

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Παθολογία Στόματος με κατεύθυνση τη Χειρουργική Στόματος

**Μελέτη του προτύπου έκφρασης
των σχετιζόμενων με το στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ)
συνοδών πρωτεϊνών ΒiP/GRP78 και Καλνεξίνης
σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους**

ΠΑΥΛΗ ΜΑΡΙΑ

Αθήνα, 2016

Επιβλέπων Αναπληρωτής Καθηγητής για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας **κος Φώτιος Τζέρμπος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής.

Τριμελής Επιτροπή για την αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

1. Φώτιος Τζέρμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
2. Ιωάννης Ιατρού, Καθηγητής Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
3. Κωνσταντίνος Τόσιος, Επίκουρος Καθηγητής Στοματολογίας, Οδοντιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Αναπληρωτή Καθηγητή Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κο Φώτιο Τζέρμπο για την άριστη συνεργασία κατά τη συγγραφή και διόρθωση του κειμένου της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κα Ιουλία Χατζηστάμου-Κιάρη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Βασικών Ιατροβιολογικών Επιστημών της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ για για την σύλληψη της αρχικής ιδέας, τον σχεδιασμό της μεθοδολογίας του πειράματος, την καθοδήγηση, καθώς και την παροχή του οικονομικά βαρέως υλικοτεχνικού εξοπλισμού της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ιωάννη Ιατρού, Διευθυντή της κλινικής Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ για την τιμή που μου έκανε να αποτελεί μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κο Κωνσταντίνο Τόσιο για τις καίριες παρατηρήσεις του και για την τιμή που μου έκανε να αποτελεί μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κο Ιπποκράτη Κιάρη για την φιλοξενία στο εργαστήριό του καθώς και για τις καίριες παρεμβάσεις του στο σχεδιασμό και στην υλοποίηση της εργασίας. Το πειραματικό σκέλος δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί χωρίς την βοήθεια της κα Έλενας Φαρμάκη, μεταδιδακτορικής ερευνήτριας στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, την οποία και ευχαριστώ θερμά. Ευχαριστίες οφείλω και στους συναδέλφους μου μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συμπορευτήκαμε και μοιραστήκαμε τις κοινές επιστημονικές μας ανησυχίες τα τρία χρόνια των μεταπτυχιακών σπουδών. Ευχαριστώ επίσης την οικογένειά μου για όλη την υποστήριξη και τη δύναμη που έδωσε από την αρχή μέχρι την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περιεχόμενα

| | | |
|------------------|--|-----------|
| A. | Γενικό μέρος | 8 |
| A.1 | Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος | 8 |
| A.1.1 | Εισαγωγή | 8 |
| A.1.2 | Επιδημιολογία | 11 |
| A.1.3 | Αιτιολογία | 13 |
| A.1.4 | Γενετικοί μηχανισμοί | 14 |
| A.1.5 | Κλινικά χαρακτηριστικά | 16 |
| A.1.6 | Απεικονιστική μεθοδολογία – ακτινογραφική εικόνα | 18 |
| A.1.7 | Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά | 22 |
| A.1.8 | Διάγνωση | 24 |
| A.1.9 | Χειρουργική Θεραπεία του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου | 26 |
| A.1.9.1 | Μαρσιποποίηση | 26 |
| A.1.9.2 | Εκτυρήνιση | 28 |
| A.1.9.2.1 | Εκτυρήνιση και συνοδευτικές θεραπείες | 30 |
| A.1.10 | Επιπλοκές | 31 |
| A.1.11 | Χειρουργική εκτομή | 32 |
| A.1.12 | Υποτροπή του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου | 32 |
| A.1.13 | Μοριακή Θεραπεία του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου | 34 |
| A.2 | Περιακρορριζικές Κύστεις | 35 |
| A.3 | Τραυματικά Ινώματα | 42 |
| A.4 | Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου | 47 |
| A.4.1 | Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) - Γενικά | 47 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| A.4.2 | Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ | 49 |
| A.4.3 | Οι πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί | 50 |
| A.4.3.1 | Η λειτουργία της πρωτεΐνης BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin heavy chain Protein/Glucose-Related Protein 78) | 53 |
| A.4.3.2 | Η πρωτεΐνη Καλνεξίνη (calnexin) | 57 |
| A.4.4 | Στρες του ΕΔ (Stress of Endoplasmic Reticulum – ER Stress) και απόκριση στις μη – ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response – UPR) | 60 |
| A.4.5 | Μονοπάτια σηματοδότησης της UPR | 63 |
| A.4.5.1 | Το μοριακό μονοπάτι της ATF6 (Activating Transcription Factor 6) | 64 |
| A.4.5.2 | Το μοριακό μονοπάτι PERK (Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase) | 65 |
| A.4.5.3 | Το μοριακό μονοπάτι IRE1 (Inositol Requirement 1) | 66 |
| A.4.6 | Αποπτωτικά φαινόμενα που σχετίζονται με το στρες του ΕΔ | 67 |
| A.4.7 | Το στρες του ΕΔ και οι νόσοι που σχετίζονται με αυτό | 71 |
| | Σκοπός | |
| B. | Ειδικό μέρος | 75 |
| B.1 | Υλικά και μέθοδοι | 75 |
| B.1.1 | Ασθενείς και δείγματα | 75 |
| B.1.2 | Επιτροπή Δεοντολογίας και Έρευνας | 76 |
| B.1.3 | Ανοσοϊστοχημεία | 76 |
| B.1.4 | Αξιολόγηση τομών | 81 |
| B.1.5 | Στατιστική ανάλυση | 82 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| B.2 | Αποτελέσματα | 82 |
| B.2.1 | Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Κερατινοκυτταρικούς Οδοντογενείς Όγκους | 83 |
| B.2.2 | Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Περιακρορριζικές Κύστεις | 90 |
| B.2.3 | Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Ινώματα | 96 |
| B.2.4 | Σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των Κερατινοκυτταρικών Οδοντογενών Όγκων, των Περιακρορριζικών Κύστεων και των Τραυματικών Ινωμάτων | 98 |
| B.2.5 | Συζήτηση – συμπεράσματα | 100 |
| Γ. | Περίληψη & Summary | 105 |
| Δ. | Βιβλιογραφία | 112 |

A. Γενικό Μέρος

A.1 Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος

A.1.1 Εισαγωγή

Οι οδοντικοί ιστοί προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της αρχέγονης στοματικής κοιλότητας και από τα εξωμεσεγχυματικά κύτταρα της αρχέγονης νευρικής ακρολοφίας του πρώτου βραγχιακού τόξου (Τζιαφάς 1999). Τα επιθηλιακά κύτταρα καταδύονται στο υποκείμενο εξωμεσέγχυμα και σχηματίζουν την οδοντική ταινία, από την οποία στη συνέχεια σχηματίζεται το οδοντικό όργανο.

Η εσωτερική στιβάδα του οδοντικού οργάνου αποτελείται από στιβάδα κυλινδρικών κυττάρων που διαφοροποιούνται σε αδαμαντινοβλάστες και παράγουν αδαμαντίνη. Εσωτερικά του οδοντικού οργάνου βρίσκονται τα εξωμεσεγχυματικά κύτταρα που αποτελούν την οδοντική θηλή. Η μορφολογία και το μέγεθος του δοντιού προκύπτει από την οδοντική θηλή, η οποία επίσης με τη λειτουργία της καθορίζει το τελικό στάδιο της οδοντογένεσης. Ακολουθεί ο σχηματισμός του οδοντοθυλακίου από εξωμεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία περιβάλλουν την οδοντική θηλή και το όργανο της αδαμαντίνης. Το οδοντοθυλάκιο συμβάλλει στην ανατολή και στη δημιουργία της περιοδοντικής μεμβράνης του δοντιού (Slootweg 2009).

Μετά το πέρας της οδοντογένεσης, υπολείμματα του οδοντογενούς επιθηλίου μπορούν να βρεθούν εγκλωβισμένα σε έκτοπες θέσεις όπως στο οστό των γνάθων, στην ακρορριζική περιοχή των δοντιών, καθώς και σε άλλες περιοχές. Τα υπολείμματα που παραμένουν στον περιοδοντικό χώρο μετά την ανατολή των δοντιών ονομάζονται επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez. Τα υπολείμματα στην περιοχή του βλεννογόνου ονομάζονται επιθηλιακά υπολείμματα του Serres (Sharpe 2001). Τα επιθηλιακά υπολείμματα υπό την δράση

ερεθισμάτων μπορούν να πολλαπλασιαστούν επενδύοντας περιγεγραμμένες κλειστές κοιλότητες που περιγράφονται με τον όρο «κύστεις» (Toller 1970).

Οι κύστεις διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες με κριτήριο την προέλευση των επιθηλιακών υπολειμμάτων που τις δημιουργούν. Οδοντογενείς κύστεις ονομάζονται αυτές που προέρχονται από οδοντικά επιθηλιακά υπολείμματα, και μη οδοντογενείς αυτές που προέρχονται από επιθηλιακά υπολείμματα άλλων ιστών.

Η πρώτη ταξινόμηση των επιθηλιακών οδοντογενών όγκων πραγματοποιήθηκε από τον (Kramer 1992). Το 2005, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) πρότεινε μια νέα ταξινόμηση:

| | | | |
|--|--------|--|--------|
| MALIGNANT TUMOURS | | | |
| Odontogenic carcinomas | | | |
| Metastasizing (malignant) ameloblastoma ¹ | 9310/3 | Odontogenic epithelium with odontogenic ectomesenchyme, with or without hard tissue formation | |
| Ameloblastic carcinoma – primary type | 9270/3 | Ameloblastic fibroma | 9330/0 |
| Ameloblastic carcinoma – secondary type (dedifferentiated), intraosseous | 9270/3 | Ameloblastic fibrodentinoma | 9271/0 |
| Ameloblastic carcinoma – secondary type (dedifferentiated), peripheral | 9270/3 | Ameloblastic fibro-odontoma | 9290/0 |
| Primary intraosseous squamous cell carcinoma – solid type | 9270/3 | Odontoma | 9280/0 |
| Primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from keratocystic odontogenic tumour | 9270/3 | Odontoma, complex type | 9282/0 |
| Primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from odontogenic cysts | 9270/3 | Odontoma, compound type | 9281/0 |
| Clear cell odontogenic carcinoma | 9341/3 | Odontoameloblastoma | 9311/0 |
| Ghost cell odontogenic carcinoma | 9302/3 | Calcifying cystic odontogenic tumour | 9301/0 |
| | | Dentinogenic ghost cell tumour | 9302/0 |
| | | Mesenchyme and/or odontogenic ectomesenchyme with or without odontogenic epithelium | |
| Odontogenic sarcomas | | Odontogenic fibroma | 9321/0 |
| Ameloblastic fibrosarcoma | 9330/3 | Odontogenic myxoma / myxofibroma | 9320/0 |
| Ameloblastic fibrodentino- and fibro-odontosarcoma | 9290/3 | Cementoblastoma | 9273/0 |
| | | Bone-related lesions | |
| BENIGN TUMOURS | | Ossifying fibroma | 9262/0 |
| Odontogenic epithelium with mature, fibrous stroma without odontogenic ectomesenchyme | | Fibrous dysplasia | |
| Ameloblastoma, solid / multicystic type | 9310/0 | Osseous dysplasias | |
| Ameloblastoma, extraosseous / peripheral type | 9310/0 | Central giant cell lesion (granuloma) | |
| Ameloblastoma, desmoplastic type | 9310/0 | Cherubism | |
| Ameloblastoma, unicystic type | 9310/0 | Aneurysmal bone cyst | |
| Squamous odontogenic tumour | 9312/0 | Simple bone cyst | |
| Calcifying epithelial odontogenic tumour | 9340/0 | OTHER TUMOURS | |
| Adenomatoid odontogenic tumour | 9300/0 | Melanotic neuroectodermal tumour of infancy | 9363/0 |
| Keratocystic odontogenic tumour | 9270/0 | see Chapter 1, pp. 70-73 | |

Εικόνα 1. Ταξινόμηση του 2005 των οδοντογενών όγκων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Barnes L. 2005).

Οι οδοντογενείς κερατινοκύστεις συνιστούν το 2-11% του συνόλου των κύστεων των γνάθων (Sharif, Oliver et al. 2010) και αποτελούν από τις πιο πολυμελετημένες βλάβες (Mendes, Carvalho et al. 2010). Ο Philipsen το 1956, πρώτος έκανε αναφορά για οδοντογενείς κερατινοκύστεις και τις προσδιόρισε ως «κυστική βλάβη των γνάθων με κερατινοποιημένο επιθήλιο» (Philipsen HP 1956).

Το 2005 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, στην πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση των Όγκων Κεφαλής και Τραχήλου, επαναπροσδιόρισε την φύση της οδοντογενούς κερατινοκύστης και την συμπεριέλαβε στους όγκους, με τον όρο «Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος» (Barnes L. 2005). Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση αυτή, ο κερατινοκυστικός οδοντογενής όγκος έχει οριστεί ως «καλοήθης, μονόχωρος ή πολύχωρος ενδοστικός όγκος, οδοντογενούς αιτιολογίας με χαρακτηριστικό τοίχωμα από παρακερατινοποιημένο πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο και δυνητικά επιθετική και διηθητική συμπεριφορά». Επιπλέον, «παρουσιάζεται ως μεμονωμένη ή πολλαπλή βλάβη». Η τελευταία μορφή, αποτελεί συνήθως κλινική εκδήλωση του Συνδρόμου Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων ή συνδρόμου Gorlin-Goltz. Επιπρόσθετα, στην περιγραφή του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας συμπληρώνεται ότι «οι κυστικές αλλοιώσεις των γνάθων που παρουσιάζουν ορθοκερατινοποιημένο επιθήλιο δεν αποτελούν πλέον τμήμα των κερατινοκυστικών οδοντογενών όγκων» (Barnes L. 2005).

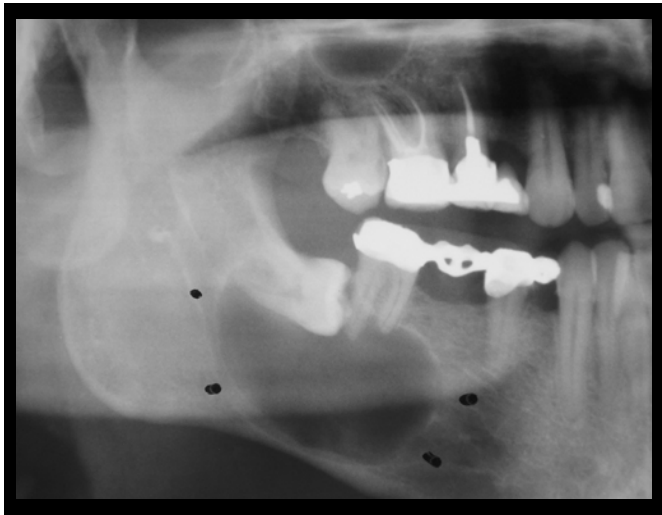
Με τον όρο «παρακερατινοποίηση» χαρακτηρίζεται η ατελής αποσύνθεση του πυρήνα και των κυτταρικών οργανιδίων στην κεράτινη στιβάδα. Ο όρος «ορθοκερατινοποίηση» χαρακτηρίζει την ολοκληρωτική αποσύνθεση του πυρήνα και των κυτταρικών οργανιδίων και σχετίζεται με περισσότερο πλήρη και ομοιόμορφη κερατινοποίηση. Μέχρι το πρόσφατο παρελθόν, οι κύστες με παρακερατινοποιημένο επιθήλιο και αυτές με ορθοκερατινοποιημένο επιθήλιο θεωρούνταν τύποι της ίδιας νοσολογικής οντότητας. Οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι χαρακτηρίζονται από περισσότερο επιθετική συμπεριφορά και μεγαλύτερη συχνότητα υποτροπής σε σύγκριση με τις ορθοκερατινοκύστες. Η μετονομασία των «Οδοντογενών Κερατινοκύστεων» σε «Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους» οφείλεται σε πρόσφατα ερευνητικά και κλινικά δεδομένα που αφορούν τη βιολογία, την ιστολογία και την κλινική συμπεριφορά της βλάβης τα οποία υποδεικνύουν την επιθετικότητά τους (MacDonald-Jankowski 2011). Οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι χαρακτηρίζονται από καταστροφική επέκταση του οστού των γνάθων και εμφανίζουν συχνή

υποτροπή μετά από χειρουργική αφαίρεση, και πολύ σπάνια αλλά τεκμηριωμένα, έχει παρατηρηθεί κακοήθης εξαλλαγή σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (MacDonald-Jankowski 2011). Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν συσχέτιση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων με μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια οι οποίες πυροδοτούν κωδικοποίηση μορίων απαραίτητων στα διάφορα μονοπάτια καρκινογένεσης (Mendes, Carvalho et al. 2010).

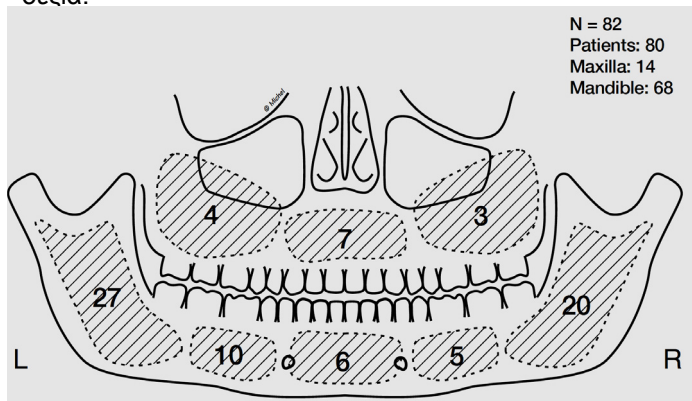
A.1.2 Επιδημιολογία

Οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι αποτελούν το 2-11% όλων των κύστεων των γνάθων (Eryilmaz, Ozmen et al. 2009; Sharif, Oliver et al. 2010; Κολοκοτρώνης 2011). Παρουσιάζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους άρρενες με αναλογία αρρένων/θηλέων 2:1 και στη 2^η - 6^η δεκαετία της ζωής (Myoung, Hong et al. 2001; Stoelinga 2001; Zhao, Wei et al. 2002; Chirapathomsakul, Sastravaha et al. 2006; Giuliani, Grossi et al. 2006; Sharif, Oliver et al. 2010; MacDonald-Jankowski 2011). Οι Myoung και συν., και οι Zhao και συν., αναφέρουν ως μέση ηλικίας εμφάνισης των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων τα 30.8-31.2 έτη (Myoung, Hong et al. 2001; Zhao, Wei et al. 2002). Οι Oda και συν. μελέτησαν 480 περιπτώσεις Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων σε δείγμα ασθενών από τις βορειοδυτικές ΗΠΑ, και παρατηρήθηκαν 23 περιπτώσεις κυστικών αλλοιώσεων κατά την 1^η δεκαετία της ζωής, με σημαντικό ποσοστό ασθενών που έπασχαν από το Σύνδρομο Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (Oda, Rivera et al. 2000). Οι περισσότερες βλάβες εμφανίζονταν με περίπου την ίδια συχνότητα κυρίως στη 2^η και 4^η δεκαετία.

Σύμφωνα με μελέτες, η νόσος παρατηρείται συχνότερα στην Καυκάσια φυλή σε ποσοστό 98% και ιδίως σε βορειοευρωπαίους (Brannon 1976; Brannon 1977; Crowley, Kaugars et al. 1992; Oda, Rivera et al. 2000; Morgan, Burton et al. 2005; Eryilmaz, Ozmen et al. 2009).



Εικόνα 2. Παράδειγμα Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου στην περιοχή της κάτω γνάθου δεξιά.



Εικόνα 3. Σχηματική παράσταση στην οποία παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων σε θέσεις της άνω και κάτω γνάθου σε δείγμα 80 ασθενών μελέτης των Stoelinga και συν.(Stoelinga 2001).

Η εντόπισή τους είναι κυρίως στην κάτω γνάθο και πιο συγκεκριμένα, στην οπίσθια περιοχή, στη γωνία και στον κλάδο της κάτω γνάθου (Stoelinga 2001; Mendes, Carvalho et al. 2010). Περίπου το 50% αυτών εμφανίζονται στη γωνία της κάτω γνάθου και επεκτείνονται με διαφορετικό βαθμό προς τον ανιόντα κλάδο και προς το σώμα της γνάθου. Το μεγαλύτερο ποσοστό κατέχει το σώμα και η γωνία της κάτω γνάθου και ακολουθεί η οπίσθια περιοχή της άνω (Myoung, Hong et al. 2001). Έρευνες αναφέρουν εντόπιση στην οπίσθια περιοχή και των 2 γνάθων με αναλογία κάτω/άνω γνάθος 2:1 (Giuliani, Grossi et al. 2006; Eryilmaz, Ozmen et al. 2009; MacDonald-Jankowski 2011).

Περιπτώσεις εξωοστικής εντόπισης είναι αρκετά σπάνιες (Mendes, Carvalho et al. 2010).

A.1.3 Αιτιολογία

Από τις κύστεις της τραχηλοπροσωπικής χώρας, συχνότερες είναι οι οδοντογενείς κύστεις που προέρχονται από έγκλειστα επιθηλιακά κατάλοιπα της οδοντικής ταινίας και οι μη-

οδοντογενείς κύστεις που προέρχονται από εμβρυϊκά επιθηλιακά τμήματα του καλυπτικού ή αναπνευστικού τύπου επιθηλίου του πρώτου βραγχιακού τόξου. Τα επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez, ορισμένες φορές εγκλωβίζονται μετά την οδοντική ανατολή, κι ένα τμήμα από αυτά διατηρεί το δυναμικό του πολλαπλασιασμού (Soskolne and Shear 1967; Killey 1977; Stoelinga 2005). Αυτό έχει ως συνέπεια την εκφύλιση - αποδόμηση των κυττάρων στο κέντρο της επιθηλιακής μάζας λόγω έλλειψης αιμάτωσης και τροφοδότησης με θρεπτικά στοιχεία. Η άθροιση των αυτολυόμενων επιθηλιακών κυττάρων έλκει μέσα στην κοιλότητα υγρό από το περιβάλλον λόγω αύξησης της ωσμωτικής πίεσης. Η συντήρηση αυτής της διαφοράς πίεσης εξασφαλίζεται με τη συνεχή εισροή επιθηλιακών κυττάρων στην κοιλότητα, και αυτή η αυξημένη πίεση οδηγεί στην απορρόφηση του παρακείμενου οστού. Στην οστική απορρόφηση θεωρείται ότι παίζει ουσιώδη ρόλο ο επονομαζόμενος «παράγων απορρόφησης οστού» που αποτελεί μείγμα προσταγλανδινών E1 και E3 από το επιθηλιακό τοίχωμα (Killey 1977; Μάρτη 1990).

Ανεξάρτητα από την προέλευση των επιθηλιακών υπολειμμάτων τα οποία είναι υπαίτια για τη δημιουργία των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος ο μηχανισμός ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού τους σε κάποιες θέσεις, ευνοώντας το σχηματισμό κυστικών βλαβών, ενώ σε κάποιες άλλες θέσεις παραμένουν αδρανή (Stoelinga 2005).

Πρόσφατα η έρευνα έχει επικεντρωθεί στους γενετικούς μηχανισμούς που ευθύνονται για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του τοιχώματος των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Τα ευρήματα των μελετών αυτών μπορούν να δώσουν απάντηση και στην εμφάνιση συχνών υποτροπών καθώς και στην επιθετική φύση της εν λόγω βλάβης και θα περιγραφούν στη συνέχεια.

A.1.4 Γενετικοί μηχανισμοί

Η κυτταρική διαφοροποίηση των οδοντικών ιστών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ρυθμιστών όπως το Σηματοδοτικό Μονοπάτι Hedgehog (SHH) και το Σηματοδοτικό Μονοπάτι του καρκίνου (Wnt), ο FGF και ο HGF, καθώς και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Mendes, Carvalho et al. 2010). Στην περίπτωση που οι ρυθμιστές - γονίδια κατασταλούν είτε από μετάλλαξη είτε από απώλεια της ετεροζυγωτίας, μπορεί να αναπτυχθεί όγκος (Knudson 1971; Knudson 1993).

Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι Hedgehog διαθέτει σηματοδοτικά μόρια όπως τα SHH, PTCH, SMO και GLI-1. Η έκφραση αυτών των μορίων έχει παρατηρηθεί σε διάφορες μορφές όγκων καθιστώντας το μονοπάτι SHH ικανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλίου – μεσεγχύματος και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Kumamoto 2006). Το PTCH κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στη μετάδοση σημάτων μέσω του SHH ελέγχοντας τον προορισμό των κυττάρων και την ανάπτυξη πολλών ιστών συμπεριλαμβανομένων και των οδοντικών. Το PTCH συνδέεται με το SMO ώστε να σχηματίσουν ένα διαμεμβρανικό σύμπλοκο για τα μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι SHH. Όταν το SHH ενεργοποιείται από τη σύνδεση του PTCH ελευθερώνει το SMO και στη συνέχεια μπορεί να ενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον GLI-1 ενεργοποιώντας τη ρύθμιση των γονιδίων μεταγραφής και κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Hardcastle, Hui et al. 1999; Zhang, Chen et al. 2005). Συνεπώς, οι αναπτυξιακές ανωμαλίες μπορούν να προκύψουν από αλλαγές είτε κληρονομικές είτε τυχαίες στα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι SHH (Mendes, Carvalho et al. 2010).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι SHH σε σχέση με την ανάπτυξη οδοντογενούς κερατινοκυστικού όγκου δεν είναι πλήρως μελετημένο, παρόλα αυτά είναι πιθανό να σχετίζεται με την κλινική του εικόνα. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης των SHH, PTCH και SMO στους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους υποδεικνύει ότι η υποτροπή τους συνδέεται με την

έκφραση του SMO. Οι Yagyuu και συν. αναφέρουν ότι οι περιπτώσεις των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων με ισχυρή έκφραση του SMO παρουσιάζουν αυξημένη παρουσία του Ki-67 σε σχέση με τις περιπτώσεις με αμελητέα έκφραση (Yagyuu, Kirita et al. 2008).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το γονίδιο PTCH, με ογκοκατασταλτικό ρόλο, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 9q22.3-q31 και εμπλέκεται στην αιτιολογία των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (Lench, High et al. 1996; Barreto, Gomez et al. 2000; Agaram, Collins et al. 2004; Guo, Zhang et al. 2013). Μεμονωμένες περιπτώσεις Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων φαίνεται να υποκρύπτουν γονοτυπικές μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου ή έλλειψη της ετεροζυγωτίας στο αντίστοιχο χρωμόσωμα (Lench, High et al. 1996). Επιπλέον, σύμφωνα με τη θεωρία του Knudson περί απενεργοποίησης των ομόζυγων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οι Lench και συν. περιέγραψαν ότι όταν υπάρχουν πολλαπλές κύστεις σε ασθενείς με το Σύνδρομο Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων, έχει ήδη προηγηθεί μια μετάλλαξη στο γονότυπο απαιτώντας μόνο μια επιπλέον μετάλλαξη στα σωματικά κύτταρα για να προκληθεί ομόζυγη απενεργοποίηση και ανάπτυξη νεοπλασματος (Lench, High et al. 1996). Σε αντίθεση, στις μεμονωμένες κύστεις απαιτούνται δύο ανεξάρτητες μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα (Lench, High et al. 1996; Levanat, Gorlin et al. 1996; Barreto, Gomez et al. 2000). Οι Barreto και συν. εξέφρασαν την υπόθεση των «2 hits» σύμφωνα με την οποία οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι οι οποίοι σχετίζονται με το Σύνδρομο Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα τα οποία περιέχουν ένα κληρονομικό «first hit» και η απώλεια των αλληλομόρφων αποτελεί απώλεια του δεύτερου φυσιολογικού αλληλομόρφου, γνωστή ως απώλεια της ετεροζυγωτίας. Στην περίπτωση των μεμονωμένων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων μπορεί να ξεκινούν από ευπαθή κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί και τα δύο σωματικά hits. Συνεπώς, το γονίδιο PTCH1 λειτουργεί ως γονίδιο ασφαλείας (gatekeeper gene). Στην περίπτωση που τα κύτταρα

των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων έχουν χάσει τη λειτουργία του PTCH γίνονται στόχοι άλλων γενετικών μεταβολών, όπως η απορρύθμιση των ογκοπρωτεϊνών κυκλίνη D1 και p53 (Lo Muzio, Staibano et al. 1999).

Οι Brelrier και συν. έδειξαν για πρώτη φορά την επίδραση των μεταλλάξεων της ετεροζυγωτίας του PTCH1 στους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους και υποστήριξαν ένα μηχανισμό απλοειδισμού, όπου οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι μπορεί να αναπτυχθούν μετά την απώλεια μόνο ενός αλληλομόρφου του γονιδίου PTCH προκαλώντας μείωση της ποιότητας του γονιδίου. Έτσι, υπάρχει ένα γονιδιακό αλληλόμορφο του PTCH φυσιολογικό, κι ένα μη φυσιολογικό (Santarosa and Ashworth 2004).

Γονοτυπικές αναλύσεις από τους Agaram και συν. έδειξαν σημαντική απώλεια της ετεροζυγωτίας γνωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως το p16, το p53, το PTCH, το MCC, σε μεμονωμένους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους (Agaram, Collins et al. 2004).

A.1.5 Κλινικά χαρακτηριστικά

Στα πρώτα στάδια συνήθως, ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος δεν παρουσιάζει συμπτώματα και συνήθως ανακαλύπτεται τυχαία μετά από κάποιο ακτινογραφικό έλεγχο του ασθενούς. Κλινικά σημεία παρουσιάζονται όταν οι διαστάσεις του όγκου έχουν αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό, τέτοιο που να προκαλείται έκπτυξη των οστικών πετάλων των γνάθων (Hyun, Hong et al. 2009; Sharif, Oliver et al. 2010). Στη μελέτη των Hyun και συν. αναφέρεται διόγκωση του παρειακού πετάλου στο 30% των περιπτώσεων στην κάτω γνάθο και στο 50% των περιπτώσεων στην άνω (Hyun, Hong et al. 2009). Αντίθετα, στην οπίσθια περιοχή της κάτω γνάθου και στον κλάδο, συνήθως δεν προκαλούν απορρόφηση ή διόγκωση του παρειακού/γλωσσικού πετάλου καθώς αναπτύσσονται κυρίως εις βάρος της σπογγώδους ουσίας του οστού με προσθιοπίσθια επέκταση (Sharif, Oliver et al. 2010; Κολοκοτρώνης

2011). Επίσης, από την αύξησή του μπορεί να προκληθεί κινητικότητα και μετατόπιση των δοντιών που σχετίζονται με τον όγκο (Μάρτη 1990). Επιπρόσθετα, η διόγκωση προκαλεί ατροφία των νευρικών ινών και των αγγείων που εισέρχονται στο ακρορρίζιο των δοντιών, με αποτέλεσμα τη νέκρωση του οδοντικού πολφού (Varinauskas, Gervickas et al. 2006). Εμπλοκή της ρινικής κοιλότητας και απορρόφηση ριζών δοντιών της άνω γνάθου δεν αναφέρεται συχνά (Makowski, McGuff et al. 2001; Giuliani, Grossi et al. 2006). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, γίνονται αντιληπτοί μετά από κάποια μόλυνση της βλάβης, που εκδηλώνεται με οξεία λοίμωξη (πόνος, φλεγμονή) ενώ όταν η λοίμωξη καταστεί χρόνια το μόνο κλινικό σημείο που θέτει υποψίες είναι στην περίπτωση εμφάνισης συριγγώδους πόρου (Killey 1977; Μάρτη 1990). Στην κάτω γνάθο, σε αρκετά ευμεγέθεις όγκους, κάποιες φορές αναφέρεται υπαισθησία - παραισθησία του κάτω χείλους και σε προχωρημένες περιπτώσεις, όταν η βλάβη έχει καταλάβει μεγάλο τμήμα της γνάθου, μπορεί να προκληθεί παθολογικό κάταγμα. Συνεπώς, καθώς η παραισθησία είναι σπάνια, μεγάλος είναι ο αριθμός των ασθενών που ανακαλύπτουν την βλάβη τυχαία μετά από ακτινογραφικό έλεγχο. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να επισημαίνεται από τον οδοντίατρο, η αναγκαιότητα ετήσιου προληπτικού ελέγχου.

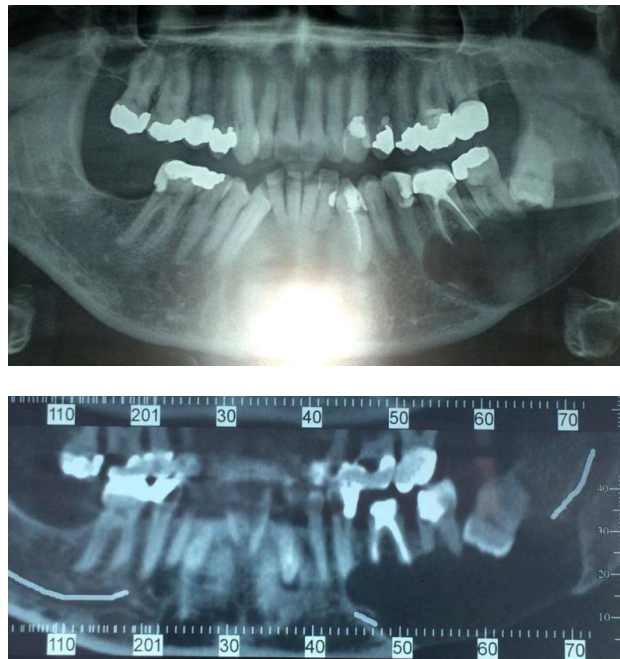
Το Σύνδρομο Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων ή Gorlin Goltz κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα αλλά σε μεγάλο ποσοστό αφορά νέες μεταλλάξεις του υπαίτιου γονιδίου στο χρωμόσωμα 9q22.3-q31 (Κολοκοτρώνης 2011). Παρουσιάζει χαρακτηριστικές εκδηλώσεις οι οποίες αφορούν το πρόσωπο, το δέρμα, τις γνάθους, το σκελετό, τους οφθαλμούς, το ενδοκρινικό σύστημα καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Αγγελόπουλος 2001).

Στο πρόσωπο, παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις μετωπιαία και κροταφοβρεγματική προπέτεια, υπερτελορισμός στο 40% των περιπτώσεων, εφιπιοειδής ρίνα και μετρίου βαθμού προγναθισμός της κάτω γνάθου (Makowski, McGuff et al. 2001; Αγγελόπουλος 2001; Giuliani, Grossi et al. 2006).

Στο δέρμα, είναι χαρακτηριστικά τα πολλαπλά σπιλοειδή βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία, και πιο συχνά, μεταξύ εφηβείας και 35^{ου} έτους. Κλινικά περιγράφονται ως βλατίδες διαμέτρου 1mm - 1cm με ή χωρίς μελανίνη. Εντοπίζονται κυρίως στο πρόσωπο, στον τράχηλο, αλλά και στη ράχη, στο θώρακα, στην κοιλιά και στα κάτω άκρα (Αγγελόπουλος 2001).

Στις γνάθους, το 65-75% των ασθενών εμφανίζει Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους κατά την 1^η δεκαετία της ζωής τους. Οι κύστεις αυτές μπορεί να είναι πολλαπλές ή και αμφοτερόπλευρες, με επιθετική συμπεριφορά και αυξημένη πιθανότητα υποτροπής (Αγγελόπουλος 2001).

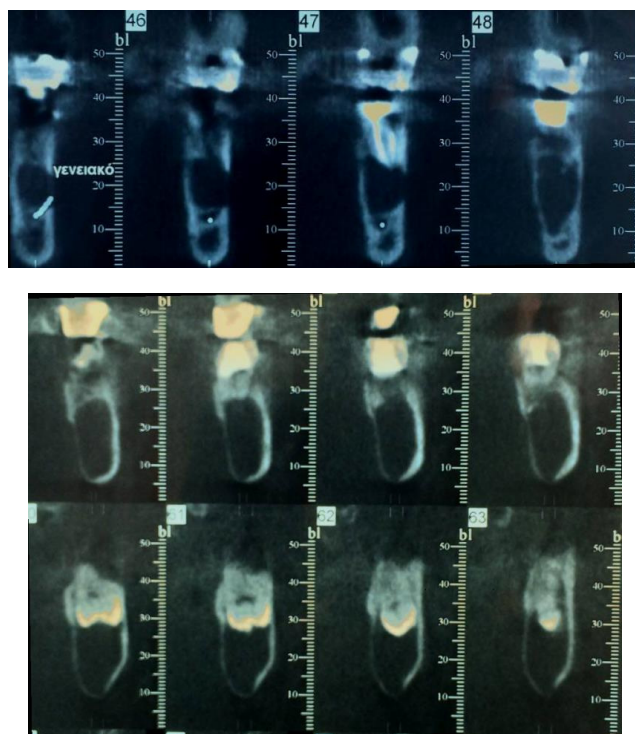
A.1.6 Απεικονιστική μεθοδολογία – ακτινογραφική εικόνα



Εικόνα 4. Ορθοπαντομογράφημα και υπολογιστική τομογραφία μεγάλου Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου κάτω γνάθου αριστερά.

Οι απεικονιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων είναι η πανοραμική ακτινογραφία και η

οδοντιατρική υπολογιστική τομογραφία κωνικής δέσμης καθώς και η τρισδιάστατη ανασύνθεση.



Εικόνα 5. Κάθετες τομές στην ακρολοφία από υπολογιστική τομογραφία (CBCT) κάτω γνάθου που απεικονίζουν Κερατινοκυστικό Οδοντογενή Όγκο, το λεππυθέν γλωσσικό πτέαλο, και τη σχέση του όγκου με το κάτω φατνιακό νεύρο και την εντόπιση του έγκλειστου σωφρονιστήρα.

Ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος μπορεί να παρουσιαστεί ως μικρή έως αρκετά μεγάλη, ωοειδής, μονόχωρη ή πολύχωρη βλάβη, συχνά με ανώμαλα αλλά σαφώς περιγεγραμμένα όρια (Αγγελόπουλος 2001; Stoelinga 2005; Giuliani, Grossi et al. 2006; MacDonald-Jankowski 2011). Σε προχωρημένο στάδιο, η κυστική αλλοίωση αποκτά ανώμαλα δαντελωτά όρια. Στη μελέτη των Chirapathomsakul και συν., το 72% των βλαβών παρουσιάζονται ως μονόχωρες αλλοιώσεις, ενώ το 28% ως πολύχωρες (Chirapathomsakul et al. 2006). Οι συνηθέστερες θέσεις εντόπισης είναι η γωνία και ο κλάδος της κάτω γνάθου (Αγγελόπουλος 2001; Stoelinga 2005). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται διαφράγματα λόγω του τρόπου επέκτασης και ανάπτυξής του (επιθηλιακή ανάπτυξη προς τη μυελώδη μοίρα του οστού με σχηματισμό προσεκβολών).

Συνήθως στην οδοντιατρική υπολογιστική αξονική τομογραφία (CBCT) δεν παρατηρείται έκπτυξη της φλοιώδους μοίρας της κάτω γνάθου (Σκλαβούνου 1988; Αγγελόπουλος 2001).



Εικόνα 6. Προεγχειρητική απεικόνιση εκτεταμένης βλάβης στην κάτω γνάθο. Δεν υπάρχει ένδειξη απορρόφησης των ριζών των γειτονικών δοντιών.

Αυτό συμβαίνει διότι ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος αυξάνεται εις βάρος της σπογγώδους μοίρας των γνάθων σε σύγκριση με τη φλοιώδη μοίρα. Το γλωσσικό πέταλο, ως πιο λεπτό, παρουσιάζει μικρότερη αντίσταση οπότε παρατηρείται πιο συχνά η διάτρησή του σε σχέση με το παρειακό πέταλο (Σκλαβούνου 1988; Κολοκοτρώνης 2011).

Τέλος σε περίπτωση που ο όγκος καταλάβει μεγάλο μέρος του σώματος της

κάτω γνάθου, προκαλεί μετατόπιση του κάτω φατνιακού νεύρου (υπαισθησία) προς το κάτω χείλος της κάτω γνάθου και σε σπάνιες περιπτώσεις κάταγμα της κάτω γνάθου (Myoung,



Εικόνα 7. Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος που προκάλεσε παρεκτόπιση του σωφρονιστήρα κάτω αριστερά.

Hong et al. 2001; Eryilmaz, Ozmen et al. 2009).

Ακτινογραφικά ευρήματα δεν είναι παθογνωμονικά.

Σε πολλές περιπτώσεις, η βλάβη μπορεί να σχετίζεται

με κάποιο έγκλειστο δόντι με συνέπεια να συγχέεται

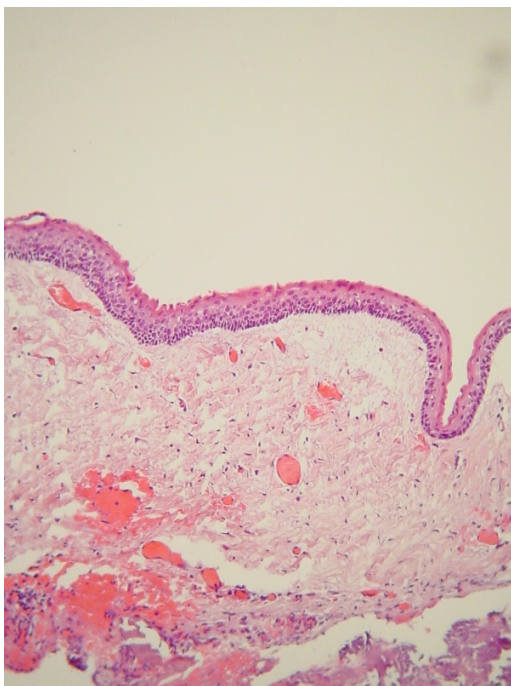
με οδοντοφόρο κύστη (Σκλαβούνου 1988; Αγγελόπουλος 2001). Στην πρόσθια περιοχή της άνω ή της κάτω γνάθου, η ύπαρξη μεμονωμένης βλάβης μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη

διάγνωση περιακρορριζικής, πλάγιας περιοδοντικής ή υπολειμματικής κύστης (Σκλαβούνου 1988; Αγγελόπουλος 2001; Giuliani, Grossi et al. 2006).

Η απορρόφηση των ριζών των γειτονικών δοντιών ή και η παρεκτόπισή τους αποτελούν σχετικά σπάνιο εύρημα (Haring and Van Dis 1988; Macdonald-Jankowski and Li 2010; MacDonald-Jankowski 2011; Κολοκοτρώνης 2011).

Θα πρέπει να δοθεί έμφαση στη διαφορική διάγνωση από την οδοντοφόρο κύστη και το αδαμαντινοβλάστωμα, στην περίπτωση ύπαρξης έγκλειστου σωφρονιστήρα, διότι εντοπίζονται κυρίως στην οπίσθια κάτω γνάθο και στον κλάδο της καθώς επίσης είναι ευμεγέθεις (Cawson 2008).

A.1.7 Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά



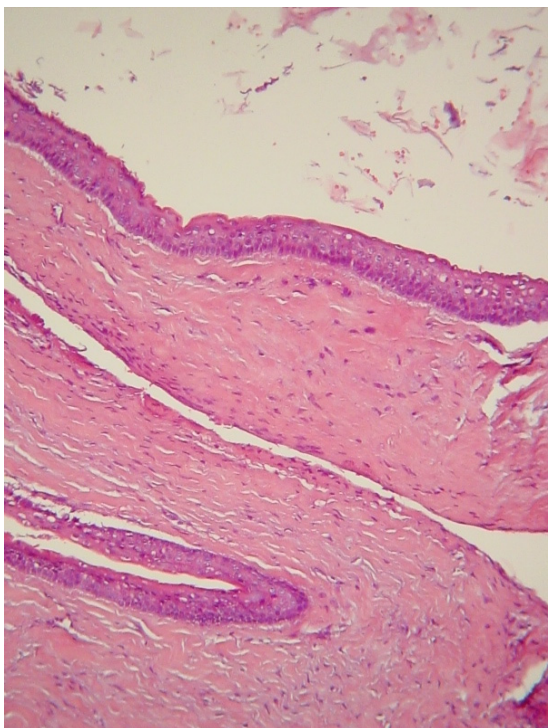
Εικόνα 8. Τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά ενός Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου (x 100).

Ιστολογικά διακρίνονται τρεις τύποι κύστεων: α) κύστεις που επενδύονται από πλακώδες επιθήλιο που έχει υποστεί παρακερατινοποίηση, β) η βασική στιβάδα παρουσιάζει ομοιότητες με εκείνη του επιθηλίου της κυρίως κυστικής κοιλότητας αλλά συχνά εμφανίζει περισσότερο πλακώδη αρχιτεκτονική δομή χωρίς να περιέχει τα χαρακτηριστικά κυβοειδή κύτταρα (παρακερατινοποιημένο επιθήλιο και ίνες κερατίνης γεμίζουν τον κυστικό σάκο), γ) σπάνιος τύπος ο οποίος στερείται επιθηλίου και υπάρχει μόνο μια μάζα κερατίνης η οποία είναι περιχαρακωμένη από πολυπύρηννα

γιγαντοκύτταρα (Browne 1970).

Τα κύρια ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τα οποία διαχωρίζουν τον Κερατινοκυστικό Οδοντογενή Όγκο από τις υπόλοιπες κύστεις των γνάθων που παρουσιάζουν κερατινοποίηση προσδιορίστηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2005. Αυτά είναι: 1) σαφώς περιγεγραμμένη, συχνά πασσαλοειδής βασική στιβάδα από κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα, 2) έντονα βασεόφιλοι πυρήνες στα κυλινδρικά κύτταρα της βασικής στιβάδας οριοθετημένοι μακριά από τη βασική μεμβράνη, 3) μιτωτική δραστηριότητα συχνότερα εμφανιζόμενη στα υπερβασικά στρώματα του επιθηλίου, 4) παρακερατωτική στιβάδα με συχνή κυματοειδή επιφάνεια.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, έχει επισημανθεί ότι η παρακεράτωση, τα εσωτερικά

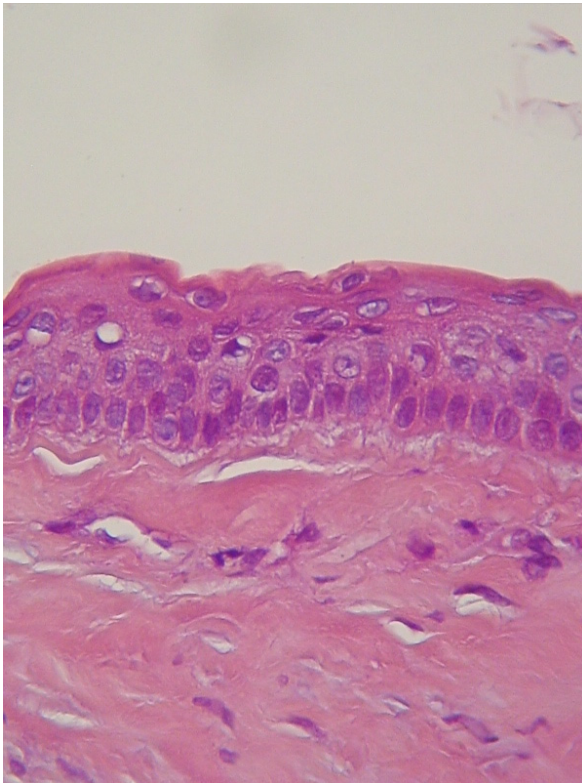


Εικόνα 9. Επιθήλιο κερατινοκυστικού οδοντογενούς όγκου (x 100).

επιθηλιακά κατάλοιπα και οι «δορυφόρες» κύστεις αποτελεί συχνότερο εύρημα στον Κερατινοκυστικό Οδοντογενή Όγκο που σχετίζεται με το Σύνδρομο Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (Todd and August 2003; Auluck and Pai 2006). Το τμήμα του συνδετικού ιστού είναι συνήθως λεπτό και δεν εμφανίζει φλεγμονώδη διήθηση, ενώ έχει αναφερθεί και αυξημένη δραστηριότητα ενεργού κολλαγενάσης (Giuliani, Grossi et al. 2006; Kuroyanagi, Sakuma et al. 2009). Επίσης έχει παρατηρηθεί αυξημένος βαθμός οστικής απορρόφησης με σύγχρονη αύξηση της έκφρασης

προσταγλανδινών (Giuliani, Grossi et al. 2006). Το υπερκείμενο επιθήλιο, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να εμφανίζει στοιχεία δυσπλασίας και μπορεί να εξαλλαχθεί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Makowski, McGuff et al. 2001; Falaki, Delavarian et al. 2009).

Οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι παρουσιάζουν μια ισχνή και διακοπτόμενη



Εικόνα 10. Μεγέθυνση (x 400) τμήματος επιθηλίου του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου της Εικόνας 8. Παρατηρούνται η κυματοειδής επιφάνεια και τα παράλληλα διατεταγμένα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Ο συνδετικός ιστός είναι ελεύθερος φλεγμονής.

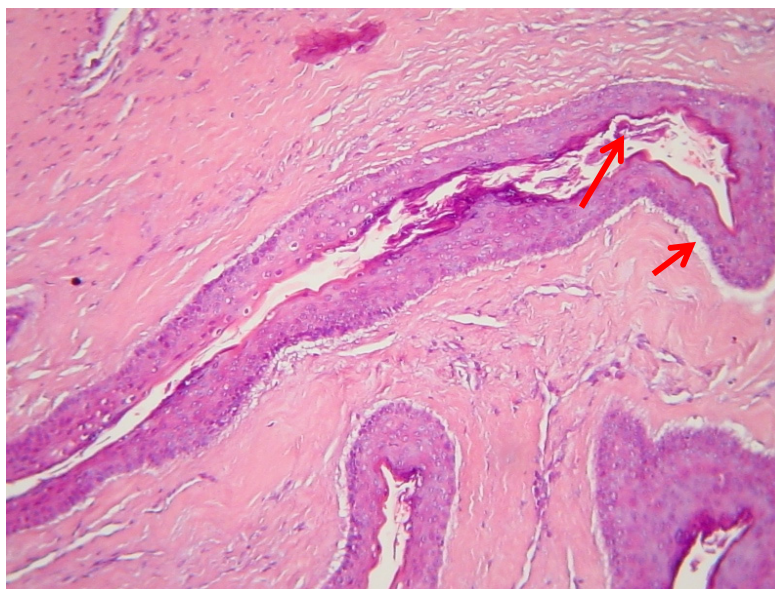
γραμμική χρώση για τη λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV, γεγονός το οποίο καταδεικνύει αλληλεπίδραση μεταξύ του επιθηλίου και του υποκείμενου συνδετικού ιστού (Kubota, Oka et al. 2002).

Τα στοιχεία του συνδετικού ιστού των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων και οι βιολογικοί δείκτες του επιθηλίου τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης ερευνών που έδειξαν ότι υπάρχει ομοιότητα με το τοίχωμα επιθετικών τύπων όγκων όπως το αδαμαντινοβλάστωμα (αυξημένη παρουσία μυοϊνοβλαστών στο υπόστρωμα, αυξημένες MMPs, αυξημένη έκφραση των RANK, RANKL και των OPGs) (Hirshberg, Sherman et al. 1999; Vered, Buchner et al. 2004; Vered, Peleg et al. 2009).

A.1.8 Διάγνωση

Δεν υπάρχουν απόλυτα διαγνωστικά στοιχεία. Απαιτείται απεικονιστικός έλεγχος όπου διευκρινίζεται το μέγεθος, η ακριβής εντόπιση και η σχέση της βλάβης με άλλα ανατομικά

στοιχεία. Η κλασσική ακτινογραφική εικόνα της βλάβης εμφανίζεται ως διαύγαση, σαφώς περιγεγραμμένη, που συνήθως περιβάλλεται από γραμμοειδή σκίαση (Σκλαβούνου 1988; Αγγελόπουλος 2001). Η χαρακτηριστική περιφερική σκίαση είναι πιθανόν να απουσιάζει σε



Εικόνα 11. Αριστερό βέλος: παρατηρούνται φολίδες κερατίνης εντός της κυστικής σιβάδας. Δεξιό βέλος: φαίνεται η αποκόλληση του επιθηλίου από το συνδετικό ιστό (x 100).

περίπτωση φλεγμονής.

Επιπλέον, σε περίπτωση κακοήθους εξαλλαγής στο επιθήλιο της κύστης, η ακτινοδιάγνωση θα έχει μη σαφώς περιγεγραμμένα όρια.

Η οδοντιατρική υπολογιστική αξονική τομογραφία αποτελεί απαραίτητο εργαλείο ώστε να

βοηθήσει τη διαφορική διάγνωση από άλλους όγκους μεγάλων διαστάσεων.

Επιπλέον, σημαντικές είναι οι

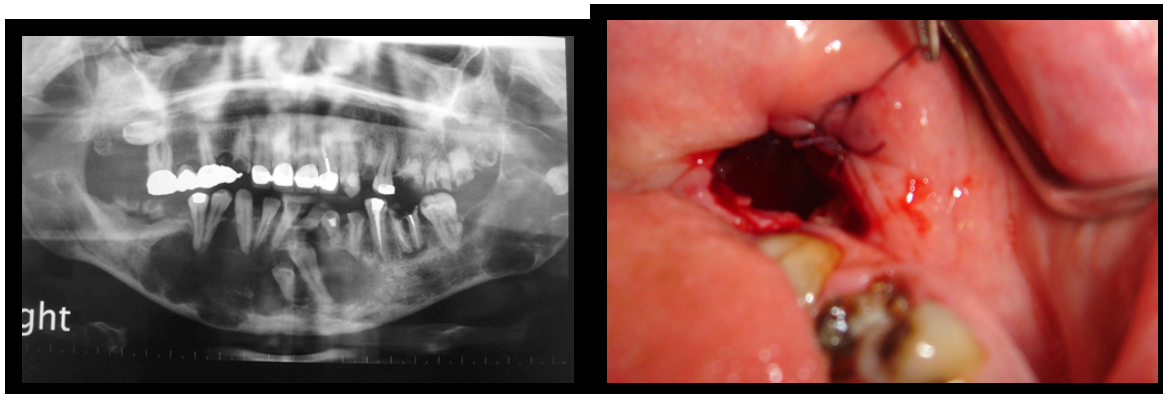
πληροφορίες που λαμβάνονται όσον αφορά την ακριβή θέση και σχέση με ανατομικά στοιχεία (κάτω φατνιακό νεύρο, ιγμόρειο άντρο, ρινική κοιλότητα). Στην περίπτωση κυστικής βλάβης, η διάγνωση υποβοηθάται με την παρακέντηση και την αναρρόφηση υγρού από την κυστική κοιλότητα (FNA) (Αγγελόπουλος 2000). Με την εξέταση αυτή ελέγχεται το είδος και η φύση του υγρού περιεχομένου. Η ακριβής εντόπιση είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό της θεραπευτικής της αντιμετώπισης.

A.1.9 Χειρουργική Θεραπεία του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου

Η μερική βιοψία, στην περίπτωση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, αποτελεί σημαντικό κλινικό εργαλείο στη διαδικασία της διάγνωσης. Η μερική βιοψία θα πρέπει να περιλαμβάνει ιστό από όλη την περιφέρεια του κυστικού τοιχώματος.

A.1.9.1 Μαρσιποποίηση

Οι τεχνικές της μαρσιποποίησης και της εκπυρήνισης πρωτοαναφέρθηκαν από τον Partsch στις αρχές του 19^{ου} αιώνα (Pogrel and Jordan 2004; Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Με την τεχνική της μαρσιποποίησης επιτυγχάνεται η μείωση της



Εικόνα 12. Ακτινογραφική εικόνα Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου στην κάτω γνάθο δεξιά και κλινική εικόνα μαρσιποποίησης.

πίεσης μέσα στον κυστικό σάκο μέσω διάνοιξης του προκειμένου να επέλθει επικοινωνία με το στοματικό περιβάλλον. Συνεπώς, το μέγεθος της κύστης μειώνεται σημαντικά ώστε σε δεύτερο χρόνο να πραγματοποιηθεί η εκπυρήνισή της. Η μαρσιποποίηση επιδιώκεται κυρίως όταν η κύστη είναι ευμεγέθης και βρίσκεται σε δυσπρόσιτα σημεία με ανατομικά μέρη τα οποία μπορεί να υποστούν βλάβη εάν γίνει προσπάθεια εκπυρήνισης (Pogrel and Jordan

2004; Pogrel 2005; Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Επιπλέον, είναι απαραίτητο να ελαττωθεί το μέγεθος της κύστης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος ιατρογενούς βλάβης ή παθολογικού κατάγματος των γνάθων (August, Faquin et al. 2003; Pogrel 2005). Η τεχνική της μαρσιποποίησης περιλαμβάνει τη δημιουργία παραθύρου, περίπου 1cm σε διάμετρο, στο τοίχωμα της κύστης, έτσι ώστε να γίνει συρραφή του κυστικού τοιχώματος με το στοματικό βλεννογόνο. Στη συνέχεια, η κοιλότητα της κύστης μπορεί να πληρωθεί με γάζα ιωδοφορμίου ή γάζα εμποτισμένη με αντιβιοτικά ή με κάποιο πώμα σιλικόνης. Όταν η γάζα αφαιρεθεί μετά από μέρες, συνήθως η κοιλότητα παραμένει ανοιχτή και χρειάζονται πλύσεις από τον ασθενή ή και τον χειρουργό δύο φορές την ημέρα, ώστε να αφαιρεθούν υπολείμματα τροφής (που μπορεί να προκαλέσουν τυχόν επιμόλυνση) καθώς επίσης και να υποβοηθηθεί η σύγκλειση της επικοινωνίας. Η τεχνική της μαρσιποποίησης έχει υψηλά ποσοστά επιτυχίας και χαμηλά ποσοστά υποτροπής όμως απαιτείται επί μακρόν παρακολούθηση του ασθενούς από 5 - 15 έτη (Marker, Brondum et al. 1996; Pogrel and Jordan 2004).

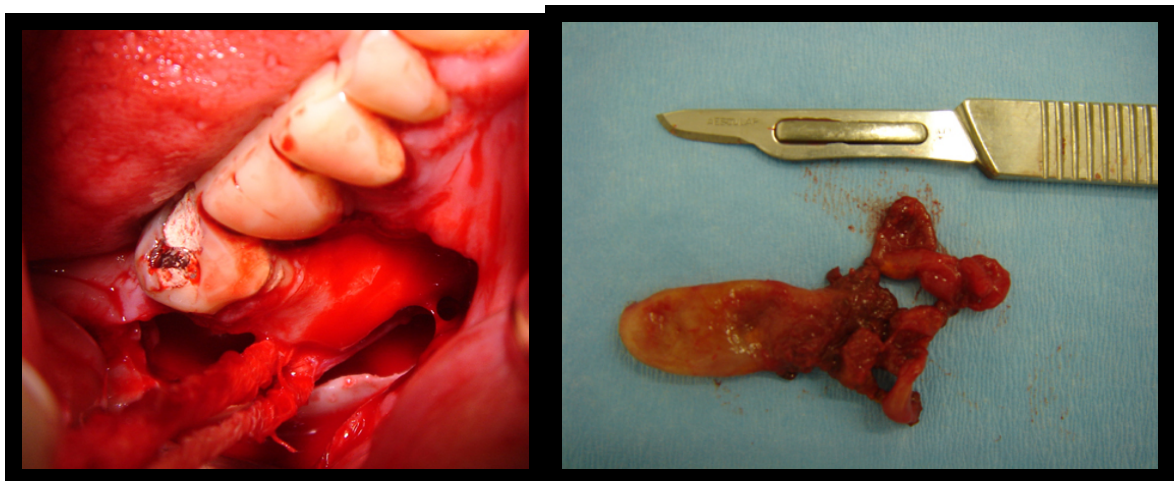
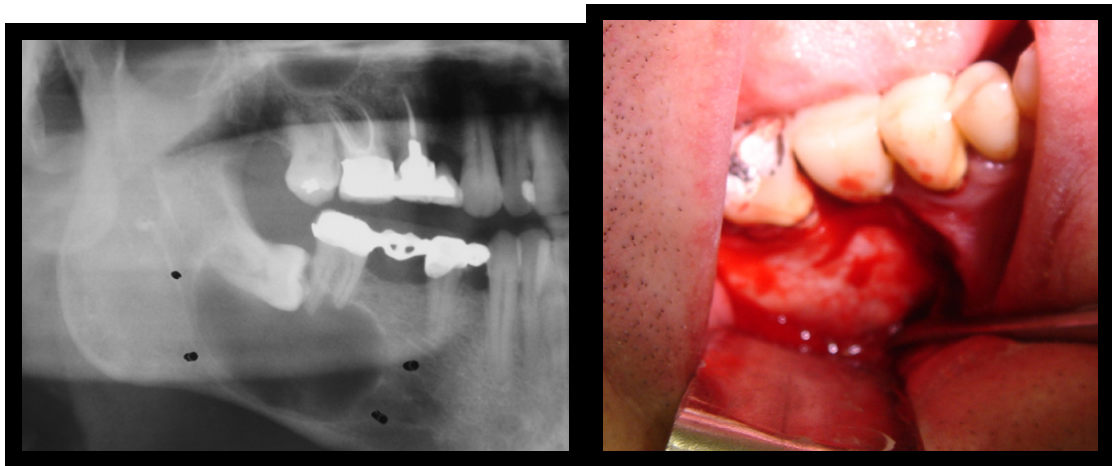
Η μαρσιποποίηση έχει προταθεί ως η καταλληλότερη θεραπεία σε μικρούς ασθενείς με μικτή οδοντοφυΐα έτσι ώστε το χειρουργικό τραύμα να είναι όσο το δυνατόν περιορισμένο και να μην διαταραχθεί η ανατολή των μόνιμων δοντιών. Σε ιστολογικό επίπεδο, μελέτες έχουν αποδείξει ότι με την τεχνική της μαρσιποποίησης το επιθήλιο των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων αντικαθίσταται από το επιθήλιο του στοματικού βλεννογόνου. Μετατρέπεται δηλαδή από παρακερατινοποιημένο σε μη – κερατινοποιημένο (de Paula, Carvalhais et al. 2000; Makowski, McGuff et al. 2001; August, Faquin et al. 2003; Pogrel 2005; Mendes, Carvalho et al. 2010). Χαρακτηριστικό στοιχείο αυτής της διαφοροποίησης του επιθηλίου, είναι η μείωση των επιπέδων της bcl-2, μιας αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης η οποία παράγεται στη βασική στιβάδα του επιθηλίου των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (Piattelli, Fioroni et al. 1998; Pogrel and Jordan 2004).

Σύμφωνα με τους Pogrel και συν., αναφέρεται ότι η υποτροπή μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και δύο χρόνια μετά τη μαρσιποποίηση και προτείνεται η εκκυρήνιση σε δεύτερο χρόνο με οστική απόξεση περιφερικά της βλάβης ώστε να μειωθούν οι υποτροπές (Pogrel and Jordan 2004). Η μαρσιποποίηση ως μοναδική τεχνική αντιμετώπισης (χωρίς εκκυρήνιση σε δεύτερο χρόνο) αποτελεί σπανιότατα την επιλογή θεραπείας (Pogrel 2005). Οι Giuliani και συν., αναφέρουν ότι η μαρσιποποίηση ως μοναδική θεραπεία δεν αρκεί, και μπορεί να επιλεγεί μόνο σε περιπτώσεις ασθενών με βεβαρυσμένο ιατρικό ιστορικό (Giuliani, Grossi et al. 2006). Η θεραπεία με την τεχνική της μαρσιποποίησης διαρκεί από 6 - 12 μήνες, στοιχείο που αποτελεί το κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής (Brondum and Jensen 1991; August, Faquin et al. 2003).

A.1.9.2 Εκκυρήνιση

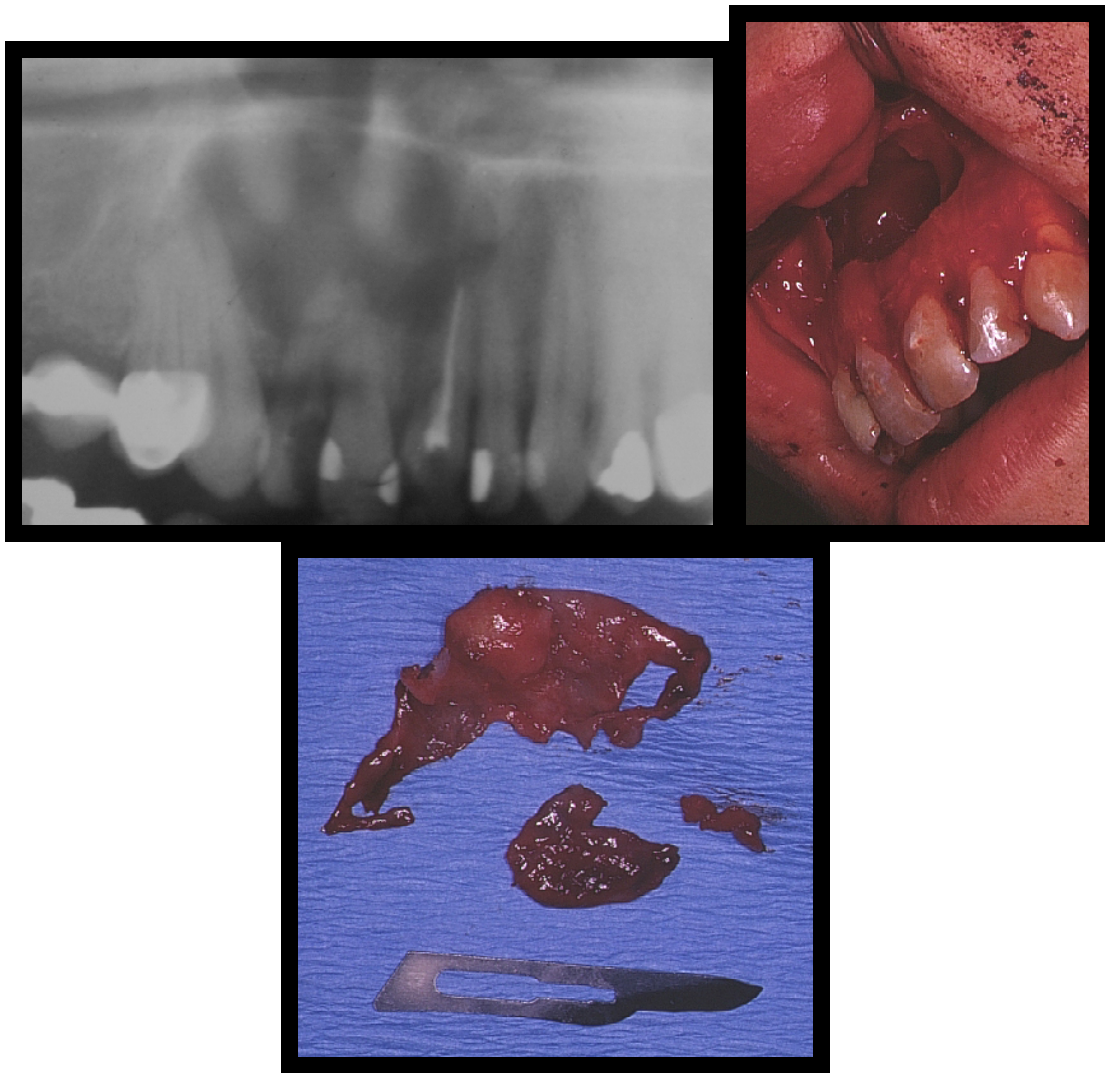
Η τεχνική της εκκυρήνισης αποτελεί την πιο διαδεδομένη θεραπεία των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Περιλαμβάνει την ολοκληρωτική αφαίρεση της κύστης και έχει το πλεονέκτημα της ολικής ιστοπαθολογικής αξιολόγησης της βλάβης (Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Η πλήρης αφαίρεση του κυστικού τοιχώματος, κυρίως σε περιπτώσεις πολύχρωων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, λόγω της στενής προσκόλλησης στο περιβάλλον οστόν και της ευθραυστότητας του επιθηλίου, αποτελούν τις κύριες δυσκολίες της τεχνικής αυτής (Myoung, Hong et al. 2001; Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Επιπλέον, η μειωμένη πρόσβαση, ο κίνδυνος βλάβης παρακείμενων ανατομικών μορίων, η ύπαρξη δοντιών που εμπλέκονται στην κύστη, η πιθανή διάτρηση των συμπαγών πετάλων των γνάθων, καθώς και η ικανότητα του χειρουργού, αποτελούν παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στην ατελή εκκυρήνιση της κύστης (Chirapathomsakul, Sastravaha et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010).

Συνεπώς, εφόσον η εκκυρήνιση επιλεγεί ως θεραπεία, θα πρέπει να γίνεται προσπάθεια αποτελεσματικής αφαίρεσης όλων των επιθηλιακών καταλοίπων ώστε να ελαχιστοποιηθεί η



Εικόνα 13. Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος κάτω γνάθου δεξιά (ορθοπαντομογράφημα). Κλινικές εικόνες: παρατηρείται το κυστικό τοίχωμα και η παρασκευή του αγγειονευρώδους δεματίου του κάτω φατνιακού νεύρου καθώς και το μέγεθος του όγκου μετά την εκκυρήνισή του.

πιθανότητα υποτροπής. Στην περίπτωση ύπαρξης έγκλειστων δοντιών εντός της βλάβης, θα πρέπει να αξιολογείται το πλεονέκτημα από την εξαγωγή τους ώστε να αποφευχθεί η παραμονή υπολειμμάτων προσκολλημένων επί των ριζών τους (Chirapathomsakul, Sastravaha et al. 2006).



Εικόνα 14. Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος άνω γνάθου (ορθοπαντομογράφημα). Κλινικές εικόνες: παρατηρείται το κυστικό τοίχωμα καθώς και το μέγεθος του όγκου μετά την εκπυρήνισή του.

A.1.9.2.1 Εκπυρήνιση και συνοδευτικές θεραπείες

Οι συνοδευτικές θεραπείες περιλαμβάνουν την κυστεοστομία, την ηλεκτροπηξία, την κρυοχειρουργική, την περιφερική οστεοτομία και τη χρήση διαλύματος Carnoy (Blanas, Freund et al. 2000; Stoelinga 2005; Mendes, Carvalho et al. 2010). Οι συνοδές θεραπείες επιλέγονται μετά την εκπυρήνιση με σκοπό τη μείωση της πιθανότητας υποτροπής (Blanas, Freund et al. 2000; Mendes, Carvalho et al. 2010). Το διάλυμα Carnoy περιέχει κατά 95% αιθανόλη, οξικό οξύ και χλωριούχο σίδηρο (Stoelinga 2005). Ο σκοπός της χρήσης του στην οστική κοιλότητα της κύστης – όγκου είναι η καταστροφή των επιθηλιακών καταλοίπων του

κυστικού τοιχώματος, τα οποία μπορεί να παραμείνουν μετά την εκκυρήνιση και να προκαλέσουν υποτροπή της βλάβης (Myoung, Hong et al. 2001).

Η ηλεκτροπηξία έχει προταθεί σε περιπτώσεις όπου το συμπαγές οστόν της γνάθου έχει διατηρηθεί ώστε να μειωθεί η πιθανότητα υποτροπής από παραμονή επιθηλιακών νησίδων στους μαλακούς ιστούς (Mendes, Carvalho et al. 2010).

Η κρυοχειρουργική προκαλεί κυτταρική νέκρωση στα οργανικά στοιχεία ενώ αφήνει ανέπαφο το ανόργανο οστικό υπόστρωμα της περιοχής το οποίο στην μετεγχειρητική περίοδο αποτελεί το κρίωμα παραγωγής οστού (Schmidt and Pogrel 2001; Pogrel 2005). Ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται με τον ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό σχηματισμό κρυστάλλων και με τη διαταραχή της ωσμωτικότητας των κυττάρων. Θερμοκρασίες μικρότερες των -20°C έχουν δείχθει ότι προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Η κρυοχειρουργική ως τεχνική προσφέρει και αιμόσταση λόγω χαμηλής θερμοκρασίας. Ωστόσο, επειδή η ποσότητα του εφαρμοζόμενου υγρού αζώτου δεν μπορεί να ελεγχθεί πλήρως, η επακόλουθη νέκρωση δεν μπορεί να ελεγχθεί σε όλες τις περιπτώσεις (Pogrel 1993).

A.1.10 Επιπλοκές

Οι συνηθέστερες επιπλοκές μετά από την αφαίρεση ευμεγέθους Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου αποτελούν το κάταγμα της γωνίας της κάτω γνάθου, το κάταγμα κονδύλου και η παραισθησία – αναισθησία του κάτω φατνιακού νεύρου (Schmidt and Pogrel 2001; Schmidt and Pogrel 2004; Pogrel 2005).

A.1.11 Χειρουργική εκτομή

Λαμβάνοντας υπόψιν το υψηλό ποσοστό υποτροπών που παρουσιάζουν οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι, κάποιοι ερευνητές αναφέρουν τη ριζική εκτομή και τοποθέτηση πλακών οστεοσύνθεσης σε μεγαλύτερες πολύχωρες βλάβες (Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Αναφέρονται δύο είδη εκτομής: 1) η περιφερική εκτομή η οποία γίνεται με την εκπυρήνιση της βλάβης και την απόξεση του οστού με εγγλυφίδες (σε απόσταση 1cm περιφερικά του ελλείμματος) χωρίς να βλάπτεται η συνέχεια του οστού και 2) η ριζική εκτομή στην οποία μετά την εκπυρήνιση αφαιρείται μέρος της άνω ή κάτω γνάθου και αποκατάσταση του ελλείμματος με πλάκες οστεοσύνθεσης (Blanas, Freund et al. 2000; Zhao, Wei et al. 2002). Παρόλο που η εκτομή δίνει ποσοστό υποτροπής 0%, από πολλούς επιστήμονες θεωρείται αρκετά επιθετική θεραπεία για μια καλοήγη οντότητα όπως ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος (Blanas, Freund et al. 2000; Stoelinga 2005; Giuliani, Grossi et al. 2006; Mendes, Carvalho et al. 2010). Η μετεγχειρητική πορεία των ασθενών είναι δύσκολη και στην περίπτωση μεγάλης εκτομής απαιτούνται μία ή περισσότερες χειρουργικές θεραπείες για την αισθητική και λειτουργική αποκατάστασή τους (Blanas, Freund et al. 2000; Stoelinga 2005). Η εκτομή αποτελεί θεραπευτική επιλογή μόνο σε περιπτώσεις όπου οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι υποτροπιάζουν και είναι μη ελεγχόμενοι, και σε υποψία - ιστολογική επιβεβαίωση κακοήθους εξαλλαγής ή εξαλλαγής σε αδαμαντινοβλάστωμα (Giuliani, Grossi et al. 2006; Gosau, Draenert et al. 2010; Mendes, Carvalho et al. 2010).

A.1.12 Υποτροπή του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου

Το φύλο του ασθενούς δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη συχνότητα υποτροπής. Η ηλικία των περισσότερων ασθενών που παρουσίασαν υποτροπή ήταν η 5^η δεκαετία (Myoung, Hong et al. 2001). Η πλειονότητα των περιπτώσεων υποτροπής παρατηρείται στα πρώτα 5-7

έτη μετά τη θεραπεία, ενώ έχουν αναφερθεί υποτροπές μετά από 9 ή και 25 έτη (Morgan, Burton et al. 2005; Eryilmaz, Ozmen et al. 2009; Mendes, Carvalho et al. 2010; MacDonald-Jankowski 2011). 1) Η ελλιπής αφαίρεση του κυστικού τοιχώματος κατά τη χειρουργική αφαίρεση, 2) η ανάπτυξη νέας κύστης από τις δορυφόρες κύστεις που παρέμειναν στην περιοχή, και 3) η ανάπτυξη νέας ανεξάρτητης κύστης από επιθηλιακά υπολείμματα και κατάλοιπα της οδοντογένεσης στην ίδια ή σε άλλη περιοχή, αποτελούν τις τρεις πιθανές υποθέσεις για το φαινόμενο των υποτροπών (Woolgar, Rippin et al. 1987; Myoung, Hong et al. 2001; Morgan, Burton et al. 2005; Stoelinga 2005; Gonzalez-Alva, Tanaka et al. 2008; Kuroyanagi, Sakuma et al. 2009).

Αρκετές μελέτες έχουν ερευνήσει την έκφραση βιολογικών δεικτών και αναστολέων πολλαπλασιασμού όπως του p53, του Ki-67, του PCNA και του bcl-2, για να διατυπώσουν τη σχέση τους με την υποτροπή (Gonzalez-Alva, Tanaka et al. 2008; Kuroyanagi, Sakuma et al. 2009; Mendes, Carvalho et al. 2010).

Η παρουσία συχνών υποτροπών καθιστά απαραίτητη τη διενέργεια συχνών επανεξετάσεων μετά τη χειρουργική θεραπεία των ασθενών. Η επανεξέταση προτείνεται να είναι κλινική και απεικονιστική, 1 φορά/έτος για τα 5 πρώτα έτη και 1 φορά/2 έτη για το υπόλοιπο της ζωής του ασθενούς (Stoelinga 2001). Επιπλέον, η τακτική επανεξέταση είναι απαραίτητη και λόγω της επιβεβαιωμένης αλλά μικρής πιθανότητας κακοήθους εξαλλαγής της βλάβης σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Stoelinga and Bronkhorst 1988; Scheer, Koch et al. 2004). Ένας προδιαθεσικός παράγοντας για την εξαλλαγή θεωρείται η παρουσία κερατινοποιημένου επιθηλίου στο τοίχωμα της κύστης (Browne and Gough 1972). Ως κύριος προδιαθεσικός παράγοντας για την εξαλλαγή των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αναφέρεται η παρουσία χρόνιας φλεγμονής στο τοίχωμα της κύστης, η οποία μπορεί να πυροδοτήσει την εξαλλαγή αυτή (Scheer, Koch et al. 2004; Falaki, Delavarian et al. 2009).

Συνεπώς, θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια από τον χειρουργό για την πλήρη εξαίρεση της βλάβης και τη λεπτομερή βιοψία σε πολλά σημεία ώστε να τεθεί έγκαιρα η διάγνωση της βλάβης.

A.1.13 Μοριακή Θεραπεία του Κερατινοκυστικού Οδοντογενούς Όγκου

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των ιντερλευκινών IL-1a και IL-6 είναι αυξημένη στο επιθήλιο των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (Meghji, Henderson et al. 1992). Τα μόρια αυτά προάγουν την απορρόφηση του οστού και την παραγωγή προσταγλανδινών και κολλαγενάσης (Dayer, de Rochemonteix et al. 1986; Meghji, Henderson et al. 1992; Lader and Flanagan 1998). In vitro μελέτες επαλήθευσαν ότι η IL-1 προάγει την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα άμεσα ή έμμεσα ενεργοποιώντας την έκκριση παραγόντων όπως ο κερατινοκυστικός αυξητικός παράγοντας KGF (Meghji, Qureshi et al. 1996; Maas-Szabowski, Shimotoyodome et al. 1999).

Οι Williams και συν., ανακάλυψαν ένα αναστολέα του μονοπατιού Hedgehog (CUR61414) ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αναστείλει την αυξημένη σηματοδοτική δράση του μονοπατιού Hedgehog που προκύπτει μετά από μεταλλάξεις στο PTCH-1 (Williams, Guicherit et al. 2003). Αυτό το στοιχείο δείχνει ότι οι αναστολές του Hedgehog θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντική εναλλακτική θεραπεία για τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα καθώς και για τους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους (Williams, Guicherit et al. 2003; Zhang, Sun et al. 2006).

A.2 Περιακρορριζικές Κύστεις

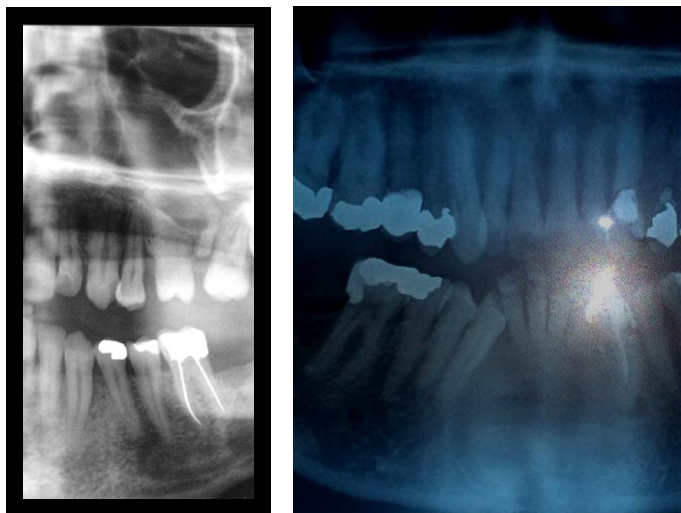
Η Περιακρορριζική Κύστη είναι η πιο συχνή οδοντογενής κύστη προερχόμενη από τα επιθηλιακά οδοντογενή υπολείμματα του περιρριζίου (υπολείμματα Malassez) ως αποτέλεσμα της φλεγμονής που συνεπάγεται η νέκρωση του πολφού (Robinson 2012; Johnson, Gannon et al. 2014). Η Περιακρορριζική Κύστη ορίζεται ως μια κοιλότητα στο φατνιακό οστόν η οποία επενδύεται από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο. Υπάρχουν δύο διακριτές κατηγορίες κύστεων: α) οι αληθείς, των οποίων η κοιλότητα περιβάλλεται εξ'ολοκλήρου από επιθήλιο, και β) οι θυλακικές, στις οποίες η κοιλότητα περιβάλλεται από επιθήλιο αλλά είναι ανοιχτή στο ριζικό σωλήνα (Simon 1980; Ramachandran Nair, Pajarola et al. 1996). Υποστηρίζεται ότι με το πέρασμα του χρόνου οι θυλακικές κύστεις μεταπίπτουν σε αληθείς. Όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία μιας χρόνιας περιακρορριζικής βλάβης, τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα είναι η πιθανότητα αυτή να είναι αληθής κύστη (Simon 1980).

Σύμφωνα με έρευνες που θέτουν αυστηρά ιστοπαθολογικά κριτήρια, το ακριβές ποσοστό εμφάνισης των Περιακρορριζικών Κύστεων κυμαίνεται από 15-17% (Simon 1980; Ramachandran Nair, Pajarola et al. 1996).

Προσβάλλονται άτομα κάθε ηλικίας, όμως συνήθως οι περισσότερες περιπτώσεις παρατηρούνται μετά την 2^η έως και την 5^η δεκαετία της ζωής (Lia, Garcia et al. 2004). Η νεογλή οδοντοφυΐα προσβάλλεται πολύ σπάνια. Επίσης, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές παρατηρείται ελαφρώς μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνιση στους άρρενες (Koivisto, Bowles et al. 2012) ενώ σύμφωνα με άλλους ερευνητές η συχνότητα εμφάνισης είναι περίπου ίδια και στα δύο φύλα (Becconsall-Ryan, Tong et al. 2010). Η θέση συχνότερης εντόπισης αφορά την άνω γνάθο, και πιο ειδικά την πρόσθια ζώνη της (Spatafore, Griffin et al. 1990; Becconsall-Ryan, Tong et al. 2010; Koivisto, Bowles et al. 2012).

Οι Περιακρορριζικές Κύστεις έχουν συνήθως μικρές διαστάσεις και είναι τελείως ασυμπτωματικές, εκτός εάν επιμολυνθούν και διαπηθούν οπότε εμφανίζεται πόνος, ή εάν

αυξηθούν οι διαστάσεις τους οπότε παρουσιάζεται έκπτυξη του οστού (Αγγελόπουλος 2013). Κλυδασμός παρατηρείται όταν διαβρωθεί το συμπαγές πέταλο του οστού. Για να χαρακτηριστεί μια κύστη ως περιακρορριζική είναι απαραίτητο να σχετίζεται με δόντι που έχει νεκρό πολφό (Αγγελόπουλος 2013).



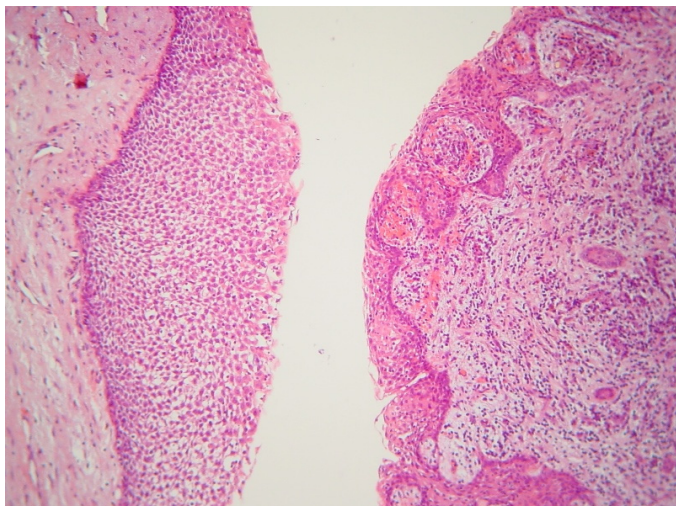
Εικόνα 15. Περιακρορριζικές αλλοιώσεις στους 34, 35, 36 (αριστερά). Αντίστοιχη αλλοίωση στον 33 (δεξιά).

Ακτινογραφικά, οι Περιακρορριζικές Κύστες απεικονίζονται ως καλά περιγεγραμμένες διαυγάσεις με ομαλό στρογγυλό ή ωοειδές σχήμα που εντοπίζονται στο ακρορρίζιο του δοντιού και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη περιφερικής πυκνωτικής γραμμής η οποία αποτελεί επέκταση της lamina dura (Lia, Garcia et al. 2004). Οι Περιακρορριζικές Κύστες, συνήθως αφορίζονται σαφώς από το

υγιές οστόν με λεπτή ακτινοσκοιερή ζώνη. Οι διαστάσεις μπορεί να κυμαίνονται από μερικά χιλιοστά έως αρκετά εκατοστά. Η διάκριση μεταξύ Περιακρορριζικής Κύστης και κοκκιώματος βάσει μόνο ακτινογραφικών κριτηρίων είναι ιδιαίτερα δύσκολη, ιδιαίτερα εάν οι Περιακρορριζικές Κύστες έχουν επιμολυνθεί και τα όρια τους είναι ασαφή χωρίς την πυκνωτική ακτινοσκοιερή γραμμή. Διαυγάσεις με διαστάσεις μεγαλύτερες των 2cm συνήθως αντιπροσωπεύουν Περιακρορριζικές Κύστες (Natkin, Oswald et al. 1984; Lia, Garcia et al. 2004).

Η διάγνωση των Περιακρορριζικών Κύστεων τίθεται βάσει των κλινικών και απεικονιστικών ευρημάτων και της ιστολογικής εξέτασης (Lia, Garcia et al. 2004). Η διαφορική διάγνωση Περιακρορριζικών Κύστεων και κοκκιωμάτων έχει απασχολήσει επί μακρόν τους ερευνητές. Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί και περιλαμβάνουν την ηλεκτροφορητική και

χρωματομετρική μέθοδο (Toller 1970; Morse, Patnik et al. 1973; Morse, Schacterle et al.



Εικόνα 16. Αριστερά: παρατηρείται το επιθήλιο της Περιακρορριζικής Κύστης το οποίο είναι πολύστοιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο. Παρατηρείται υπερπλασία επιθηλιακών στιβάδων με υπερακάνθωση και έντονη σπογγίωση καθώς επίσης απουσία επιθηλιακών καταδύσεων ενώ υποεπιθηλιακά ο συνδετικός ιστός παρουσιάζει ήπια έως μηδενική φλεγμονώδη διήθηση. Δεξιά: παρατηρούμε μετρίου έως υψηλού βαθμού φλεγμονώδη διήθηση αντίστοιχα με την οποία το υπερκείμενο πολύστοιβο πλακώδες μη κερατινοποιημένο επιθήλιο εμφανίζει επιμηκυσμένες αναστομούμενες καταδύσεις (x 100).

1976; Barlocco and Poladian 1979).

Ωστόσο, η κλινική χρησιμότητα και των δύο μεθόδων είναι μειωμένη. Μία ακόμη μέθοδος για την διαφορική διάγνωση των Περιακρορριζικών Κύστεων αφορά την χρήση υπερήχων.

Οι υπέρηχοι μπορούν να παράσχουν πληροφορίες για την φύση του περιεχομένου της οστικής αλλοίωσης

και επομένως να επιτευχθεί η διαφορική διάγνωση της Περιακρορριζικής Κύστης από το περιακρορριζικό κοκκίωμα (Cotti,

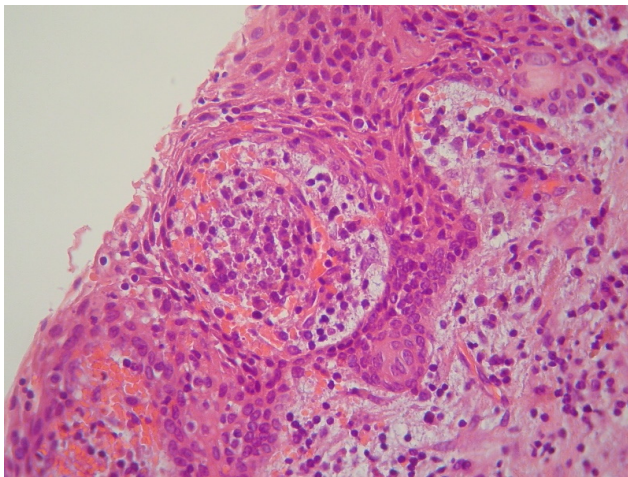
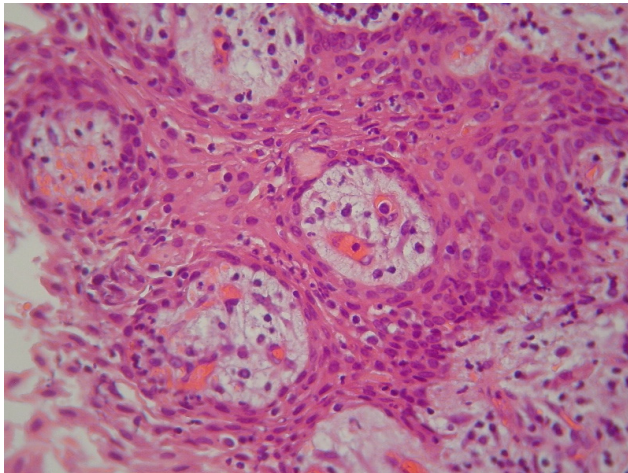
Campisi et al. 2003). Σύμφωνα με τη μελέτη των Gundappa και συν., στην οποία έγινε σύγκριση μεταξύ της

χρήσης των υπερήχων και της ψηφιακής ή συμβατικής ακτινογραφίας βρέθηκε ότι η

ακτινογραφία αποκαλύπτει την ύπαρξη περιακρορριζικής αλλοίωσης (ακόμα και μικρού μεγέθους) αλλά δεν διακρίνει την κύστη από το κοκκίωμα (Gundappa, Ng et al. 2006).

Αντίθετα, οι υπέρηχοι υποεκτιμούν την έκταση της βλάβης λόγω της ασάφειας που εμφανίζουν τα οστικά τοιχώματα των αλλοιώσεων, όμως αποκαλύπτουν τη φύση της βλάβης (Gundappa, Ng et al. 2006).

Οι Περιακρορριζικές Κύστεις χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μη κερατινοποιημένου

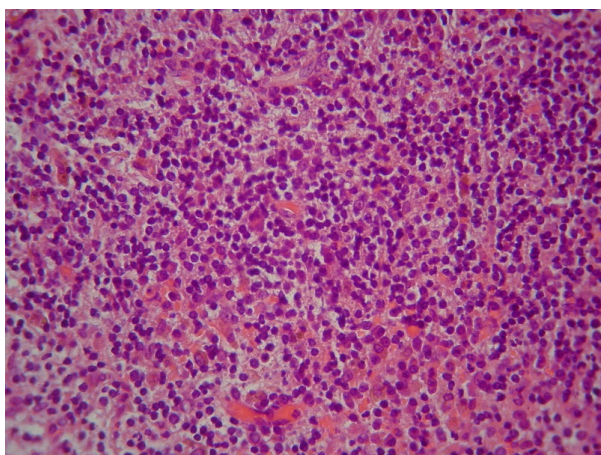
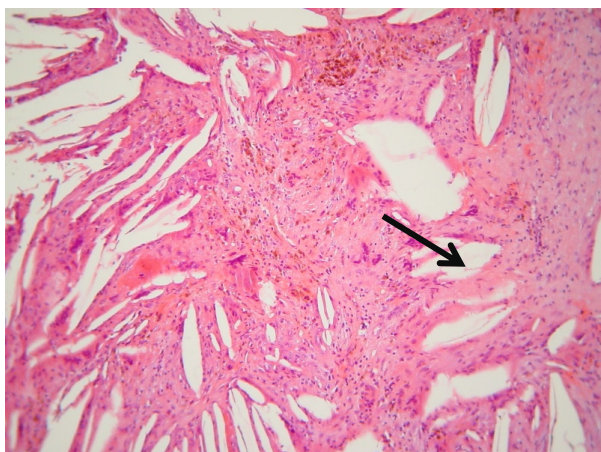


Εικόνα 17. Μεγεθύνσεις (x 400) της εικόνας 16.

πολύστοιβου πλακώδους επενδυτικού επιθηλίου (Lia, Garcia et al. 2004). Το επιθήλιο διαφέρει σε πάχος από θέση σε θέση, και διαθέτει επιμήκεις αναστομούμενες καταδύσεις. Χαρακτηριστικά, το πάχος του επιθηλίου είναι ανάλογο της έκτασης της φλεγμονής. Η ακανθωτή στιβάδα εμφανίζει σπογγίωση και διήθηση από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (Lia, Garcia et al. 2004). Επίσης είναι δυνατόν να παρατηρηθούν βλενώδη ή κυλινδρικά κύτταρα με κροσσούς (αναπνευστικού τύπου επιθήλιο) κυρίως στις επιπολής στιβάδες του επιθηλίου (Αγγελόπουλος 2013). Κύτταρα αναπνευστικού τύπου

επιθηλίου παρατηρούνται κυρίως στην άνω γνάθο (Αγγελόπουλος 2013). Στην περίπτωση όπου η περιακρορριζική κύστη έχει παραμείνει επί μακρόν στη γνάθο, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί κερατινοποίηση του επιθηλίου από μεταπλασία (Αγγελόπουλος 2013). Το κερατινοποιημένο όμως αυτό επιθήλιο διαφέρει από εκείνο των κερατινοκύστεων διότι είναι υπερπλαστικό, σπογγιωτικό και διηθημένο από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, δηλαδή δεν παρουσιάζει την χαρακτηριστική αρχιτεκτονική του επιθηλίου των κερατινοκύστεων (Αγγελόπουλος 2013).

Το επιθήλιο των περιακρορριζικών κύστεων συχνά χαρακτηρίζεται από την παρουσία των σωματίων Rushton (σώματα υαλίνης) τα οποία είναι ηωσινόφιλοι δακτυλιοειδείς ή



Εικόνα 18. Άνω: Παρατηρούνται κοκκιώματα κρυστάλλων χοληστερόλης (ενδεικτικό βέλος)(x 100). Κάτω: Παρατηρείται χρόνια φλεγμονή του συνδετικού ιστού αποτελούμενη κυρίως από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα (x 400).

γραμμικοί σχηματισμοί, συχνά αποτελούμενοι από ομόκεντρους κύκλους (Jacob 2010; Babburi, Rudraraju et al. 2015).

Το τοίχωμα του συνδετικού ιστού στην Περιακρορριζική Κύστη εμφανίζει φλεγμονώδη διήθηση χρόνιου τύπου, λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα (Lia, Garcia et al. 2004; Αγγελόπουλος 2013).

Επιπλέον, συχνά παρατηρούνται αιμορραγικές εστίες, εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης και κρύσταλλοι χοληστερόλης, πιθανόν προερχόμενοι από αποδόμηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι κρύσταλλοι χοληστερόλης αντιμετωπίζονται από τον οργανισμό ως ξένο σώμα και εγείρουν την αντίδρασή του (Santos, Vilas Boas et al. 2011). Επίσης, στο συνδετικό ιστό παρατηρούνται σωματάρια

Russell, επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez καθώς και δυστροφικές ενασβεστιώσεις (Giardino, Savoldi et al. 2004; Santos, Vilas Boas et al. 2011).

Το επιθήλιο της περιακρορριζικής κύστης είναι δυνατόν να υποστεί καρκινική εξαλλαγή, λίγες αλλά καλά τεκμηριωμένες τέτοιες περιπτώσεις έχουν ανακοινωθεί (Birke, Koch et al. 1979; Parmar, Brannon et al. 2011; Kun-Darbois, Pare et al. 2015).

Κατά τη διαδικασία της νέκρωσης του πολφού του δοντιού, ο κενός ριζικός σωλήνας αποτελεί το ιδανικό περιβάλλον για την αποίκιση και τον πολλαπλασιασμό μικροβίων (Takahashi, Lappin et al. 1998). Ο φυσιολογικός πολφός είναι στείρος μικροβίων. Μετά τη νέκρωση του πολφού, ο ριζικός σωλήνας φιλοξενεί νεκρά κι εκφυλισμένα ιστικά στοιχεία τα οποία αποικίζονται από μικρόβια. Η έξοδος, από το ριζικό τρήμα προς το περιρρίζιο, ιστικών στοιχείων, μικροβίων και μεταβολικών προϊόντων τους διαταράσσει την ομοίωση με επακόλουθο την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού ενάντια στα τοξικά αυτά ερεθίσματα (Marton and Kiss 2000; Rocas, Siqueira et al. 2004; Rocas, Siqueira et al. 2004). Η παθογενετικότητα της μικροβιακής χλωρίδας του νεκρού οδοντικού πολφού εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: α) αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροβίων του ριζικού σωλήνα, β) ικανότητα των μικροβίων να αποφεύγουν το αμυντικό σύστημα του ξενιστή, γ) απελευθέρωση λιποπολυσακχαριτών (LPS) και άλλων μορίων (TNF-α και ιντερλευκίνες), δ) σύνδεση ενζύμων που καταστρέφουν τους ιστούς του ξενιστή (Nair 2004).

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι Περιακρορριζικές Κύστει προέρχονται από τα επιθηλιακά υπολείμματα του Malassez, τα οποία ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται από τα προϊόντα της φλεγμονής μετά τη νέκρωση του πολφού. Στη συνέχεια, τα επιθηλιακά υπολείμματα πολλαπλασιάζονται και εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου διϋδρογονάση της γλυκόζης 6-P (Shiromany 2014).

Η κλασσική θεωρία για τη δημιουργία κυστικής κοιλότητας είναι αυτή της κεντρικής νέκρωσης μιας πολλαπλασιαζόμενης νησίδας του Malassez. Η κύστη αυξάνει σε μέγεθος, παθητικά, λόγω διαφοράς ωσμωτικής πίεσης (Suzuki 1975; Nair 1997).

Επικρατεί διχογνωμία στην επιστημονική κοινότητα για το αν οι Περιακρορριζικές Κύστει θεραπεύονται συντηρητικά με την ενδοδοντική θεραπεία ή πρέπει να αφαιρούνται χειρουργικά. Η ύπαρξη διαφορετικών απόψεων έγκειται στο γεγονός ότι η ενδοδοντική θεραπεία παρουσιάζει υψηλά ποσοστά επιτυχίας που αγγίζουν το 90%. Συνεπώς ένα μεγάλο

ποσοστό κύστεων θεραπεύεται με τη συντηρητική ενδοδοντική θεραπεία (Bhaskar 1972; Σίσκος 2006; Saatchi 2007). Η χειρουργική προσέγγιση περιλαμβάνει την εκπυρήνιση της κύστης, σε συνδυασμό με χειρουργική ενδοδοντική θεραπεία (ακρορριζεκτομή) ή εξαγωγή του υπεύθυνου δοντιού και παραμένει θεραπεία επιλογής για τις Περιακρορριζικές Κύστεις, είτε πρόκειται για ευμεγέθεις κύστεις είτε στις περιπτώσεις αποτυχίας της συντηρητικής ενδοδοντικής θεραπείας (Σίσκος 1995; Wang, Knight et al. 2004; Kim and Kratchman 2006). Με τη χειρουργική ενδοδοντική θεραπεία επιτυγχάνεται ταχύτερη επούλωση εφόσον ο μηχανικός καθαρισμός της περιακρορριζικής περιοχής είναι πολύ πιο αποτελεσματικός από αυτόν που επιτελούν τα φαγοκύτταρα, ο οποίος επιτυγχάνεται κατά τη συντηρητική ενδοδοντική θεραπεία (Wang, Knight et al. 2004; Lin, Huang et al. 2007). Η αναγκαιότητα κλινικού και απεικονιστικού επανελέγχου ανά τακτά χρονικά διαστήματα είναι μείζονος σημασίας είτε επιλεγεί η συντηρητική είτε η χειρουργική θεραπεία (Natkin, Oswald et al. 1984; Danin, Linder et al. 1999; Caliskan 2004).

A.3 Τραυματικά Ινώματα

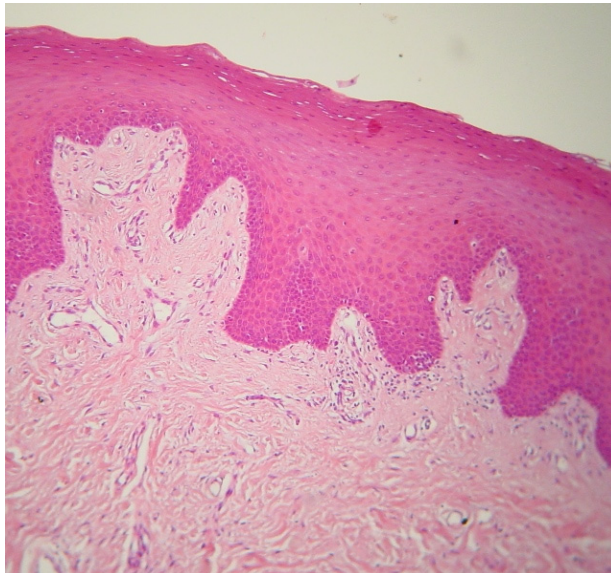
Το ίνωμα, υπό τη μορφή του τυπικού καλοήθους όγκου του ινώδους συνδετικού ιστού, είναι ασύνηθες στην περιοχή κεφαλής-τραχήλου. Οι βλάβες αυτές εμφανίζονται ως ασυμπτωματικά ογκίδια τα οποία συνήθως καλύπτονται από φυσιολογικό βλεννογόνο. Η λέξη ίνωμα, στο βλεννογόνο του στόματος, περιγράφει ένα συμβατικό όρο με τον οποίο προσδιορίζονται αντιδραστικής φύσης εστιακές υπερπλασίες του ινώδους συνδετικού ιστού (Αγγελόπουλος 2013). Η ιστολογική τους εικόνα παρουσιάζει ώριμο ινώδη συνδετικό ιστό διάσπαρτο από καλά διαφοροποιημένα κύτταρα (Αγγελόπουλος 2013).

Το Τραυματικό Ίνωμα είναι μια συνήθης καλοήθης βλάβη της στοματικής κοιλότητας το οποίο δημιουργείται δευτερογενώς μετά από χρόνιο τραυματισμό του βλεννογόνου (Esmeili, Lozada-Nur et al. 2005).

Τα Τραυματικά Ινώματα κατατάσσονται ανάμεσα στις πιο συνήθεις καλοήθεις αντιδραστικές



Εικόνα 19. Τραυματικό Ίνωμα στο βλεννογόνο της παρειάς.



Εικόνα 20. Ιστοπαθολογική εικόνα Τραυματικού Ινώματος. Παρατηρείται το πολύστοιβο πλακώδες παρακερατινοποιημένο επιθήλιο το οποίο εμφανίζει υπερακάνθωση και αναστομούμενες επιθηλιακές καταδύσεις. Στο χόριο παρατηρείται αγγειοβριθής ινώδης συνδετικός ιστός με ήπια χρόνια φλεγμονώδη διήθηση σε υποεπιθηλιακή εντόπιση. Επιπλέον παρατηρούνται πλασματοκύτταρα και λεμφοκύτταρα (x 100).

βλάβες του στόματος. Σύμφωνα με μελέτες, σε δείγμα ασθενών ηλικίας 15-82 ετών, το Τραυματικό Ίνωμα παρουσιάζει συχνή εμφάνιση (Esmeili, Lozada-Nur et al. 2005; Kadeh, Saravani et al. 2015). Σύμφωνα με τη μελέτη των Bouquot και συν. η οποία πραγματοποιήθηκε σε δείγμα 23.616 λευκών Αμερικανών ηλικίας άνω των 35 ετών, τα Τραυματικά Ινώματα είναι οι δεύτερες σε συχνότητα καλοήθεις βλάβες του στόματος (Bouquot and Gundlach 1986). Παρατηρείται ίση κατανομή και στα δύο φύλα.

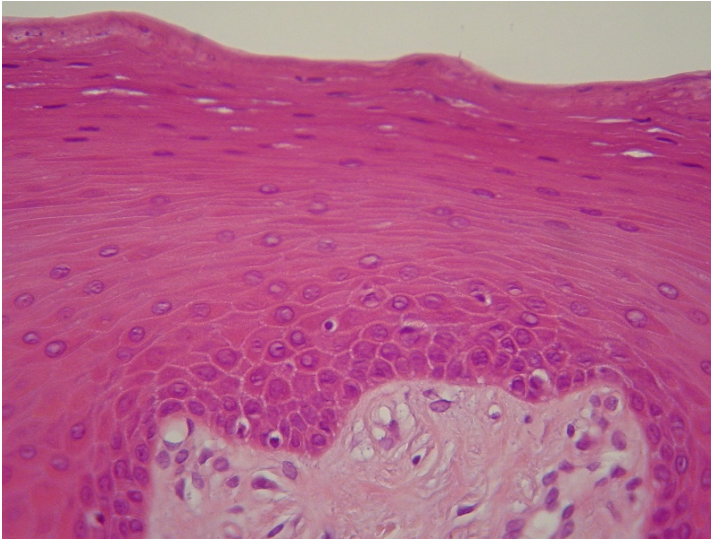
Ο όγκος αυτός είναι ανώδυνος, έχει λεία επιφάνεια, συνήθως εκφύεται από ευρεία βάση, και καλύπτεται από φυσιολογικό βλεννογόνο (Αγγελόπουλος 2013). Οι συνηθέστερες θέσεις εντόπισης του Τραυματικού Ινώματος είναι η γλώσσα, το κάτω χείλος και ο βλεννογόνος της παρειάς (Kovac-Kovacic and Skaleric 2000). Κλινικά, τα Τραυματικά Ινώματα παρουσιάζονται με απόχρωση πιο

ανοιχτή από τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό, με την επιφάνειά τους να παρουσιάζεται είτε λευκή, λόγω υπερκεράτωσης, είτε εξελκωμένη, λόγω δευτερογενούς τραύματος. Το μέγεθος του Τραυματικού Ίνωματος δεν ξεπερνάει τα 1 - 2 cm σε διάμετρο (McGinnis 1987; Sousa, Etges et al. 2002; Regezi 2003; Αγγελόπουλος 2013).

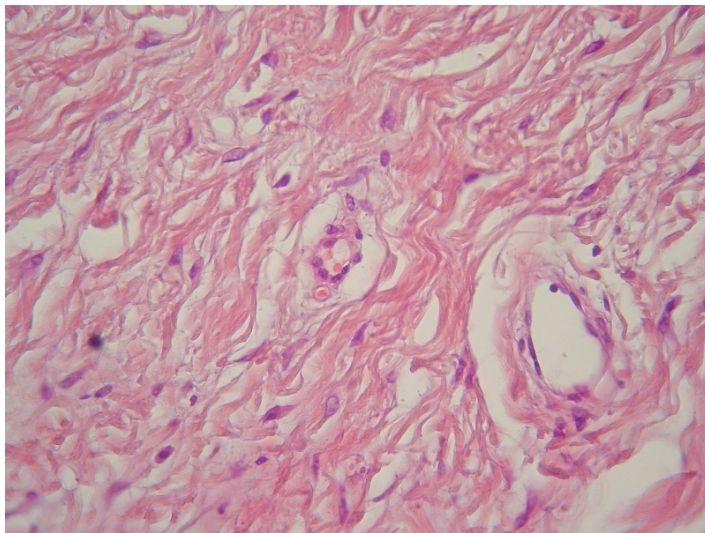
Η ιστοπαθολογική του εικόνα χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ώριμου, πυκνού ινώδους συνδετικού ιστού με πολυάριθμους ώριμους ινοβλάστες διάσπαρτους συμμετρικά σε όλη την έκταση της βλάβης (Regezi 2003). Ο ινώδης συνδετικός ιστός του όγκου συνήθως δεν διαφέρει από τον φυσιολογικό ιστό από τον οποίο προέρχεται (Αγγελόπουλος 2013). Σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να παρατηρηθούν περιοχές μυξωματώδους ή λιπώδους εκφύλισης ή και εστίες ενασβεστίωσης λόγω μηχανολειτουργικών επιβαρύνσεων. Άλλοτε παρατηρούνται εστιακές ή διάχυτες διηθήσεις από κύτταρα χρόνιας φλεγμονής (Regezi 2003). Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί υπερκερατωτικό καλυπτικό επιθήλιο λόγω του χρόνιου τραύματος (Regezi 2003). Επιφανειακά, το Τραυματικό Ίνωμα καλύπτεται από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο. Το επιθήλιο αυτό συνήθως παρουσιάζει φυσιολογική εικόνα, όμως μπορεί να παρουσιάσει πάχυνση ή και εξέλκωση ανάλογα με τις τραυματικές επιδράσεις που υφίσταται (Αγγελόπουλος 2013).

Το Τραυματικό Ίνωμα είναι αποτέλεσμα μιας χρόνιας διαδικασίας «επιδιόρθωσης» που περιλαμβάνει κοκκιωματώδη ιστό και δημιουργία ουλώδους ιστού οδηγώντας στο σχηματισμό ενός υποβλεννογόνιου ινώδους όγκου (Esmeili, Lozada-Nur et al. 2005). Τα συνηθέστερα αίτια για την ανάπτυξη Τραυματικών Ίνωμάτων είναι: α) χρόνια καθ'έξιν δήξη των χειλέων, της παρειάς, ή της γλώσσας, β) ακατάλληλες προσθετικές εργασίες, και γ) τερηδονισμένα και κατεστραμμένα δόντια με οξύαιγμα άκρα. Οι υποτροπές είναι σπάνιες και συνήθως οφείλονται σε επαναλαμβανόμενο τραύμα στην ίδια περιοχή.

Σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά κριτήρια που προαναφέρθηκαν, η διαφορική διάγνωση του



Εικόνα 21. Μεγέθυνση (x 400) τμήματος της εικόνας 20. Παρατηρούνται οι επιθηλιακές στιβάδες.



Εικόνα 22. Μεγέθυνση (x 400) τμήματος Τραυματικού Ινώματος. Παρατηρούνται διαπλεκόμενες ίνες κολλαγόνου και τριχοειδή αγγεία.

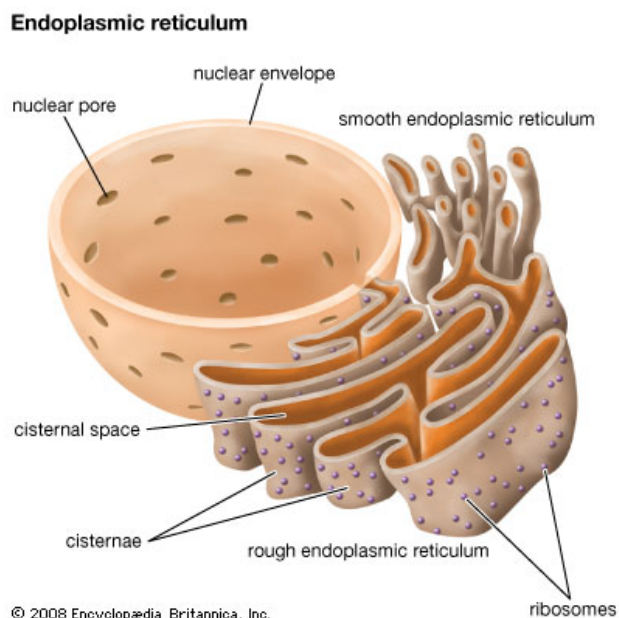
όγκου θα πρέπει να γίνει από το οστεοποιοό περιφερικό ίνωμα, τον ινοεπιθηλιακό όγκο, το περιφερικό οδοντογενές ίνωμα, το ωριμάζον αιμαγγειωματοειδές κοκκίωμα, την πτυχωτή ινώδη υπερπλασία, το νευροίνωμα, το νευριλήμωμα, όγκους σιελογόνων αδένων και λίπωμα (Esmeili, Lozada-Nur et al. 2005; Αγγελόπουλος 2013).

Η θεραπεία του Τραυματικού Ινώματος συνίσταται στη χειρουργική του αφαίρεση και η πρόγνωση είναι άριστη. Παράλληλα, επιβάλλεται μαζί με τη χειρουργική αφαίρεση να επιτελείται και άρση του αιτιολογικού παράγοντα διότι ο όγκος είναι πιθανό να υποτροπιάσει (McGinnis 1987; Esmeili, Lozada-Nur et al. 2005).

A.4 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου

A.4.1 Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) - Γενικά

Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) είναι ένα οργάνο που απαντάται σε όλα τα κύτταρα και αποτελείται από ένα συμπιεσμένο και πολύπλοκο δίκτυο πρωτεϊνών. Είναι το πλέον

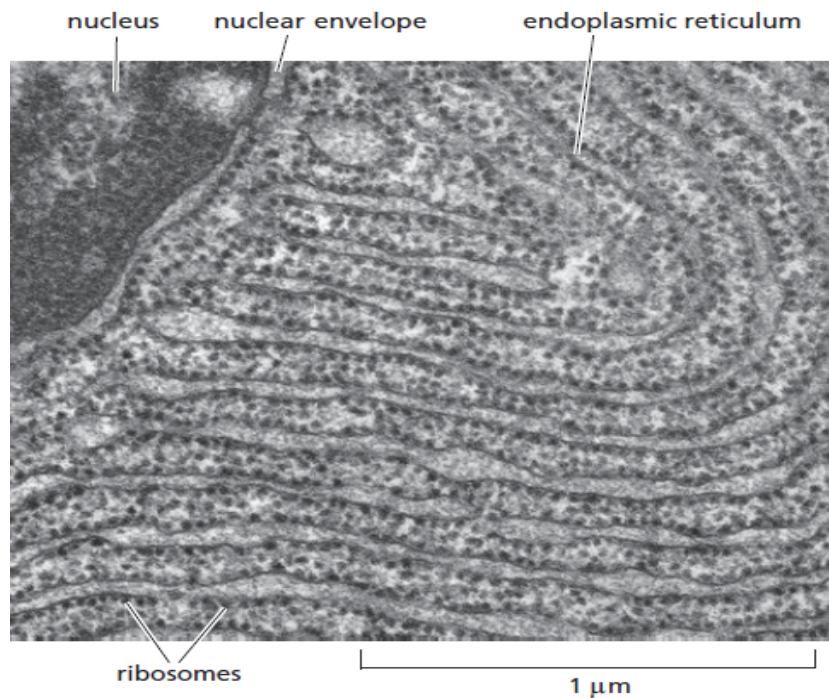


Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του Αδρού και Λείου ενδοπλασματικού δικτύου (Britannica Encyclopaedia, 2008).

εκτεταμένο οργάνο καθώς η επιφάνεια που καλύπτει η μεμβράνη του αποτελεί συνήθως πάνω από το μισό της συνολικής επιφάνειας του κυττάρου. Αποτελεί μέρος του συστήματος μεταφοράς πρωτεϊνικών προϊόντων μέσω κυστιδίων. Το ΕΔ είναι σημείο εισόδου νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών οι οποίες υφίστανται τροποποιήσεις στο εσωτερικό των δεξαμενών του ΕΔ, στη συνέχεια εγκλείονται σε λιπιδικά κυστίδια και τέλος μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi ή σε λυσοσώματα. Η κύρια

λειτουργία του ΕΔ αφορά στο επίπεδο των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα διαθέτει εκτενές δίκτυο κυττάρων με εκκριτικό ρόλο όπως πλασματοκύτταρα και αδενικά κύτταρα (Alberts 2014).

Η βασικότερη λειτουργία του είναι η βιοσύνθεση πρωτεϊνών και διακρίνεται βάσει της μορφολογίας του σε Αδρό (ΑΕΔ, Rough Endoplasmic Reticulum) και Λείο (ΛΕΔ, Smooth Endoplasmic Reticulum). Το Αδρό, ή κοκκιώδες ΕΔ, συνίσταται από ριβοσώματα τα οποία είναι προσδεμένα στη μεμβράνη του. Τα ριβοσώματα συνθέτουν συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες των κυτταρικών οργανιδίων, καθώς και πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση. Το ΑΕΔ και το κυτοσόλιο αποτελούν τις δύο βασικές θέσεις που



Εικόνα 24. Εικόνα ΑΕΔ από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Διακρίνεται η άμεση εγγύτητα των δεξαμενών του ΑΕΔ με τον πυρηνικό φάκελο καθώς και η πληθώρα ριβοσωμάτων στην επιφάνεια (Alberts et al., 2014).

εντοπίζονται ριβοσώματα. Στο ΛΕΔ τα ριβοσώματα απουσιάζουν και συντελείται η σύνθεση και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων και των φωσφολιπιδίων. Επιπλέον, στο ΛΕΔ παράγονται ένζυμα για την αποτοξίνωση λιποδιαλυτών δραστικών ουσιών (κυρίως στα ηπατοκύτταρα) ενώ σχετίζεται και με το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Το ΛΕΔ αποτελεί επίσης τη μεγαλύτερη κυτταρική αποθήκη Ca^{2+} (Park, Lomax et al. 2001; Chen, Morgan et al. 2010; Chen, Karnovsky et al. 2010; Kierszenbaum 2012). Σύμφωνα με μελέτες μορφολογίας σε επίπεδο ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, το ΑΕΔ αποτελείται από ένα συνεχόμενο πλέγμα

επικοινωνούντων σάκων στην επιφάνεια των οποίων υπάρχουν ριβοσώματα, σε αντίθεση με το ΛΕΔ το οποίο οργανώνεται σε ένα δίκτυο με μορφή λαβυρίνθου το οποίο αποτελείται από διακλαδιζόμενους σωλήνες. Οι σάκοι του ΛΕΔ επικοινωνούν με τους σωληνίσκους του ΛΕΔ, παρόλο που διαφέρουν σε οργάνωση και μορφολογία στο χώρο, δημιουργώντας έναν ενιαίο χώρο, τον αυλό του ΕΔ (Μαργαρίτης 2004).

A.4.2 Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ

Τόσο οι πρωτεΐνες που συντίθεται πάνω στη μεμβράνη του ΕΔ, όσο και άλλες που παράγονται στο κυτοσόλιο, εισέρχονται στο ΕΔ με σκοπό την ωρίμανση, την ταξινόμηση και τη μεταφορά τους. Οι λειτουργίες αυτές ονομάζονται συν-μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στις τροποποιήσεις αυτές ανήκουν: 1) η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης, 2) ο ολιγομερισμός πολυπεπτιδικών αλυσίδων με σκοπό τη δημιουργία πολυπεπτιδικών υποομάδων σε πολυμερείς πρωτεΐνες, 3) η N-γλυκοζυλίωση σε κατάλοιπα ασπαραγίνης, 4) η προσθήκη της ομάδας γλυκοφωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI), 5) η αποκοπή τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Ellgaard and Helenius 2003; Khoury, Baliban et al. 2011). Οι προαναφερθείσες τροποποιήσεις είναι μείζονος σημασίας για τη σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών (Ellgaard and Helenius 2003; Μαργαρίτης 2004; Alberts 2014).

Η ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών αποτελεί μία από τις βασικότερες λειτουργίες του ΕΔ. Το ΕΔ αποτελεί το ιδανικό περιβάλλον για τη μετατροπή νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε τρισδιάστατες λειτουργικές πρωτεϊνικές δομές. Αυτό οφείλεται στο κατάλληλο οξειδωτικό δυναμικό του ΕΔ αλλά και στην πληθώρα μοριακών συνοδών – πρωτεϊνών (chaperones) και ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της αναδίπλωσης. Οι εν λόγω αλλαγές ονομάζονται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (posttranslational modifications) και

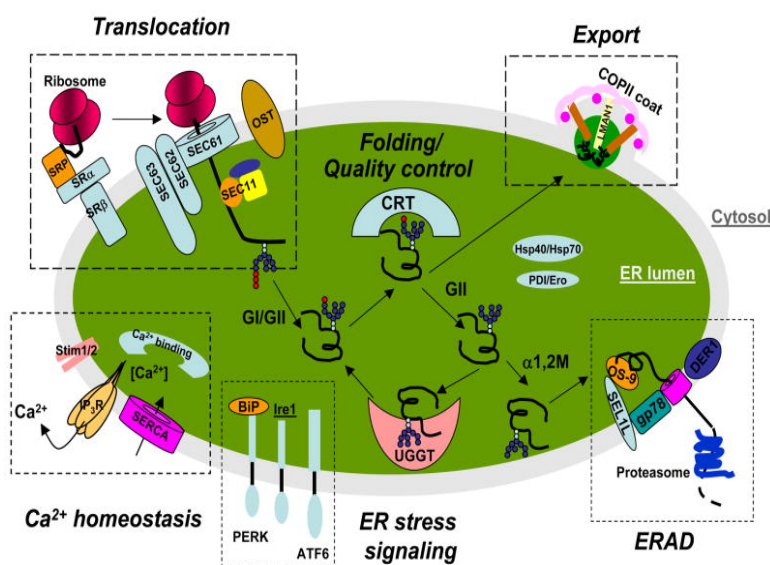
αποτελούν απαραίτητο στάδιο στον κύκλο ζωής μιας πρωτεΐνης καθώς με αυτόν τον τρόπο θα καταστεί βιολογικά δραστικό μόριο (Alberts 2014).

Οι παραπάνω διεργασίες είναι μέρος του συνόλου των τροποποιήσεων που μπορεί να υποστεί ένα πρωτεϊνικό μόριο. Σε εργαστηριακό επίπεδο, οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών μπορούν να ανιχνευθούν με τεχνικές όπως φασματομετρία μάζας, eastern και western blotting (Nicholas and Nelson 2013). Η τελική διαμόρφωση, ωστόσο, της πρωτεΐνης στο χώρο (protein folding) θα είναι αυτή που θα παρέχει στο τελικό προϊόν τη βιολογική του δραστηριότητα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται τόσο σε επίπεδο κυττάρου (in vivo) όσο και σε επίπεδο δοκιμαστικού σωλήνα (ex vivo) (Alberts 2014). Στα θηλαστικά, η διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών ολοκληρώνεται σε τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, οι διαδικασίες της αναδίπλωσης πραγματοποιούνται συν-μεταφραστικά. Στη δεύτερη φάση, η αναδίπλωση συνεχίζει μετα-μεταφραστικά, δηλαδή μετά την απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το ριβόσωμα και το μετατοπιστή. Κατά την τελευταία, πραγματοποιείται η σύνδεση των ολιγομερών, όταν πια η πρωτεΐνη είναι κοντά στην τελική της μορφή. Οι συνοδές πρωτεΐνες και τα ένζυμα αναδίπλωσης μετέχουν και στις 3 φάσεις. (Chen, Karnovsky et al. 2010).

A.4.3 Οι πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί

Όπως προαναφέρθηκε, η διαδικασία αναδίπλωσης της πρωτεΐνης είναι μία εξαιρετικής σημασίας διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό των μεμβρανών του ΕΔ. Ωστόσο, οι συνθήκες που επικρατούν στο ΕΔ (όπως θερμοκρασία και υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών) δεν συντελούν στη δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος ώστε οι νεοεισαγόμενες πρωτεΐνες να αναδιπλωθούν με ορθό τρόπο. Η παραπάνω διαδικασία καταλύεται και υποβοηθάται από τις πρωτεΐνες – μοριακούς συνοδούς (molecular chaperones) και τα ένζυμα αναδίπλωσης (folding enzymes). Αυτά τα μόρια αποτελούν μέρος της πολύπλοκης διαδικασίας που

ονομάζεται ποιοτικός έλεγχος του ΕΔ (ER quality control)(Walter and Buchner 2002; Ma and Hendershot 2004). Ο αγγλικός όρος «chaperone» (συνοδός) στη βιολογία χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις πρωτεΐνες εκείνες που διαθέτουν την ικανότητα πρόσδεσης με τις νεοσυντιθέμενες και νεοεισαγόμενες πρωτεΐνες στο ΕΔ, προκειμένου να βοηθήσουν στη σωστή διαδικασία αναδίπλωσης παρεμποδίζοντας τη συσσώρευσή τους, γεγονός που διαταράσσει την ομοιόσταση του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί ανιχνεύονται



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών λειτουργιών του αδρού ΕΔ (Chen et al., 2010).

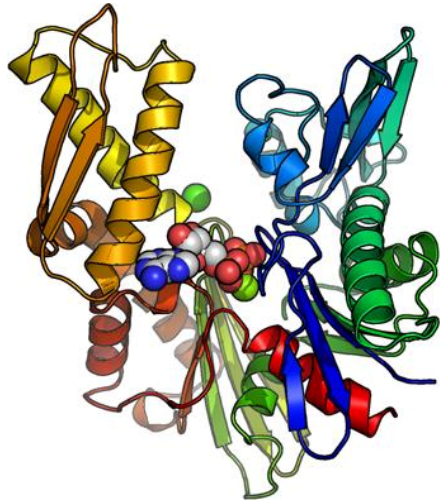
καθ'όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του κυττάρου (Martin and Hartl 1993). Οι πρωτεΐνες αποτρέπουν την πραγματοποίηση μη ευνοϊκών αντιδράσεων μεταξύ των υδρόφοβων ομάδων, οι οποίες θα οδηγούσαν στο σχηματισμό «ελαττωματικών» πρωτεϊνών.

Επιπλέον, ελέγχουν και εμποδίζουν την πρόωμη έξοδο από το ΕΔ, πρωτεϊνών στις

οποίες δεν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία αναδίπλωσης. Ένας επιπρόσθετος ρόλος των chaperones είναι να δεσμεύουν τις πρωτεΐνες με ελαττωματική αναδίπλωση, στο εσωτερικό του ΕΔ, και να τις αποτρέψουν να συνεχίσουν το εκκριτικό μονοπάτι προς άλλα οργανίδια. Οι πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί μπορούν να διαχωριστούν αρχικά με βάση το μοριακό βάρος. Συνεπώς, προκύπτουν οι οικογένειες πρωτεϊνών τα μέλη των οποίων παρουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό ομολογία ως προς την ακολουθία των πολυπεπτιδίων, ενώ παράλληλα εμφανίζουν παρόμοια δομή και λειτουργία (Walter and Buchner 2002). Ωστόσο, η πιο συνηθισμένη κατηγοριοποίηση περιλαμβάνει τρεις ομάδες: 1) μοριακές συνοδοί της

οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins) που περιλαμβάνουν τις GRP78, GRP94 και τις βοηθητικές συνοδούς (co-chaperones), 2) μοριακές συνοδούς λεκτίνες (chaperones lectins) όπως η καλνεξίνη, η καλρετικουλίνη και η EDEM, 3) μοριακές συνοδούς εξειδικευμένες με βάση το υπόστρωμα (substrate - specific chaperones) όπως η HSP47 (Ellgaard and Helenius 2003). Επιπλέον, αναφέρονται και πρωτεΐνες που λειτουργούν ως καταλύτες στη διαδικασία αναδίπλωσης και αυτές είναι οι θειολούχες οξειδοαναγωγάσες των δισουλφιδικών ισομερασών (thiol oxidoreductases of the protein disulfide isomerase, PDI family) και οι πεπτιδυλο-προλυλ-ισομεράσες (peptidyl-prolyl-isomerases, PPIs family) (Ni and Lee 2007; Wiersma, Michalak et al. 2015). Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών είναι η ικανότητά τους να εντοπίζουν και να συνδέονται με τα μη ορθά αναδιπλωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια. Η ικανότητα αυτή είναι αποτέλεσμα της γενικότερης ικανότητάς τους να αναγνωρίζουν υδρόφοβες ομάδες οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες θα έπρεπε να βρίσκονται στο εσωτερικό ενός σταθερού πρωτεϊνικού μορίου. Οι ομάδες αυτές εμφανίζονται είτε στα πρώιμα στάδια της αναδίπλωσης είτε μετά από μια λανθασμένη αναδίπλωση. Οι υδρόφοβες ομάδες είναι σχετικά ευδιάλυτες κι έτσι δημιουργούν συσσωματώματα συνδεόμενες μεταξύ τους, τα οποία θεωρούνται ως μια μη ευνοϊκή κατάσταση για την κυτταρική ομοιόσταση. Οι chaperones διαθέτουν συγκεκριμένα σημεία σύνδεσης με την πρωτεΐνη υπόστρωμα. Η αποσύνδεση του υποστρώματος από την chaperone είναι μια ενεργειακά καταλυόμενη αντίδραση καθώς δαπανάται μόριο ATP. Επίσης, ως μέρος του ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ οι chaperones δεσμεύουν τις μη ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες ώστε να αποτρέψουν την έξοδό τους από το ΕΔ, τη μεταφορά τους στη συσκευή Golgi και την ενσωμάτωσή τους στο βιολογικό μονοπάτι στο οποίο ανήκουν (Walter and Buchner 2002; Ellgaard and Helenius 2003).

Μια ακόμη λειτουργία των chaperones αποτελεί και η δυνατότητα τροποποίησης μιας ήδη σχηματισμένης πρωτεΐνης. Έτσι, ένα ατελώς διαμορφωμένο μόριο μετατρέπεται με τη βοήθεια μιας chaperone σε ένα μη αναδιπλούμενο ενδιάμεσο προϊόν το οποίο με την απελευθέρωσή του από τη chaperone μπορεί να αναδιπλωθεί πλέον αυθόρμητα και με τη σωστή μορφολογία (Ma and Hendershot 2004; Mattoo and Goloubinoff 2014). Τέλος, με τη συγκεκριμένη διαδικασία δίνεται η δυνατότητα αποδόμησης πρωτεϊνών από πρωτεάσες



Εικόνα 26. 78kDa heat shock protein 5 (BiP/GRP78) ATPase domain σε σύμπλοκο με ένα μόριο ADP (από SGC online structure gallery).

(Mattoo and Goloubinoff 2014).

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η δράση των chaperones πέρα από το ΕΔ, ως επιγενετικοί παράγοντες σημαντικοί στην εξέλιξη των ειδών (Quinlan and Ellis 2013).

A.4.3.1 Η λειτουργία της πρωτεΐνης BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin heavy chain Protein/Glucose-Related Protein 78)

Στο ΕΔ υπάρχουν δύο συστήματα πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών τα οποία έχουν μελετηθεί αρκετά, το σύστημα BiP/GRP78 και το σύστημα καλνεξίνης – καλρετικουλίνης (Ma and Hendershot 2004). Η BiP/GRP78 αποτελεί την πλέον μελετημένη πρωτεΐνη – μοριακή συνοδό που εντοπίζεται στο εσωτερικό του ΕΔ. Η BiP/GRP78 κατέχει καίριο ρόλο στην κινητοποίηση των μηχανισμών όταν παρατηρείται στρες του ΕΔ (Blond-Elguindi, Fourie et al. 1993). Το σύστημα αυτό πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών ενεργοποιείται από την παρουσία μη αναδιπλωμένων περιοχών ή πρωτεϊνών που περιέχουν υδρόφοβες ομάδες τις οποίες και αναγνωρίζει η BiP/GRP78. Πρόκειται για πρωτεΐνη 78kDa, το όνομα της οποίας (GRP78) προήλθε μετά από παρατήρηση ότι η έλλειψη γλυκόζης από το θρεπτικό υπόστρωμα κυτταροκαλλιιεργειών οδήγησε στην αύξηση της έκφρασής της.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως η εν λόγω πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα σύνδεσης με τις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών των προδρόμων β-κυττάρων (Lee 2005). Σε ερευνητικό επίπεδο, η GRP78 εντοπίστηκε και σε στρωματικούς ινοβλάστες καθώς και σε ορισμένα πλασματοκύτταρα με πλήρη ικανότητα σύνθεσης αντισωμάτων (Chung, Shen et al. 2002). Είναι ευρέως αποδεκτό πως πρόκειται για μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο εσωτερικό του ΕΔ και η έκφρασή της αυξάνει δραματικά σε περιπτώσεις που διαταράσσεται η ομαλή λειτουργία του ΕΔ (Lee 2005). Η πρωτεΐνη BiP ανήκει σε ένα μεγάλο πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, την υπεροικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) και διατηρεί 60% ομολογία με την πρωτεΐνη Hsp70. Διαθέτει περιοχή υδρόλυσης μορίων ATP στο N-τελικό της άκρο ενώ το C-τελικό της άκρο λειτουργεί ως περιοχή σύνδεσης με υπόστρωμα (Substrate Binding Domain, SBD) για σύνδεση με την ορθώς αναδιπλούμενη πρωτεΐνη – στόχο (Fritz, Dong et al. 2014). Η σύνδεση με πρωτεΐνη – στόχο στην SBD περιοχή της BiP εξαρτάται από την δράση ATPάσης του N-τελικού της άκρου. Η παρουσία ATP οδηγεί σε μια κατάσταση χαμηλής συγγένειας με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, σε αντίθεση με την κατάσταση της υδρόλυσης του ATP σε ADP όπου η παραπάνω κατάσταση αντιστρέφει. Συνεπώς, κατά την μετατροπή του ATP σε ADP η στερεοδιαμόρφωση της BiP στο χώρο αλλάζει με αποτέλεσμα πιο ισχυρή σύνδεση με το υπόστρωμα. Η εν λόγω διαδικασία αντιστρέφεται με την ανταλλαγή του ADP με ATP που οδηγεί στην απελευθέρωση του υποστρώματος. Ο κύκλος αυτός πρόσδεσης με πρωτεΐνες – υποστρώματα οδηγεί στην ενεργειακά καταλυόμενη αντίδραση αναδίπλωσης των πρωτεϊνών δίδοντας τελικά στη BiP τη λειτουργία της ως chaperone (Gething 1999). Επιπροσθέτως η BiP επιτελεί και επιπλέον λειτουργίες για την κυτταρική ομοιοστάση. Τα υψηλά επίπεδα Ca^{2+} που παρατηρούνται στο ΕΔ συμβάλλουν στη σωστή λειτουργία του οργανιδίου, ωστόσο διαταραχές στις αποθήκες Ca^{2+} μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο (Gaut and Hendershot 1993). Τόσο η BiP όσο και άλλα μέλη της οικογένειας των GRP πρωτεϊνών (όπως η GRP94, CaBPI, PDI, ERp72, καλρετικουλίνη κλπ.) παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη

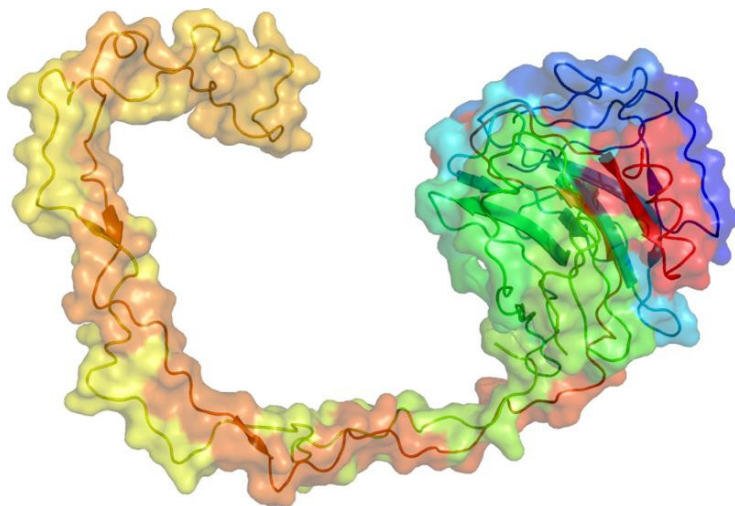
συγκέντρωση Ca^{2+} , η οποία μπορεί να αλλάξει και να επηρεάσει το βαθμό σύνδεσης της BiP με το υπόστρωμα (Gaut and Hendershot 1993). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η BiP/GRP78 σε φάση ηρεμίας λειτουργεί και ως πρωτεΐνη δέσμευσης και μεταφοράς Ca^{2+} συμμετέχοντας στο μηχανισμό αποθήκευσης του στο εσωτερικό του ΕΔ. Η δράση της καλύπτει περίπου το 25% της συνολικής αποθήκευσης (Lievremont, Rizzuto et al. 1997). Εάν η διαδικασία της ορθής αναδίπλωσης αποτύχει, οι μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες οδηγούνται εκτός του ΕΔ (στο πρωτεάσωμα) όπου αποδομούνται μέσω του μηχανισμού της ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Η αποτελεσματική απομάκρυνση των μη ορθά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών εμποδίζει την τοξική συσσώρευσή τους και την ταυτόχρονη επίμονη δέσμευση των μοριακών συνοδών που θα μπορούσε να αυξήσει περισσότερο το στρες του ΕΔ (Hampton 2002; Merulla, Fasana et al. 2013). Οι προαναφερθείσες λειτουργίες των μοριακών συνοδών αποτέλεσαν αντικείμενο ενδιαφέροντος των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες. Η εξέλιξη της επιστήμης, με τη βοήθεια των σύγχρονων τεχνικών του γονιδιακού αποκλεισμού (gene knock out), οδήγησε σε νέες ανακαλύψεις. Ειδικότερα, έγινε γνωστό από knock out πειράματα ότι η ορθή λειτουργία των μοριακών συνοδών είναι απαραίτητη στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των θηλαστικών (Ni and Lee 2007). Ο γονιδιακός αποκλεισμός της BiP/GRP78 οδήγησε σε θνησιμότητα την 3,5 εμβρυική ημέρα. Τα έμβρυα δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν πέρα από το στάδιο σχηματισμού της διαυγούς ζώνης καθώς δημιουργήθηκε πρόβλημα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε η απόπτωση των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας η οποία αποτελεί πρόδρομο των εμβρυικών βλαστοκυττάρων. Σε αποκλεισμό της GRP94 τα έμβρυα έζησαν ως την 7^η εμβρυική ημέρα, καθώς ήταν αδύνατο να συνεχιστεί η διαδικασία της γαστριδίωσης, λόγω μη ομαλής ανάπτυξης του μεσοδέρματος (Wanderling, Simen et al. 2007). Σε ανάλογα αποτελέσματα οδηγεί και ο αποκλεισμός της καλρετικουλίνης που δεν είναι συμβατός με τη ζωή καθώς τα έμβρυα παρουσιάζουν έντονα προβλήματα από το καρδιαγγειακό σύστημα (Mesaeli, Nakamura et al. 1999). Παρόμοιες

μελέτες έχουν γίνει και σε άλλες πρωτεΐνες – μοριακούς συνοδούς υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητά τους για την επιβίωση και ανάπτυξη του οργανισμού.

Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, το στρες του ΕΔ έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση και οι έρευνες έχουν στραφεί στη μελέτη της BiP και άλλων μορίων της λειτουργίας του ΕΔ σε καρκινικούς ιστούς (Li and Lee 2006). Η ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και η συνεπακόλουθη υποξία αποτελούν χαρακτηριστικά του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος που μπορούν να επάγουν στρες στο ΕΔ (Lin, Walter et al. 2008). Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης BiP αυξάνονται προκειμένου τα καρκινικά κύτταρα να επιβιώσουν αποφεύγοντας έτσι τους μηχανισμούς απόπτωσης που ενεργοποιούνται από το στρες του ΕΔ (Pfaffenbach and Lee 2011). Μελέτες έχουν δείξει πως αυξημένα επίπεδα έκφρασης της BiP σε καρκινικά κύτταρα σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση και υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής καρκίνου προστάτη, μαστού, μελανώματος και άλλων κακοηθειών (Li and Lee 2006). Η παρατήρηση της έκτοπης πρωτεΐνης BiP στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων έχει κατευθύνει την έρευνα στην ανάπτυξη νέων αντινεοπλασματικών παραγόντων και αποτελεί ευρύ πεδίο μελέτης (Pfaffenbach and Lee 2011).

A.4.3.2 Η πρωτεΐνη Καλνεξίνη (*calnexin*)

Το δεύτερο γνωστό σύστημα πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών στο ΕΔ που έχουν μελετηθεί αρκετά αφορά στο σύστημα καλνεξίνης – καλρετικουλίνης. Η καλνεξίνη είναι μια



Εικόνα

27. Η δομή της πρωτεΐνης – μοριακής συνοδού καλνεξίνης (από PDB, Protein Data Bank).

διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ΕΔ μαζί με την καλρετικουλίνη η οποία είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη του αυλού του ΕΔ (Helenius 1997). Στο εν λόγω σύστημα, πρωταγωνιστικό ρόλο διαθέτει η πρωτεΐνη καλνεξίνη. Πρόκειται για

μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 65kDa που εντοπίζεται στη μεμβράνη του ΕΔ με το δραστικό της τμήμα να εντοπίζεται στον αυλό του ΕΔ. Αποτελείται από μια κυτταροπλασματική ουρά μήκους 89 αμινοξικών καταλοίπων και το καρβοξυτελικό της άκρο λειτουργεί ως αισθητήρας του ΕΔ. Το ανθρώπινο μόριο της καλνεξίνης διαθέτει υψηλό ποσοστό ομολογίας με το αντίστοιχο των φυτικών κυττάρων και των μυκήτων (Schrag, Bergeron et al. 2001; Bedard, Szabo et al. 2005). Η καλνεξίνη έχει ομολογία σε ποσοστό 42-78% με το διαλυτό μόριο της καλρετικουλίνης, δηλαδή η καλρετικουλίνη αποτελεί τον διαλυτό ομόλογο της καλνεξίνης στο εσωτερικό του αυλού του ΕΔ. Η καλρετικουλίνη έχει μοριακό βάρος 46kDa και μήκος 400 αμινοξικών καταλοίπων. Το μόριο της περιέχει μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή που συμβάλλει στην πρόσδεση με τα Ca^{2+} , συμβάλλοντας στην αποθήκευση Ca^{2+} στο εσωτερικό του ΕΔ. Η καλρετικουλίνη εκτός από το εσωτερικό του ΕΔ έχει εντοπιστεί και στην επιφάνεια του κυττάρου και σε εξωκυττάρια θέση, καθώς επίσης έχει παρατηρηθεί στα

αρχικά εμβρυικά στάδια. Ο ρόλος της καλρετικουλίνης στις προαναφερθείσες θέσεις παραμένει υπό διερεύνηση (Johnson, Michalak et al. 2001; Bedard, Szabo et al. 2005).

Η καλνεξίνη και η καλρετικουλίνη συνιστούν ένα σύστημα πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών που σχετίζεται με την ορθή αναδίπλωση και επεξεργασία των νεοσυντιθέμενων γλυκοπρωτεϊνών. Όταν τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια εισέρχονται στο ΕΔ, συχνά τροποποιούνται με την προσθήκη N-συνδεόμενων γλυκανών και τα μόρια γλυκόζης που περιέχονται στα μόρια αυτά απομακρύνονται άμεσα από τις γλυκοσιδάσες 1 και 2 (glucose residues trimming) (Parodi 2000). Την ύπαρξη των N-μονογλυκοζυλιωμένων γλυκανών στην πολυπεπτιδική αλυσίδα αναγνωρίζει το σύστημα καλνεξίνης - καλρετικουλίνης, στη συνέχεια συνδέεται μαζί τους και τις καθοδηγεί στα επόμενα στάδια της αναδίπλωσης. Η εν λόγω διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί και συν-μεταφραστικά. Επιπρόσθετα η απελευθέρωση μιας γλυκοπρωτεΐνης από αυτόν τον κύκλο αφού έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της αναδίπλωσης συνήθως ακολουθείται από την μεταφορά της στο σύστημα Golgi (Ni and Lee 2007). Η GRP58/ERp57 μέλος της οικογένειας PDI είναι ακόμα ένα σημαντικό μόριο του συστήματος καλνεξίνης – καλρετικουλίνης. Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως θειολούχος οξειδοαναγωγάση και καταλύει τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στις νεοσυντιθέμενες γλυκοπρωτεΐνες (Molinari and Helenius 1999).

Όπως προαναφέρθηκε και για την πρωτεΐνη BiP/GRP78, έτσι και η καλνεξίνη αποτελεί μόριο το οποίο έχει μελετηθεί στα πλαίσια της παθογένειας διαφόρων νόσων. Ειδικότερα, ανάλυση του ορού ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και συστηματικό ερυθρεματώδη λύκο έδειξε υψηλά επίπεδα αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών BiP, καλνεξίνης και GRP94, σε σύγκριση με υγιή άτομα (Weber, Haslbeck et al. 2010). Σε αποκλεισμό της καλρετικουλίνης σε πειράματα σε επίμυες, υπήρξαν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά του αποκλεισμού της GRP78 τα οποία δεν είναι συμβατά με τη ζωή καθώς τα έμβρυα παρουσιάζουν έντονα προβλήματα από το καρδιαγγειακό σύστημα (Mesaeli, Nakamura et al. 1999). Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (Alzheimer's και Parkinson's), οι

μεταβολικές νόσοι (όπως ο διαβήτης), τα προβλήματα του καρδιαγγειακού συστήματος (όπως η αθηροσκλήρωση) και η καρκινογένεση είναι από τις πιο μελετημένες νόσους. Σε αυτές, οι πρωτεΐνες – μοριακοί σύνοδοι λειτουργούν λαμβάνοντας μέρος στο μηχανισμό της

| Πρωτεΐνη | Εντόπιση | Λειτουργία | Γονιδιακός αποκλεισμός | Νόσος |
|-----------------|---|---|---|---|
| GRP78/BiP | Αυλός ΕΔ Μεμβράνη του ΕΔ Κυτταρική επιφάνεια Πυρήνας | Συνοδός πρωτεΐνη Δέσμευση Ca ²⁺ Ρυθμιστής UPR Αισθητήρας του στρες του ΕΔ Αντι- αποπτωτική δράση | Εμβρυϊκή θνησιμότητα την 3,5 ^η εμβρυϊκή εβδομάδα | Καρκίνος Alzheimer's Parkinson's Νόσος των prions Αθηροσκλήρωση |
| GRP94/grp96 | Αυλός ΕΔ Κυτταρική μεμβράνη | Συνοδός πρωτεΐνη Δέσμευση Ca ²⁺ Αντι- αποπτωτική δράση Ανοσία όγκων | Εμβρυϊκή θνησιμότητα | Καρκίνος Νόσος των prions Αυτοάνοσα νοσήματα |
| GRP58/ ERp57 | Αυλός ΕΔ Πυρήνας Κυτοσόλιο | Καταλείπει σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών σε γλυκοπρωτεΐνες | Εμβρυϊκή θνησιμότητα Grp58-/- Β λεμφοκύτταρα μη αντιγονο- παρουσιαστικά | Νόσος των prions Alzheimer's |
| Καλνεξίνη | Μεμβράνη του ΕΔ Κυτταρική επιφάνεια | Συνοδός πρωτεΐνη Αναδίπλωση γλυκοπρωτεϊνών | Ανάπτυξη διαβήτη οφειλόμενου σε αυξημένη απόπτωση των β-κυττάρων | Διαβήτης (σε πειραματόζωα) |
| Καλρεπικουλίνη | Αυλός ΕΔ Κυτοσόλιο Κυτταρική επιφάνεια | Συνοδός Πρωτεΐνη Αναδίπλωση γλυκοπρωτεϊνών Δέσμευση Ca ²⁺ | Εμβρυϊκή θνησιμότητα τη 14 ^η εμβρυϊκή εβδομάδα | Καρδιακή υπερτροφία Alzheimer's Αυτοάνοσα νοσήματα |

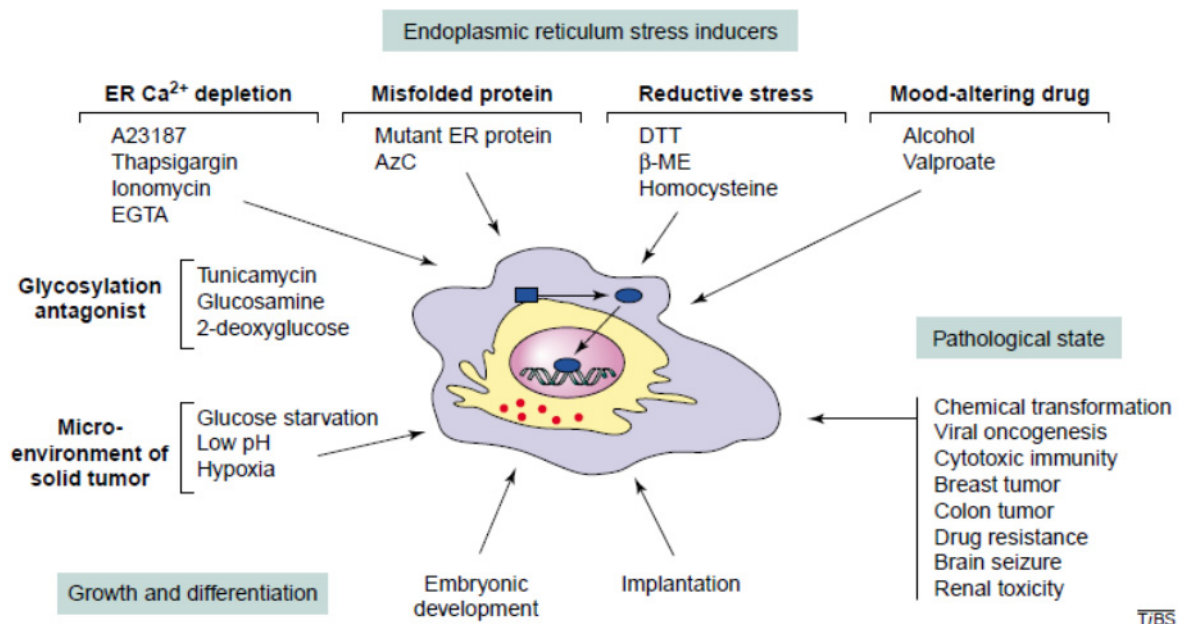
Πίνακας 1. Περίληψη των λειτουργιών των πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών και η συσχέτισή τους με διάφορες νόσους τροποποίηση από (Ni and Lee 2007).

παθογένεσης ή ενίοτε προς την αντίθετη κατεύθυνση παίζοντας αντιρροπιστικό ρόλο ως προς την εκδήλωση της νόσου (Ni and Lee 2007).

Συνεπώς, οι πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί έχουν σημαντικό ρόλο στην in vivo διαδικασία της ορθής αναδίπλωσης, στο πρώιμο στάδιο του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών που συμβαίνει στο εσωτερικό του ΕΔ (Ellgaard and Helenius 2003). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στις διαδικασίες απόκρισης στο στρες του ΕΔ (UPR), καθώς και στις διαδικασίες απόπτωσης οι οποίες σχετίζονται με το στρες του ΕΔ, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

A.4.4 Στρες του ΕΔ (Stress of Endoplasmic Reticulum – ER Stress) και απόκριση στις μη – ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response – UPR)

Όπως προαναφέρθηκε, το ΕΔ είναι ένα οργανίδιο στο οποίο διάφορες εκκριτικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες συντίθενται, μορφοποιούνται (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις) και προετοιμάζονται κατάλληλα (πρωτεϊνική αναδίπλωση), έτσι ώστε να συνεχίσουν το εκκριτικό τους μονοπάτι προς άλλα οργανίδια ή το κυτταρόπλασμα ή και εκτός κυττάρου. Ωστόσο, υπάρχουν πολλαπλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, ειδικά στο



Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση των συνθηκών επαγωγής για την πρωτεΐνη GRP78 των θηλαστικών. Οι συνθήκες στρες επηρεάζουν την ομοιόσταση του ΕΔ και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια από το ΕΔ στον πυρήνα (Lee 2001).

επίπεδο των πολυκύτταρων οργανισμών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν εκτροπή της φυσιολογίας του ΕΔ. Ο όρος στρες του ΕΔ χρησιμοποιείται για να περιγράψει την έλλειψη ισορροπίας που υπό συνθήκες δημιουργείται ανάμεσα στην κυτταρική ανάγκη για ορθή λειτουργία του ΕΔ και την ικανότητά του για κάτι τέτοιο (Schroder and Kaufman 2005; Zhao

and Ackerman 2006). Η εκδήλωση κυτταρικού στρες σχετίζεται με ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Μερικοί από αυτούς αποτελούν: παθογόνος μόλυνση, χημικοί παράγοντες (θαψιγρανίνη κ.α.), γενετική μετάλλαξη, απουσία θρεπτικών συστατικών (π.χ. γλυκόζης), καθώς και φυσιολογικές καταστάσεις διαφοροποίησης και ωρίμανσης των ιστών (Zhao and Ackerman 2006). Η διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αυτά τα ερεθίσματα με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη – ορθά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών (Rutkowski and Kaufman 2004). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μη – ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες δεν μπορούν να μεταφερθούν από το ΕΔ στο σύστημα Golgi αλλά διατηρούνται εκεί με σκοπό την ορθή αναδίπλωσή τους. Ειδικότερα, η συσσώρευσή τους στο εσωτερικό του ΕΔ οδηγεί στη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων από την ένωση των υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων τους. Η συσσώρευση των εν λόγω συσσωματωμάτων λειτουργεί τοξικά για το κύτταρο και επάγει μηχανισμούς κυτταρικής νέκρωσης ή απόπτωσης, παρόμοιες με αυτούς σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Alzheimer's και Parkinson's), στο σακχαρώδη διαβήτη καθώς και σε εγκεφαλικές βλάβες σχετιζόμενες με prions (Zhao and Ackerman 2006; Yoshida 2007; Kaufman, Back et al. 2010; Walter and Ron 2011; Torres, Matamala et al. 2015). Συνεπώς, η δυνατότητα ενός κυττάρου να αναγνωρίσει και να αντιμετωπίσει το στρες είναι αναγκαία προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόστασή του.

Για τη διατήρηση της ομοιόστασης τα κύτταρα ενεργοποιούν έναν εξειδικευμένο μηχανισμό «αυτοάμυνας» ως απόκριση στο στρες του ΕΔ ο οποίος ονομάζεται Unfolded Protein Response (UPR) δηλαδή απόκριση στις μη – ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες. Η απόκριση αυτή ξεκινάει από το ΕΔ, όμως απαιτείται συμμετοχή και του πυρήνα και του συστήματος Golgi για τη μεταφορά των σημάτων (Zhao and Ackerman 2006). Η UPR ενεργοποιείται υπό παθολογικές αλλά και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στο βαθμό που ο κάθε κυτταρικός τύπος διαφέρει ως προς το πρωτεϊνικό φορτίο που είναι ικανός να συνθέσει, διαφέρει και ο βαθμός του φυσιολογικού στρες που μπορεί να υποστεί. Το γεγονός αυτό διαφοροποιεί τη λειτουργία της UPR η οποία εμφανίζεται πιο έντονη σε εκκριτικά κύτταρα (π.χ. παγκρεατικά) ή σε

κύτταρα που συνθέτουν μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών (όπως β-λεμφοκύτταρα) (Schroder and Kaufman 2005; Zhao and Ackerman 2006). Τέλος, η μετάλλαξη σε μία πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει σε αδυναμία αναδίπλωσής της και σε συσσώρευση (Ron and Hampton 2004; Rutkowski and Kaufman 2004; Kaufman, Back et al. 2010). Η UPR συντονίζει την αύξηση της ικανότητας του ΕΔ να αναδιπλώνει πρωτεΐνες υπό συνθήκες στρες του ΕΔ και για να το πραγματοποιήσει αυτό προβαίνει σε τέσσερις βασικές ενέργειες: 1) μείωση της μαζικής πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου, 2) αύξηση της μεταγραφής των πρωτεϊνών – μοριακών συνοδών με σκοπό την ορθή αναδίπλωση και έκκριση, 3) αύξηση της σύνθεσης των συστατικών της ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) με σκοπό την αποδόμηση των μη ορθά – αναδιπλούμενων πρωτεϊνών, και 4) την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών σε περιπτώσεις παρατεταμένου ή μη αναστρέψιμου στρες του ΕΔ (Gardner, Pincus et al. 2013). Οι παραπάνω μηχανισμοί δίνουν τη δυνατότητα στο κύτταρο να απαλλάξει το ΕΔ από το πρωτεϊνικό φορτίο είτε μέσω άμεσης επίδρασης στον ίδιο το μηχανισμό μετάφρασης, είτε μέσω επίτευξης της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης με τη βοήθεια των chaperones.

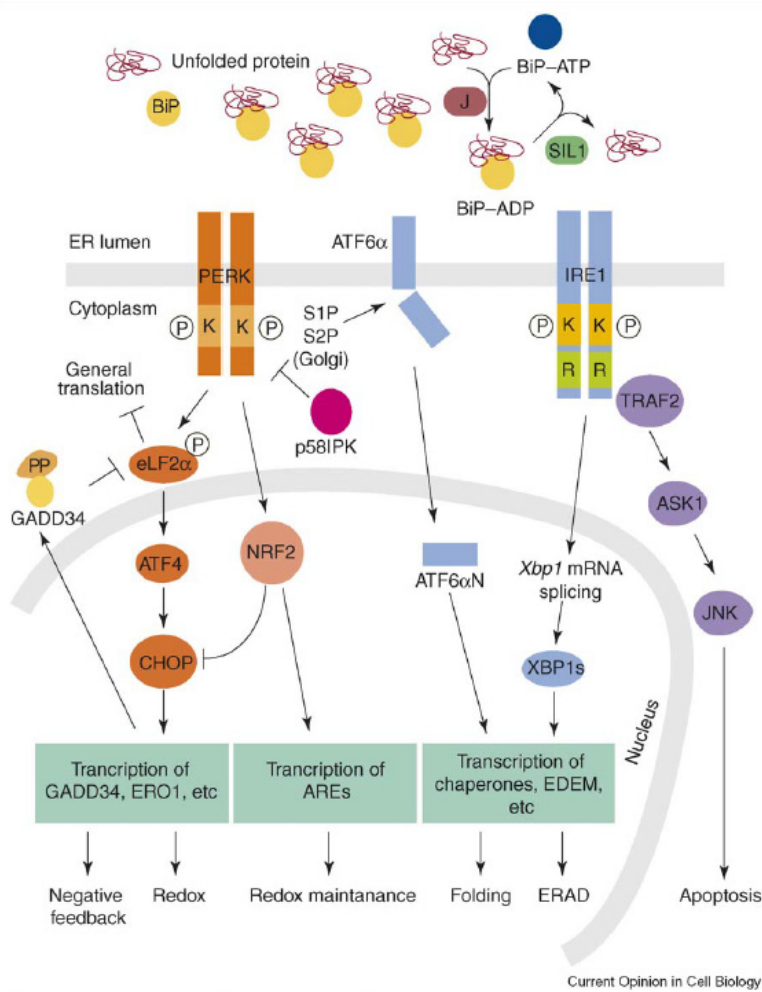
A.4.5 Μονοπάτια σηματοδότησης της UPR

Όπως προαναφέρθηκε η UPR αποτελείται από 4 διαφορετικές συνιστώσες, η κάθε μία από τις οποίες οδηγεί σε διαφορετικό αποτέλεσμα. Μέχρι σήμερα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν αναγνωριστεί ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό της UPR. Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται από τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ΕΔ, τις ATF6, PERK και IRE1, η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί σε διαφορετικά μοριακά αποτελέσματα μέσω διαφορετικού μοριακού καταρράκτη (Ron and Hampton 2004; Schroder and Kaufman 2005). Τα τρία μονοπάτια διαθέτουν ένα κοινό χαρακτηριστικό το οποίο είναι ότι η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη – μοριακή συνοδό BiP/GRP78. Σε φάση ηρεμίας, το

τμήμα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που βρίσκεται στο εσωτερικό του αυλού είναι συνδεδεμένο με τη συνοδό πρωτεΐνη BiP/GRP78. Η BiP συνδέεται μέσω των υδρόφοβων ομάδων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με το ενδοαυλικό τμήμα των παραπάνω πρωτεϊνών, καθιστώντας τις ανενεργές. Όσο υπάρχει ηρεμία στο κύτταρο, η BiP βρίσκεται σε αφθονία στο ΕΔ και είναι προσδεδεμένη με τους σηματοδότες της UPR. Ωστόσο, υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, η BiP ως chaperone αποσυνδέεται από τις εν λόγω θέσεις προκειμένου να συνδεθεί με τις νεοεισαγόμενες μη – ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες. Συνεπώς, η BiP εγκαταλείπει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ATF6, PERK και IRE1, οι οποίες αυτομάτως ενεργοποιούνται προωθώντας τους αντίστοιχους μοριακούς καταρράκτες. Τα υψηλά επίπεδα BiP καθώς και η ύπαρξη ενεργοποιημένων ATF6, PERK και IRE1, αποτελούν ευαίσθητους δείκτες ύπαρξης στρες του ΕΔ σε ένα κύτταρο (Yoshida 2007; Hetz, Martinon et al. 2011; Zhang and Wang 2012). Ακολουθεί μια σύντομη παρουσίαση των τριών μοριακών μονοπατιών.

A.4.5.1 Το μοριακό μονοπάτι της ATF6 (Activating Transcription Factor 6)

Η ATF6 είναι μια διαμεμβρανική τύπου II μεγέθους 90kDa της οποίας το ένα τμήμα που βρίσκεται στο εσωτερικό του αυλού, λειτουργεί ως ανιχνευτής του στρες του ΕΔ (Chen, Shen et al. 2002). Το υπόλοιπο μέρος της πρωτεΐνης που βρίσκεται κυτταροπλασματικά



Εικόνα 30. Ο μηχανισμός της UPR σε κύτταρα θηλαστικών. Υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, η αποδέσμευση της BiP από τις μη ορθά αναδιπλούμενες πρωτεΐνες ενεργοποιεί τα μονοπάτια PERK, ATF6 και IRE1 (Zhao and Ackerman 2006).

αποτελείται από μια περιοχή δέσμευσης του DNA με μορφολογία μοτίβου φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper motif bZIP) και μια περιοχή με δράση μεταγραφικού παράγοντα (Haze, Yoshida et al. 1999). Σε κατάσταση ηρεμίας του ΕΔ, η BiP συνδέεται με την ATF6 εμποδίζοντάς την να μεταφερθεί στη συσκευή Golgi για τη μεταγωγή του σήματος, δηλαδή την καθιστά ανενεργή. Υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, η BiP αποσυνδέεται και η ATF6 ενεργοποιείται και διασπάται, ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω κυστιδίων στη συσκευή Golgi (Shen, Chen et al. 2002; Shen, Snapp et al. 2005). Στη συσκευή Golgi, η ATF6 υφίσταται πρωτεόλυση από δύο πρωτεάσες, την Site 1 Protease (S1P), και την Site 2 Protease (S2P), οπότε και απελευθερώνεται το αμινοτελικό

αποτελείται από μια περιοχή δέσμευσης του DNA με μορφολογία μοτίβου φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper motif bZIP) και μια περιοχή με δράση μεταγραφικού παράγοντα (Haze, Yoshida et al. 1999). Σε κατάσταση ηρεμίας του ΕΔ, η BiP συνδέεται με την ATF6 εμποδίζοντάς την να μεταφερθεί στη συσκευή Golgi για τη μεταγωγή του σήματος, δηλαδή την καθιστά ανενεργή. Υπό συνθήκες

άκρο της ATF6 (ATF6N) το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα (Chen, Shen et al. 2002). Εκεί, η ATF6 (N) λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων συστατικών της UPR όπως BiP, GRP94, calreticulin κ.α. (Yoshida, Haze et al. 1998). Η πρωτεόλυση που υφίσταται η ATF6 είναι μοναδική και ονομάζεται ρυθμιζόμενη ενδομεμβρανική πρωτεόλυση (Regulated Intramembrane Proteolysis, RIP) και αποτελεί μια μοναδική βιολογική διεργασία καλά διατηρημένη από τα βακτήρια έως τα ανώτερα θηλαστικά (Yoshida 2007; Urra and Hetz 2012; Janssens, Pulendran et al. 2014).

A.4.5.2 Το μοριακό μονοπάτι PERK (Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase)

Το δεύτερο βιοχημικό μονοπάτι της UPR ρυθμίζεται από την PERK. Η PERK είναι μία τύπου 1 διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ΕΔ, μεγέθους 125kDa, το ενδοαυλικό κομμάτι της οποίας λειτουργεί ως αισθητήρας ύπαρξης μη – ορθώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών ενώ το κυτταροπλασματικό κομμάτι της έχει δράση κινάσης (Harding, Zhang et al. 1999). Σε κατάσταση ηρεμίας η PERK συνδέεται με την BiP στο ενδοαυλικό της άκρο καθιστώντας την ανενεργή. Υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, η αποδέσμευση της BiP από την PERK, οδηγεί την PERK σε ενεργοποίηση μέσω ολιγομερισμού και φωσφορυλίωσής της (Bertolotti, Zhang et al. 2000; Harding, Zhang et al. 2000; Liu, Schroder et al. 2000). Η ενεργοποιημένη PERK φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την υπομονάδα α του μεταγραφικού παράγοντα eIF2a οδηγώντας σε γενικευμένη πτώση της μεταγραφικής δραστηριότητας (Ron and Hampton 2004). Συνεπώς η PERK συμβάλλει στη μείωση του πρωτεϊνικού φορτίου που εισέρχεται στο ΕΔ με αποτέλεσμα τη μείωση του στρες του ΕΔ. Παρόλα αυτά, κάποια γονιδιακά mRNA που περιέχουν μικρά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης στο μη – μεταφρασμένο 5' άκρο τους μεταφράζονται εκλεκτικά όταν ο eIF2a είναι φωσφορυλιωμένος και κατά συνέπεια ανενεργός. Αυτό συμβαίνει στην περίπτωση του μεταγραφικού παράγοντα ATF4 ο οποίος

υπό συνθήκες στρες του ΕΔ εμφανίζει υψηλά ποσοστά. Στη συνέχεια ο ATF4 έχοντας δράση μεταγραφικού παράγοντα εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και ευνοεί τη μεταγραφή γονιδίων όπως πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μεταβολισμό αμινοξέων, μορίων που σχετίζονται με αντίσταση στο οξειδωτικό στρες καθώς και του μορίου CHOP που κινητοποιεί αποπτωτικά φαινόμενα. Συμπερασματικά, το μοριακό μονοπάτι PERK έχει την ικανότητα να επιτελεί λειτουργίες της UPR όπως η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας καθώς και η ενεργοποίηση αποπτωτικών φαινομένων (Ron and Walter 2007; Yoshida 2007; Chakrabarti, Chen et al. 2011; Walter and Ron 2011).

A.4.5.3 Το μοριακό μονοπάτι IRE1 (*Inositol Requirement 1*)

Το τρίτο και τελευταίο μονοπάτι της UPR είναι αυτό του IRE1. Αποτελεί το πιο μελετημένο βιοχημικό μονοπάτι εξαιτίας της παρουσίας του στους μύκητες. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 110kDa του ΕΔ με διπλή λειτουργία κινάσης – ενδοριβονουκλεάσης (Iwawaki, Hosoda et al. 2001). Υπάρχουν δύο διαφορετικά γονίδια για την IRE1, το IRE1α και το IRE1β. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης είναι παρόμοιος με αυτόν που περιγράφηκε για τα μονοπάτια της ATF6 και PERK. Η αποδέσμευση της BiP από το ενδοαυλικό άκρο της IRE1 προκαλεί ενεργοποίηση της πρωτεΐνης μέσω διμερισμού και αυτοφωσφορυλίωσης (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Στη συνέχεια, το κυτταροπλασματικό άκρο της IRE1α με δραστικότητα ριβονουκλεάσης μετατρέπει το πρόδρομο pre-mRNA του γονιδίου XBP1 (X-box Binding Protein 1) σε ώριμη μορφή μέσω μιας άτυπης διαδικασίας ματίσματος (Yoshida, Matsui et al. 2001; Calton, Zeng et al. 2002). Η ιδιαίτερη αυτή μορφή ματίσματος καταλύεται από την ίδια την IRE1α, πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν τυχαία σειρά. Η βιολογική σημασία αυτής της διαδικασίας εστιάζεται στο ότι πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα και με πολύ μικρή ενέργεια (Yoshida 2007). Το μεταγραφόμενο πρόδρομο mRNA του XBP1 δεν διαθέτει

ικανότητα μεταγραφικού παράγοντα. Αντίθετα, το ώριμο mRNA δίνει θέση στην πρωτεΐνη pXBP1(S) η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, εισέρχεται στον πυρήνα και προάγει τη μεταγραφή γονιδίων της UPR, όπως την BiP, συστατικά του μηχανισμού πρωτεϊνικής αποδόμησης ERAD καθώς και μορίων που εμπλέκονται στη σύνθεση φωσφολιπιδίων και στη βιογένεση του ΕΔ. Συνεπώς, τα επίπεδα της πρωτεΐνης XBP1 είναι υψηλά σε είδη κυττάρων με ανεπτυγμένο ΕΔ και έντονη εκκριτική ικανότητα, όπως τα ηπατοκύτταρα, τα ώριμα πλασματοκύτταρα και τα β-παγκρεατικά κύτταρα (Yoshida, Matsui et al. 2001; Hetz and Glimcher 2009; Chen and Brandizzi 2013).

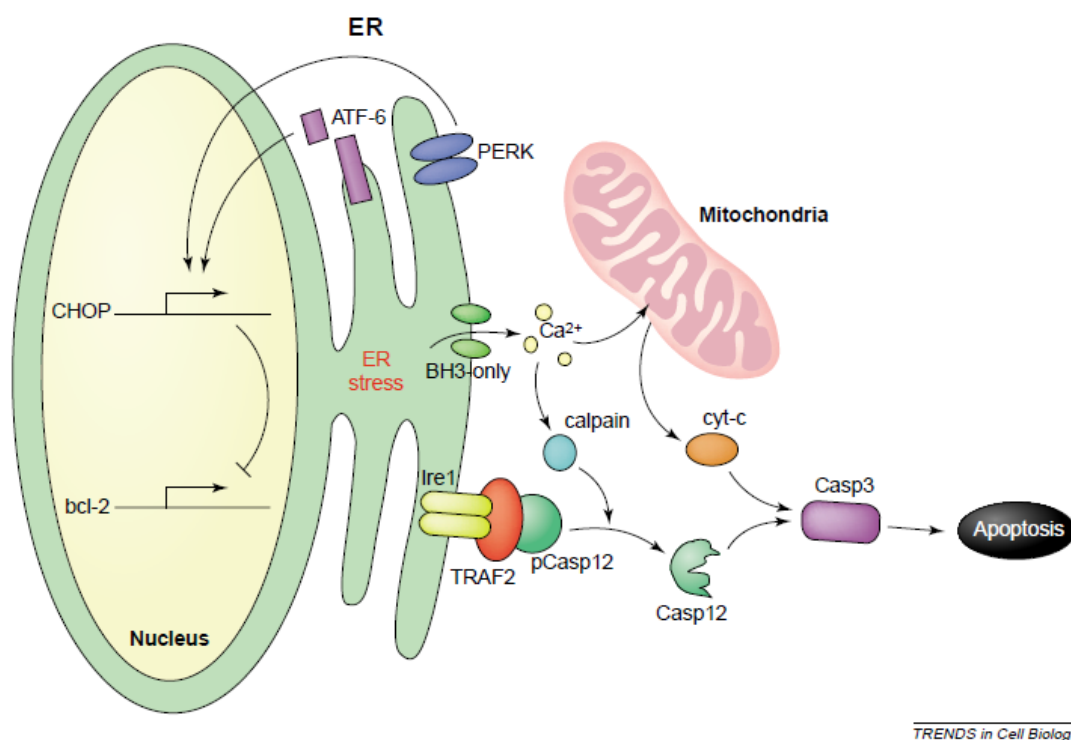
A.4.6 Αποπτωτικά φαινόμενα που σχετίζονται με το στρες του ΕΔ

Όπως έχει προαναφερθεί, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μη ορθά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του ΕΔ είναι τοξικός για τα κύτταρα. Ως απάντηση, το ΕΔ κινητοποιεί τα τρία μοριακά μονοπάτια που ήδη αναφέρθηκαν, στα πλαίσια της UPR, προκειμένου να απομακρύνει αυτές τις πρωτεΐνες και συνεπώς να αποκατασταθεί η λειτουργία του ΕΔ. Έχει αναφερθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων μονοπατιών παίζει ρόλο στην απόπτωση προκαλούμενη από το στρες του ΕΔ. Οι μηχανισμοί απόπτωσης σχετιζόμενοι με το στρες του ΕΔ που έχουν περιγραφεί είναι οι εξής: 1) η επαγωγή της έκφρασης του προ-αποπτωτικού παράγοντα CHOP/GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage 153) από το μοριακό μονοπάτι PERK, 2) η έκφραση του μορίου TRAF2 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 2) από το μοριακό μονοπάτι IRE, και 3) η εξαρτώμενη από το σύστημα Bcl-2 διαρροή Ca^{2+} από το εσωτερικό του ΕΔ (Zinszner, Kuroda et al. 1998; Urano, Wang et al. 2000; Rao, Hermel et al. 2001; Yoneda, Imaizumi et al. 2001; Zhang, Kawauchi et al. 2001; Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002; Yoshida 2007).

Πιο συγκεκριμένα, ίσως το πιο μελετημένο αποπτωτικό μονοπάτι είναι αυτό του CHOP/GADD153 η έκφραση του οποίου επάγεται από τη UPR μέσω των PERK και ATF6.

Ο αποκλεισμός του συγκεκριμένου γονιδίου σε πειραματόζωα οδηγεί σε λιγότερο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση με αυτόν που παρατηρείται υπό το στρες του ΕΔ οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το CHOP κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή (Zinszner, Kuroda et al. 1998). Η πρωτεΐνη CHOP είναι μεγέθους 23kDa και αποτελείται από 169 αμινοξικά κατάλοιπα γνωστή και ως GADD153. Υπάρχουν 3 γονίδια για GADD πρωτεΐνες: GADD34, GADD45 και GADD153 τα οποία δεν διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς τη δομή τους. Είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι συμμετέχουν σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου όπως κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση καθώς επίσης συμμετέχουν και στο ανοσολογικό σύστημα. Η πρωτεΐνη CHOP είναι μεταγραφικός παράγοντας που επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων GADD34, ERO1(ER Oxidoreductin), DR5 (Death Receptor 5) και carbonic anhydrase VI τα οποία φαίνεται να παίζουν ρόλο στην απόπτωση (Yoshida 2007). Σε κατάσταση ηρεμίας το CHOP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ τα επίπεδα αυξάνονται σημαντικά και η πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα. Το μοριακό μονοπάτι PERK είναι κυρίως υπεύθυνο για την προώθηση της μεταγραφής του γονιδίου και συνεπώς για τα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης υπό συνθήκες στρες του ΕΔ. Παράλληλα, το CHOP αυξάνει τα επίπεδα του αποπτωτικού παράγοντα Bim και μειώνει την έκφραση του αντι-αποπτωτικού Bcl-2. Παρόλα αυτά, τα ακριβή αποπτωτικά μονοπάτια που σχετίζονται με το CHOP δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστά (Marciniak, Yun et al. 2004; Oyadomari and Mori 2004; Yoshida 2007; Mihailidou, Papavassiliou et al. 2014).

Ένα άλλο αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη IRE1 είναι αυτό των TRAF2-ASK1. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της IRE1 συνδέεται με την πρωτεΐνη TRAF2 η οποία με τη σειρά της συνδέεται με το μόριο ASK1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1). Το σύμπλεγμα IRE1-TRAF2-ASK1 είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου JNK (Jun Kinase) και της πρωτεϊνικής κινάσης SAPK (Stress Activated Protein Kinase) (Urano, Wang et al. 2000; Sano



Εικόνα 31. Σχηματική αναπαράσταση πολλαπλών αποπτωτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από το στρες του ΕΔ (Rutkowski and Kaufman 2004).

and Reed 2013). Επιπλέον η TRAF2 σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης 12 όπως επίσης και με τον καταστολέα της μεταγραφής ATF3, μόρια τα οποία συμμετέχουν στην κυτταρική απόπτωση υπό συνθήκες στρες του ΕΔ (Yoneda, Imaizumi et al. 2001; Zhang, Kawauchi et al. 2001).

Μία ακόμη καλά μελετημένη ομάδα πρωτεϊνών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι αυτή της οικογένειας Bcl-2. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται από εσωτερικά

αποπτωτικά σήματα όπως η καταστροφή του DNA. Τα αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του ΕΔ και ενεργοποιούν την κασπάση 12, σε αντίθεση με τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας τα οποία εμποδίζουν αυτή τη συγκέντρωση (Yoshida 2007). Ο αντι-αποπτωτικός παράγοντας Bcl-2, υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, ενεργοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα CHOP ο οποίος εντείνει το οξειδωτικό ερέθισμα και κατευθύνει το κύτταρο προς απόπτωση (McCullough, Martindale et al. 2001). Η υπερέκφραση της Bcl-2 εμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης 12 και προστατεύει το κύτταρο από την απόπτωση που επάγεται υπό συνθήκες στρες του ΕΔ (Contreras, Smyth et al. 2003). Παράλληλα, ο αποπτωτικός παράγοντας BAD (Bcl-2 Antagonist of cell Death) αποφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται υπό συνθήκες στρες του ΕΔ. Η ενεργοποίησή του προάγει μια σειρά αντιδράσεων που οδηγεί στην μεταφορά του κυτοχρώματος c από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο κυτταρόπλασμα (Elyaman, Terro et al. 2002). Η αλληλεπίδραση του ΕΔ με τα μιτοχόνδρια ώστε να κινητοποιηθούν οι μηχανισμοί απόπτωσης επιβεβαιώνεται από τη δράση και άλλων αποπτωτικών παραγόντων οικογένειας Bcl-2 όπως ο BAX (Bcl-2 Associated X protein) και ο BAK (Bcl-2 homologous Antagonist/Killer). Και οι δύο παράγοντες ολιγομερίζουν, υπό συνθήκες στρες του ΕΔ, και ενεργοποιούν την κασπάση 12. Επιπρόσθετα, οι παράγοντες αυτοί φαίνεται ότι ελέγχουν την ομοιόσταση του Ca^{2+} στο εσωτερικό του ΕΔ. Αύξηση των επίπεδων της BAX οδηγεί σε απελευθέρωση Ca^{2+} από το εσωτερικό του ΕΔ, συνεπακόλουθη αύξηση του μιτοχονδριακού Ca^{2+} και αυξημένη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και έναρξη της απόπτωσης (Contreras, Smyth et al. 2003; Scorrano, Oakes et al. 2003; Yoshida 2007). Στα μιτοχόνδρια, στις διαδικασίες της απόπτωσης περιλαμβάνεται και η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης BH3 (Homology domain 3) η οποία λειτουργεί ως σύνδεσμος για τις BAX και BAK (Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η έκφραση των BAX και BAK επηρεάζει και το σηματοδοτικό μονοπάτι της IRE1 υπό συνθήκες στρες του ΕΔ (Hetz, Bernasconi et al. 2006).

A.4.7 Το στρες του ΕΔ και οι νόσοι που σχετίζονται με αυτό

Το στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου και η UPR σχετίζονται με μηχανισμούς κυτταρικής επιβίωσης ή κυτταρικού θανάτου, και κατ'επέκταση οι μηχανισμοί αυτοί εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην παθοφυσιολογία νοσημάτων του ανθρώπινου οργανισμού (Zhao and Ackerman 2006). Οι εν λόγω νόσοι, σε μοριακό επίπεδο, χαρακτηρίζονται από συσσώρευση μη ορθά αναδιπλούμενων πρωτεϊνών και γι'αυτό ταξινομούνται στις «νόσους διαμόρφωσης» ή «νόσους αναδίπλωσης» (conformational or folding diseases) (Yoshida 2007). Η ανικανότητα του κυττάρου να αναδιπλώσει σωστά τις πρωτεΐνες, το έλλειμμα των βασικών μηχανισμών αναγνώρισής του από τους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ, ή και η λανθασμένη ενεργοποίηση της UPR οδηγούν στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών. Συνεπώς, προκαλείται κυτταρική βλάβη η οποία στο επίπεδο του πολυκύτταρου ανθρώπινου οργανισμού οδηγεί σε διαταραχή στη φυσιολογία με αποτέλεσμα την εμφάνιση νόσου (Yoshida 2007; Lin, Walter et al. 2008).

Το στρες του ΕΔ έχει διερευνηθεί για τη σύνδεσή του με νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως νόσος Parkinson's, νόσος Alzheimer's, prions disease (Lindholm, Wootz et al. 2006). Η νόσος Parkinson's χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων του ντοπαμινεργικού συστήματος που οδηγεί σε βλάβες στη λειτουργία της κίνησης. Οι πρωτεΐνες α -synuclein, parkin, και η c-terminal esterase L1 (UCL-L1) έχουν εντοπιστεί στα κυτταροπλασματικά σωμάτια Lewy των προσβεβλημένων κυττάρων. Οι δύο τελευταίες πρωτεΐνες εμπλέκονται άμεσα στο μηχανισμό της ERAD, για την α -synuclein δεν υπάρχουν ακόμη επαρκείς ενδείξεις (Ryu, Harding et al. 2002; Hoozemans, Veerhuis et al. 2005; Lin, Walter et al. 2008).

Η νόσος Alzheimer's χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρώνων στην περιοχή του ιππόκαμπου και του πρόσθιου εγκεφάλου και από συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς β-πεπτιδίου. Οι αρχικές ενδείξεις, σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο, εμπλοκής του στρες του ΕΔ στην παθογένεια της νόσου ήταν η αύξηση των επιπέδων των chaperones και η ενεργοποίηση των μηχανισμών

της UPR. Επιπρόσθετα, αποπτωτικά μόρια όπως η κασπάση 4 (σχετίζεται με το στρες του ΕΔ) έχουν εντοπιστεί στα αρχικά στάδια της νόσου (Lin, Walter et al. 2008).

Ο σακχαρώδης διαβήτης θεωρείται άλλη μια νόσος στην παθογένεια της οποίας εμπλέκεται το στρες ΕΔ (Harding and Ron 2002). Η ανάγκη για μαζική παραγωγή ινσουλίνης στην περίπτωση του τύπου 1 σακχαρώδους διαβήτη ενεργοποιεί την εμφάνιση στρες του ΕΔ στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η επαγωγή της αποπτωτικής δράσης του CHOP μέσω του μοριακού μονοπατιού PERK οφείλεται μερικώς για την καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων. Σε μελέτες που χρησιμοποίησαν πειραματικά μοντέλα διαβήτη, όπως τα διαβητικά ποντίκια Akita, εμφάνισαν ενεργοποίηση μορίων της UPR όπως ATF6, BiP, GRP94 και XBP1 (Allen, Nguyen et al. 2004; Ozcan, Cao et al. 2004; Yoshida 2007). Επιπρόσθετα, σε πρόσφατη πειραματική μελέτη διαπιστώθηκε πως η πρωτεΐνη p21 έχει την ικανότητα να παρουσιάζει αντιδιαβητογόνο δράση μέσω επιδιόρθωσης της σχετιζόμενης με το στρες του ΕΔ βλάβης σε επίπεδο ιστών (Allen, Nguyen et al. 2004; Ozcan, Cao et al. 2004; Mihailidou, Papavassiliou et al. 2014). Το στρες του ΕΔ σχετίζεται επίσης με την παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων. Η πρωτεΐνη BiP σχετίζεται με το αυτοαντιγόνο Ro-52/SS-A το οποίο συμμετέχει στο μοριακό μηχανισμό γένεσης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Επιπλέον, η δράση της πρωτεΐνης synoviolin (μέλος της ERAD) έχει σε πειραματικό επίπεδο ερευνηθεί ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη αρθροπάθειας με μηχανισμό παρεμφερή με αυτόν της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Nagaraju, Casciola-Rosen et al. 2005; Yamasaki, Yagishita et al. 2005). Επίσης, μελέτες σε ασθενείς με αυτοάνοση μυοσίτιδα έδειξαν υψηλά επίπεδα των μορίων CHOP, BiP και GADD45 (Purcell, Todd et al. 2003).

| Table 1 | | | | |
|---|--------------------------------|---|---|--------------|
| Human diseases linked to ER stress | | | | |
| Disease | Protein | Function | Major pathology | Ref |
| Wolcott-Rallison Syndrome | PERK | UPR sensor | Infantile diabetes | [8] |
| Wolfram Syndrome | WFS1 | Involved in ERAD? | Diabetes insipidus, neurodegeneration | [8] |
| Hereditary tyrosinemia type 1 | FAH | Tyrosine metabolism | Liver and renal dysfunction; accumulation of a metabolic intermediate causes ER stress | [9] |
| Familial hypercholesterolemia | LDLR | Low density lipoprotein receptor | Hypercholesterolemia; accumulation of mutant protein causes ER stress | [59] |
| Z α 1-antitrypsin deficiency | A1AT (α 1-antitrypsin) | Protease inhibitor | Early onset liver disease; accumulation of mutant protein causes ER stress | [18] |
| Inclusion body myopathy (IBMPFD) | p97/VCP/CDC48 | ERAD | Early onset Paget disease and frontal temporal dementia, muscular dystrophy, motor neuron degeneration | [60,61] |
| Parkinson's disease | Parkin Others | E3 ubiquitin ligase | Tremor, bradykinesia; loss of inclusion-containing dopaminergic neurons in the substantia nigra; Mutation of Parkin causes ER stress | [16] |
| Familial Alzheimer's disease | PS1 Others | γ -secretase complex | Memory loss, dementia; loss of neurons from frontal cortex, hippocampus, basal forebrains, formation of extracellular plaques and intracellular neurofibrillary tangles; ER stress? | [16, 62,63] |
| Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis | SOD1 | Cu/Zn superoxide dismutase | Degeneration of motoneurons in spinal cord, cortex and brain stem; caspase 12 is activated and mutant SOD1 forms aggregates in ER in transgenic mice | [16,64] |
| Marinesco-Sjögren syndrome | SIL1/BAP/SLS1 | BIP adenine nucleotide exchange factor | Cerebellar ataxia, myopathy, cataracts; ER stress and UPR activation are observed in a mouse model | [39*, 40,41] |
| GM1 gangliosidosis | β -galactosidase | Carbohydrate/lipid metabolism | Severe cerebral neurodegeneration; Accumulation of gangliosides; ER stress is observed in a mouse model | [43*] |
| Pelizaeus-Merzbacher disease | PLP1 | Proteolipid protein 1, myelin component | Spastic quadriplegia, ataxia; dysmyelination; ER accumulation of PLP causes ER stress | [16] |
| Batten disease/Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis | PPT1 | Palmitoyl-protein thioesterase-1 | Seizures, mental deterioration, blindness; accumulation of toxic fatty-acylated proteins in neurons; may involve ER stress and activation of caspase 4 | [65] |
| Bipolar disease | XBP1? | UPR sensor | Manic/depressive psychosis; <i>Xbp1</i> gene polymorphism? | [20,21] |
| Transmissible Spongiform Encephalopathy | PrP | | Neuronal loss due to accumulation of the misfolded prion protein; enhanced calcium release and ER stress may be involved | [16] |
| Spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease | SCA3 | | Ataxia, abnormal ocular movement, spasticity; activation of the IRE1 and PERK branches of UPR | [16] |
| Huntington's disease | Huntingtin | | Neurodegeneration, motor dysfunction, abnormal cognition; mutant huntingtin changes ER calcium homeostasis | [16] |
| Sporadic inclusion body myositis | APP | | Muscle degeneration with vacuolated muscle fibers; inclusions containing either β -amyloid or phosphorylated tau induces ER stress | [19] |
| Cerebral ischemia | | | Paresis, memory disturbance; neuron death; ER stress and CHOP activation | [15] |
| Atherosclerosis | | | Cholesterol deposition on the artery wall; hyperhomocysteinaemia and accumulation of unesterified cholesterol cause UPR induction | [10, 66,67] |
| Solid tumors | | | UPR activation can protect tumor cells from hypoxia-induced apoptosis | [12] |
| Viral infection | | | UPR activation upon viral infection | [11] |
| Inflammation | | | Utilizes a specific UPR sensor, CREB-H | [25*] |
| Fluoride tooth | | | Fluoride causes ER stress in ameloblast, resulting in dental enamel formation | [68] |

Πίνακας 2. Ανθρώπινες νόσοι σχετιζόμενες με το στρες του ΕΔ (Zhao and Ackerman 2006).

Εκτενές είναι το θέμα εμπλοκής του ΕΔ στην ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασμάτων. Συνθήκες (όπως χαμηλό pH, υποξία, έλλειψη θρεπτικών συστατικών) μπορούν να επάγουν το στρες του

ΕΔ με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μηχανισμών απόπτωσης οι οποίοι είναι καταστρεπτικοί για τα καρκινικά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα έκφρασης μορίων της UPR σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων. Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης – μοριακής συνοδού BiP έχουν εντοπιστεί σε καρκίνους του εγκεφάλου, του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, του εντέρου, του δέρματος, κι έχουν συσχετιστεί με υψηλό βαθμό κακοήθειας (Ma and Hendershot 2004; Lee and Hendershot 2006). Επιπλέον, γενετικές μεταλλάξεις των μορίων της UPR έχουν εμπλακεί σε διάφορες κακοήθειες (όπως η XBP1 του μονοπατιού IRE1α) (Dicks, Gutierrez et al. 2015).

Τέλος, το στρες του ΕΔ και η ενεργοποίηση των μηχανισμών της UPR έχει συσχετιστεί με την παθογένεια και άλλων νοσημάτων όπως καρδιαγγειακές νόσοι (αθηροσκλήρωση, καρδιακή ανεπάρκεια), διπολική διαταραχή, νόσοι του ήπατος και των νεφρών, καθώς και ιογενείς λοιμώξεις. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται συνοπτικά, νοσολογικές οντότητες και συσχετίσή τους με το στρες του ΕΔ.

ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψιν τη νεοπλασματική φύση των κερατινοκυστικών οδοντογενών όγκων σε συνδυασμό με την ασαφή αιτιολογία τους, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εάν το στρες του ΕΔ εμπλέκεται στην παθογένεσή τους. Πιο ειδικά, σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να αξιολογηθεί η έκφραση των συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και καλνεξίνης σε ιστολογικά δείγματα κερατινοκυστικών οδοντογενών όγκων (ΚΟΟ) χρησιμοποιώντας ως δείγματα ελέγχου, ιστολογικά δείγματα περιακρορριζικών κύστεων (ΠΑΚ) και τραυματικών ινωμάτων (ΤΙ). Οι δύο αυτές συνοδές πρωτεΐνες θεωρούνται αξιόπιστοι δείκτες της επαγωγή του στρες ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων.

B. Ειδικό Μέρος

B.1 Υλικά και μέθοδοι

B.1.1 Υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκιβωτισμένα σε παραφίνη προερχόμενα από κερατινοκυστικούς οδοντογενείς όγκους (24 δείγματα), περιακρορριζικές κύστεις (9 δείγματα) και τραυματικά ινώματα (5 δείγματα). Το υλικό της παρούσας μελέτης προέρχεται από τα ιστοπαθολογικά αρχεία του Εργαστηρίου Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), μεταξύ των ετών 2006 και 2013.

Το σύνολο των ασθενών, από τους οποίους προήλθαν τα δείγματα, περιελάμβανε άτομα ηλικίας 8 έως 75 ετών. Οι ασθενείς είχαν δώσει έγγραφη συγκατάθεση, λαμβάνοντας γνώση πως το αρχειακό υλικό (φωτογραφικό, ακτινογραφικό, βιολογικό) που θα προέκυπτε κατά τη διάρκεια της εξέτασης και θεραπείας τους μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ερευνητικούς σκοπούς χωρίς να αναφέρονται τα στοιχεία τους κατά την αρχική τους εξέταση στην Κλινική της Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος, της Οδοντιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ. Η επιλογή των ιστοπαθολογικών δειγμάτων για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε βάσει των επαρκών κλινικών στοιχείων, της αντιπροσωπευτικής ιστολογικής εικόνας και του επαρκούς υλικού για τις τομές.

Οι Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν, χαρακτηρίζονταν από την ύπαρξη παρακερατινοποιημένου επιθηλίου. Τα ιστολογικά δείγματα των Περιακρορριζικών Κύστεων και των Τραυματικών Ινωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου στην μελέτη. Η επιλογή των Περιακρορριζικών Κύστεων έγινε διότι αντιπροσωπεύουν τον πιο συχνό τύπο φλεγμονωδών οδοντογενών κύστεων (Robinson 2012;

Akinyamoju, Gbadebo et al. 2014; Gbadebo, Akinyamoju et al. 2014). Επιπρόσθετα, η επιλογή των Τραυματικών Ινωμάτων έγινε καθώς αντιπροσωπεύουν βλάβες του συνδετικού ιστού οι οποίες όμως δεν παρουσιάζουν παθολογικές αλλοιώσεις στο υπερκείμενο επιθήλιο (Barker DS 1967).

B.1.2 Επιτροπή Δεοντολογίας και Έρευνας

Το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης έχει λάβει έγκριση από την Επιτροπή Δεοντολογίας και Έρευνας της Οδοντιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ (αριθμός αίτησης: 287/9-2-2016).

B.1.3 Ανοσοϊστοχημεία

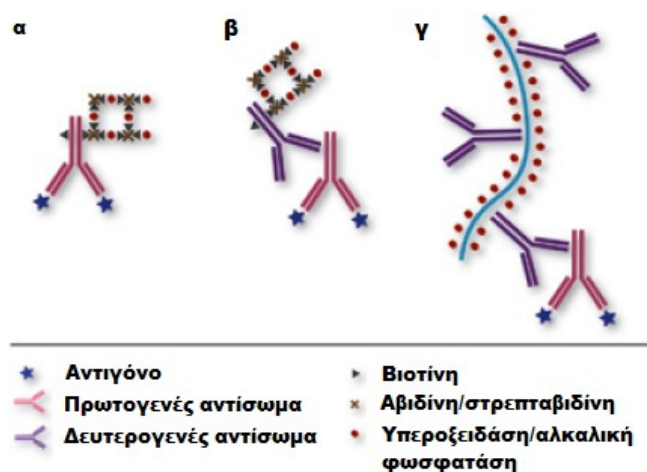
Για τη διερεύνηση της έκφρασης των πρωτεϊνών BiP/GRP78 και καλνεξίνης, σε ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, Περιακρορριζικών Κύστεων και Τραυματικών Ινωμάτων, πραγματοποιήθηκαν κλασσικές μέθοδοι ανοσοϊστοχημείας οι οποίες θα περιγραφούν παρακάτω.

Με τον όρο ανοσοϊστοχημεία αναφερόμαστε στη διαδικασία ανίχνευσης ενός αντιγόνου (μιας πρωτεΐνης) σε ιστούς ή κύτταρα. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στην ειδική αντίδραση μεταξύ αντιγόνου - αντισώματος. Οι πρώτες ερευνητικές μελέτες πάνω στη σήμανση των αντισωμάτων και στις αντιδράσεις αντιγόνου - αντισώματος χρονολογούνται από το 1931. Η πρώτη συστηματική και ουσιαστική όμως μελέτη γύρω από την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας αποδίδεται στον Coons (Coons and Kaplan 1950). Οι Taylor και Burns το 1974 ανέπτυξαν την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε ιστοτεμάχια μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκιβωτισμένα σε παραφίνη (Taylor and Burns 1974).

Η διαδικασία της μονιμοποίησης των ιστολογικών δειγμάτων είχε ήδη πραγματοποιηθεί από το Εργαστήριο Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ με τη χρήση διαλύματος ουδέτερα - ρυθμισμένης φορμόλης συγκεντρώσεως 10%. Σύμφωνα με τη μελέτη των Dill και Shortle το 1991, η μονιμοποίηση διατηρεί σε μεγάλο βαθμό τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλά επηρεάζει την αντιγονικότητα σε ένα βαθμό (μεταβάλλεται η τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών χωρίς όμως την ολική απώλεια ή τη μη-αναστρέψιμη μείωση των αντιγονικών επιτόπων των πρωτεϊνών στο ιστοτεμάχιο)(Dill and Shortle 1991). Για την αποκάλυψη των επιθυμητών αντιγονικών επιτόπων που έχουν μεταβληθεί από τη μονιμοποίηση, μπορούν να εφαρμοσθούν τεχνικές που χρησιμοποιούν ένζυμα όπως η τρυψίνη ή πρωτεάσες, ή να θερμανθεί το ιστοτεμάχιο σε νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα (Schacht and Kern 2015). Στην παρούσα μελέτη, τα ιστοτεμάχια τοποθετούνταν αρχικά σε θερμοκρασία 60 - 65°C για 30min προκειμένου να επιτευχθεί τήξη της παραφίνης και αποκατάσταση της τριτοταγούς δομής των αντιγονικών επιτόπων.

Γενικά, στην ανοσοϊστοχημεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές είτε άμεσης είτε έμμεσης ανοσοσήμανσης (Schacht and Kern 2015). Στην άμεση τεχνική, το πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συζευγμένο συνήθως με τη βιοτίνη και εφαρμόζεται άμεσα στο ιστοτεμάχιο (**Εικόνα 32α**). Στην έμμεση τεχνική, το πρωτογενές αντίσωμα είναι μη-σημασμένο, και εφαρμόζεται επί του ιστοτεμαχίου είτε δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζευγμένο με βιοτίνη είτε πολλαπλά δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα επί πολυμερούς αλυσίδας και τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά το πρωτογενές αντίσωμα (**Εικόνα 32β,γ**). Εν συνεχεία, στη βιοτίνη συνδέονται πρωτεΐνες όπως η αβιδίνη ή η στρεπταβιδίνη. Ακολουθεί μια ενζυματική αντίδραση με τη μεσολάβηση συνήθως της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP) (**Εικόνα 32α,β,γ**). Κατόπιν τοποθετείται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, που συνήθως είναι η ουσία διαμινοβενζιδίνη (3,3-Diaminobenzidine, DAB). Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός έγχρωμου προϊόντος και με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η αναγνώριση του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης - στόχου στον ιστό.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η έμμεση τεχνική ανοσοσήμανσης που περιγράφηκε παραπάνω. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-BiP (C50B12) από κουνέλι (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) και το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-calnexin (sc-46669) από ποντίκι



Εικόνα 32. Τεχνικές άμεσης και έμμεσης ανοσοϊστοχημείας. α) Άμεση μέθοδος. Β ,γ) Έμμεση μέθοδος (περιγραφή λεπτομερειών τεχνικής στο κείμενο)(Schacht and Kern 2015).

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Το αντίσωμα anti-BiP χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1:100 και το αντίσωμα anti-calnexin σε συγκέντρωση 1:75 (αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS). Για τον ανοσοχρωματισμό με το δευτερογενές αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε το SuperPicture™ Polymer, Detection Kit, (Invitrogen) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Πριν την κλινική αξιολόγηση και παρατήρηση, πραγματοποιήθηκε ελαφρά χρώση με αιματοξυλίνη σε όλα τα ανοσοσημασμένα δείγματα. Για την παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε οπτική μικροσκοπία. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν κλινικά με τυχαία επιλογή από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές. Αναλυτικά η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε είναι η εξής:

Στάδιο 1: Τήξη παραφίνης

Τοποθέτηση των πλακιδίων για 30min σε θερμοκρασία 60 - 65°C.

Στάδιο 2: Διαδικασία ενυδάτωσης

- i. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε ξυλόλη I.
- ii. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε ξυλόλη II.
- iii. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη I συγκεντρώσεως 100% (v/v).
- iv. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη II συγκεντρώσεως 96% (v/v).
- v. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη III συγκεντρώσεως 70% (v/v).

Στάδιο 3: Πλύσιμο των τομών

- i. Πλύσιμο των τομών για 5min με αποσταγμένο H₂O.
- ii. Πλύσιμο των τομών για 15min με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στάδιο 4: Δέσμευση μη-ειδικών θέσεων

Προσθήκη Super Block (διάλυμα BSA 5% σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS) για 10min.

Στάδιο 5: Πλύσιμο των τομών

Πλύσιμο των τομών για 15min με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στάδιο 6: Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Προσθήκη του πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος (έναντι της πρωτεΐνης BiP/GRP78 ή της καλνεξίνης σε αραιώση 1:100 ή 1:75 σε PBS αντίστοιχα) και επώαση για 4h σε θερμοκρασία δωματίου.

Στάδιο 7: Πλύσιμο των τομών

Πλύσιμο των τομών για 15min με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στάδιο 8: Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα και HRP

Προσθήκη του έτοιμου διαλύματος HRP και επώαση για 20min.

Στάδιο 9: Πλύσιμο των τομών

Πλύσιμο των τομών για 15min με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Στάδιο 10: Προσθήκη υποστρώματος

Τοποθέτηση του διαλύματος DAB για 10min σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (σε 1ml αποσταγμένου H₂O προστίθεται 1 σταγόνα από τα φιαλίδια B1, B2 και B3 του kit).

Στάδιο 11: Πλύσιμο των τομών

Πλύσιμο των τομών με καταιονισμό αποσταγμένου νερού.

Στάδιο 12: Συμπληρωματική χρώση

Τοποθέτηση σε αιματοξυλίνη για 30 - 60sec ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες των κυττάρων.

Στάδιο 13: Πλύσιμο τομών

Πλύσιμο των τομών για περίπου 3min με αποσταγμένο νερό.

Στάδιο 14: Διαδικασία της αφυδάτωσης

- i. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη III συγκεντρώσεως 70% (v/v).
- ii. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη II συγκεντρώσεως 96% (v/v).
- iii. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε αιθανόλη I συγκεντρώσεως 100% (v/v).
- iv. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε ξυλόλη II.
- v. Τοποθέτηση των τομών για 5min σε ξυλόλη I.

Στάδιο 15: Μονιμοποίηση

Προσθήκη μέσου στερέωσης (permount) και τοποθέτηση καλυπτρίδας, ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί ο ιστός σε οπτικό μικροσκόπιο.

Αντισώματα και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

- ❖ Διάλυμα PBS (Phosphate buffered saline) 1x : NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ x 7H₂O ή x 2H₂O 8mM.
- ❖ Διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) 5% σε PBS : 0,5gr albumin bovine σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος BSA.

B.1.4 Αξιολόγηση τομών

Αφού πραγματοποιήθηκε η ανοσοσήμευση, οι τομές παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και έγινε αξιολόγηση του σήματός έκφρασης για τις 2 πρωτεΐνες (BiP/GRP78 και καλνεξίνη). Ανάλογα με την ένταση του σήματος δημιουργήθηκαν πέντε βαθμίδες για την κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων. Η πρώτη με συμβολισμό (-) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία δεν ανιχνευόταν καθόλου σήμα, η δεύτερη με συμβολισμό (+/-) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία ανιχνευόταν οριακή χρώση, η τρίτη με συμβολισμό (+) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία ανιχνευόταν ήπια χρώση, η τέταρτη με συμβολισμό (++) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία ανιχνευόταν μέτρια χρώση, και η τελευταία με συμβολισμό (+++) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια με έντονη χρώση.

Παράλληλα, αναλύθηκε και το χωρικό πρότυπο έκφρασης των 2 πρωτεϊνών (BiP/GRP78 και καλνεξίνης) στις επιθηλιακές στιβάδες του κάθε ιστοτεμαχίου. Ανάλογα με το πρότυπο έκφρασης δημιουργήθηκαν τρεις βαθμίδες για την κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων. Η πρώτη με συμβολισμό (OE) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία παρατηρούνταν εντόπιση της πρωτεΐνης σε όλο το πάχος του επιθηλίου, η δεύτερη με συμβολισμό (ME) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα οποία παρατηρούνταν εντόπιση της πρωτεΐνης μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, και η τρίτη με συμβολισμό (OE/ME) περιελάμβανε τα ιστοτεμάχια στα παρατηρούνταν εντόπιση της πρωτεΐνης σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου.

B.1.5 Στατιστική ανάλυση

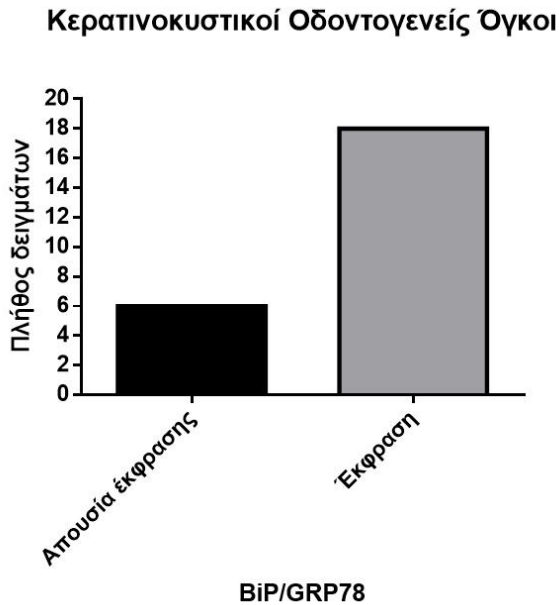
Για την στατιστική ανάλυση και γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA) και η στατιστική δοκιμασία χ^2 .

B.2 Αποτελέσματα

Σε όλα τα ιστοτεμάχια που εξετάστηκαν, και για τις δύο πρωτεΐνες (BiP/GRP78 και Καλνεξίνη), η έκφραση ήταν ομοιογενής ανάμεσα στα κύτταρα του κάθε δείγματος και η μόνη διαφορά αφορούσε την ένταση του σήματος έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων. Εξετάστηκαν 24 ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, 9 ιστοτεμάχια Περιακρορριζικών Κύστεων και 5 ιστοτεμάχια Τραυματικών Ινωμάτων.

B.2.1 Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους

Στον Πίνακα 3 αναφέρονται περιγραφικά τα επίπεδα έκφρασης (βάσει της 5βάθμιας κλίμακας που ορίσαμε) και το χωρικό πρότυπο έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών



BiP/GRP78 και Καλνεξίνης στα ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που μελετήθηκαν. Σε σύνολο 24 ιστοτεμαχίων, τα 18 ιστοτεμάχια παρουσίαζαν έκφραση της BiP/GRP78 ενώ 6 όχι (75% ανοσοθετικότητα) (Εικόνα 33 και Πίνακας 3).

33. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν ή όχι έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78.

Εικόνα

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 και στην Εικόνα 34α, 1 ιστοτεμάχιο παρουσίαζε οριακή ανοσοθετικότητα για την

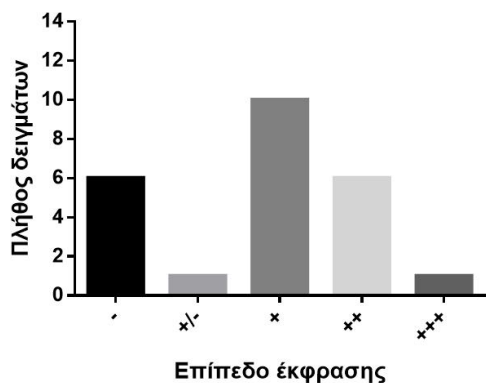
BiP/GRP78, 10 παρουσίαζαν ήπια ανοσοθετικότητα, 6 παρουσίαζαν μέτρια ανοσοθετικότητα και 1 παρουσίαζε έντονη ανοσοθετικότητα. Τα αντίστοιχα ποσοστά τους επί του συνόλου φαίνονται στην Εικόνα 34β. Τα περισσότερα ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (που εξέφραζαν την BiP/GRP78) παρουσίαζαν ήπια ή μέτρια ανοσοθετικότητα.

| Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς Όγκοι | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Αύξων αριθμός δείγματος | Ηλικία ασθενούς (έτη) | Ένταση έκφρασης BiP/GRP78 | Εντόπιση έκφρασης BiP/GRP78 | Ένταση έκφρασης Καλνεξίνης | Εντόπιση έκφρασης Καλνεξίνης |
| 1 | 47 | - | | + | OE |
| 2 | 74 | + | OE | ± | OE |
| 3 | 58 | + | OE | ± | OE |
| 4 | 40 | - | | - | |
| 5 | 65 | ++ | ME | - | |
| 6 | 62 | - | | - | |
| 7 | 60 | - | | - | |
| 8 | 43 | ++ | OE/ME | + | ME |
| 9 | 24 | +++ | ME | + | ME |
| 10 | 33 | ++ | OE/ME | + | ME |
| 11 | 51 | ++ | OE/ME | ++ | OE/ME |
| 12 | 70 | - | | - | |
| 13 | 66 | - | | - | |
| 14 | 44 | + | OE | - | |
| 15 | 40 | ± | OE | ± | OE |
| 16 | 46 | + | OE | - | |
| 17 | 47 | + | OE | + | OE |
| 18 | 8 | ++ | OE/ME | + | OE |
| 19 | 28 | ++ | OE | ++ | OE |
| 20 | 57 | + | OE | ± | OE |
| 21 | 48 | + | OE | - | |
| 22 | 45 | + | ME | - | |
| 23 | 75 | + | OE/ME | - | |
| 24 | 32 | + | OE | - | |

Πίνακας 3. Επίπεδα έκφρασης και εντόπιση της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους. (**OE**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, **ME**: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, **OE/ME**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, (-) : απουσία έκφρασης, (±) : οριακή ανοσοθετικότητα, (+) : ήπια ανοσοθετικότητα, (++) : μέτρια ανοσοθετικότητα, (+++) : έντονη ανοσοθετικότητα.

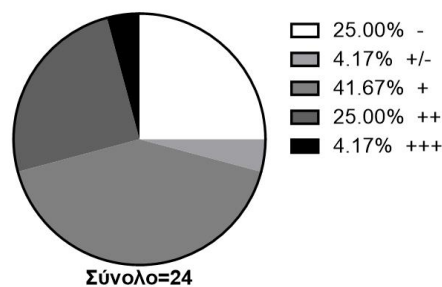
Στο ίδιο σύνολο Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, στα 10 ιστοτεμάχια η BiP/GRP78 εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου, σε 3 ιστοτεμάχια εντοπιζόταν μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, ενώ σε 5 ιστοτεμάχια εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του (Εικόνες 35α και 36). Τα αντίστοιχα ποσοστά τους επί του συνόλου φαίνονται στην Εικόνα 35β (στο 25% των ιστοτεμαχίων δεν παρατηρούνταν ανοσοθετικότητα για την BiP/GRP78).

α Επίπεδα έκφρασης BiP/GRP78 σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



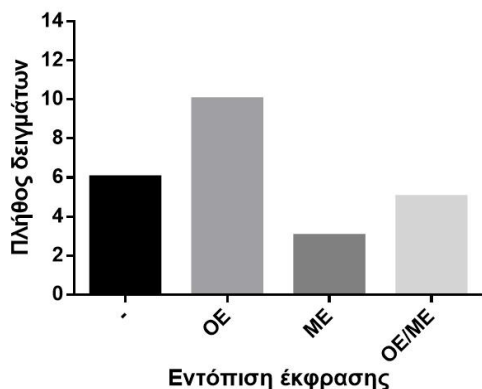
β

Επίπεδα έκφρασης BiP/GRP78 σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



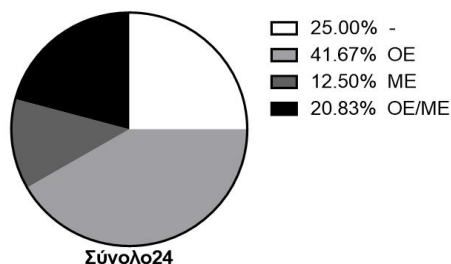
Εικόνα 34. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78. β) Ποσόστωση ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78.

α Εντόπιση έκφρασης BiP/GRP78 σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



β

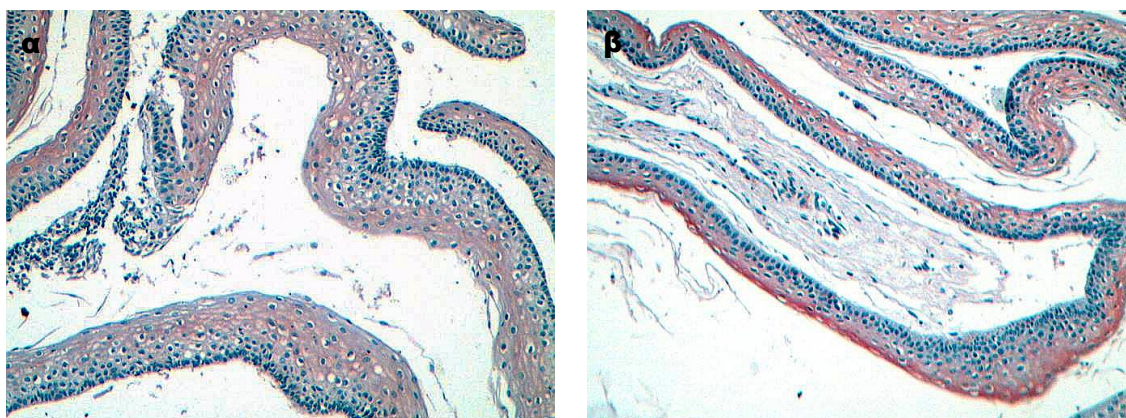
Εντόπιση έκφρασης BiP/GRP78 σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



Εικόνα 35. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της BiP/GRP78 στις στιβάδες του επιθηλίου. β) Ποσόστωση ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της

BiP/GRP78 στις στιβάδες του επιθηλίου (**OE**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, **ME**: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, **OE/ME**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου).

Με την εξαίρεση 3 ιστοτεμαχίων (12,5% επί του συνόλου) τα οποία παρουσίαζαν ήπια, μέτρια ή έντονη ανοσοθετικότητα για την BiP/GRP78 και ταυτόχρονα η έκφρασή της εντοπιζόταν κυρίως στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 36α**, η ανοσοθετικότητα των υπολοίπων ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου (62,5% επί του συνόλου), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 36β**.

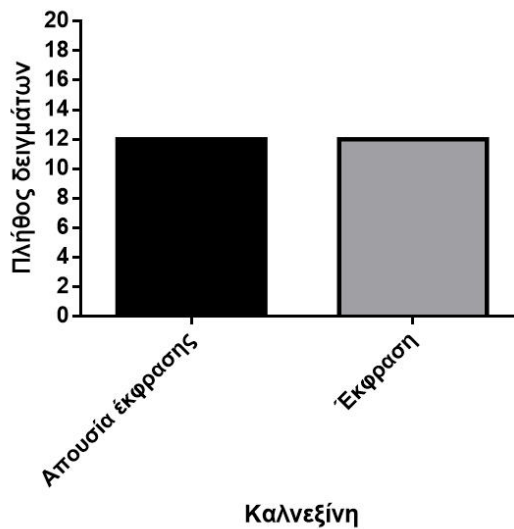


Εικόνα 36. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78 σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους. α) Το καφετί χρώμα (DAB-περιγραφή στα Υλικά και Μεθόδους) υποδεικνύει τη χρώση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου ή β) σε όλο το πάχος του επιθηλίου με μεγαλύτερη όμως ένταση στις ανώτερες στιβάδες. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ασθενής χρώση με αιματοξυλίνη μετά την ανοσοσήμανση (πραγματική μεγέθυνση x20).

Όσον αφορά την Καλνεξίνη, στο ίδιο σύνολο των 24 ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων ασθενών ηλικίας 8 έως 75 ετών, τα 12 δείγματα παρουσίαζαν έκφραση της Καλνεξίνης ενώ 12 όχι (50% ανοσοθετικότητα) (**Εικόνα 37 και Πίνακας 3**).

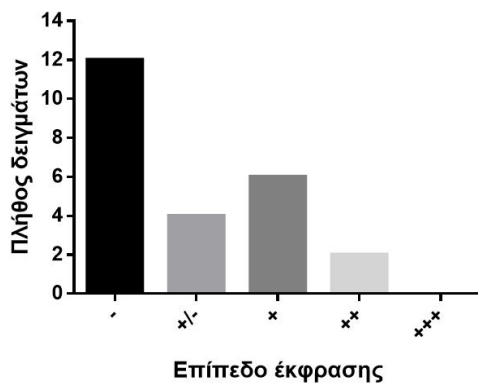
Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 3** και στην **Εικόνα 38α**, 4 ιστοτεμάχια παρουσίαζαν οριακή ανοσοθετικότητα για την Καλνεξίνη, 6 παρουσίαζαν ήπια ανοσοθετικότητα, 2 παρουσίαζαν μέτρια ανοσοθετικότητα ενώ κανένα δεν παρουσίαζε έντονη ανοσοθετικότητα. Τα αντίστοιχα ποσοστά τους επί του συνόλου φαίνονται στην **Εικόνα 38β**. Τα περισσότερα ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (που εξέφραζαν την Καλνεξίνη) παρουσίαζαν οριακή ή ήπια ανοσοθετικότητα.

Κερατινοκυστικοί Οδοντογενείς όγκοι



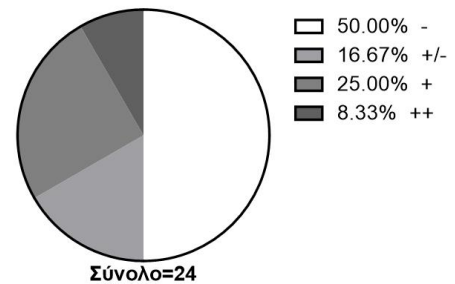
Εικόνα 37. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν ή όχι, έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης.

α Επίπεδα έκφρασης Καλνεξίνης σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



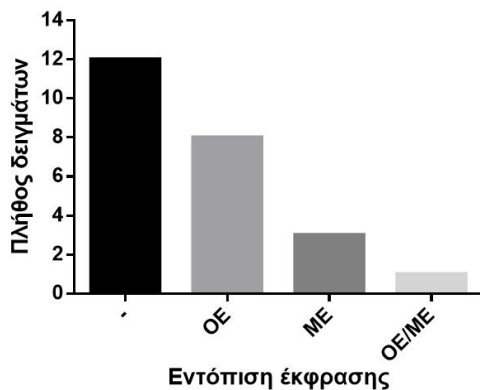
β

Επίπεδα έκφρασης Καλνεξίνης σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



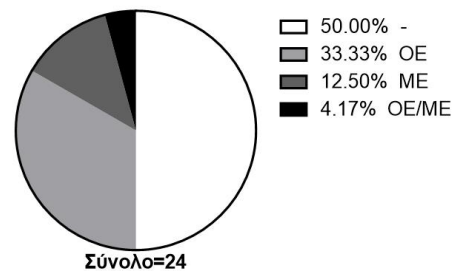
Εικόνα 38. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης καλνεξίνης. **β)** Ποσόστωση ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης.

α Εντόπιση έκφρασης καλνεξίνης
σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



β

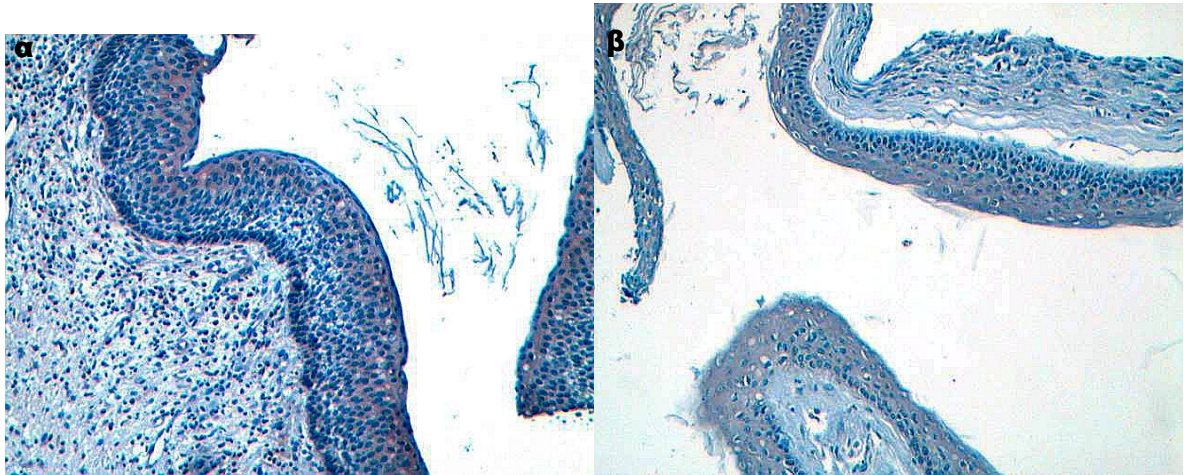
Εντόπιση έκφρασης καλνεξίνης
σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους



Εικόνα 39. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της Καλνεξίνης στις στιβάδες του επιθηλίου. β) Ποσόστωση ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της Καλνεξίνης στις στιβάδες του επιθηλίου (**OE**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, **ME**: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, **OE/ME**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου).

Στο ίδιο σύνολο Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, στα 8 ιστοτεμάχια η Καλνεξίνη εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου, σε 3 ιστοτεμάχια εντοπιζόταν μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, ενώ σε 1 ιστοτεμάχιο εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του (Εικόνες 39α και β). Τα αντίστοιχα ποσοστά τους επί του συνόλου φαίνονται στην **Εικόνα 39β** (στο 50% των ιστοτεμαχίων δεν παρατηρούνταν ανοσοθετικότητα για την Καλνεξίνη).

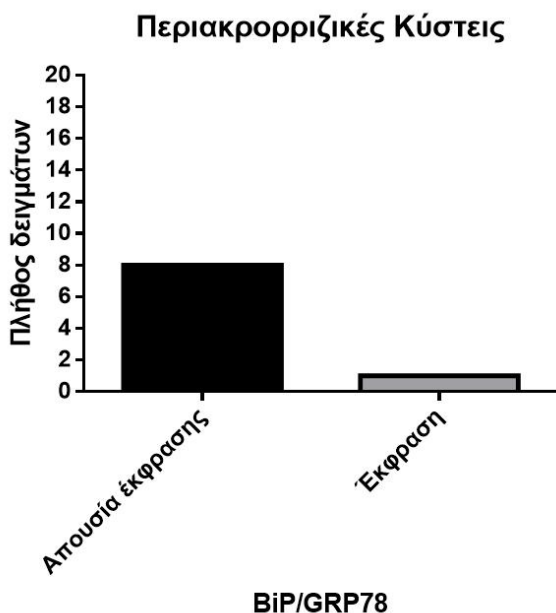
Με την εξαίρεση 3 ιστοτεμαχίων τα οποία παρουσίαζαν ήπια ανοσοθετικότητα για την Καλνεξίνη και ταυτόχρονα η έκφρασή της εντοπιζόταν κυρίως στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 39α**, η ανοσοθετικότητα των υπολοίπων ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (37,5% επί του συνόλου) εντοπιζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 39β**.



Εικόνα 40. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης σε Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους. **α)** Το καφετί χρώμα (DAB-περιγραφή στα Υλικά και Μεθόδους) υποδεικνύει τη χρώση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου ή **β)** σε όλο το πάχος του επιθηλίου με μεγαλύτερη όμως ένταση στις ανώτερες στιβάδες. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ασθενής χρώση με αιματοξυλίνη μετά την ανοσοσθήμανση (πραγματική μεγέθυνση x20).

B.2.2 Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Περιακρορριζικές Κύστεις

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται περιγραφικά τα επίπεδα έκφρασης (βάσει της 5βάθμιας κλίμακας που ορίσαμε) και το χωρικό πρότυπο έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών

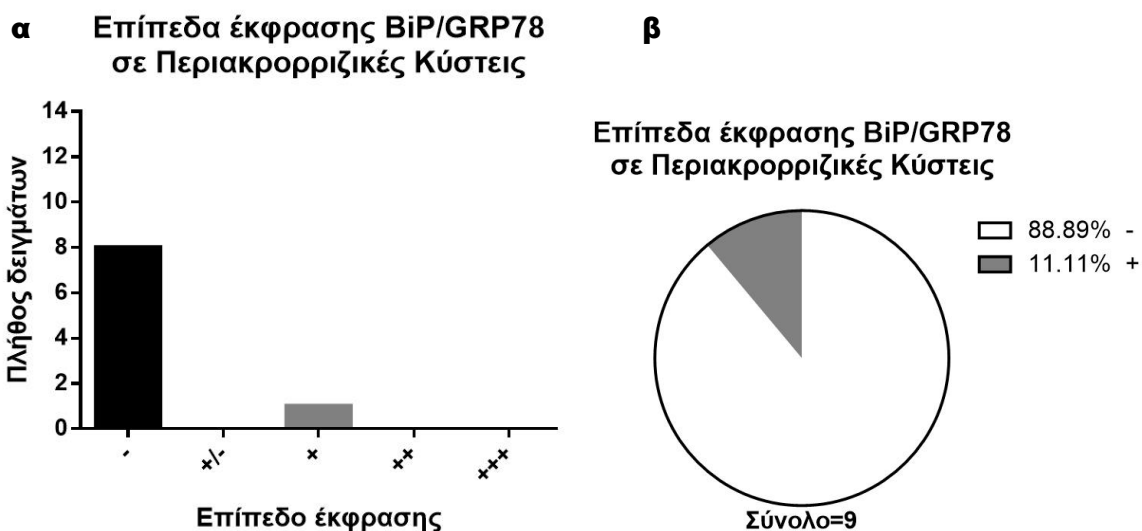


Εικόνα 40. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν ή όχι, έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78.

BiP/GRP78 και Καλνεξίνης στα ιστοτεμάχια Περιακρορριζικών Κύστεων που μελετήθηκαν. Σε σύνολο 9 ιστοτεμαχίων από ασθενείς ηλικίας 30 έως 57 ετών, 1 δείγμα παρουσίαζε έκφραση της BiP/GRP78 ενώ 8 όχι (88,9% ανοσοαρνητικότητα) (**Εικόνα 40 και Πίνακας 4**).

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 4** και στην **Εικόνα 41α**, αυτό το ιστοτεμάχιο παρουσίαζε ήπια ανοσοθετικότητα για την

BiP/GRP78. Το αντίστοιχο ποσοστό του επί του συνόλου φαίνονται στην **Εικόνα 41β**. Στο ιστοτεμάχιο αυτό, η BiP/GRP78 εκφραζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου (**Εικόνα 42α**). Το αντίστοιχο ποσοστό του επί του συνόλου φαίνονται στην **Εικόνα 42β**.

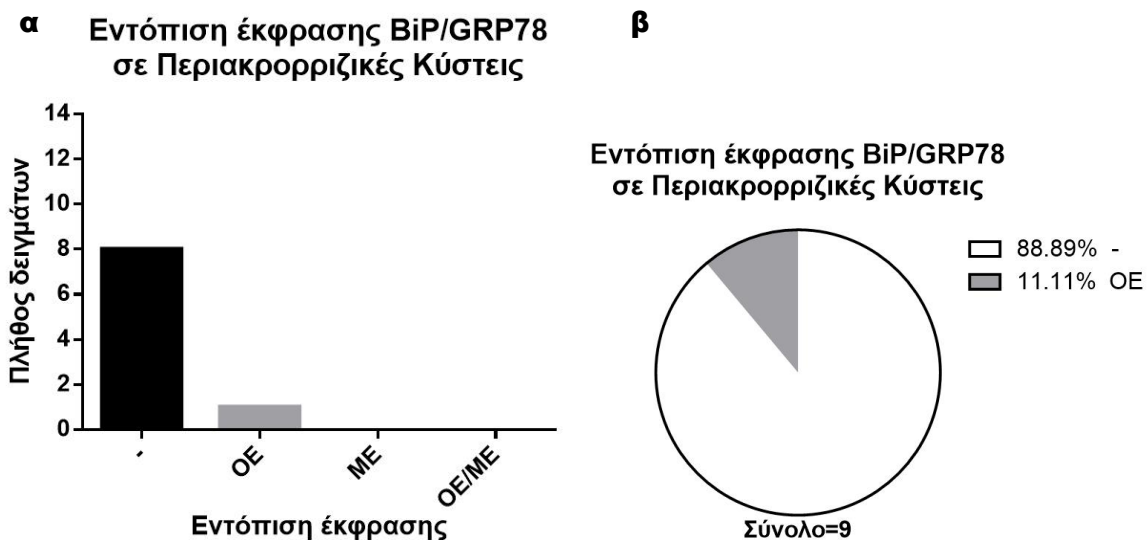


Εικόνα 41. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78. β) Ποσοστωση ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78.

| Περιακρορριζικές Κύστεις | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Αριθμός δειγματος | Ηλικία ασθενούς (έτη) | Ένταση έκφρασης BiP/GRP78 | Εντόπιση έκφρασης BiP/GRP78 | Ένταση έκφρασης καλνεξίνης | Εντόπιση έκφρασης καλνεξίνης |
| 1 | 57 | + | OE | ± | OE |
| 2 | 45 | - | | - | |
| 3 | 32 | - | | - | |
| 4 | 30 | - | | - | |
| 5 | 53 | - | | - | |
| 6 | 40 | - | | - | |
| 7 | 52 | - | | - | |
| 8 | 40 | - | | - | |
| 9 | 45 | - | | - | |

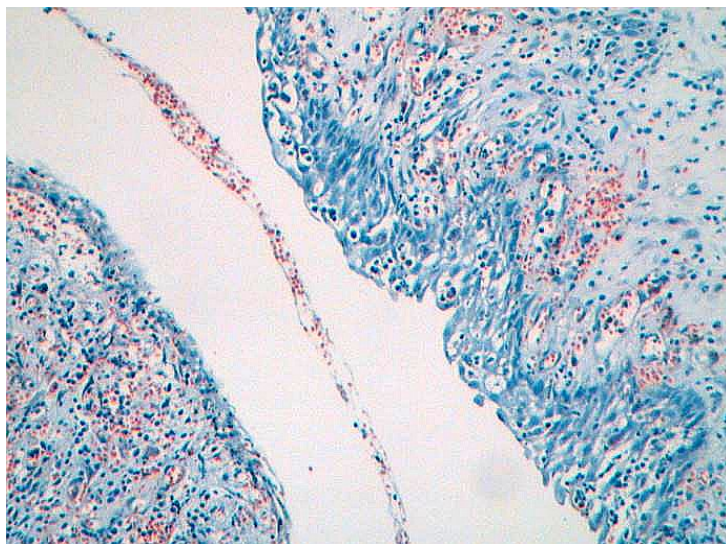
Πίνακας 4. Επίπεδα έκφρασης και εντόπιση της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Περιακρορριζικές Κύστεις. (OE: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, ME: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, OE/ME: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις

ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, (-) : απουσία έκφρασης, (\pm) : οριακή ανοσοθετικότητα, (+) : ήπια ανοσοθετικότητα, (++) : μέτρια ανοσοθετικότητα, (+++) : έντονη ανοσοθετικότητα.

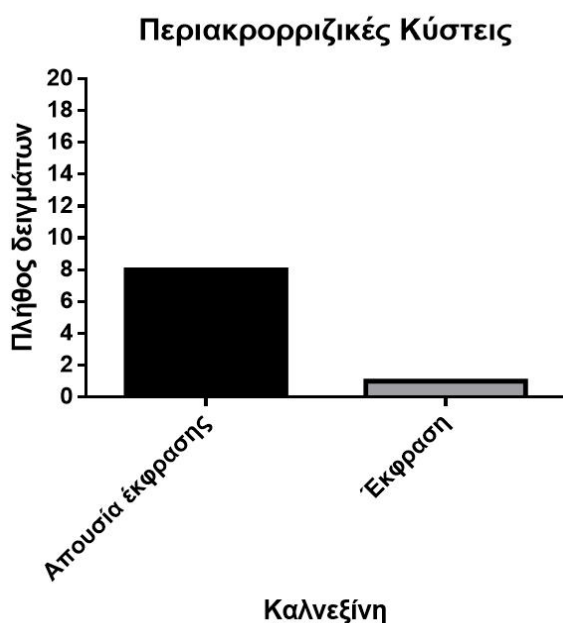


Εικόνα 42. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της BiP/GRP78 στις στιβάδες του επιθηλίου. β) Ποσόστωση ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της BiP/GRP78 στις στιβάδες του επιθηλίου (**OE**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, **ME**: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, **OE/ME**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου).

Στην **Εικόνα 43** παρουσιάζεται ιστοτεμάχιο Περιακρορριζικής Κύστης που παρουσιάζει ανοσοαρνητικότητα για την BiP/GRP78 στις στιβάδες του επιθηλίου του.



Εικόνα 43. Απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης BiP/GRP78 στο επιθήλιο Περιακρορριζικής Κύστης. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ασθενής χρώση με αιματοξυλίνη μετά την ανοσοσήμευση (πραγματική μεγέθυνση x20).

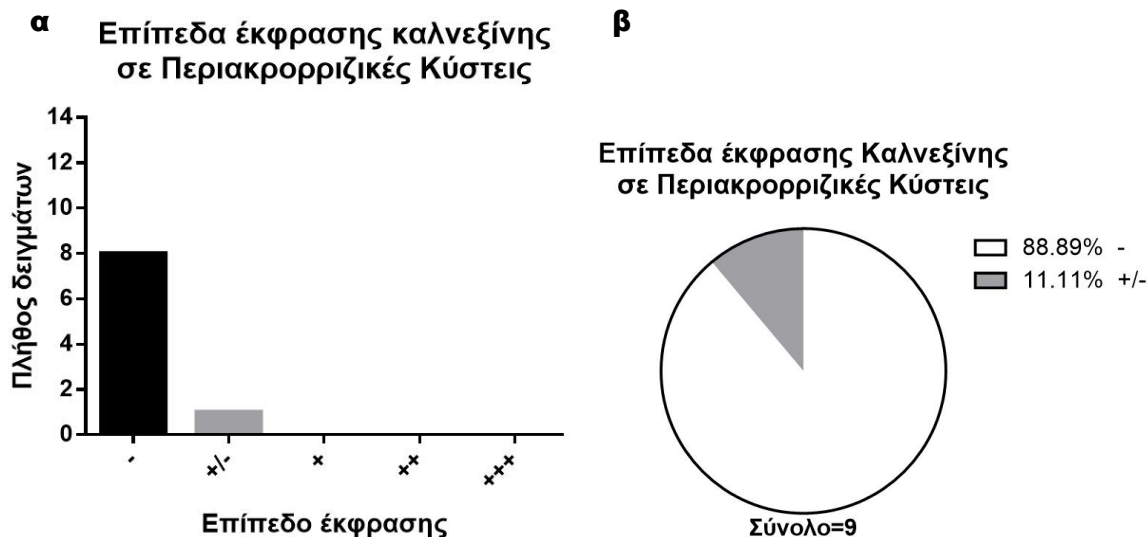


Όσον αφορά την Καλνεξίνη, στο ίδιο σύνολο των 9 δειγμάτων Περιακρορριζικών Κύστεων ασθενών ηλικίας 30 έως 57 ετών, 1 δείγμα παρουσίαζε έκφραση της Καλνεξίνης ενώ 8 όχι (88,9% ανοσοαρνητικότητα) (**Εικόνα 44 και Πίνακας 4**).

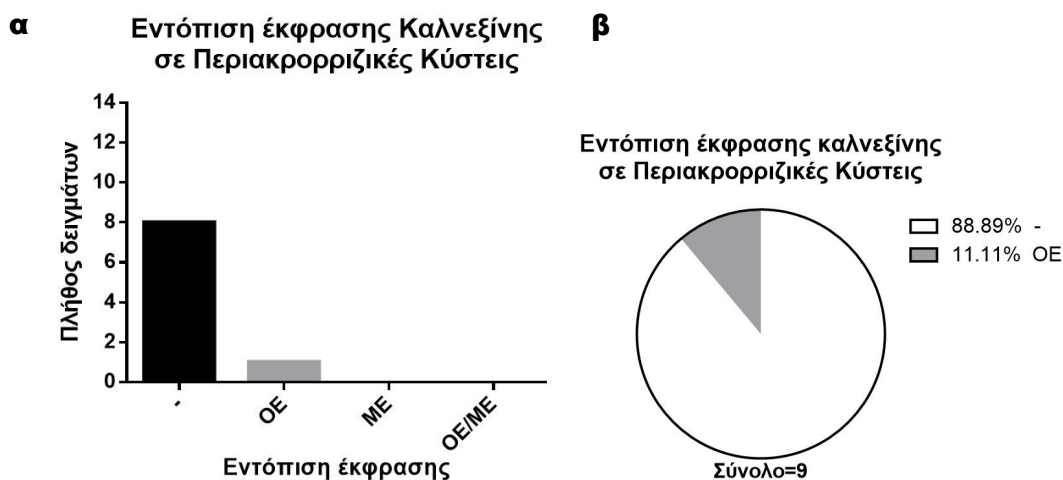
Εικόνα 44. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν ή όχι, έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης.

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 4** και στην **Εικόνα 45a**, αυτό το ιστοτεμάχιο παρουσίαζε οριακή ανοσοθετικότητα για την Καλνεξίνη. Το αντίστοιχο ποσοστό του επί του συνόλου φαίνονται στην

Εικόνα 45β. Στο ιστοτεμάχιο αυτό, η Καλνεξίνη εκφραζόταν σε όλο το πάχος του επιθηλίου (Εικόνα 46α). Το αντίστοιχο ποσοστό του επί του συνόλου φαίνονται στην **Εικόνα 46β**.



Εικόνα 45. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης καλνεξίνης. β) Ποσοστ看ση ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων που παρουσίαζαν οριακή (+/-), ήπια (+), μέτρια (++) , έντονη (+++) ή όχι (-) έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης.

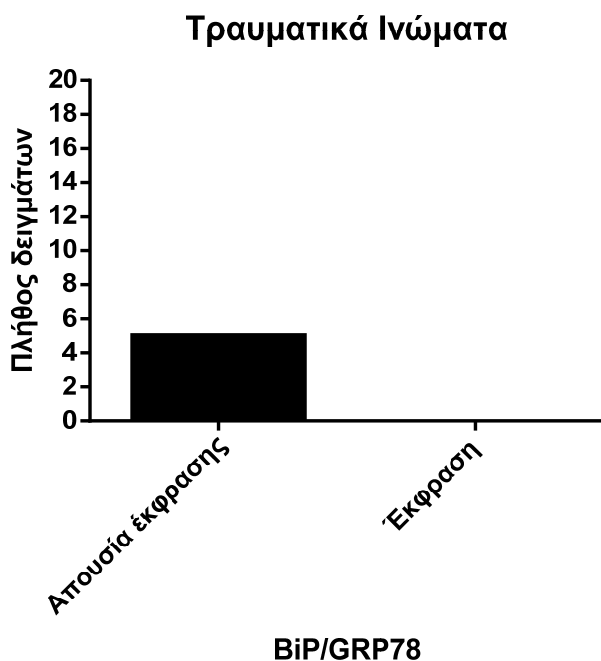


Εικόνα 46. α) Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Περιακρορριζικών Κύστεων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της Καλνεξίνης στις στιβάδες του επιθηλίου. β) Ποσοστ看ση ιστοτεμαχίων

Περιοριστικών Κύσεων ανάλογα με την εντόπιση της έκφρασης της Καλνεξίνης στις στιβάδες του επιθηλίου (**OE**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, **ME**: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, **OE/ME**: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου).

B.2.3 Μελέτη της έκφρασης της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Τραυματικά Ινώματα

Στον Πίνακα 3 αναφέρονται περιγραφικά τα επίπεδα έκφρασης (βάσει της 5βάθμιας



Εικόνα

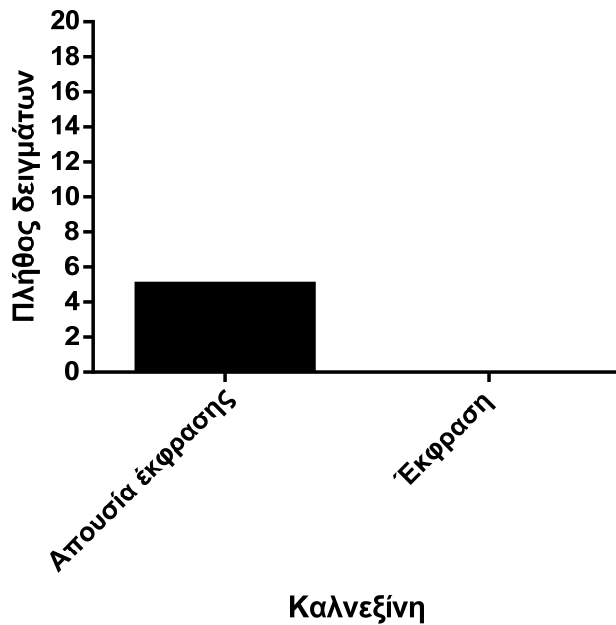
47. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Τραυματικών Ινωμάτων που παρουσίαζαν ή όχι, έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78.

κλίμακας που ορίσαμε) και το χωρικό πρότυπο έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και Καλνεξίνης στα ιστοτεμάχια Ινωμάτων που μελετήθηκαν. Σε σύνολο 5 ιστοτεμαχίων από ασθενείς ηλικίας 10 έως 67 ετών, κανένα δείγμα δεν παρουσίαζε έκφραση της BiP/GRP78 (0% ανοσοθετικότητα) (**Εικόνα 47 και Πίνακας 5**).

Όσον αφορά την Καλνεξίνη, στο ίδιο σύνολο των 5 δειγμάτων Ινωμάτων ασθενών ηλικίας 10 έως 67 ετών, κανένα δείγμα δεν παρουσίαζε έκφραση της Καλνεξίνης (0% ανοσοθετικότητα) (**Εικόνα 48 και Πίνακας 5**).

Στην **Εικόνα 49** παρουσιάζεται ιστοτεμάχιο Ινώματος που παρουσιάζει ανοσοαρνητικότητα για την Καλνεξίνη στις στιβάδες του επιθηλίου του.

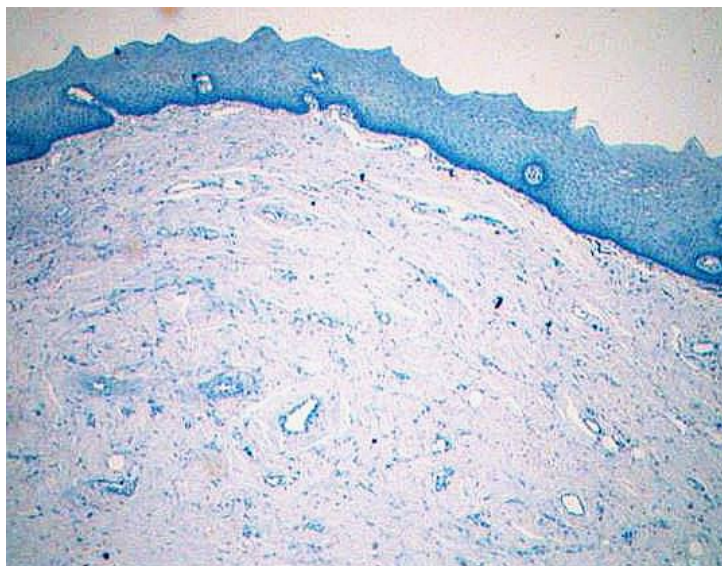
Τραυματικά Ινώματα



Εικόνα 48. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Τραυματικών Ινωμάτων που παρουσίαζαν ή όχι, έκφραση της πρωτεΐνης Καλνεξίνης.

| Τραυματικά Ινώματα | | | | | |
|--------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Αριθμός δείγματος | Ηλικία ασθενούς (έτη) | Ένταση έκφρασης BiP/GRP78 | Εντόπιση έκφρασης BiP/GRP78 | Ένταση έκφρασης καλνεξίνης | Εντόπιση έκφρασης καλνεξίνης |
| 1 | 10 | - | | - | |
| 2 | 56 | - | | - | |
| 3 | 67 | - | | - | |
| 4 | 50 | - | | - | |
| 5 | 34 | - | | - | |

Πίνακας 5. Επίπεδα έκφρασης και εντόπιση της BiP/GRP78 και της Καλνεξίνης σε Τραυματικά Ινώματα. (OE: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου, ME: εντόπιση μόνο στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, OE/ME: εντόπιση σε όλο το πάχος του επιθηλίου αλλά με μεγαλύτερη ένταση στις ανώτερες στιβάδες του επιθηλίου, (-) : απουσία έκφρασης, (±) : οριακή ανοσοθετικότητα, (+) : ήπια ανοσοθετικότητα, (++) : μέτρια ανοσοθετικότητα, (+++) : έντονη ανοσοθετικότητα.

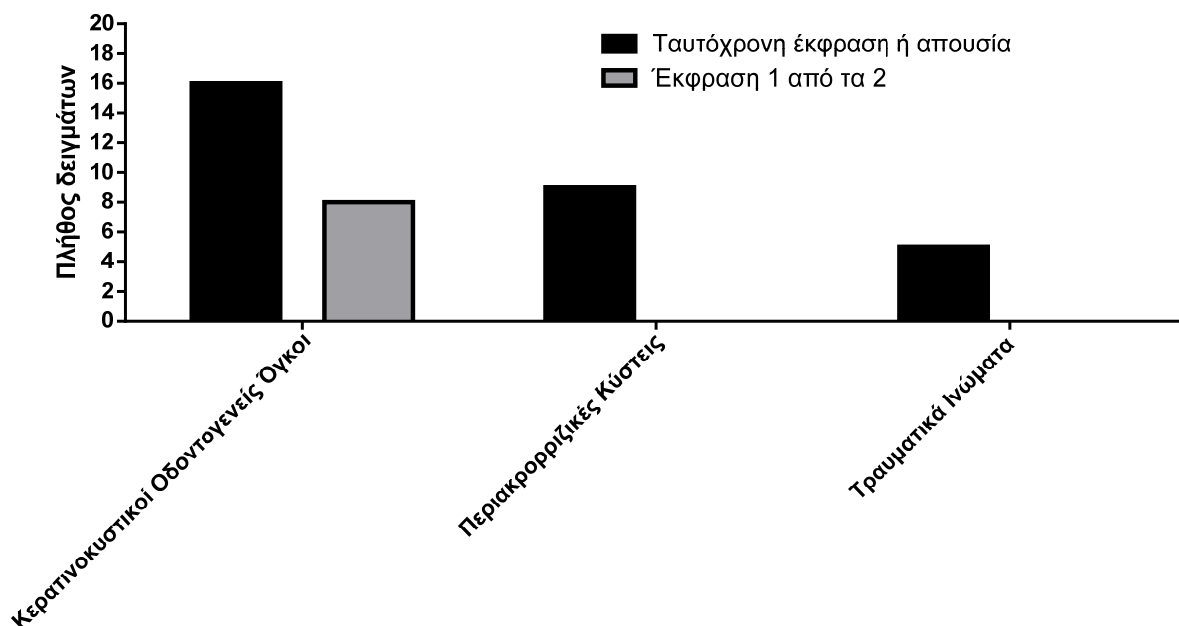


Εικόνα 49. Απουσία ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης Καλνεξίνης στο επιθήλιο Τραυματικού Ινώματος. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ασθενής χρώση με αιματοξυλίνη μετά την ανοσοσήμανση (πραγματική μεγέθυνση x20).

B.2.4 Σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, των Περιακρορριζικών Κύστεων και των Τραυματικών Ινωμάτων

Παρατηρούμε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης BiP/GRP78 (τόσο σε ποσοστό δειγμάτων όσο και σε επίπεδο έκφρασης) στους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους (75% ανοσοθετικότητα, κυρίως ήπια ή μέτρια ανοσοθετικότητα) σε σύγκριση με τις Περιακρορριζικές Κύστεις (11,1% ανοσοθετικότητα, κυρίως ήπια ανοσοθετικότητα) καθώς και σε σχέση με τα Τραυματικά Ινώματα (0% ανοσοθετικότητα). Αυτή η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία χ^2 ($p < 0,001$).

Όσον αφορά την Καλνεξίνη, παρατηρούμε αυξημένη έκφρασή της (τόσο σε ποσοστό δειγμάτων όσο και σε επίπεδο έκφρασης) στους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους (50% ανοσοθετικότητα, κυρίως οριακή ή ήπια ανοσοθετικότητα) σε σύγκριση με τις Περιακρορριζικές Κύστεις (11,1% ανοσοθετικότητα, κυρίως οριακή) καθώς και σε σχέση με τα Ινώματα (0% ανοσοθετικότητα). Αυτή η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική



Εικόνα 50. Κατανομή του αριθμού των ιστοτεμαχίων Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, Περιακρορριζικών Κύστεων και Τραυματικών Ινωμάτων που παρουσίαζαν ταυτόχρονη έκφραση ή απουσία, ή έκφραση μίας εκ των δύο πρωτεϊνών (BiP/GRP78, καλνεξίνης).

χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία χ^2 ($p < 0,001$).

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τόσο η Καλνεξίνη όσο και η BiP/GRP78 είναι δείκτες του στρες ΕΔ μελετήσαμε αν η έκφρασή τους συμπίπτει στα ίδια ιστοτεμάχια. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 50**, σε σύνολο 38 ιστοτεμαχίων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, τα 30 ιστοτεμάχια παρουσίαζαν είτε θετική ή αρνητική ανοσοσήμανση ταυτόχρονα και για τις 2 πρωτεΐνες (16 ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, 9 ιστοτεμάχια Περιακρορριζικών Κύστεων και 5 ιστοτεμάχια Τραυματικών Ινωμάτων) ενώ μόλις 8 παρουσίαζαν έκφραση είτε της BiP/GRP78 ή της Καλνεξίνης, αλλά όχι ταυτόχρονα (8

ιστοτεμάχια Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν την υπόθεσή μας ότι η πρωτεΐνη BiP/GRP78 και η Καλνεξίνη, συνεκφράζονται και οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία χ^2 ($p < 0,001$).

B.2.5 Συζήτηση – συμπεράσματα

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εξέτασε τους πιθανούς μηχανισμούς ανάπτυξης Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, και πιο συγκεκριμένα έθεσε την υπόθεση ότι το στρες ΕΔ και η συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του μηχανισμού UPR μπορεί να συσχετίζεται με την παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των Όγκων Κεφαλής και Τραχήλου από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, επαναπροσδιορίστηκε η φύση της Οδοντογενούς Κερατινοκύστης, και συμπεριελήφθη στους όγκους, με τον όρο «Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος». Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση αυτή, ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος έχει οριστεί ως «καλοήθης, μονόχωρος ή πολύχωρος ενδοστικός όγκος, οδοντογενούς αιτιολογίας με χαρακτηριστικό τοίχωμα από παρακερατινοποιημένο πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο και δυνητικά επιθετική και διηθητική συμπεριφορά». Επιπλέον, «παρουσιάζεται ως μεμονωμένη ή πολλαπλή βλάβη». Η τελευταία μορφή, αποτελεί συνήθως κλινική εκδήλωση του Συνδρόμου Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (ή συνδρόμου Gorlin-Goltz). Επιπρόσθετα, στην ανακοίνωση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, συμπληρώνεται ότι «οι κυστικές αλλοιώσεις των γνάθων που παρουσιάζουν ορθοκερατινοποιημένο επιθήλιο δεν αποτελούν πλέον τμήμα των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων» (Barnes L. 2005).

Για να εξετάσουμε την αρχική μας υπόθεση, χρησιμοποιήσαμε ιστοπαθολογικά δείγματα Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, από ασθενείς της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών τα οποία μελετήθηκαν με την χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων ώστε να παρατηρηθούν τα πρότυπα έκφρασης της Bip/GRP78 και της καλνεξίνης. Τα δύο αυτά μόρια αποτελούν δύο από τις πιο ευρέως μελετημένες πρωτεΐνες – μοριακούς συνοδούς (molecular chaperones) οι οποίες αποτελούν διαγνωστικά εργαλεία για τα κύτταρα τα οποία

βρίσκονται υπό συνθήκες στρες του ΕΔ τους (Lee 2005; Chevet, Smirle et al. 2010; Gupta and Tuteja 2011; Pfaffenbach and Lee 2011).

Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της BiP/GRP78 και της καλνεξίνης στους ιστούς Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων συνεκρίθησαν με ιστούς Περιακρορριζικών Κύστεων και Τραυματικών Ινωμάτων. Οι Περιακρορριζικές Κύστεις αποτελούν αλλοιώσεις με συγκεκριμένα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και ευρέως γνωστό παθογενετικό μηχανισμό (Nair 2004; Robinson 2012; Αγγελόπουλος 2013). Επιπλέον, οι ιστοί των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων συνεκρίθησαν με ιστούς ασθενών που εμφάνισαν Τραυματικό Ίνωμα, μια νοσολογική οντότητα στην οποία τα κύτταρα που επηρεάζονται ως επί το πλείστον είναι αυτά του συνδετικού ιστού και σε λιγότερο βαθμό αυτά του επιθηλίου (Regezi 2003; Esmaili, Lozada-Nur et al. 2005; Αγγελόπουλος 2013).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν έντονη υπερέκφραση των πρωτεϊνών μοριακών συνοδών BiP/GRP78 και καλνεξίνης στους ιστούς των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, όχι όμως στους ιστούς των Περιακρορριζικών Κύστεων και των Τραυματικών Ινωμάτων. Επιπρόσθετα, αυτές οι δύο πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί, ανιχνεύτηκε η ταυτόχρονη έκφρασή τους σε αρκετά δείγματα ιστών, ένα εύρημα το οποίο υποδεικνύει ότι η υπερέκφραση της BiP/GRP78 και της καλνεξίνης δεν ήταν τυχαίο γεγονός, αλλά αρκετά ενδεικτικό της ενεργοποίησης του μηχανισμού στρες ΕΔ και της κινητοποίησης του συστήματος της UPR (Gupta and Tuteja 2011).

Ένα ιδιαίτερο διαγνωστικό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων είναι η παρακερατινοποίηση του επιθηλίου (Barnes L. 2005; Madras and Lapointe 2008; Robinson 2012). Το χαρακτηριστικό αυτό των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων, δηλαδή η ελαττωματική έκφραση της κερατίνης, σχετίζεται με την κινητοποίηση του μηχανισμού στρες του ΕΔ. Σύμφωνα με τις μελέτες των Sugiura και των Suzuki και συν., ο μηχανισμός διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων είναι ικανός να

παράξει στρες ΕΔ και να ενεργοποιήσει το μηχανισμό της UPR (Suzuki, Endo et al. 2009; Sugiura 2013). Σύμφωνα με αυτές τις δύο μελέτες, παραμένει ασαφές εάν οι μηχανισμοί αυτοί κινητοποιούνται λόγω της έκτοπης υπερέκφρασης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, όπως είναι η κερατίνη, ή σχετίζεται με τη διατάραξη της ομοιόστασης εξαιτίας της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαφοροποίησης. Ωστόσο, σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης μας, ούτε οι Περιακρορριζικές Κύστεις ούτε τα Τραυματικά Ινώματα επιδεικνύουν στοιχεία ύπαρξης στρες του ΕΔ στο εσωτερικό των κυττάρων τους. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι το στρες ΕΔ συνδέεται με την παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Βασιζόμενες σε αυτή την παρατήρηση, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στο δέρμα, στο οποίο η κερατινοποίηση αποτελεί μία ορθή και φυσιολογική διαδικασία, πρωτεΐνες – μοριακοί συνοδοί σχετιζόμενες με το στρες ΕΔ, όπως η BiP/GRP78 και η HRD1, βρέθηκαν σε υψηλά επίπεδα σε κύτταρα ανθρώπινης επιδερμίδας τα οποία περιέχουν κερατινοκύτταρα υπό διαφοροποίηση (Sugiura 2013). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η διαδικασία της κερατινοποίησης είτε ως φυσιολογικός μηχανισμός (όπως στο δέρμα) είτε ως ανώμαλη διαδικασία (όπως στους Κερατινοκυστικούς Οδοντογενείς Όγκους) είναι συνδεδεμένη με την κινητοποίηση του μηχανισμού του στρες του ΕΔ. Επιπρόσθετα, στην ίδια μελέτη, απεδείχθη η φαρμακολογική παρέμβαση στο μηχανισμό της UPR, επηρεάζει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων σε *in vitro* συνθήκες, εύρημα το οποίο ενισχύει τη συσχέτιση μεταξύ στρες ΕΔ και διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων (Sugiura 2013).

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μελετών που προαναφέρθηκαν και υποστηρίζουν ότι το στρες ΕΔ επάγεται στο οδοντογενές επιθήλιο όταν τα κύτταρα έχουν δεσμευθεί στο πρόγραμμα διαφοροποίησής τους σε κερατινοκύτταρα, κατά την ανάπτυξη των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται επίσης από την παρατήρηση ότι κυρίως η BiP/GRP78 και σε μικρότερο βαθμό η Καλνεξίνη παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα, η οποία ήταν πιο έντονη στις ανώτερες επιθηλιακές στιβάδες στις οποίες η παρακερατινοποίηση είναι περισσότερο έκδηλη. Μελέτες οι οποίες θα συγκρίνουν την

εμπλοκή του στρες ΕΔ σε φυσιολογικούς παρακερατινοποιημένους ιστούς, υπερπλαστικές και προκαρκινικές/δυσπλαστικές βλάβες του στοματικού επιθηλίου, θα προσέθεταν πολύτιμες πληροφορίες στην διελεύκανση της πιθανής εμπλοκής της BiP/GRP78 ή της Καλνεξίνης στο μηχανισμό παρακερατινοποίησης. Στην πραγματικότητα, πληθώρα ασθενειών σχετίζονται με ανώμαλη κερατινοποίηση όπως οι κληρονομικές υπερκερατώσεις, όπως η νόσος του Darier, η συγγενής ιχθύαση, το σύνδρομο υπερκεράτωσης παλαμών και πελμάτων, οι ερυθροκερατοδερμίες και η θυλακική ιχθύαση με ατριχία και σύνδρομο φωτοφοβίας. Οι νοσολογικές αυτές οντότητες έχουν συνδεθεί με την ενεργοποίηση του μηχανισμού της UPR (Sugiura 2013).

Θα μπορούσε να τεθεί ως στοιχείο διαφωνίας ότι η παρακερατινοποίηση και συνεπώς η επαγωγή του στρες ΕΔ δεν σχετίζονται με το ογκογενετικό ερέθισμα το οποίο οδηγεί στην δημιουργία των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν ότι η κερατινοποίηση αποτελεί ένδειξη ανώμαλης κυτταρικής διαφοροποίησης και λαμβάνοντας υπόψιν ότι η ανάπτυξη νεοπλασιών είναι διαδικασία που σχετίζεται με την ανώμαλη κυτταρική διαφοροποίηση, καταλήγουμε στην άποψη ότι το στρες του ΕΔ έχει αιτιολογική σχέση με την ανάπτυξη νόσου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν στοιχεία σχετικά με την παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Όμως, η εντόπιση των συγκεκριμένων μονοπατιών της UPR που ενεργοποιούνται κατά τη δημιουργία των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων και η επίδραση της καταστολής τους στην διαδικασία της κερατινοποίησης και στην επιβράδυνση της ανάπτυξης των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων αποτελούν πεδία προς περαιτέρω ερευνητική μελέτη. Επιπλέον, θα ήταν ιδιαίτερος ενδιαφέρον να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση δεικτών της μεταβατικής περιοχής επιθηλίου – μεσεγχύματος στην παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων και η πιθανή σύνδεσή τους με το στρες του ΕΔ.

Σύμφωνα με μελέτες των Mendes και συν., και των Guo και συν., μεταλλάξεις στο γονίδιο PTCH1 συνδέονται με την ανάπτυξη Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (Mendes, Carvalho et al. 2010; Guo, Zhang et al. 2013). Επίσης, επειδή το προϊόν του γονιδίου PTCH1 αποτελεί εκκρινόμενο μόριο, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος του στο στρες ΕΔ (Mendes, Carvalho et al. 2010; Guo, Zhang et al. 2013).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή στην κλινική πράξη σε δύο κύριες κατευθύνσεις. Η ανίχνευση του στρες ΕΔ και η ενεργοποίηση του μηχανισμού της UPR, μπορεί να έχουν διαγνωστική αξία στην ακριβή διάγνωση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων όπως σε περιπτώσεις όπου είναι δύσκολη η διάγνωσή τους λόγω παρουσίας έντονης φλεγμονής (διήθηση του επιθηλίου από φλεγμονώδη κύτταρα που καθιστούν τη διαφορική διάγνωση δύσκολη). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το στρες ΕΔ επηρεάζει την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η αναστολή της UPR μπορεί να έχει υποστηρικτικό θεραπευτικό ρόλο στην αντιμετώπιση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (ιδιαίτερα των επιθετικών και υποτροπιάζόντων, όπου η χειρουργική θεραπεία αποτελεί σήμερα τη θεραπεία εκλογής) (Yildirim, Ataoglu et al. 2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν την πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Η κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού με βάση τον οποίο το στρες του ΕΔ σχετίζεται με την ανάπτυξη των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων δύναται να βρει εφαρμογή στη διάγνωση καθώς και στη θεραπεία αυτής της νοσολογικής οντότητας.

Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη του προτύπου έκφρασης των σχετιζόμενων με το στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (ΕΔ) συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και Καλνεξίνης σε Κερατινοκυτταρικούς Οδοντογενείς Όγκους

Εισαγωγή: Ο σχηματισμός των κύστεων στις γνάθους έχει μοναδικά χαρακτηριστικά σε σχέση με την παθολογία τους καθώς εμπλέκονται στη δημιουργία τους οι μηχανισμοί της φυσιολογικής οδοντογένεσης. Στα περισσότερα συστήματα ταξινόμησης οι οδοντογενείς κύστεις χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) τις αναπτυξιακές και β) τις φλεγμονώδεις. Οι οδοντογενείς κερατινοκύστεις και οι περιακρορριζικές κύστεις απαντώνται σε μεγάλη συχνότητα.

Η οδοντογενής κερατινοκύστη είναι γνωστή για τον ταχύ ρυθμό αύξησης που παρουσιάζει, και την τάση της να εισβάλλει στους γειτονικούς ιστούς περιλαμβανομένου και του οστίτη ιστού. Ο όρος «κερατινοκύστη» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Philipsen το 1956 για να ορίσει κάθε οδοντογενής κύστη που παρουσιάζει κερατινοποίηση του επενδυτικού της επιθηλίου, ενώ πρώτη φορά τα χαρακτηριστικά της περιγράφησαν από τον Shear το 1960.

Ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας (WHO), στην ιστολογική κατάταξη των οδοντογενών όγκων που συνέταξε το 2005, αναθεώρησε τις οδοντογενείς κερατινοκύστεις ως κερατινοκυτταρικούς οδοντογενείς όγκο. Αναλυτικότερα, ορίστηκαν ως καλοήθεις μόνο- ή πολυ- κυστικοί ενδοοστικοί όγκοι οδοντογενούς προελεύσεως, με χαρακτηριστική επιφάνεια παρακερατινοποιημένου πολύστιβου πλακώδους επιθηλίου το οποίο διατηρεί το δυναμικό επιθετικής και διηθητικής συμπεριφοράς, όρος ο οποίος αντικατοπτρίζει καλύτερα την νεοπλασματική φύση αυτών των οντοτήτων.

Ο Κερατινοκυστικός Οδοντογενής Όγκος παρουσιάζεται ως ξεχωριστή οντότητα κυστικής εξεργασίας λόγω: α) αυξημένης τάσης για υποτροπή, β) αυξημένης επιθετικότητάς της όσον αφορά την εξάπλωση και τη διήθηση των γύρω ιστών, γ) της συνύπαρξής της σε ορισμένες περιπτώσεις με το Σύνδρομο των Πολλαπλών Σπιλοειδών Βασικοκυτταρικών Καρκινωμάτων (σύνδρομο Gorlin-Goltz) και δ) της πιθανής νεοπλασματικής εξαλλαγής της. Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) αποτελεί ένα οργανίδιο με μείζονα ρόλο στη σύνθεση των λιπιδίων και πρωτεϊνών και καθοδηγεί πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως α) οργανογένεση, β) μεταγραφική δραστηριότητα, γ) αποκρίσεις στο στρες, δ) απόπτωση. Το ΕΔ είναι υπεύθυνο για τη σωστή αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, διαδικασία η οποία υποβοηθάται από διάφορες συνοδές πρωτεΐνες του ΕΔ. Όταν η ποσότητα των μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών υπερβαίνει το όριο ικανότητας αναδίπλωσής του ΕΔ, τα ανθρώπινα κύτταρα ενεργοποιούν έναν ομοιοστατικό μηχανισμό άμυνας ο οποίος ονομάζεται απόκριση του ΕΔ στην παρουσία μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR). Ανάμεσα στις διάφορες επιπτώσεις της UPR συγκαταλέγεται και η απορρύθμιση της έκφρασης της συνοδού πρωτεΐνης BiP/GRP78 καθώς και άλλων συνοδών πρωτεϊνών οι οποίες θεωρούνται διαγνωστικά στοιχεία για την επαγωγή του στρες ΕΔ σε ένα ιστό.

Η καλνεξίνη και η καλρετικουλίνη είναι επίσης συνοδές πρωτεΐνες του ΕΔ με κύριο ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται ορθά, απελευθερώνεται από το ένζυμο και μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi. Εάν όμως δεν ακολουθήσει ορθή αναδίπλωση της πρωτεΐνης, ένζυμα τροποποιούν την πρωτεΐνη μέσω γλυκοζυλίωσης και την επιστρέφουν στην καλνεξίνη και την καλρετικουλίνη.

Σκοπός: Λαμβάνοντας υπόψιν τη νεοπλασματική φύση των κερατινοκυστικών οδοντογενών όγκων σε συνδυασμό με την ασαφή αιτιολογία τους, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εάν το στρες του ΕΔ εμπλέκεται στην παθογένεσή τους. Πιο ειδικά, σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να αξιολογηθεί η έκφραση των συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και

καλνεξίνης σε ιστολογικά δείγματα κερατινοκυστικών οδοντογενών όγκων (ΚΟΟ) χρησιμοποιώντας ως δείγματα ελέγχου, ιστολογικά δείγματα περιακρορριζικών κύστεων (ΠΑΚ) και τραυματικών ινωμάτων (ΤΙ). Οι δύο αυτές συνοδές πρωτεΐνες θεωρούνται αξιόπιστοι δείκτες της επαγωγή του στρες ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων.

Υλικά και Μέθοδοι: Ιστολογικά δείγματα εγκιβωτισμένα σε παραφίνη που προέρχονται από κερατινοκυστικούς οδοντογενείς όγκους, περιακρορριζικές κύστες και τραυματικά ινώματα επιλέχθηκαν από τα αρχεία ασθενών του Τμήματος Στοματολογίας (Οδοντιατρική σχολή ΕΚΠΑ), περιόδου 2006-2013, βάσει των επαρκών κλινικών στοιχείων, της αντιπροσωπευτικής ιστολογικής εικόνας και του επαρκούς υλικού για τις τομές.. Οι ασθενείς έχουν δώσει έγγραφη συγκατάθεση λαμβάνοντας γνώση πως το αρχειακό υλικό (φωτογραφικό, ακτινογραφικό, βιολογικό), που προέκυψε κατά τη διάρκεια της εξέτασης και θεραπείας τους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ερευνητικούς σκοπούς, χωρίς να αναφέρονται τα στοιχεία τους, κατά την αρχική τους εξέταση στην Κλινική της Διαγνωστικής και Ακτινολογίας Στόματος, της Οδοντιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν με χρήση μεθόδων ανοσοϊστοχημείας. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το anti-BiP μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (C50B12), συγκεντρώσεως 1:100 της εταιρείας Cell Signaling Technology (USA) και το anti-calnexin μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικίου (sc-46669), συγκεντρώσεως 1:75 της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology (USA). Για τον ανοσοχρωματισμό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Superpicture Polymer (Dab) Kit της εταιρείας Novocastra ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, πριν την αξιολόγησή τους, στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης για την παρατήρησή τους. Στα δείγματα αυτά αναλύθηκε η πιθανή έκφραση των συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και καλνεξίνης και το πρότυπο έκφρασής τους.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε στενή συσχέτιση μεταξύ και των δύο συνοδών πρωτεϊνών BiP/GRP78 και καλνεξίνης και της έκφρασης των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων (ΚΟΟ): 18 από τους 24 (75%) ΚΟΟ εξέφραζαν την BiP/GRP78, σε αντίθεση με 1 από τις 9 (13%) ΠΑΚ και κανένα από τα 5 δείγματα ΤΙ ($P < 0.001$, χ^2 –test). Η Καλνεξίνη εκφράστηκε σε 11 από τους 24 (46%) ΚΟΟ, σε μόνο 1 από τις 9 (13%) ΠΑΚ και σε κανένα από τα 5 δείγματα ΤΙ ($P < 0.001$, χ^2 –test).

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν την πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή του στρες του ΕΔ στην παθογένεση των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων. Η κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού με βάση τον οποίο το στρες του ΕΔ σχετίζεται με την ανάπτυξη των Κερατινοκυστικών Οδοντογενών Όγκων δύναται να βρει εφαρμογή στη διάγνωση καθώς και στη θεραπεία αυτής της νοσολογικής οντότητας.

SUMMARY

Study of the expression of the Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Chaperones, BiP/GRP78 and Calnexin in Keratocystic Odontogenic Tumours

Introduction: The formation of jaw cysts has unique characteristics in relation to their pathology as mechanisms of odontogenesis are associated with their formation. Odontogenic cysts are divided into two categories: a) developmental and b) inflammatory. Odontogenic keratocysts and radicular cysts are detected clinically quite frequently.

Odontogenic keratocysts are characterized by a high rate of growth and tendency to invade in to adjacent anatomical structures. The term “keratocyst” was first introduced by Philipsen in 1956 in order to define every odontogenic cyst that shows keratinization of the epithelium. The particular characteristics of keratocysts were then described by Shear in 1960.

The World Health Organization (WHO) reclassified OKC in its 2005 edition of histological classification of odontogenic tumours and according to this reclassification, the OKC is now considered as a KCOT. It is defined as “a benign uni- or multicystic, intraosseous tumour of odontogenic origin, with a characteristic lining of parakeratinized stratified squamous epithelium that bears the potential for aggressive, infiltrative behaviour”, a term that better reflects its neoplastic nature. Several factors form the basis of this decision: a) the clinical behaviour of the lesion, since KCOT is locally destructive and highly recurrent, b) the histopathologic characteristics, considering that the basal layer of the KCOT budding into connective tissue, in addition to the mitotic figures that are frequently found in the suprabasal layers, and finally c) genetic alterations (nevroid basal cell carcinoma syndrome “NBCCS” or Gorlin-Goltz), are the most important parameters.

The endoplasmic reticulum (ER) is an organelle with a major role in the synthesis of lipid and proteins and leads many cellular processes such as organogenesis, transcriptional activity, stress responses, and apoptosis. ER is responsible for the proper folding of the newly synthesized proteins that is facilitated with the assistance of various ER chaperones. When the amount of unfolded protein exceeds the folding capacity of the ER, human cells activate a homeostatic defense mechanism designated as the UPR that follows ER stress. Among the various consequences of UPR is also the upregulation of BiP/GRP78 and of other chaperones that is considered diagnostic for the induction of ER stress in a given tissue.

Calnexin and calreticulin are ER chaperones specifically involved in the folding of glycoproteins. If the protein is folded properly, it is released from the enzyme and transported to the Golgi apparatus. If it is not folded appropriately, UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase attaches one glucose residue and returns it to calnexin and calreticulin.

Aim: Considering the neoplastic nature of KCOTs, in combination with their poorly defined aetiology we explored if ER stress is involved in disease development. Specifically, we evaluated the expression of the chaperones, BiP/GRP78 and calnexin in a panel of KCOTs as compared to PACs and TFs. Both of these markers are considered to accurately reflect the induction of ER stress which has been associated with neoplastic development.

Materials and Methods: Paraffin-embedded tissue specimens of KCOTs, PACs and Traumatic Fibroma (TFs) were selected from the archives of the Department of Oral Pathology, of the National and Kapodistrian University of Athens, Dental School spanning the years 2006 - 2011 and were analyzed by immunohistochemistry. The selection of the tissue specimens was based on the sufficiency of clinical characteristics, the relevance of the histopathologic characteristics and the abundance of tissue specimen for immunochemistry. The tissue specimens were obtained from patients that attended the Department of Oral

Pathology, of the National and Kapodistrian University of Athens, Dental School, and had given full informed consent.

Immunohistochemistry was carried out in formalin fixed, paraffin embedded tissue specimens. The antibodies used were monoclonal rabbit anti-BiP (C50B12), by Cell Signaling Technology; 1:100 and monoclonal mouse anti-calnexin (sc-46669), by Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:75. Immunostaining was performed by using the Superpicture Polymer (Dab) Kit (Novocastra), following the manufacturer's instructions. Before evaluation, a weak counterstaining with hematoxylin was performed in all immunostained specimens. Before evaluation, a weak counterstaining with hematoxylin was performed in all immunostained specimens. The samples were examined for the potential expression of BiP/GRP78 and calnexin.

Results: Analysis revealed a strong association between both BiP/GRP78 and calnexin expression and KCOTs: 18 out of 24 (75%) KCOTs expressed BiP/GRP78 as opposed to 1 out of 9 (13%) PACs and none of 5 TFs evaluated ($P < 0.001$, χ^2 -test). Calnexin was expressed in 11 out of 24 KCOTs (46%) but only one out of 9 (13%) PACs and none of the 5 TFs analysed ($P < 0.001$, χ^2 -test).

Conclusions: Study results entail that induction of endoplasmic reticulum stress maybe of diagnostic value in keratocystic odontogenic tumours characterisation. Additionally, recent findings suggesting that endoplasmic reticulum stress plays a causative role in keratinisation of epithelia. Therefore, pharmacological interference with the execution of the unfolded protein response should be considered for the management of keratocystic odontogenic tumours.

Δ. Βιβλιογραφία

- Agaram, N. P., B. M. Collins, et al. (2004). "Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic." Arch Pathol Lab Med **128**(3): 313-317.
- Akinyamoju, A. O., S. O. Gbadebo, et al. (2014). "Periapical lesions of the jaws: a review of 104 cases in ibadan." Ann Ib Postgrad Med **12**(2): 115-119.
- Alberts, B., Johnson, A, Lewis, J, Morgan, D, Raff, M, Roberts, K, Walter, P, (2014). *Molecular biology of the cell*, Garland Science: 669-691.
- Allen, J. R., L. X. Nguyen, et al. (2004). "High ER stress in beta-cells stimulates intracellular degradation of misfolded insulin." Biochem Biophys Res Commun **324**(1): 166-170.
- August, M., W. C. Faquin, et al. (2003). "Dedifferentiation of odontogenic keratocyst epithelium after cyst decompression." J Oral Maxillofac Surg **61**(6): 678-683; discussion 683-674.
- Auluck, A. and K. M. Pai (2006). "Treatment of recurrent odontogenic keratocyst: a known but forgotten point." Br J Oral Maxillofac Surg **44**(1): 74-75.
- Babburi, S., A. R. Rudraraju, et al. (2015). "Rushton bodies: an update." J Clin Diagn Res **9**(2): ZE01-03.
- Barker DS, L. R. (1967). "Localised fibrous overgrowths of the oral mucosa." British Journal of Oral Surgery **5**(2): 86-92.
- Barlocco, J. C. and A. J. Poladian (1979). "[A diagnostic technic for cysts and granulomas]." Rev Circ Argent Odontol **42**(1-2): 21-24.
- Barnes L., E. J., Sidranski D., (2005). World Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, IARC Press.
- Barreto, D. C., R. S. Gomez, et al. (2000). "PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts." J Dent Res **79**(6): 1418-1422.
- Beconsall-Ryan, K., D. Tong, et al. (2010). "Radiolucent inflammatory jaw lesions: a twenty-year analysis." Int Endod J **43**(10): 859-865.
- Bedard, K., E. Szabo, et al. (2005). "Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57." Int Rev Cytol **245**: 91-121.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(6): 326-332.
- Bhaskar, S. N. (1972). "Nonsurgical resolution of radicular cysts." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **34**(3): 458-468.
- Birke, W. P., H. J. Koch, et al. (1979). "[Malignant degeneration of a residual radicular cyst]." Stomatol DDR **29**(5): 382-384.
- Blanas, N., B. Freund, et al. (2000). "Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **90**(5): 553-558.
- Blond-Elguindi, S., A. M. Fourie, et al. (1993). "Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers." J Biol Chem **268**(17): 12730-12735.
- Bouquot, J. E. and K. K. Gundlach (1986). "Oral exophytic lesions in 23,616 white Americans over 35 years of age." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **62**(3): 284-291.
- Brannon, R. B. (1976). "The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part I. Clinical features." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **42**(1): 54-72.
- Brannon, R. B. (1977). "The odontogenic keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **43**(2): 233-255.
- Brondum, N. and V. J. Jensen (1991). "Recurrence of keratocysts and decompression treatment. A long-term follow-up of forty-four cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **72**(3): 265-269.
- Browne, R. M. (1970). "The odontogenic keratocyst. Clinical aspects." Br Dent J **128**(5): 225-231.
- Browne, R. M. and N. G. Gough (1972). "Malignant change in the epithelium lining odontogenic cysts." Cancer **29**(5): 1199-1207.
- Calfon, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**(6867): 92-96.

- Caliskan, M. K. (2004). "Prognosis of large cyst-like periapical lesions following nonsurgical root canal treatment: a clinical review." Int Endod J **37**(6): 408-416.
- Cawson, R., Odell, EW (2008). Cysts of the jaws. Oral pathology and oral medicine: 124-129.
- Chakrabarti, A., A. W. Chen, et al. (2011). "A review of the mammalian unfolded protein response." Biotechnol Bioeng **108**(12): 2777-2793.
- Chen, J. L., A. J. Morgan, et al. (2010). "Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum of NY-ESO-1-specific T cells is modulated by the affinity of TCR and by the use of the CD8 coreceptor." J Immunol **184**(4): 1829-1839.
- Chen, X., A. Karnovsky, et al. (2010). "Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies." Proteomics **10**(22): 4040-4052.
- Chen, X., J. Shen, et al. (2002). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." J Biol Chem **277**(15): 13045-13052.
- Chen, Y. and F. Brandizzi (2013). "IRE1: ER stress sensor and cell fate executor." Trends Cell Biol **23**(11): 547-555.
- Chevet, E., J. Smirle, et al. (2010). "Calnexin phosphorylation: linking cytoplasmic signalling to endoplasmic reticulum luminal functions." Semin Cell Dev Biol **21**(5): 486-490.
- Chirapathomsakul, D., P. Sastravaha, et al. (2006). "A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **101**(1): 5-9; discussion 10.
- Chung, K. T., Y. Shen, et al. (2002). "BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP." J Biol Chem **277**(49): 47557-47563.
- Contreras, J. L., C. A. Smyth, et al. (2003). "Coupling endoplasmic reticulum stress to cell death program in isolated human pancreatic islets: effects of gene transfer of Bcl-2." Transpl Int **16**(7): 537-542.
- Coons, A. H. and M. H. Kaplan (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." J Exp Med **91**(1): 1-13.
- Cotti, E., G. Campisi, et al. (2003). "Ultrasound real-time imaging in the differential diagnosis of periapical lesions." Int Endod J **36**(8): 556-563.
- Crowley, T. E., G. E. Kaugars, et al. (1992). "Odontogenic keratocysts: a clinical and histologic comparison of the parakeratin and orthokeratin variants." J Oral Maxillofac Surg **50**(1): 22-26.
- Danin, J., L. E. Linder, et al. (1999). "Outcomes of periradicular surgery in cases with apical pathosis and untreated canals." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **87**(2): 227-232.
- Dayer, J. M., B. de Rochemonteix, et al. (1986). "Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells." J Clin Invest **77**(2): 645-648.
- de Paula, A. M., J. N. Carvalhais, et al. (2000). "Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation." J Oral Pathol Med **29**(10): 477-482.
- Dicks, N., K. Gutierrez, et al. (2015). "Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer." Front Oncol **5**: 11.
- Dill, K. A. and D. Shortle (1991). "Denatured states of proteins." Annu Rev Biochem **60**: 795-825.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-191.
- Elyaman, W., F. Terro, et al. (2002). "BAD and Bcl-2 regulation are early events linking neuronal endoplasmic reticulum stress to mitochondria-mediated apoptosis." Brain Res Mol Brain Res **109**(1-2): 233-238.
- Eryilmaz, T., S. Ozmen, et al. (2009). "Odontogenic keratocyst: an unusual location and review of the literature." Ann Plast Surg **62**(2): 210-212.
- Esmeili, T., F. Lozada-Nur, et al. (2005). "Common benign oral soft tissue masses." Dent Clin North Am **49**(1): 223-240, x.
- Falaki, F., Z. Delavarian, et al. (2009). "Squamous cell carcinoma arising from an odontogenic keratocyst: a case report." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **14**(4): E171-174.

- Fritz, J. M., M. Dong, et al. (2014). "Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects." *Mol Biol Cell* **25**(4): 431-440.
- Gardner, B. M., D. Pincus, et al. (2013). "Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(3): a013169.
- Gaut, J. R. and L. M. Hendershot (1993). "The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum." *Curr Opin Cell Biol* **5**(4): 589-595.
- Gbadebo, S. O., A. O. Akinyamoju, et al. (2014). "Periapical Pathology: Comparison of Clinical Diagnosis and Histopathological Findings." *J West Afr Coll Surg* **4**(3): 74-88.
- Gething, M. J. (1999). "Role and regulation of the ER chaperone BiP." *Semin Cell Dev Biol* **10**(5): 465-472.
- Giardino, L., E. Savoldi, et al. (2004). "Russell bodies in dental pulp of permanent human teeth." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**(6): 760-764.
- Giuliani, M., G. B. Grossi, et al. (2006). "Conservative management of a large odontogenic keratocyst: report of a case and review of the literature." *J Oral Maxillofac Surg* **64**(2): 308-316.
- Gonzalez-Alva, P., A. Tanaka, et al. (2008). "Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases." *J Oral Sci* **50**(2): 205-212.
- Gosau, M., F. G. Draenert, et al. (2010). "Two modifications in the treatment of keratocystic odontogenic tumors (KCOT) and the use of Carnoy's solution (CS)--a retrospective study lasting between 2 and 10 years." *Clin Oral Investig* **14**(1): 27-34.
- Gundappa, M., S. Y. Ng, et al. (2006). "Comparison of ultrasound, digital and conventional radiography in differentiating periapical lesions." *Dentomaxillofac Radiol* **35**(5): 326-333.
- Guo, Y. Y., J. Y. Zhang, et al. (2013). "PTCH1 gene mutations in Keratocystic odontogenic tumors: a study of 43 Chinese patients and a systematic review." *PLoS One* **8**(10): e77305.
- Gupta, D. and N. Tuteja (2011). "Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants." *Plant Signal Behav* **6**(2): 232-236.
- Hampton, R. Y. (2002). "ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation." *Curr Opin Cell Biol* **14**(4): 476-482.
- Hardcastle, Z., C. C. Hui, et al. (1999). "The Shh signalling pathway in early tooth development." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**(5): 567-578.
- Harding, H. P. and D. Ron (2002). "Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S455-461.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response." *Mol Cell* **5**(5): 897-904.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature* **397**(6716): 271-274.
- Haring, J. I. and M. L. Van Dis (1988). "Odontogenic keratocysts: a clinical, radiographic, and histopathologic study." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **66**(1): 145-153.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* **10**(11): 3787-3799.
- Helenius, A., Trombetta, E.S, Hebert, D.N, Simons, J.F, (1997). "Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins." *Trends Cell Biol* **7**(5): 193-200.
- Hetz, C., P. Bernasconi, et al. (2006). "Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha." *Science* **312**(5773): 572-576.
- Hetz, C. and L. H. Glimcher (2009). "Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome." *Mol Cell* **35**(5): 551-561.
- Hetz, C., F. Martinon, et al. (2011). "The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha." *Physiol Rev* **91**(4): 1219-1243.
- Hirshberg, A., S. Sherman, et al. (1999). "Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy." *J Oral Pathol Med* **28**(9): 410-412.
- Hoozemans, J. J., R. Veerhuis, et al. (2005). "The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **110**(2): 165-172.

- Hyun, H. K., S. D. Hong, et al. (2009). "Recurrent keratocystic odontogenic tumor in the mandible: a case report and literature review." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **108**(2): e7-10.
- Iwawaki, T., A. Hosoda, et al. (2001). "Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress." Nat Cell Biol **3**(2): 158-164.
- Jacob, S. (2010). "Rushton bodies or hyaline bodies in radicular cysts: a morphologic curiosity." Indian J Pathol Microbiol **53**(4): 846-847.
- Janssens, S., B. Pulendran, et al. (2014). "Emerging functions of the unfolded protein response in immunity." Nat Immunol **15**(10): 910-919.
- Johnson, N. R., O. M. Gannon, et al. (2014). "Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review." J Investig Clin Dent **5**(1): 9-14.
- Johnson, S., M. Michalak, et al. (2001). "The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space." Trends Cell Biol **11**(3): 122-129.
- Kadeh, H., S. Saravani, et al. (2015). "Reactive hyperplastic lesions of the oral cavity." Iran J Otorhinolaryngol **27**(79): 137-144.
- Kaufman, R. J., S. H. Back, et al. (2010). "The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in beta-cells." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 99-107.
- Khoury, G. A., R. C. Baliban, et al. (2011). "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database." Sci Rep **1**.
- Kierszenbaum, A., Tres, L (2012). Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, Elsevier Saunders: 67-69.
- Killey, H., Kay, LW, sir Robert Bradlaw (1977). Benign cystic lesions of the jaws, Edinburgh and London.
- Kim, S. and S. Kratchman (2006). "Modern endodontic surgery concepts and practice: a review." J Endod **32**(7): 601-623.
- Knudson, A. G. (1993). "Antioncogenes and human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10914-10921.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Koivisto, T., W. R. Bowles, et al. (2012). "Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases." J Endod **38**(6): 729-732.
- Kovac-Kovacic, M. and U. Skaleric (2000). "The prevalence of oral mucosal lesions in a population in Ljubljana, Slovenia." J Oral Pathol Med **29**(7): 331-335.
- Kramer, I., Pindborg, JJ, Shear, M., (1992). Histological typing of odontogenic tumours. Berlin, Springer: 10-42.
- Kubota, Y., S. Oka, et al. (2002). "Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts." J Dent Res **81**(1): 23-27.
- Kumamoto, H. (2006). "Molecular pathology of odontogenic tumors." J Oral Pathol Med **35**(2): 65-74.
- Kun-Darbois, J. D., A. Pare, et al. (2015). "In situ squamous cell carcinoma arising in a mandibular radicular cyst." Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis **132**(5): 305-306.
- Kuroyanagi, N., H. Sakuma, et al. (2009). "Prognostic factors for keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation." J Oral Pathol Med **38**(4): 386-392.
- Lader, C. S. and A. M. Flanagan (1998). "Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro." Endocrinology **139**(7): 3157-3164.
- Lee, A. S. (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." Trends Biochem Sci **26**(8): 504-510.
- Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." Methods **35**(4): 373-381.
- Lee, A. S. and L. M. Hendershot (2006). "ER stress and cancer." Cancer Biol Ther **5**(7): 721-722.
- Lench, N. J., A. S. High, et al. (1996). "Investigation of chromosome 9q22.3-q31 DNA marker loss in odontogenic keratocysts." Eur J Cancer B Oral Oncol **32B**(3): 202-206.

- Levanat, S., R. J. Gorlin, et al. (1996). "A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome." *Nat Genet* **12**(1): 85-87.
- Li, J. and A. S. Lee (2006). "Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer." *Curr Mol Med* **6**(1): 45-54.
- Lia, R. C., J. M. Garcia, et al. (2004). "Clinical, radiographic and histological evaluation of chronic periapical inflammatory lesions." *J Appl Oral Sci* **12**(2): 117-120.
- Lievremont, J. P., R. Rizzuto, et al. (1997). "BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺." *J Biol Chem* **272**(49): 30873-30879.
- Lin, J. H., P. Walter, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis." *Annu Rev Pathol* **3**: 399-425.
- Lin, L. M., G. T. Huang, et al. (2007). "Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing." *J Endod* **33**(8): 908-916.
- Lindholm, D., H. Wootz, et al. (2006). "ER stress and neurodegenerative diseases." *Cell Death Differ* **13**(3): 385-392.
- Liu, C. Y., M. Schroder, et al. (2000). "Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **275**(32): 24881-24885.
- Lo Muzio, L., S. Staibano, et al. (1999). "Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome." *J Dent Res* **78**(7): 1345-1353.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "ER chaperone functions during normal and stress conditions." *J Chem Neuroanat* **28**(1-2): 51-65.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?" *Nat Rev Cancer* **4**(12): 966-977.
- Maas-Szabowski, N., A. Shimotoyodome, et al. (1999). "Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism." *J Cell Sci* **112** (Pt 12): 1843-1853.
- MacDonald-Jankowski, D. S. (2011). "Keratocystic odontogenic tumour: systematic review." *Dentomaxillofac Radiol* **40**(1): 1-23.
- Macdonald-Jankowski, D. S. and T. K. Li (2010). "Keratocystic odontogenic tumour in a Hong Kong community: the clinical and radiological features." *Dentomaxillofac Radiol* **39**(3): 167-175.
- Madras, J. and H. Lapointe (2008). "Keratocystic odontogenic tumour: reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour." *J Can Dent Assoc* **74**(2): 165-165h.
- Makowski, G. J., S. McGuff, et al. (2001). "Squamous cell carcinoma in a maxillary odontogenic keratocyst." *J Oral Maxillofac Surg* **59**(1): 76-80.
- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, et al. (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." *Genes Dev* **18**(24): 3066-3077.
- Marker, P., N. Brondum, et al. (1996). "Treatment of large odontogenic keratocysts by decompression and later cystectomy: a long-term follow-up and a histologic study of 23 cases." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **82**(2): 122-131.
- Martin, J. and F. U. Hartl (1993). "Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way." *Structure* **1**(3): 161-164.
- Marton, I. J. and C. Kiss (2000). "Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis." *Oral Microbiol Immunol* **15**(3): 139-150.
- Mattoo, R. U. and P. Goloubinoff (2014). "Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins." *Cell Mol Life Sci* **71**(17): 3311-3325.
- McCullough, K. D., J. L. Martindale, et al. (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." *Mol Cell Biol* **21**(4): 1249-1259.
- McGinnis, J. P., Jr. (1987). "Review of the clinical and histopathologic features of four exophytic gingival lesions--the pyogenic granuloma, irritation fibroma, peripheral giant cell granuloma, and peripheral ossifying fibroma." *J Okla Dent Assoc* **77**(3): 25-30.
- Meghji, S., B. Henderson, et al. (1992). "Interleukin-1: the principal osteolytic cytokine produced by keratocysts." *Arch Oral Biol* **37**(11): 935-943.

- Meghji, S., W. Qureshi, et al. (1996). "The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts." Arch Oral Biol **41**(6): 523-531.
- Mendes, R. A., J. F. Carvalho, et al. (2010). "Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - an overview." Oral Oncol **46**(1): 19-24.
- Mendes, R. A., J. F. Carvalho, et al. (2010). "Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features." Oral Oncol **46**(4): 219-225.
- Merulla, J., E. Fasana, et al. (2013). "Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery." Traffic **14**(7): 767-777.
- Mesaeli, N., K. Nakamura, et al. (1999). "Calreticulin is essential for cardiac development." J Cell Biol **144**(5): 857-868.
- Mihailidou, C., A. G. Papavassiliou, et al. (2014). "A crosstalk between p21 and UPR-induced transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) linked to type 2 diabetes." Biochimie **99**: 19-27.
- Molinari, M. and A. Helenius (1999). "Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells." Nature **402**(6757): 90-93.
- Morgan, T. A., C. C. Burton, et al. (2005). "A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst." J Oral Maxillofac Surg **63**(5): 635-639.
- Morse, D. R., J. W. Patnik, et al. (1973). "Electrophoretic differentiation of radicular cysts and granulomas." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **35**(2): 249-264.
- Morse, D. R., G. R. Schacterle, et al. (1976). "A rapid chairside differentiation of radicular cysts and granulomas." J Endod **2**(1): 17-20.
- Myoung, H., S. P. Hong, et al. (2001). "Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **91**(3): 328-333.
- Nagaraju, K., L. Casciola-Rosen, et al. (2005). "Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction." Arthritis Rheum **52**(6): 1824-1835.
- Nair, P. N. (1997). "Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response." Periodontol 2000 **13**: 121-148.
- Nair, P. N. (2004). "Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures." Crit Rev Oral Biol Med **15**(6): 348-381.
- Natkin, E., R. J. Oswald, et al. (1984). "The relationship of lesion size to diagnosis, incidence, and treatment of periapical cysts and granulomas." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **57**(1): 82-94.
- Ni, M. and A. S. Lee (2007). "ER chaperones in mammalian development and human diseases." FEBS Lett **581**(19): 3641-3651.
- Nicholas, M. W. and K. Nelson (2013). "North, south, or east? Blotting techniques." J Invest Dermatol **133**(7): e10.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, et al. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." Genes Dev **16**(11): 1345-1355.
- Oda, D., V. Rivera, et al. (2000). "Odontogenic keratocyst: the northwestern USA experience." J Contemp Dent Pract **1**(2): 60-74.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." Science **306**(5695): 457-461.
- Park, M. K., R. B. Lomax, et al. (2001). "Local uncaging of caged Ca(2+) reveals distribution of Ca(2+)-activated Cl(-) channels in pancreatic acinar cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10948-10953.
- Parmar, R. M., R. B. Brannon, et al. (2011). "Squamous odontogenic tumor-like proliferations in radicular cysts: a clinicopathologic study of forty-two cases." J Endod **37**(5): 623-626.

- Parodi, A. J. (2000). "Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation." *Biochem J* **348 Pt 1**: 1-13.
- Pfaffenbach, K. T. and A. S. Lee (2011). "The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress." *Curr Opin Cell Biol* **23**(2): 150-156.
- Philipsen HP (1956). "Om keratocyster (kolesteatom) i kaeberne." *Tandlaege bladet* **60**: 963-981.
- Piattelli, A., M. Fioroni, et al. (1998). "Differentiation of odontogenic keratocysts from other odontogenic cysts by the expression of bcl-2 immunoreactivity." *Oral Oncol* **34**(5): 404-407.
- Pogrel, M. A. (1993). "The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions." *J Oral Maxillofac Surg* **51**(3): 269-273; discussion 274.
- Pogrel, M. A. (2005). "Treatment of keratocysts: the case for decompression and marsupialization." *J Oral Maxillofac Surg* **63**(11): 1667-1673.
- Pogrel, M. A. and R. C. Jordan (2004). "Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst." *J Oral Maxillofac Surg* **62**(6): 651-655; discussion 655-656.
- Purcell, A. W., A. Todd, et al. (2003). "Association of stress proteins with autoantigens: a possible mechanism for triggering autoimmunity?" *Clin Exp Immunol* **132**(2): 193-200.
- Quinlan, R. A. and R. J. Ellis (2013). "Chaperones: needed for both the good times and the bad times." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**(1617): 20130091.
- Ramachandran Nair, P. N., G. Pajarola, et al. (1996). "Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**(1): 93-102.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." *J Biol Chem* **276**(36): 33869-33874.
- Regezi, J., Sciubba, J., Jordan, RC, Abrahams, PH, (2003). *Oral pathology: clinical pathologic correlations*. St Louis (MO), W.B Saunders.
- Robinson, R., Vincent, SD (2012). *Tumors and Cysts of the Jaws*. AFIP Atlas of Tumor Pathology. M. A. R. o. Pathology, Silver Spring: 64-68.
- Rocas, I. N., J. F. Siqueira, Jr., et al. (2004). "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**(6): 741-749.
- Rocas, I. N., J. F. Siqueira, Jr., et al. (2004). "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases." *J Endod* **30**(5): 315-320.
- Ron, D. and R. Y. Hampton (2004). "Membrane biogenesis and the unfolded protein response." *J Cell Biol* **167**(1): 23-25.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 519-529.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* **14**(1): 20-28.
- Ryu, E. J., H. P. Harding, et al. (2002). "Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease." *J Neurosci* **22**(24): 10690-10698.
- Saatchi, M. (2007). "Healing of large periapical lesion: a non-surgical endodontic treatment approach." *Aust Endod J* **33**(3): 136-140.
- Sano, R. and J. C. Reed (2013). "ER stress-induced cell death mechanisms." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3460-3470.
- Santarosa, M. and A. Ashworth (2004). "Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way." *Biochim Biophys Acta* **1654**(2): 105-122.
- Santos, L. C., D. S. Vilas Boas, et al. (2011). "Histopathological study of radicular cysts diagnosed in a Brazilian population." *Braz Dent J* **22**(6): 449-454.
- Schacht, V. and J. S. Kern (2015). "Basics of immunohistochemistry." *J Invest Dermatol* **135**(3): e30.
- Scheer, M., A. M. Koch, et al. (2004). "Primary intraosseous carcinoma of the jaws arising from an odontogenic cyst--a case report." *J Craniomaxillofac Surg* **32**(3): 166-169.
- Schmidt, B. L. and M. A. Pogrel (2001). "The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts." *J Oral Maxillofac Surg* **59**(7): 720-725; discussion 726-727.

- Schmidt, B. L. and M. A. Pogrel (2004). "Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy." J Oral Maxillofac Surg **62**(10): 1183-1187.
- Schrag, J. D., J. J. Bergeron, et al. (2001). "The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding." Mol Cell **8**(3): 633-644.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res **569**(1-2): 29-63.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." Science **300**(5616): 135-139.
- Sharif, F., R. Oliver, et al. (2010). "Interventions for the treatment of keratocystic odontogenic tumours (KCOT, odontogenic keratocysts (OKC))." Cochrane Database Syst Rev(9): CD008464.
- Sharpe, P. T. (2001). "Neural crest and tooth morphogenesis." Adv Dent Res **15**: 4-7.
- Shen, J., X. Chen, et al. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell **3**(1): 99-111.
- Shen, J., E. L. Snapp, et al. (2005). "Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response." Mol Cell Biol **25**(3): 921-932.
- Shiromany, A., Sood, R., Akifuddin, S., Sidhu, GK, Khan, N., Singla, K., (2014) "Comparison of mast cells and inflammatory cells within periapical lesions and comparison of degranulated mast cells between fibrous and inflamed area in radicular cysts: an immunohistochemical study." Journal of clinical and diagnostic research **8**, ZC61-ZC64.
- Simon, J. H. (1980). "Incidence of periapical cysts in relation to the root canal." J Endod **6**(11): 845-848.
- Slootweg, P. J. (2009). "Lesions of the jaws." Histopathology **54**(4): 401-418.
- Soskolne, W. A. and M. Shear (1967). "Observations on the pathogenesis of primordial cysts." Br Dent J **123**(7): 321-326.
- Sousa, F. B., A. Etges, et al. (2002). "Pediatric oral lesions: a 15-year review from Sao Paulo, Brazil." J Clin Pediatr Dent **26**(4): 413-418.
- Spatafore, C. M., J. A. Griffin, Jr., et al. (1990). "Periapical biopsy report: an analysis of over a 10-year period." J Endod **16**(5): 239-241.
- Stoelinga, P. J. (2001). "Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol." Int J Oral Maxillofac Surg **30**(1): 14-25.
- Stoelinga, P. J. (2005). "The treatment of odontogenic keratocysts by excision of the overlying, attached mucosa, enucleation, and treatment of the bony defect with carnoy solution." J Oral Maxillofac Surg **63**(11): 1662-1666.
- Stoelinga, P. J. and F. B. Bronkhorst (1988). "The incidence, multiple presentation and recurrence of aggressive cysts of the jaws." J Craniomaxillofac Surg **16**(4): 184-195.
- Sugiura, K. (2013). "Unfolded protein response in keratinocytes: impact on normal and abnormal keratinization." J Dermatol Sci **69**(3): 181-186.
- Suzuki, M. (1975). "A study of biological chemistry on the nature of jaw cysts. On the maintainance of homoeostasis in jaw cyst fluid." J Maxillofac Surg **3**(2): 106-118.
- Suzuki, M., M. Endo, et al. (2009). "Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells." Cancer Chemother Pharmacol **64**(6): 1115-1122.
- Takahashi, K., D. F. Lappin, et al. (1998). "Relative distribution of plasma cells expressing immunoglobulin G subclass mRNA in human dental periapical lesions using in situ hybridization." J Endod **24**(3): 164-167.
- Taylor, C. R. and J. Burns (1974). "The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody." J Clin Pathol **27**(1): 14-20.
- Todd, R. and M. August (2003). "Molecular approaches to the diagnosis of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated odontogenic keratocysts." Oral Maxillofac Surg Clin North Am **15**(3): 447-461.
- Toller, P. (1970). "Recent immunological research into periapical lesions and cysts of the jaws." J Anglocont Dent Soc(22): 9-11.
- Toller, P. A. (1970). "The osmolality of fluids from cysts of the jaws." Br Dent J **129**(6): 275-278.

- Torres, M., J. M. Matamala, et al. (2015). "ER stress signaling and neurodegeneration: At the intersection between Alzheimer's disease and Prion-related disorders." *Virus Res* **207**: 69-75.
- Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* **287**(5453): 664-666.
- Urrea, H. and C. Hetz (2012). "The ER in 4D: a novel stress pathway controlling endoplasmic reticulum membrane remodeling." *Cell Death Differ* **19**(12): 1893-1895.
- Varinauskas, V., A. Gervickas, et al. (2006). "Analysis of odontogenic cysts of the jaws." *Medicina (Kaunas)* **42**(3): 201-207.
- Vered, M., A. Buchner, et al. (2004). "Solid variant of odontogenic keratocyst." *J Oral Pathol Med* **33**(2): 125-128.
- Vered, M., O. Peleg, et al. (2009). "The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts." *J Oral Pathol Med* **38**(7): 597-604.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science* **334**(6059): 1081-1086.
- Walter, S. and J. Buchner (2002). "Molecular chaperones--cellular machines for protein folding." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(7): 1098-1113.
- Wanderling, S., B. B. Simen, et al. (2007). "GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion." *Mol Biol Cell* **18**(10): 3764-3775.
- Wang, N., K. Knight, et al. (2004). "Treatment outcome in endodontics-The Toronto Study. Phases I and II: apical surgery." *J Endod* **30**(11): 751-761.
- Weber, C. K., M. Haslbeck, et al. (2010). "Antibodies to the endoplasmic reticulum-resident chaperones calnexin, BiP and Grp94 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." *Rheumatology (Oxford)* **49**(12): 2255-2263.
- Wiersma, V. R., M. Michalak, et al. (2015). "Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity." *Front Oncol* **5**: 7.
- Williams, J. A., O. M. Guicherit, et al. (2003). "Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4616-4621.
- Woolgar, J. A., J. W. Rippin, et al. (1987). "A comparative study of the clinical and histological features of recurrent and non-recurrent odontogenic keratocysts." *J Oral Pathol* **16**(3): 124-128.
- Yagyuu, T., T. Kirita, et al. (2008). "Recurrence of keratocystic odontogenic tumor: clinicopathological features and immunohistochemical study of the Hedgehog signaling pathway." *Pathobiology* **75**(3): 171-176.
- Yamasaki, S., N. Yagishita, et al. (2005). "Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic-reticulum-associated degradation disease." *Arthritis Res Ther* **7**(5): 181-186.
- Yildirim, G., H. Ataoglu, et al. (2010). "Conservative Treatment Protocol for Keratocystic Odontogenic Tumour: a Follow-up Study of 3 Cases." *J Oral Maxillofac Res* **1**(3): e7.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, et al. (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." *J Biol Chem* **276**(17): 13935-13940.
- Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." *FEBS J* **274**(3): 630-658.
- Yoshida, H., K. Haze, et al. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J Biol Chem* **273**(50): 33741-33749.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* **107**(7): 881-891.
- Zhang, C., J. Kawachi, et al. (2001). "Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(3): 718-724.
- Zhang, L., Z. J. Sun, et al. (2006). "Inhibition of SHH signaling pathway: molecular treatment strategy of odontogenic keratocyst." *Med Hypotheses* **67**(5): 1242-1244.

- Zhang, L. and A. Wang (2012). "Virus-induced ER stress and the unfolded protein response." Front Plant Sci **3**: 293.
- Zhang, Y. D., Z. Chen, et al. (2005). "Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells." Cell Res **15**(5): 301-316.
- Zhao, L. and S. L. Ackerman (2006). "Endoplasmic reticulum stress in health and disease." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 444-452.
- Zhao, Y. F., J. X. Wei, et al. (2002). "Treatment of odontogenic keratocysts: a follow-up of 255 Chinese patients." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94**(2): 151-156.
- Zinszner, H., M. Kuroda, et al. (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev **12**(7): 982-995.
- Zong, W. X., C. Li, et al. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol **162**(1): 59-69.
- Αγγελόπουλος, Α., Παπανικολάου, Σ, Αγγελοπούλου, Ε, (2000). Σύγχρονη στοματική και γναθοπροσωπική παθολογία. Αθήνα: 490 και 219-221.
- Αγγελόπουλος, Α., Παπανικολάου, Σ, Αγγελοπούλου, Ε, (2013). Σύγχρονη στοματική και γναθοπροσωπική παθολογία. Αθήνα: 509-511.
- Αγγελόπουλος, Α., Σπυρόπουλος, Ν, Τσιχλάκης, Κ, (2001). Σύγχρονη Στοματική και Γναθοπροσωπική Διαγνωστική και Ακτινολογία. Αθήνα: 451-517.
- Κολοκοτρώνης, Α., Επιβατιανός, Α, (2011). Στοματολογία, University Studio Press. **4**: 128-130.
- Μαργαρίτης, Λ., Γαλανόπουλος, ΒΚ, Κεραμάρης, ΚΕ, Μαρίνος, ΕΣ, Παπασιδέρη, ΙΣ, Στραβοπόδης, ΔΙ, Τρουγκάκος, ΙΠ, (2004). Μεταμεταφραστική τροποποίηση - διαλογή - στόχευση πρωτεϊνών και κυτταρική πολικότητα Βιολογία Κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας: 390-397.
- Μάρτη, Σ. (1990). Στοματο-Γναθοπροσωπική Χειρουργική. Αθήνα. **Τόμος Α**: 337-362.
- Σίσκος, Γ. (2006). "Εκτεταμένες περιακρορριζικές αλλοιώσεις: Η πρόκληση της συντηρητικής αντιμετώπισης. Κριτική βιβλιογραφική ανασκόπηση και κλινική έρευνα." Ενδοδοντολογία **1**: 3-17.
- Σίσκος, Γ., Συκαράς, ΣΝ., (1995). Παθοφυσιολογία της φλεγμονής του πολφού και των περιακρορριζικών ιστών. Ενδοδοντία βασικές αρχές. Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα: 346-379.
- Σκλαβούνου, Α., Νικοπούλου-Καραγιάννη, Α, (1988). "Οδοντογενείς κερατινοκύστεις των γνάθων. Κλινικοστατιστική μελέτη 189 περιπτώσεων." Οδοντοστοματολογική πρόοδος **42**(463-467).
- Τζιαφάς, Δ. (1999). Βιολογία των οδοντικών ιστών. U. S. Press. **Κεφάλαιο 1**: 17-18.