Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell.* 1994 Aug 26;78(4):635-44.
- 162.Takenawa T, Miki H. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.* 2001 May;114(Pt 10):1801-9.
- 163.Kurusu S, Takenawa T. The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biol.* 2009;10(6):226.

- 164.Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):32531-4.
- 165.Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):37-48.
- 166.Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):221-31.
- 166.Polachini GM, Sobral LM, Mercante AM, Paes-Leme AF, Xavier FC, Henrique T, Guimarães DM, Vidotto A, Fukuyama EE, Góis-Filho JF, Cury PM, Curioni OA, Michaluart P Jr, Silva AM, Wünsch-Filho V, Nunes FD, Leopoldino AM, Tajara EH. Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. *PLoS One*. 2012;7(12):e50517.
167. Yamaguchi H, Miki H, Suetsugu S, Ma L, Kirschner MW, Takenawa T. Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12631-7
168. Bailly M. et al. Relationship between Arp 2/3 Complex and the Barbed Ends of Actin Filaments at the Leading Edge of Carcinoma Cells after epidermal growth factor stimulation. *The Journal of Cell Biology* 145(2), 331-345, 1999.
169. Iwaya K, Oikawa K, Semba S, Tsuchiya B, Mukai Y, Otsubo T, et al. Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci*.2007;98:992-999.
170. Pollard TD and Cooper JA: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*.2009, 326:1208-1212.
171. Wu C, Asokan SB, Berginski ME, [Haynes EM](#), [Sharpless NE](#), [Griffith JD](#), et al: Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell*.2012, 148:973-987.
172. Suraneni P, [Rubinstein B](#), [Unruh JR](#), [Durnin M](#), [Hanein D](#), [Li R](#): The Arp 2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J Cell Biol*.2012,197:239-251.

173. Yamaguchi H: Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis. *Eur J Cell Biol.*2012, 91:902-907.
174. Iwaya K, Norio K and Mukai K: Coexpression of Arp2 and WAVE 2 predicts poor outcome in invasive breast carcinoma. *Med Pathol.*2007, 20: 339-343.
175. Zheng H, Zheng Y, Li X, Takahashi H, Hara T, Masuda S, et al. Arp2/3 Overexpression Contributed to pathogenesis Growth and Invasion of Gastric Carcinoma. *Anticancer Research.*2008, 28:2225-2232.
176. César Rivera. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-11894.
177. [Hasegawa T](#), [Tanakura M](#), [Takeda D](#), [Sakakibara A](#), [Akashi M](#), [Minamikawa T](#), et al. Risk factors associated with distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;152(6):1053-1060.
178. [Jerjes W](#), [Upile T](#), [Petrie A](#), [Riskalla A](#), [Hamdoon Z](#), [Vourvachis M](#). et al Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head & Neck Oncology.* 2010;2:9.
179. Yamaguchi H, Oikawa T. Membrane lipids in invadopodia and podosomes: Key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget* 2010, 1;320-328.
180. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007;642–652.
181. Alblazi KM, Siar CH: Cellular Protrusions-Lamellipodia, Invadopodia and Podosomes- and their role in progression of orofacial tumours: Current Understanding. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2187-2191.
182. [Lai FP](#), [Szczydrak M](#), [Block J](#), [Faix J](#), [Breitsprecher D](#), [Mannherz HG](#) et al: Arp2/3 Complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO Journal.* 2008;27(7):982-92.
183. Goley ED and Welch MD: The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Mol Cell Biol.* 2006;7:713-726.
184. Pollard TD and Cooper JA: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009;326:1208-1212.

185. Rahuala H, Teppo S, Niemela S and Kallioniemi A. Silencing of the Arp2/3 Complex Disturbs Pancreatic Cancer Cell Migration. *Anticancer Research*. 2013;33:45-52.
186. Giri A, [Bajpai S](#), [Trenton N](#), [Jayatilaka H](#), [Longmore GD](#), [Wirtz D](#).:The Arp2/3 complex mediates multigeneration dendritic protrusions for efficient 3-dimensional cancer cell migration. *FASEB J*. 2013;27(10):4089–4099.
187. Nurnberg A, Kitsing T and Grosse R: Nucleating actin for invasion. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;11:177-187.
188. Zheng H, Zheng Y, Li X, Takahashi H, Hara T, Masuda S, et al. Arp2/3 Overexpression Contributed to pathogenesis Growth and Invasion of Gastric Carcinoma. *Anticancer Research*. 2008;28:2225-2232.
189. [Semba S](#), [Iwaya K](#), [Matsubayashi J](#), [Serizawa H](#), [Kataba H](#), [Hirano T](#), et al. Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich syndrome family verprolin-homologous protein2 in adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2449-2454.
190. Liu Z, Yang X, Chen C, Liu B, Ren B, Wang l, et al: Expression of the Arp2/3 complex in human gliomas and its role in the migration and invasion of glioma cells. *Oncology Reports*. 2013;30:2127-2136.
191. Kazazian K, Go C, Wu H, Brashavitskaya O, Xu R, Dennis J, et al: Plk4 promotes cancer invasion and metastasis through Arp2/3 Complex regulation of the actin cytoskeleton. *Cancer Res*. 2017;77(2):434-447.
192. Sun Y, Shang Y, Ren G, Zhou I, Feng B, et al. Coronin 3 regulates gastric cancer invasion and metastasis by interacting with Arp2. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 1163-73.
193. [Baggett AW](#), [Cournia Z](#), [Han MS](#), [Patargias G](#), [Glass AC](#), [Liu SY](#), [Nolen BJ](#): Structural characterization and computer-aided optimization of a small molecule inhibitor of Arp2/3 Complex, a key regulator of the actin cytoskeleton. *Chem Med Chem*. 2012;7(7):1286-1294.

194. Kinoshita T, Nohata N, Watanabe-Takano H, Yoshino H, Hidaka H et al: Actin-related protein 2/3 complex subunit 5(ARPC5) contributes to cell migration and invasion and is directly regulated by tumor-suppressive microRNA-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Inter. Journal of Oncology*. 2012;40:1770-1778.
195. Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, et al. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature* 406; 2009, 1031-1034.
196. Flanagan L, Chou J, Falet H, Neujahr R, Hartwing J, and Stossel T.: Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *The Journal of Cell Biology*. 2001;155(4):511-517.
197. Kashani-Sabet M, Rangel J, Torabian S, Nosrati M, Simko J et al: Aulti marker essay to distinguish malignant melanoma from benign nevi. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:6268-6272.

SUMMARY

Arp2/3 complex is expressed in oral squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study of 88 cases.

BACKGROUD: We investigated the immunohistochemical expression of Arp2/3 complex in 88 oral squamous cell carcinomas (OSCCs) and correlated it with the tumor type and grade.

MATERIALS AND METHODS: This is a retrospective study of 88 cases of OSCCs (9 verrucous carcinomas, 4 carcinomas in situ, 37 well differentiated OSCCs, 32 moderately differentiated OSCCs, and 6 poorly differentiated OSCCs), stained with mouse monoclonal antibodies for Arp2 and Arp3. Staining was graded according to the extent of positivity by two observers.

RESULTS: Arp2 positivity was seen in 79 (89.77%) cases and Arp3 positivity in 78 (88.63%) cases. In positive cases, Arp2 expression was graded as (+) in 12.5%, (++) in 28.4% and (+++) in 48.86% of the cases; Arp3 was graded as (+) in 36.36%, (++) in 30.68% and (+++) in 21.59% of the cases.

CONCLUSION: Expression of Arp2 and Arp3, indicative of the formation of the Arp2/3 complex, was seen in most OSCCs examined. Although no statistically significant correlation was found between the immunohistochemical expression of Arp2/Arp3 and tumor type or grade, the more common expression in invasive OSCCs than in non-invasive verrucous carcinomas and carcinomas in situ is indicative of its involvement in the biological behaviour of the lesions. The availability of Arp2/3 inhibitors that could be used in clinical practice warrants further study of the expression of Arp2/3 in OSCC.

