

**ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ο ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ**

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΗΣ 8
ΚΑΙ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΤΗΣ Η
ΣΤΟ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟ ΚΑΙ ΣΤΑ ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΑ ΤΟΥ**

ΨΑΘΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ

ΙΑΤΡΟΥ ΜΑΙΕΥΤΗΡΑ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Πρόλογος	4
Μυομήτριο	6
Γενικά περί λειομυωμάτων	8
Παθολογική Ανατομική Λειομυωμάτων	9
Ποικιλίες Λειομυωμάτων	18
Λειομυοσαρκώματα	22
Κατηγοριοποίηση προβληματικών όγκων λείων μυϊκών κυττάρων μήτρας	26
Κερατίνες	29
Κερατίνη 8	33
Κερατίνες σε λείες μυϊκές ίνες	35
λειομύματα και λειομυοσαρκώματα	
Αντίσωμα Η και Επιτόπιο Η	37
Αντίσωμα Η και Κερατίνη 8	40
Επιτόπιο Η και Γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη	42
Γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των κερατινών	44

Γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των λείων μυϊκών ινών	45
Νεοπλασία και Γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη	50
Το επίπεδο της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και των ενζύμων OGT και OGA που την ανακυκλώνουν στις κύριες μορφές καρκίνου	56
Γενικό συμπέρασμα της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στην νεοπλασία	61
<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
Το υλικό μας	63
Μέθοδος επεξεργασίας υλικού	63
Αποτελέσματα	66
Συζήτηση	82
Τελικά Συμπεράσματα	89
Summary	92
Βιβλιογραφία	94

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η γλυκοζυλιωμένη ομάδα H της κερατίνης 8 περιλαμβάνει το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη που αποτελεί μέρος του επιτόπιου H, που αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό IgM αντίσωμα H που αναπτύχθηκε σε ποντικό. Το επιτόπιο H περιλαμβάνει το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένο κατά ένα ειδικό τρόπο στο χώρο ή και με μέρος της παρακείμενης πολυπεπτιδικής αλύσου ή συνδυασμό και των δύο ανωτέρω καταστάσεων. Έτσι, το μονοκλωνικό αντίσωμα H αναγνωρίζει το επιτόπιο H της κερατίνης 8, αλλά δεν αναγνωρίζει επιτόπιο H πάνω στην κερατίνη 18, που και αυτή είναι γλυκοζυλιωμένη με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Έτσι το μονοκλωνικό αντίσωμα H θεωρείται ένα ειδικό θέσης αντίσωμα, δηλαδή ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό των πολυπεπτιδίων, που είναι γλυκοζυλιωμένα με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη γίνεται με την ένωσή του με τα υδροξύλια των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης των πρωτεϊνών. Έχουν βρεθεί μέχρι και 4000 πρωτεΐνες του πυρήνα, των μιτοχονδρίων και του κυτταροπλάσματος, που γλυκοζυλιώνονται με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη.

Η γλυκοζυλίωση είναι αμφίδρομη και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη προστίθεται με την δράση της τρανσφεράσης της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, που αναφέρεται με τα αρχικά OGT στην διεθνή βιβλιογραφία και η αφαίρεση γίνεται με τη δράση μιας εξοζαμινιδάσης, υδρολάσης, που αναφέρεται με τα αρχικά OGA. Η γλυκοζυλίωση των

πρωτεϊνών με το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη επηρεάζει βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η μεταγραφή του DNA, η μετάφραση του mRNA, η μετακίνηση των πρωτεϊνών στα κυτταρικά διαμερίσματα, η πρωτεασωμική αποδόμηση των πρωτεϊνών και επηρεάζει βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την αντίσταση στο κυτταρικό στρες, την αντίληψη των θρεπτικών αναγκών των κυττάρων. Η διαταραχή της γλυκοζυλίωσης με την N-ακετυλογλυκοζαμίνη εμπλέκεται στην αιτιολογία κύριων ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιοαγγειακά και τα νευρολογικά νοσήματα. Στην παρούσα μελέτη έγινε η διερεύνηση της παρουσίας της κερατίνης 8 στο μυομήτριο και στα νεοπλάσματα των λείων μυϊκών ινών του, δηλαδή στα λειομύματα και στα λειομυοσαρκώματα σε σχέση με την παρουσία του επιτόπιου H, επειδή υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες περί της παρουσίας της κερατίνης 8 στις λείες μυϊκές ίνες.

Περίληπτικά αναφέρεται ότι δεν βρέθηκε παρουσία κερατίνης 8 στα δείγματα του μυομητρίου, των λειομυωμάτων και των λειομυοσαρκωμάτων. Το επιτόπιο H βρέθηκε σε τέσσερα πολυπεπτίδια ίδιων μοριακών βαρών στα λειομύματα και στο μυομήτριο. Είναι πιθανό, ότι η περαιτέρω ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των τεσσάρων πολυπεπτιδίων με μοριακά βάρη 100.000, 61.000, 59.000 και 54.000, που φέρουν το επιτόπιο H, μπορεί να διαλευκάνει το ρόλο που έχουν στην φυσιολογία του μυομητρίου και στην παθολογία των λειομυωμάτων και των λειομυοσαρκωμάτων.

ΜΥΟΜΗΤΡΙΟ

Στο μυομήτριο οι μυϊκές δεσμίδες, τα αγγεία και ο συνδετικός ιστός βρίσκονται σε στενή σχέση και διαπλοκή (1). Το σώμα της μήτρας αποτελείται κατά το 28% από μυϊκές ίνες ο αριθμός των οποίων ελαττώνεται στον ισθμό και τον τράχηλο. Το μυομήτριο εμφανίζει τρεις στιβάδες χωρίς σαφή όρια, την έξω, τη μέση και την έσω στιβάδα.

Η παχύτερη στιβάδα (κατά πολύ πιο παχιά από τις άλλες) είναι η μέση, που έχει πλούσια αιμάτωση (αγγειώδης στιβάδα). Οι μυϊκές δεσμίδες σχηματίζουν στο σώμα της μήτρας ένα τρισδιάστατο δίκτυο, που φέρεται παράλληλα κυρίως προς την επιφάνεια της μήτρας και προσφύεται στο τοίχωμα των αγγείων. Στον ισθμό και στον τράχηλο υπάρχουν βαθμιαία ανιούσες κυκλοτερείς μυϊκές δεσμίδες. Επομένως σε καισαρική τομή δια του ισθμού οι μυϊκές δεσμίδες μπορούν να διαχωρισθούν με εγκάρσια τομή. Η μέση μυϊκή στιβάδα αποτελεί την κύρια δύναμη εξώθησης κατά τον τοκετό. Η έσω στιβάδα, υπό το βλεννογόνο, αποτελείται κυρίως από κυκλοτερείς μυϊκές δεσμίδες (υποβλεννογόνια ή υπαγγειώδης στιβάδα). Θεωρείται ότι συμβάλλει στη σύσπαση των αγγείων κατά την αποκόλληση του πλακούντα μετά τον τοκετό. Η έξω στιβάδα, που είναι και αυτή λεπτή, αποτελείται από 4 εναλλασσόμενα πέταλα επιμήκων και κυκλοτερών μυϊκών δεσμίδων (υπεραγγειώδης στιβάδα). Ίσως συμβάλλουν στην προσαρμογή της επιφάνειας της μεγεθυνόμενης κατά την κύηση

μήτρας. Οι λείες μυϊκές ίνες της μήτρας κατά την κύηση μεγεθύνονται μέχρι περίπου 7-10 φορές από το αρχικό μέγεθός τους.

Ο ισθμός επίσης μεταβάλλεται. Κατά την αμφίχειρη εξέταση ψηλαφάται μαλακός σε αντίθεση με τη σκληρία του τραχήλου (σημείο του Hegar της κύησης). Στην αύξηση του μεγέθους της μήτρας κατά την κύηση συμβάλλουν τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη αλλά και το ερέθισμα διάτασης που προκαλείται από το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Ο τράχηλος της μήτρας έχει ιδιαίτερη κατασκευή. Ο τράχηλος παραμένει κλειστός σε όλη τη διάρκεια της κύησης αλλά κατά τον τοκετό πρέπει να διασταλεί γρήγορα μέχρι το μέγεθος της κεφαλής του εμβρύου που γεννιέται. Για να γίνει αυτό συμμετέχουν παθητικοί και ενεργητικοί μηχανισμοί: Η παθητική μεγέθυνση έχει ήδη προετοιμασθεί από την αυξημένη περιεκτικότητα του τραχήλου σε υγρό, το οποίο κατά τον τοκετό εισέρχεται στο συνδετικό ιστό, τα φλεβώδη πλέγματα διευρύνονται και οι αδένες του τραχήλου μεγαλώνουν. Η ενεργητική διαστολή του τραχήλου γίνεται με την αναδιάταξη των μυϊκών δεσμίδων και των ινών του συνδετικού ιστού. Στη μήτρα που δε βρίσκεται σε κύηση τα στοιχεία αυτά που βρίσκονται κοντά στο βλεννογόνο φέρονται σχεδόν κυκλοτερώς. Μέχρι τον 7ο όμως μήνα της κύησης αρχίζουν να παίρνουν περισσότερο επιμήκη φορά απ' ότι στη μη εγκύμονα μήτρα. Συνέχονται εν μέρει με τις επιμήκεις μυϊκές δεσμίδες του σώματος ("κατιούσες δεσμίδες") και εν μέρει με αυτές του κολεού ("ανιούσες δεσμίδες"). Η έλξη αυτών των μυϊκών δεσμίδων κατά τον τοκετό προκαλεί διάνοιξη του έσω και του έξω στομίου του τραχήλου.

ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΩΝ

Έχει υπολογιστεί ότι τουλάχιστον 20% των γυναικών και μέχρι και το 40% των γυναικών πάνω από σαράντα ετών, έχουν λειομύωματα στη μήτρα. Μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτά τα νεοπλάσματα προκαλούν κλινικά συμπτώματα, συνήθως ανώμαλη μητρορραγία και πόνο. Τα λειομύωματα όταν είναι μεγάλα ή όταν είναι πολλαπλά μπορεί να είναι υπεύθυνα για στειρότητα. Περίπου είκοσι ασθενείς με λειομύωμα είχαν σύγχρονη ερυθροκυττάρωση και η παραγωγή ερυθροποιητίνης από το λειομύωμα θεωρείται σχεδόν συνήθως σαν ο υπεύθυνος μηχανισμός και σε τρεις περιπτώσεις η ερυθροποιητίνη έχει δειχτεί στα λειομύωματα (2, 3, 4).

Επειδή τα λειομύωματα είναι συνήθως πολλαπλά και αναπτύσσονται μέσα στο λείο μυϊκό ιστό του μυομητρίου, έχει γεννηθεί η απορία εάν είναι πραγματικά νεοπλάσματα ή τοπικές υπερπλασίες των λείων μυϊκών κυττάρων. Αυτή η απορία λύθηκε ικανοποιητικά με μια από τις πρώτες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τα ισοένζυμα της γλυκόζης-6-φωσφορικής αφυδρογονάσης (G6PD) σαν κυτταρικοί δείκτες (5). Ένα λείο μυϊκό κύτταρο περιέχει είτε την Α ή την Β μορφή του ισοενζύμου της G6PD και το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου βρίσκεται στο Χ χρωμόσωμα. Μερικές γυναίκες της μαύρης φυλής είναι ετεροζυγώτες γι' αυτό το ένζυμο και με την τυχαία εξουδετέρωση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα, που

γίνεται ενωρίς στην εμβρυϊκή ζωή, οι λείες μυϊκές ίνες του μυομητρίου τους αποτελούν μωσαϊκό γι' αυτό το ένζυμο, με αποτέλεσμα ορισμένες ίνες να περιέχουν την Α μορφή, ενώ οι υπόλοιπες την Β μορφή του ισοενζύμου. Εν τούτοις έχει δειχθεί ότι όλα τα λεία μυϊκά κύτταρα ενός λειομύωματος περιέχουν είτε την Α μόνο είτε την Β μόνο μορφή του ισοενζύμου με αποτέλεσμα να αποδεικνύεται ότι τα κύτταρα ενός λειομύωματος προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό ενός μόνο κλώνου κυττάρων.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΩΝ ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΩΝ

Μακροσκοπική εικόνα

Τα λειομύωματα απαντούν σ' όλη την έκταση της μήτρας, αλλά είναι πιο συχνά στον πυθμένα της. Ποικίλουν σε μέγεθος από μικροσκοπικά οζίδια μέχρι μεγάλων διαστάσεων όγκοι, που μπορεί να ζυγίζουν μέχρι 50 κιλά και να γεμίζουν την πύελο (8). Τα λειομύωματα συχνά είναι πολλαπλά, διευρύνουν και παραμορφώνουν την μήτρα σε τέτοιο βαθμό ώστε παρεμποδίζουν την γονιμότητα της γυναίκας. Ένα μεγάλο μονήρες λειομύωμα, μπορεί να μεγεθύνει διαχύτως την μήτρα και να δώσει την εντύπωση εγκυμονούσας μήτρας. Η εντόπισή τους μπορεί να είναι υπορογόνια, ενδοτοιχική ή υποβλεννογόνια και η εντόπισή τους καθορίζει και την φύση των συμπτωμάτων της ασθενούς.

Τα υπορογόνια λειομύματα σπανίως προκαλούν συμπτώματα εκτός αν είναι πολύ μεγάλα και ογκώδη. Σ' αυτή την περίπτωση μπορεί να προκαλέσουν πόνο και αίσθημα βάρους. Αν είναι μισχωτά μπορεί να περιστραφεί ο μίσχος τους και να προκληθούν συμπτώματα οξέος κοιλιακού άλγους. Τα μισχωτά λειομύματα φαίνονται συχνά σαν να κολυμπούν στην κοιλία π.χ. δίνουν την εντύπωση ελευθέρως κινουμένων μαζών κατά την ψηλάφηση. Τα υπορογόνια λειομύματα μπορεί να προσκολληθούν σε μία θέση του κοιλιακού τοιχώματος να αποκτήσουν καινούργια αιμάτωση στην νέα θέση και μετά να αποχωρισθούν από τη μήτρα κατόπιν αποκοπής του μίσχου τους. Τότε ονομάζονται παρασιτικά λειομύματα και δεν πρέπει να συγχέονται με τα μεταστατικά λειομυοσαρκώματα.

Τα ενδοτοιχικά λειομύματα όταν προκαλούν συμπτώματα δημιουργούν αίσθημα βάρους, κυκλικούς πόνους, δυσμηνορραγία ή υπερμηνορραγία.

Τα υποβλεννογόνια λειομύματα, είναι συχνά αιτία ανώμαλης αιμορραγίας της μήτρας (9). Ακόμα μπορεί να προβάλλουν από το τραχηλικό στόμιο και όταν συνδυάζονται με νέκρωση και αιμορραγία δίδουν μακροσκοπικά την εντύπωση κακοήθους νεοπλασματος.

Τα λειομύωματα χαρακτηριστικά είναι συμπαγή ελαστικά και λευκά. Οι μυϊκές ίνες συχνά σχηματίζουν περιστρεφόμενες και διαπλεκόμενες δεσμίδες οι οποίες φαίνονται μακροσκοπικά στην κομμένη επιφάνειά τους που προβάλλει στην επιφάνεια διατομής. Συχνά περιβάλλονται από ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού που τα ξεχωρίζει από το παρακείμενο μυομήτριο. Τα λειομύωματα χαρακτηριστικά διαθέτουν ένα ομαλό, μη διηθητικό, πιεστικό όριο και μπορούν εύκολα να αποκολληθούν ή να ξεχωριστούν από το παρακείμενο φυσιολογικό μυομήτριο. Δεν είναι όμως ασύνηθες για κάποιο λειομύωμα να δείχνει ασαφή όρια σχετικά με το παρακείμενο μυομήτριο. Εκτροπή από τη συνήθη λευκή στροβιλώδη εμφάνιση είναι σχετικά συχνή και είναι το αποτέλεσμα μιας ποικιλίας αλλοιώσεων στις μυϊκές ίνες που συλλογικά ονομάζεται εκφύλιση (10). Η εκφύλιση έχει ταξινομηθεί σαν υαλοειδής, κυστική, μυξωματώδης, βλενωδής και ασβεστοποιός. Κάθε μια απ' αυτές τις εκφυλίσεις καταλήγει σε μία διαφορετική μακροσκοπική εικόνα.

Η υαλοειδής εκφύλιση χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση των λείων μυϊκών ινών από άμορφη θεμέλια ουσία και κολλαγόνο και κάνει το λειομύωμα να φαίνεται μαλακό, ωχρο και ομοιογενές. Μερικές φορές οι χαμηλωμένες υαλοειδείς περιοχές ενός λειομύωματος εναλλάσσονται με υπερυψωμένες φυσιολογικές περιοχές και δίνουν την εντύπωση λιθόστρωτου στην επιφάνεια διατομής.

Η κυστική εκφύλιση είναι το αποτέλεσμα υδρωπικής μετατροπής περιοχών με υαλοειδή εκφύλιση με αποτέλεσμα την δημιουργία κυστικών χώρων που περιέχουν διαυγές υγρό.

Η ασβεστοποιός εκφύλιση προέρχεται από την εναπόθεση αλάτων ασβεστίου σε υαλοειδοποιημένες περιοχές, και μπορεί να είναι τόσο εκτεταμένες ούτως ώστε ο όγκος να είναι σκληρός και να δίνει την εντύπωση οστού.

Η μυξωματώδης εκφύλιση δίνει στο λειομύωμα την μακροσκοπική εικόνα και την υφή ενός ρινικού πολύποδα. Όταν η εκφύλιση είναι εκτεταμένη ο όγκος φαίνεται λευκόφαιος, ζελατινώδης, γλιστερός και ατομικές μυϊκές δεσμίδες δεν είναι δυνατόν να είναι ορατές.

Η βλεννώδης εκφύλιση φαίνεται μακροσκοπικά ίδια με την μυξωματώδη αλλά διαφέρει κάπως μικροσκοπικά.

Η ερυθρά εκφύλιση προέρχεται είτε από υπεραιμία ή έμφρακτο του λειομυώματος και δίνει στον όγκο εμφάνιση και υφή μπριζόλας ή ωμού κρέατος.

Όσο αυτές οι εκφυλισμένες μορφές αναγνωρίζονται σαν ποικιλίες ή μετατροπή του λειομύματος οι μακροσκοπικές και οι μικροσκοπικές διαφορές τους δεν έχουν καμία πρακτική αξία.

Τα λειομυοσαρκώματα τυπικά έχουν μία λευκόφαιη μαλακή σύσταση και μπορεί να μοιάζουν με λειομύματα που παθαίνουν υαλοειδή, μυξοειδή ή βλεννώδη εκφύλιση (11, 12). Εξυπακούεται ότι η διάγνωση ενός εκφυλισμένου λειομύματος δεν πρέπει να γίνεται μόνο μακροσκοπικά αλλά όλα τα λειομύματα που παρουσιάζουν εκφύλιση και έχουν μορφολογία που εκτρέπεται από την συνηθισμένη τους φυσιολογική μορφή πρέπει να εξετάζονται με προσοχή μικροσκοπικά για να αποκλεισθεί με σιγουριά η περίπτωση λειομυοσαρκώματος.

Από την άλλη μεριά είναι σπάνιο για ένα λειομυοσάρκωμα να έχει την τυπική μορφολογία ενός λειομύματος. Πολλαπλοί όγκοι με την τυπική μορφολογία του λειομύματος πρέπει για σιγουριά να εξετάζονται μικροσκοπικώς όλοι, εάν δε τούτο δεν είναι εφικτό και πρακτικό τουλάχιστον πρέπει να τέμνονται και να εξετάζονται μακροσκοπικά και στην περίπτωση που κάποιος διαφέρει από την τυπική μορφολογία των λειομυωμάτων να είναι αυτοί που πρέπει να προτιμηθούν να εξετασθούν μικροσκοπικά.

Μικροσκοπική εικόνα

Το κλασσικό λειομύωμα είναι εύκολο να αναγνωρισθεί και δεν παρουσιάζει διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα. Χαρακτηριστικά ένα λειομύωμα αποτελείται από επιμήκη κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα που χωρίζονται μεταξύ τους από ποικίλο ποσό συνδετικού ιστού. Εν τούτοις όταν τα κύτταρα κόβονται εγκάρσιως παρουσιάζουν στρογγυλό σχήμα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα σχηματίζουν δεσμίδες που περιστρέφονται και τοποθετούνται κάθετα σε παρακείμενες δεσμίδες.

Το κυτταρόπλασμα των λείων μυϊκών κυττάρων είναι ηωσινόφιλο σε χρώσεις ηωσίνης και αιματοξυλίνης και ερυθρό στην τριχρωμική χρώση. Τα κυτταροπλασματικά ινίδια μπορεί μερικές φορές να γίνουν ορατά με τη χρώση του φωσφοροβολφραμικού οξέος - αιματοξυλίνης.

Οι πυρήνες των λείων μυϊκών κυττάρων στα περισσότερα λειομύωματα είναι επιμήκεις με αμβλεία άκρα σε σχήμα τσιγάρου και ομοιόμορφοι. Συνήθως δεν σχηματίζουν πασσαλωτή διάταξη όπως τα νευριλεϊμώματα. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες ή απύσες στα συνήθη λειομύωματα. Μεγάλοι πυρήνες γιγαντοκυττάρων και κυτταροβριθείς περιοχές με μικρή πυρηνική ατυπία μπορεί να συναντηθούν σε μερικά λειομύωματα (13, 14, 15). Οι ίνες ρετικουλίνης είναι άφθονες, πυκνές και τοποθετούνται παράλληλα στον επιμήκη άξονα των λείων μυϊκών κυττάρων. Πολλά λειομύωματα περιέχουν αρκετό κολλαγόνο το οποίο μπορεί να βαφεί με την ελαστική χρώση Van Gieson ή την

τριχρωμική χρώση. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει δώσει το όνομα "ινώδες", γι' αυτό πολλοί ονομάζουν τα λειομύματα, ινομύματα.

Όταν υπάρχει αρκετό κολλαγόνο τότε τα νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα αποχωρίζονται μεταξύ τους περισσότερο από τα φυσιολογικά του παρακείμενου μυομητρίου.

Τα λειομύματα συνήθως έχουν ομαλά όρια που απωθούν τους γύρω ιστούς αλλά μερικές φορές τα όρια είναι ανώμαλα και δεν μπορούν να ξεχωριστούν από το παρακείμενο μυομήτριο. Όταν τα όρια είναι ασαφή η διάγνωση εξαρτάται από το στροβιλοειδές σχεδιάγραμμα των μυϊκών δεσμίδων στο κεντρικό τμήμα του νεοπλάσματος. Ο όρος "αδενομύωμα" χρησιμοποιείται όταν υπερτροφικά υπερπλαστικά οζίδια λείου μυϊκού ιστού περιλαμβάνουν αδένια και στρώμα ενδομητρίου. Αυτή η αλλοίωση αποτελεί τμήμα του φάσματος της αδενομύωσης και ο όρος είναι αδόκιμος. Οι φλέβες είναι σπάνιες στα λειομύματα συγκριτικά με τον μεγάλο αριθμό αρτηριών μέσα στον όγκο (16). Εν τούτοις αυτές οι φλέβες στην περιφέρεια του όγκου είναι διατεταμένες και συμφορητικές και μπορεί να είναι ορατές μακροσκοπικά. Η φλεβική διάταση προκαλείται από την τοπική πίεση του όγκου και μπορεί να είναι αιτία αιμορραγίας στα υποβλεννογόνια λειομύματα.

Οι εκφυλιστικές αλλοιώσεις που είναι μακροσκοπικά ορατές μπορούν να εκτιμηθούν καλύτερα μικροσκοπικά.

Η υαλοειδής εκφύλιση είναι συχνή στα λειομύματα συνήθως όταν είναι μεγάλα. Η "υαλίνη" είναι ινιδώδες ηωσινόφιλο υλικό το οποίο αντικαθιστά τις λείες μυϊκές ίνες. Όταν "υδροποιείται" παράγει μονήρεις ή πολλαπλές κύστεις ποικίλλων μεγεθών και όταν το φαινόμενο είναι εκτεταμένο παράγεται η κυστική εκφύλιση. Οι κύστεις περιέχουν κολλώδες υλικό αλλά δεν επενδύονται από επιθήλιο.

Η μυξοειδής εκφύλιση χαρακτηρίζεται μικροσκοπικά από διασπαρμένους πυρήνες μέσα σε ένα άμορφο, ωχρο, ελαφρώς κυανό ινιδώδες υλικό.

Η βλεννώδης εκφύλιση χαρακτηρίζεται από λίμνες κυανού βλεννώδες υλικού που ξεχωρίζει τις λείες μυϊκές ίνες και έτσι ξεχωρίζει λίγο χωρίς καμμία πρακτική διαφορά από την μυξωματώδη εκφύλιση.

Η ασβεστοποιός εκφύλιση χαρακτηρίζεται από άμορφη ιώδη εναπόθεση αλάτων, ασβεστίου στην χρώση ηωσίνης- αιματοξυλίνης.

Η ερυθρά εκφύλιση παρουσιάζει διάχυτη αιμορραγία και οίδημα στα λειομύματα και συμφόρηση των αρτηριών.

Το πραγματικό έμφρακτο προκαλεί νέκρωση των μυικών κυττάρων με μεγάλο αριθμό καρδιορρηκτικών πυρήνων, οξεία φλεγμονή και αιμορραγία. Οξεία φλεγμονή και αποστηματοποίηση μπορεί να προκληθεί από μικροβιακή μόλυνση ιδίως στα υποβλεννογόνια λειομύματα (17). Η οξεία φλεγμονή και αποστηματοποίηση μπορεί να ξεχωρισθεί και μακροσκοπικά από το έμφραγμα γιατί το τελευταίο παρουσιάζει ερυθρές περιοχές ενώ η αποστηματοποίηση χαρακτηρίζεται από διάσπαρτες στικτές και κίτρινες περιοχές.

Η λιπώδης εκφύλιση χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση λίπους στα λεία μυϊκά κύτταρα ή στα μακροφάγα ιστιοκύτταρα και συχνά συνοδεύει την υαλοειδή εκφύλιση και δεν πρέπει να συγχέεται με το λειομυολίπωμα στο οποίο παρατηρείται παρουσία ώριμων λιποκυττάρων ανάμεσα στα λεία μυϊκά κύτταρα του όγκου. Ο παθολογοανατόμος πρέπει να είναι οικείος με αυτές τις εκφυλιστικές βλάβες και να γνωρίζει ότι συμβαίνουν στα λειομύματα. Όταν τα λειομύματα εκφυλίζονται γίνονται μαλακά και λευκόφαια και μοιάζουν με λειομυοσαρκώματα μακροσκοπικά γι' αυτό σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να λαμβάνονται αρκετές θέσεις για τομές για να αποκλεισθεί η παρουσία λειομυοσαρκώματος ιστολογικά. Το ενδομήτριο που πιέζεται πάνω από ένα υποβλεννογόνιο λειομύωμα και αυτό που βρίσκεται στην απέναντι

πλευρά και πιέζεται από ένα λειομύωμα είναι γενικά ατροφικό εν τούτοις το ενδομήτριο στην περιφέρεια του όγκου μπορεί να περιέχει επιμηκυσμένα και κυστικώς διευρυσμένα αδένια. Επιπρόσθετα τα ενδομητρικά αδένια κοντά σε ένα λειομύωμα μπορεί να χωρίζονται από λείες μυϊκές ίνες. Ο συνδυασμός των παραπάνω αλλοιώσεων του ενδομητρίου σε ξέσματα ενδομητρίου μπορεί να υποδηλώσει την παρουσία ενός λειομυώματος (18).

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΩΝ

Εκτός από το κλασσικό τύπο λειομυώματος και τις εκφυλισμένες παραλλαγές του υπάρχουν και διάφοροι άλλοι τύποι λειομυωμάτων, που κατατάσσονται ως εξής:

1) Λειομύωμα με λεμφική διήθηση

Ο τύπος αυτός του λειομυώματος μπορεί να προκαλέσει διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα γιατί μπορεί να θεωρηθεί σαν λέμφωμα. Ο τύπος αυτός του όγκου χαρακτηρίζεται από μεγάλη διήθηση από φλεγμονώδη στοιχεία, που αποτελούνται από μικρά λεμφοκύτταρα, (ανοσοβλάστες) και πλασματοκύτταρα. Ακόμα μπορεί να παρατηρηθούν βλαστικά λεμφικά κέντρα. Το περιβάλλον μιομήτριο συνήθως μένει απρόσβλητο (19, 20).

2) Κυτταροβριθές λειομύωμα

Ο τύπος αυτός του νεοπλάσματος χαρακτηρίζεται από αυξημένη κυτταροβριθεία, χωρίς όμως άτυπες κυτταρικές μορφές ή αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Η φυσική ιστορία του φαίνεται να είναι η ίδια με του κλασσικού λειομύωματος. Η διαφορική διάγνωσή του πρέπει να γίνει από το λειομυοσάρκωμα και τα νεοπλάσματα του στρώματος του ενδομητρίου (21).

3) Άτυπο, συμπλασμικό ή πολύμορφο λειομύωμα

Ο τύπος αυτός του λειομύωματος περιέχει κύτταρα με άτυπες ανώμαλες μορφές που διαφέρουν πολύ σε σχήμα και μέγεθος. Έχουν μεγάλους υπερχρωματικούς πυρήνες και παρουσιάζουν πολλά πολυπύρνα κύτταρα. Η μιτωτική δραστηριότητα του όγκου δεν είναι αυξημένη. Σπανίως όλος ο όγκος αποτελείται από αυτά τα ανώμαλα κύτταρα. Ο όγκος μπορεί να δημιουργηθεί αυτομάτως, αλλά τις περισσότερες φορές απαντά σε ασθενείς που παίρνουν προγεστερινούχα παρασκευάσματα (22, 23).

4) Μιτωτικός δραστήριο λειομύωμα

Ο όγκος αυτός παρουσιάζει από πέντε μέχρι δέκα μιτώσεις ανά δέκα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης, αλλά τα κύτταρά του στερούνται κυτταρικής ατυπίας (24).

5) Λειομυολίπωμα

Ο τύπος αυτός του όγκου αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες και λιποκύτταρα. Πιστεύεται, ότι ο τύπος αυτός καθώς και το σπανιότερο λίπωμα προέρχεται από μεταπλασία του κλασσικού λειομύωματος (25, 26).

6) Πασσαλωτό λειομύωμα

Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται από πασσαλωτή διάταξη των πυρήνων των κυττάρων του και μπορεί να μοιάζει με νευριλείωμα.

7) Καλόηθες λειομυοβλάστωμα ή διαυγοκυτταρικό ή επιθηλιοειδές ή λειομύωμα

Ο τύπος αυτός μπορεί να αποτελείται μερικώς ή ολικώς από κύτταρα με στρογγυλό ή πολυγωνικό σχήμα και διαυγές συνήθως κυτταρόπλασμα. Ο τύπος αυτός μοιάζει με παρόμοιο τύπο που απαντά πιο συχνά στο γαστρεντερικό σωλήνα. Μορφές με ανάμεικτα επιθηλιοειδή και διαυγοκυτταρικά κύτταρα απαντώνται συχνά και έτσι θεωρούνται ποικιλίες της ίδιας οντότητας (27, 28). Μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν αποδείξει, ότι τα επιθηλιοειδή και τα διαυγή κύτταρα είναι πράγματι λεία μυϊκά κύτταρα (29, 30).

8) Παρασιτικό λειομύωμα

Ο τύπος αυτός του λειομύωματος, έχει αποχωρισθεί από τη μήτρα και έχει συνδεθεί αγγειακά, είτε με το επίπλουν είτε με το τοίχωμα της πυέλου ή άλλες ενδοκοιλιακές θέσεις, όπως το τοίχωμα του τυφλού.

9) Λειομύωμα με διαφοροποίηση σε σκελετικές ίνες.

Ο τύπος αυτός έχει περιγραφεί μόνο μία φορά (31).

10) Διάχυτος Λειομυομάτωση

Η κατάσταση χαρακτηρίζεται από προσβολή σχεδόν ολόκληρου του μυομητρίου από πολυάριθμα ασαφώς διαχωριζόμενα λειομύωματα, πολλά από τα οποία έχουν μικροσκοπικό μέγεθος. Αυτή η εξαιρετικά σπάνια οντότητα πρέπει να ξεχωριστή από τον ασαφή όρο της πρωτοπαθούς υπερτροφίας ή υπερπλασίας του μυομητρίου, που ορίζεται, όταν η μήτρα ζυγίζει πάνω από 120 γραμμάρια χωρίς να υπάρχει καμμία βλάβη του μυομητρίου (32, 33).

11) Ενδοφλέβιος λειομυομάτωση

Η οντότητα είναι εξαιρετικά σπάνια και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ωρίμου λείου μυϊκού ιστού **μέσα στον αυλό** των φλεβών της μήτρας ή του τοιχώματος της πυέλου (34, 35). Συχνά συνδυάζεται, με κλασσικά λειομύωματα της μήτρας και μπορεί να προέρχεται από αυτά (36). Η κατάσταση προσομοιάζει κλινικά και μακροσκοπικά με τον τύπο του σαρκώματος του στρώματος του ενδομητρίου που ονομάζεται ενδολεμφική στρωματική μύωση εκτός από το γεγονός, ότι στην ενδοφλέβια λειομυομάτωση παρατηρείται μακροσκοπικά προσβολή των φλεβών.

Οι δύο οντότητες ξεχωρίζουν μικροσκοπικά διότι στην ενδολέφλια λειομυομάτωση παρατηρούνται στον αυλό των φλεβών λείες μυϊκές ίνες, ενώ στην ενδολεμφική στρωματική μύωση, παρατηρούνται στον αυλό των λεμφαγγείων στρογγυλά ή ωσειδή κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου. Οι δύο καταστάσεις μπορεί να συνδέονται ιστογενετικώς καθώς υπάρχουν μερικές υβριδικές μορφές, όπου παρατηρούνται μεικτοί όγκοι από λεία μυϊκά και στρωματικά κύτταρα αφ' ενός και αφ' ετέρου υπάρχει στενή συγγένεια μεταξύ του στρώματος του ενδομητρίου και των λείων μυϊκών ινών του μυομητρίου. Η μιτωτική δραστηριότητα είναι σπάνια ή απύουσα.

Μπορεί να προσβληθούν οι φλέβες του στρογγυλού συνδέσμου, οι μητραίες φλέβες, οι λαγόνιες φλέβες και από αυτές μπορεί να προσβληθεί η κάτω κοίλη φλέβα και ο δεξιός κόλπος της καρδιάς (37). Εν τούτοις απομακρυσμένες μεταστάσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες και η πρόγνωση θεωρείται γενικά άριστη (38). Σ' ορισμένες περιπτώσεις έχει περιγραφεί, ότι οι ενδοφλέβιες μάζες αποτελούνταν από λειομυολιτώματα (39).

ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ

Τα λειομυοσαρκώματα προσβάλλουν ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας από ότι τα λειομύματα (μέσος όρος ηλικίας τα 54 έτη). Η παλιά αντίληψη, ότι τα περισσότερα λειομυοσαρκώματα προέρχονται από προυπάρχοντα λειομύματα πιθανώς δεν είναι σωστή. Το γεγονός ότι σε μια μεγάλη σειρά μελέτης το 67% των λειομυοσαρκωμάτων

ήταν μονήρη είναι ενάντια αυτής της πιθανότητας (40). Μερικά λειομυοσαρκώματα είναι μακροσκοπικά παρόμοια με τα συνηθισμένα λειομύματα, αλλά στη πλειοψηφία τους είναι μαλακά ή σαρκώδη, με νεκρωμένες ή αιμορραγικές περιοχές και σημεία διήθησης (41).

Μικροσκοπικώς είναι κυτταροβριθείς όγκοι, που αποτελούνται από ωοειδή ή ατρακτοειδή κύτταρα με μορφολογικά, υπερμικροσκοπικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά λείων μυϊκών κυττάρων. Η ακτίνη και η μυοσίνη είναι σταθερά παρούσες στο κυτταρόπλασμά τους (42).

Ένα σπουδαίο μικροσκοπικό κριτήριο στη διάκριση ανάμεσα στα λειομύματα και λειομυοσαρκώματα της μήτρας είναι ο αριθμός των μιτώσεων. Όγκοι με λιγότερες από 5 μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης στις πιο δραστήριες περιοχές συμπεριφέρονται πρακτικά πάντοτε σαν καλοήθεις όγκοι, ακόμα και αν υπάρχουν άτυπα κύτταρα, υπερχρωματικοί πυρήνες και πολυπύρηνες μορφές. Αντίστροφα οι περισσότεροι όγκοι με 10 ή περισσότερες μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης συμπεριφέρονται σαν κακοήθη νεοπλασμάτα, ακόμα και αν η ατυπία είναι πολύ μικρή. Η συμπεριφορά των όγκων που έχουν από 5 έως 9 μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης είναι λιγότερο προβλέψιμη, αλλά ένας ορισμένος αριθμός θα δώσει μεταστάσεις (43). Ευτυχώς που μόνον μια μικρή μειοψηφία των όγκων της μήτρας από λείες μυϊκές ίνες ανήκει σε αυτή τη γκρίζα ζώνη. Αυτοί οι όγκοι

χαρακτηρίζονται σαν όγκοι λείων μυϊκών ινών με ακαθόριστη, ενδιάμεση ή περιθωριακή συμπεριφορά.

Ο υπολογισμός των μιτώσεων στους όγκους των λείων μυϊκών ινών της μήτρας δέχεται κριτικές, εξαιτίας της εμφανούς έλλειψης αναπαραγωγιμότητας (44), γιατί δεν υπάρχει αμφιβολία, ότι μπορεί να επηρεασθεί από παράγοντες όπως το πάχος της τομής, η μεγέθυνση του μικροσκοπίου, οι περιοχές λήψης του δείγματος και τα κριτήρια του παρατηρητή για τις μιτώσεις (45). Το διάστημα μεταξύ αφαίρεσης του όγκου και μονιμοποίησης φαινομενικά δεν είναι σημαντικό (46). Ένα συχνό λάθος, που γίνεται είναι να μπερδέψει κανείς τους μικρούς πυκνωτικούς πυρήνες των λείων μυϊκών κυττάρων, τα μαστοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα για μιτώσεις.

Μία καλή πρακτική είναι να ερευνησει κανείς τις τομές για μία πολύ δραστήρια μιτωτική περιοχή, να υπολογίσει τις μιτώσεις σε δέκα διαδοχικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης στην περιοχή και να επαναλάβει το ίδιο τουλάχιστον για τέσσερις τέτοιες περιοχές. Στους όγκους ενδιάμεσης βιολογικής συμπεριφοράς πρέπει να λαμβάνεται ένας ικανός αριθμός block και ο Kempson (47) συστήνει να λαμβάνονται τουλάχιστον 10 block ή ένα ανά εκατοστό διαμέτρου του όγκου, εξαρτώμενο από το ποιο από τα δύο μέτρα δίνει μεγαλύτερο αριθμό blocks. Η τομή πρέπει να έχει πάχος γύρω στα 5 μικρά. Υψηλή μεγέθυνση σημαίνει ένας 10X προσοφθάλμιος φακός και ένας 40X αντικειμενικός φακός. Μόνον οι αναμφισβήτητες μιτώσεις πρέπει να υπολογίζονται. Αν

ακολουθούνται αυτές οι αυστηρές προδιαγραφές, τότε ο αριθμός των μιτώσεων παραμένει ένα σημαντικό κριτήριο διάκρισης λειομυμάτων και λειομυοσαρκωμάτων της μήτρας (48).

Στις περισσότερες περιπτώσεις η αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα συνοδεύεται από ένα έως περισσότερα από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: Κυτταροβρίθεια, νέκρωση των νεοπλασματικών κυττάρων, εκτεταμένο μυξοειδές στρώμα, σχηματισμός γιγαντοκυττάρων, πολυμορφία και υπερχρωμασία (49).

Η σύγχρονη τάση είναι να υπολογίζονται εκτός από την μιτωτική δραστηριότητα και άλλοι παράμετροι, όπως η κυτταρική ατυπία και η πηκτική νέκρωση των νεοπλασματικών κυττάρων. Παραδείγματος χάριν υπάρχουν περιπτώσεις όγκων λείων μυϊκών κυττάρων της μήτρας συνήθως σε νέα άτομα, οι οποίοι μακροσκοπικά και μικροσκοπικά φαίνονται σαν τυπικά λειομύματα. Όμως εστιακά είχαν ένα μιτωτικό δείκτη που κυμαινόταν από πέντε μέχρι δεκαπέντε μιτώσεις ανά δέκα οπτικά πεδία υψηλής μεγέθυνσης. Σ' αυτές τις περιπτώσεις οι όγκοι μπορούν να χαρακτηρισθούν σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, όχι λειομυοσαρκώματα αλλά μιτωτικώς δραστήρια λειομύματα. Ένα εντελώς αντίθετο παράδειγμα, όσον αφορά τη μιτωτική δραστηριότητα, αποτελεί το μεταναστεύον ή μεταναστευτικό λειομύωμα, το οποίο αντιπροσωπεύει ένα φαινομενικά καλοήγη όγκο των λείων μυϊκών ινών με μικρή ή μηδενική μιτωτική δραστηριότητα ο οποίος όμως συνοδεύεται από οζίδια όγκου στους πνεύμονες ή στους επιχώριους λεμφαδένες με την ίδια ιστολογική εμφάνιση του

πρωτοπαθούς όγκου της μήτρας (50, 51, 52). Ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς δειγματοληψίας του πρωτοπαθούς όγκου στη μήτρα ή να αποτελούν σύγχρονη ανάπτυξη ανεξαρτήτων όγκων στους πνεύμονες (53).

Ο Bell και οι συνεργάτες του (54) έχουν αναλύσει 213 περιπτώσεις προβληματικών όγκων λείων μυϊκών ινών με τη συνδυασμένη μορφολογική προσέγγιση, έχοντας δώσει έμφαση στην σπουδαιότητα της πηκτικής νέκρωσης του όγκου και έχουν ταξινομήσει τους όγκους σε πέντε κατηγορίες, όπως παρουσιάζονται στην κατηγοριοποίηση που ακολουθεί.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

ΟΜΑΔΑ I: Όγκοι με μιτωτικό δείκτη που κυμαίνεται από 5 μέχρι 10 μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης, με πηκτική νέκρωση νεοπλασματικών κυττάρων και με φυσιολογική μορφολογία ή το πολύ ελαφρά κυτταρική ατυπία. Όλοι οι όγκοι αυτής της ομάδας, εκτός από ένα, συμπεριφέρθηκαν βιολογικά σαν καλοήθεις όγκοι και οι συγγραφείς προτείνουν γι' αυτούς την ονομασία λειομυώματα με αυξημένο μιτωτικό δείκτη.

ΟΜΑΔΑ II: Όγκοι χωρίς πηκτική νέκρωση, με διάχυτη μέτρια ή έντονη ατυπία και μιτωτικό δείκτη με δέκα μιτώσεις ανά δέκα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης πρέπει να ονομάζονται λειομυοσαρκώματα.

ΟΜΑΔΑ III: Όγκοι με διάχυτη μέτρια ή έντονη ατυπία και πηκτική νέκρωση. Αυτοί οι όγκοι είναι λειομυοσαρκώματα ανεξαρτήτως του μιτωτικού δείκτη.

ΟΜΑΔΑ IV: Όγκοι με ασήμαντη κυτταρική ατυπία αλλά με πηκτική νέκρωση. Αυτοί οι όγκοι πρέπει να ονομάζονται λειομυοσαρκώματα όταν ο μιτωτικός δείκτης ξεπερνά τις 10 μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης.

ΟΜΑΔΑ V: Όγκοι χωρίς πηκτική νέκρωση και ατυπία που είναι μέτρια ή έντονη αλλά είναι εστική ή πολυεστιακή παρά διάχυτη. Αυτοί έχουν ευνοϊκή πορεία ακόμα και αν περιπτώσιακώς ο μιτωτικός δείκτης είναι υψηλός.

Ορισμένα λειομυοσαρκώματα έχουν επιθηλιοειδή ή διαυγοκυτταρική εμφάνιση και αναφέρονται σαν **κακοήθη λειομυοβλαστώματα ή διαυγοκυτταρικά επιθηλιοειδή λειομυοσαρκώματα**. Φαίνεται πάλι, ότι ο αριθμός των μιτώσεων είναι το καλύτερο μέσο για να τα ξεχωρίσει από τα πιο συχνά αντίστοιχά τους καλοήθη νεοπλάσματα. Άλλοι βοηθητικοί παράγοντες είναι το μεγάλο μέγεθος, τα διηθητικά όρια, η απουσία

υαλοειδοποίησης και η παρουσία νέκρωσης (55, 56). Το επιθηλιοειδές στοιχείο αυτών των όγκων μπορεί να πάρει τη μορφή μεταστατικού καρκινώματος (57).

Τα μυξοειδή λειομυοσαρκώματα αντιπροσωπευουν μία σπάνια αλλά σημαντική ποικιλία λειομυοσαρκωμάτων της μήτρας και του στρογγυλού συνδέσμου (58, 59).

Μακροσκοπικά έχουν μία ζελατινώδη εμφάνιση και ένα φαινομενικά καλά περιγεγραμμένο όριο. Μικροσκοπικά είναι διηθητικά και πολύ μυξοματώδη. Εστιακά δεσμίδες από τυπικά λεία μυϊκά κύτταρα εναλλάσσονται με αδιάκριτα μεσεγχυματικά κύτταρα. Γι' αυτή τη ποικιλία του λειομυοσαρκώματος, ο μεταστατικός μιτωτικός δείκτης δεν έχει εφαρμογή, γιατί οι όγκοι έχουν την τάση να επανεμφανίζονται και να δίνουν μεταστάσεις ανεξάρτητα αν οι μιτώσεις είναι σπάνιες ή πολλές (59, 60).

Σπανίως μερικά λειομυοσαρκώματα περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό γιγαντοκυττάρων σαν οστεοκλάστες (61, 62). Τα λεία μυϊκά χαρακτηριστικά των ατρακτοκυττάρων ξεχωρίζει αυτό τον όγκο από τα κακοήθη ινώδη ιστιοκυτώματα και τον κακοήθη γιγαντοκυτταρικό όγκο.

Δεν υπάρχει σταθερή συσχέτιση μεταξύ επιβίωσης και βαθμού κακοηθείας του όγκου.

Η επέκταση έξω από τα όρια της μήτρας είναι ένα εύρημα με πολύ κακή πρόγνωση

(63). Από 20 ασθενείς, που μελετήθηκαν από τον Bart Sich (64) και τους συνεργάτες του, στις οποίες παρατηρήθη επέκταση του όγκου πέρα από τη μήτρα δεν υπήρχαν επιζώντες μετά από 29 μήνες. Η πιο συχνή εκδήλωση της κακοήθειας είναι η τοπική επανεμφάνιση στην πύελο.

Όμως μακρινές μεταστάσεις ιδιαίτερα στους πνεύμονες μπορεί να συμβούν χωρίς να συνοδεύονται από τοπική επανεμφάνιση. Η προσβολή των λεμφαδένων είναι σπάνια.

ΚΕΡΑΤΙΝΕΣ

Τα **ενδιάμεσα ινίδια της κερατίνης**, που απαντούν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα από τα πέντε είδη ενδιάμεσων ινιδίων των κυττάρων. Τα υπόλοιπα τέσσερα είναι τα **νευροϊνίδια** που απαντούν στα νευρικά κύτταρα, **τα ινίδια της όξινης πρωτεΐνης της γλοίας**, που απαντούν κυρίως στα νευρογλοιακά κύτταρα με χαρακτηριστικότερους εκπροσώπους τα αστροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα του νευρικού συστήματος, **τα ινίδια της δεσμίνης**, που απαντούν στα μυϊκά κύτταρα (σκελετικές μυϊκές ίνες, λείες μυϊκές ίνες, καρδιακές μυϊκές ίνες) και **τα ινίδια της βιμεντίνης**, που απαντούν κυρίως στα μεσεγχυματικά κύτταρα.

Όλα τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν πάχος 10 nm.

Τα ινίδια της κερατίνης σχηματίζονται από τον πολυμερισμό των μορίων των κερατινών. Οι κερατίνες είναι πρωτεΐνες είκοσι ειδών. Αρχικά περιγράφησαν δεκαεννέα πρωτεΐνες και αργότερα προστέθηκε και η εικοστή. Οι κερατίνες ή κυτταροκερατίνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό ΡΗ. Το ισοηλεκτρικό τους ΡΗ κυμαίνεται από 5-8 και το μοριακό τους βάρος από 40.000-68.000. Τα ινίδια της κερατίνης δημιουργούνται από τον πολυμερισμό και την ένωση διαφόρων ειδών κυτταροκερατινών, ανάλογα με το είδος του επιθηλιακού κυττάρου στο οποίο απαντούν. Αξιοσημείωτο είναι, ότι τα νεοπλάσματα, που προέρχονται από διάφορα είδη επιθηλιακών κυττάρων διατηρούν συνήθως τα ίδια είδη κερατινών με τα αντίστοιχά τους φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα.

Αναλυτικά τα πολυπεπίδια των κερατινών ή κυτταροκερατινών κατατάσσονται ως ακολούθως:

Η **κερατίνη 1** με μοριακό βάρος 68.000 και η **κερατίνη 2 με μοριακό βάρος 65.500**. Τα πεπίδια αυτά απαντούν κυρίως στην επιδερμίδα (65), στο πλακώδες επιθήλιο του πρωκτικού σωλήνα και στο πλακώδες επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας (66).

Η **κερατίνη 3** με μοριακό βάρος 63.000 απαντά στο επιθήλιο του κερατοειδούς του οφθαλμού του ανθρώπου.

Η **κερατίνη 4** με μοριακό βάρος 59.000, η **κερατίνη 5** με μοριακό βάρος 58.000, και η **κερατίνη 6** με μοριακό βάρος 56.000, απαντούν σε διάφορες αναλογίες στα πολύστοιβα πλακώδη μη κερατινοποιούμενα επιθήλια, όπως αυτό της γλώσσας καθώς και στο ψευδοπολύστοιβο κροσσωτό της τραχείας, στο επιθήλιο των αποκρινών και ιδρωτοποιών αδένων του δέρματος και στο επιθήλιο των αδένων του μαστού. Ακόμα τα πολυπεπίδια 5 και 6 απαντούν στην επιδερμίδα και στα θυλάκια των τριχών (67).

Η **κερατίνη 7** με μοριακό βάρος 54.000 και η **κερατίνη 8** με μοριακό βάρος 52.500 απαντούν σε διάφορα απλά επιθήλια, στο ψευδοπολύστοιβο κροσσωτό επιθήλιο της τραχείας, στο μεταβατικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστεως και στο επιθήλιο διαφόρων πολύπλοκων αδένων (68).

Η **κερατίνη 9** με μοριακό βάρος 64.000, η **κερατίνη 10** με μοριακό βάρος 56.500 και η **κερατίνη 11** με μοριακό βάρος 56.000, βρίσκονται μόνο στην επιδερμίδα (69). Η κερατίνη 9 είναι άφθονη στην επιδερμίδα των πελμάτων, ενώ οι κερατίνες 10 και 11 απαντούν στην επιδερμίδα των περισσότερων μερών του σώματος.

Η **κερατίνη 12** με μοριακό βάρος 55.000 απαντά στο επιθήλιο του κερατοειδούς του οφθαλμού του ανθρώπου.

Η **κερατίνη 13** με μοριακό βάρος 54.000 απαντά σε αφθονία στα πολύστοιβα πλακώδη μη κερατινοποιούμενα επιθήλια, όπως στο επιθήλιο της γλώσσας, της στοματικής κοιλότητας, του οισοφάγου, του εξωτραχήλου της μήτρας και του κολεού καθώς και του πρωκτικού σωλήνα.

Η **κερατίνη 14** με μοριακό βάρος 50.000, η **κερατίνη 15** με μοριακό βάρος 50.000, η **κερατίνη 16** με μοριακό βάρος 48.000 και η **κερατίνη 17** με μοριακό βάρος 46.000 απαντούν σε διάφορους συνδυασμούς στην επιδερμίδα, σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων (70), σε πολλά μη κερατινοποιούμενα πολύστοιβα πλακώδη επιθήλια καθώς και στο ψευδοπολύστοιβο κυλινδρικό κροσσωτό της τραχείας και στο επιθήλιο διαφόρων αδένων.

Η **κερατίνη 18** με μοριακό βάρος 45.000 παρουσιάζει την ίδια κατανομή στους ιστούς όπως και η κερατίνη 8 (71).

Η **κερατίνη 19** με μοριακό βάρος 40.000 απαντά σε ένα ευρύ φάσμα επιθηλιακών ιστών. Απαντά σε μεγάλη αναλογία στα απλά επιθήλια (72), αλλά σε μικρή αναλογία σε

διάφορα πλακώδη επιθήλια και σε ορισμένα κερατινοκύτταρα σε καλλιέργειες, αλλά δεν βρίσκεται στα ηπατοκύτταρα και στην επιδερμίδα.

Η **κερατίνη 20** με μοριακό βάρος 46.000, απαντάται στα εντεροκύτταρα.

ΚΕΡΑΤΙΝΗ 8

Η κερατίνη 8 στην αρχική κατάταξη των κερατινών στον κατάλογο του Moll (73) και των συνεργατών του αναφέρεται με μοριακό βάρος 52.500 αργότερα σε άλλες εργασίες και με λίγο τροποποιημένες τεχνικές αναφέρεται ότι έχει τελικό μοριακό βάρος 54.000.

Η κερατίνη 8 συνδέεται κυρίως με την κερατίνη 18 και λιγότερο με την κερατίνη 19 για να σχηματίσει ινίδια κερατίνης, γι' αυτό όπως προαναφέρθηκε η κατανομή της κερατίνης 8 και 18 είναι σχεδόν ταυτόσημη στους ιστούς του σώματος.

Η κερατίνη 8 απαντά στα κύτταρα των απλών επιθηλίων. Σαν απλά επιθήλια χαρακτηρίζονται όλα τα επιθήλια εκτός από το πολύστοιβο πλακώδες κερατινοποιούμενο και το πολύστοιβο πλακώδες μη κερατινοποιούμενο. Έτσι η

κερατίνη 8 βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιολίων, στα πνευμονοκύτταρα των κυψελίδων των πνευμόνων, στα κύτταρα του ψευδοπολύστοιβου κυλινδρικού κροσσωτού επιθηλίου της αναπνευστικής οδού και στα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα και του περιτοναίου. Ακόμα παρατηρείται στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων όπως του εγγύς εσπειραμένου, της αγκύλης του Henle, του άπω εσπειραμένου και των αθροιστικών σωληναρίων, καθώς και στα κύτταρα του μεταβατικού επιθηλίου της ουροφόρου οδού δηλαδή καλύκων, νεφρικής πυέλου, ουρητήρων και ουροδόχου κύστεως.

Στο δέρμα απαντά στα κύτταρα των ιδρωτοποιών αδένων και των αποκρινών αδένων π.χ. της μασχάλης.

Στο μαστό απαντά στα κύτταρα των πόρων και των αδενοκυψελών.

Στο γαστρεντερικό σύστημα βρίσκεται στα καλυπτήρια και αδενικά κύτταρα του βλεννογόνου του στομάχου, του λεπτού και του παχέος εντέρου.

Στο γεννητικό σύστημα του θήλεος βρίσκεται στα επιθηλιακά στοιχεία της ωοθήκης, της σάλπιγγος και στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και του επιθηλίου και των αδένων του ενδοτραχήλου.

Στο γεννητικό σύστημα του άρρενος βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα των όρχεων, της επιδιδυμίδας, του σπερματικού πόρου, του προστάτη και της ουρήθρας.

Στο ενδοκρινικό σύστημα βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα όλων των ενδοκρινών αδένων.

Στους εξωκρινείς αδένες απαντά τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα των αδενοκυψελών όσο και των εκφορητικών πόρων . Έτσι βρίσκεται σε αφθονία τόσο στο ήπαρ όσο και στο πάγκρεας.

Επιγραμματικά, θα μπορούσε να πει κάποιος ότι η κερατίνη 8 απαντά σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα του πολύστοιβου πλακώδους επιθηλίου κερατινοποιούμενου ή μη κερατινοποιούμενου.

Αρχικά οι κερατίνες θεωρήθηκαν μόρια τα οποία παρήγαγαν αποκλειστικά τα επιθηλιακά κύτταρα, αργότερα όμως έρευνες έδειξαν ότι οι κερατίνες μπορούν να παραχθούν και από μη επιθηλιακά κύτταρα. Έτσι έχει ανακοινωθεί, ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα (74) και οι όγκοι τους σ' ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να παράγουν κερατίνες.

ΚΕΡΑΤΙΝΕΣ ΣΕ ΛΕΙΕΣ ΜΥΪΚΕΣ ΙΝΕΣ,

ΛΕΙΟΜΥΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ

Τα ενδιάμεσα ινίδια των λείων μυϊκών ινών και των νεοπλασμάτων τους δηλαδή των λειομυωμάτων και λειομυοσαρκωμάτων είναι τα ινίδια της δεσμίνης και λέγονται ενδιάμεσα σε αντιδιαστολή με τα μικροϊνίδια της ακτίνης και τα μακροϊνίδια της μυοσίνης.

Όμως οι λείες μυϊκές ίνες και τα νεοπλάσματά τους καλοήθη και κακοήθη έχει βρεθεί ότι σ' ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να παράγουν κερατίνες. Ειδικότερα για την κερατίνη 8, οι Bader et al., (75) έχουν ανακοινώσει, ότι παράγεται σε χαμηλές ποσότητες από τα λεία μυϊκά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων των ανθρώπινου ομφάλιου λώρου μαζί με την κερατίνη 18 και 19 και ότι συνεχίζουν να παράγονται σε καλλιέργειες αυτών των λείων μυϊκών κυττάρων in vitro.

Οι Gown AM et al. (76) έχουν ανακοινώσει, ότι οι λείες μυϊκές ίνες μπορούν να παράγουν κερατίνες, που βρίσκονται στα απλά επιθήλια δηλαδή στα επιθήλια στα οποία απαντάται και η κερατίνη 8, ενώ οι Turley, H. et al. (77) έχουν δείξει βιοχημικώς ότι οι κερατίνες μπορούν να παραχθούν από τις λείες μυϊκές ίνες.

Τέλος οι Norton et al. (78) έχουν δείξει ότι μονοκλωνικά αντισώματα που είναι ειδικά για τις κερατίνες αντιδρούν με όγκους των λείων μυϊκών ινών, ενώ ο Miettinen M (79) έχει ανακοινώσει ανοσοϊστοχημικώς εντόπιση κερατίνης σε λειομυοσάρκωμα.

ΑΝΤΙΣΩΜΑ Η ΚΑΙ ΕΠΙΤΟΠΙΟ Η

Το αντίσωμα Η είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάστηκε σε ποντικούς μετά από ένεση ώριμων ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων, που πάρθηκαν από εγκεφάλους προβάτων. Τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα απομονώθηκαν από τους εγκεφάλους των προβάτων σύμφωνα με τη μέθοδο των Szuchet et al (80) κατά την οποία επιτυγχάνεται η απομόνωση των σωμάτων των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων από τα υπόλοιπα στοιχεία του νευρικού συστήματος.

Η διαδικασία παραγωγής του μονοκλωνικού αντισώματος Η έγινε ως εξής: (81) Σαν αντιγόνο χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα τα σώματα των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων.

Αρχικά χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκώς 24Χ10 ολιγοδενδροκύτταρα, σε κάθε θηλυκό ποντικό τύπου Balbc. Δεκατέσσερις μέρες αργότερα χορηγήθηκε μία δεύτερη

ενδοπεριτοναϊκή ένεση που περιείχε 15X10 ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα. Οι οροί από τα ποντίκια ελέγχοντο περιοδικά για την παρουσία αντισωμάτων. Μετά από ένα μήνα χορηγήθηκε μία τρίτη δόση ενδοφλέβια που περιείχε 16X10 ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα.

Μετά από τρεις μέρες αφαιρέθηκαν οι σπλήνες των ποντικών με άσηπτες χειρουργικές τεχνικές και τα κύτταρά τους χρησιμοποιήθηκαν για κυτταρικό υβριδισμό με κύτταρα της κυτταρικής σειράς SP2/0 που προέρχονται από πολλαπλούν μύελωμα ποντικού. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίσθηκε στην τεχνική των Kohler και Milstein (82) όπως περιγράφεται από τον Galfre και Milstein (83).

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο 4 ml κυττάρων σπληνός συγχωνεύτηκαν με 1 ml κυττάρων μυελώματος με προσθήκη 50% ανά όγκο πολυεθυλαινικής γλυκόλης. Μετά από δύο πλύσεις με DMEM, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικό HAT υλικό με DMEM και 20% ορό αλόγου.

Τα υγρά της κυτταρικής καλλιέργειας (supernatants) ελέγχοντο για αντισώματα με την τεχνική της ELISA, χρησιμοποιώντας σαν αντιγόνα εκχυλίσματα από ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μικρογλοιακά κύτταρα μετά από κατεργασία αυτών των κυττάρων με Triton X-100.

Οι κλώνοι, που ήταν θετικοί στα εκχυλίσματα των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων, αλλά αρνητικοί στα εκχυλίσματα των ινοβλαστών και των μικρογλοιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω. Η κλωνοποίηση έγινε με αραίωση κατά την οποία τοποθετήθηκαν (0,2-1,0 κύτταρο/ανα βοθρίο ιστοκαλλιέργειας) πάνω από στρώμα θυμοκυττάρων ποντικού που αριθμούσαν (10 ανά βοθρίο ιστοκαλλιέργειας) σε HT υγρό μέσο καλλιέργειας.

Τα κύτταρα των νέων κλώνων επανακλωνοποιήθηκαν μέχρις ότου όλοι οι μετέπειτα κλώνοι να παρουσιάζουν τις ίδιες ιδιότητες (81).

Το αντίσωμα Η είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού της τάξης IgM, το οποίο αναγνωρίζει εξ' ορισμού το επιτόπιο Η. Το επιτόπιο Η βρίσκεται σε περισσότερα από ένα πολυπεπίδια στα εκχυλίσματα των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων που λαμβάνονται μετά την κατεργασία τους με Triton X-100. Τα πολυπεπίδια αυτά έχουν μοριακά βάρη περίπου 219.000, 160.000, 204.000 και 155.000. Τα δύο πρώτα πολυπεπίδια βρίσκονται σε σχετικά μεγάλη συγκέντρωση, σε αντίθεση με τα δύο τελευταία στην παραπάνω σειρά που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση (81).

Ενώ το αντίσωμα Η, παρασκευάστηκε εναντίον των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων του προβάτου, έρευνες απέδειξαν ότι το επιτόπιο Η εκτός από τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα βρίσκεται και σε κύτταρα που βρίσκονται εκτός του κεντρικού νευρικού συστήματος και τα οποία προέρχονται και από τα τρία βλαστικά δέρματα δηλαδή το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα (Arvanitis et al στο 23ο συνέδριο της Αμερικάνικης εταιρείας Νευροχημείας στο Houston του Τέξας των ΗΠΑ το 1992).

ΑΝΤΙΣΩΜΑ Η ΚΑΙ ΚΕΡΑΤΙΝΗ 8

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτουν τα ακόλουθα κύρια χαρακτηριστικά του επιτόπιου Η: 1) το επιτόπιο Η βρίσκεται σε περισσότερα από ένα είδος φυσιολογικών ή παθολογικών κυττάρων και 2) το επιτόπιο Η βρίσκεται σε περισσότερα από ένα πολυπεπίδια.

Επειδή το αντίσωμα Η είναι της τάξης IgM και επειδή πολλά αντισώματα αυτής της τάξης αναγνωρίζουν επιτόπια που έχουν σάκχαρα, οι συγγραφείς απ' ότι προκύπτει από την ανάλυση της μέχρι τώρα βιβλιογραφίας, έδειξαν ότι πράγματι το επιτόπιο Η περιέχει σάκχαρο γιατί όπως αναφέρουν η αφαίρεση των ομάδων των σακχάρων από τα πολυπεπίδια των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων που φέρουν το επιτόπιο Η έχει

σαν αποτέλεσμα τη μη αντίδραση του αντισώματος Η με αυτά. Επομένως ένα τρίτο χαρακτηριστικό του επιτόπιου Η είναι ότι το επιτόπιο Η περιέχει ομάδα σακχάρων στη δομή του . Περαιτέρω διερεύνηση για την εξιχνίαση της δομής του επιτόπιου Η και την ταυτοποίηση του σακχάρου που περιέχεται σ' αυτό έχει μέχρι στιγμής οδηγήσει στα ακόλουθα: το επιτόπιο Η βρίσκεται σε έξι πολυπεπτίδια με μοριακά βάρη 232.000, 67.000, 54.000, 51.000, 50.000 και 37.000, τα οποία παράγονται από την κυτταρική σειρά MCF-7 που προέρχεται από ανθρώπινο καρκίνωμα μαστού. Το πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 54.000 αντιστοιχεί με την κερατίνη 8 (81).

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας οι συγγραφείς παρατηρούν ότι η κερατίνη 8 περιέχει ένα μόνο είδος σακχάρου στο μόριό της που είναι η Ο-N-ακετυλογλυζαμίνη (84) και επομένως ένα άλλο χαρακτηριστικό του επιτόπιου Η είναι ότι πρέπει να περιέχει το σάκχαρο Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Περαιτέρω γίνεται διερεύνηση αν και κατά πόσον η Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη αντιπροσωπεύει ολόκληρο το επιτόπιο Η ή αποτελεί μέρος αυτού. Έτσι οι συγγραφείς (81) παρατηρούν ότι η κερατίνη 18 που παράγεται από την σειρά MCF-7 (85) και περιέχει και αυτή το σάκχαρο Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στο μόριό της δεν περιέχει το επιτόπιο Η γιατί δεν αντιδρά με το αντίσωμα Η. Έτσι από αυτό το γεγονός, συμπεραίνεται ότι το επιτόπιο Η περιέχει το σάκχαρο Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και επί πλέον ένα τμήμα του παρακείμενου πρωτεϊνικού μέρους της πολυπεπτιδικής αλύσου ή το σάκχαρο είναι τοποθετημένο κατά ένα ειδικό τρόπο στο χώρο ή πρόκειται για συνδυασμό και των δύο ανωτέρω καταστάσεων.

Έτσι συμπερασματικά καταλήγουμε στο εξής όσον αφορά τη σχέση αντισώματος Η, επιτόπιου Η και κερατίνης 8 : Η κερατίνη 8 περιέχει στο μόριό της το επιτόπιο Η που αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα Η και ότι το επιτόπιο Η περιέχει το σάκχαρο Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και επιπλέον ένα τμήμα του παρακείμενου πρωτεϊνικού μέρους του μορίου της κερατίνης 8 ή ότι το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι τοποθετημένο στο χώρο κατά ένα ειδικό τρόπο ή σε συνδυασμό και με τις δύο ανωτέρω καταστάσεις .

ΕΠΙΤΟΠΙΟ Η ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΜΕ Ο-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ

Όπως προαναφέρθηκε το επιτόπιο Η περιέχει το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη και πιθανώς, παρακείμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλύσου ή το σάκχαρο είναι τοποθετημένο στον χώρο κατά έναν ειδικό τρόπο ή σε συνδυασμό και τα δύο παραπάνω με αποτέλεσμα η κερατίνη 8 να σχηματίζει το επιτόπιο Η, ενώ η κερατίνη 18 που είναι γλυκοζυλιωμένη με το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη να μην σχηματίζει το επιτόπιο Η. Αυτό ονομάζεται γενικώς στην ανοσολογία, ότι το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι τοποθετημένο στο επιτόπιο Η κατά έναν ειδικό τρόπο στο χώρο ή και κατα ένα ειδικό τρόπο με το παρακείμενο περιβάλλον, δηλαδή με το παρακείμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλύσου. Αυτό σημαίνει ότι, το μονοκλωνικό αντίσωμα Η, που αναγνωρίζει το επιτόπιο Η, είναι ένα ειδικό αντίσωμα θέσης και επομένως αναγνωρίζει έναν υποπληθυσμό πολυπεπτιδίων, που έχουν γλυκοζυλιωθεί

με το σάκχαρο O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Το επιτόπιο H έχει βρεθεί ότι υπάρχει σε φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα. Σε φυσιολογικά κύτταρα απαντάται σε διάφορες αναλογίες σε βλεννώδη κύτταρα, σε εφεδρικά κύτταρα και σε κροσσωτά κύτταρα του ενδοτραχήλου της μήτρας (86), σε κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης (87), σε κύτταρα της υπερτροφικής στοιβάδας των συζευκτικών χόνδρων (88), στα κύτταρα της γλοίας εγκεφάλων προβάτου, δηλαδή στα αστροκύτταρα και στα επενδυματικά κύτταρα, καθώς και σε ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα προβάτου σε καλλιέργειες (89). Το επιτόπιο H αυξάνεται στα φυσιολογικά κύτταρα κάτω από διάφορες επιδράσεις. Έτσι παρατηρείται μεγάλη αύξηση του επιτόπιου H στα αντιδραστικά αστροκύτταρα, σε σχέση με τα φυσιολογικά αστροκύτταρα (90), όπως και στα επενδυματικά κύτταρα του ανθρώπινου εγκεφάλου κάτω από συνθήκες υποξίας (90).

Όσον αφορά σε παθολογικά κύτταρα, έχει βρεθεί μέχρι στιγμής, ότι το επιτόπιο H απαντάται σε καρκινώματα μαστού (81, 91, 92), σε ογκοκυτώματα, που είναι όγκοι που έχουν κύτταρα γεμάτα με παθολογικά μιτοχόνδρια (93), σε αστροκυτώματα και σε πολύμορφα γλοιβλαστώματα (94) και σε υποκατηγορίες αστροκυτωμάτων (95).

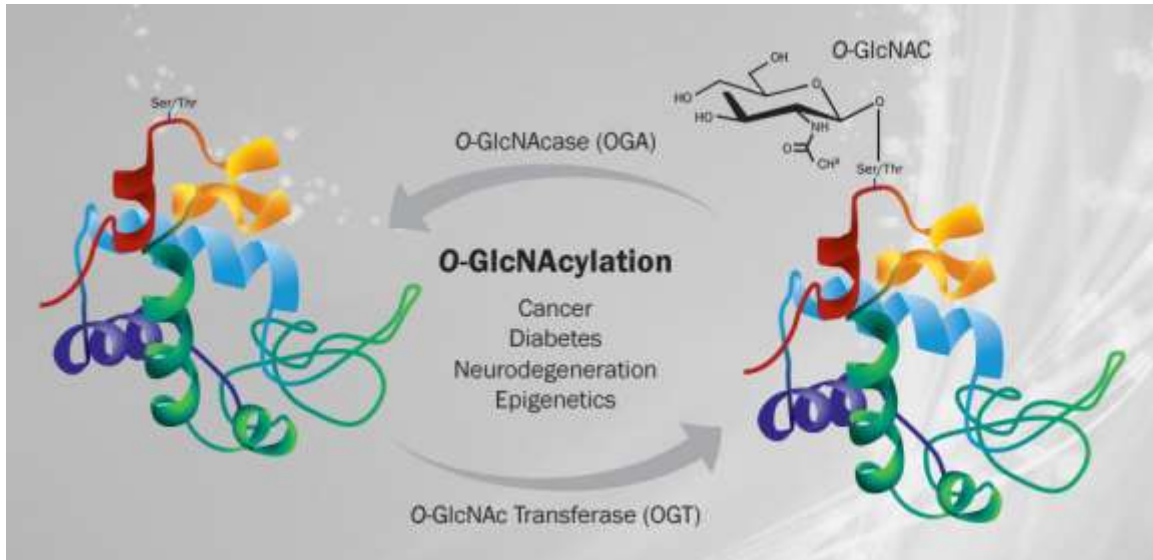
Το επιτόπιο H με τη μέθοδο των ανοσοαποτυπωμάτων (western-blot) έχει βρεθεί ότι απαντάται σε μικρό έως μέτριο αριθμό πολυπεπτιδίων, τα οποία ποικίλουν ανάλογα με το είδος των κυττάρων, όπως στα κύτταρα της γλοίας των εγκεφάλων προβάτου (89) ή στα κύτταρα του αδενοκαρκινώματος του μαστού MCF-7 (81). Αν και ο αριθμός των

πολυπεπτιδίων που φέρουν το επιτόπιο Η είναι σχετικά περιορισμένος μέχρι τώρα μόνο δύο πολυπεπίδια έχουν χαρακτηριστεί που φέρουν το επιτόπιο Η: το ένα είναι η κερατίνη 8 (81) και το άλλο είναι η βιμεντίνη, όταν τα κύτταρα βρίσκονται κάτω από συνθήκες στρες (96).

ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΜΕ Ο-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ ΤΩΝ ΚΕΡΑΤΙΝΩΝ

Η γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι μια ιδιαίτερη μορφή γλυκοζυλίωσης που περιλαμβάνει την προσθήκη του σακχάρου Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη στα υδροξύλια των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης των πολυπεπτιδίων. Αυτή η προσθήκη είναι αναστρέψιμη. Η προσθήκη γίνεται με τη δράση του ενζύμου τρανσφεράσης της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται με τα αρχικά OGT, και η αφαίρεση γίνεται με τη δράση μιας εξοζαμινιδάσης, που αναφέρεται ως εξοζαμινιδάση της Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνης και που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται με τα αρχικά OGA (εικ.1). Από τις κερατίνες μόνο η κερατίνη 13 (97) , η κερατίνη 8 και η κερατίνη 18, είναι γλυκοζυλιωμένες με το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη στα υδροξύλια της σερίνης και της θρεονίνης, δηλαδή ως Ο-N-

ακετυλογλυκοζαμίνη σύνδεση, όπου το O αντιπροσωπεύει το οξυγόνο των υδροξυλίων (^-OH), με το οποίο ενώνεται το σάκχαρο N-ακετυλογλυκοζαμίνη.



Εικ. 1

Η κερατίνη 13, όπως προαναφέρθηκε, απαντάται στο πολύστοιβο πλακώδες μη κερατινοποιούμενο επιθήλιο των εσωτερικών οργάνων και είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα των στοιβάδων, εκτός από τα κύτταρα της βασική στοιβάδας. Η κερατίνη 8 ενώνεται με την κερατίνη 18 και δημιουργεί ινίδια κερατίνης στα απλά μονόστοιβα επιθήλια ή στα επιθήλια των αδένων. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες, που ασχολούνται με την O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη γλυκοζυλίωση των κερατινών 8 και 18. (81, 91, 92, 84)

ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΜΕ O-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ ΤΩΝ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ

Άμεση βραχυχρόνια γλυκοζυλίωση (ευνοϊκή)

Έχει βρεθεί (150), ότι οποιαδήποτε αιτία προκαλεί κυτταρικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της Ο-γλυκοζυλίωσης με το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη σε ένα μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδίων. Το σάκχαρο Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη προσλαμβάνεται από το τελικό παράγωγο προϊόν UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Αυτό το τελικό προϊόν σχηματίζεται από την βιοσυνθετική οδό της εξοζαμίνης η οποία αναφέρεται διεθνώς με τα αρχικά HBP. Η οδός της εξοζαμίνης μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια παραοδός του καταβολισμού της γλυκόζης και καταναλώνει γύρω στο 2-5% της γλυκόζης που εισέρχεται στα κύτταρα. Όσο πιο πολλή γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα, τόσο πιο πολύ τελικό προϊόν UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης παράγεται και τόσο μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη παρατηρείται πάνω σε ένα μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδίων, του κυτταροπλάσματος, του πυρήνα και των μιτοχονδρίων. Το κυτταρικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την άμεση και αυξημένη είσοδο γλυκόζης στα κύτταρα με αύξηση της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης και αύξηση της Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνης γλυκοζυλίωσης των πολυπεπτιδίων. Έτσι οι λείες μυϊκές ίνες όταν βρίσκονται κάτω από καταστάσεις κυτταρικού στρες, αυξάνουν την Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη γλυκοζυλίωσή τους με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν τις εξής αντιδράσεις: σε πειράματα (99) σε επίμυες που είχαν χωριστεί σε ομάδα ως μάρτυρες και σε ομάδα που είχε λάβει γλυκοζαμίνη, η οποία αυξάνει την UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, με αποτέλεσμα την τελική αύξηση της Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνης ή σε επίμυες που είχαν λάβει την ουσία PUGNAC που αδρανοποιεί το ένζυμο OGA με

τελική αύξηση της O-N-ακετυλογλυκοζαμίνης παρατηρήθηκε ότι η ομάδα με τη γλυκοζαμίνη ή το PUGNAC παρουσίασε μειωμένη έκφραση των χημειοκινών [του χημειοελκυστικού παράγοντα των ουδετεροφίλων του επαγόμενου από τις χημειοκίνες και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων] και των μορίων προσκόλλησης [P-σελεκτίνης και του αγγειακού κυτταρικού μορίου προσκόλλησης (VCAM-1)] καθώς επίσης και μειωμένη διήθηση ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων/μακροφάγων γύρω από τον πρόσθετο χιτώνα των αρτηριών σε επίμυες οι οποίοι είχαν υποστεί οξεία βλάβη του τοιχώματος των καρωτίδων αρτηριών τους με μπαλονάκι και ότι η επακολουθούσα χρόνια χορήγηση γλυκοζαμίνης παρεμπόδισε τον σχηματισμό νέας στοιβάδας στον έσω χιτώνα. Αυτές οι αντιφλεγμονώδεις και αγγειοπροστατευτικές επιδράσεις σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα O-N-ακετυλογλυκοζαμίνης γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών των κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων που υπέστησαν την βλάβη. Οι λείες μυϊκές ίνες των αγγείων αποτελούν τους κρίσιμους «πρώτους απαντητές» στην οξεία αγγειακή βλάβη και δείχτηκε ότι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF- α , διεγείρει την οδό NF-kB μέσω της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας P65 του NF-kB για την μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-kB. Οι επίμυες που έλαβαν γλυκοζαμίνη ή την ουσία PUGNAC δείχτηκε ότι αύξησαν την γλυκοζυλίωση της υπομονάδας P65 NF-kB, με αποτέλεσμα ο TNF- α να μην μπορεί να αυξήσει την φωσφορυλίωση της P65 NF-kB και επομένως την τελική ενεργοποίηση της οδού NF-kB, με αποτέλεσμα την αντιφλεγμονώδη και αγγειοπροστατευτική επίδραση πάνω στα αγγεία. Έτσι η άμεση και βραχυχρόνια αύξηση της γλυκοζυλίωσης με O-N-

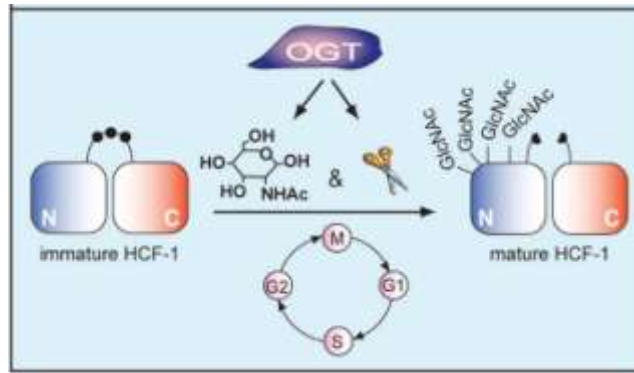
ακετυλογλυκοζαμίνη των λείων μυϊκών ινών είχε ένα ευεργετικό τελικό αποτέλεσμα στα αγγεία που είχαν υποστεί τραυματική βλάβη και άρα κυτταρικό στρες.

Μακροχρόνια επίδραση (δυσμενής)

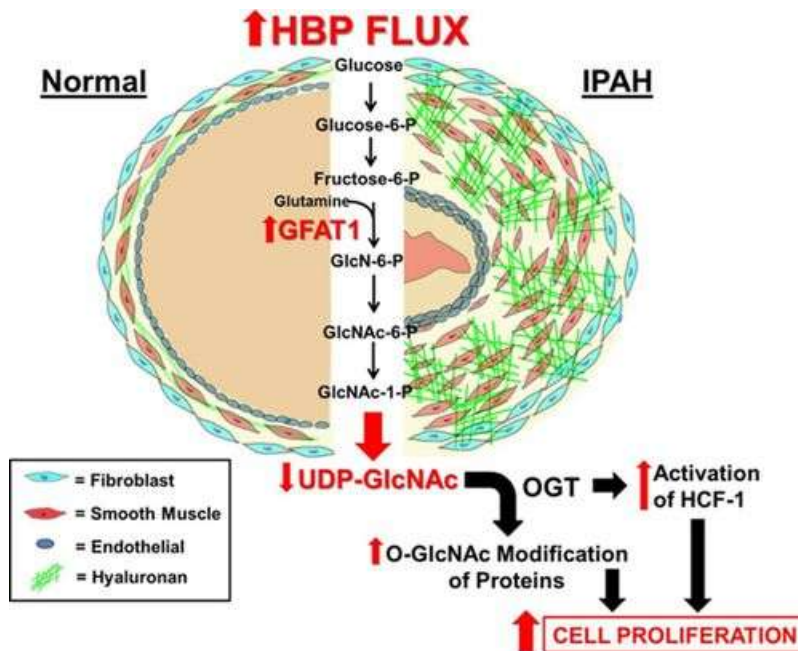
Στον σακχαρώδη διαβήτη παρατηρείται υπεργλυκαιμία και αυξημένης είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα με αποτέλεσμα και αυξημένη δράση της οδού HBP και αυξημένη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των πρωτεϊνών και ότι οι βλάβες των αγγείων του σακχαρώδη διαβήτη μπορεί να αποδοθούν τουλάχιστον μερικώς στην αυξημένη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των λείων μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων τα οποία πολλαπλασιάζονται και προκαλούν αγγειακή νόσο που μπορεί να οδηγήσει σε καταρράκτη, νεφρική ανεπάρκεια και αθηρωματοσκλήρυνση (100).

Ένα άλλο παράδειγμα της μακροχρόνιας επίδρασης της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη πάνω στην φυσιολογία των λείων μυϊκών ινών παρέχεται από την περιγραφή του μηχανισμού πρόκλησης της ιδιοπαθούς πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (ΙΠΑΥ) (101). Στην ΙΠΑΥ παρατηρείται αυξημένη δράση της HBP, η οποία παράγει ως τελικό προϊόν την UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, που είναι και ο δότης της N-ακετυλογλυκοζαμίνης για την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη κάτω από την δράση του ενζύμου OGT. Συγχρόνως παρατηρείται αυξημένη παραγωγή και αυξημένη ενεργοποίηση της OGT στα κύτταρα του τοιχώματος

των αγγείων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η καθολικώς αυξημένη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των πρωτεϊνών των κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων και ιδιαίτερα των λείων μυϊκών ινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων και ιδιαίτερα των λείων μυϊκών κυττάρων. Επίσης η αυξημένη παραγωγή και ενεργοποίηση της OGT προκαλεί την ενεργοποίηση του HCF-1, που είναι ένας κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου μέσω της γλυκοζυλίωσής του και της καταλυτικής διάσπασής του (102) με αποτέλεσμα τα προϊόντα της διάσπασης (εικ.2) (103) να εισαγάγουν τα κύτταρα στη G1 φάση προόδου του κυτταρικού κύκλου και τελικά στην μίτωση, στην κυτταρική διαίρεση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα αυτών των δυο δράσεων συνεργικά δηλαδή, της ολικής αύξησης της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των πρωτεϊνών και της ενεργοποίησης του HCF-1 παρατηρείται υπερπλασία των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος δηλαδή, και των ενδοθηλίων και των ινοβλαστών και ιδιαίτερα των λείων μυϊκών κυττάρων (εικ.3) και δημιουργείται έτσι η βλάβη στην κατασκευή των αγγείων που προκαλεί τα συμπτώματα της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγάλη δράση της OGT έχει ως αποτέλεσμα οι αποθήκες της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης να φαίνονται ελαττωμένες παρά την αυξημένη παραγωγή της διότι αυτή ταχέως μέσω της OGT καταναλώνεται προς την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών.



Εικ. 2



Εικ. 3

ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗ ΜΕ Ο-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ

Από το 1927 ο Warburg (104, 105) έδειξε ότι τα νεοπλασματικά καρκινικά κύτταρα προσλάμβαναν γλυκόζη η οποία ακολουθούσε την γλυκολυτική οδό με τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ παρά την παρουσία επαρκούς οξυγόνου και όχι την οδό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Έτσι, ένα μόριο γλυκόζης παρήγαγε δύο μόρια ATP αντί των 38 μορίων ATP που θα παράγονταν αν ακολουθείτο η οδός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε αερόβια γλυκόλυση και πήρε το όνομα (επίδραση Warburg). Αποτέλεσμα αυτού ήταν τα καρκινικά κύτταρα να προσλαμβάνουν αυξημένα ποσά γλυκόζης για να ικανοποιήσουν τις ανάγκες τους σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Η αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα και την αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης από την βιοσυνθετική οδό της εξοζαμίνης, εφόσον το 2-5% της προσλαμβανόμενης γλυκόζης χρησιμοποιείται σ' αυτήν την οδό, με αποτέλεσμα την αύξηση του τελικού προϊόντος της δηλαδή, της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Έχει βρεθεί (106, 107) ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αυξημένα ποσά γλυκοζαμίνης, η οποία αποτελεί μια ουσία που χρησιμοποιείται στην βιοσυνθετική οδό της εξοζαμίνης με αποτέλεσμα και η αυξημένη πρόσληψη γλυκοζαμίνης να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης. Αργότερα, άλλες εργασίες έδειξαν ότι το ένζυμο που καθορίζει τον ρυθμό παραγωγής της βιοσυνθετικής οδού της εξοζαμίνης που είναι η γλουταμίνη: 6-φωσφορική γλυκόζη αμιδοτρανσφεράση η οποία στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται με τα αρχικά GFAT, παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα κάτω από την επίδραση των ογκογονιδίων Kras και c-Myc (108) καθώς και από την επίδραση του EGF

(επιδερμικού αυξητικού παράγοντα) (109) ή της υποξίας και του HIF-1α (110) κι επομένως όλα αυτά συμβάλουν στην αυξημένη παραγωγή του τελικού προϊόντος UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Όπως προαναφέρθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης της UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης προκαλεί κάτω από την επίδραση της OGT μια γενική αύξηση της O-γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών με την N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Έτσι, αρκετές εργασίες έδειξαν ανοσοϊστοχημικώς καθώς και με την μέθοδο των ανοσοαποτυπωμάτων των πεπτιδίων (western-blot) ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μια καθολικώς αυξημένη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους κύτταρα πάνω στους παρακείμενους ιστούς (111, 112, 113, 114, 115, 116). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή της OGT και ελαττωμένη παραγωγή της OGA, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα με αποτέλεσμα αυτός ο συνδυασμός να προκαλεί περαιτέρω αύξηση της ολικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους κύτταρα. Η OGT υπερεκφράζεται στο καρκίνωμα του μαστού (111), του προστάτη (112) και του καρκίνου του παγκρέατος (113), ενώ τα επίπεδα του OGA ελαττώνονται και του OGT αυξάνονται στον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς (114). Περαιτέρω μελέτες ασχολήθηκαν με τους υποκείμενους μηχανισμούς που δρουν μέσω της αυξημένης γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Έτσι, βρέθηκε ότι η υπεργλυκοζυλίωση συμβάλλει μερικώς στην υπερέκφραση και σταθεροποίηση των παραγόντων όπως του FOXM1 που οδηγούν στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ υποεκφράζει τις

πρωτεΐνες που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο όπως την P27kip1 (118). Ακόμα, υπενθυμίζουμε την επίδραση της OGT στην υπεργλυκοζυλίωση και στην ενεργοποίηση του παράγοντα HCF-1 που οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη δρα εναντίον της απόπτωσης πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού NF-κΒ όπως δείχτηκε σε πορογενή αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος (113).

Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη συμβάλλει στην προστασία των καρκινικών κυττάρων από το υφιστάμενο κυτταρικό στρες. Τα είδη του αντιδραστικού οξυγόνου προκαλούν αυξημένο οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα (119). Για να καταπολεμηθούν οι ουσίες που προκαλούν το οξειδωτικό στρες απαιτείται να υπάρχουν επαρκείς αποθήκες της αναγομένης μορφής της γλουταθειόνης και γι' αυτό απαιτείται να υπάρχει επαρκής NADPH ουσία. Η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη του ενζύμου PFK1 της γλυκολυτικής οδού ελαττώνει την δραστηριότητά του, με αποτέλεσμα να ελαττώνει την γλυκόλυση εκτρέποντας την 6-φωσφορική φρουκτόζη προς την παραοδό της φωσφορικής πεντόζης, που τελικά παράγει αυξημένη ποσότητα NADPH διατηρώντας επαρκείς αποθήκες αναγομένης γλουταθειόνης (120).

Ως κυτταρική πρωτεϊνική ομοιοστασία ή πρωτεοστασία αναφέρεται η ικανότητα των κυττάρων να διατηρούν την κατάλληλη πτύχωση και κυκλοφορία των πρωτεϊνών τους

αποφεύγοντας την τοξική πρωτεϊνική συσσωμάτωση (121). Η πρωτεοστασία διατηρείται σε συνθήκες κυτταρικού στρες, από την προστασία του μηχανισμού της απάντησης του θερμικού σοκ. Η απάντηση του θερμικού σοκ διαμεσολαβείται από τις έξι ομάδες πρωτεϊνών του θερμικού σοκ HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 και μικρού μοριακού βάρους HSPs. Αρκετές εργασίες έχουν δείξει ότι η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη βοηθά την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αυξημένης παραγωγής ή της αυξημένης δραστηριότητας των HSP (98, 122, 123).

Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη συμβάλλει στην καρκινική αγγειογένεση μέσω της υπερέκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) από τα καρκινικά κύτταρα, της υπερέκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλειας ουσίας (MMPs) και της αυξημένης σηματοδότησης της οδού του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGF), (112, 124, 125).

Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη βοηθά την διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ένας μηχανισμός μετάστασης των καρκινωμάτων είναι η λεγόμενη επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση, κατά την οποία τα καρκινώματα χάνουν την καντχερίνη E και αποκτούν βιμεντίνη και καντχερίνη N, που είναι χαρακτηριστική των μεσεγχυματικών όγκων. Έχει δειχθεί σε καρκινώματα μαστού και ήπατος ότι η υπεργλυκοζυλίωση ελαττώνει την καντχερίνη E και αυξάνει την παραγωγή της βιμεντίνης, ενώ η πειραματική ελάττωση της γλυκοζυλίωσης κάνει το αντίστροφο

(126, 113, 127). Ειδικά η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη του κυτταροπλασματικού τμήματος της E καντχερίνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού στρες μπλοκάρει την επιφανειακή κυτταρική της μεταφορά, αναστέλλοντας έτσι την μεσοκυττάρια προσκόλληση (117) προωθώντας δυνητικά την διήθηση και την μετάσταση. Ακόμα, η άμεση γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη του snail στην σερίνη 112, τον σταθεροποιεί, αυξάνοντας την καταστολή της έκφρασης της καντχερίνης E, αυξάνοντας έτσι την διήθηση και την μετάσταση (128). Ακόμα, η σταθεροποίηση του snail μπορεί να γίνει έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης της οδού NF-kB, από την γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (113).

Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη αυξάνει την γονιδιακή αστάθεια και έχει δειχθεί ότι η υπεργλυκοζυλίωση, προκαλεί διαταραχές στην μιτωτική άτρακτο με αποτέλεσμα να προκαλείται πολυπλοειδία στα καρκινικά κύτταρα (129, 130).

Η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη επιδρά στον πληθυσμό των βλαστικών καρκινικών κυττάρων μέσω της γλυκοζυλίωσης μερικών μεταγραφικών παραγόντων όπως του c-Myc, Oct4, sox2 (131, 132, 133), που εμπλέκονται στην ρύθμιση της πολυδυναμικότητας και στο να επαναπρογραμματίζουν τα σωματικά κύτταρα σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) (134). Η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη του Oct4 στη θρεονίνη 228 είναι σημαντική για την διατήρηση της αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, για τον

επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων και για την επαγωγή μερικών γονιδίων σχετιζομένων με την πολυδυναμικότητα (135). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν, ότι η υπεργλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στον καρκίνο μπορεί να συμβάλει στην αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και στην πολυδυναμικότητά τους.

ΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕ O-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ OGT ΚΑΙ OGA ΠΟΥ ΤΗΝ ΑΝΑΚΥΚΛΩΝΟΥΝ ΣΤΙΣ ΚΥΡΙΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Καρκίνος του μαστού

Διαταραχές των επιπέδων της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη καθώς και των επιπέδων της OGT και της OGA έχουν καθοριστεί καλά στο καρκίνωμα του μαστού. Οι μελέτες δείχνουν ότι αμφότερα και οι κυτταρικές σειρές και δείγματα καρκίνου από τους ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με την O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και αυξημένη OGT. Οι Gu et al., 2010 (126) έδειξαν ανοσοϊστοχημικώς ότι η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι αυξημένη στα δείγματα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό μαζικό ιστό. Ο Krzeslak et al., 2012 (136), έδειξαν ότι τα καρκινικά δείγματα είχαν περισσότερο OGT mRNA και λιγότερο OGA mRNA συγκριτικά με τον φυσιολογικό ιστό του μαστού. Επιπρόσθετα ο Champattanichai et al., 2013, επιβεβαίωσαν μέσω ανοσοαποτυπωμάτων (western-blot) ότι τα καρκινικά δείγματα

είχαν αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και αυξημένη OGT συγκριτικά με τα φυσιολογικά δείγματα μαστού. Ακόμα οι Caldwell et al., 2010 (111), έδειξαν ότι οι καρκινικές σειρές κυττάρων είχαν περισσότερη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και περισσότερη OGT συγκριτικά με φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Οι Krzeslak et al., 2012 (136), έδειξαν ότι η πρόοδος και η επέκταση των καρκίνων συνοδεύονταν από αυξημένα επίπεδα OGT mRNA και ελαττωμένα επίπεδα OGA mRNA. Οι Champattanichai et al., 2013, έδειξαν ότι μια αύξηση της OGT πρωτεΐνης και της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη ήταν σχετική και ανάλογη με το βαθμό διαφοροποίησης των καρκίνων του μαστού.

Καρκίνωμα προστάτη

Οι Lynch et al., 2012 (112), έδειξαν ότι τα επίπεδα της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και της OGT είναι υψηλότερα και η αναλογία OGA/OGT είναι μικρότερη στα καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Η μειωμένη OGA/OGT αναλογία οδηγεί σε υψηλότερη γλυκοζυλίωση. Ακόμα βρήκαν ότι η έκφραση του OGT mRNA ήταν μεγαλύτερη στο προστατικό καρκίνωμα συγκριτικά με τον παρακείμενο φυσιολογικό προστατικό ιστό. Ακόμη βρήκαν ότι, η αυξημένη OGT ήταν ανάλογη με την διαφοροποίηση, την επέκταση και την μετάσταση του καρκίνου, και ότι οι ασθενείς με χαμηλό επίπεδο OGT είχαν καλύτερη πενταετή επιβίωση. Γι' αυτό οι Kamigaito et al., 2013 (137), πρότειναν τα επίπεδα της γλυκοζυλίωσης με την O-

N-ακετυλογλυκοζαμίνη να λαμβάνονται ως προγνωστικό δείκτης δεδομένης της σημαντικά στατιστικής διαφοράς ως προς την πενταετή επιβίωση των ασθενών.

Καρκίνωμα παχέος εντέρου

Οι μελέτες έδειξαν μια αύξηση των επιπέδων της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και της OGT στα καρκινικά δείγματα ανοσοϊστοχημικώς και με τα ανοσοαποτυπώματα, ενώ τα επίπεδα της OGA δεν τροποποιήθηκαν σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου (114, 138). Οι Yehezkel et al., 2012 (139), χρησιμοποιώντας μεταστατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές και καρκινικές κυτταρικές σειρές από τον πρωτοπαθή όγκο από τον ίδιο ασθενή έδειξαν ότι οι μεταστατικές σειρές είχαν αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και ελαττωμένα επίπεδα OGA συνδέοντας έτσι την αυξημένη γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη με την αυξημένη κακοήθεια. Τα επίπεδα της OGT δεν έδειξαν διαφορά και επιπλέον η OGT και η OGA ήταν ευκολότερα ανιχνεύσιμες στο κυτταρόπλασμα απ' ό τι στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων.

Καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως

Μελέτη της παρουσίας του OGT mRNA στα ούρα 176 ασθενών και 143 υγείων ατόμων έδειξε ότι στους μισούς ασθενείς βρέθηκε OGT mRNA, ενώ απουσίαζε από όλους τους υγιείς. Έτσι η ανάλυση του OGA mRNA και του OGT mRNA στα ούρα μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς. Επιπλέον, η έκφραση της OGT ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα ουροθηλιακά καρκινώματα grade 2 και 3 συγκριτικά με τα grade 1 και έτσι η έκφραση της OGT μπορεί να είναι ενδεικτική για την πρόγνωση του ασθενούς (140).

Λευχαιμία

Η δυναμική της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι πτωχά κατανοητή μέχρι τώρα αλλά οι ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρά τους σε σύγκριση με τα λεμφοκύτταρα από υγιείς ανθρώπους. Τα επίπεδα της OGT και της OGA δεν διερευνήθηκαν. Όμως, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από άλλους τύπους όγκων, τα χαμηλά επίπεδα της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη συσχετίστηκαν με πιο επιθετική έκβαση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (115).

Καρκίνωμα ενδομητρίου

Οι Krzeslak et al., 2012 (136), μέτρησαν το OGT mRNA και το OGA mRNA σε καρκινώματα 76 ασθενών και βρήκαν ότι η έκφραση αμφότερων και του OGT mRNA και του OGA mRNA ήταν σημαντικά υψηλότερες στα αδενοκαρκινώματα υψηλού

βαθμού κακοήθειας σε σύγκριση με τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας και ότι υπήρχε θετική συσχέτιση της έκφρασης του OGT mRNA και του OGA mRNA με την διήθηση του μυομητρίου, δείχνοντας ότι η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να συσχετισθεί με την επιθετικότητα του καρκίνου.

Καρκίνωμα ήπατος

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα οδηγεί τους ασθενείς σε μεταμόσχευση ήπατος, με κύριο κίνδυνο την επανεμφάνιση υποτροπών του καρκινώματος. Οι Zhu et al., 2012 (116) βρήκαν ότι οι ασθενείς με υποτροπή είχαν ηπατοκυτταρικά καρκινώματα με αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη συγκριτικά με αυτούς που δεν παρουσίασαν υποτροπές. Οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα OGA είχαν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής μετά από μεταμόσχευση ήπατος, δείχνοντας ότι η έκφραση της OGA μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης. Η έκφραση της OGT δεν σχετιζόταν με την πρόγνωση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Καρκίνωμα παγκρέατος

Η ανοσοϊστοχημική εξέταση δειγμάτων καρκινώματος του παγκρέατος και φυσιολογικών παγκρεατικών ιστών έδειξε ότι το παγκρεατικό καρκίνωμα παρουσίασε αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με την O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη συγκριτικά με τους

φυσιολογικούς ιστούς. Ακόμα, συγκρίνοντας παγκρεατικές κυτταρικές σειρές, καρκινικές και φυσιολογικές, βρέθηκε ότι οι καρκινικές σειρές είχαν αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης OGT και ελαττωμένα επίπεδα OGA σε σύγκριση με τις φυσιολογικές σειρές (113).

Καρκίνωμα πνεύμονα

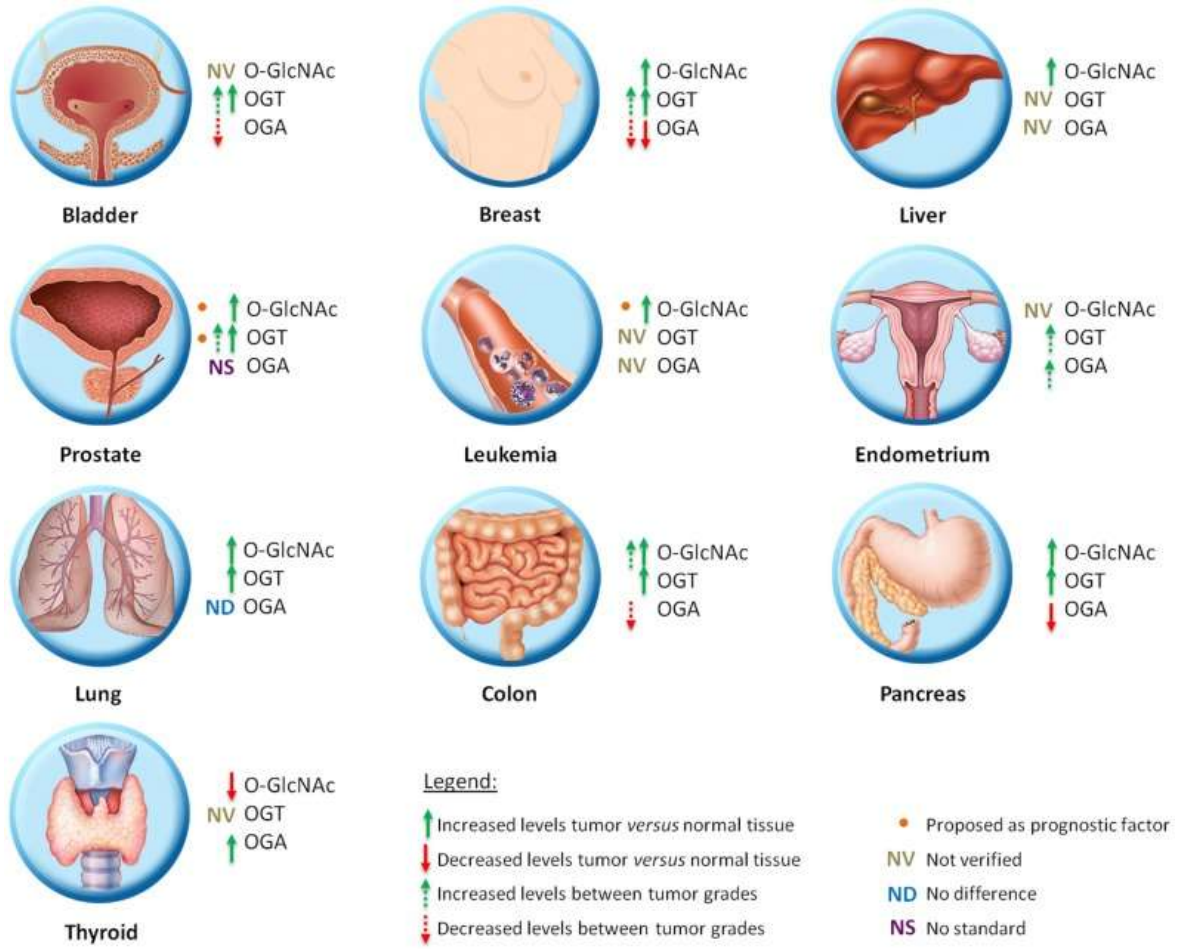
Ανοσοϊστοχημικώς βρέθηκε ότι ο καρκινικός ιστός είχε αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης OGT σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό πνευμονικό ιστό και ότι τα επίπεδα της OGA παρέμειναν αμετάβλητα (114).

Καρκίνωμα θυρεοειδούς

Σε αντίθετη κατεύθυνση με τον γενικό κανόνα οι Krzeslak et al., 2011 (141), βρήκαν ότι τα επίπεδα της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι ελαττωμένα στους όγκους του θυρεοειδούς, συνοδευόμενα από μια αύξηση της δραστηριότητας του OGA και ότι οι περισσότερες γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ήταν στον πυρήνα.

**ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕ Ο-N-ΑΚΕΤΥΛΟΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΗ ΣΤΗΝ
ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ**

Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι πραγματικά διαταραγμένη στους όγκους γενικώς όταν συγκρίνονται με τους φυσιολογικούς ιστούς. Όμως, δεν υπάρχει γενικός κανόνας σχετικά με την μεταβολή των επιπέδων αυτής της τροποποίησης ή με την συσχέτισή της με την πρόγνωση. Επειδή οι ιστοί από διαφορετικούς όγκους μπορεί να έχουν διαφορετικά επίπεδα γλυκοζυλίωσης με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη και διαφορετική επιρροή πάνω στην πρόγνωση (142) (εικ. 4).



Εικ. 4

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΟ ΥΛΙΚΟ ΜΑΣ

Το υλικό μας αποτελείται από 50 περιπτώσεις λειομυωμάτων μήτρας και πέντε περιπτώσεις λειομυοσαρκωμάτων μήτρας. Οι 50 περιπτώσεις λειομυωμάτων πάρθηκαν αφ' ενός από το Νοσοκομείο "ΤΖΑΝΕΙΟ" Πειραιώς και αφ' ετέρου από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι πέντε περιπτώσεις λειομυοσαρκωμάτων πάρθηκαν από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Τα λειομύματα και τα λειομυοσαρκώματα ανήκαν σε παρασκευάσματα υστερεκτομής. Από κάθε περίπτωση λειομύματος και λειομυοσαρκώματος πάρθηκε αντιπροσωπευτικό υλικό συνοδευόμενο και από υλικό από το παρακείμενο μυομήτριο. Το υλικό μονιμοποιήθηκε για 24 ώρες σε 10% ουδέτερη φορμόλη και κατόπιν αφού αφυδατώθηκε σταδιακά σε διαλύματα 70%,80%,90%,100% αιθυλικής αλκοόλης και ξυλόλης κλείσθηκε σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους παραφίνης κόπηκαν τομές πάχους 4 μικρών. Στη συνέχεια από κάθε περίπτωση όγκου και του παρακείμενου μυομητρίου του βάφτηκαν τομές ηωσίνης-αιματοξυλίνης και ανοσοϊστοχημικώς με αντίσωμα Η και αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8.

Διαδικασία χρώσης Ηωσίνης - Αιματοξυλίνης

Οι τομές παραφίνης αποπαραφινώθηκαν, αφού έμειναν σε κλίβανο 60 βαθμών Κελσίου για 1 ώρα και περάστηκαν από διαλύματα ξυλόλης και 100%,80% και 70%

αιθυλικής αλκοόλης για 10' σε κάθε διάλυμα. Στη συνέχεια, αφού πλύθηκαν με νερό και βιάφτηκαν με αιματοξυλίνη για 1 λεπτό, πλύθηκαν με νερό, οξινίστηκαν, πλύθηκαν με νερό, βιάφτηκαν με ηωσίνη για 2 λεπτά, πλύθηκαν με νερό και στη συνέχεια αφυδατώθηκαν, αφού πέρασαν διαδοχικά από διαλύματα 70% και 100% αιθυλικής αλκοόλης και κατόπιν ξυλόλης για 10' σε κάθε διάλυμα, καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με υλικό permount.

Διαδικασία ανοσοϊστοχημικής χρώσης των τομών με το αντίσωμα Η και το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8

Τομές από τα ίδια block που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης, αφού ελέγχθηκε η καταλληλότητά τους για ανοσοϊστοχημική χρώση, δηλαδή παρουσία μη νεκρωμένων και εκφυλισμένων περιοχών και αποφυγή εκτεταμένων αιμορραγιών, χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική χρώση με τον παρακάτω τρόπο: αρχικά έγινε αποπαραφίνωση των τομών με επώαση αυτών σε κλίβανο 60 βαθμών Κελσίου για 1 ώρα και στη συνέχεια με πέρασμα από διαλύματα ξυλόλης και 100%, 80% και 50% αιθυλικής αλκοόλης για 10 λεπτά σε κάθε διάλυμα. Στη συνέχεια πλύθηκαν με απεσταγμένο H₂O. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό της κερατίνης 8 τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ενζύμου πρωτεϊνάσης που αγοράστηκε από την σίγμα για 6' σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο H₂O. Στη συνέχεια όλες οι τομές πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris Ph 7,6 και τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε 3% διάλυμα H₂O₂ σε Tris για να γίνει αναστολή της

ενδογενούς υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris 3X5' και μετά επώασθηκαν με διάλυμα 10% φυσιολογικού ορού κουνελιού σε Tris 30' για να εξουδετερωθεί η μη ειδική σύνδεση των μονοκλωνικών αντισωμάτων με τα συστατικά των κυττάρων και έπειτα απομακρύνθηκε το διάλυμα του φυσιολογικού ορού χωρίς να πλυθούν οι τομές. Στη συνέχεια έγινε επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα. Η και αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8. Το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Η παρασκευάστηκε στο Πανεπιστήμιο του Σικάγου και είναι προσφορά από τον κύριο Δ. Αρβανίτη Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 αγοράστηκε από την SIGMA και αντιπροσωπεύει το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 35BH11.

Το αντίσωμα Η κάλυψε τις τομές σαν αδιάλυτο διάλυμα υγρού καλλιέργειας (supernatant) ενώ το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 σαν διάλυμα 1:100 σε Tris. Η επώαση διήρκησε 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αφού πλύθηκαν οι τομές με Tris για 5X6 λεπτά έγινε η επώαση των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα, που είναι ένα αντίσωμα κουνελιού συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση παρασκευασμένο εναντίον ορού ποντικού και αγορασμένο από την DAKO. Η επώαση διήρκησε 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι τομές πλύθηκαν με Tris για 5X6 λεπτά και μετά ακολούθησε η επώαση των τομών σε διάλυμα DAB 40 mgr σε 100 ml Tris και σε 100 ml H₂O₂ για 10 λεπτά. Μετά οι τομές αφού πλύθηκαν με Tris και

απεσταγμένο νερό, βάφτηκαν με αιματοξυλίνη, αφυδατώθηκαν και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με permount.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης με το αντίσωμα Η

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης έδειξαν, ότι το επιτόπιο Η παρατηρήθηκε σ' όλες τις περιπτώσεις των λειομυμάτων, των λειομυοσαρκωμάτων και του παρακείμενου μυομητρίου. Τα φυσιολογικά λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου (εικ. 5, Α) και τα νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα παρουσίαζαν λεπτοκοκκιώδη διάχυτη χρώση στο κυτταρόπλασμά τους ενώ οι πυρήνες παρέμειναν άβαφοι. Ακόμα θετικά βάφθηκαν τα λεία μυϊκά κύτταρα στο τοίχωμα των αγγείων. Η ένταση της χρώσης κυμάνθηκε από μέτρια έως έντονη και για την ακριβή βαθμολόγησή της χρησιμοποιήθηκαν τα σύμβολα(-) αρνητική, (+) ελαφρά, (++) μέτρια και (+++) έντονη. Τα αναλυτικά αποτελέσματα για κάθε περίπτωση φαίνονται στον πίνακα 1 για τα λειομύματα και το παρακείμενο μυομήτριο και στον πίνακα 2 για τα λειομυοσαρκώματα και το παρακείμενο μυομήτριο. Στον πίνακα 1 φαίνεται ότι 23 περιπτώσεις 46% λειομυμάτων και το παρακείμενο μυομήτριά τους έδειξαν έντονη χρώση για το επιτόπιο Η, ενώ οι υπόλοιπες 27 περιπτώσεις (54%) έδειξαν μέτρια χρώση για το επιτόπιο Η (εικ. 5, C & B).

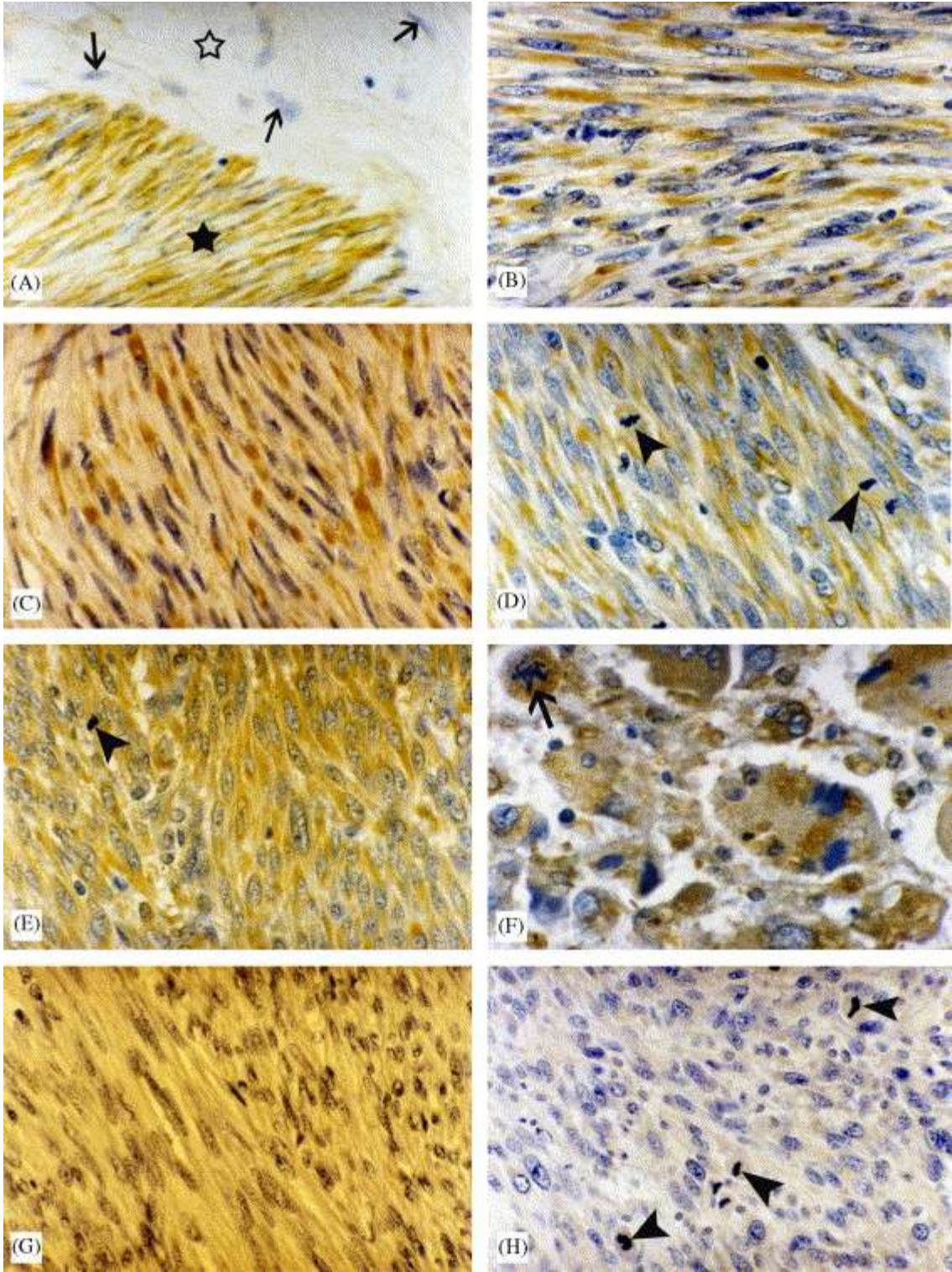
Τελικά συμπεραίνεται ότι: α) τόσο τα λειομυώματα όσο και το παρακείμενο μυομήτριο παρουσιάζουν από πρακτικής απόψεως ικανή έκφραση του επιτοπίου Η, επειδή σ' όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκαν μέτρια ή έντονη χρώση με το αντίσωμα Η, και β) δεν παρατηρείται διαφορά στην έκφραση του επιτοπίου Η μεταξύ των λειομυωμάτων και του παρακείμενου μυομητρίου τους.

Όσον αφορά τα λειομυοσαρκώματα (πίνακας 2) τρεις περιπτώσεις από τις πέντε δηλαδή το 60% έδειξαν μέτρια χρώση τόσο στα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και στο παρακείμενο μυομήτριο, ενώ δύο περιπτώσεις δηλαδή το 40% έδειξαν έντονη χρώση τόσο στα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και στο παρακείμενο μυομήτριο για το επιτόπιο Η (εικ. 5, D, E & F).

Τελικά συμπεραίνεται ότι: α) τόσο τα λειομυοσαρκώματα όσο και το παρακείμενο μυομήτριο παρουσιάζουν ικανή έκφραση του επιτοπίου Η επειδή σ' όλες τις περιπτώσεις η χρώση με το αντίσωμα Η ήταν μέτρια ή έντονη β) δεν παρατηρείται διαφορά στην έκφραση του επιτοπίου Η μεταξύ των λειομυοσαρκωμάτων και του παρακείμενου μυομητρίου και γ) τόσο τα λειομυώματα όσο και τα λειομυοσαρκώματα παρουσιάζουν ικανή έκφραση του επιτοπίου Η γιατί σ' όλες τις περιπτώσεις και των δύο κατηγοριών των όγκων παρατηρήθηκε μέτρια ή έντονη χρώση με το αντίσωμα Η.

Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης με το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8 έδειξαν, ότι σ' όλες τις περιπτώσεις των λειομυωμάτων , των λειομυοσαρκωμάτων (εικ. 5, G & H) και του παρακείμενου μυομητρίου τόσο στις περιπτώσεις των λειομυωμάτων όσο και των λειομυοσαρκωμάτων δεν υπήρξε παρουσία κερατίνης 8 (πίνακες 1 & 2). Σαν θετικός μάρτυρας για την παρουσία της κερατίνης 8 πάθθηκε η θετική αντίδραση που παρατηρήθηκε στα αδένια και στο επιθήλιο του ενδομητρίου σε όσες περιπτώσεις ενδομήτριο συνόδευε το μυομήτριο στις ελεγχόμενες τομές.

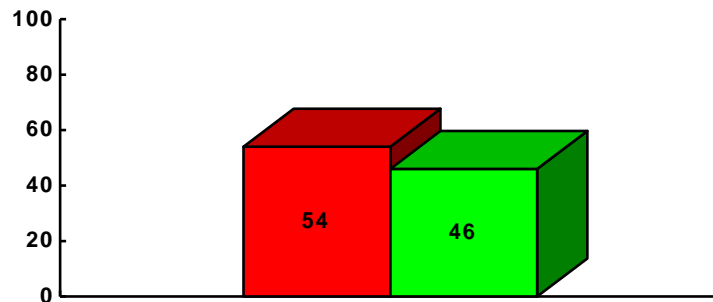


Elk. 5

Εικόνα 5:

- (A) Έντονη κυτταροπλασματική χρώση των λείων μυϊκών ινών του μυομητρίου (*) για το επιτόπιο Η. Δεσμίδα συνδετικού ιστού αρνητική (*). Πυρήνες ινοβλαστών (βέλη). Μεγ. x250
- (B) Μέτρια κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων λειομύματος για το επιτόπιο Η. Μεγ. x400
- (C) Έντονη κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων λειομύματος για το επιτόπιο Η. Μεγ. x400
- (D) Μέτρια κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων λειομυοσαρκώματος για το επιτόπιο Η. Κεφαλές βελών: μιτώσεις. Μεγ. x400
- (E) Έντονη κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων λειομυοσαρκώματος για το επιτόπιο Η. Κεφαλή βέλους: μίτωση. Μεγ. x400
- (F) Μέτρια κυτταροπλασματική χρώση κυττάρων λειομυοσαρκώματος για το επιτόπιο Η. Βέλος: ανώμαλη μίτωση. Μεγ. x400
- (G) Απουσία χρώσης λειομύματος για την κερατίνη 8. Μεγ. x400
- (H) Απουσία χρώσης λειομυοσαρκώματος για την κερατίνη 8. Μεγ. x400

Σχήμα 1

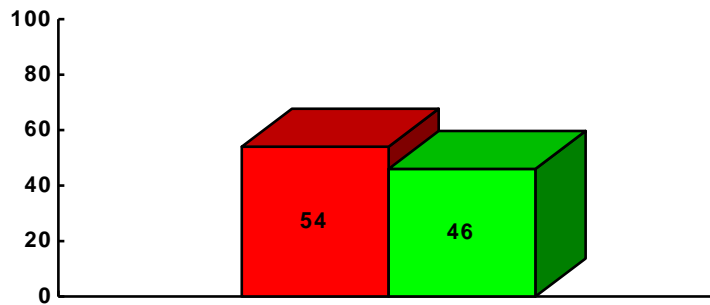


Σύμβολα:

■ Μέτρια έκφραση ■ Έντονη έκφραση

Ποσοστιαία κατανομή της έκφρασης του επιτόπιου H στο παρακείμενο μυομήτριο των περιπτώσεων των λειομυωμάτων.

Σχήμα 2

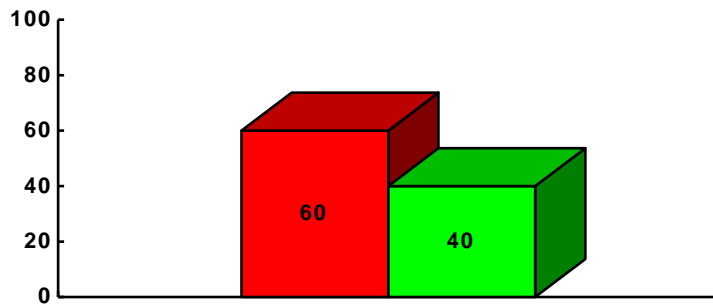


Σύμβολα:

■ Μέτρια έκφραση ■ Εντονη έκφραση

Ποσοστιαία κατανομή της έκφρασης του επιτόπιου Η στις περιπτώσεις των λειομυωμάτων.

Σχήμα 3

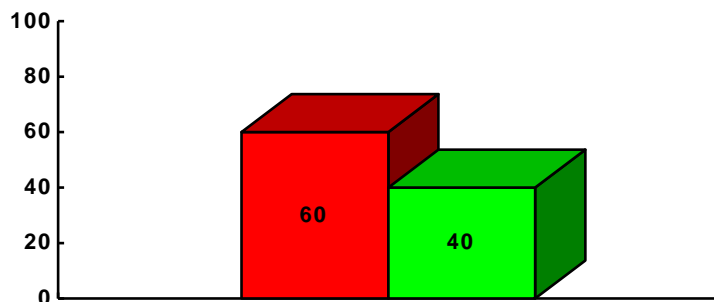


Σύμβολα:

■ Μέτρια έκφραση ■ Εντονη έκφραση

Ποσοστιαία κατανομή της έκφρασης του επιτόπιου H στο παρακείμενο μυομήτριο των περιπτώσεων των λειομυοσαρκωμάτων.

Σχήμα 4



Σύμβολα:

■ Μέτρια έκφραση ■ Εντονη έκφραση

Ποσοστιαία κατανομή της έκφρασης του επιτόπιου Η στις περιπτώσεις των λειομυοσαρκωμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης των λειομυωμάτων και του παρακείμενου μυομήτριου με το αντίσωμα Η και το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ

Α/Α ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ	Επιτόπιο Η		Κερατίνη 8	
	Λειομύωμα	Μυομήτριο	Λειομύωμα	Μυομήτριο
1	++	++	-	-
2	+++	+++	-	-
3	++	++	-	-
4	+++	+++	-	-
5	++	++	-	-
6	+++	+++	-	-
7	++	++	-	-
8	++	++	-	-
9	+++	+++	-	-
10	++	++	-	-
11	+++	+++	-	-

12	++	++	-	-
13	+++	+++	-	-
14	+++	+++	-	-
15	++	++	-	-
16	+++	+++	-	-
17	++	++	-	-
18	++	++	-	-
19	++	++	-	-
20	++	++	-	-
21	+++	+++	-	-
22	+++	+++	-	-
23	++	++	-	-
24	++	++	-	-
25	+++	+++	-	-
26	++	++	-	-
27	++	++	-	-

28	+++	+++	-	-
29	++	++	-	-
30	++	++	-	-
31	+++	+++	-	-
32	++	++	-	-
33	+++	+++	-	-
34	++	++	-	-
35	++	++	-	-
36	+++	+++	-	-
37	+++	+++	-	-
38	+++	+++	-	-
39	+++	+++	-	-
40	++	++	-	--
41	+++	+++	-	-
42	+++	+++	-	-
43	++	++	-	-

44	+++	+++	-	-
45	++	++	-	-
46	+++	+++	-	-
47	+++	+++	-	-
48	++	++	-	-
49	++	++	-	-
50	++	++	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

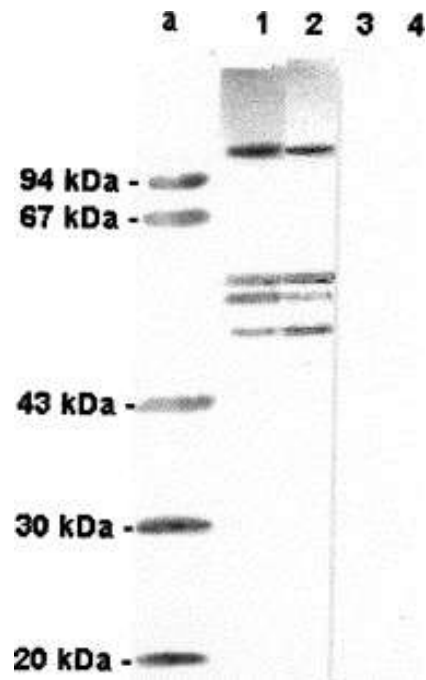
Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης των λειομυοσάρκωμάτων και του παρακειμένου μυομήτριου με το αντίσωμα Η και το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ

Α/Α ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ	Επιτόπιο Η		Κερατίνη 8	
	Λειομυοσάρκωμα	Μυομήτριο	Λειομυοσάρκωμα	Μυομήτριο
1	++	++	-	-
2	+++	+++	-	-
3	++	++	-	-
4	++	++	-	-
5	+++	+++	-	-

Αποτελέσματα των πειραμάτων των ανοσοαποτυπωμάτων

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη μέθοδο **Western Blot-immunoblot** (ανοσοαποτυπωμάτων) (143, 144) για την ανίχνευση πολυπεπτιδίων στα λειομύματα και στο μυομήτριο που αναγνωρίζονται από το αντίσωμα Η και το αντίσωμα εναντίον της κερατίνης 8, έδειξαν ότι υπάρχουν τέσσερα πολυπεπτίδια με μοριακά μεγέθη 100, 61, 59 και 54 KDa, τα οποία φέρουν το επιτόπιο Η αναγνωριζόμενα από το αντίσωμα Η. Τα τέσσερα αυτά πολυπεπτίδια περιέχονται τόσο στα κύτταρα των λειομυωμάτων όσο και στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών του μυομητρίου. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την κερατίνη 8 δεν αναγνώρισε κανένα πολυπεπτίδιο τόσο στα πολυπεπτίδια που περιέχονται στα κύτταρα των λειομυωμάτων όσο και στα πολυπεπτίδια των λείων μυϊκών ινών του μυομητρίου. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε δείγματα από πέντε λειομύματα πέντε διαφορετικών ασθενών και πέντε δείγματα από το αντίστοιχο μυομήτριο κάθε μήτρας που έφερε το λειομύωμα. Τα ανωτέρω αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα για όλα τα δείγματα (εικ. 6).



Εικ. 6

Αλληλεπίδραση του μονοκλωνικού αντισώματος Η με πρωτεΐνες φυσιολογικού μυομητρίου [1] και λειομύματος [2]. Αναγνωρίζονται 4 ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν σε μοριακά μεγέθη 100, 61, 59 και 54 kDa. Χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικά δείγματα για την κάθε περίπτωση και όλα παρουσίασαν παρόμοια εικόνα. Η ποσότητα των δειγμάτων ήταν 10 μg, ενώ των μοριακών βαρών 6μg (145). Η αραιώση του αντισώματος ήταν 1:100. Τα δείγματα επώαστηκαν και με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την κερατίνη 8 σε διάφορες αραιώσεις χωρίς όμως αποτέλεσμα [3], [4].

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, το επιτόπιο Η έδειξε, 1) έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση στο 46% (23/50) και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση στο 54% (27/50) των λειομυωμάτων του μυομητρίου, 2) έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση στο 40% (2/5) και μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση στο 60% (3/5) των λειομυοσαρκωμάτων του μυομητρίου, και 3) παρόμοια διακύμανση έκφρασης του επιτόπιου Η στο παρακείμενο μυομήτριο σε σχέση με αυτή των λειομυωμάτων και λειομυοσαρκωμάτων του. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκφραση του επιτόπιου Η διακυμαίνεται στο φυσιολογικό και στο νεοπλασματικό μυομήτριο, καθώς το επιτόπιο Η εκφράζεται είτε μετρίως είτε έντονα στα λειομυοσαρκώματα και στα λειομύματα του μυομητρίου και στο παρακείμενο μυομήτριά τους. Λαμβάνοντας υπόψιν, τα παρόντα καθώς και τα προηγούμενα αποτελέσματα ερευνών, δείχνεται ότι η έκφραση του επιτόπιου Η παρουσιάζει διακυμάνσεις στους φυσιολογικούς και στους παθολογικούς ιστούς. Πράγματι, 1) το επιτόπιο Η απουσιάζει από την συντριπτική πλειοψηφία των φυσιολογικών αστροκυττάρων, ενώ υπερεκφράζεται στα αντιδραστικά αστροκύτταρα, 2) η έκφραση του επιτόπιου Η, είναι σημαντικά υψηλότερη στα αστροκυτώματα συγκριτικά με την έκφρασή του στα αναπλαστικά αστροκυτώματα και στα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα, 3) η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το επιτόπιο Η ήταν κυρίως μέτρια στα κακοήθη κύτταρα των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού, ενώ μικρές ομάδες καρκινικών κυττάρων παρουσίαζαν έντονη ανοσοϊστοχημική χρώση για το επιτόπιο Η, 4) η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας στο επίπεδο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

ήταν ελαττωμένη στα μιτοχόνδρια, στα πυρήνια και στα κυτταροπλασματικά κυστίδια των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού συγκριτικά με αυτά των ινοαδενωμάτων και, 5) τα πλούσια σε μιτοχόνδρια φυσιολογικά, μεταπλαστικά και νεοπλασματικά κύτταρα έδειξαν υπερέκφραση του επιτόπιου H (81, 146, 94, 93, 91).

Καθώς το επιτόπιο H περιέχει την ρίζα N-ακετυλογλυκοζαμίνη συνδεδεμένη με τα υδροξύλια της σερίνης ή της θρεονίνης των πολυπεπτιδίων (146) είναι πιθανόν, ότι οι διακυμάνσεις της έκφρασης του επιτόπιου H, που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη και στις προηγούμενες μελέτες (93,54,147) να αντανακλούν διαφορές στην έκφραση γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών ή πρωτεΐνης των κυττάρων με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη.

Αυτές οι διακυμάνσεις μπορεί να είναι ενδιαφέρουσες για την κατανόηση της παθολογίας των λείων μυϊκών όγκων της μήτρας, καθώς η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να τροποποιήσει την λειτουργία πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως είναι οι λειτουργίες των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ, οι πρωτεΐνες της χρωματίνης, οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και οι ογκοπρωτεΐνες (133, 148, 149, 150). Πράγματι, το C-myc τροποποιείται μέσω της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στη θέση 38 της θρεονίνης, μία θέση γνωστή για την τροποποίησή της με φωσφορυλίωση, που αποτελεί και ένα συχνό σημείο μετάλλαξης στα ανθρώπινα λεμφώματα (133). Ακόμα, υπάρχει ένδειξη ότι η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στην τελική καρβοξυλική περιοχή του P53, μπορεί να έχει ένα ρόλο στην ρύθμιση της ειδικής σύνδεσης του P53 με το DNA (149). Έχει υποστηριχθεί, ότι η δυνητική εμπλοκή της

γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη στην ογκογένεση, μπορεί να διαμεσολαβείται από την προσθήκη ή την αφαίρεση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στα υδροξύλια της σερίνης ή της θρεονίνης σε ογκοπρωτεΐνες, σε ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και σε άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ογκογένεση (133). Περεταίρω μελέτες, χρησιμοποιώντας βιοχημικές μεθόδους και ανοσοκυτταροχημεία στο επίπεδο του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου θα βοηθήσουν να διαλευκάνουν τη φύση των πολυπεπτιδίων που φέρουν το επιτόπιο H και την ακριβή εντόπισή τους στα κύτταρα των όγκων των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη εμπλέκεται στην απόπτωση και στις οδούς του κυτταρικού κύκλου (151, 152). Πράγματι η OGA διασπάται από την κασπάση 3 και η αύξηση ή η ελάττωση των επιπέδων της γλυκοζυλίωσης με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη αναστέλλει ή ενισχύει αντίστοιχα την ενεργοποίηση της αντι-αποπτωτικής AKT (152). Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι τα ευρήματα ότι στα λεία μυϊκά κύτταρα, η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να έχει μια βαθιά επίδραση στις μεταβάσεις του κυτταρικού κύκλου, που ρυθμίζουν την ετεροδιμεροποίηση του YY1 μεταγραφικού παράγοντα ένωσης με τρόπο δακτύλου τσίγκου στο DNA με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (151). Πράγματι, ο γλυκοζυλιωμένος YY1 παράγοντας με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη δεν συνδέεται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Έτσι, μετά την αποσύνδεσή του, από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, ο γλυκοζυλιωμένος με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη YY1, είναι ελεύθερος να συνδεθεί με το DNA. Έτσι, η γλυκοζυλίωση με την O-N-

ακετυλογλυκοζαμίνη προάγει την δραστηριότητα του ΥΥ1 μεταγραφικού παράγοντα (151). Καθώς το επιτόπιο Η, περιέχει την ρίζα Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (146) θα μπορούσε κάποιος να υποδείξει, ότι οι διακυμάνσεις στην έκφραση του επιτόπιου Η μπορεί να αντανakλούν διαφορές στην έκφραση πρωτεϊνών γλυκοζυλιωμένων με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στην ρύθμιση της απόπτωσης στους όγκους των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου, καθώς και στο ίδιο το μυομήτριο. Μια υπόθεση εργασίας αρχίζει να εμφανίζεται που υποστηρίζει ότι η γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να είναι ένας αισθητήρας του μεταβολισμού των θρεπτικών συστατικών που εξασθενίζει την απάντηση ενός κυττάρου στα εξωκυττάρια ερεθίσματα βάση της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου (152). Αυτό το πρότυπο, προτείνει ότι τα κύτταρα δεν απαντούν τυφλά στα εξωκυττάρια ερεθίσματα, αλλά λαμβάνουν υπόψιν τους τις δικές τους ενεργειακές αποθήκες (152). Υπ' αυτήν την άποψη, η γλυκοζυλίωση με Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνη, που φαίνεται να είναι ένας αισθητήρας του μεταβολισμού που ανταποκρίνεται επακριβώς στην κατάσταση θρέψης τροποποιεί συστατικά σηματοδοτικών οδών, κυτταροσκελετικά συστατικά και τον μηχανισμό της μεταγραφής και της μετάφρασης (152). Καθώς το επιτόπιο Η περιέχει μια ρίζα Ο-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (146), μπορεί να γίνει υπόθεση ότι οι διακυμάνσεις της έκφρασης του επιτόπιου Η μπορεί να αντανakλούν διαφορές στην έκφραση γλυκοζυλιωμένων κυτταρικών πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην μεταβολική ρύθμιση των όγκων των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου καθώς και του ίδιου του μυομητρίου.

Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι μέσω του ανοσοαποτυπώματος (western-blot) το επιτόπιο H μοιράζεται μεταξύ της κερατίνης 8 και πέντε επιπρόσθετων πολυπεπτιδίων με μοριακές μάζες 232, 67, 51, 50 και 37 KDa, στην κυτταρική σειρά MCF-7 του ανθρώπινου καρκινώματος του μαστού (81). Επιπρόσθετα η κερατίνη 8 περιέχει μονήρεις ρίζες O-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (84). Βάσει των παραπάνω, έγινε προσπάθεια να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ της έκφρασης του επιτόπιου H και της έκφρασης της κερατίνης 8, στους όγκους των λείων μυϊκών κυττάρων (λειομυωμάτων και λειομυοσάρκωμάτων) και του παρακείμενου φυσιολογικού μυομητρίου. Χρησιμοποιώντας την ανοσοϊστοχημεία και τη μέθοδο των ανοσοαποτυπωμάτων (western-blot). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι τα εξής: 1) ανοσοϊστοχημική έκφραση της κερατίνης 8, δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίπτωση λειομύωματος, λειομυοσάρκωματος ή μυομητρίου, 2) το ανοσοαποτύπωμα δεν έδειξε κερατίνη 8, στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου και των λειομυωμάτων, 3) το ανοσοαποτύπωμα έδειξε ότι στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου και των λειομυωμάτων το επιτόπιο H εντοπίζεται σε τέσσερα πολυπεπτίδια με μοριακές μάζες 100, 61, 59 και 54 KDa. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κερατίνη 8, χωρίς να υπάρχει στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου, των λειομυωμάτων και λειομυοσάρκωμάτων μοιράζεται το επιτόπιό της H, που περιέχει το μοναδικό της σάκχαρο που είναι η ρίζα O-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (84) με τέσσερα άλλα άσχετα πολυπεπτίδια που όλα τους παράγονται από τα φυσιολογικά και τα νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όταν χρησιμοποιούνται αντισώματα εναντίον της κερατίνης 8 ή άλλων κερατινών κατά την ανοσοϊστοχημεία εναντίον των όγκων των

λείων μυϊκών κυττάρων (π.χ. σε αδιαφοροποίητα λειομυοσαρκώματα ή σε μεταστατικά αδιαφοροποίητα λειομυοσαρκώματα) για να αποφευχθεί η εσφαλμένη διάγνωση ενός αδιαφοροποίητου καρκινώματος (147, 21, 153).

Πρέπει να τονιστεί εμφαντικώς ότι μια σειρά αντισωμάτων εναντίον της δεσμίνης, της ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων, της h-καλντεσμόνης, της καλπονίνης, κλπ, πρέπει να χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των όγκων των λείων μυϊκών κυττάρων για να αποφευχθεί η σύγχυσή τους με επιθηλιακούς όγκους.

Τελικά, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης δείχνουν ότι το επιτόπιο Η εκφράζεται είτε μέτρια, είτε έντονα στους όγκους των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου και στο παρακείμενο μυομήτριά τους. Αυτές οι διακυμάνσεις της έκφρασης του επιτόπιου Η μπορεί να είναι ενδιαφέρουσες στο να κατανοηθεί η παθογένεια των όγκων των λείων μυϊκών κυττάρων του μυομητρίου καθώς η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη των κυτταρικών πρωτεϊνών εμπλέκεται στην απόπτωση και στις οδούς του κυτταρικού κύκλου και μπορεί να τροποποιήσει πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στην ογκογένεση, όπως ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και ογκοπρωτεΐνες, καθώς και πρωτεΐνες με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ και οι πρωτεΐνες της χρωματίνης. Επιπλέον, τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν, ότι η κερατίνη 8, χωρίς να είναι παρούσα στα κύτταρα του μυομητρίου, των λειομυωμάτων

και των λειομυοσαρκωμάτων, μοιράζεται το επιτόπιό της H, που περιέχει το μοναδικό σάκχαρό της, που είναι η O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη με τέσσερα άλλα άσχετα πολυπεπτίδια που παράγονται από τα φυσιολογικά και τα νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, όταν χρησιμοποιούνται αντισώματα εναντίον της κερατίνης 8 στην ανοσοϊστοχημεία έναντι των όγκων των λείων μυϊκών κυττάρων για να αποφευχθούν ψευδώς θετικά ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα. Περαιτέρω, η διερεύνηση των αντιγόνων που φέρουν το επιτόπιο H μπορεί να βοηθήσει να διαλευκανθεί η φύση των πολυπεπτιδίων που φέρουν το επιτόπιο H, για να επιτευχθεί περαιτέρω γνώση των μηχανισμών μέσω των οποίων η γλυκοζυλίωση με O-N-ακετυλογλυκοζαμίνη ρυθμίζει την ιστοφυσιολογία του φυσιολογικού μυομήτριου και την παθολογία των λείων μυϊκών όγκων του μυομήτριου και να εξεταστεί η πιθανή σχέση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με το μονοκλωνικό αντίσωμα H, ως προς την πρόγνωση αυτών των όγκων.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν ανοσοϊστοχημικώς 50 περιπτώσεις λειομυωμάτων με το παρακείμενο μυομήτριό τους και 5 περιπτώσεις λειομυοσαρκωμάτων με το παρακείμενο μυομήτριό τους για να ανιχνευθεί σ' αυτά η κατανομή της κερατίνης 8 και

του επιτόπιου Η που περιέχεται στο μόριο της κερατίνης 8 και περιλαμβάνει και το μοναδικό σάκχαρο της κερατίνης 8 που είναι η Ο-N ακετυλογλυκοζαμίνη.

Η μελέτη του υλικού έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

1. Η κερατίνη 8 δεν εντοπίστηκε σε καμία περίπτωση λειομώματος, λειομυοσαρκώματος ή μυομητρίου.
2. Το επιτόπιο Η παρουσίασε έντονη έκφραση στο 46% και μέτρια έκφραση στο 54% των περιπτώσεων των λειομωμάτων.
3. Το επιτόπιο Η παρουσίασε έντονη έκφραση στο 40% και μέτρια έκφραση στο 60% των περιπτώσεων των λειομυοσαρκωμάτων.
4. Το επιτόπιο Η δεν παρουσίασε διαφορά στην έκφρασή του ανάμεσα στα λειομώματα και στο παρακείμενο μυομήτριά τους και στα λειομυοσαρκώματα και στο παρακείμενο μυομήτριά τους.
5. Το επιτόπιο Η στις λείες μυϊκές ίνες του φυσιολογικού μυομητρίου και στις λείες μυϊκές ίνες των λειομωμάτων βρίσκεται σε τέσσερα πολυπεπίδια με μοριακά βάρη 100.000, 61.000, 59.000 και 54.000 που παράγονται όλα και από τα φυσιολογικά και από τα καλοήθη νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα, όπως αποδείχθηκε με τη μέθοδο των ανοσοαποτυπωμάτων (immunoblotting).

6. Η κερατίνη 8 δεν βρέθηκε στις λείες μυϊκές ίνες είτε του μυομητρίου ή των λειομυωμάτων όπως αποδείχθηκε με τη μέθοδο των ανοσοαποτυπωμάτων (immunoblotting).

Τελικά συμπεραίνεται, ότι η κερατίνη 8 χωρίς να βρίσκεται στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου, των λειομυωμάτων και των λειομυοσάρκωμάτων μοιράζεται το επιτόπιό της Η που περιέχει και το μοναδικό σάκχαρό της, που είναι η Ο-N ακετυλογλυκοζαμίνη με τέσσερα άλλα άσχετα πολυπεπτίδια που παράγονται από τα φυσιολογικά και τα νεοπλασματικά λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτό αφ' ενός πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη στις ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, όταν χρησιμοποιούνται αντισώματα εναντίον της κερατίνης 8 γιατί μπορεί να υπάρξει διασταυρούμενη αντίδραση και να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με κίνδυνο ένα άτυπο λειομύωμα, ένα αδιαφοροποίητο λειομυοσάρκωμα και ένα αδιαφοροποίητο μεταστατικό λειομυοσάρκωμα να εκληφθούν σαν καρκινώματα. Αφετέρου συμβάλλει περισσότερο στην κατανόηση της γλυκοζυλίωσης με Ο-N-Ακετυλογλυκοζαμίνη στην βιολογία του μυομητρίου και των νεοπλασμάτων του. Μελλοντική περαιτέρω ταυτοποίηση των πεπτιδίων που φέρουν το επιτόπιο Η θα συμβάλλει στην ανίχνευση των οδών που εμπλέκονται τα τέσσερα αυτά πολυπεπτίδια ρίχνοντας περισσότερο φως στις οδούς της γλυκοζυλίωσης με Ο-N-

Ακετυλογλυκοζαμίνη αναφορικά με την βιολογία του μυομητρίου και των λειομυωμάτων και λειομυοσαρκωμάτων του.

DOCTORATE THESIS

PSATHAS PANAGIOTIS

Obstetrician-Gynecologist

TITLE

COMPARATIVE STUDY OF THE EXPRESSION OF THE KERATIN 8 AND ITS GLYCOSYLATED GROUP H IN MYOMETRIUM AND ITS LEIOMYOMATA

SUMMARY

In this study, fifty cases of uterine leiomyomas with their adjacent myometrium and five cases of uterine leiomyosarcomas with their adjacent myometrium were investigated immunohistochemically in order to detect the distribution of the keratin 8 and its glycosylated group H, which represents the epitope H which includes the sugar O-linked N - acetyl glycosamine residue in a specific conformation and/or environment. The study of this material gave the following results:

1. The keratin 8 was not detected in any case of leiomyomas, leiomyosarcomas and myometrial tissues.
2. The epitope H showed high expression in 46% and moderate expression in 54% of the cases of leiomyomas.

3. The epitope H showed high expression in 40% and moderate expression in 60% of the cases of leiomyosarcomas.
4. The epitope H did not show any difference in its expression among leiomyomas and their adjacent myometrium and among leiomyosarcomas and their adjacent myometrium.
5. The epitope H in the normal smooth muscle cells of the myometrium and in the smooth muscle cells of the leiomyomas is located in four polypeptide chains with molecular weights 100.000, 61.000, 59.000 and 54.000 which all are produced by both the normal and benign neoplastic smooth muscle cells as it was revealed by western blotting and immunoblotting studies.
6. The cytokeratin 8 was not detected in the normal and benign neoplastic smooth muscle cells as it was revealed by western blotting and immunoblotting studies.

Finally, it is concluded that, although keratin 8 is not present in the smooth muscle cells of the myometrium, leiomyomas and leiomyosarcomas, it shares its epitope H which contains the sugar O-linked N- Acetylglucosamine residue in a specific conformation and/or environment with other four unrelated polypeptides which all are produced by the normal myometrial and the benign neoplastic uterine smooth muscle cells. This finding from one point of view has to be taken into consideration when anti-keratin 8 antibodies are used for immunohistochemistry due to the risk of cross- reactivity resulting in false

positive findings and from the other point of view it contributes more knowledge into the biology of the myometrium and its neoplasms. Future further identification and characterization of the four polypeptides, which bear the epitope H, might shed more light in the pathways of the glycosylation with O-linked N-Acetylglucosamine, which are involved in the biology of the myometrium and in the pathology of the uterine leiomyomas and leiomyosarcomas.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Norris, H.J., A.T. Hertig, M.R. Abell: The uterus (by 23 authors) williams and wilkins, Baltimoe 1973.
2. Hertko, E.J.: Polycythemia (erythrocytosis) associated with uterine fibroids: A case report with erythropoietic activity demonstrated in the tumor. Ann. Intern. Med., 68:1169, 1968.
3. Naets, J. P., Wittek, M., Delwiche, F., et al: Polycythaemia and erythropoietin producing uterine fibromyoma. Scand. J. Haematol., 19:75-78, 1977.
4. Spurlin, G. W., Van Nagell, J. R., Jr., Parker, J. C., Jr., et al: Uterine myomas and erythrocytosis. Obstet. Gynecol., 40:646-651, 1972.

5. Townsend, D. E., Sparkes, R.S., Baluda, M.C., et al: Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose - 6 - phosphate dehydrogenase. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 107:1168-1173, 1970.
6. Farber, M., Conrad, S., Heinrichs, W. L., et al.: Estradiol binding by fibroid tumors and normal myometrium. *Obstet. Gynecol.*, 40:479-486, 1972.
7. Spellacy, W. N., Le Maire, W. J., Buhi, W. C., et al.: Plasma growth hormone and estradiol levels in women with uterine myomas. *Obstet. Gynecol.*, 40:829-833, 1972.
8. Jonas, H. S., and Masterson, B. J.: Giant uterine tumors. Case report and review of the literature. *Obstet. Gynecol.*, 50:2s - 4s, 1977.
9. Laitinen, O.: Submucous myomas. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 42: 383-398, 1963.
10. Persaud, V., and Arjoon, P.D.: Uterine leiomyoma: Incidence of degenerative change and a correlation of associated symptoms. *Obstet. Gynecol.*, 35:432-436, 1970
11. Aaro, L. A., Symmonds, R. E., and Dockerty, M. B.: Sarcoma of the uterus. A clinical and pathological study of 177 cases. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 94:101-109, 1966.
12. Taylor, H. B., and Norris, H. J.: Mesenchymal tumors of the uterus. IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcomas. *Arch. Pathol.*, 82:40-44, 1966.
13. Fechner, R.E.: Atypical leiomyomas and synthetic therapy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 49:697-703, 1968. (one of the first descriptions of this association.)
14. Kempson, R. L., and Bari, W.: Uterine sarcomas: Classification, diagnosis and prognosis. *Hum. Pathol.*, 1 :331-349, 1970.

- 15.** Prakash, S., and Scully, R. E.: Sarcoma-like pseudopregnancy changes in uterine leiomyomas: Report of a case resulting from prolonged norethindrone therapy. *Obstet. Gynecol.*, 24:106-110, 1964.
- 16.** Farrer-Brown, G., Beilby, J. O. W., and Tarbit, M.H.: The vascular patterns in myomata uteri. *J. Obst. Gynaec. Brit. Cwlth.*, 77:967-975, 1970.
- 17.** Punnonen, R.: Necrosis of uterine myomata. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 44:500-505, 1965.
- 18.** Deligdish, L., and Loewenthal, M.: Endometrial changes associated with myomata of the uterus. *J. Clin. Pathol.*, 23:676-680, 1970.
- 19.** Ferry JA, Harris NL, Scully RE: Uterine leiomyomas with lymphoid infiltration simulating lymphoma. A report of seven cases. *Int J Gynecol Pathol* 8:263-270, 1989.
- 20.** Gilks C.B, Taylor GP, Clement PB: Inflammatory pseudotumor of the uterus. *Int J. Gynecol Pathol* 6:275-286, 1987.
- 21.** Oliva E, Young RH, Clement PB, Bhan AK, Scully RE: Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol* 19:769-774, 1993.
- 22.** Fechner RE :Atypical leiomyomas and synthetic progestin therapy. *Am J Clin Pathol* 49:697-703, 1968.

- 23.** Prakash S, Scully RE: Sarcoma-like pseudopregnancy. Changes in uterine leiomyomas. Report of a case resulting from prolonged norethindrone therapy *Obstet Gynecol* 24:106-110, 1964.
- 24.** Prayson RA , Hart WR: Mitotically active leiomyomas of the uterus. *Am J C Pathol* 97:14-20, 1992.
- 25.** Jacobs DS, Cohen H, Johnson JS: Lipoleiomyomas of the uterus. *Am J Clin Pathol* 44:45-51, 1965.
- 26.** Pounder DJ: Fatty tumours of the uterus. *J Clin Pathol* 35:1380-1383, 1982.
- 27.** Hyde KE, Geisinger KR, Marshall RB, Jones TL: The clear-cell variant of uterine epithelioid leiomyoma. An immunohistologic and ultrastructural study. *Arch Pathol Lab Med* 113:551-553, 1989.
- 28.** Kurman RJ, Norris HJ: Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear-cell leiomyoma. A clinical and pathologic analysis of 26 cases. *Cancer* 37:1853-1865, 1976.
- 29.** Mazur MT: Clear cell leiomyoma (leiomyoblastoma) of the uterus. Ultrastructural observations. *Ultrastruct Pathol* 10:249-255, 1986.
- 30.** Mazur MT, Kraus FT: Histogenesis of morphologic variations in tumors of the uterine wall. *Am J Surg Pathol* 4:59-74, 1980.
- 31.** Martin-Reay DG, Christ ML, La Pata RE: Uterine leiomyoma with skeletal muscle differentiation. Report of a case. *Am J Clin Pathol* 96:344-347, 1991.

- 32.** Cramer SF, Patel A: Myometrial hyperplasia. Proposed criteria for a discrete morphological entity. *Mod Pathol* 8:71-77, 1995.
- 33.** Lemis PL, Lee ABH, Easler RE: Myometrial hypertrophy. A clinical pathologic study and review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 84: 1032-1041, 1962.
- 34.** Harper RS, Scully RE: Intravenous leiomyomatosis of the uterus. *Am J Clin Pathol* 4:45-51, 1965.
- 35.** Norris HJ, Parmley T: Mesenchymal tumors of the uterus. V. Intravenous leiomyomatosis. A clinical and pathologic study of 14 cases. *Cancer* 36:2164-2178, 1975.
- 36.** Nogales FF, Novano N, Martinez de Victoria JM, Contreras f, Redondo C, Herraiz MA, Seco MA, Velasco A: Uterine intravascular leiomyomatosis. An update and report of seven cases. *Int J Gynecol Pathol* 6:331-339, 1987.
- 37.** Canzonieri V, D ' Amore ES, Bartoloni G, Piazza M, Blandamura S, Cardone A:Leiomyomatosis with vascular invasion. A unified pathogenesis regarding leiomyoma with vascular microinvasion, benign metastasizing leiomyoma and intravenous leiomyomatosis. *Virchows Arch* 425:541-545, 1994.
- 38.** Mulvany NJ, Slavin JL, Ostor AG, Fortune DW: Intravenous leiomyomatosis of the uterus. A clinicopathologic study of 22 cases. *Int J Gynecol Pathol* 13:19;; ,1994.
- 39.** Brescia RJ, Tazelaar HD, Hobbs J, Miller AW:intravascular lipoleiomyomatosis. A report of two cases. *Hum Pathol* 20:252-256, 1989.

- 40.** Taylor HB, Norris HJ: Mesenchymal tumors of the uterus. IV Diagnosis and prognosis of leiomyosarcomas Arch Pathol 82:40-44, 1966.
- 41.** Christopherson WM, Williamson EO, Gray LA:Leiomyosarcoma of the uterine Cancer 29:70-75, 1972.
- 42.** Marshall RJ, Braye SG:Alpha-I- antitrypsin, alpha-I-antichymotrypsin, actin, and myosin in uterine sarcomas. Int J Gynecol Pathol 4:346-354, 1985.
- 43.** Kempson RL, Bari W:Uterine sarcomas. Classification, diagnosis, and prognosis. Hum Pathol 1: 331-349, 1970.
- 44.** Silverberg SG: Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus. Hum Pathol 7:451-454, 1976.
- 45.** Donhuijsen K:Mitosis counts. Reproducibility and significance in grading malignancy. Hum Pathol 17:1122-1125, 1986.
- 46.** Evans N: Mitotic figures in malignant tumors as affected by time before fixation of tissues. Arch Pathol 1:894-898, 1926.
- 47.** Editorials: Mitosis counting-I. (Scully RE et al) Mitosis counting-II.(Kempson RL) Mitosis counting -III.(Norris HJ Hum Pathol 7:481-484, 1976.
- 48.** Jones MW, Norris HJ:Clinicopathologic study of 28 uterine leiomyosarcomas with metastasis. Int J Gynecol Pathol 14:243-249, 1995.
- 49.** Hart WR Billman JK Jr: A reassessment of uterine neoplasmas originally diagnosed as leiomyosacomas. Cancer 41:1902-1910, 1978.

- 50.** Abell MR, Littler ER: Benign metastasizing uterine leiomyoma. Multiple lymph nodal metastases. *Cancer* 36:2206-2213, 1975.
- 51.** Spiro RH, McPeak CJ: On the so-called metastasizing leiomyoma. *Cancer* 19:544-548, 1966.
- 52.** Tench WD, Dail D, Gmelich JT, Matani N: Benign metastasizing leiomyomas. A review of 21 cases (abstract). *Lab Invest* 38:367, 1978.
- 53.** Cho KR, Woodruff JD, Epstein JI: Leiomyoma of the uterus with multi extrauterine smooth muscle tumors. A case report suggesting multifocal origin *Hum Pathol* 20:80-83, 1989.
- 54.** Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR: Problematic uterine smooth muscle neoplasms A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol* 18:558, 1994.
- 55.** Buscema J, Carpenter SE, Rosenshein NB, Woodruff JD: Epithelioid leiomyosarcoma of the uterus. *Cancer* 7:1192-1196, 1986.
- 56.** Kurman RJ, Norris HJ: Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear cell leiomyoma. A clinical and pathologic analysis of 26 cases. *Cancer* 37:1853-1865, 1976.
- 57.** Seidman JD, Yetter RA, Papadimitriou JC: Epithelioid component of uterine leiomyosarcoma simulating metastatic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 116:287-290, 1992.

- 58.** King E, Dickersin GR, Scully RE: Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Am J Surg Pathol* 6:589-598, 1982.
- 59.** Lu B, Shi H and Zhang X: Myxoid leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases. *Human Pathology*, 59: 139-146. January 2017.
- 60.** Pounder DJ, Iyer PV: Uterine leiomyosarcoma with myxoid stroma. *Arch Pathol Lab Med* 109:762-764, 1985.
- 61.** Darby AJ, Papadaki L, Beiby JOW : An unusual leiomyosarcoma of the uterus containing osteoclast-like giant cells. *Cancer* 36:495-504, 1975.
- 62.** Marshall RJ, Braye SG, Jones DB: Leiomyosarcoma of the uterus with giant cells resembling osteoclasts. *Int Gynecol Pathol* 5:260-268, 1986.
- 63.** Salazar OM, Bonfiglio TA, Patten SF, Keller BE, Feldstein M, Dunne ME, Rudolph J: Uterine sarcomas. Natural history, treatment and prognosis. *Cancer* 42:1152-1160, 1978.
- 64.** Bartsich EG, Bowe ET, Moore JG :Leiomyosarcoma of the uterus. A 50-years review of 42 cases. *Obstet Gynecol* 32:101-106, 1968.
- 65.** Baden, H. P. and Lee, L. D. Fibrous protein of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 71, 148-151,1978.
- 66.** Franke, W. W., Schiller, D. L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht I., Denk, H., Krepler, R and Platzer, B. (1981c). Diversity of cytokeratins: differentiation specific

expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.* 153, 933-959, 1981c.

67. Fuchs E and Green, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033-1042, 1980.

68. Moll, R., Krepler, R and Franke, W. W. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in diverse human carcinomas. *Differentiation* 23, in press (1982c).

69. Bowden, P. E. and Cunliffe, W. J. Modification of human prekeratin during epidermal differentiation. *Biochem. J.* 199, 145-154, (1981).

70. Sun, T.-T. and Green, H. Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* 253, 2053-2060, (1978b).

71. Denk, H., Krepler, R., Lackinger, E., Artlied, U. and Franke, W. W. (1982). Biochemical and immunocytochemical analysis of the intermediate filament cytoskeleton in human hepatocellular carcinomas and in hepatic neoplastic nodules of mice. *Lab. Invest.* 46, 584-596, 1982.

72. Franke, W.W., Winter, S., Grund, C., Schmid, E., Schiller, D. L. and Jarasch, E.-D. (1981b). Isolation and characterization of desmosome associated tonofilaments from rat intestinal brush border. *J. Cell Biol* 90, 116-127.

- 73.** Moll R, Franke WW, Schiller D.L, Geiger B and Krepler R: The catalog of human cytokeratin polypeptides. Patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24, 1982.
- 74.** Battifora H: Expression of keratins by endothelial cells. Atavism or Anarchy;(editorial). *Ultrastruct Pathol* 14:iii-v, 1990.
- 75.** Bader BL, Jahn L, Franke WW: Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur J Cell Biol* 47:300-319, 1988.
- 76.** Gown AM, Boyd HC, Chang Y, Ferguson M, Reichler B, Tippens D: Smooth muscle cells can express cytokeratins of "simple" epithelium. *Am J Pathol* 132:223-232, 1988.
- 77.** Turley H, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY: Biochemical evidence that cytokeratins are present in smooth muscle. *Br J Exp Pathol* 69:433-440, 1988.
- 78.** Norton Aj, Thomas JA, Isaacson PG: Cytokeratin specific monoclonal antibodies are reactive with tumours of smooth muscle derivation. An immunocytochemical and biochemical study using antibodies to intermediate filament cytoskeletal proteins. *Histopathology* 11:487-499, 1987.
- 79.** Miettinen M: Immunoreactivity for cytokeratin and epithelial membrane antigen in leiomyosarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 112:637-640,1988.
- 80.** Szuchet, S, Stefansson K, Wollmann RL, Dawson G, Arnason BGW:Maintenance of isolated oligodendrocytes in long-term culture. *Brain Res* 1980;200:151-164.

- 81.** Dimitrios L. Arvanitis, Panos Kouklis, Gladys Mori de Moro, Nikos Goutas, Christos Kittas and Sara Szuchet. Immunostaining of ductal breast carcinomas with the monoclonal antibody H. *Oncology reports* 2:991-995, 1995.
- 82.** Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497, 1975.
- 83.** Galfre G and Milstein C: Preparation of monoclonal antibodies, strategies and procedures. *Meth Enzymol* 73:3-46, 1981.
- 84.** C-F Chou, Smith AJ, Omary BM: Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J Biol Chem* 267:3901-3906, 1992.
- 85.** Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S and Brennan MD: A human cell line from pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1416, 1973.
- 86.** Arapis F, Arvanitis L, Zibis A, Havaki S, Sotiriou S and Arvanitis D: Expression of the O-Linked N-Acetylglucosamine Containing Epitope H (O-GlcNAcH) in Human Uterine Cervical Mucosa. ISCAA, September 2016.
- 87.** Nikolaou M, Zibis A, Drosos Y, Havaki S and Arvanitis L: The O-Linked N-Acetylglucosamine Containing Epitope H (O-GlcNAcH) is Upregulated in the Trophoblastic and Downregulated in the Fibroblastic Cells in Human Chorionic Villi with Myxoid Degeneration. ISCAA, September 2017.
- 88.** Zibis A, Nikolaou M, Nikolaou G and Arvanitis D: The O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H (O-GlcNAcH) is present in the hypertrophic and absent in the

resting/reserve chondrocytes in the ossification centers of human embryos. ISCAA, September 2015

89. Arvanitis D, Drosos Y, Zibis A, Havaki S and Arvanitis L: Expression of the O-Linked N-Acetylglucosamine containing epitope H (O-GlcNAcH) in lamb glial cells in vitro and in vivo. Glial Cells in Health and Disease. Edinburg, July, 2017.

90. Arvanitis L, Vassiou K, Kotrotsios A and Sgantzios M: Hypoxia upregulates the expression of the O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in human ependymal cells. Pathology - Research and Practice 207(2):91-6. February, 2011.

91. Havaki S, Kittas Ch, Marinos E, Dafni U, Sotiropoulou Ch, Voloudakis-Baltatzis I, Goutas N, Vassilaros S, Athanasiou E and Arvanitis D: Ultrastructural Immunostaining of Infiltrating Ductal Breast Carcinomas with the Monoclonal Antibody H: A Comparative Study with Cytokeratin 8. Ultrastructural Pathology 27(6):393-407. November, 2003.

92. Havaki S, Voloudakis-Baltatzis I, Goutas N, Arvanitis L, Vassilaros S, Arvanitis D, Kittas Ch and Marinos E: Nuclear Localization of Cytokeratin 8 and the O-linked N - Acetylglucosamine-containing Epitope H in Epithelial Cells of Infiltrating Ductal Breast Carcinomas: A Combination of Immunogold and EDTA Regressive Staining Methods. Ultrastructural Pathology 30(3):177-86. May, 2006.

93. Arvanitis D, Arvanitis L, Panourias I, Kitsoulis P and Kanavaros P: Mitochondria-rich normal, metaplastic, and neoplastic cells show overexpression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H. Pathology - Research and Practice 201(4):319-24. February, 2005.

- 94.** Arvanitis D, Arvanitis L, Panourias I, Kitsoulis P and Kanavaros P: The expression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H is higher in astrocytomas compared to anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Histology and histopathology* 20(4):1057-63. November, 2005.
- 95.** Arvanitis L, Koukoulis G and Kanavaros P: The expression of the O-linked N-acetylglucosamine containing epitope H in the gemistocytic, pilocytic and subependymal giant cell astrocytomas. *Oncology Reports* 22(3):521-4. October, 2009.
- 96.** Yildirim G, Reeves R, Han G, Hart G, Arvanitis L and Zachara N: Monoclonal Antibody H is a Novel O-GlcNAc Specific Antibody that Recognizes a Stress-Dependent Epitope on Vimentin. *Glycobiology*. November, 2013.
- 97.** King IA and Hounsell EF: Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-acetylglucosamine residues. *Journal of Biological Chemistry* 264(24):14022-8. Sept, 1989.
- 98.** Zachara N, Cheung WD and Hart G: Nucleocytoplasmic Glycosylation: O-Linked β -N-Acetylglucosamine. *Current Organic Chemistry* 8(5):369-383. March, 2004.
- 99.** Xing D, Gong K, Feng W, Nozell S, Chen Y, Chatham J and Oparil S: O-GlcNAc Modification of NF κ B p65 Inhibits TNF- α -Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Plos One*. August, 2011.
- 100.** Akimoto Y, Kreppel L, Hirano H and Hart G: Hyperglycemia and the O-GlcNAc Transferase in Rat Aortic Smooth Muscle Cells: Elevated Expression and Altered Patterns of O-GlcNAcylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 389(2):166-75. June, 2001.

- 101.** Barnes JW, Tian L, Heresi GA, Farver CF, Asosingh K, et al.: O-GlcNAc Transferase Directs Cell Proliferation in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. April, 2015.
- 102.** Capotosti F, Guernier S, Lammers F, et al.: O-GlcNAc Transferase Catalyzes Site-Specific Proteolysis of HCF-1. *Cell* 144(3):376-88. February, 2011.
- 103.** Lazarus MB, Jiang J, Kapuria V, et al.: HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science* 342(6163):1235-9. December, 2013.
- 104.** Warburg O, Wind F and Negelein E: The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology*, 8(6): 519–530. March, 1927.
- 105.** Warburg O: On the origin of cancer cells. *Science*. 123(3191):309-14. February, 1956.
- 106.** Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, et al.: Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *JCB*. 178 (1): 93. July, 2007.
- 107.** Deberardinis R: Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genetics in Medicine* volume 10, pages 767–777. November, 2008.
- 108.** Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis C, et al.: Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Volume 149, Issue 3, Pages 656-670*. April, 2012
- 109.** Roos MD, Han IO, Paterson Aj and Kudlow JE: Role of glucosamine synthesis in the stimulation of TGF-alpha gene transcription by glucose and EGF. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. Volume 270, Issue 3, Pages C803-C811. March, 1996

- 110.** Manzari B, Kudlow JE, Fardin P, et al.: Induction of Macrophage Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase Expression by Hypoxia and by Picolinic Acid. *International Journal of immunopathology and Pharmacology*. January, 2007.
- 111.** Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari SH, et al.: Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* volume 29, pages 2831–2842. May, 2010.
- 112.** Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR et al.: Critical role of O-GlcNAc transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*. January, 2012.
- 113.** Ma Z and Vosseller K: O-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids* 45(4). July, 2013.
- 114.** Mi W, Gu Y, Han C, et al.: O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Volume 1812, Issue 4, Pages 514-519. April 2011.
- 115.** Shi Y, Tomic J, Wen F, et al.: Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* volume 24, pages 1588–1598. July, 2010.
- 116.** Zhu Q, Zhu L, Yang Z, et al.: O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical Oncology* 29(2):985-993. April, 2011.
- 117.** Zhu W, Leber B and Andrews D: Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *The EMBO Journal* 20(21):5999-6007. December, 2001.

- 118.** Myatt S and Lam E: The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, volume 7, pages 847–859. 2007.
- 119.** Benz C and Yau C: Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nature Reviews Cancer* volume 8, pages 875–879. 2008.
- 120.** Yi W, Clark P, Mason D, et al.: Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism. *Science*, Vol. 337, Issue 6097, pp. 975-980. August, 2012.
- 121.** Balch W, Morimoto R, Dillin A and Kelly J: Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science*: Vol. 319, Issue 5865, pp. 916-919. February, 2008.
- 122.** Walgren J, Vincent T, Schey K and Buse M: High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including α -tubulin. Volume 284, Issue 2, Pages E424-E434. February 2003.
- 123.** Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC and Lefebvre T: Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology*, Volume 16, Issue 1, Pages 22–28. January, 2006
- 124.** Mariappa D, Sauert K, Marino K, et al.: Protein O-GlcNAcylation Is Required for Fibroblast Growth Factor Signaling in *Drosophila*. *Science Signaling*: Vol. 4, Issue 204, pp. ra89.Dec, 2011.
- 125.** Andres-Bergos J, Tardio L, Larranaga-Vera A, et al.: The increase in O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo. August 2012.

- 126.** Gu Y, Mi W, Ge Y, et al.: GlcNAcylation Plays an Essential Role in Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research*. July 2010.
- 127.** Park KS and Gumbiner BM: Cadherin 6B induces BMP signaling and de-epithelialization during the epithelial mesenchymal transition of the neural crest. *Development*: July 2010.
- 128.** Park SY, Kim HS, Kim NH, et al.: Snail1 is stabilized by *O*-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO Journal* (2010) 29, 3787-3796. October, 2010.
- 129.** Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, et al.: Perturbations in *O*-linked β -N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry*. September 2005.
- 130.** Wang Z, Udeshi N, Slawson C, et al.: Extensive Crosstalk Between *O*-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis. *Science Signaling*. Vol. 3, Issue 104, pp. ra2. January 2010.
- 131.** Jang H, Kim TW, Yoong S, et al.: *O*-GlcNAc Regulates Pluripotency and Reprogramming by Directly Acting on Core Components of the Pluripotency Network. *Cell Stem Cell*. Volume 11, Issue 1, Pages 62-74. 6 July 2012
- 132.** Myers SA, Panning B and Burlingame AL: Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific *O*-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. *PNAS*, May 2011.
- 133.** Chou TY, Dang CV and Hart GW: Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *PNAS*, 92 (10) 4417-4421. May 1995.

- 134.** Vierbuchen T, Wernig M: Molecular roadblocks for cellular reprogramming. *Mol Cell* 47(6):827–838. doi:10.1016/j.molcel. 2012.09.008. 2012
- 135.** Yang YR, Song M, Lee H, et al.: O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *The Ageing Cell*. Volume11, Issue3, Pages 439-448. June 2012.
- 136.** Krzeslak A, Forma E, Bernaciak M, Romanowicz H, Brys M. Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin Exp Med*, 12(1):61–5. doi:10.1007/s10238-011-0138-5. 2012.
- 137.** Kamigaito T, Okaneya T, Kawakubo M, Shimojo H, Nishizawa O, Nakayama J. Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 17(1):18–22. doi:10.1038/pcan.2013.56. 2013
- 138.** Phueaouan T, Chaiyawat P, Netsirisawan P, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, et al. Aberrant O-GlcNAc-modified proteins expressed in primary colorectal cancer. *Oncol Rep* (2013) 30(6):2929–36. doi:10.3892/or. 2013.2794
- 139.** Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-linked β -Nacetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* (2012) 287(34):28755–69. doi:10.1074/jbc.M112.345546

- 140.** Rozanski W, Krzeslak A, Forma E, Brys M, Blewniewski M, Wozniak P, et al.
Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin Lab* (2012) 58(5–6):579–83
- 141.** Krzeslak A, Józwiak P, Lipinska A. Down-regulation of β -N-acetyl-Dglucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol Rep* (2011) 26(3):743–9. doi:10.3892/or.2011.1333
- 142.** Muniz de Queiroz R, Carvalho E and Barbosa Dias W: *Frontiers in Oncology*, June 2014
- 143.** Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 880-885.
- 144.** Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- 145.** Bradford, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 146.** Arvanitis DL, Stavridou AI, Mori de Moro G and Szuchet S: Reactive astrocytes upregulate one or more gene products that are recognised by monoclonal antibody H, *Cell Tissue Res.* 304 (2001) 11-19.
- 147.** Brown DC, Theaker JM, Banks PM. Gatter KC. Mason DY. Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumours. *Histopathology*:11; 477-486, 1987

- 148.** Hart GW: Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 315-335.
- 149.** Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R: Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus, *Oncogene* 12 (1996) 921-930.
- 150.** Zachara NE and Hart GW, O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress.
- 151.** Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, et al: YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation), *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14046-14052.
- 152.** Wells L, Whelan SA and Hart GW: O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 435-441.
- 153.** B. Stiemer, R. Graf, H. Neudeck, R. Hildebrandt, H. Hopp & H.K. Weitzel. Antibodies to cytokeratins bind to epitopes in human uterine smooth muscle cells in normal and pathological pregnancies. *Histopathology* 1995,27, 407-414.

