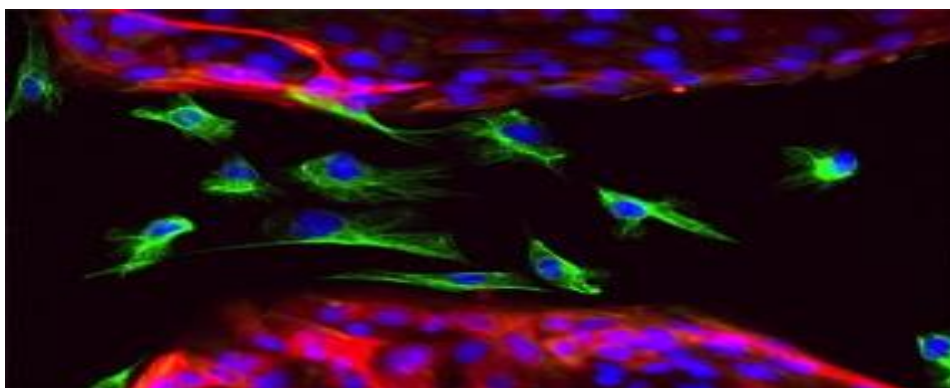




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ

ΜΠΣ : ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ:
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ



Η ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ
ΚΑΙ Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Αν. Καθηγητής Α.Χ. ΛΑΖΑΡΗΣ

ΜΠΟΥΚΛΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2013

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Α.Χ ΛΑΖΑΡΗΣ (Επιβλέπων)	ΑΝ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ν.Β ΤΣΑΒΑΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ρ.ΤΡΙΓΓΙΔΟΥ	ΔΙΔΑΚΤΩΡ

Το εὐδαίμον το ελεύθερον, το δ' ελεύθερον το εὐφύχον

Περικλέους Ἐπιτάφιος Λόγος

(Θουκυδίδου, Ἱστοριῶν Β)

Την εργασία αυτή την αφιερώνω σε όλους τους δασκάλους και καθηγητές που είχα στην ζωή μου , από όλους τους οποίους πήρα ένα μικρό λιθαράκι για να χτίσω μέσα μου το προσωπικό οικοδόμημα γνώσης, ηθικής και αξιών το οποίο με βοηθά κάθε μέρα στην προσπάθεια μου να γίνομαι ολοένα καλύτερος άνθρωπος. Θα τους είμαι παντοτινά ευγνώμων!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.. 6

1.1	Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα.....	6
1.2	Αιτιοπαθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα.....	8
1.2.1	Αιτιολογία.....	8
1.2.2	Παθογένεση.....	10
1.3	Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα.....	11
1.4	Ιστολογική ταξινόμηση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα.....	13
1.4.1	Ιστολογική ταξινόμηση.....	13
1.4.2	Σταδιοποίηση.....	15
1.5	Κλινική και θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του πνεύμονα.....	17
1.5.1	Κλινική προσέγγιση.....	17
1.5.2	Θεραπευτική προσέγγιση.....	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Η ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ.....21

2.1	Ορισμός της EMT και ιστορική αναδρομή.....	21
-----	--	----

2.2 Η Φυσιολογία της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής.....	23
2.3 Ταξινόμηση της EMT.....	28
2.3.1 Πρώτη κατηγορία.Φυσιολογική EMT.Εμβρυογένεση.....	30
2.3.2 Δεύτερη κατηγορία.Φυσιολογική EMT.Ιστική επούλωση.....	32
2.4 Παθολογική EMT.....	33
2.4.1 Παθολογική EMT.Ίνωση.....	33
2.4.2 Παθολογική EMT.Καρκίνος.....	34
2.5 Μελλοντικές προοπτικές για την EMT.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Η ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΙ Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	37
3.1 Ενδείξεις επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής στα επιθηλιακά νεοπλάσματα του πνεύμονα.....	37
3.2 Κυριότεροι μοριακοί μηχανισμοί της EMT στον καρκίνο του πνεύμονα.....	39
3.3 Κυριότεροι επαγωγείς της EMT στον καρκίνο του πνεύμονα.....	43
3.4 Γονιδιακές αλλοιώσεις και EMT.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ EMT ΜΕ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	53
4.1 Χημειοαντοχή και EMT.....	53

4.2 Η EMT ως επαγωγέας αρχέγονων καρκινικών κυττάρων.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΗΣ EMT.....	59
Βιβλιογραφία.....	63
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	71
ABSTRACT.....	72
Συνομογραφίες.....	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

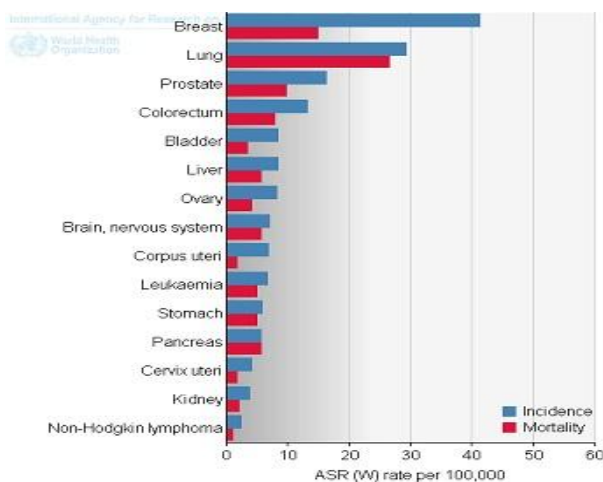
Με περισσότερους από 1.000.000 θανάτους παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα κατατάσσεται στην πρώτη θέση ως η πιο συχνή και θανατηφόρος κακοήθεια, με θνησιμότητα μεγαλύτερη από τους καρκίνους του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη μαζί. (Travis W, 2004) (Kernstine K, 2011).Μόνο για το 2010 στις ΗΠΑ η εκτίμηση των νέων διεγνωσμένων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα από την American Cancer Society ήταν περίπου 222.250 περιπτώσεις με περίπου 155.000 θανάτους. (Kernstine K, 2011) Είναι αξιοσημείωτο ότι στην ίδια χώρα, στις αρχές του 1990 η επίπτωση για την ίδια νεοπλασία καθώς επίσης και η θνησιμότητα αυτής, είχε ξεκινήσει να μειώνεται στον ανδρικό πληθυσμό και το ίδιο ισχύει για τα τελευταία 30 έτη χάρη στις αντικαπνιστικές εκστρατείες πρόληψης και ενημέρωσης, που εφαρμόστηκαν από τις εκάστοτε κυβερνήσεις.

Από την άλλη μεριά κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στον γυναικείο πληθυσμό μιας και από το 1987 ολοένα και περισσότερες γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνο του πνεύμονα, θνησιμότητα η οποία φαίνεται να τείνει να ξεπεράσει αυτής του καρκίνου του μαστού ο οποίος για πάνω από 40 έτη αποτέλεσε την κύρια αιτία θανάτου από νεοπλασία στις γυναίκες. Είναι χαρακτηριστικό ότι η αναλογία μεταξύ ανδρικού και γυναικείου πληθυσμού είναι 2,7(Α/Γ) ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο καρκίνος του πνεύμονα συναντάται περισσότερο στις αναπτυγμένες χώρες. (Youlden DR, 2008)

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Globocan του 2008 που δημοσιεύθηκαν από την διεθνή υπηρεσία για την έρευνα στον καρκίνο στην χώρα μας,ο επιπολασμός για τον ανδρικό πληθυσμό στην 5ετή εκτίμηση ανα 100.000 κατοίκους είναι 14,2% ενώ για τις γυναίκες 3%.Η επίπτωση για τους άνδρες φθάνει το 26,3% και στις γυναίκες 7%,ενώ η θνησιμότητα και για τα δύο φύλα μαζί αγγίζει το 23,5%. (IARC, 2008) . Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το 2008 περίπου 6500 έλληνες απεβίωσαν από καρκίνο του πνεύμονα στοιχείο το οποίο δεν μπορεί να περάσει απαρατήρητο

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	439	1.2	1.8	173	0.6	0.7	1178	1.3	12.3
Nasopharynx	117	0.3	0.7	53	0.2	0.3	350	0.4	3.7
Other pharynx	57	0.2	0.3	45	0.2	0.2	127	0.1	1.3
Oesophagus	191	0.5	0.8	194	0.7	0.8	198	0.2	2.1
Stomach	1486	4.0	5.8	1333	4.9	4.9	2531	2.9	26.5
Colorectum	3385	9.1	13.2	2296	8.4	7.8	9567	10.8	100.2
Liver	2267	6.1	8.4	1615	5.9	5.7	2390	2.7	25.0
Gallbladder	365	1.0	1.4	305	1.1	1.1	354	0.4	3.7
Pancreas	1412	3.8	5.7	1469	5.4	5.7	820	0.9	8.6
Larynx	487	1.3	2.1	364	1.3	1.4	1733	2.0	18.1
Lung	6667	18.0	29.3	6402	23.5	26.6	7722	8.7	80.8
Melanoma of skin	414	1.1	2.3	181	0.7	0.9	1625	1.8	17.0
Breast	4349	11.7	41.4	1927	7.1	14.9	17476	19.7	360.4
Cervix uteri	345	0.9	4.1	172	0.6	1.6	1205	1.4	24.9
Corpus uteri	821	2.2	6.9	271	1.0	1.8	3139	3.5	64.7
Ovary	860	2.3	8.1	504	1.9	4.0	2068	2.3	42.6
Prostate	2412	6.5	16.2	1564	5.8	9.8	8901	10.0	189.3
Testis	78	0.2	1.2	19	0.1	0.2	296	0.3	6.3
Kidney	880	2.4	3.8	553	2.0	2.0	2650	3.0	27.7
Bladder	2240	6.0	8.4	1081	4.0	3.4	7802	8.8	81.7
Brain, nervous system	1291	3.5	7.1	1178	4.3	5.6	1227	1.4	12.8
Thyroid	284	0.8	1.8	63	0.2	0.2	1157	1.3	12.1
Hodgkin lymphoma	401	1.1	2.4	223	0.8	0.9	1227	1.4	12.8
Non-Hodgkin lymphoma	484	1.3	2.4	258	0.9	1.1	1314	1.5	13.8
Multiple myeloma	503	1.4	1.9	353	1.3	1.2	1243	1.4	13.0
Leukaemia	1512	4.1	6.6	1388	5.1	5.0	3161	3.6	33.1
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	37089	100.0	160.0	27213	100.0	104.2	88758	100.0	929.1

Incidence and mortality data for all ages. 5-year prevalence for adult population only. ASR (W) and proportions per 100,000



Πίνακες 1,α,β

Στοιχεία
IARC Globocan 2008
για τον καρκίνο του
πνεύμονα στην
Ελλάδα (Globocan
προσπέλαση
11/08/2013) (IARC,
2008)

- **Προληπτικός έλεγχος(screening)**

Ο καρκίνος του πνεύμονα πληρεί αρκετά από τα κριτήρια τα οποία είναι αναγκαία για ένα πλήρες πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου μιας και ένας πληθυσμός με γνωστούς παράγοντες κινδύνου είναι εύκολα ανιχνεύσιμος ενώ οι διαγνωστικές εξετάσεις των προκακοήθων αλλοιώσεων είναι σχετικά χαμηλού κόστους όπως για παράδειγμα μια απλή κυτταρολογική εξέταση πτυέλων ή ανοσοϊστοχημικές εξετάσεις για p53,p16 ή απεικονιστικές όπως HRCT και άλλες. (Corrin B, 2006)

1.2.Αιτιοπαθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα

1.2.1 Αιτιολογία

- **Κάπνισμα**

Είναι πλέον αποδεκτό ότι το κάπνισμα αποτελεί χωρίς αμφιβολία τον σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου στον πνεύμονα. Πολυάριθμες αποδεδειγμένα καρκινογόνες χημικές ενώσεις με σημαντικότερους τους πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες οι οποίοι παράγονται από την πυρόλυση του καπνού αλλά και τις νιτροζαμίνες , ουσίες γνωστές για την καρκινογόνο τους δράση και κυρίως για την ανάπτυξη και πλακώδους αλλά και αδενοκαρκινώματος στον πνεύμονα.

Οι καπνιστές έχουν δέκα φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονικής νεοπλασίας σε σχέση με τους μη καπνιστές.Το κάπνισμα δεν ευθύνεται μόνο για τον καρκίνο στον πνεύμονα αλλά και για μια σειρά άλλων κακοηθειών όπως καρκίνο της στοματικής κοιλότητας,φάρυγγα,λάρυγγα,οισοφάγου,παγκρέατος,νεφρού,ουροδόχου κύστεως και άλλες.Ο καπνός είναι ιδιαίτερα επιβλαβής και για τους παθητικούς καπνιστές.

Οι κυριότερες μοριακές αλλοιώσεις είναι σε επίπεδο γενετικών αλλοιώσεων κυρίως στις αλληλουχίες βάσεων (G:C>T:A) αλλά και μεταλλάξεις στο p53.Φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με την ποσότητα και τη διάρκεια έκθεσης καθώς και την παρουσία προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων.

- **Περιβάλλον**

Η καρκινογόνος δράση των περιβαλλοντικών αποβλήτων και κυρίως της μόλυνσης του αέρα αποδεικνύεται στη στατιστική διαφορά περιπτώσεων καρκίνου μεταξύ κατοίκων μεγάλων πόλεων και κατοίκων υπαίθρου. Ενοχοποιούνται κυρίως

οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες που εκλύονται πλέον περισσότερο από τις εξατμίσεις των πετρελαιοκίνητων μέσων μεταφοράς ενώ λιγότερο φαίνεται να εμπλέκεται το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και τα θειικά απόβλητα.

- **Ιοντίζουσες ακτινοβολίες**

Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες αυξάνουν κατακόρυφα τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα. Εργάτες ορυχείων εξόρυξης ραδιενεργών υλικών στο παρελθόν, ασθενείς που υπόκεινται σε χρόνιες θεραπευτικές ακτινοβολήσεις όπως επίσης και ιατρικό προσωπικό που εκτίθεται σε αυτές, είναι ομάδες που έχουν αποδεδειγμένα αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται κατά 67% όταν η έκθεση σε ακτινοβολία συνδυάζεται με το κάπνισμα.

- **Αμιάντος**

Η συσχέτιση αμιαντοσικής έκθεσης και ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα έχει αποδειχτεί επιστημονικά από το 1955. Αν και ευθύνεται περισσότερο για την ανάπτυξη μεσοθηλιώματος εντούτοις ένας αμιαντοσικός πνεύμονας έχει σίγουρα κατά το μείζον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα και αυξάνεται αυτός ο κίνδυνος κατά 14 φορές αν ο ασθενής είναι καπνιστής.

- **Βιομηχανικά χημικά**

Σε αυτή την κατηγορία ενοχοποιούνται το αρσενικό, οι χλωρομεθυλικοί αιθέρες, το χρώμιο, το κάδμιο, οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, το βινυλοχλωρίδιο ενώ κατά τις τελευταίες επιδημιολογικές έρευνες αποδεικνύεται ότι η έκθεση σε πυρίτιο προκαλεί και καρκινογένεση στον πνεύμονα εκτός από την μέχρι πρότινος γνωστή ινωτική δραστηριότητα του πυριτίου.

- **Διατροφή**

Η διατροφή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα όπως και σε άλλες νεοπλασίες καθώς μια διατροφή χαμηλή σε βιταμίνες με αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης πνευμονικής νεοπλασίας. Σημαντική μελέτη έχει γίνει με την Βιταμίνη Α, το ρόλο των ρετινοειδών, και την ανάπτυξη πλακώδους καρκινώματος.

- **Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση**

Η IPF αυξάνει κατά 14 φορές την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα και μπορεί να δώσει έναρξη σε οποιονδήποτε ιστολογικό τύπο. Υπάρχουν εκτενείς μελέτες για το αν τα διάμεσα νοσήματα προδιαθέτουν και αν ναι, σε τι ποσοστό στην καρκινογένεση. (Robbins S, 2010), (Corrin B, 2006)

- **Ιοι**

Οποιοσδήποτε ιός ικανός να αντιγράψει το γονιδίωμα του στο DNA του κυττάρου και να παρέμβει στην φυσιολογική λειτουργία του γονιδιώματος μπορεί να δώσει έναρξη σε νεοπλασματική εξεργασία. Τέτοιοι ιοί στον πνεύμονα είναι ο HPV, JCV, SV40, BKV, ο HCMV αλλά και οι HIV και EBV (Giuliani L, 2007) (Corrin B, 2006)

- **Μεταβολισμός και ξενοβιοτικά**

Το γεγονός ότι κάποιοι καπνιστές μπορούν να φτάσουν σε μεγάλες ηλικίες χωρίς να νοσήσουν από καρκίνο του πνεύμονα αποδεικνύει ότι κάθε ανθρώπινος οργανισμός μεταβολίζει διαφορετικά τις ξενοβιοτικές ουσίες όπως στην προκειμένη περίπτωση τα παράγωγα της πυρόλυσης του καπνού. Αυτή η ιδιότητα είναι μάλλον γενετικά προγραμματισμένη και επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο ο ανθρώπινος οργανισμός αντιμετωπίζει τον καρκίνο θέτωντας σε λειτουργία τις ενζυματικές ηπατοκυτταρικές αλυσίδες αποτοξίνωσης. (Corrin B, 2006)

1.2.2 Παθογένεση

Όλοι οι παραπάνω αναφερθέντες αιτιολογικοί και προδιαθεσικοί παράγοντες ενεργούν μέσα από μια πολυσταδιακή διαδικασία αποθήκευσης ολοένα και περισσότερο μοριακών μεταλλάξεων σε σημεία κλειδιά του κυτταρικού γονιδιώματος με αποτέλεσμα κυτταρικές γονιδιακές βλάβες που ως αποτέλεσμα έχουν την μετατροπή του κυττάρου σε νεοπλασματικό. Η παθογενετική διαδικασία αυτού του είδους είναι παρόμοια και σε πολλά άλλα είδη καρκίνου του ανθρώπινου σώματος.

Αρκετά πριν την εμφάνιση του καρκίνου πολύ συχνά είναι εμφανείς πρώιμες αλλοιώσεις. Οι αλλοιώσεις αυτές δεν είναι πάντα υποχρεωτικό ότι θα προχωρήσουν σε καρκίνο αλλά είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι αποτελούν την φαινοτυπική έκφραση των διαφόρων μοριακών γεγονότων που έχουν επιδράσει στο κυτταρικό γονιδίωμα του εν λόγω οργάνου.

Συγκεκριμένα στον πνεύμονα διακρίνουμε τρεις κύριους τύπους προκαρκινωματοδών αλλοιώσεων:

Α) Πλακώδη μετάπλαση και δυσπλασία με αποδεδειγμένη μεταβατική ακολουθία ξεκινώντας από Υπερπλασία-Πλακώδη μετάπλαση-Δυσπλασία-Καρκίνωμα

ενδοεπιθηλιακό (In situ)-Πλακώδες διηθητικό καρκίνωμα με πιο χαρακτηριστική εντόπιση κεντρικά στους μεγαλύτερης διαμέτρου βρόγχους.

Β)Άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία, και , πλέον με την νέα πρόταση ταξινόμησης,το ενδοεπιθηλιακό αδenoκαρκίνωμα κάτω από 3 εκατοστά πρώην επονομαζόμενο μονήρες βρογχοκυψελιδικό(πλέον ο όρος BAC προτείνεται να απαληφθεί) το οποίο μπορεί να είναι βλεννώδες ,μη βλεννώδες ή μεικτό.Απο τις προδιηθητικές αλλοιώσεις του αδenoκαρκινώματος, μετάβαση προς αδenoκαρκίνωμα με πιο χαρακτηριστική εντόπιση περιφερικά στον πνεύμονα.

Γ)Η διάχυτη ιδιοπαθής νευροενδοκρινική υπερπλασία (DIPNECH) η οποία έχει δειχθεί ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη καρκινοειδούς νεοπλασματος ή άλλων τύπων νευροενδοκρινούς όγκου χωρίς όμως να έχει βρεθεί συσχέτιση με τον μικροκυτταρικό τύπο του καρκίνου του πνεύμονα με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση. (Corrin B, 2006) (Robbins S, 2010) (Travis WD, 2011)

1.3Μοριακή βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Στην προηγούμενη ενότητα έγινε μια γενική αναφορά στους κυριότερους αιτιοπαθογενετικούς παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου στον πνεύμονα.Οι παράγοντες αυτοί δρουν συσσωρευτικά προκαλώντας τις περισσότερες φορές σειρά γονιδιακών και γενετικών μεταλλάξεων με δυναμική νεοπλασματικής εξαλλαγής.Είναι πλέον ερευνητικά αποδεδειγμένο ότι τη στιγμή της διάγνωσης μπορούν να ανιχνευτούν 10 με 20 γενετικές μεταλλάξεις.

Τα κυριότερα ογκογονίδια που εμπλέκονται συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα είναι τα c-myc,c-Met,K-ras, γονίδια που κωδικοποιούν για τον EGFR, αλλά και το c-kit.Τα κυριότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται στην εν λόγω κακοήθεια είναι το p53, Rb1, p16(INK4A), καθώς επίσης και γονίδια που εδράζουν στις θέσεις του βραχέως τμήματος του χρωμοσώματος 3 όπως το FHIT,RASSF1A και άλλα. Να σημειωθεί ότι το c-kit είναι απλά υπερεκφραζόμενο και όχι μεταλλαγμένο.

Όπως θα δούμε, στην ιστολογική ταξινόμηση ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται αδρά σε Μη Μικροκυτταρικό καρκίνο και Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Αρκετές μοριακές μεταλλάξεις είναι κοινές ενώ άλλες αφορούν περισσότερο τη μία ή την άλλη κατηγορία. Έτσι στο μεν μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα θα συναντήσουμε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν για EGFR,K-ras,p53,p16 ενώ στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα εμπλέκονται κυρίως το c-kit,c-

myc,p53,απώλειες της ετεροζυγωτίας του βραχέου τμήματος του χρωμοσώματος 3,Rb και bcl-2.Έχει επίσης φανεί από πρόσφατες μελέτες ότι γονίδια όπως τα PTEN και TSC που εμπλέκονται στο μονοπάτι του M-tor φαίνεται να μεταλλάσσονται σε ποσοστό 30% κυρίως στο μη μικροκυτταρικό τύπο. Σημαντικό επίσης μόριο με ενζυματική δραστηριότητα είναι η τελομεράση της οποίας η δραστηριότητα είναι αυξημένη κατά 80% σε όλους τους διάφορους τύπους του καρκίνου του πνεύμονα αποτελώντας έτσι ένα μοριακό δείκτη με σημαντική διαγνωστική αξία.

Σε ότι αφορά τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται είναι: το μονοπάτι PI3-Akt,το μονοπάτι των MAP κινασών, το μονοπατι των Jak-stat κινασών αλλά και των Ιντεγκρινών με την paxillin σημαντική πρωτεΐνη συγκόλλησης να βρίσκεται ενεργοποιημένη.Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι απώλειες τμημάτων του βραχέως τμήματος του χρωμοσώματος 3(3p) συναντώνται και σε φυσιολογικό βρογχικό επιθήλιο καπνιστών χωρίς καρκίνο του πνεύμονα,αποτελούν όμως ένα εύφορο έδαφος για την κακοήθη εξαλλαγή.

Όπως προαναφέρθηκε,το γενετικό προφίλ του κάθε πληθυσμού είναι πολλές φορές καθοριστικό για την προδιάθεση ανάπτυξης καρκίνου στον πνεύμονα.Έτσι ομάδες ανθρώπων με πολυμορφισμούς του κυτοχρώματος P450 που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP1A1,δείχνουν να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα μεταβολισμού καρκινογόνων μεταβολιτών κυρίως προερχομένων από το κάπνισμα με επακόλουθη ενεργοποίηση σε πλήρη καρκινογόνες ουσίες.Απο άλλες έρευνες έχει αποδειχτεί ότι άτομα με μεταλλαξιακή γονοτυπική ευαισθησία ,κυρίως διαπιστωμένη σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από καρκινογόνες ουσίες του καπνίσματος, έχουν έως και δέκα φορές πιο αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα.Αυτού του είδους η γονοτυπική ευαισθησία φαίνεται να συνδέεται με το γονιδιακό locus 6q23-25.

Τελευταίες μελέτες στον χώρο της γενετικής ογκολογίας έφεραν στο φώς πολυμορφισμούς που συνδέουν το γονίδιο που εκφράζει τον ακετυλχολινικό υποδοχέα της νικοτίνης και τη σχέση του με τον καρκίνο του πνεύμονα σε καπνιστές και μη καπνιστές.Θα πρέπει πάντως να αναφερθεί ότι 25% των καρκίνων του πνεύμονα παγκοσμίως αναπτύσσεται σε μη καπνιστές. Τέτοια άτομα είναι συνήθως γυναίκες με μεταλλάξεις στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR και άθικτο K-ras και p53 (Travis W, 2004), (Robbins S, 2010)

Ολοκληρώνοντας την ενότητα της μοριακής βιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα θα πρέπει να αναφερθεί ότι παγκοσμίως υπάρχει μεγάλη και ένθερμη

συμμετοχή στην ερευνητική ογκολογία αυτού του νεοπλάσματος. Οι τελευταίες τάσεις των ερευνητών στρέφονται στην ταυτοποίηση γονιδιακών και πρωτεομικών προφίλ των διαφόρων ιστοτύπων της εν λόγω νεοπλασίας, με σκοπό την καλύτερη συσχέτιση ιστολογικού τύπου, θεραπευτικής και προγνωστικής προσέγγισης.

Στα πλαίσια αυτά ερευνητές έχουν ταυτοποιήσει γονιδιακές διαφορές στις μεταλλάξεις μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών όπως επίσης ανεύρεση καινούργιων μοριακών δεικτών που σχετίζονται με καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση. Για παράδειγμα 45 γονίδια εκφράζονται διαφορετικά στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα από ότι στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα ενώ 27 γονίδια σχετίζονται με καλύτερη 5ετή επιβίωση. Μόρια όπως το fas, erb-b1, cyclin-d1 σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση ενώ το στάδιο της μεθυλίωσης του DNA αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία και γενικότερα της πρόγνωσης.

Συνολικά οι παραπάνω πληροφορίες αποτελούν ισχυρή απόδειξη ότι η περαιτέρω έρευνα και τελειοποίηση των διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του βιολογικού υλικού θα αποβεί χρήσιμη για τη διάγνωση και διαχείριση του ογκολογικού ασθενή. (DeVita V, 2008)

1.4 Ιστολογική ταξινόμηση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα

1.4.1 Ιστολογική ταξινόμηση

Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούν επιγραμματικά λίγα στοιχεία για την ιστολογική ταξινόμηση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Περισσότερες πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν από τον αναγνώστη σε πιο εξειδικευμένα συγγράματα. Η ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα είναι σημαντική για την διαχείριση του καρκινοπαθούς ασθενή γιατί προσφέρει μια βάση για επιδημιολογική και βιολογική έρευνα.

Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση είναι αυτή της WHO του 2004 στη Lyon της Γαλλίας (Travis W, 2004), όπου διάφοροι ιστολογικοί τύποι περιγράφονται, αν και η κλινική σημασία όλης αυτής της σειράς των όγκων φαίνεται να είναι ακόμα υπο συζήτηση. Υπάρχει μια τελευταία πρόταση από τα μέλη της IASLC για τη σταδιοποίηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και κυρίως του αδενοκαρκινώματος με απαλοιφή του όρου BAC βρογχοκυψελιδικού καρκίνου και στη θέση του την εισαγωγή της οντότητας (Αδενοκαρκίνωμα In Situ) ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα αλλά και άλλες οντότητες που απομακρύνουν πλέον τον όρο βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα. Η ταξινόμηση για το μικροκυτταρικό

καρκίνωμα παραμένει ως έχει με το αμιγές μικροκυτταρικό και το μεικτό ΜΚΠ με ΜΜΚΠ (Travis W, 2004)

TABLE 3: WHO and IASLC guidelines for the histologic classification of lung cancer

I	Adenocarcinoma
	I. Protrusive lesions
	1. Atypical adenomatous hyperplasia
	2. Adenocarcinoma in situ (< 3 cm formerly BAC)
	a. Nonmucinous
	b. Mucinous
	c. Mixed mucinous/nonmucinous
	II. Minimally invasive adenocarcinoma (< 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)
	1. Nonmucinous
	2. Mucinous
	3. Mixed mucinous/nonmucinous
	III. Invasive adenocarcinoma
	1. Lepidic predominant (formerly resection BAC pattern, with > 5 mm invasion)
	2. Acinar predominant
	3. Papillary predominant
	4. Micropapillary predominant
	5. Solid predominant with mucin production
	IV. Variants of invasive adenocarcinoma
	1. Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
	2. Colloid
	3. Fetal (low and high-grade)
	4. Enteric
II	Squamous cell carcinoma
	I. Papillary
	II. Small-cell
	III. Clear cell
	IV. Basoid
III	Large-cell carcinoma
	I. Large-cell neuroendocrine carcinoma
	II. Basoid carcinoma
	III. Lymphoepithelioma-like carcinoma
	IV. Mixed large-cell neuroendocrine carcinoma
	V. Clear cell carcinoma with hobnail phenotype
IV	Adenosquamous carcinoma
V	Carcinomas with pleomorphic, sarcomatous characteristics
	I. Carcinosarcoma
	II. Pulmonary blastoma
	III. Carcinomas with spindle and/or giant cells
	1. Giant cell carcinoma
	2. Spindle cell carcinoma
	3. Pleomorphic carcinoma
	IV. Other
VI	Carcinoid
	I. Typical carcinoid
	II. Atypical carcinoid
VII	Carcinomas of salivary gland origin
	I. Adenoid cystic carcinoma
	II. Mucoepithelioid carcinoma
	III. Others
VIII	Unclassified

Adapted from: International Classification of Tumors, Geneva, Switzerland: WHO, 1991; Travis WD, Colby TC, Corrie B, et al. World Health Organization: Histological Typing of Lung and Pleural Tumours, 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999; Gotlibovitch PC, Boffa DJ, Tamura H, Chen L, et al. 138:262-271, 2009; Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. Journal of Thoracic Oncology 6:244-285, 2011. BAC = bronchioloalveolar carcinoma; NSCLC = International Association for the Study of Lung Cancer

Εικ.1 Νέες προτάσεις ταξινόμησης του ΜΜΚΠ από την IASLC σε συνεργασία με την WHO. (Travis WD, 2011)

Οι κυριότερες κατηγορίες στην ταξινόμηση κατά WHO είναι το αδενοκαρκίνωμα (37% άνδρες, 47% γυναίκες), το πλακώδες καρκίνωμα με συχνότητα (32% άνδρες 25% στις γυναίκες), το μικροκυτταρικό καρκίνωμα (14% άνδρες και 18% γυναίκες) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (18% άνδρες και 10% γυναίκες).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος έχει αυξηθεί σημαντικά και αποτελεί πλέον τον πιο συχνό τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Ερευνητικές υποθέσεις κάνουν λόγο για δύο κύρια αίτια αυτής της αύξησης. Το πρώτο είναι η σημαντική αύξηση του αριθμού γυναικών καπνιστών και το δεύτερο αίτιο είναι η αλλαγή της αρχιτεκτονικής του τσιγάρου με χρήση σιγαρέττων τύπου

Lights και φίλτρων κατακράτησης πίσσας. Αυτά τα στοιχεία ωθούν τον καπνιστή σε βαθύτερες εισπνοές του καπνού για να έχει την ίδια αίσθηση με πριν και να ωθήσει έτσι τον καπνό περισσότερο στην περιφέρεια του πνεύμονα χαρακτηριστικό σημείο εντόπισης του αδενοκαρκινώματος.

Είναι πολύ συχνό φαινόμενο να παρατηρηθεί ιστολογικά μια μίξη περισσότερων του ενός ιστολογικού τύπου στον ίδιο όγκο, αν και μικτοί τύποι καρκινωμάτων πλακώδους-αδενοκαρκινώματος ή μικροκυτταρικού-πλακώδους/μικροκυτταρικού-αδενοκαρκινώματος συναντάται μόνο στο 10% των περιπτώσεων. Για λόγους κλινικής ευκολίας, σήμερα ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε μη μικροκυτταρικό και μικροκυτταρικό τύπο με τον πρώτο να έχει μικρότερο μεταστατικό δυναμικό και να ανταποκρίνεται όμως λιγότερο αποτελεσματικά στη χημειοθεραπεία ενώ ο δεύτερος να έχει υψηλό μεταστατικό δυναμικό αλλά να ανταποκρίνεται, τουλάχιστον στην πρώτη φάση, άριστα στη χημειοθεραπεία. Το κάπνισμα φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με το πλακώδες καρκίνωμα και το μικροκυτταρικό. (Robbins S, 2010), (Travis W, 2004)

Στην εργασία αυτή θα αναλυθεί περισσότερο η σχέση μεταξύ EMT και μη μικροκυτταρικού καρκίνου στον πνεύμονα. Αυτό θα γίνει γιατί η διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει ακόμα εμπλουτιστεί με έρευνα της EMT πάνω στον μικροκυτταρικό τύπο αν και όπως θα δούμε πιο κάτω υπάρχουν σημαντικές ανακαλύψεις πάνω στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτού του νεοπλάσματος που ίσως να το συνδέουν με την EMT τύπου 1 και 3. Επίσης είναι ένα νεόπλασμα για το οποίο δεν υπάρχει επαρκές υλικό σε ζωντανό ιστό λόγω της μη χειρουργησιμότητας της νόσου, με αποτέλεσμα τις περισσότερες φορές να χρειάζονται πειραματικές μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες κάτι που απαιτεί σίγουρα περισσότερο κόστος αλλά και χρόνο για να προκύψουν νέες έρευνες.

1.4.2 Σταδιοποίηση

Όπως αναφέρθηκε ο MMKΠ είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου που συναντάται στον πνεύμονα έναντι του MKΠ με αναλογία 85/15%. Το σύστημα TNM για την σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα φαίνεται να αποτελεί τον καλύτερο προγνωστικό δείκτη της ολικής επιβίωσης σε ασθενείς με MMKΠ. Συγκεκριμένα το στάδιο TNM, ο ιστολογικός τύπος, το performance status (PS) δηλαδή τη γενική κατάσταση του ασθενούς, η συνοσηρότητα και οι επιθυμίες του ασθενούς αποτελούν όλα μαζί τα σημερινά εργαλεία της θεραπευτικής ογκολογίας για τον ασθενή με

καρκίνο του πνεύμονα. Η τελευταία ταξινόμηση βασίζεται στις προτάσεις της Διεθνούς Ομοσπονδίας για την μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα (IASLC) βασισμένη σε μια εργασία η οποία μελέτησε 68463 ασθενείς από το MD Anderson Cancer Center στο πανεπιστήμιο του Texas των ΗΠΑ. (Rami-Porta R, 2007)

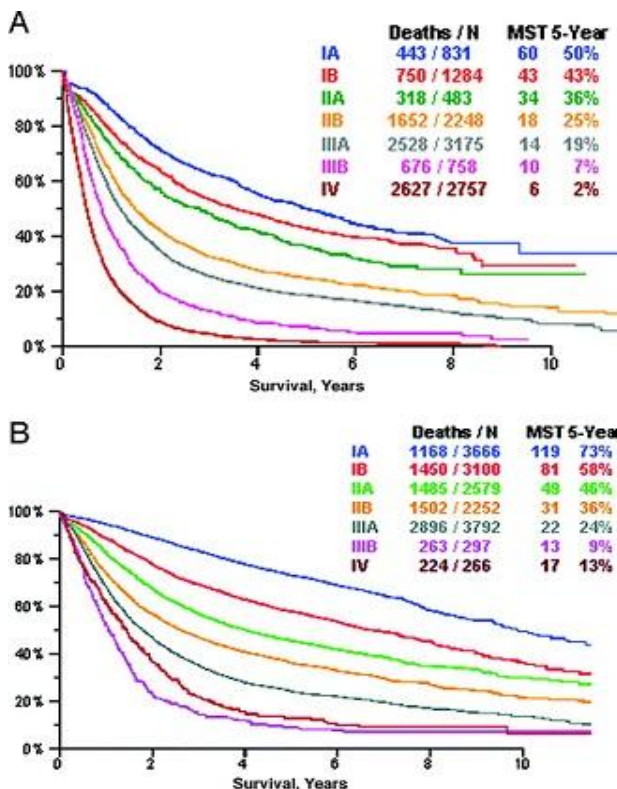
Supraclavicular		Scalene		Mediastinal		Hilar		Lymph Node (N)
Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-	
+	+	+						N3
-	-	-	+	+				N2
-	-	-	-	-	-	+	+	N1
-	-	-	-	-	-	-	-	N0

Stage IV (Metastatic: M1a or M1b, any T, any N)							
Stage III B							
Stage III A							
Stage II A				Stage II B			
Stage IA		Stage IB		Stage IIA		Stage IIB	
T1a	T1b	T2a	T2b	T3	T4	Primary Tumor (T)	
≤2cm	>2cm but ≤3cm	>3cm but ≤5cm	>5cm but ≤7cm	>7cm	Any	a. Size	
No invasion proximal to lobar bronchus		Main bronchus (≥2cm distal to the carina)		Main bronchus (<2cm distal to the carina)		b. Endo-bronchial location	
Surrounded by lung or visceral pleura		Visceral pleura		Chest wall/diaphragm/mediastinal pleura/parietal pericardium		c. Local invasion	
		Atelectasis/obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung		Atelectasis/obstructive pneumonitis of entire lung; separate tumor nodule(s) in ipsilateral primary tumor lobe		d. Other	

Metastatic (M):

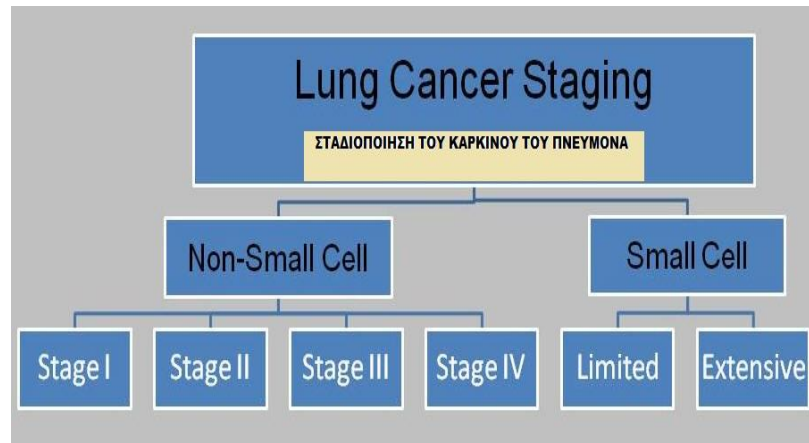
M1a:
Local intrathoracic spread:
• Malignant pleural/pericardial effusion
• Separate tumor nodule(s) in the contralateral lung

M1b:
Disseminated (extrathoracic) disease:
Liver, bone, brain, adrenal gland, etc.



Εικ.2.Εβδομη (7) έκδοση σταδιοποίησης καρκίνου του πνεύμονα κατά AJCC (UyBico S, 2010)

Πίνακας2.
Νέα σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα και καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier όπου φαίνεται η διαφορά στη Β καμπύλη της 5ετούς επιβίωσης μετά από τη μετατροπή κατά Rami-Porta της παλιάς σταδιοποίησης IASLC. (Rami-Porta R, 2007)



Εικ.3.Αδρή σχηματική σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα
(Nasser, 2007)

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα η σταδιοποίηση του μικροκυτταρικού τύπου διαχωρίζεται στην θεραπευτική ογκολογία σε εντοπισμένη ή διάχυτη νόσο μιας και χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλό μεταστατικό δυναμικό και πολύ συχνά τη στιγμή της διάγνωσης έχει ήδη εκδηλωθεί μεταστατική νόσος.

1.5 Κλινική και θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του πνεύμονα

1.5.1 Κλινική προσέγγιση

Ένα χαρακτηριστικό του καρκίνου του πνεύμονα είναι ότι συνήθως διαγιγνώσκεται όταν αρχίσει να δίνει εμφανή συμπτώματα και έτσι αναγκάσει τον ασθενή να αναζητήσει ιατρική βοήθεια. Λιγότερο από 15% διαγιγνώσκεται κατά τύχη κατά τη διάρκεια εξετάσεων ρουτίνας εργασιακής απασχόλησης, στρατιωτικής κατάταξης και άλλα. Η κλινική συμπτωματολογία είναι συνδεδεμένη πολλές φορές με την τοπογραφία της αλλοίωσης. Ένας κεντρικά αναπτυσσόμενος όγκος σε βρόγχο θα δώσει συνήθως πιο γρήγορα συμπτώματα από ένα περιφερικό όγκο ο οποίος μπορεί να παραμείνει για περισσότερο χρόνο ασυμπτωματικός ακόμα και αν αυξηθεί σε μέγεθος. (Corrin B, 2006), (Longmore M, 2006)

Η ευρέως γνωστή κυρίως στον Ιατρικό πληθυσμό νομισματοειδής ακτινολογική βλάβη σε Rx θώρακος, ή αλλιώς το μονήρες ασυμπτωματικό οζίο, θα πρέπει να θεωρείται κακοήθεια μέχρι αποδείξεως του αντιθέτου. Στον πιο κάτω πίνακα φαίνεται η συνήθης διαγνωστική προσπέλαση και οι συγκεκριμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μια αλλοίωσης κεντρικά ή περιφερικά στον πνεύμονα.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΥΠΟΠΤΗΣ ΓΙΑ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ

Πρώτα ακτινογραφία θώρακος, μετά CT και τέλος PET scan

ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ

1. Διαδερμική FNA (fluor or CT)
2. TBNA (brush or needle)
3. VATS
4. Θωρακοτομή

ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ

1. Πτύελα
2. Βρογχοσκόπηση (Βιοψία/brush/FNB)
3. Διαδερμική FNA/FNB
4. Θωρακοτομή

Πίνακας 3. Διαγνωστική προσπέλαση ύποπτης πνευμονικής αλλοίωσης (DeVita V, 2008)

Στη διαγνωστική προσπέλαση ο διαγνώστης ακτινολόγος θα θεωρήσει μια κεντρική ασβέστωση του οζίου περισσότερο καλοήθους αρχής, ενώ μια νομισματοειδής αλλοίωση με παρουσία λεπτών γραμμοειδών αποφυάδων φυγόκεντρα της αλλοιώσεως γέρνει την πλάστιγγα υπέρ της κακοήθειας, χωρίς βέβαια τα παραπάνω στοιχεία να αποτελούν πάντα τον κανόνα. (Corrin B, 2006)

Ο ιατρός θα πρέπει να αναζητήσει συμπτώματα όπως ο επίμονος βήχας, η αιμόπτυση, η δύσπνοια, το ήπιο αλλά εμμένον θωρακικό άλγος, η ανορεξία και η απώλεια βάρους. Συχνές είναι οι επαναλαμβανόμενες ή μη πλήρως αποδραμούσες πνευμονίες. Σημαντικά σημεία στην αντικειμενική εξέταση είναι η καχεξία, η αναιμία αγνώστου αιτιολογίας, ο δακτυλικός ιπποκρατισμός και συχνά επικλείδιες ή μασχαλιαίες λεμφαδενοπάθειες.

Είναι πολλές οι επιπλοκές μιας τοπικής διήθησης της νόσου ενδοθωρακικά όπως για παράδειγμα τα σύνδρομα Pancoast, άνω κοίλης φλέβας, η παράλυση του πνευμονογαστρικού νεύρου και άλλα. Η εξωθωρακική επέκταση είναι εξίσου προβληματική μιας και αφορά τη μεταστατική νόσο σε ήπαρ, επινεφρίδια, οστά και νεφρά. (Longmore M, 2006)

Clinical Feature	Pathologic Basis
Pneumonia, abscess, lobar collapse	Tumor obstruction of airway
Lipid pneumonia	Tumor obstruction; accumulation of cellular lipid in foamy macrophages
Pleural effusion	Tumor spread into pleura
Hoarseness	Recurrent laryngeal nerve invasion
Dysphagia	Esophageal invasion
Diaphragm paralysis	Phrenic nerve invasion
Rib destruction	Chest wall invasion
SVC syndrome	SVC compression by tumor
Homer syndrome	Sympathetic ganglia invasion
Pericarditis, tamponade	Pericardial involvement

SVC, superior vena cava.

Πίνακας 4.Κλινική συμπτωματολογία και τοπική διήθηση (Robbins S, 2010)

Συχνό φαινόμενο στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η εκδήλωση παρανεοπλασματικών συνδρόμων. Αυτά αναπτύσσονται έως και σε 20% των ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα και χαρακτηρίζονται κυρίως από αυξημένη παραγωγή ADH και υπονατρίαμίας, διαταραχή της ACTH και σύνδρομο Cushing, υπερασβεστιαμία από διαταραχή της παραθορμόνης και διαφόρων κυτταροκινών εμπλεκόμενων με τη ρύθμιση του Ca^{++} στο αίμα. Επίσης αύξηση της καλσιτονίνης και συνοδό υπασβεστιαμία, διαταραχή της GnRh και γυναικομαστία στους άνδρες ενώ διαταραχές της σεροτονίνης και της βραδυκινίνης ως νευρο-ορμονο-πεπτίδια θα έχουν ως αποτέλεσμα εκδήλωση καρκινοειδούς συνδρόμου με τις χαρακτηριστικές ταχυκαρδίες, διαρροϊκά επεισόδια και ερύθημα κυρίως στο πρόσωπο του ασθενούς (flushing). (Robbins S, 2010) (Longmore M, 2006)

1.5.2 Θεραπευτική προσέγγιση

Σε ότι αφορά τη θεραπεία, η αντιμετώπιση χαρακτηρίζεται ως τριφασικής μορφής. Η χειρουργική εξέρεση ενδείκνυται για τους ασθενείς των οποίων η νόσος είναι, ή , καθίσταται χειρουργίσιμη μετά από εκτενή υποσταδιοποίηση. Επιθετική χήμειο και ακτινοθεραπεία επιλέγεται για ασθενείς με μη χειρουργήσιμο ΜΜΚΠ. Νεοεπικουρική χημειοθεραπεία επιλέγεται για να μειώσει το φορτίο της νόσου.

Σήμερα η θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα αποτελεί μεγάλο ερευνητικό πεδίο με νέα πιο αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα να έρχονται στη διάθεση των ασθενών και των ογκολόγων θεραπειών. Πλέον η θεραπεία φαίνεται σιγά σιγά να ωθείται, καθοδηγούμενη από τις εξελίξεις, προς την εξατομικευμένη στοχευμένη θεραπεία όπου η ιδιαιτερότητα του κάθε ασθενή και το γενωμικό και

μοριακό του προφίλ θα χρησιμοποιούνται για να αποφασισθεί η σωστή θεραπευτική προσέγγιση.

Σε αυτό τον τομέα ο ογκολόγος θεραπευτής με όλη την ομάδα συνεργατών ιατρών και συνεργαζόμενων ειδικοτήτων προχωρά πάντα συνυπολογίζοντας τα λοιπά συνοδά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τον ασθενή σε ότι αφορά λοιπές παθολογίες και την ψυχολογία του ασθενούς. Μόρια εξειδικευμένα έναντι άλλων μοριακών δομών έχουν ήδη ξεκινήσει να αναπτύσσονται, ενώ στοχευμένα φάρμακα ενάντια σε μεταλλαγμένα μοριακά μονοπάτια είναι ήδη στην αγορά. Μερικά από αυτά αποτελούν μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν μεμβρανικούς υποδοχείς, άλλα αποτελούν αναστολείς της αγγειογένεσης ενώ παράγοντες ή μέθοδοι γονιδιακής θεραπείας θα βρεθούν στο προσκήνιο της θεραπευτικής ογκολογίας. (Corrin B, 2006), (DeVita V, 2008)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ

2.1 Ορισμός της EMT και ιστορική αναδρομή

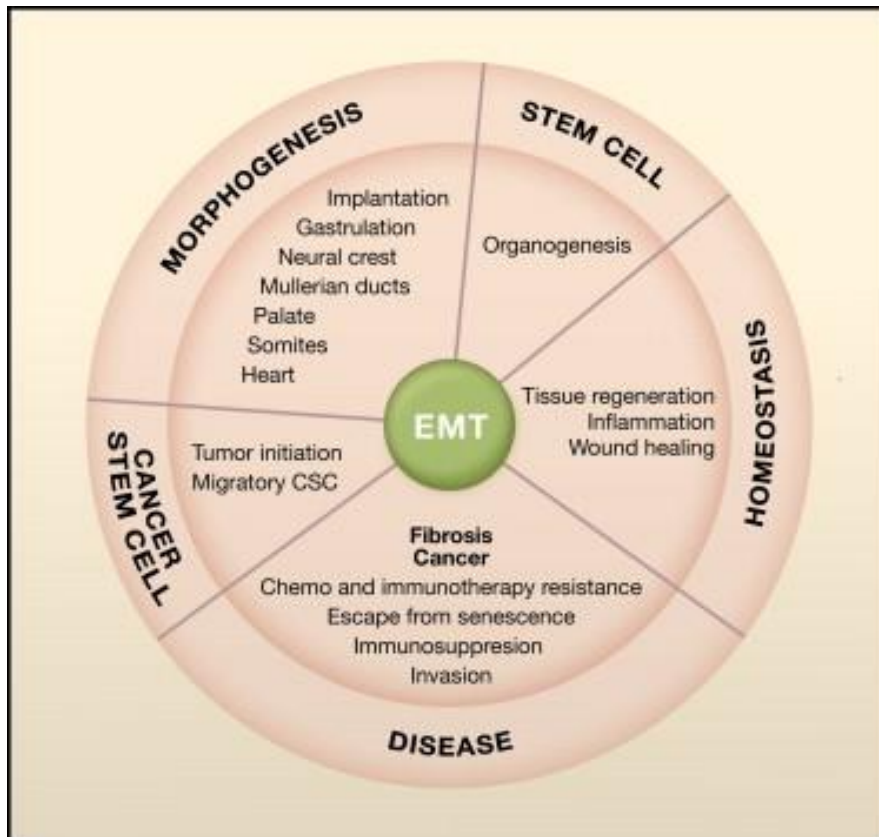
Η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) αποτελεί βιολογικό φαινόμενο κατά τη διάρκεια του οποίου επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τον φυσιολογικό τους προσανατολισμό και υπόκεινται σε σειρά βιοχημικών αλλαγών οι οποίες ωθούν τα κύτταρα αυτά να προσλάβουν μεσεγχυματικό φαινότυπο. Αυτό σημαίνει βελτιωμένη και αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης, διήθησης, αύξηση της παραγωγής συστατικών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) καθώς επίσης και αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση. (Kalluri R, 2009)

Πρόκειται για αναστρέψιμο, υπό καθορισμένες βιολογικές συνθήκες, φαινόμενο με πρωτοπόρο ερευνητή να το περιγράφει την κ. Hay Elizabeth et al. το 1968 και να εδραιώνεται μαζί με σημαντικούς ερευνητές, όπως ο P Thiery, R Kalluri και άλλους, ως τους κύριους επιστήμονες με σημαντική ερευνητική μελέτη πάνω στην EMT. Σήμερα είναι γνωστό ότι, η αναστρέψιμη φύση του φαινομένου αντικατοπτρίζεται στην πλαστικότητα που έχει το επιθηλιακό κύτταρο ώστε να μετατρέπεται σε μεσεγχυματικό και να μπορεί να επιστρέφει υπό ορισμένες συνθήκες ξανά στον επιθηλιακό φαινότυπο. (Lim J, 2012), (Acloque H, 2008)

Η EMT, έχει πλέον αποδειχθεί ότι, διαδραματίζει βασικής σημασίας ρόλο στην εμβρυογένεση. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν γίνει για την έρευνα και ταυτοποίηση των βιοχημικών μηχανισμών που τίθενται σε λειτουργία κατά τη διάρκεια, ή και μετά τη γαστριδίωση του εμβρύου. Φαίνεται να υπάρχει συμφωνία στην επιστημονική κοινότητα για το διαχωρισμό της EMT σε τρεις καλά διαχωρισμένες κατηγορίες. Στον ενήλικο άνθρωπο το φαινόμενο αυτό έχει φυσιολογικό ρόλο στην επούλωση των τραυματισμών αλλά το συναντούμε και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. (Kalluri R, 2009)

Η ίνωση είναι μια από τις παθολογικές καταστάσεις που τελευταία βρίσκεται στο στόχαστρο των επιστημόνων του χώρου. Για παράδειγμα σε EMT αποδίδεται μια βασική επιπλοκή της μακροχρόνιας διάλυσης των νεφροπαθών η οποία σχετίζεται με την δημιουργία μεσοθηλιακού στρώματος το οποίο περιβάλλει το περιτόναιο και εμποδίζει την περεταίρω αποτελεσματική διάλυση. (Goulioumis.A, 2005) Η EMT επίσης ολοένα και περισσότερο ενοχοποιείται σε συγκεκριμένα στάδια του διηθητικού και μεταστατικού καρκινικού φαινότυπου αποτελώντας ένα μεγάλο και ενδιαφέρων ερευνητικό πεδίο στον τομέα της μοριακής ογκολογίας.

Σε EMT αποδίδεται από πολλούς ερευνητές η απόκτηση χημειόαντοχων κυτταρικών ομάδων μέσα σε ένα όγκο καθώς επίσης και η απόκτηση χαρακτηριστικών αρχέγονων καρκινικών κυττάρων από τα ίδια, ή άλλα κύτταρα του όγκου. Όπως θα δειχθεί πιο μετά, αυτές οι δύο ιδιότητες αποτελούν μεγίστης σημασίας εφόδια για την ικανότητα του όγκου να διαφεύγει από την κυτταροτοξικότητα διαφόρων χημειοθεραπευτικών αλλά και να αποκτά δυσμενέστερα προγνωστικά χαρακτηριστικά με αντίκτυπο στην συνολική επιβίωση του ασθενούς. (Thiery J.P, 2009)



Εικ.4 Ο κεντρικός ρόλος της EMT (Thiery J.P, 2009)

2.2 Η Φυσιολογία της επιθήλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής

Στην ενότητα αυτή θα γίνει μια προσπάθεια γενικής επισκόπησης των διαφόρων μηχανισμών που ελέγχουν την EMT. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα και σήμερα σε πολλούς από τους εν λόγω μηχανισμούς δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί με σαφήνεια ο λειτουργικός ρόλος τους και έτσι πολλά σημεία παραμένουν θολά.

Το φαινόμενο της EMT φαίνεται και αυτό να ελέγχεται ,όπως πολλές κυτταρικές λειτουργίες, από σήματα προερχόμενα από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον ,δηλαδή από στοιχεία της θεμέλιας ουσίας και ενεργοποιημένα κύτταρα του στρώματος. Το ίδιο το κύτταρο που από την άλλη μεριά υφίσταται τη μετατροπή είναι ικανό να τροποποιεί το περιβάλλον του ενεργοποιώντας το. (Goulioumis.A, 2005) (Weinberg.R, 2013)

- **Ο ρόλος των μεμβρανικών υποδοχέων και των συνδετών τους**

Σήμερα τα ερευνητικά εργαστήρια που μελετούν την EMT φαίνεται να συμφωνούν στο γεγονός ότι τυροσινοκινασικοί υποδοχείς όπως οι EGFR, FGFR, HGFR αποτελούν βασικούς εναρκτήριους παράγοντες αμέσως μόλις ενεργοποιηθούν από τους συνδέτες τους. Όπως είναι γνωστό οι RTKs με τη σειρά τους συνδέονται κυρίως με πρωτεΐνες G συνδεδεμένες με GTP καθώς και οικογένειες πρωτεϊνών ras,Rho,Rac οι οποίες μια φορά ενεργοποιημένες δίνουν έναρξη σε μοριακές οδούς όπως των MAPK,ή του PI3K.

Τα μόρια αυτά θα μεταδώσουν με τη σειρά τους σήματα μέχρι τον πυρήνα όπου μεταγραφικοί παράγοντες θα μεταγράψουν γονίδια όπως myc, fos, jun, είτε θα παρέμβουν στη λειτουργία των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, ασκώντας ρυθμιστικό ρόλο στα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον οι RTKs μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση μιας άλλης ομάδας κινασών src (Fyn, Yes) η οποία έχει φανεί ότι σχετίζεται με την αποδόμηση των δομών συνοχής του κυττάρου όπως οι αποφρακτικές ζώνες (zonulae occludentes) ,ζώνες πρόσφυσης (zonulae adherens), οι χασματικές συνάψεις (gap junctions) και τα ημιδεσμοσώματα, δεσμοσώματα ,τοπικές συνδέσεις αντίστοιχα (hemidesmosomes, desmosomes, focal adhesions). Όπως θα αναλυθεί πιο κάτω αυτές οι κυτταρικές δομές αποτελούνται από μόρια ακτίνης και ενδιάμεσα ινίδια καθώς επίσης καντχερίνες όπως η E-cadherin που η αποδόμηση τους διαδραματίζει σημείο αναφοράς στο φαινόμενο της EMT. (Goulioumis.A, 2005) (Le Bras Grégoire F, 2012)

- **TGF-b**

Ο TGF-b (transforming growth factor) ο οποίος ανήκει σε μια κατηγορία αυξητικών παραγόντων οι οποίοι εκκρίνονται από ποικιλία κυττάρων όπως τα επιθηλιακά και τα ενεργοποιημένα κύτταρα του στρώματος έχει ίσως έναν από τους σημαντικότερους ρόλους στην εξέλιξη του φαινομένου της EMT. Το χαρακτηριστικό του TGF-b είναι πως μπορεί να παρουσιάσει, ανάλογα με την περίπτωση τόσο ευοδωτική όσο και ανασταλτική δράση σε σχέση με τις νεοπλασματικές εξεργασίες. Στους φυσιολογικούς ιστούς η λειτουργία του εμποδίζει την ανάπτυξη νεοπλασιών οδηγώντας σε απόπτωση και σταθερότητα του γονιδιώματος.

Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης εμφανίζονται διαφορές στην έκφραση του TGF-b όπου η συνοδός κυτταρική απόκριση και η ενεργοποίηση των εξαρτώμενων μοριακών μονοπατιών οδηγεί υπέρ της προώθησης της κακοήθειας. Με δύο (I,II) διαμεμβρανικούς υποδοχείς σερίνης θρεονίνης κινάσης ο υποδοχέας TGF-bR μόλις ενεργοποιηθεί με τη σειρά του επιστρατεύει τα βασικά επιτελεστικά μόρια Smads πρώτα 6,7 τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν και με άλλες οδούς όπως αυτή του IFN-γ, TNF-α, NF-Κβ, EGF. Αμέσως μετά σε συνεργασία με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σταθεροποιούν συγκεκριμένους υποδοχείς, ενώνονται και ενεργοποιούν τους RSmads. Μόλις ενεργοποιηθούν μετά την ένωση τους αποδεσμεύονται από το παραπάνω σύμπλοκο, ενώνονται με το Smad 4 και μεταναστεύουν στον πυρήνα όπου διαντιδρούν με μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων μερικοί από τους οποίους ενισχύονται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του EMT όπως ο Snail, το Sip-1 και άλλοι που καταστέλλουν τον υποκινητή της E-cadherin. (Weinberg.R, 2013)

- **Το μοριακό μονοπάτι Wnt/b-catenin**

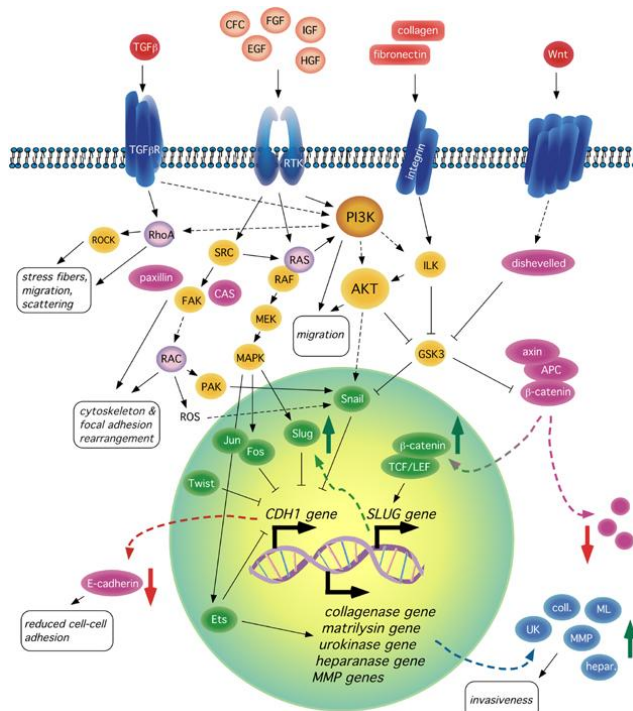
Άλλο ένα σημαντικό μονοπάτι ενεργοποίησης με βασικό ρόλο στην EMT όπου τελικό στόχο αποτελεί η αποδόμηση του βασικού μορίου των διαφόρων ζωνών πρόσφυσης, η β-κατενίνη, η οποία βρίσκεται ενωμένη με την E-cadherin με τα κυτταροσκελετικά ινίδια ακτίνης. Όταν η β-κατενίνη υπάρχει ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα οδηγεί σε ένωση με την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων TCF και στην συνέχεια ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων όπως αυτών που προωθούν την παραγωγή μεταλοπρωτεϊνών MMP, αλλά και cyclin-D1, Cox-2, c-myc, στοιχείων άμεσα σχετιζόμενων με την EMT. (Weinberg.R, 2013)

- **Το μονοπάτι των Ιντεγκρινών**

Το σημαντικό αυτό μονοπάτι αποτελεί αφετηρία για διάφορους ενδοκυττάριους μοριακούς καταράκτες. Σε αυτό το μονοπάτι εμπλέκονται από τη μία πρωτεΐνες της

οικογένειας Src κινασών και από την άλλη μόρια όπως το FAK. Το src μέσα από διαδοχικά βήματα ενεργοποιεί οικογένειες πρωτεϊνών όπως RhoGTPases, PAK, JNK και το σημαντικό NF-κB. Η FAK ενεργοποιεί οικογένειες όπως το PI3K, Akt/PKB, ή μονοπάτια όπως το ERK/MAPK τα οποία σε συνεργία με τους αυξητικούς παράγοντες ενεργοποιούν με τη σειρά τους μια πολύ σημαντική σερίνη-θρεονίνη κινάση την ILK. Πρόκειται για μόριο με κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι των Ιντεγκρινών και με τελική ρύθμιση σε πολλους παράγοντες που επηρεάζουν την EMT.

Τα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια μαζί με τα επιτελεστικά μόρια που ενεργοποιούν κάθε φορά ενδοεπικοινωνούν μεταξύ τους (cross talk) και πολλές φορές αλληλορυθμίζονται αναλόγως. Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα και σήμερα αν και έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη διαλεύκανση των μοριακών μονοπατιών με ανάδειξη της σημασίας ειδικά για την EMT μορίων όπως οι Rho GTPases, η σχέση MAPK με την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας και την κυτταρική κίνηση ή άλλων μορίων όπως το ras,src,PI3K είναι κατανοητό ότι υπάρχει δρόμος ακόμα μέχρι να διευκρινισθεί ποια είναι τα ακριβή αίτια ενεργοποίησης αυτών των μορίων αλλά και να έρθουν στο φως τα ακριβή μοριακά αποτελέσματα της ενεργοποίησης τους. (Goulioumis.A, 2005)



Εικ.5 Βασικοί μοριακοί μηχανισμοί της EMT (Larue L, 2005)

- **Η μεταγραφική ρύθμιση του EMT**

Όπως έγινε κατανοητό παραπάνω η συνήθης κατάληξη των περισσότερων σηματοδοτικών μονοπατιών αφορά τον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί θα αλληλεπιδράσουν με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων είτε με θετικό είτε με αρνητικό τρόπο δίνοντας έναρξη στο φαινοτυπικό αποτέλεσμα της EMT. Μέχρι σήμερα η έρευνα για την EMT έχει διαπιστώσει αρκετούς τέτοιους παράγοντες όπως οι: Snail,Slug,WT1,cfos-ER,cjun-ER,bcatenin/TCF,Zeb1,Zeb2 και άλλους όπως Twist,Klf-8,E47.

Ειδική μνεία θα πρέπει να γίνει για δύο κυρίαρχα μόρια στην EMT το Snail και το Slug. Τα δύο αυτά μόρια επιδρούν με το DNA ως πρωτεΐνες με μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger) και ενεργοποιούνται μέσω EGF,FGF ή και TGF-β. Το Snail από τη μία ευοδώνει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως της Vimentin, N-cadherin,Fibronectin,MMPs,RhoGTPases και καταστέλει γονίδια όπως αυτά της claudin ,occludin ,desmoplakin ,E-cadherin ,ενώ επικάθεται μαζί με το Slug και το Sip 1 ή το E12/E47,Twist στους υποκινητές της E-cadherin αναστέλλοντας την μεταγραφή της. (Goulioumis.A, 2005) (Weinberg.R, 2013)

- **Φαινοτυπικό αποτέλεσμα της EMT**

Όλα τα μοριακά γεγονότα που λαμβάνουν μέρος κατά την EMT έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του κυτταρικού φαινότυπου από επιθηλιακού τύπου σε μεσεγχυματικό. Το πρώτο σημαντικό γεγονός στο οποίο συνίσταται αυτή η τροποποίηση δεν είναι άλλο από την απώλεια συνοχής του επιθηλιακού κυττάρου με τα δίπλα γειτονικά κύτταρα. Το δεύτερο σημαντικό γεγονός είναι η τροποποίηση του κυτταροσκελετού και η απόκτηση δομών κυτταρικής κίνησης και μετανάστευσης. Σε αυτό το σημείο εμφανίζονται νέες πρωτεΐνες όπως η Vimentin, η N-cadherin και άλλες ενώ ξεκινά η παραγωγή MMPs. Το πλέον τροποποιημένο κύτταρο εκκρίνει αγγειογενετικούς και λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες ενώ αλληλεπιδρά διαρκώς (cross talk) με το μικροπεριβάλλον του τροποποιώντας το στρώμα μέσα στο οποίο κινείται.

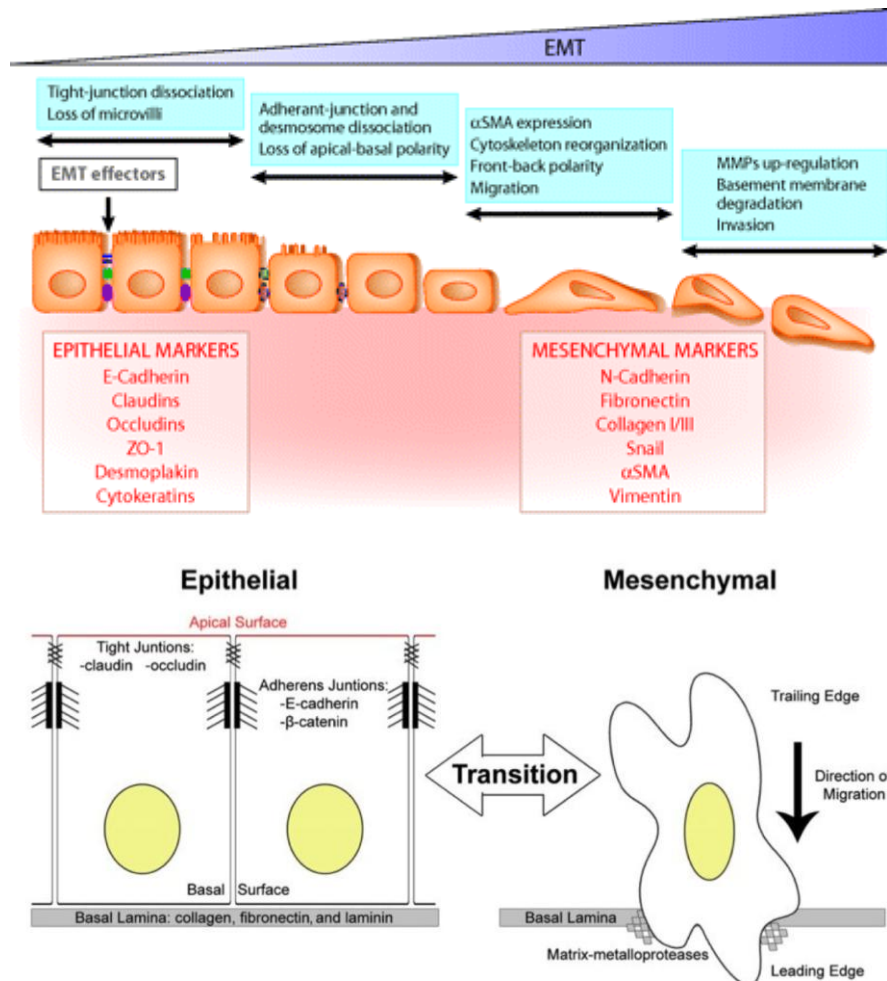
Πιο αναλυτικά, στο πρώτο μέρος η απώλεια των δομών συνοχής γίνεται με την αποκόλληση συνδέσεων κυττάρου-κυττάρου μέσω διαδοχικής απώλειας της E-cadherin από τις ζώνες πρόσφυσης και τα δεσμοσώματα. Η ελεύθερη β-κατενίνη στο κυτταρόπλασμα θα αυξήσει περαιτέρω την αρνητική ρύθμιση της E-cadherin και θα

προωθήσει ογκογονίδια όπως αυτά που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα c-myc, c-jun αλλά και πρωτεΐνες όπως η N-cadherin και άλλες. Μαζί με την β-κατενίνη πολλές φορές αποκολλάται και η p120-κατενίνη κυτταροπλασματική αύξηση της οποίας ρυθμίζει κατασταλτικά την RhoA που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση επιθηλιακού τύπου κυτταροσκελετικής αρχιτεκτονικής. Το κύτταρο αρχίζει λοιπόν να αναδιαμορφώνει τον φαινότυπο του. (Le Bras Grégoire F, 2012)

Μαζί με την αποκόλληση κυττάρου-κυττάρου ξεκινά και η αποκόλληση από τη βασική μεμβράνη αποδομώντας ημιδεσμοσώματα και γενικότερα δομών συνοχής λειτουργίες οι οποίες ρυθμίζονται από αύξηση της κυτταροπλασματικής src και καταστολή της Rho. Η επαγόμενη αύξηση της N-cadherin μέσα στο κυτταρόπλασμα έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του υποδοχέα FGFR χωρίς την παρουσία του συνδέτη και έτσι έχουμε συνεχή θετικό σήμα για την παραγωγή MMP και κυρίως MMP 9. Πλέον η αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού έχει ξεκινήσει και το κύτταρο αρχίζει να αποκτά δομές όπως φιλοπόδια (filopodia, lamellipodia) οι οποίες χαρακτηρίζονται από μειωμένη ακτίνη και αυξημένη μυοσίνη. (Le Bras Grégoire F, 2012), (Goulioumis.A, 2005)

Σε όλη αυτή την αλλαγή του φαινότυπου σημαντικό ρόλο θα διαδραματίσουν και μόρια όπως το CD44,CD43 αλλά και ICAM μορίων συνοχής βοηθώντας το πλέον μεσεγχυματικό κύτταρο να ξεκινήσει την κίνηση του. Αυτό το καταφέρνει θέτοντας σε συνεργία τις MMP κυρίως 2,3 και 9, για να λύσει τη BM να εισχωρήσει στο στρώμα και με τη συνεργασία του ευέλικτου πλέον κυτταροσκελετού, τη βοήθεια των MMP και άλλων λυτικών ενζύμων της θεμέλιας ουσίας, καθώς επίσης των ICAMs, προχωρά και μεταναστεύει μέσα στο στρώμα.

Υπο ορισμένες συνθήκες στην άφιξη του στο σημείο που θα έχει προκαθορίσει, το κύτταρο μπορεί να επιστρέψει στον επιθηλιακό του φαινότυπο. Επίσης εκτός από την μεταναστευτική του ικανότητα θα πρέπει να γίνει σαφές όπως θα αναλυθεί πιο μετά ότι το κύτταρο που έχει υποστεί EMT μπορεί και διαφεύγει την απόπτωση ενώ ταυτόχρονα αποκτά χημειοαντοχή σε διάφορες κυτταροτοξικές ενώσεις, στοιχεία τα οποία έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες να υποθέτουν μια κυτταρική φυσιογνωμία αρχέγονου κυττάρου. (Goulioumis.A, 2005), (Le Bras Grégoire F, 2012)



Εικ 6 Φαινοτυπικό αποτέλεσμα της EMT (Aroeira L, 2007) (Atala A, 2011)

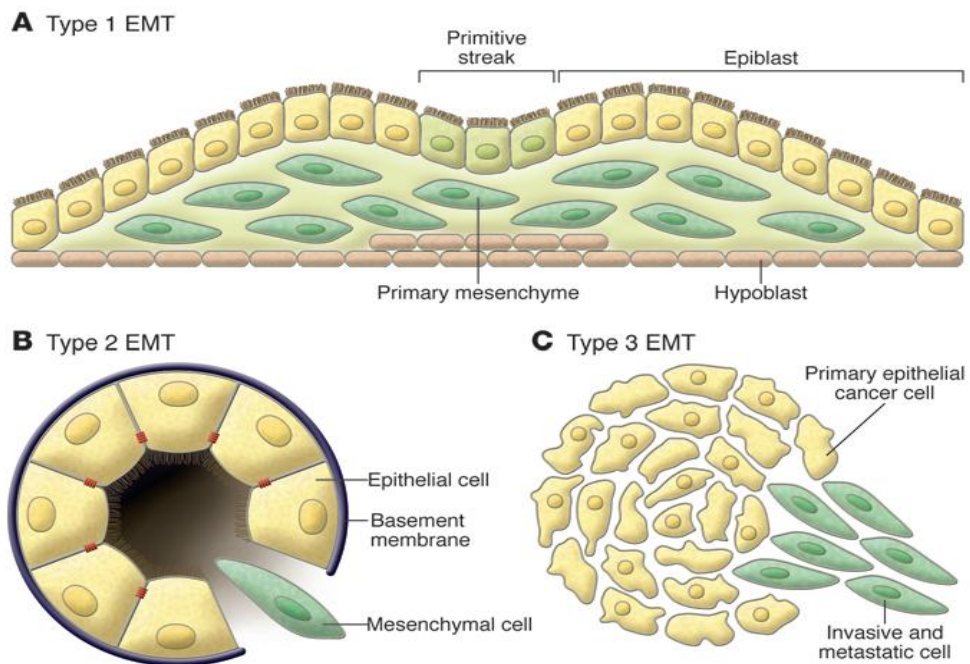
2.3 Ταξινόμηση της EMT

Η EMT συναντάται σε τρεις διαφορετικές βιολογικές καταστάσεις οι οποίες επιφέρουν διαφορετικά λειτουργικά αποτελέσματα. Το 2007 και το 2008 έγιναν συναντήσεις ειδικών ώστε να πραγματοποιηθεί μια προσπάθεια ταξινόμησης του φαινομένου στις παρακάτω κατηγορίες. (Kalluri R, 2009), (Acloque H, 2008)

Στην πρώτη κατηγορία τοποθετήθηκαν οι τύποι της EMT που συναντώνται στην εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου καθώς επίσης στη διάρκεια της οργανογένεσης στην εμβρυογένεση. Αυτή η κατηγορία EMT είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία κυττάρων με πολλά κοινά μεσεγχυματικών κυττάρων δημιουργώντας πρωτογενή μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να επιστρέφουν ξανά στον αρχικό φαινότυπο του επιθηλιακού κυττάρου απ'όπου ξεκίνησαν. Αυτή η κατηγορία δεν εμπλέκεται σε παθολογικά γεγονότα που θα εξετασθούν παρακάτω.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά την EMT η οποία σχετίζεται με την ιστική μετατραυματική αποκατάσταση και την ίνωση των οργάνων. Σε αυτή την κατηγορία οι μηχανισμοί της EMT ξεκινούν ως μέρος μιας γενικευμένης μετατραυματικής επούλωσης η οποία συνήθως συμβάλλει στην δημιουργία ινοβλαστικών κυτταρικών στοιχείων. Επίσης η δεύτερη κατηγορία συνδέεται με τη φλεγμονή, βαδίζει παράλληλα με αυτή, σε τέτοιο βαθμό που το τέλος του φλεγμονώδους συμβάντος σηματοδοτεί και το τέλος της EMT. Στην περίπτωση όμως της ινωτικής εκφύλισης των οργάνων, το φαινόμενο συνεχίζει να υφίσταται και ωθεί τα κύτταρα να εισέρχονται σε μία κατάσταση συνεχόμενης αλληλοενεργοποίησης με την υφιστάμενη φλεγμονή, οδηγώντας έτσι σε καταστροφή του οργάνου.

Στην τρίτη κατηγορία το φαινόμενο είναι άμεσα εμπλεκόμενο με την αλλαγή του φαινότυπου των νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία έχουν προηγουμένως υποστεί γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις κυρίως σε γονίδια τα οποία προωθούν την κλωνική ανάπτυξη και την δημιουργία εντοπισμένων όγκων. Τα νεοπλασματικά κύτταρα που υπόκεινται σε EMT τρίτης κατηγορίας έχουν την τάση να αλλάζουν φαινότυπο άλλα εξ' αυτών μερικώς, ενώ άλλα εξ' ολοκλήρου και έτσι μετατρέπονται σε κύτταρα με αυξημένο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό. Είναι ακόμα όμως σκοτεινά πολλά από τα ακριβή αίτια και μηχανισμοί που διέπουν την τρίτη κατηγορία και αναμένονται εξελίξεις στον ερευνητικό τομέα γύρω από την EMT.



Εικ.7 Τα τρία διαφορετικά είδη της EMT (Kalluri R, 2009)

2.3.1 Πρώτη κατηγορία.Φυσιολογική EMT.Εμβρυογένεση

Από τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, η εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου καθώς επίσης και η έναρξη της δημιουργίας του πλακούντα συνδέονται με φαινόμενα EMT, κατά τη διάρκεια των οποίων πρωταγωνιστούν κύτταρα του τοιχωματικού ενδοδέρματος. Τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος, πρόγονοι των κυτταροτροφοβλαστών εισχωρούν στο ενδομήτριο μετά από EMT. Οι μετατροπές αυτές καθώς και μετατροπές μεταγενέστερες στην περίοδο της οργανογένεσης του εμβρύου αποτελούν την EMT τύπου 1.

Η EMT τύπου 1 διακρίνεται σε δύο κατηγορίες με αρκετούς ερευνητές τελευταία να εισάγουν άλλη μία , υποκατηγορία της δεύτερης ουσιαστικά, την λεγόμενη EndEMT ή αλλιώς ενδοθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή. Η τελευταία λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια σχηματισμού αγγείων, ενδοθηλιακών κατασκευών και των βαλβίδων της καρδιάς από αγγειοβλαστικά στοιχεία που δημιουργήθηκαν με EMT τύπου 2 στην οργανογένεση του εμβρύου.

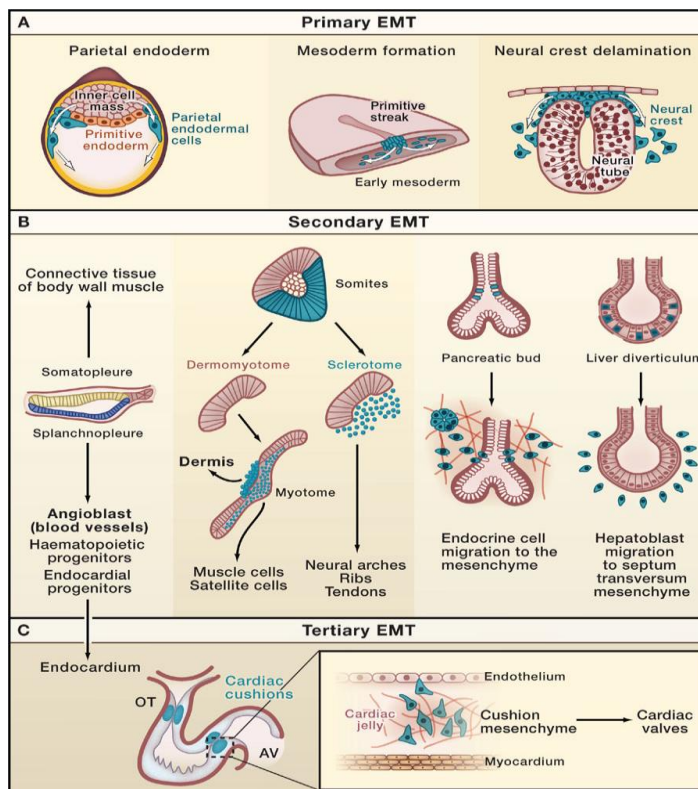
- **Κατηγορίες EMT τύπου 1**

Στην πρώτη κατηγορία EMT τύπου 1 ή αλλιώς πρωτογενή EMT τύπου 1, το γονιμοποιημένο ωάριο προχωρεί σε γαστριδίωση μετά την εμφύτευση του, δημιουργώντας τρία στρώματα βλαστικών κυττάρων. Η αρχική ταινία ξεκινά στο επιβλαστικό στρώμα και είναι ένδειξη έναρξης της γαστριδίωσης μάλιστα χαρακτηρίζεται από αυλάκωση στη μέση γραμμή του επιβλαστικού στρώματος. Εκεί τα επιθηλιακά κύτταρα εισέρχονται σε μια συνεχόμενη προγραμματισμένη διαδικασία μοριακών αλλαγών οι οποίες σχετίζονται με την ικανότητα μετανάστευσης και διαφοροποίησης. Μόλις σχηματιστεί , η αρχική ταινία , αρχίζει να εγκολπώνεται δημιουργώντας το μεσενδόδερμα το οποίο θα διαχωριστεί σε μεσόδερμα και ενδόδερμα μέσω πρωτογενούς EMT τύπου 1. Σε όλη τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τελείται αντικατάσταση των υποβλαστικών κυττάρων τα οποία πιθανά οδεύουν σε απόπτωση ή συμμετέχουν στην δημιουργία του μεσοδέρματος πάλι μέσω μηχανισμού πρωτογενούς EMT τύπου 1. Το εμβρυϊκό μεσόδερμα που σχηματίζεται μεταξύ επιβλαστικού και υποβλαστικού στρώματος θα δώσει το πρωτογενές μεσέγχυμα που συνδέεται με τη δημιουργία της αξονικής, παρααξονικής διάμεσης και πλευρικής μεσοδερμικής πλάκας. Τα κύτταρα αυτού του στρώματος εμφανίζουν αυξημένες μεταναστευτικές ιδιότητες αν συγκριθούν με κύτταρα του επιβλαστικού ή του υποβλαστικού στρώματος. (Kalluri R, 2009), (Lim

J, 2012) Πρωτογενή EMT τύπου 1 συνατούμε και κατά τη διάρκεια σχηματισμού και μετανάστευσης κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας η οποία θα δώσει γένεση σε κύτταρα που θα διανεμηθούν σε διάφορα μέρη του εμβρύου και θα υποστούν διαφοροποίηση. Σημαντικός αντιπρόσωπος αυτών των κυττάρων είναι τα μελανοκύτταρα.

Δευτερογενή EMT τύπου 1 συναντάται στο στάδιο μετά τη γαστριδίωση όπου έχει ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των τριών στρωμάτων δηλαδή του εξωδέρματος, του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος και έχουμε πλέον την απαρχή της οργανογένεσης στο έμβρυο. Έτσι, φαινόμενα δευτερογενούς EMT τύπου 1 θα έχουμε στη δημιουργία του συνδετικού ιστού και των μυών από το σωματοπλευρικό μεσόδεσμα ενώ από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδεσμα θα έχουμε το σχηματισμό αγγειοβλαστικών στοιχείων που θα δώσουν γένεση σε αγγεία και καρδιά μέσω τριτογενούς EMT τύπου 1 ή EndEMT που προαναφέρθηκε. (Lim J, 2012)

Άλλες λειτουργίες της δευτερογενούς EMT τύπου 1 είναι η δημιουργία σομιτών και εν συνεχεία μέσω σχηματισμού των δερματομίων και σκληροτομίων η οργανογένεση των διαφόρων δερματικών και ερειστικών στοιχείων του ανθρωπίνου σώματος. Τέλος, η ενδοδερματική οργανογένεση των παρεγχυματικών οργάνων φαίνεται και αυτή να συνδέεται με γεγονότα δευτερογενούς EMT τύπου 1. (Kalluri R, 2009)



Εικ.8 Τρεις κατηγορίες EMT τύπου 1 (Thiery J.P, 2009)

- **Μοριακά γεγονότα κατά τη διάρκεια EMT τύπου 1**

Σε μοριακό επίπεδο η πρωτογενής EMT 1 συνδέεται κυρίως με συνεχή, φυσιολογική όμως, σηματοδότηση Wnt με τον frizzled υποδοχέα του και το Wnt/Apc/b-catenin μονοπάτι. Είναι αξιοσημείωτο ότι γονιμοποιημένα ωάρια με δυσλειτουργικά ή ελλατωματικά μονοπάτια Wnt δεν μπορούν να ξεκινήσουν γαστριδίωση. Σημαντικές πρωτεΐνες της υπεροικογένειας πρωτεϊνών του TGF-β, όπως η Nodal και η Vg 1 ρυθμίζουν τα Wnts και η λάθος λειτουργία τους οδηγεί σε μεσοδερμικές απώλειες κατά την οργανογένεση.

Από τα σηματοδοτικά μόρια, πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο ειδικά στην πρωτογενή EMT 1 παίζει ο FGF ενώ τα Snail, Eomes, Mesps τα οποία αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες έχουν κεντρικό ρόλο στην ενορχήστρωση της μετατροπής όπως αναλύθηκε και στην προηγούμενη ενότητα. Καινούργιες μελέτες αναδεικνύουν γονίδια που εμπλέκονται στην κωδικοποίηση πρωτεϊνών κυτταροσκελετού όπως τα Dlg, Crumbs3 και άλλα.

Στη δευτερογενή EMT 1 πάλι συναντάμε το Sox, Snail, Slug, FoxD3. Μονοπάτια κι εδώ πάλι του Wnt, FGF, BMPs, c-myc, msx-1. Το BMP φαίνεται να αποτελεί βασικής σημασίας μόριο στην προώθηση των μεταναστευτικών ιδιοτήτων της νευριδιακής ακρολοφίας ενώ τελευταία έχει δειχθεί ότι πρωτεϊνικοί αναστολείς όπως η Noggin μπορούν να σταματήσουν την EMT. Στην τριτογενή EMT 1 όπως και στην EndEMT τα μοριακά γεγονότα είναι παρόμοια ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι αποτελούν τύπο EMT 1 που συνεχίζεται μέχρι τα τελευταία στάδια της οργανογένεσης. (Kalluri R, 2009)

2.3.2 Δεύτερη κατηγορία. Φυσιολογική EMT. Ιστική επούλωση

Εκτός από τους μηχανισμούς της εμβρυογένεσης το φαινόμενο της EMT το συναντάμε και στην ιστική αποκατάσταση των διαφόρων τραυματισμών. Στην περίπτωση αυτή κερατινοκύτταρα στο χείλος της τραυματισμένης περιοχής φαίνεται να αποκτούν εν μέρει ένα ενδιάμεσο κυτταρικό φαινότυπο ο οποίος επιτρέπει να μετακινηθούν ενώ διατηρούν ακόμη χαλαρούς συνδέσμους μεταξύ τους.

Σε μελέτες που έχουν γίνει στο επουλωτικό μέτωπο του ιστού βρέθηκε ότι το μόριο Snail 2 όπως έχει ήδη αναφερθεί κατέχει βασικό ρυθμιστικό ρόλο και η όποια προσπάθεια καταστολής του ανέκοπτε ή και σταματούσε οριστικά την ιστική

αποκατάσταση και την επούλωση. Απο την άλλη προσπάθειες υπερέκφρασης του ίδιου μορίου επιτάχυναν την επούλωση. (Thierry J.P, 2009), (Arnoux & al, 2005)

Σε άλλη μελέτη πειραματικά ποντίκια φανέρωσαν μια αλλαγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα FoxC2 μιας ογκοπρωτεΐνης που όπως φαίνεται ρυθμίζει την αποκατάσταση της ισχαιμικής βλάβης ενεργοποιώντας την EMT. Τελευταίες μελέτες εμπλέκουν το FoxC2 και στον διηθητικό φαινότυπο του καρκίνου μέσω EMT τύπου 3. (Hader C, 2010)

2.4 Παθολογική EMT

Πριν ξεκινήσουμε την επισκόπηση των παθολογικών τύπων της EMT θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε κυτταρικό επίπεδο οι παθολογικές EMT είναι παρόμοιες σε ότι αφορά τους μοριακούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς με τη φυσιολογική EMT. Αυτό είναι μια αξιόλογη πληροφορία μιας και η κατανόηση εις βάθος της φυσιολογίας της EMT μπορεί να ρίξει περαιτέρω φως στην ερευνητική παθολογία διαφόρων νοσημάτων και ιδιαίτερα των χρονίων εκφυλιστικών νοσημάτων και του καρκίνου.

2.4.1 Παθολογική EMT. Ίνωση

Η EMT αποτελεί σημαντικό εναρκτήριο γεγονός στις ινωτικές εκφυλιστικές διαδικασίες των οργάνων. Στους ινωτικούς ιστούς τα εκφυλιστικά φαινόμενα αποδιδόταν σε ενεργοποιημένους ινοβλάστες του ενδιάμεσου χώρου οι οποίοι μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες οι οποίοι με τη σειρά τους αθροίζονται και εκκρίνουν περίσσεια κολλαγόνου το οποίο εναποτίθεται στους ιστούς σε μορφή ινών με τελική κατάληξη την λειτουργική απώλεια , οδηγώντας σε λειτουργική ανεπάρκεια τελικά του ίδιου το όργανο. (Robbins S, 2010) (Goulioumis.A, 2005)

Διάφορες έρευνες φαίνεται να συνδέουν ένα μεγάλο μέρος της ενεργοποίησης των μυοϊνοβλαστών σε φαινόμενο EMT τύπου 2. Στον τομέα της ίνωσης έχουν μελετηθεί αρκετά μοντέλα όπως η ίνωση των νεφρικών σωληναρίων, το επιθήλιο του οφθαλμικού φακού, το ενδοθήλιο νεφρικών σωληναρίων, το ενδοθήλιο , η ίνωση σε ηπατοκύτταρα και καρδιομυοκύτταρα. Πολλές απο αυτές τις κυτταρικές καλλιέργειες φαίνεται να οδηγούνται σε ίνωση μετά από ενεργοποίηση του TGF-b. Άλλοι ερευνητές αποδείξανε ότι ιστοί εκτεθειμένοι σε TGF-b ή μέσω υπερέκφρασης μορίων του σηματοδοτικού του μονοπατιού όπως το BMP-7 ή το Snail-1 είναι ικανά να προωθήσουν την ινωτική διαδικασία. Απο την άλλη προσπάθειες αναστολής του TGF-b ή αντίστοιχα μόρια του σηματοδοτικού του μονοπατιού κατάφεραν να αποτρέψουν την ίνωση. (Zeisberg M, 2003)

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από την Ισπανία παρατήρησε ότι μεσοθηλιακά κύτταρα του περιτοναίου, μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά όταν ασθενείς υποβάλλονται σε περιτοναϊκή διάλυση με αποτέλεσμα, η μετά από χρόνια συνεχιζόμενη διάλυση να επιφέρει ίνωση και αδυναμία συνέχισης εφικτής ανακούφισης του ασθενούς. Σε αυτό το φαινόμενο της ίνωσης του περιτοναίου η ομάδα του Strippoli απέδειξε ότι εμπλέκεται η οδός των MAP κινασών με ενεργοποίηση του παράγοντα Snail-1 και επακόλουθη EMT τύπου 2. (Strippoli R, 2008)

Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της ίνωσης τα επίπεδα του TGF- β παραμένουν υψηλά κάτι το οποίο πιθανά να οφείλεται σε τραυματισμό, χρόνιο ερεθισμό ή κάποια παθολογική κατάσταση και δεδομένου ότι το Snail-1 δρά ως κύριος μεταδότης της βλαπτικής δράσης του TGF- β , ίσως η αναστολή του, αποτελεί θεραπευτικό στόχο της ίνωσης για πολλά όργανα. (Thiery J.P, 2009)

2.4.2 Παθολογική EMT.Καρκίνος

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο τύπος της EMT που παρατηρείται στον καρκίνο είναι ο τύπος 3. Σε πολλές μελέτες και πειραματικά μοντέλα ποντικών αποδεικνύεται ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν μεσεγχυματικούς δείκτες όπως α -SMA, FSP, Vimentin, Desmin και άλλα. Αυτά τα κύτταρα παρατηρούνται ιστολογικά κυρίως στο διηθητικό μέτωπο της πρωτοπαθούς εστίας και πιθανά είναι αυτά που θα προσδώσουν τον διηθητικό και μεταστατικό φαινότυπο στο νεόπλασμα.

Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα που έχουν υποστεί EMT με την απόκτηση μεταστατικού δυναμικού μεταφερόμενα στον τόπο της μετάστασης επαναμετατρέπονται μέσω MET σε κύτταρα επιθηλιακού τύπου. Αυτό το γεγονός έχει οδηγήσει τους ερευνητές να αξιολογήσουν την ικανότητα του μικροπεριβάλλοντος και την επικοινωνία του όγκου με αυτό.

Οι ακριβείς μηχανισμοί της EMT 3 δεν είναι ακόμα γνωστοί. Υπάρχουν υποθέσεις για το αν ο αρχικός σχηματισμός του κάθε νεοπλασματος μετά από γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις θέτει τα ίδια κύτταρα περισσότερο ευάλωτα σε σήματα που προωθούν την EMT. Για μια κόμη φορά συναντά κανείς σηματοδοτικούς αυξητικούς παράγοντες όπως ο HGF, FGF, EGF, PDGF και ο TGF- β . Ενώ και εδώ οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι αυτοί που ήδη έχουν εξετασθεί όπως Snail, Slug, Zeb1, Goosecoid, Twist, FoxC2. (Kalluri R, 2009)

Σηματοδοτικά μονοπάτια και εδώ αποτελούν το μονοπάτι των MAP κινασών υπερέκφραση του ERK, το PI3K/Akt, τα μονοπάτια που ξεκινούν από ενεργοποίηση του TGF- β , Wnt/b-catenin, τα μονοπάτια των Ιντεγκρινών με κύριες εκπροσώπους τις β 4, α 5 β 1 και α V β 6 ιντεγκρίνες και άλλα μονοπάτια όπως αυτά που ενεργοποιούν τον παράγοντα LEF με συνοδές μεταλλάξεις του Ras, Rho και άλλες.

EMT τύπου 3 μπορεί να προωθήσει η αποκοπή συνδέσεων κυτταροσκελετού, η ενεργοποίηση του TGF- β είτε μέσω του μονοπατιού των Smads είτε μέσω του ALK-5 υποδοχέα. Επίσης το μονοπάτι TGF- β /Smad/LEF/PDGF τελευταία αποκτά μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. (Kalluri R, 2009). Μεγάλη σημασία στην καρκινογένεση κατέχει το φλεγμονώδες φαινόμενο. Η φλεγμονή εκτός από την EMT τύπου 2 φαίνεται να συνδέεται και με την EMT τύπου 3 μέσω απενεργοποίησης του Smad από την Cox-2 γεγονός το οποίο αυξάνει την EMT η οποία συνεχίζει να προωθείται από τον TGF- β μέσω PGE-2 εξαρτώμενο μηχανισμό.

Για άλλη μια φορά και στην EMT 3 σημείο αναφοράς αποτελεί η απώλεια της E-καντχερίνης. Κι εδώ η αύξηση της β -κατενίνης στο κυτταρόπλασμα είναι δείκτης έναρξης EMT με επακόλουθη μετανάστευση στον πυρήνα όπου θα προσδεθεί στο σύμπλοκο tcf-lef καταστέλωντας τους εκκινητές μεταγραφής της E-καντχερίνης ακόμα περισσότερο. Επίσης Ειδική αναφορά θα πρέπει να γίνει για το ρόλο των microRNAs. Αυτά είναι μια ομάδα μικρών (1900 περίπου νουκλεοτιδίων) μη κωδικοποιούντων RNA μορίων τα οποία ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων μοριακών στόχων μέσω μηχανισμού ταιριάσματος βάσεων. Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι οικογένειες miRNAs όπως τα miRna 200 αναστέλουν την EMT προωθώντας ενδοκυττάρια αύξηση της E-καντχερίνης και μπλοκάροντας ταυτόχρονα τον Zeb1/Zeb2. Άλλες οικογένειες για παράδειγμα miRna 21 εμφανίζονται αυξημένες σε αρκετούς όγκους ταυτόχρονα με τον TGF- β . (Kalluri R, 2009) Όπως θα αναλυθεί και πιο κάτω η EMT τύπου 3 εξαρτάται από παράγοντες πολλοί από τους οποίους είναι άγνωστοι ακόμα. Συνεχίζονται να έρχονται στο φως ολοένα περισσότερα δεδομένα για τη σημασία των καρκινικών κυττάρων που έχουν μετράει μέσω EMT με επανεμφάνιση αρχέγονου καρκινικού φαινοτύπου και κατά πόσο αυτοί οι πληθυσμοί μέσα στον όγκο ευθύνονται για σημαντικά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των όγκων όπως η χημειοαντοχή και η κλωνικότητα στη μεταστατική εστία.

2.5 Μελλοντικές προοπτικές για την EMT

Στα περισσότερα ζωικά είδη ,η EMT διαδραματίζει βασικής σημασίας ρόλο σε διάφορα στάδια της οργανογένεσης και της μορφογένεσης του εμβρύου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Snail και Twist φαίνεται να αποτελούν ζωτικής σημασίας μόρια ρυθμιστές με αντίκτυπο την κυτταρική μορφή και τα πρώιμα στάδια της γαστριδίωσης στα ασπόνδυλα. Το Snail κυρίως αφορά τα σπονδυλωτά. Η νευριδιακή ακρολοφία αποτελεί και αυτή ενδιαφέρον πεδίο μελέτης με το Zeb2 αλλά και νέα μόρια υποψηφίους υπεύθυνους σε βασικές θέσεις σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το JmjD2A και WT-1. Αυτό ισχύει και για τους μηχανισμούς διήθησης και μετάστασης. Η καρδιακή μορφογένεση επίσης αποτελεί ερευνητικό πεδίο μελέτης το οποίο έχει αρχίσει να αποδίδει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς της EMT. (Lim J, 2012)

Όπως μπορεί να αντιληφθεί κανείς, η εμβάθυνση της γνώσης, των φυσιολογικών μηχανισμών της EMT και η ταυτοποίηση του γονιδιακού ρυθμιστικού δικτύου του φαινομένου, θα δώσει την ευκαιρία να μπορεί να μελετηθεί με περισσότερη ακρίβεια ο διηθητικός φαινότυπος του καρκίνου και η ίνωση των οργάνων και να επιτραπεί έτσι η ταυτοποίηση στοχευμένης θεραπείας έναντι μορίων στόχων του εν λόγω φαινομένου. (Thierry J.P, 2009)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΙ Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

3.1 Ενδείξεις επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής στα επιθηλιακά νεοπλάσματα του πνεύμονα.

Στις προηγούμενες ενότητες έγινε κατανοητό ότι η EMT αποτελεί δυναμικό και αναπτυξιακό βιολογικό φαινόμενο, το οποίο συναντάται στην εμβρυϊκή μορφογένεση, σε φυσιολογικές επουλωτικές διαδικασίες του οργανισμού αλλά και σε σημαντικές παθολογικές καταστάσεις όπως η ίνωση και ο καρκίνος. Η συσχέτιση EMT και προώθησης της καρκινόγενεσης έχει αποδειχθεί για πολλούς τύπους καρκίνου όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του παγκρέατος και του ήπατος. Για τον καρκίνο του πνεύμονα, ενώ η βιβλιογραφία τα προηγούμενα χρόνια ήταν φτωχή, κάτι ανάλογο δεν παρατηρείται σήμερα μιας και η ολοένα μεγαλύτερη ενασχόληση με τα ερευνητικά δεδομένα της EMT στο εν λόγω όργανο έχει ξεκινήσει να αποδίδει καρπούς. (Xiao D, 2010)

Στην αρχή της ενότητας αυτής έγινε αναφορά στην δυναμικότητα της EMT. Ακριβώς αυτή η δυναμική φύση του φαινομένου θέτει αρκετές δυσκολίες στην παρατήρηση του. Αυτό συμβαίνει για τρεις κυρίως λόγους: Ο πρώτος αφορά στη δυσκολία να ληφθούν συνεχείς βιοψίες από τον ίδιο ασθενή ώστε να τεκμηριωθεί η χρονική στιγμή της μετατροπής και να διαπιστωθεί το διαδοχικό πέρασμα από τον επιθηλιακό στον μεσεγγυματικό φαινότυπο. Ο δεύτερος λόγος αφορά την ταυτοποίηση των κυττάρων που έχουν υποστεί EMT μιας και αυτά είναι πολλές φορές δύσκολο να διαχωριστούν από τα ινοβλαστικά στοιχεία του όγκου. Τέλος η EMT ως δυναμικό φαινόμενο είναι δύσκολο να παρατηρηθεί *in vivo*. Αυτό οδήγησε πολλούς ερευνητές να χρησιμοποιούν κυρίως κυτταροκαλλιέργειες, κάτι το οποίο δέχθηκε πολλές κριτικές στο κατά πόσο η χρήση αυτών των καλλιεργειών

αντανακλούσε προσομοίωση της πραγματικότητας κυρίως σε ότι αφορά το στρωματικό μικροπεριβάλλον του όγκου. (Sato M, 2012)

Από τα παραπάνω στοιχεία γίνεται αντιληπτό ότι οι ερευνητές είχαν ανάγκη από ενδείξεις για την EMT στον πνεύμονα. Σε άλλους όγκους όπως του μαστού και του παχέος εντέρου υπήρχαν ήδη μελέτες για την παρατήρηση του φαινομένου *in vivo*. Με τη βιβλιογραφία ολοένα να αυξάνεται σε ότι αφορά τις νεότερες εξελίξεις στο πλαίσιο της EMT στον πνεύμονα, οι τομείς με περισσότερη επικέντρωση από τις επιστημονικές ομάδες αφορούν την απώλεια της E-καντχερίνης στο διηθητικό μέτωπο του καρκίνου, η επανεμφάνιση αρχέγονων κυτταρικών δεικτών, η φύση των εγγύς του όγκου μυοϊνοβλαστών, η ταυτοποίηση των ενδοκυττάρων miRNAs και άλλων μορίων με μείζονα σημασία στο φαινόμενο της EMT. Από τα μέχρι τώρα στοιχεία θα μπορούσε να παρατηρήσει κανείς ότι η απώλεια της E-καντχερίνης φαίνεται να συνδέεται με φτωχότερη πρόγνωση. Από την άλλη μεριά οι βιοδείκτες που ανακαλύπτονται σταδιακά δεν μπορούν να αποτελέσουν ειδικούς και ευαίσθητους βιοδείκτες για τον πνεύμονα διότι όπως είναι γνωστό σχεδόν σε όλες τις κακοήθειες επικρατεί πάντα ένας σχετικός βαθμός αποδιαφοροποίησης με άναρχη έκφραση διαφόρων ακόμα και αρχέγονων κυτταρικών δεικτών. (Xiao D, 2010) (Sato M, 2012)

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να αποδειχτεί η εμφάνιση EMT στον καρκίνο του πνεύμονα ήταν κατά πρώτον η απώλεια E-καντχερίνης στην περιφέρεια του όγκου, η απώλεια και της β-κατενίνης, με παράλληλη αύξηση της L1CAM και του Slug στο στρώμα του όγκου. Ταυτόχρονα η E-καντχερίνη ήταν παρούσα κεντρικά στον όγκο. Η δεύτερη απόδειξη ήρθε από μια παρα πολύ σημαντική δημοσίευση από την ομάδα του Sequist et al ο οποίος απέδειξε ότι ασθενείς με επιθηλιακό νεόπλασμα πνεύμονα και μετάλλαξη στον EGFR, στη θεραπεία τους με EGFR-TKI, όπως το erlotinib, ανέπτυξαν χημειοαντοχή μέσω EMT τύπου 3. Σε ότι αφορά την φύση των ινοβλαστικών στοιχείων και το αν οι καρκινικοί ινοβλάστες είναι στην ουσία επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί EMT εδώ οι απόψεις ακόμα διίστανται. Ενώ σε έρευνες για τον καρκίνο του μαστού έχει αποδειχθεί ότι μεγάλο μέρος των καρκινικών ινοβλαστών είναι επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί EMT, εντούτοις στον πνεύμονα μένει ακόμα να αποσαφηνιστεί αν αυτό ισχύει. (Sequist L, 2011)

Άλλες ενδείξεις για την EMT στον καρκίνο του πνεύμονα αναζήτησαν αποδείξεις επανεμφάνισης της E-καντχερίνης σε μεταστατικές εστίες από το εν λόγω

νεόπλασμα, κάτι που αποδεικνύει και την αναστρεψιμότητα του φαινομένου. Επίσης σε μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη σε πνευμονικούς όγκους όπως τα καρκινοσαρκώματα μετά από κυτταρογενετική ανάλυση για την μονοκλωνικότητα του όγκου, φάνηκε ότι ο εν μέρει μεσεγχυματικός φαινότυπος που κατέχουν αυτά τα νεοπλάσματα οφείλεται σε EMT τύπου 3. (Sato M, 2012)

Άλλη μελέτη παρουσιάζει κυτταροκαλλιέργειες A549 από όγκους πνεύμονα όπου η χρήση TGF-β σε αθανατοποιημένες σειρές ανθρώπινου βρογχικού επιθηλίου, μετά από χρήση παραγώγων καπνού προσέδιδε αρχέγονα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά οφειλόμενα σε EMT τύπου 3 (Sato M, 2012) , ενώ έρευνα έδειξε τη σημασία των miRNA 200 στην EMT όταν μελετήθηκε ως μόριο ρυθμιστής για την EMT σε κυτταροκαλλιέργειες από αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με μεταλλαγμένο και το KRAS και το p53. (Gibbons, 2009)

Όλα τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι η EMT τύπου 3 παρατηρείται και στον καρκίνο του πνεύμονα. Παρόλη την γενική αύξηση της έρευνας προς την κατεύθυνση της αποσαφήνισης του φαινομένου αυτού στον πνεύμονα , είναι αποδεκτό ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να διαλευκανθεί η σχέση της EMT με τα εν λόγω νεοπλάσματα. (Sato M, 2012)

3.2 Κυριότεροι μοριακοί μηχανισμοί της EMT στον καρκίνο του πνεύμονα

Η επισκόπηση των γενικών μηχανισμών της καρκινογένεσης στον πνεύμονα καθώς επίσης και της φυσιολογίας της EMT ανέδειξε την πολύπλοκότητα του φαινομένου. Οι μέχρι τώρα έρευνες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η EMT τύπου 1 και 3 ομοιάζουν σε πολλά σημεία. Στον πνεύμονα φαίνεται να ισχύουν τα ίδια ακριβώς που ισχύουν σε κάθε άλλο όργανο σε ότι αφορά τους μηχανισμούς που ελέγχουν την EMT.

Σε αυτή και στην επόμενη παράγραφο θα γίνει μια αναφορά στους κυριότερους μοριακούς μηχανισμούς καθώς επίσης και στα κυριότερα μόρια επαγωγείς της EMT στον πνεύμονα. Είναι κατανοητό ότι οι μηχανισμοί και τα μόρια που θα αναφερθούν αποτελούν ένα μικρό αντιπροσωπευτικό δείγμα του συνόλου των παραγόντων που εμπλέκονται στην EMT και ότι για περαιτέρω ανάλυση ο αναγνώστης θα πρέπει να αναζητήσει ακόμα πιο εξειδικευμένη βιβλιογραφία και ειδικά συγγράματα όπου αναλύονται οι εν λόγω μηχανισμοί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

- **Ο ρόλος του TGF-β και των Smads**

Ο TGF-β αναλύθηκε και σε προηγούμενη ενότητα. Πρόκειται για κυτταροκίνη με πολλαπλές βιολογικές ιδιότητες και μεγάλη σημασία στην βιολογία του καρκίνου. Οι λειτουργίες του ποικίλλουν από την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την ανοσιακή απάντηση αποτελώντας έτσι ίσως το σημαντικότερο μόριο προωθητή της EMT. Εκκρίνεται στον πνεύμονα και από τα καρκινικά κύτταρα και από τα στρωματικά. (Sato M, 2012) Σε άλλη έρευνα φάνηκε ότι MMKP με μεταλλαγμένο K-ras και p-53 καταστέλλανε τον TGF-β έμμεσα καταστέλλοντας τα smads 2 και 3. Σημαντική μελέτη για τα MMKP έδειξε ότι η αποακετυλίωση των ιστονών, χαμήλωνε τα επίπεδα του TGF-β και η έκφραση του μπορούσε να επανέλθει με HDACI (αναστολείς της αποακετυλίωσης των ιστονών). (Halder SK, 2011) Σε άλλη μελέτη αναστολείς της αποακετυλίωσης των ιστονών HDACI σε όγκους με μεταλλαγμένο EGFR επανέφερε την E-καντχερίνη αναστέλλοντας την EMT. (Sato M, 2012) Η έρευνα πάνω στους αναστολείς HDACI φαίνεται ότι τα επόμενα χρόνια θα φέρει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τη ρύθμιση της EMT.

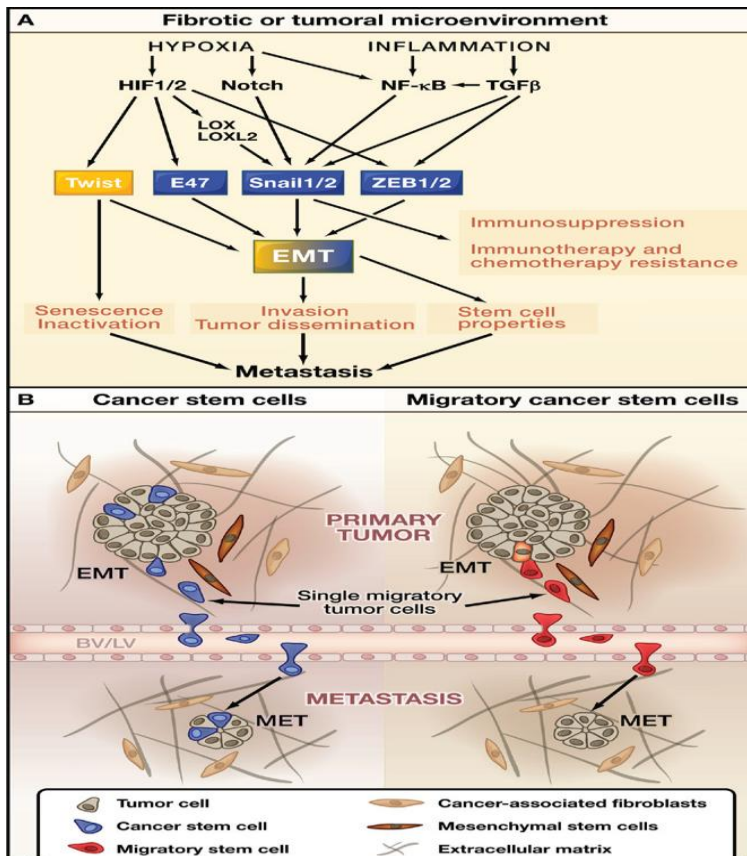
- **Cox-2 /PGE 2**

Η κυκλοξυγενάση 2 είναι ένζυμο το οποίο καταλύει την παραγωγή των προσταγλανδινών και των θρομβοξάνων από το αραχιδονικό οξύ, μόρια τα οποία κατέχουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή. Σήμερα υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η COX-2 προωθεί την ογκογένεση σε διάφορα όργανα δίνοντας αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αποφυγή της απόπτωσης και EMT. Στον καρκίνο του πνεύμονα είναι υπερεκφρασμένο όπως επίσης και στις προκακοήθειες βλάβες του εν λόγω οργάνου ενώ διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η αύξηση του COX-2 συνοδεύεται από φτωχή πρόγνωση. Στον πνεύμονα η EMT επάγεται από την COX-2 μέσω της PGE2, μείζονα μεταβολίτη της κυκλοξυγενάσης. Η PGE-2 έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την ανοσιακή απάντηση, αυξάνει την αντίσταση του κυττάρου στην απόπτωση και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε γενικές γραμμές η αύξηση της κυκλοξυγενάσης 2 συμβαδίζει με μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της E-καντχερίνης ενώ η PGE-2 συνοδεύεται από αύξηση της έκφρασης του Zeb-1, Snail. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η κυκλοξυγενάση 2 μπορεί

να προωθηθεί σε όγκους με μεταλλαγμένο p53, Kras και επίσης από τον TGF-β. (Sato M, 2012)

- **Υποξία**

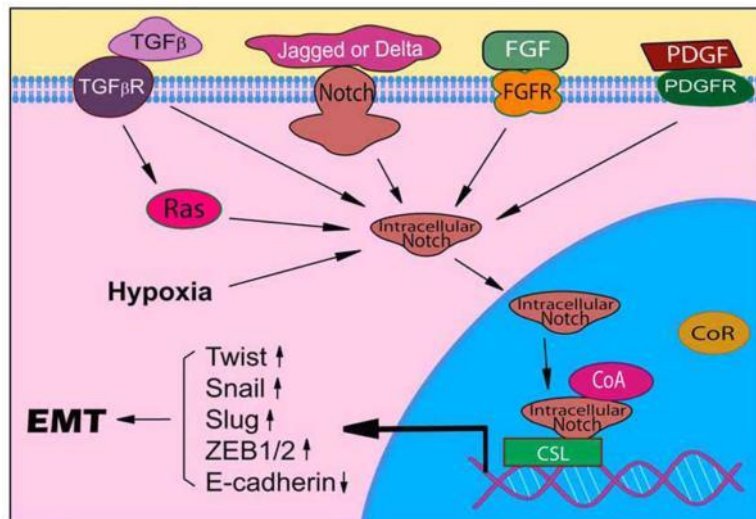
Περί το 50-60% των συμπαγών όγκων περιέχουν υποξικές ή και ανοξικές περιοχές οι οποίες προκύπτουν από υπερβολική κατανάλωση του οξυγόνου από τα κύτταρα του όγκου καθώς και φαινόμενα ανεπαρκούς αγγείωσης περιοχών ταχέως αναπτυσσόμενου όγκου. Η υποξία επάγει την EMT προβαίνοντας στη σταθεροποίηση μεταγραφικών παραγόντων με μοτίβο βάσης έλικα-αγκύλη-έλικα(bHLH), παραγόντων όπως οι HIF(1,2,3) αλλά και αναστέλλοντας ένζυμα όπως αυτό του VHL. Σε πρόσφατη έρευνα η αύξηση του HIF1a προκαλούσε αύξηση του Twist και επαγωγή της EMT. (Sato M, 2012) (Salnikow A, 2012) Άλλη έρευνα έδειξε ότι όταν ο HIF 2a διαντιδρούσε με τη ras ογκοπρωτεΐνη τότε προωθούσε την EMT (Kim WY, 2009) Τέλος η υποξία κυρίως μέσω HIF 2a όπως θα αναλυθεί και πιο κάτω μπορεί να προσδώσει μέσω φαινόμενου EMT αρχέγονα χαρακτηριστικά στο κύτταρο. (Xu Yuan, 2012)



Εικ9. Η υποξία και η φλεγμονή στην EMT και τη MET (Thiery J.P, 2009)

- **Notch**

Τα Notch αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Notch 1-4) , τα οποία ρυθμίζουν βασικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες από τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης μέχρι την ενηλικίωση. Οι υποδοχείς Notch που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι Notch 1 και 3. Εκτός από τα MMKΠ έχει αποδειχθεί ότι ο Notch 1 ενοχοποιείται και στον MKΠ. (Galluzzo P, 2011) Ειδικά για αυτό τον υποδοχέα μελέτη δείχνει ότι συμμετέχει στην επαγωγή της EMT. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές οι οποίες απέκτησαν χημειοαντοχή στους αναστολείς του EGFR και φάνηκε ότι μαζί με την απόκτηση χημειοαντοχής που οφειλόταν σε EMT ταυτόχρονα εξέφραζαν υψηλά επίπεδα Notch 1. (Xie M, 2012)



Εικ10. Διάφορες λειτουργίες του υποδοχέα Notch (Wang Z, 2010)

- **WNT**

Ήδη σε προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκε η βασική σημασία αυτού του μονοπατιού στην καρκινογένεση και ειδικότερα στην EMT. Τα Wnts αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια εκκρινόμενων γλυκοζυλιωμένων προσδετών οι οποίοι εκφράζονται σε μεγάλη ποικιλία ιστών. Εκτός από την καρκινογένεση η έκφραση τους αποτελεί σημείο αναφοράς στην εμβρυογένεση μιας και όπως αναλύθηκε η λανθασμένη έκφραση κάποιων από τα Wnts σε σημεία κλειδιά της εμβρυϊκής περιόδου μπορεί να οδηγήσει σε μορφολογικές ανωμαλίες του εμβρύου. Τρία κύρια μονοπάτια αποτελούν τη σηματοδότηση του Wnt. Ένα επονομαζόμενο κανονικό το οποίο χρησιμοποιεί τη β-κατενίνη και δύο μη κανονικά που μπορούν να φτάσουν

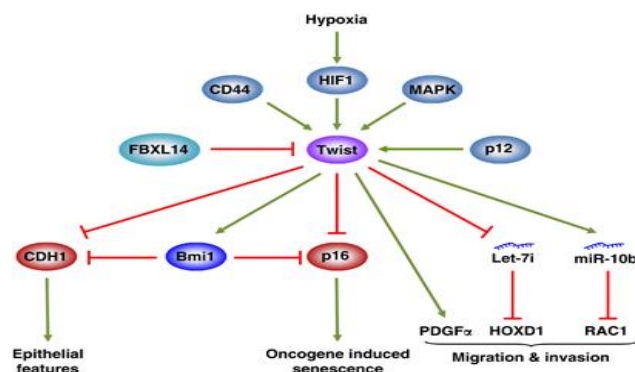
στα γονίδια στόχους χωρίς την οδό της β-κατενίνης.Ενώ οι ερευνητές του φαινομένου της EMT ανέμεναν με ενθουσιασμό κάποιες λεπτομέρειες που θα συμπεριλάμβαναν και αυτό το μονοπάτι στην παθογένεση της EMT παρόλα αυτά δεν φάνηκε τουλάχιστον ακόμα να εμπλέκεται με κάποιο τρόπο το Wnt με την EMT τύπου 3 στον πνεύμονα.Παρά την αποδεδειγμένη σημασία του Wnt στην EMT τύπου 1 και 2,ακόμα δεν έχει ξεκαθαριστεί ποιος είναι ο ρόλος του στην EMT 3 τουλάχιστον όσον αφορά τον πνεύμονα.Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι δεν μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια αν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της β-κατενίνης ρυθμίζεται μόνο από το Wnt ή και από άλλα μόρια σε ότι αφορά την καρκινογένεση στον πνεύμονα. (Konigshoff M, 2009)

3.3 Κυριότεροι επαγωγείς της EMT στον καρκίνο του πνεύμονα

Όπως στην προηγούμενη παράγραφο ,έτσι και εδώ θα πλοηγηθούμε επιλεκτικά στους κυριότερους εκπροσώπους επαγωγείς της EMT. Πρόκειται για μόρια, ογκογονίδια ή ογκοπρωτεΐνες καθώς επίσης και μικρο-μόρια αντιπερισπασμού στο κύτταρο όπως τα miRNAs με σημαντικές λειτουργίες όπως θα αναλυθεί πιο κάτω.

- **Twist**

Ήδη από το 1989 είχε παρατηρηθεί η δράση του Twist κατά την εμβρυογένεση της Drosophila.Το μόριο Twist αποτελεί πρωτεϊνικό μεταγραφικό παράγοντα με διάταξη έλικας-αγκύλης-έλικας ο οποίος διαδραματίζει βασικό ρόλο στην καρκινογένεση και ιδιαίτερα στη μετατροπή EMT (Jang J, 2004).Ειδικότερα στον πνεύμονα,μετά από μελέτες φάνηκε ότι η έκτοπη έκφραση του Twist προσδίδει στο καρκινικό κύτταρο του πνεύμονα μεταναστευτικές ικανότητες και διηθητικό φαινότυπο σε εκείνα τα κύτταρα που πριν είχαν χαμηλή συγκέντρωση του ίδιου παράγοντα. (Sakamoto K, 2010)



Εικ11. Η πρωτεΐνη Twist (Zheng H, 2013)

- **Snail**

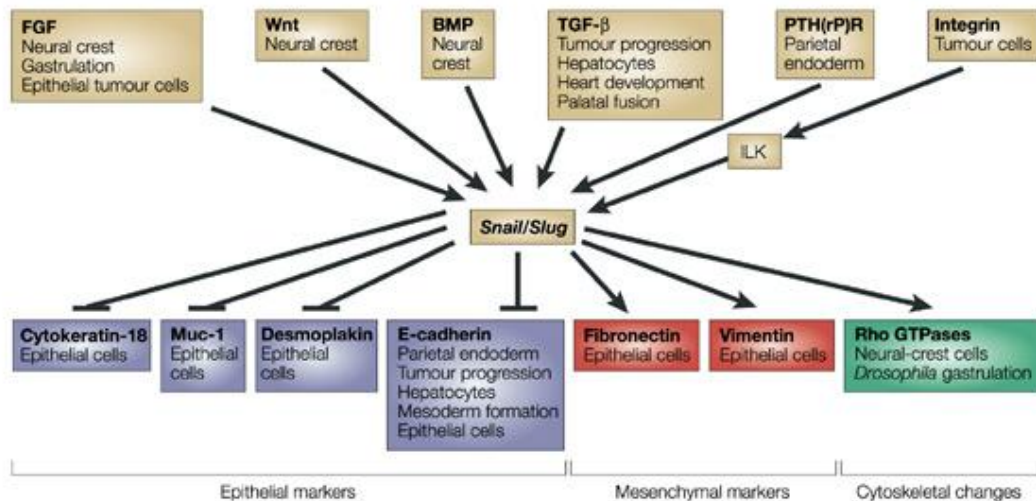
Ο μεταγραφικός παράγοντας Snail ανήκει σε ομάδα πρωτεϊνών τύπου δακτυλίου ψευδαργύρου. Όπως προαναφέρθηκε, ο Snail έχει και αυτός βασικό ρόλο στην EMT, καθώς μειώνει την έκφραση της E-καντχερίνης, ενώ αυξάνει τις MMP όπως λόγω χάρη η MMP-9. Επίσης, ο Snail έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση πρωτεϊνών ζωνών πρόσφυσης, όπως οι Claudin, Occludins και άλλες. Απο τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι ο Snail ίσως είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστής γονιδίων από όσους εμπλέκονται στο φαινόμενο της EMT επηρεάζοντας την αποπτωτική ικανότητα του κυττάρου και την κυτταρική κίνηση. Ίσως γι αυτό, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων.

Ειδικά στον καρκίνο του πνεύμονα φάνηκε μεγαλύτερη θετικότητα του Snail στο ΜΚΠ σε σχέση με το ΜΜΚΠ, ενώ στο τελευταίο αποδείχθηκε περισσότερο θετικός στο πλακώδες καρκίνωμα. (Sato M, 2012) Οι ερευνητές της ομάδας Merikalio et al, προτείνουν ότι μία στόχευση του Snail ίσως να είχε ευεργητικά αποτελέσματα. (Merikalio H, 2012) Σε άλλη μελέτη, ερευνητές επιμόλυναν κυτταροκαλλιέργειες όγκου πνεύμονα ΜΜΚΠ, ώστε να εκφράσουν τον Snail και παρατήρησαν την σχεδόν άμεση καταστολή της E-καντχερίνης στα κύτταρα. (Yanagawa J, 2009)

- **Slug**

Πρόκειται για έναν από τους επαγωγείς με δεσπόζουσα θέση σε ότι αφορά τη ρύθμιση της EMT και ένα από τα πρώτα μόρια ρυθμιστές της EMT που συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών. Σε μελέτες που έγιναν σε κυτταροκαλλιέργειες όγκων ΜΜΚΠ σε διάφορα στάδια διήθησης, φάνηκε ότι σε εκείνες τις σειρές όπου υπήρχε μεγαλύτερη διήθηση και επιθετικότητα του καρκίνου, εκεί το Slug ήταν υπερεκφρασμένο.

Στην ίδια μελέτη το Slug φαινόταν να προωθεί την καρκινογένεση καθώς επίσης και την αγγειογένεση του όγκου. Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι με αυξανόμενο Slug προωθούνται αρχέγονα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και συνεκφραζόμενο με Oct4 και Nanog τότε η πρόγνωση των ασθενών ήταν φτωχή. (Sato M, 2012)

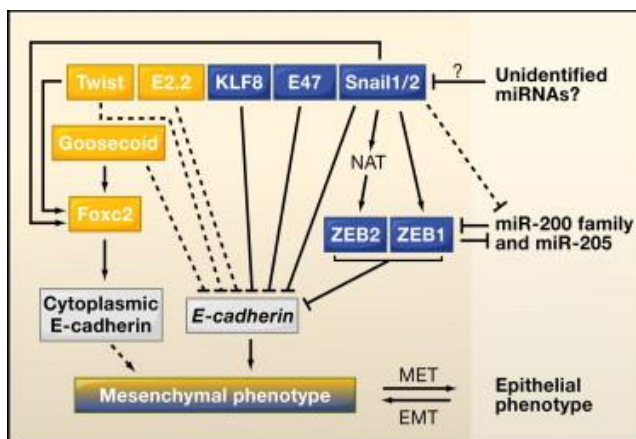


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικ. Εμπλεκόμενα ρυθμιστικά μόρια με αντίκτυπο στον Snail και στον Slug (Nieto, 2002)

- **Zeb1/Zeb2**

Οι Zeb1 και Sip1 ή Zeb2 είναι δύο μεταγραφικοί παράγοντες δακτύλων ψευδαργύρου τύπου E-box. Σε μια μελέτη δειγμάτων όγκων MMKΠ φάνηκε ότι ο Zeb1 συνεργεί στην ανάπτυξη όγκων πνεύμονα και αυτό επιβεβαιώθηκε πρόσφατα από μελέτη σε αθανатоποιημένες σειρές βρογχικού επιθηλίου, οι οποίες υπόκειντο σε EMT. Επίσης ο Zeb1 εκφράζονταν υψηλά, όταν ταυτόχρονα η ενδοκυττάρια E-καντχερίνη μειωνόταν. (Sato M, 2012) Κυρίως ο Zeb 1 συσχετίστηκε σε μία μελέτη με αύξηση της Βιμεντίνης ενός μεσεγχοματικού δείκτη χωρίς όμως να συμβαίνει και το αντίθετο δηλαδή η μείωση του Zeb1 να μειώνει ταυτόχρονα και την έκφραση της Βιμεντίνης. (Takeyama Y, 2010)



Εικ12. Ρόλος των Zeb1/Zeb2 (Thiery J.P, 2009)

Ένας από τους κύριους στόχους του Zeb είναι και η καταστολή της Semaphorin 3a μιας πρωτεΐνης η οποία ρυθμίζει την κυτταροσκελετική δομή μαζί με άλλες εξίσου σημαντικές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας ή τις plexins. Η σεμαφορίνη 3a είναι αποδεδειγμένα ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Η σεμαφορίνη 3a μειώνεται όταν ο Zeb1 αυξάνεται και υπήρχε ταυτόχρονη EMT. (Sato M, 2012) Ερευνητική εργασία με σκοπό την εξακρίβωση μιας άλλης σεμαφορίνης της 7a έδειξε ότι η τελευταία εμπλέκεται στη ρύθμιση του TGF- β μαζί με το ογκογονίδιο ras. Όταν υπερεκφραζόταν η Semaphorin 7a προωθούσε την EMT μέσω ενδοκυττάριας ενεργοποίησης του TGF- β πάντα σε συνεργία με το ras και τον ERF παράγοντα του μονοπατιού των MAPK. (Allegra M, 2012)

- **L1CAM/ β 2-microglobulin/collagen I**

Η L1CAM αποτελεί διακυττάριο μόριο προσκόλλησης το οποίο έχει δειχθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού ιστού καθώς επίσης και στην ογκογένεση. Σε σχέση με την EMT ήδη από το 2006 επιστήμονες απέδειξαν ότι η L1CAM ανευρίσκεται στο διηθητικό μέτωπο αρκετών όγκων και του πνευμονα συμπεριλαμβανομένου. Ο ρόλος της επικεντρώνεται στην αποσυγκόλληση της E-καντχερίνης από τις ζώνες πρόσφυσης και στην υποβοήθηση του κυττάρου ώστε να αποκτήσει μεσεγχυματικό φαινότυπο (Kiefel H, 2012)

Η β 2-μικροσφαιρίνη μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα με πυρήνα, μπορεί να προωθήσει την EMT αποδίδοντας μεταστατικό δυναμικό με στόχο κυρίως τα οστά. (Josson S, 2011) Η μελέτη αυτή, αναφέρεται κυρίως στους καρκίνους του προστάτη του μαστού και του πνεύμονα. Αυτό συμβαίνει με τρεις τρόπους Α) η β 2-M ελέγχει την EMT προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό την αποφυγή της απόπτωσης προκαλώντας οστικές μεταστάσεις σε πειραματικά ποντίκια. Β) Στο διηθητικό μέτωπο η β 2M προσδίδει στο κύτταρο μεσεγχυματικό φαινότυπο καταστέλλοντας την E-καντχερίνη και προωθώντας την N-καντχερίνη τη βιμεντίνη και άλλους μεσεγχυματικούς δείκτες. Γ) Διαντιδρά με τον υποδοχέα της HFE ο οποίος ελέγχει τον HIF παράγοντα υποξίας ο οποίος έχει αναλυθεί πιο πάνω σε ότι αφορά τη διένεξη του με την EMT. (Josson S, 2011)

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι το κολλαγόνο I μόριο της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας φαίνεται να προωθεί την EMT σε αρκετούς καρκίνους και στον

καρκίνο του πνεύμονα επάγοντας τη δράση του TGF-β3 μέσω αυτοκρινούς δράσης και πιθανά μέσω μονοπάτια των ιντεγκρινών (Shintani Y, 2007)

- **ROS**

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ασταθείς αντιδραστικές ενώσεις με ελεύθερα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου H_2O_2 ή το υπεροξειδικό ανιόν O_2^- και άλλες. Η παραγωγή αυτών των ουσιών γίνεται ενδοκυτταρικά από διάφορα αίτια όπως ιοντίζουσες ακτινοβολίες ή κυρίως από την αναπνευστική αλυσίδα. Επίσης, παραγωγή ROS μπορούμε να έχουμε από το αναγόμενο νικοτιναμίδιο NADPH από οξειδάσες ή μυελοπεροξειδάσες των ουδετερόφιλων.

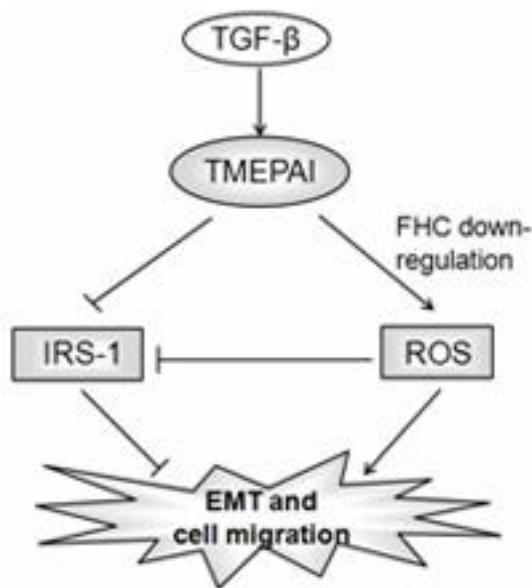
Μελέτες αποδεικνύουν ότι τα ROS προάγουν φαινόμενα EMT ,προωθώντας τη διήθηση και τη διαμόρφωση της ΕΘΟ όπως επίσης επηρεάζοντας την κυτταρική προσκόλληση αλλά και μια σειρά κυτταρικών μοριακών μονοπατιών. Ιδιαίτερα στον καρκίνο του πνεύμονα ερευνητές έχουν αποκαλύψει την επίδραση των ROS μέσω των MMP 3 ,οι οποίοι με τη σειρά τους προωθούν τη μεταγραφή παραγόντων όπως ο Rac-1b. Το τελευταίο μόριο με τη σειρά του προωθεί τη μεταγραφή παραγόντων όπως ο Snail, σημαντικός καταστολέας της E-καντχερίνης. (Dasari V, 2006)

- **TMEPAI**

Η προστατική διαμεμβρανική πρωτεΐνη επαγόμενη από ανδρογόνα [TMEPAI], πρόσφατα συσχετίστηκε με την EMT τύπου 3 σε ότι αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα. Ο μηχανισμός με τον οποίο φαίνεται να το πετυχαίνει είναι μέσω της καταστολής της βαρέας αλυσού της φεριττίνης και δυσλειτουργίας της ενζυμικής δραστηριότητας αυτού του αποτοξινωτικού ενζύμου. Αποτέλεσμα της καταστολής αυτής, είναι η συσσώρευση της ενδοκυττάριας φεριττίνης η οποία συνεπάγεται σε αύξηση ROS η οποία οδηγεί σε EMT. Ταυτόχρονα το TMEPAI καταστέλλει τον IRS-1 μαζί με τα ROS. (Hu Y, 2013)

Το IRS-1 είναι το υπόστρωμα του ινσουλινικού υποδοχέα το οποίο , μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων EGFR, προσδένεται σε SH-2 πεδία(περιοχές σερίνης θρεονίνης) και ενεργοποιεί αρκετά μονοπάτια ,όπως αυτό του PI3K και των

MAPK.Απο προηγούμενες μελέτες φαίνεται ότι το IRS-1 μπλοκάρει την EMT ,διατηρώντας υψηλά εκφραζόμενη την E-καντχερίνη.Μελέτες έδειξαν ότι η καταστολή του IRS-1 προωθούσε την EMT οδηγώντας τους ερευνητές να υποθέσουν ότι το TMEPAI θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό μοριακό στόχο στην θεραπευτική μοριακή ογκολογία. (Hu Y, 2013).Παρακάτω στην εικ. φαίνεται σχηματικά ο τρόπος με τον οποίο το TMEPAI επιδρά ρυθμίζοντας τα ROS και αναστέλλοντας τον IRS-1.Να σημειωθεί ότι ο TGF-b φαίνεται και εδώ να διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση του TMEPAI.



Εικ13. Η δράση του TMEPAI (Hu Y, 2013)

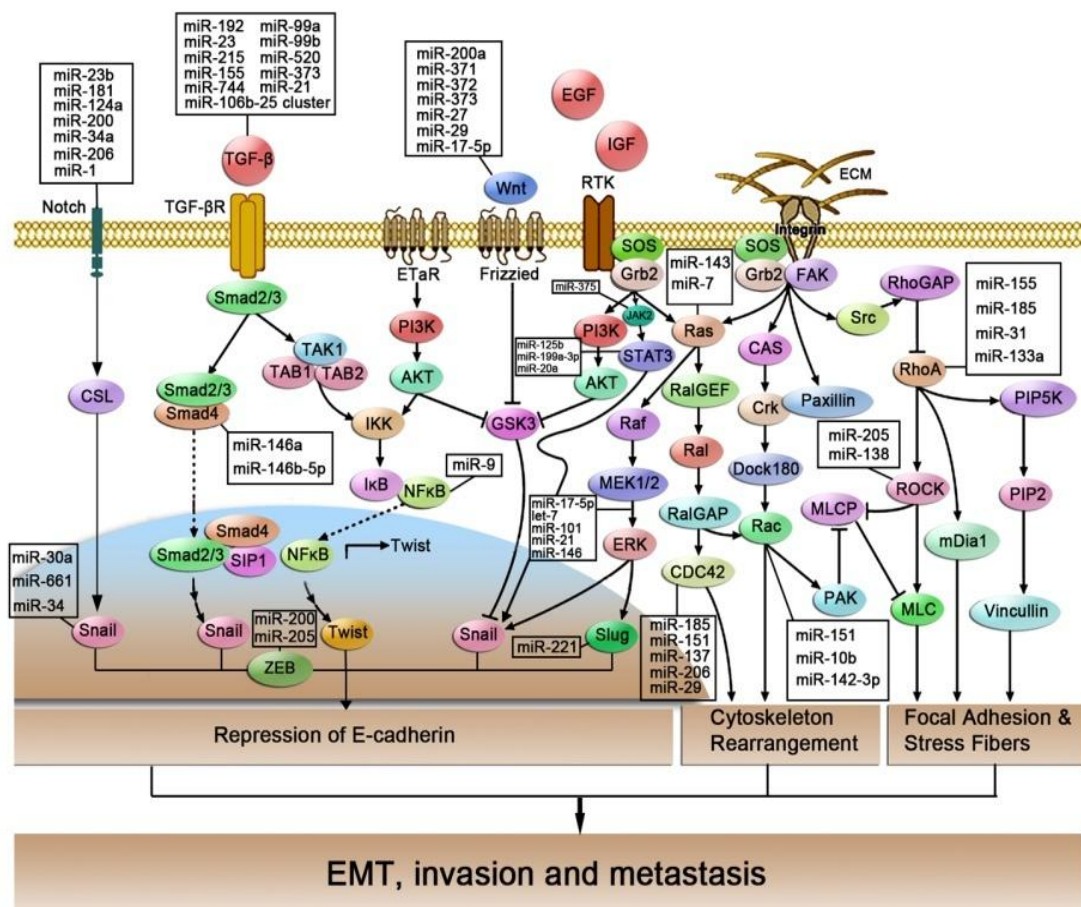
- **miRNAs**

Τα miRNAs είναι μικρά μόρια μη κωδικοποιημένου RNA τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η απορρύθμιση των miRNAs ισοδυναμεί με εμφάνιση διαφόρων νόσων στον άνθρωπο και το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τον καρκίνο. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 700 miRNAs. (Acloque H, 2008)

Νέες μελέτες (Yiang L, 2013) φερνουν στο φώς διάφορες οικογένειες miRNAs,που με συγκεκριμένους μηχανισμούς ρυθμίζουν την EMT. Έτσι, οικογένειες των miRNA 200 καταστέλλουν άμεσα τους zeb1/zeb2 και αυτόματα καταστέλλουν και την EMT. (Ceppi P, 2010) Ειδικότερα ακόμα έχει βρεθεί ότι τα miRNAs που καταστέλλουν την EMT και γενικότερα τον διηθητικό φαινότυπο και τη μετάσταση είναι: το 126 μέσω αναστολής του ογκογονιδίου Crk,το 21 μέσω

καταστολής του PTEN, το 125α-3p, το 200c, το 200 μέσω αναστολής του ογκογονιδίου Flit-1, το 206 και το 30a μέσω αναστολής του Snail. Ειδικότερα τα 126, 21, 200, 200c και 30a εμπλέκονται στην αναστολή της EMT στον πνεύμονα και η αποσιώπηση τους προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα ιδιαίτερα επιθετικό φαινότυπο. (Yiang L, 2013)

Από την άλλη τα miRNAs 378, 125a-5p, 125b, 210, 103, 194, 500 φαίνεται να προωθούν το διηθητικό και μεταστατικό φαινότυπο με ταυτόχρονη επιτάχυνση της EMT. (Yiang L, 2013) Το miRNA149 φαίνεται να μπλοκάρει τον FoxM1 ο οποίος αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που προωθείται από την ενεργοποίηση του TGF-β1. Αυξημένα επίπεδα του miRNA 149 αναστέλλουν τον FoxM1 με επακόλουθη αναστολή της EMT και απομάκρυνση του κυττάρου από τον επιθετικό διηθητικό φαινότυπο. (Yang K, 2013) Τα miRNAs που είναι γνωστά ότι εμπλέκονται στην EMT είναι ακόμα πολύ λίγα. Σίγουρα υπάρχουν νέοι πρωταγωνιστές στο προσκήνιο της EMT και σίγουρα πρέπει να πέσει άπλετο φως σε ότι αφορά την ακριβή λειτουργία αυτών των μορίων.



Εικ14. Κάποιες από τις λειτουργίες των miRNAs (Yiang L, 2013)

3.4 Γονιδιακές αλλοιώσεις και EMT

Σημαντικός αριθμός γενετικών μεταλλάξεων κυρίως ενεργοποιημένων ογκογονιδίων φαίνεται να ενοχοποιείται για την EMT τύπου 3. Οι κυριότερες από αυτές αφορούν γονίδια που κωδικοποιούν για το p53, ras, c-myc, EGFR και τον Her-2. Πειράματα που έχουν γίνει για να διαπιστωθεί η συνεργία αυτών των μεταλλάξεων με τον TGF- β για παράδειγμα, δεν απέδωσαν ιδιαίτερα στοιχεία. Αντίθετα, φάνηκε ότι οι γενετικές μεταλλάξεις που επάγουν την EMT χρειάζονται ένα γενικότερο πλαίσιο συνέκφρασης για να προωθήσουν το φαινόμενο. (Sato M, 2012)

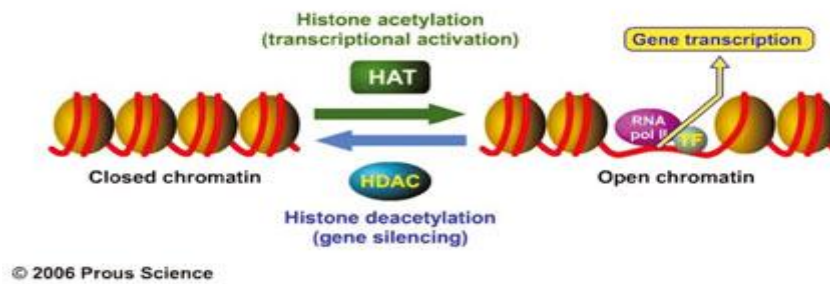
Συγκεκριμένα η μετάλλαξη του p53 φαίνεται να επιδρά αρνητικά στη ρύθμιση των miRNA και κυρίως της οικογένειας 200c, μορίων που προάγουν την αύξηση της E-καντχερίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια παράλληλη μείωση του miRNA 200c η οποία αυτόματα σημαίνει μείωση της μεταγραφής της E-καντχερίνης και κατά συνέπεια μεσεγχυματικό φαινότυπο μέσω EMT 3. (Chang J C, 2011)

Υπάρχει μελέτη που δείχνει ότι κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκίνους του πνεύμονα με μετάλλαξη στο Kras δεν δείχνει άμεση συσχέτιση με την EMT κάτι που υποστηρίζει την αρχική παρατήρηση ότι μία μετάλλαξη από μόνη της πολλές φορές δεν είναι ικανή να δώσει έναρξη στη μετατροπή. (Singh A, 2009). Στην ίδια μελέτη μάλιστα η προώθηση της EMT ανεξάρτητα από τη μετάλλαξη του Kras φαίνεται να αποδίδεται σε επιγενετικές μεταλλάξεις. (Singh A, 2009)

Είναι γνωστό ότι οι μεταλλάξεις του EGFR είναι συχνό φαινόμενο στον καρκίνο του πνεύμονα. Ο EGF είναι ο πιο ισχυρός συνδέτης του EGFR. Ενώ στην αρχή θεωρήθηκε ότι μια μετάλλαξη του EGFR προωθεί την EMT, σήμερα πειράματα φαίνεται να αποδεικνύουν το αντίθετο. Συνηγορεί σε αυτό και το γεγονός ότι σε όγκους θετικούς για μεταλλάξεις στον υποδοχέα του επδερμικού αυξητικού παράγοντα όταν εφαρμόζεται θεραπεία με αναστολείς τυροκινασικών υποδοχέων αυτοί αναπτύσσουν χημειοαντοχή. (Sequist L, 2011)

Ο Her-2 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων EGFR και διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η υπομεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου ERBB2 διατηρεί τον επιθηλιακό φαινότυπο στα MMKP. (Walter K, 2012) Σε ότι αφορά ένα σημαντικό γονίδιο που μεταλλάσσεται στο 1/3 των αδενοκαρκινωμάτων βρέθηκε ότι η μετάλλαξη του και η επακόλουθη αποσιώπηση του ενεργοποιεί ανεξέλεγκτα το Zeb1

προωθητή της EMT. (Roy BC, 2010) Ο TTF-1 όπως είναι γνωστό είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εκφράζεται στον πνεύμονα, στον θυρεοειδή και στα νεοπλάσματα αυτών των οργάνων. Μελέτες δείχνουν ότι ο θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας αναστέλει την EMT έμμεσα δρώντας αρνητικά για τον TGF- β . (Saito R, 2009) Υπάρχει τέλος μια μελέτη που έρχεται από την Κίνα και η οποία μελετά δύο οικογένειες μορίων τα HAT και HDACs δηλαδή ένζυμα ακετυλίωσης των ιστονών (μεταφεράσες) και ένζυμα αποακετυλίωσης των ιστονών (υδρολάσες). Αυτά τα μόρια εμπλέκονται με επιγενετικές αλλοιώσεις του γονιδιώματος οι οποίες υπερεκφράζουν ή αποσιωπούν διάφορα ρυθμιστικά γονίδια. Ενεργοποίηση των HATs ή αποσιώπηση των HDACs προάγει την EMT. (Chang R, 2013)



Εικ15. Η δράση των HATs και των HDACs στο γονιδίωμα (McIntyre J, 2007)

Απο τα παραπάνω προκύπτει ότι οι γονιδιακές αλλοιώσεις δεν οδηγούν αναγκαστικά σε EMT πάντοτε. Τις περισσότερες φορές θα χρειαστεί ικανός αριθμός μεταλλαξιακών γεγονότων τα οποία θα δράσουν συνεργικά με συνοδές αλλοιώσεις και πιθανά εξωκυττάριο συνεχή ερεθισμό ωστέ να δοθεί το εναρκτήριο λάκτισμα στην μετατροπή. Αυτό δείχνει επίσης την πολυπλοκότητα του φαινομένου της EMT επισημαίνοντας ταυτόχρονα το πόσο μακρύς δρόμος πρέπει να διανυθεί στην διαφώτιση των υπεύθυνων μοριακών μηχανισμών .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ EMT ΜΕ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

4.1 Χημειοαντοχή και EMT

Από το 2006 και έπειτα, σε μελέτες οι οποίες αφορούσαν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας σε ορισμένα είδη καρκίνου, όπως αυτόν του ορθοκολικού καρκίνου παρατηρήθηκε ότι όταν ο όγκος αποκτούσε χαρακτηριστικά EMT μετατροπής αυτός ανέπτυξε χημειοαντοχή στην οξυπλατίνα. Κάτι ανάλογο παρατήρησαν άλλες ομάδες ερευνητών στον καρκίνο των ωοθηκών. (Thiery J.P, 2009)

Περαιτέρω μοριακές έρευνες πάνω στο θέμα της χημειοαντοχής των όγκων θεώρησαν υπεύθυνα δύο κυρίαρχα μόρια της EMT, το Twist και το Snail. Απο την άλλη, η προσπάθεια υπερέκφρασης ενός σημαντικού αναστολέα της EMT, του miRNA 200c, φαίνονταν να επαναφέρει την χημειοευαισθησία. (Thiery J.P, 2009)

Σε σχέση με τη χημειοαντοχή στον καρκίνο του πνεύμονα, σε δοκιμές του erlotinib, ενός μονοκλωνικού αντισώματος ενάντια στον EGFR, φαίνεται ότι προσέκρουε σε χημειοαντοχή που αποκτούσαν οι κυτταροκαλλιέργειες όγκων ΜΜΚΠ, όταν κατείχαν χαρακτηριστική γονιδιακή υπογραφή EMT μετατροπής. (Yauch R, 2005)

Όπως αναφέρθηκε, τα miRNAs αποτελούν σημαντικό μόριο επικοινωνίας ενδοκυτταρικά. Το miRNA 200c έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ισχυρό αναστολέα της EMT και επαναφέρει τη λειτουργία της E-καντχερίνης στο κύτταρο. Σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι η απώλεια ή η αναστολή του miRNA 200c συνδέεται με απόκτηση EMT χαρακτηριστικών και ταυτόχρονη αύξηση της χημειοαντοχής έναντι συγκεκριμένων ταξάνων, αλλά και του cetuximab. Αντίθετα η επαναπροώθηση της παραγωγής του miRNA 200c στην ίδια μελέτη έδειξε, ότι επαναφέρει τον

επιθηλιακό φαινότυπο των νεοπλασματικών κυτταροκαλλιιεργειών από τα δείγματα όγκων.Επίσης στην ίδια μελέτη φάνηκε να υπάρχει στενή σχέση μεταξύ του miRNA 203c και του παράγοντα Snai1,ο οποίος όπως έχει δειχθεί εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια του EMT.Η ύπαρξη του miRNA 203c αναστέλει τον Snai1 με επαναφορά του επιθηλιακού φαινότυπου και καταστολή της EMT. (Chang T, 2010)

Ένας άλλος τυροσινοκινασικός αναστολέας, στο οποίο αποκτούν αντίσταση όγκοι του αναπνευστικού,είναι το gefitinib.Φαίνεται ότι ένα ποσοστό της χημειοαντοχής τους ,τα καρκινικά κύτταρα το αποκτούν χάρη σε φαινόμενα EMT.Έχει προαναφερθεί ότι συγκεκριμένα κύτταρα του όγκου και κυρίως αυτά που εδράζουν στο διηθητικό μέτωπο υπόκεινται σε φαινόμενα EMT τύπου 3.Κατα τη διάρκεια του φαινομένου παρατηρείται υπερέκφραση επαγωγέων της EMT,όπως Twist,ZEB,Slug.Συγκεκριμένα,στη χημειοαντίσταση στο gefitinib φαίνεται να ενοχοποιείται ο Slug μεταγραφικός παράγοντας,ρυθμίζοντας αρνητικά προαποπτωτικούς παράγοντες,όπως BIM και Caspases 9 με ταυτόχρονη αποφυγή της απόπτωσης των κακοήθων κυττάρων, μετατρέποντάς τα έτσι σε χημειοάντοχα. (Chang T, 2010)

Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη από την Ιαπωνία ερευνητές απέδειξαν ότι όταν ωθούσαν 50 διαφορετικούς MMKΠ με έκτοπο TGF-b να μετραταθούν μέσω EMT σε μεσεγχυματικά κύτταρα,τότε αυτά αποκτούσαν σαφή χημειοαντοχή στην πλατίνα και στην πακλιταξέλη.Επίσης σε συγκριτικές δοκιμασίες που έκαναν με όγκους μετά από χημειοακτινοθεραπεία παρατηρούσαν αλλαγή φαινοτυπικών χαρακτηριστικών προς μεσεγχυματικό φαινότυπο και έκφραση δεικτών μεσεγχυματικής προέλευσης.Μετρώντας το διάστημα ελεύθερο νόσου σε αυτούς τους ασθενείς ήταν σαφώς χαμηλότερο από εκείνους τους ασθενείς όπου οι όγκοι τους δεν είχαν υποστεί EMT μετατροπή. (Shintani Y, 2011)

Σε άλλη έρευνα η οποία μελέτησε δύο ομάδες αποτελούμενες από διαφορετικές σειρές κυτταρων ογκου πνεύμονα.Η πρώτη ομάδα πλαισιώνονταν από χημειοευαίσθητα MMKΠ κύτταρα ενώ η δεύτερη ομάδα από χημειοάντοχα στην πλατίνα.Σε πειράματα 12 μηνών που ακολούθησαν οι ερευνητές παρακολούθησαν μια σχετική εμφάνιση χημειοαντοχής σε πληθυσμούς κυττάρων οι οποίοι φέραν στοιχεία αρχέγονων κυττάρων,με έκφραση δεικτών όπως Oct4/Nanog αλλά και μορίων CD133⁺/CD44⁺.Επίσης οι κυτταρικοί αυτοί πληθυσμοί ήταν θετικοί στην έκφραση πρωτεϊνών EMT όπως c-Met και β-κατενίνης.Υπήρχε μια ξεκάθαρη

συσχέτιση μεταξύ επαγωγής αρχέγονων κυτταρικών χαρακτηριστικών και χημειοαντοχής. (Barr MP, 2013)

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα καρκινικά κύτταρα στον πνεύμονα αποκτούν χημειοαντοχή. Μερικοί από αυτούς αναφέρονται στην χημειοαντοχή που αποκτάται σε τυροκινασικούς αναστολείς, όπως για παράδειγμα αυτός του EGFR. Ειδικά για αυτόν τον υποδοχέα έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με την αναπτυσσόμενη αντοχή για τις στοχευμένες θεραπείες σε διάστημα 6 έως 12 μήνες. Όπως φαίνεται από διάφορες ερευνες η χημειοαντοχή στην θεραπεία για τον EGFR χωρίζεται σε de novo και επίκτητη. Και οι δυο τους χαρακτηρίζονται από μια σειρά μεταλλάξεων σε διάφορα εξόνια που κωδικοποιούν για τον EGFR ενώ ταυτόχρονα ανευρίσκονται αλλοιωμένα πολλά μονοπάτια καρκινογένεσης. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην ερευνητική ογκολογία για τον τρόπο με τον οποίο μπορεί η θεραπεία να παρακάμψει τη χημειοαντοχή και να συνεχίσει να διατηρεί χημειοευαίσθητο τον όγκο. Αναμένονται αποτελέσματα και σχετικά με την EMT και την απόκτηση χημειοαντοχής μέσω αντίστασης στους TKI.

4.2 Η EMT ως επαγωγέας αρχέγονων καρκινικών κυττάρων

Αρκετά πρόσφατα στην επιστημονική κοινότητα στο χώρο της ερευνητικής ογκολογίας έχει ανακύψει ένα ενδιαφέρον νέο ζήτημα, το οποίο αφορά το χαρακτηρισμό ομάδας κυττάρων με αρχέγονα χαρακτηριστικά. Η υπόθεση ότι σε ένα όγκο του οποίου τα κύτταρα αποκτούν μια σχετική χημειοαντοχή, χαρακτηριστική ιδιότητα των αρχέγονων κυττάρων, όπως επίσης και ικανότητα αυτοανανέωσης με σχετικά ομαλό ρυθμό διπλασιασμού, ήταν αρκετά ως στοιχεία για να κατευθύνουν τη διεξαγωγή ερευνών σε αυτό το πεδίο. (Iwatsuki M, 2009)

Στο πλαίσιο της έρευνας στα καρκινικά αρχέγονα κύτταρα (KAK) και της σχέσης τους με την EMT, σημαντική ερευνητική εργασία αποτελεί αυτή της ομάδας του (Mani S, 2008) η οποία σε μία μεγάλη μελέτη παρατήρησε ότι αθανатоποιημένες κυτταροκαλλιέργειες αποτελούμενες από ανθρώπινα κύτταρα μαζικού αδένου όταν έρχοταν σε επαφή με έκτοπη εφαρμογή επαγωγέων της EMT όπως ο Twist και ο Snail εκτός του ότι αποκτούσαν μεσεγχυματικό φαινότυπο, σχεδόν στο σύνολο τους εξέφραζαν υψηλή αναλογία $CD44^{high}/CD24^{low}$ η οποία χαρακτηρίζει τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα του μαστού. Εκτός αυτού τα ίδια κύτταρα είχαν καταστολή της E-καντερίνης με ταυτόχρονη αύξηση μεσεγχυματικών δεικτών και ινοβλαστικού μεσεγχυματικού φαινοτύπου. (Mani S, 2008)

Τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν μια ευχάριστη και αναπάντεχη σύγκλιση μεταξύ δύο διαφορετικών ερευνών. Μέχρι τώρα ήταν γνωστό ότι τα ΑΚ ανευρίσκονταν σε διάφορους φυσιολογικούς ιστούς και πρόσφατα αυτό επεκτάθηκε και σε καρκινικούς ιστούς. Η έρευνα για την EMT γίνεται ολοένα και πιο ακριβής με μεγαλύτερη εμβάθυνση της γνώσης και των μηχανισμών που ρυθμίζουν τα διάφορα στάδια του φαινομένου. Η ανακάλυψη ότι η EMT προωθεί κύτταρα στο να αποκτούν ικανότητες αυτοανανέωσης όπως τα ΑΚ υπόσχεται να λύσει ένα μείζον πρόβλημα στη Βιολογία του καρκίνου. Αυτό φαίνεται ότι προσπαθεί να το καταφέρει με τον εξής τρόπο: Τα περισσότερα είδη κακοήθειας εγκαταλείπουν τον πρωτοπαθή όγκο χρησιμοποιώντας μετατροπή EMT για να διηθήσουν και να μεταστατήσουν. Το τελευταίο στάδιο αποίκησης στη μεταστατική εστία χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία μικρομεταστάσεων και έπειτα κανονικών μεταστάσεων. Η επιβίωση ειδικά των αρχικών σταδίων της μεταστατικής εστίας φαίνεται να εξαρτάται αποκλειστικά από ομάδες κυττάρων με αρχέγονα κυτταρικά χαρακτηριστικά. (Mani S, 2008). Οι ίδιοι ερευνητές θεωρούν ότι αν και χρειάζονται περαιτέρω στοιχεία σύνδεσης EMT-μετάστασης-KAK εντούτοις αρχίζουν να αχνοφαίνονται χαρακτηριστικά κοινά σημεία. Πιθανοί μοριακοί και θεραπευτικοί στόχοι της EMT αναμένονται με ενθουσιασμό. (Iwatsuki M, 2009) (Mani S, 2008)

Μία σημαντική επίσης μελέτη από το πανεπιστήμιο Nanjing στην Κίνα παρατήρησε ότι όταν χρησιμοποιούνταν κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση σε Αρσενικό τα κύτταρα αυτά μετατρέπονταν σε μεσεγχυματικά μέσω EMT. Το Αρσενικό είναι γνωστό για την καρκινογόνο δράση του σε πνεύμονα, ουροδόχο κύστη και δέρμα. Η χρόνια χρήση Αρσενικού στις πιο πάνω κυτταρικές σειρές προωθούσε την EMT μέσω Twist ενώ από τη μελέτη φάνηκε ότι Snail και Slug διατηρούσαν φυσιολογική ενδοκυττάρια συγκέντρωση. Επίσης οι Zeb1/Zeb2 ήταν αυξημένοι μόνο στη χρόνια έκθεση και όχι στην οξεία φάση. Η ανάλυση των μηχανισμών μέσω των οποίων επιδρά στην EMT φάνηκε ότι εμπλέκουν το γονίδιο Oct4 το οποίο ενέχεται στη λειτουργία του HIF-2a υποξειακού παράγοντα. Το HIF-2a ρυθμίζει τη λειτουργία του Twist και Bmi1 παράγοντες σημαντικούς για την EMT. Τα κύτταρα που εκτείνονται χρόνια στο Αρσενικό ενώ εκτός από τη μετατροπή EMT εκφράζουν και υψηλά επίπεδα CD133⁺ και CD44 χαρακτηριστικά μόρια των ΚΑΚ. (Xu Yuan, 2012)

Άλλη έρευνα έρχεται και αυτή με τη σειρά της να επιβεβαιώσει την αλλαγή του φαινοτύπου κυττάρων από MMKP μετά από EMT προς κύτταρα που αποκτούν

ΚΑΚ στοιχεία και υπερέκφραση CD133, αυτοανανέωση και Oct4 έκφραση. Στη μελέτη αυτή εξετάζονται 60 ΜΜΚΠ οι οποίοι κατείχαν ABC αντλίες μεταφορείς καθώς επίσης και ABCG2 πρωτεΐνες αντλίες μεταφορείς ως χαρακτηριστική τους φαινοτυπική ιδιότητα. Αυτά τα κύτταρα φάνηκε ότι αναπτύσσανε ιδιαίτερη χημειοαντοχή σε κυτταροτοξικά φάρμακα όπως οι ταξάνες και τελικά υπήρχε μεγάλη διαφορά μεταξύ CD133⁺ και CD133⁻ πληθυσμών στην επιβίωση μετά από χημειοθεραπεία. (Bartolini G, 2009)

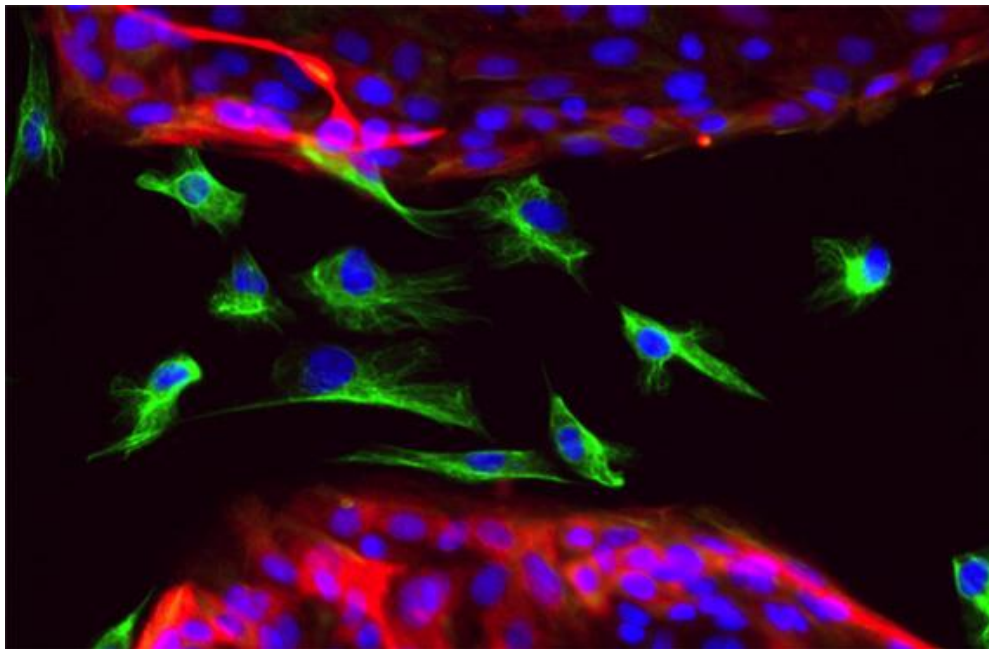
Η συνέκφραση Oct4 και Nanog, δύο βασικής σημασίας μεταγραφικών παραγόντων, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη υψηλόβαθμης κακοήθειας αδενοκαρκινώματος πνεύμονα μέσω δημιουργίας ΚΑΚ από EMT μετατροπή. Αυτό παρατήρησαν οι Chiu et al, όταν υπέβαλαν σε έκθεση σειρά δειγμάτων από αδενοκαρκινώματα σε έκτοπους Oct4 και Nanog παράγοντες. Συγκεκριμένα οι δύο αυτοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του Slug πολύ σημαντικού ρυθμιστού μορίου όπως είδαμε πιο πάνω για την EMT. Σε knockdown ποντίκια για τους δύο αυτούς παράγοντες παρατηρήθηκε ότι αναστέλλονταν η ρυθμιση του Slug με ταυτόχρονη καταστολή του διηθητικού και μεταστατικού φαινοτύπου. Στους ίδιους όγκους αδενοκαρκινωμάτων που μελετήθηκε η τριπλή θετική έκφραση Oct4/Nanog/Slug είχε τη χειρότερη πρόγνωση επιβίωσης. (Chiu S, 2010)

Στους κυριότερους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην προώθηση των ΚΑΚ, μια άλλη ομάδα μελετώντας κυρίως ΚΑΚ από όγκους μαζικού αδένου, ανακάλυψε ότι σχετίζεται άμεσα το p53 με miRNAs κυρίως miRNA 200 και 183. Όταν τα δύο αυτά μόρια ήταν κανονικά εκφρασμένα στα κύτταρα, τα τελευταία δεν προχωρούσαν σε EMT και δεν αποκτούσαν χαρακτήρες ΚΑΚ. Όταν το p53 μεταλλάσσονταν ή γινόταν αποκοπή του με ποντίκια knockdown, αυτόματα υποεκφραζόταν και τα πιο πάνω miRNAs με επακόλουθη αύξηση των Zeb1/Zeb2 παραγόντων και προώθηση της EMT.

Σε ανάλογες κυτταροκαλλιέργειες για τη μελέτη μονοπατιών καρκινογένεσης σε σχέση με την EMT φάνηκε ότι όταν επιμόλυναν τις εν λόγω κυτταροκαλλιέργειες όγκων με μόρια Twist τα οποία δημιουργήθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων HeLa, τότε τα κύτταρα των όγκων εισέρχονταν σε μετατροπή EMT. Έτσι αποκτούσαν χαρακτήρες αρχέγονων κυττάρων (CD44⁺) μέσω κυρίως του μονοπατιού της β-κατενίνης/AKT. (Li J, 2011) Δυστυχώς μέχρι σήμερα η εξακρίβωση μοριακών

μηχανισμών στον πνεύμονα οι οποίοι να σχετίζονται με την προώθηση ΚΑΚ από EMT θεωρείται ακόμα ελλιπής.

Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτή η σημασία διευκρίνησης και εξακρίβωσης των μηχανισμών που διέπουν την EMT. Είναι σχεδόν βέβαιο ότι στο μέλλον τομείς όπως αυτός της σχέσης EMT και ΚΑΚ αλλά και της επεξήγησης της χημειοαντοχής όπως θα δούμε πιο κάτω θα είναι στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας για τον καρκίνο.



Εικ16.Μεταναστευτικές και αυτοανανεωτικές ιδιότητες κυττάρων που έχουν υποστεί EMT (Scheel C, 2011)[με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού με πράσινο τα κύτταρα με μεσεγχυματικό φαινότυπο που αποκολλούνται από τον υπόλοιπο όγκο με κόκκινο ο οποίος διατηρεί επιθηλιακά στοιχεία]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΤΗΣ EMT

Οδεύοντας προς το τέλος αυτής της εργασίας είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι η EMT, ως δυναμικό βιολογικό φαινόμενο είναι σχετικά δύσκολο να αξιολογηθεί κλινικά. Αυτό είναι εμφανές κάθε φορά που προσπαθεί κανείς να μελετήσει την EMT σε κυτταροκαλλιέργειες όπου με τη χρήση διαφόρων μοριακών επαγωγέων είναι εύκολο να προωθηθεί το φαινόμενο της EMT. Σε ζωντανό ιστό και *in vivo* είναι σχεδόν αδύνατο να παρατηρηθεί χάρη στη δυναμικότητα της φύσης του φαινομένου. Είναι πάρα πολύ δύσκολο να γίνουν συνεχόμενες σε χρονική ακολουθία βιοπτικές λήψεις. Επίσης πολλές φορές τα καρκινικά κύτταρα που μόλις έχουν υποστεί EMT ομοιάζουν υπερβολικά με τους καρκινικούς ινοβλάστες. Τέλος, ακόμα δεν υπάρχουν μέθοδοι ζωντανής *in vivo* παρακολούθησης του φαινομένου (Sato M, 2012)

Σήμερα παρόλη την σημαντική ερευνητική δραστηριότητα πολλά σημεία είτε της φυσιολογίας του φαινομένου είτε του παθολογικού εκτροχιασμού των διαφόρων μηχανισμών που διέπουν την EMT παραμένουν σκοτεινά και προκλητικά άγνωστα. Σε αυτό ακριβώς το σημείο τίθενται διάφορα ερωτήματα. Για ποιο λόγο συμβαίνει η EMT; Ποιοί είναι τελικά οι κύριοι ρυθμιστές και με ποιόν τρόπο ενορχηστρώνουν την λειτουργία του φαινομένου; Υπάρχουν βιοδείκτες αξιόπιστοι πέρα από τους μέχρι σήμερα γνωστούς; Αν ναι, είναι ειδικοί και ευαίσθητοι και συνεπώς χρησιμοποιήσιμοι στη διαγνωστική και θεραπευτική ογκολογία; (Zeisberg M, 2009).

Πιο κάτω παρατίθεται πίνακας με τους κυριότερους και πιο πρόσφατους βιοδείκτες για το φαινόμενο της EMT με τα *micro RNAs* να έχουν ξεκινήσει να χρησιμοποιούνται και αυτά με σχετικά μεγάλο ενθουσιασμό ως δείκτες μεγάλης σημασίας στην EMT. Τη στιγμή που γράφεται αυτή η εργασία είναι σε εξέλιξη ανα τον κόσμο μεγάλος αριθμός ερευνών γύρω από την EMT όχι μόνο στον πνεύμονα αλλά και σε άλλα όργανα. Ο καρκίνος του μαστού και του παχέος εντέρου είναι τα κύρια όργανα όπου το φαινόμενο μελετήθηκε για πρώτη φορά ενώ ενδιαφέρον

προκαλεί ο παγκρεατικός καρκίνος και η σχέση της ιδιαίτερης επιθετικότητας του με φαινόμενα τύπου EMT 3.

Table 1
Markers of EMT

Acquired markers		Attenuated markers	
Name	EMT type	Name	EMT type
Cell-surface proteins			
N-cadherin	1, 2	E-cadherin	1, 2, 3
OB-cadherin	3	ZO-1	1, 2, 3
α 5 β 1 integrin	1, 3		
α V β 6 integrin	1, 3		
Syndecan-1	1, 3		
Cytoskeletal markers			
FSP1	1, 2, 3	Cytokeratin	1, 2, 3
α -SMA	2, 3		
Vimentin	1, 2		
β -Catenin	1, 2, 3		
ECM proteins			
α 1(I) collagen	1, 3	α 1(IV) collagen	1, 2, 3
α 1(III) collagen	1, 3	Laminin 1	1, 2, 3
Fibronectin	1, 2		
Laminin 5	1, 2		
Transcription factors			
Snail1 (Snail)	1, 2, 3		
Snail2 (Slug)	1, 2, 3		
ZEB1	1, 2, 3		
CBF-A/KAP-1 complex	2, 3		
Twist	1, 2, 3		
LEF-1	1, 2, 3		
Ets-1	1, 2, 3		
FOXC2	1, 2		
Goosecoid	1, 2		
MicroRNAs			
miR10b	2	Mir-200 family	2
miR-21	2, 3		

ZEB1, zinc finger E-box binding homeobox 1.

Εικ.17 Σημαντικότεροι βιοδείκτες EMT και αρχέγονων κυττάρων (Zeisberg M, 2009)

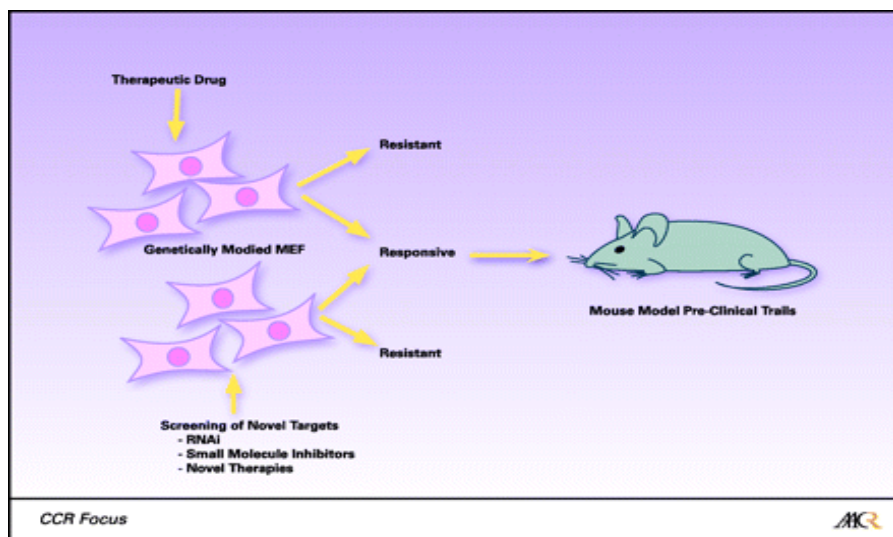
Σήμερα οι ερευνητές δίνουν ιδιαίτερο βάρος στην αποσαφήνιση της EMT τύπου 1, στην μορφογένεση, μιας και φαίνεται ότι οι μηχανισμοί της είναι παρόμοιοι με την EMT τύπου 3.Μια άλλη πολύ σημαντική παρατήρηση και ανακάλυψη για την αρχέγονη φύση των κυττάρων που έχουν υποστεί EMT άνοιξε νέους ορίζοντες, όπως είδαμε στην προηγούμενη ενότητα, σε ότι αφορά την αιτιολογία της χημειοαντοχής αρκετών όγκων και ενδέχεται να αποτελέσει κεντρικό στόχο στη μελλοντική έρευνα και τελειοποίηση της θεραπευτικής φαρμακευτικής ογκολογίας.

Το ίδιο ισχύει για τις χρόνιες φλεγμονώδεις και ινωτικές εκφυλιστικές νόσους.Εδώ με κυρίαρχο τον τύπο της EMT 2 τίθενται ερωτήματα για την φύση της μετατροπής των κυττάρων.Τι είδους κύτταρα είναι τελικά οι μυοϊνοβλάστες και ποια η πραγματική κυτταρική τους λειτουργία;Ποιοί οι ακριβείς μηχανισμοί της ίνωσης;Ποιος ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στη διένεξη του με τα μετατρεπόμενα από EMT κύτταρα;Και εδώ οι ερευνητές βρίσκονται μπροστά σε

σημαντικά επιστημονικά ερωτήματα αν και σίγουρα τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στις μελέτες με επίκεντρο τον TNF, το NF-kb και το Snail και τον ρόλο τους στην ινωτική διαδικασία. (Chia-Wei Li, 2012) (Atsushi Shiozaki, 2012)

Εμμένοντας στον τομέα της φλεγμονής και ιδιαίτερα των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, σε πρόσφατη δημοσίευση του πανεπιστημίου της Νίκαιας στη Γαλλία αναφέρεται η σημασία των χρόνιων λοιμώξεων πιθανά μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών χρόνιας φλεγμονής και εμπλοκής του μονοπατιού των MAPK και του TGF-b. Φαίνεται λοιπόν από τις έρευνες ότι η χρόνια λοίμωξη διαμορφώνει το γύρω μικροπεριβάλλον θέτοντας τις βάσεις για καρκινογένεση μέσω τροποποίησης EMT κυρίως τύπου 3 αλλά και επιδρά μέσω EMT τύπου 2 προωθώντας ινωτική εκφύλιση του εν λόγω ιστού. (Hofman P, 2012)

Τελευταία οι ολοένα περισσότερα υποσχόμενες και βελτιωμένες κυτταροκαλλιέργειες καθώς επίσης και πειραματικά μοντέλα ποντικών εργαστηρίου δίνουν την ευκαιρία σε ερευνητές ανα τον κόσμο να δημιουργήσουν ακριβή μοντέλα ανθρώπινων όγκων με γενετικές τροποποιήσεις knock-in και knock-out γονιδίων και έτσι να μελετήσουν το γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου. Κάτι ανάλογο εφαρμόζεται και στην περίπτωση της EMT αφήνοντας πολλές ελπίδες για στόχευση μορίων στόχων που αποτελούν επαγωγείς της EMT. (Pandolfi, 2006)



Εικ.18 Μοντέλα ποντικών στις μελλοντικές θεραπευτικές επιλογές (Pandolfi, 2006)

Τα πειραματικά ποντίκια αποτελούν τους σημερινούς πραγματικούς ήρωες του παρασκηνίου των ερευνητικών εργαστηρίων καθώς προσφέρουν μεγάλη γκάμα δυνατοτήτων διαφόρων ερευνητικών χειρισμών. Είναι γεγονός ότι πάρα πολλά

φάρμακα και τεχνικές θεραπείας έχουν έρθει εις πέρας χάρη στα μικρά αυτά θηλαστικά και αναπτύσσονται διάφορες τεχνικές ώστε η μικρή τους διαβίωση στο ερευνητικό κέντρο να είναι όσο το δυνατόν ανώδυνη σε ότι αφορά πάντα τα θέματα βιοηθικής.

Αρκετά ενδιαφέρουσα μελέτη παρουσιάστηκε από την ομάδα (Bartley J. Gill, 2012) η οποία φαίνεται να φέρνει σημαντικά στοιχεία στο φώς σχετικά με τις βιοφυσικές ιδιότητες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων που έχουν υποστεί EMT στον καρκίνο του πνεύμονα και ιδιαίτερα τον τύπο του αδενοκαρκινώματος. Σύμφωνα λοιπόν με αυτή τη μελέτη χρησιμοποιώντας μοντέλα συνθετικής υδρογέλης μελετώνται φυσικές και μηχανικές ιδιότητες της EOM που φαίνεται να συνδέονται άμεσα με το ιστολογικό αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης της μεταστατικής εστίας. Έτσι ιστοί με μεγαλύτερη συνοχή και πιο συμπαγείς θα δώσουν μια πιο άναρχη και αδιαφοροποίητη μεταστατική εστία σε ότι αφορά το πρότυπο ανάπτυξης ενώ μια πιο χαλαρή διάταξη του στρώματος επιτρέπει τη μεταστατική εστία να οργανωθεί σε πιο καλά διαφοροποιημένες μορφές του αρχικού νεοπλάσματος. Εδώ ακριβώς υπεισέρχονται οι μοριακές έρευνες ώστε να δια φωτίσουν στο κατά πόσο ενεργοποιούνται μηχανισμοί επαγωγής EMT που θα προωθήσουν αυτή τη μετάσταση στα διάφορης υφής και σύστασης πειραματικά στρώματα. (Bartley J. Gill, 2012)

Με την παραπάνω τελευταία αναφορά η εργασία φθάνει στο τέλος της. Το φαινόμενο της EMT φαίνεται να εισέρχεται στο κέντρο του ενδιαφέροντος ολόένα και περισσότερο σε όλους τους επιστημονικούς και ερευνητικούς κύκλους της ογκολογίας και της μελέτης της παθολογίας του ανθρώπου. Τα σημάδια για νεότερα δεδομένα και σημαντικές εξελίξεις πάνω στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή είναι ιδιαίτερα ενθαρυντικά.

Με την ανάπτυξη μεθόδων μεγαλύτερης ακρίβειας και πρακτικής ευκολίας στην καθημερινή ερευνητική εργασία του ανθρώπου-ερευνητή και επιστήμονα, όλος ο ιατρικός και όχι μόνο πληθυσμός, αναμένει απαντήσεις σε πολλά από τα ερωτήματα που ετέθησαν πιο πάνω. Οι απαντήσεις θα πρέπει να έχουν τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο που νοσεί, εκείνον τον άνθρωπο που έχει πραγματική ανάγκη έμπρακτης εφαρμογής της απεραντοσύνης της επιστημονικής γνώσης.

Βιβλιογραφία

Acloque H, et al., 2008. The physiology and pathology of the EMT. *EMBO reports*, 7 March, 7(9), p. 322–326.

Allegra M, et al., 2012. Semaphorin-7a reverses the ERF-induced inhibition of EMT in Ras-dependent mouse mammary epithelial cells. *Molecular Biology of The Cell*, 1 October, Τόμος 23, pp. 3873-3881.

Arnoux, V. et al, et al., 2005. Cutaneous Reepithelization: A partial and reversible EMT. Στο: *Rise and Fall of epithelial phenotype: Concepts of EMT*. s.l.: Savanger.

Aroeira L, et al, 2007. Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. *Journal of the American society of Nephrology*, Τόμος 18, pp. 204-2013.

Atala A, et al, 2011. Principles of Regenerative Medicine.

Atsushi Shiozaki, et al, 2012. Claudin 1 Mediates TNF α -Induced Gene Expression and Cell Migration in Human Lung Carcinoma Cells. *PLOS one*, May, Volume 7.

Barr MP, et al., 2013. Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. *Plos One*, 17 January, 8(1).

Bartley J. Gill, et al, 2012. A Synthetic Matrix with Independently Tunable Biochemistry and Mechanical Properties to Study Epithelial Morphogenesis and EMT in a Lung Adenocarcinoma Model. *Cancer Research*, 12 November, 72(22), p. 6013–6023.

Bartolini G, et al, 2009. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *PNAS*, 22 September, 106(38), pp. 16281-16286.

Ceppi P, et al, 2010. Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*, 9 August, Issue 8, pp. 1207-1216.

Chang J, et al., 2011. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nature Cell biology*, 1 March, 13(3), p. 317–323.

Chang R, et al 2013. Research Advance on Mechanism and Application of HATs and HDACs in Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Cancer. *Cancer*, 7 April, pp. 211-215.

Chang T, et al., 2010. Slug confers resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 28 October, pp. 1071-1079.

Chia-Wei Li, et al., 2012. Epithelial-mesenchyme transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Research*, March.

Chiou S, et al, 2010. Coexpression of Oct4 and Nanog Enhances Malignancy in Lung Adenocarcinoma by Inducing Cancer Stem Cell -Like Properties and Epithelial - Mesenchymal Transdifferentiation. *Cancer Research*, pp. 10433-10444.

Corrin B, et al., 2006. *Pathology of the Lungs*. 2 επιμ. s.l.:Churchil Livingstone Elsevier.

Dasari V, et al., 2006. Epithelial–Mesenchymal Transition in Lung Cancer: Is Tobacco the “Smoking Gun”? *American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 16 February, Τόμος 35, pp. 3-9.

DeVita V, et al, 2008. *Cancer Principles and Practice*. 8 επιμ. s.l.:LWW.

Galluzzo P, et al., 2011. Notch signaling in lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21 April, 11(4), pp. 533-540.

Gibbons, et al, 2009. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes and Development*, 12 May, pp. 2140-2151.

Giuliani L, et al., 2007. Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer*, 2 April, 57(3), pp. 273-281.

Goulioumis.A, 2005. *Το φαινομενο EMT κατα τη μετάσταση επιθηλιακών κυττάρων*, Πατρα Ελλάδα: Πανεπιστήμιο Πατρών.

Hader C, et al., 2010. Mesenchymal-Epithelial Transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2. *Oncogene*, 18 February, Τόμος 29, p. 1031–1040.

Halder SK, et al, 2011. Elucidating the mechanism of regulation of transforming growth factor β Type II receptor expression in human lung cancer cell lines. *Neoplasia*, 13 October, Τόμος 10, pp. 912-922.

Hofman P, et al 2012. Microbes-induced EMT at the crossroad. *Gut Microbes*, June, pp. 176-185.

Hu Y, et al, 2013. TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis*, 20 April.

Hung JJ, et al., 2009. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*, 23 September, 64(12), pp. 1082-1089.

IARC, 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. [Ηλεκτρονικό] [Πρόσβαση 11 august 2013].

Iwatsuki M, et al, 2009. Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Science*, 21 October, 101(2), pp. 293-299.

Jang J, et al, 2004. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, 25 June, 117(7), pp. 927-939.

Josson S, et al, 2011. β 2-Microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Research*, 1 April, 71(7), pp. 2600-2610.

Kalluri R, W. R., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, June, 119(6), pp. 1420-1428.

Kernstine K, et al, 2011. *Lung Cancer: A Multidisciplinary Approach to Diagnosis and Management*. 5 επιμ. New York USA: Demos Medical.

Kiefel H, et al, 2012. L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell adhesion and Migration*, August, 6(4), pp. 374-384.

Kim WY, et al, 2009. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, August, 119(8), pp. 2160-2170.

Konigshoff M, et al., 2009. Wnt signaling in Lung Disease. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 5 March, Τόμος 42, pp. 21-31.

Larue L, B. A., 2005. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 30 kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 14 November, 50(24), pp. 7443-7454.

Le Bras Grégoire F, et al., 2012. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adhesion & Migration*, August, 6(4), p. 365–373.

Li J, et al., 2011. Activation of b-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *Cancer*, 49(11), pp. 1471-2407.

Lim J, et al, 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, pp. 3471-3486.

Longmore M, et al, 2006. *Oxford Handbook of Clinical Medicine*. 5 επιμ. s.l.:Oxford University Press.

Mani S, et al., 2008. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 16 May, Τόμος 133, pp. 704-715.

McIntyre J, et al 2007. Combination therapy with valproic acid in cancer: Initial clinical approach. *Drugs of the future*, 32(1).

Merikallio H, et al 2012. Snail promotes an invasive phenotype in lung carcinoma. *Respiratory Research*, 17 November, 104(13).

Nakashima H, et al., 2012. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 18 May, 51(5), pp. 400-410.

Nasser, 2007. http://www.thebestoncologist.com/Cancer_Diseases/lung_cancer.html#Staging. [Ηλεκτρονικό]
[Πρόσβαση 25 August 2013].

Nieto, 2002. The Snail Superfamily of Zinc Finger transcription factors. *Molecular Cell Biology*, 2 March, Τόμος 3.

Pandolfi, C et al., 2006. Mouse Modeling in Oncologic Preclinical and Translational Research. *Clinical cancer research*, Issue 12.

Rami-Porta R, et al., 2007. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2 July, Issue 7, pp. 593-602.

Rangel M, et al., 2012. Role of Cripto-1 during Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Development and Cancer. *American Journal of Pathology*, 21 February, Τόμος 180.

Robbins S, et al 2010. *Pathologic Basis of Diseases*. 8 επιμ. σ.λ.:Elsevier.

Roy BC, et al, 2010. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells.. *Lung Cancer*, November, 70(2), pp. 136-45.

Saito R, et al, 2009. Thyroid Transcription Factor-1 Inhibits Transforming Growth Factor- β -Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research*, 17 March, pp. 2783-2791.

Sajni Josson, et al 2011. β 2-Microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Research*, 1 April, 71(7), p. 2600–2610.

Sakamoto K, et al, 2010. EMT-related Gene, Twist, For Phenotype Change In Lung Cancer Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 15 May.

Salnikova, et al, 2012. Hypoxia Induces EMT in Low and Highly Aggressive Pancreatic Tumor Cells but Only Cells with Cancer Stem Cell Characteristics Acquire Pronounced Migratory Potential. *Plos One*, 12 September.

Sato M, et al., 2012. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition. *Respirology*, Τόμος 17, p. 1048–1059.

Scheel C, et al, 2011. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem-cell states in the breast. *Cell*, 10 June.

Sequist L, et al, 2011. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Scientific Translation Medicine*, 23 March, 75(3).

Shintani Y, et al., 2007. Collagen I Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells via Transforming Growth Factor- β Signaling. *American Journal Of Respiratory Cell Molecular Biology*, 16 July, pp. 95-104.

Shintani Y, et al., 2011. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to Chemoradiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*, 15 June, Τόμος 92, pp. 1794-1804.

Singh A, et al , 2009. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer cell*, 2 June, 15(6), pp. 489-500.

Smit M, et al., 2009. A Twist-Snail Axis Critical for TrkB-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Transformation, Anoikis Resistance, and Metastasis. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, July, 29(13), p. 3722–3737.

Strippoli R, et al., 2008. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway.. *Disease Models and Mechanisms*, December, 4-5(1), pp. 264-274.

Takeyama Y, et al., 2010. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Letters*, 28 October, pp. 216-224.

Thiery J.P, et al, 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *The Cell*, 29 November.

Travis W, et al, 2004. *Pathology and Genetics of tumors of Lungs, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon France: WHO.

Travis WD, et al, 2011. Paradigm shifts in lung cancer as defined in the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification. *European Respiratory Journal*, 38(2), pp. 239-243.

Uybico S, et al., 2010. Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. *Radiographics*, September, pp. 1163-1181.

Walter K, et al, 2012. DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer.. *Clinical Cancer Research*, 15 April, 18(8), pp. 2360-73.

Wang Z, et al, 2010. The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Current Drug Targets*, 11 June, pp. 745-751.

Weinberg.R, 2013. Moving Out: Invasion and Metastasis. Στο: *The Biology of Cancer*. 2 εκδ. s.l.:Garland science, pp. 657-689.

Xiao D, et al, 2010. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, September, 2(3), pp. 154-159.

Xie M, et al, 2012. Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *Journal of Cell Biochemistry*, May, 113(5), pp. 1501-1513.

Xu Yuan,et al,2012. EMT and Stem Cell-Like Properties Associated with HIF-2a Are Involved in Arsenite-Induced Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells. *Plos ONE*, 25 May, 7(5).

Yanagawa J, et al, 2009. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 15 November.

Yang K,et al., 2013. miR-149 Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Cells EMT by Targeting FOXM1. *Biochemistry Research International*, 4 March.

Yauch R,et al,2005. Epithelial versus Mesenchymal Phenotype Determines In vitro Sensitivity and Predicts Clinical Activity of Erlotinib in Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, November, pp. 8686-8698.

Yiang L, et al, 2013. MicroRNAs in Invasion and Metastasis in Lung Cancer. Στο: Y. L, εκδ. *Oncogenomics and Cancer Proteomics-Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*. s.l.:Intech.

Youlde DR, et al, 2008. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *Journal of Thoracic Oncology*, 3 August, Issue 8, pp. 819-831.

Zeisberg M, et al, 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine*, 9 July, 9(7), pp. 964-968.

Zeisberg M, et al, 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal for Clinical Investigation*, 1 June, 119(6), p. 1429–1437.

Zheng H, et al 2013. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, 22 April.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετατροπή είναι ένα βιολογικό φαινόμενο επιστημονικά τεκμηριωμένο σε ιστολογικό επίπεδο το οποίο χαρακτηρίζεται από σημαντικές ενδοκυττάριας μοριακές αλλαγές με αντίκτυπο στη φαινοτυπική διαφοροποίηση προς μεσεγγυματικό τύπο κυττάρου.

Το φαινόμενο αυτό διαδραματίζει βασικής σημασίας ρόλο στην οργανογένεση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής περιόδου ενώ συμβάλλει σημαντικά στην ιστική επιδιόρθωση μετά από τραυματική βλάβη. Σε παθολογικό επίπεδο η EMT φαίνεται ολοένα και περισσότερο να αποτελεί θεμελιώδη διαδικασία στην καρκινική διήθηση και μετάσταση των κακοήθων νεοπλασμάτων ενώ σημαντικές πληροφορίες έρχονται στο φώς τα τελευταία χρόνια σε ότι αφορά την σχέση EMT και ίνωσης.

Στην εργασία αυτή θα μελετηθεί η πιο πρόσφατη βιβλιογραφία σε ότι αφορά το φαινόμενο της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής και πως αυτό σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα, νεόπλασμα το οποίο αποτελεί σήμερα ένα από τους συχνότερους τύπους κακοήθειας. Στο πρώτο κεφάλαιο θα γίνει μια γενική αναφορά σχετικά με τον καρκίνο του πνεύμονα αναλύοντας αδρά κάποια στοιχεία μοριακής βιολογίας. Το δεύτερο κεφάλαιο μελετά το φαινόμενο της EMT με ιδιαίτερη μνεία στη φυσιολογία και στην ταξινόμηση του. Στο τρίτο κεφάλαιο αναλύεται η σχέση EMT και καρκίνου του πνεύμονα ενώ το τέταρτο εισάγει και αναλύει έννοιες όπως η συσχέτιση EMT και αργεγονων καρκινικών κυττάρων αλλά και η εμφάνιση της χημειοαντοχής μετά από μικρό διάστημα αντικαρκινικής θεραπείας. Η εργασία ολοκληρώνεται με την αναφορά στις τελευταίες εξελίξεις πάνω στην έρευνα για το φαινόμενο της EMT.

ABSTRACT

The epithelial-mesenchymal transition is a biological phenomenon scientifically documented on tissue level, which is characterized by significant intracellular molecular changes with an impact on phenotypic differentiation in mesenchymal cell type.

This phenomenon plays a crucial role in organogenesis during the fetal period while significantly contributes to tissue repair after tissue damage. In pathological level EMT seems increasingly to be a fundamental process in cancerous infiltration and metastasis of malignant neoplasm while recently important information coming to light regarding the relationship between EMT and fibrosis. In this work we review the most recent literature on the phenomenon of epithelial-mesenchymal transition and how this is associated with lung cancer , a neoplasm, which is today one of the most frequent types of malignancy.

In the first chapter a general reference on lung cancer is being made, by analyzing some evidence of molecular biology. The second chapter examines the phenomenon of EMT with particular reference to the physiology and classification. The third chapter discusses the relationship between lung cancer and EMT , while the fourth , introduces and discusses concepts such as chemotherapy resistance of the EMT transformed cancer cells and the relative stemness properties that this phenomenon can confer at the same cells. The review is accomplished by a reference to the latest developments in research on EMT.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

β 2M	β 2 μικροσφαιρίνη
COX	Κυκλοξυγενάση
DIPNECH	Διάχυτη πνευμονική νευροενδοκρινική κυτταρική υπερπλασία
EGFR	Υποδοχέας του Επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EMT	Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή
E Θ O	Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία
HAT	Μεταφοράση ακετυλίωσης Ιστονών
HDAC	Ένζυμο αποακετυλίωσης Ιστονών
HIF	Παράγοντας επαγόμενος από την Υποξία
IASLC	Διεθνής οργανισμός μελέτης του καρκίνου του πνεύμονα
ICAM	Διακυττάρια μόρια προσκόλλησης
IPF	Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση
ΜΜΚΠ	Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα
ΜΚΠ	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα
MMP	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
NADPH	Φωσφορικό δινουκλεοτιδικό νικοτιναμίδιο αδενίνης
PGE	Προσταγλανδίνη
ROS	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
RTK	τυροσινוקινασικοί υποδοχείς
SMADS	πρωτεΐνες επλεκόμενες στο μονοπάτι του TGF-β
TKI	Αναστολείς Τυροσινוקινασικού υποδοχέα
ΤΜΕΡΑΙ	Διαμεμβρανική προστατική επαγόμενη από ανδρογόνα πρωτεΐνη
VHL	von Hippel Lindau