



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρική Σχολή

Α΄ Ορθοπαιδική Χειρουργική Κλινική

Διευθυντής: Καθηγητής Παναγιώτης Ι. Παπαγγελόπουλος

---

# **Ανίχνευση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε οστεοσαρκώματα και συσχέτιση με τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτών**

ΤΟΥ

Μάρκου Ε. Ιωάννου

Ορθοπαιδικού Χειρουργού

Διατριβή επί Διδακτορία

Αθήνα 2022

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 18.06.2003, Αρ. Πρωτ. 9778

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 02.09.2003

**Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής:** 20.11.2021

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

1. Παναγιώτης Ι. Παπαγγελόπουλος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Γεώργιος Λυρίτης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Γεώργιος Σάπκας, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

1. Παναγιώτης Ι. Παπαγγελόπουλος, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Γεώργιος Λυρίτης, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Γεώργιος Σάπκας, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
4. Πηνελόπη Κορκολοπούλου, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
5. Παύλος Πατάπης, Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
6. Διαμάντω Ψυρρή, Καθηγήτρια Ογκολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών.
7. Όλγα Σαββίδου, Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Ημερομηνία Κρίσεως της Διδακτορικής Διατριβής:** 08 Φεβρουαρίου 2022

**Βαθμολογία:** ΑΡΙΣΤΑ

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Η μέγιστη επίπτωση του οστεοσαρκώματος με την φάση ταχείας σκελετικής ανάπτυξης και η ανάπτυξη του στις περιοχές των οστών που αναπτύσσονται σε μήκος και πάχος, οδηγούν στην υποψία ότι παράγοντες που σχετίζονται με την φάση ταχείας οστικής ανάπτυξης μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος. Επίσης είναι γνωστή πιθανή συσχέτιση της χορήγησης αυξητικής ορμόνης για θεραπευτικούς σκοπούς με υψηλή επίπτωση οστεοσαρκώματος. Έτσι, είναι εύλογος ο συλλογισμός, ότι στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μπορεί να εκφράζονται υποδοχείς αυξητικής ορμόνης. Η ανεύρεση τέτοιων υποδοχέων μπορεί να έχει προγνωστική, ερευνητική και θεραπευτική χρησιμότητα.

**Σκοπός:** Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινο οστεοσάρκωμα και η συσχέτιση των πιθανών ευρημάτων με την βιολογική συμπεριφορά του όγκου.

**Υλικό και Μέθοδος:** Έγινε ανοσοϊστοχημική ανάλυση (Polyclonal Rabbit Anti-Human SST, Dako®, Denmark) για ανίχνευση τυχόν υποδοχέων αυξητικής ορμόνης επί των υπάρχοντων ιστολογικών παρασκευασμάτων 32 περιπτώσεων οστεοσαρκώματος που νοσηλεύτηκαν μεταξύ 1997 έως 2011. Ο ελάχιστος χρόνος παρακολούθησης ήταν τα 7 έτη. Καταγράφηκαν οι θάνατοι εκ νόσου, η συνολική επιβίωση, η επιβίωση χωρίς ένδειξη νόσου, η εμφάνιση τοπικής υποτροπής και πνευμονικών μεταστάσεων. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία συγκρίθηκε μεταξύ των ομάδων με ή χωρίς έκφραση υποδοχέων και αναλύθηκε στατιστικά με STATA/SE15.1 (StataCorp, College Station, TX, USA).

**Αποτελέσματα:** Ανιχνεύτηκαν 5 περιπτώσεις οστεοσαρκωμάτων με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης. Η συνολική 5ετής επιβίωση των περιπτώσεων αυτών ήταν 0% σε σύγκριση με 74% των περιπτώσεων χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία υπολογίστηκε σημαντικά αυξημένος κατά 3,86 95% CI (2,04/7,30) στην ομάδα έκφρασης υποδοχέων αυξητικής ορμόνης.

**Συμπεράσματα:** Σε αυτή τη μελέτη εντοπίσαμε υποδοχείς αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινα οστεοσαρκώματα. Το εύρημα αυτό βοηθά στην κατανόηση της παθογένεσης του όγκου και στην αποκρυπτογράφηση της μοριακής του δομής. Η ανίχνευση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε οστεοσαρκώματα φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, πιθανολογώντας μια επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία σε περιστατικά με έκφραση τέτοιων υποδοχέων υπολογίστηκε 3,86 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με περιστατικά χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης. Το εύρημα αυτό πιθανώς να έχει μελλοντική θεραπευτική αξία.

## **Abstract:**

**Background:** The location of osteosarcoma in the metaphysis as well as the age of the patients during the most rapid tumour growth suggest that factors related to skeletal growth are involved in the pathogenesis of this tumour. Furthermore studies suspect an association between growth hormone treatment and increased risk of osteosarcoma. In this aspect this study aims to detect growth hormone receptors in human osteosarcomas and correlate this finding with the clinical outcome of the tumour.

**Patients and methods:** Immunohistochemical staining (Polyclonal Rabbit Anti-Human SST, Dako®, Denmark) for the presence of growth hormone receptors as well as overall survival, disease free survival, disease progression, local recurrence and pulmonary metastasis rates were studied in 32 osteosarcoma patients, treated between 1997 and 2011, with a minimum follow up of 7 years. The 5 - years overall survival rate was compared between groups with and without receptor expression. We used STATA/SE15.1 (StataCorp, College Station, TX, USA) for the statistical analysis.

**Results:** Five osteosarcomas with several aggressive biologic behaviour expressed growth hormone receptors. Overall survival rate in 5 years was 0% for tumours expressing growth hormone receptors and 74% for the cases without growth hormone receptor expression. We calculated a significantly increased relative risk of 3.86, 95% CI (2.04/7.30) of death in 5 years in the group with growth hormone receptors expression.

**Conclusion:** The present study demonstrates the existence of growth hormone receptors in human osteosarcoma. Tumours expressing these receptors seemed to be aggressive with a lower overall survival rate compared to osteosarcoma with negative receptor status. These findings may have prognostic and therapeutic value.

## **Ευχαριστίες:**

Με την ολοκλήρωση της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή μου, κύριο Παπαγγελόπουλο Παναγιώτη, για την συμπαράσταση και υποστήριξη του. Χωρίς την πίστη του σε εμένα δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω το έργο αυτό. Τον ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου, ακόμα και όταν οι χιλιομετρικές αποστάσεις μας χωρίζουν. Μου έδειξε εμπιστοσύνη, με εμπύχωσε, με καθοδήγησε στις ερευνητικές μου αναζητήσεις και με στήριξε σε όλη την διάρκεια της επιστημονικής μου προσπάθειας, από την στιγμή που αποφάσισα να ασχοληθώ με την ορθοπαιδική ογκολογία έως και σήμερα.

Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στον δάσκαλό μου κύριο Δεμερτζή Νικόλαο, ο οποίος με μύησε στην ορθοπαιδική ογκολογία. Ο δάσκαλος μου με εμπιστεύτηκε όταν πρωτογνωριστήκαμε όντας εγώ ειδικευόμενος ιατρός, μου διέγειρε το ενδιαφέρον στην ορθοπαιδική ογκολογία και επένδυσε σε μένα. Ως πρόεδρος του τμήματος Ορθοπαιδικής Ογκολογίας της ΕΕΧΟΤ το έτος 2013 τίμησα ιδιαίτερα την επένδυσή του και εύχομαι με το παρόν έργο να τον κάνω περήφανο. Η συλλογή του υλικού, η επιστημονική σκέψη και η ανάλυση των περιστατικών έγινε με την βοήθεια, καθοδήγηση και στήριξη του δασκάλου μου. Τον ευχαριστώ όμως πάνω από όλα για την αγάπη του, την οποία του ανταποδίδω.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον καθηγητή κο Λυρίτη και τον καθηγητή κο Σάπκα για την στήριξη και βοήθειά τους.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Ιωάννα Ιακωβίδου, τ. Διευθύντρια Παθολογοανατομικής, η οποία επιμελήθηκε των ιστολογικών μεθόδων της έρευνας. Χωρίς την κυρία Ιακωβίδου δεν θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή της έρευνας. Την ευχαριστώ από καρδιάς για όλη την εργασία της, την βοήθειά της και την αγάπη της.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Fabian Grewe για την στατιστική ανάλυση.

## Περιεχόμενα

Ευρετήριο Πινάκων.....	vi
Ευρετήριο Σχημάτων.....	vii
Ευρετήριο Εικόνων.....	vii
Συνομογραφίες .....	vii

### Γενικό Μέρος

1. Οστεοσάρκωμα.....	1
1.1. Αιτιοπαθογένεια.....	2
1.1.1. Βιολογία της Ογκογένεσης.....	2
1.1.2. Προδιαθεσικοί Παράγοντες- Αιτιολογία.....	6
1.1.3. Παθογένεια και Αυξητικοί Παράγοντες.....	8
1.2. Κλινική Έκφραση και Διαγνωστική Διαδικασία.....	9
1.2.1. Κλινική Εικόνα.....	9
1.2.2. Διαγνωστική Προσέγγιση.....	9
1.2.3. Σταδιοποίηση.....	12
1.2.4. Ιστολογική Ταξινόμηση.....	13
1.2.5. Ιστολογικές Παραλλαγές.....	13
1.3. Βιολογική Συμπεριφορά –Πρόγνωση.....	15
1.4. Θεραπεία.....	17
1.4.1. Χημειοθεραπεία.....	17
1.4.2. Χειρουργική Θεραπεία.....	20
1.4.3. Μεταστατικό Οστεοσάρκωμα.....	21
1.4.4. Ακτινοθεραπεία.....	21
1.4.5. Νεότερα φάρμακα και έρευνα.....	22
2. Αυξητική Ορμόνη.....	25
3. Ανοσοϊστοχημεία.....	29
4. Αγωνιστές σωματοστατίνης και έρευνα.....	32

### Ειδικό μέρος

5. Υπόθεση.....	35
5.1. Υλικό και Μέθοδος.....	35
5.2. Αποτελέσματα.....	38
5.2.1. Υποδοχείς αυξητικής ορμόνης.....	41
5.2.2. Βιολογική συμπεριφορά οστεοσαρκωμάτων.....	43
5.3. Συζήτηση.....	44
5.4. Συμπεράσματα.....	47

### Συνημμένα

Βιβλιογραφία.....	I
Ιπποκράτειος Όρκος.....	XI
Βιογραφικό Σημείωμα.....	XII

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Βασικές αρχές βιοψίας.....	11
Πίνακας 2: Σύστημα σταδιοποίησης του Enneking.....	12
Πίνακας 3: Σύστημα σταδιοποίησης AJCC.....	12
Πίνακας 4: Βαθμός ιστολογικής ανταπόκρισης στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία.....	16
Πίνακας 5: Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των SM-As.....	33
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των ασθενών υπό μελέτη.....	36

Πίνακας 7: Ποσοστιαία ανάλυση πορείας ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη επί του συνόλου των ασθενών.....	38
Πίνακας 8: Ογκολογικό αποτέλεσμα και έκφραση υποδοχέων GH των περιστατικών υπό μελέτη.....	39
Πίνακας 9: Ανάλυση επιβίωσης ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη ανά ομάδα.....	43
Πίνακας 10: Ανάλυση επιβίωσης ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη ανά ομάδα επί ομογενοποιημένου δείγματος.....	44

## Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1: Απλοποιημένη σχηματική παράσταση του κυτταρικού κύκλου.....	3
Σχήμα 2: Σχηματική παράσταση αυξητικού παράγοντα που διεγείρει την Κυτταρογένεση.....	4
Σχήμα 3: Μηχανισμοί αντοχής στην χημειοθεραπεία. ....	19
Σχήμα 4: Η ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού JAK.....	26
Σχήμα 5: Ρύθμιση έκκρισης GH και IGF-1.....	27
Σχήμα 6: Έμμεση μέθοδος ανοσοϋπεροξειδάσης.....	31
Σχήμα 7: Μέθοδος υπεροξειδάσης – ανοσοϋπεροξειδάσης.....	31

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Επίπτωση του οστεοσαρκώματος σε σχέση με την ηλικία.....	1
Εικόνα 2: απλή ακτινογραφία οστεοσαρκώματος της άπω μετάφυσης του μηριαίου..	10
Εικόνα 3: Περισστικό οστεοσάρκωμα μηριαίου.....	15
Εικόνα 4: Οστοεσάρκωμα GHR- (μεγέθυνση X 100) .....	41
Εικόνα 5: Οστοεσάρκωμα GHR- (μεγέθυνση X 300) .....	41
Εικόνα 6: Οστοεσάρκωμα GHR+ (μεγέθυνση X 630) .....	42

## Συντομογραφίες

LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen activated protein kinase
PDGF	Platelet-derived growth factors
TGF	Tumor growth factor
MSC	Mesenchymal stem cell
ALP	Alkaline phosphatase
OPN	Osteopontin
OCN	Osteocalcin
CTGF	Connective tissue growth factor
RB gene	Retinoblastoma gene
DNA	deoxyribonucleic acid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MMPs	Matrix metalloproteinases
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
PET	Positron emission tomography
CT	Computed tomography
hEGF	Human epidermal growth factor
MRT	Magnetic resonance tomography
BS	Bone Scan
MSTS	Musculoskeletal Tumor Society
AJCC	American Joint Committee on Cancer

ADM	Adriamycin
CDP	Cisdiaminoplatinum
MTX	Methotrexate
HDMTX	High Dose Methotrexate
IFO	Ifosfamide
MDR	Multi-drug-resistance gene
BMP	Bone morphogenetic protein
RTK	Receptor tyrosine kinase
MTP-PE	Muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine
BCG	Bacille Calmette-Guérin
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
TNF	Tumor necrosis factor
OS	Overall Survival
GHRH	Growth hormone–releasing hormone
hGH	Human growth hormone, Somatotropin
Sm	Somatomedin
GHR	Growth hormone receptor
c-AMP	Cyclic adenosine monophosphate
JAK	Janus kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin receptors
PBS	phosphate-buffered saline
SM-As	Somatostatin agonist
IL	Interleukine
mRNA	Messenger ribonucleic acid
GHIF	Growth hormone inhibitory factor
GF	Growth factor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
min	Minute
DOD	Died on disease
DP	Disease progression
P.M.	Pulmonary metastasis
L.R.	Local recurrence
NED	No evidence of disease
A	Άρρεν
Θ	Θήλυ

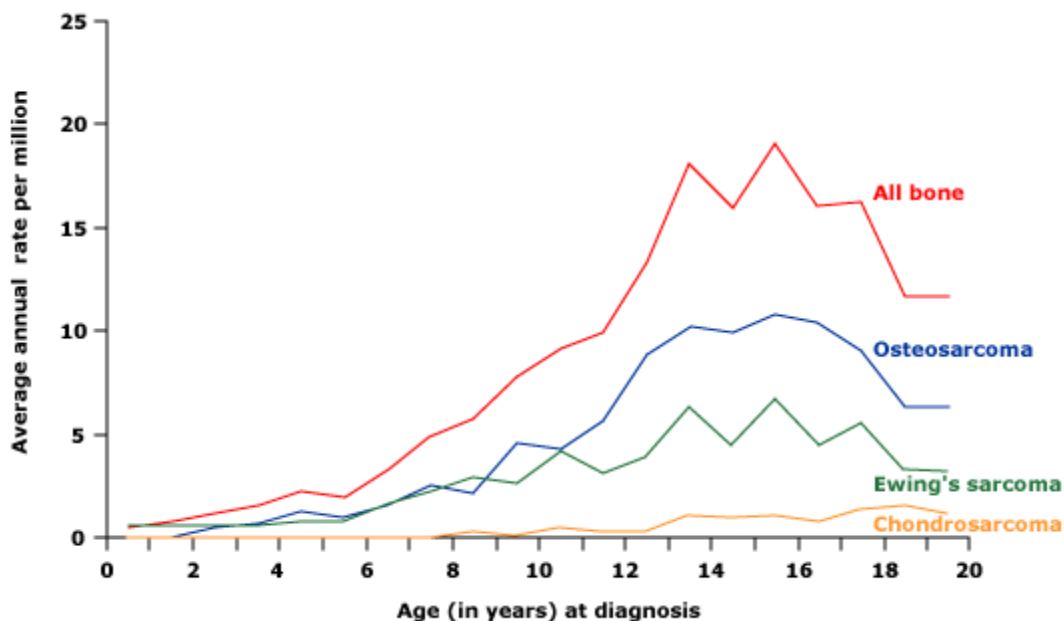


## Οστεοσάρκωμα

Το οστεοσάρκωμα είναι έναν υψηλής κακοήθειας όγκος αποτελούμενος από μεσεγχυματικά κύτταρα που παράγουν οστεοειδές και άωρο οστόν<sup>[1-3]</sup>. Με εξαίρεση το πολλαπλούν μυέλωμα, είναι ο συχνότερος πρωτοπαθής κακοήθης όγκος των οστών. Η συχνότητα του πρωτοπαθούς οστεοσαρκώματος είναι 2-3 νέες περιπτώσεις/ εκατομμύριο πληθυσμού/ έτος, κυρίως σε αναπτυσσόμενους οργανισμούς<sup>[4]</sup>. Αφορά συχνότερα άρρενα σε σχέση με τα θήλεα (1,5/1)<sup>[5]</sup>. Η συχνότερη προσβαλλόμενη ηλικιακή ομάδα είναι η 2η δεκαετία<sup>[6,7]</sup>. Είναι ασυνήθης προ της ηλικίας των 10 ετών και σπάνιο μετά τα 30 έτη. Οστεοσαρκώματα που παρατηρούνται σε μεγάλες ηλικίες είναι δευτερογενή σε νόσο του Paget, ακτινοβολημένο οστόν, αδιαφοροποίητο χονδροσάρκωμα κ.α.<sup>[8-14]</sup>.

Το οστεοσάρκωμα αφορά το 56% επί του συνόλου των κακοήθων όγκων των οστών σε ασθενείς κάτω των 20 ετών, ακολουθούμενο σε συχνότητα από το σάρκωμα Ewing's που αφορά το 34% των ασθενών και το χονδροσάρκωμα σε 6% των ασθενών<sup>[15]</sup>, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 1.

Εικόνα 1: Επίπτωση του οστεοσαρκώματος σε σχέση με την ηλικία<sup>[15]</sup>



Το 70% των οστεοσαρκωμάτων εντοπίζονται γύρω από το γόνατο και τον ώμο και συγκεκριμένα την άπω μετάφυση του μηριαίου, την εγγύς μετάφυση της κνήμης και την εγγύς μετάφυση του βραγχιονίου με λόγω 4/ 2/ 1 αντίστοιχα <sup>[16]</sup>. Το υπόλοιπο 30% εντοπίζεται στο εγγύς μηριαίο, την λεκάνη (λαγόνιο οστού), την άπω μετάφυση της κνήμης, την εγγύς περόνη με φθίνουσα σειρά προτίμησης.

Από το 1977 η πρόοδος των απεικονιστικών τεχνικών, η είσοδος της χημειοθεραπείας στο θεραπευτικό πρωτόκολλο και η κατανόηση της βιολογίας της νόσου αύξησαν την 5ετή επιβίωση για πρωτοπαθή οστεοσάρκωμα χωρίς μεταστάσεις στο 70-80% , ενώ η τοπική υποτροπή μετά από επέμβαση διάσωσης μέλους είναι πλέον < 5-7% έναντι 70-80% του παρελθόντος <sup>[17]</sup>. Παρόλα όμως αυτά, 40% περίπου των ασθενών που προσβάλλονται από οστεοσάρκωμα, θα εμφανίσει απομακρυσμένες μεταστάσεις, συνήθως τα τρία πρώτα χρόνια μετά την αρχική θεραπεία <sup>[18]</sup>.

## **1.1. Αιτιοπαθογένεια**

Η αιτιοπαθογένεια του οστεοσαρκώματος είναι άγνωστη. Την πλειοψηφία των οστεοσαρκωμάτων αποτελούν σποραδικές περιπτώσεις. Κληρονομικοί παράγοντες σχετίζονται με την εμφάνιση του οστεοσαρκώματος μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις. Η έρευνα στον τομέα της βιολογίας της ογκογένεσης έχει κάνει τα τελευταία έτη σημαντικές προόδους. Η κατανόηση των μηχανισμών που χρησιμοποιούνται για την ογκογένεση σε μοριακό επίπεδο είναι απαραίτητη για την εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας (targeted therapy) που αποτελεί και την θεραπευτική ελπίδα του μέλλοντος. Παρακάτω αναφέρονται οι κύριοι μηχανισμοί της ογκογένεσης, οι πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος και η πιθανή σχέση της παθογένειας του οστεοσαρκώματος με τους αυξητικούς παράγοντες.

### **1.1.1. Βιολογία της Ογκογένεσης**

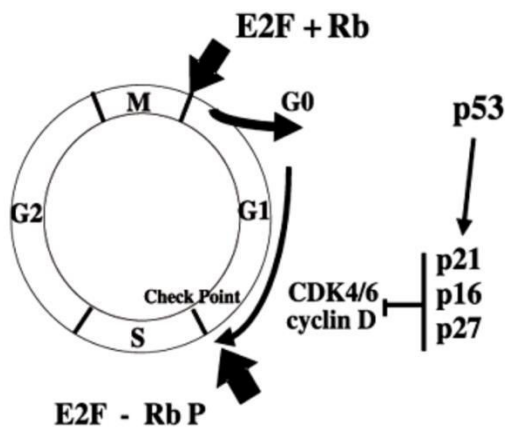
Η ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία και απαιτεί την ύπαρξη συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών (μεταλλάξεων). Οι βασικές γνωστές γενετικές μεταλλάξεις απαραίτητες για την φυσιολογία των νεοπλασμάτων είναι οι ακόλουθες:

#### A. Παράκαμψη του μηχανισμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Όταν κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου συμβεί σφάλμα αντιγραφής του DNA, σταματά η διαδικασία αντιγραφής, έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη. Εάν η βλάβη δεν μπορεί να αποκατασταθεί , τότε το κύτταρο αυτοκαταστρέφεται , μέσω της ενεργοποίησης

λυσσωματικών ενζύμων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται απόπτωση. Το P53 κατασταλτικό ογκογονίδιο ονομάζεται και “κλειδωκράτωρ του γενώματος” και κατέχει την σημαντικότερη θέση στο μηχανισμό αναγνώρισης βλαβών αντιγραφής, όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Βρίσκεται στην θέση 17p13, δηλαδή στην 13<sup>η</sup> θέση του κοντού σκέλους του χρωμοσώματος 17. Όταν υπάρχει μετάλλαξη του P53 κατασταλτικού ογκογονιδίου, η ικανότητα αναγνώρισης βλαβών δεν υφίσταται και το κύτταρο συνεχίζεται να πολλαπλασιάζεται [19-21]. Πράγματι σε 76% των σποραδικών μορφών οστεοσαρκώματος ανευρίσκεται μετάλλαξη του P53 με loss of heterozygosity analysis (LOH) [22]. LOH, ήτοι η απώλεια ετεροζυγωτίας, αποτελεί μια έμμεση μέθοδο ελέγχου μεταλλάξεων [22].

Σχήμα 1: Απλοποιημένη σχηματική παράσταση του κυτταρικού κύκλου



Ο κυτταρικός κύκλος αρχίζει μετά τον διπλασιασμό του κυττάρου ή την μίτωση. Το κύτταρο μπορεί να εισέλθει στην φάση ηρεμίας (G0) ή να εισέλθει στην φάση G. Το checkpoint αποτελεί το βασικό σημείο ελέγχου. Στο σημείο αυτό το κύτταρο ελέγχεται για την αρτιότητά του ή μή και μπορεί να μπλοκάρεται η συνέχιση του κύκλου (G1 arrest). Οι βασικότεροι μηχανισμοί ελέγχου είναι το μοριακό μονοπάτι του P53 κατασταλτικού πρωτοογκογονιδίου και το μονοπάτι του ρετινοβλαστώματος Rb. Μόλις το κύτταρο περάσει αυτό το σημείο εισέρχεται στην φάση σύνθεσης και αντιγραφής του DNA.

## B. Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού

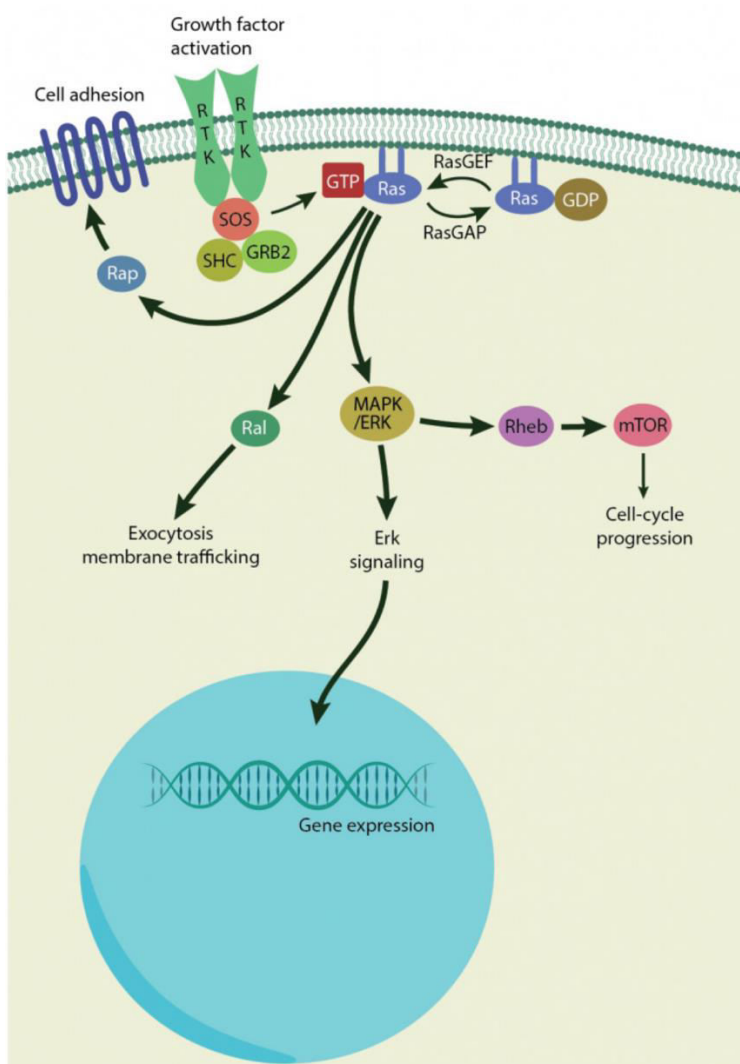
Το φυσιολογικό κύτταρο έχει περιορισμένη δυνατότητα διπλασιασμού, περίπου 60-70 φορές. Σε κάθε πολλαπλασιασμό του κυττάρου τα χρωμοσώματα χάνουν ένα μέρος τους, δηλαδή κονταίνουν. Πρόκειται για σημεία των χρωμοσωμάτων χωρίς αντιγραφικό υλικό (γονίδια). Και όταν συγκεκριμένο τμήμα του χρωμοσώματος λείπει, τότε το κύτταρο αυτοκαταστρέφεται μέσω της διαδικασίας απόπτωσης. Αυτός είναι ένας μηχανισμός ασφαλείας μη επιτρέποντας σε κύτταρα με αυξημένες πλέον πιθανότητες αντιγραφικών βλαβών, όπως γερασμένα κύτταρα, να αντιγράφονται. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν αυξημένη δράση της

τελομεράσης, ενός ενζύμου που προσθέτει συνεχώς τα χαμένα από τα χρωμοσώματα νουκλεοτίδια, κάνοντας έτσι τα κύτταρα αθάνατα [20,23].

### Γ. Αυξημένη ευαισθησία σε αυξητικούς παράγοντες

Στον κυτταρικό κύκλο η φάση ηρεμίας του κυττάρου χαρακτηρίζεται ως φάση G0. Όταν επιδράσει κάποιος αυξητικός παράγοντας, θα επιτρέψει στο κύτταρο να εισέλθει στην φάση G1, S, G2 και M, περνώντας από τους διάφορους μηχανισμούς ελέγχου (σχήμα 2). Η ισορροπία αυξητικών και ανασταλτικών της αύξησης παραγόντων (π.χ. αυξητική ορμόνη και σωματοστατίνη) ελέγχουν πόσα κύτταρα ανά πάσα στιγμή μπαίνουν στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η αυξημένη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στους αυξητικούς παράγοντες καταστρατηγεί το ισοζύγιο αυτό με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρογένεση [24-26].

Σχήμα 2: Σχηματική παράσταση αυξητικού παράγοντα που διεγείρει την κυτταρογένεση.



Η ενεργοποίηση του υποδοχέος στην κυτταρική μεμβράνη από κάποιον αυξητικό παράγοντα οδηγεί σε αυτοφωσφορίλωσή του και ενεργοποίηση της τυροσινοκινάσης. Μέσω ενός καταρράκτη μοριακών αντιδράσεων οδηγεί στην φωσφορυλίωση του ενζύμου MAPK (Mitogen activated protein kinase), το οποίο στην συνέχεια θα ενεργοποιήσει την αντιγραφή.

#### Δ. Ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν την ικανότητα ή προάγουν άλλα κύτταρα (κύτταρα στρώματος) προς έκκριση αυξητικών παραγόντων που θα δράσουν στα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα, προάγοντας την αύξηση αυτών. Τέτοια παραδείγματα είναι οι παράγοντες PDGF (Platelet-derived growth factors), TGF- $\alpha$  (Tumor growth factor alpha), epidermal growth factor HER2/neu κ.α.<sup>[20,27,28]</sup>. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι μια υπαρκτή στον οργανισμό πρωτεΐνη ή μια μεταλλαγμένη μορφή αυτής ή ακόμα νέα –μη υπαρκτή στον μη νοσούντα οργανισμό –πρωτεΐνη. Η ικανότητα αυτή προσδίδει στο νεόπλασμα αυτονομία και ανεξαρτησία ως προς τον συνεχή ερεθισμό της ανάπτυξής του.

#### Ε. Παράκαμψη ελεγκτικών μηχανισμών αντιγραφής

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB gene) βρίσκεται στην θέση 13q14 (δηλαδή στο μακρύ σκέλος του 13<sup>ου</sup> χρωμοσώματος). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το γονίδιο RB μπλοκάρει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1 (σχήμα 1). Όταν κάποιος αυξητικός παράγοντας, όπως η αυξητική ορμόνη, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, τότε κινάσες φωσφορυλιώνουν τον παράγοντα RB, ο οποίος γίνεται ανενεργός και επιτρέπεται η συνέχεια του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή η σύνθεση DNA και ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου. Μετάλλαξη του γονιδίου RB οδηγεί σε ανεπάρκεια του ελεγκτικού αυτού μηχανισμού του κυττάρου (G1 phase checkpoint) και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αυτού. Σε σποραδικές μορφές οστεοσαρκώματος ανευρίσκεται μετάλλαξη του RB γονιδίου σε ποσοστό 63-72% με LOH<sup>[29]</sup>.

#### ΣΤ. Αγγειογένεση

Οι όγκοι διαθέτουν αγγειογενετική ικανότητα, ειδάλλως, τρεφόμενοι μόνο μέσω διήθησης, θα μπορούσαν να αυξηθούν σε μια μέγιστη διάμετρο μόλις 1-3 χιλ. Ένας σημαντικός παράγων που φαίνεται να εμπλέκεται στους περισσότερους όγκους στον μηχανισμό αγγειογένεσης είναι ο VEGF A,-B,-C και -D<sup>[30]</sup>. Ο παράγων αυτός διεγείρει την παραγωγή και αύξηση νέων αγγείων. Αυξάνεται με τον παρακρινικό μηχανισμό, και κύριο ερέθισμα προς παραγωγή/ αύξησή του είναι η υποξία.

#### Ζ. Ιστική διήθηση και μετάσταση

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αποσπώνται και να δημιουργούν νέος κλώνους σε απομακρυσμένες θέσεις σχετίζεται με την παράκαμψη του μηχανισμού “συγκόλλησης” των κυττάρων. Φυσιολογικά τα κύτταρα παραμένουν ενωμένα μεταξύ τους σεβόμενα τους πέριξ ιστούς και διατηρώντας σαφή όρια. Σημαντικό ρόλο εδώ παίζει το μόριο συγκόλλησης E-

cadherin <sup>[31]</sup>. Στα καρκινικά κύτταρα δεν ισχύει κάτι τέτοιο. Φαίνεται ότι το μόριο παρακάμπτεται ή καταστρέφεται με την βοήθεια πρωτεασών που εκκρίνονται από τους όγκους. Σημαντικό ρόλο στην ιστική διήθηση και μετάσταση φαίνεται να παίζουν και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αποτελούν μόρια σημαντικά στην εμβρυογένεση, αναπαραγωγή, επούλωση, αγγειογένεση και ρυθμίζονται φυσιολογικά με τον ιστικό αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών (TIMP). Η μετάσταση μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση των MMPs και κατάργηση της λειτουργίας των TIMPs <sup>[32,33]</sup>.

### 1.1.2. Προδιαθεσικοί Παράγοντες- Αιτιολογία

A. Προηγούμενη ακτινοβολία: Το οστεοσάρκωμα αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο μετά από ακτινοθεραπεία για συμπαγή καρκίνο σε παιδιά μετά 20ετίας <sup>[11,12]</sup>. Στο σύνολο μόνο 3% των οστεοσαρκωμάτων σχετίζονται με προηγούμενη ακτινοβολία <sup>[10,11,13]</sup>. Η χρονική διάρκεια μεταξύ έκθεσης στην ακτινοβολία και εμφάνισης οστεοσαρκώματος κυμαίνεται από 4 έως 40 έτη με μέσο όρο τα 13,7 έτη <sup>[11-13]</sup>.

B. Η έκθεση σε χημειοθεραπεία και συγκεκριμένα σε αλκυλιούντες παράγοντες έχουν τεκμηριωμένη σχέση με δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα <sup>[11-13]</sup>. Αυτή η σχέση μάλιστα είναι δόσοεξαρτώμενη. Επίσης υπάρχουν αναφορές ότι οι ανθρακυκλίνες επιδρούν στην ανάπτυξη δευτεροπαθούς οστεοσαρκώματος <sup>[14]</sup>.

Γ. Νόσος Paget και άλλες καλοήθειες οστικές βλάβες: Περιπτώσεις οστεοσαρκωμάτων σε ασθενείς άνω των 40 ετών μπορεί να αναπτύσσονται σε προϋπάρχουσα νόσο Paget, ένα μεταβολικό νόσημα των οστών με κύριο χαρακτηριστικό τον τοπικά (στο σημείο της βλάβης) αυξημένο οστικό μεταβολισμό <sup>[8]</sup>. Παρότι η επίπτωση του οστεοσαρκώματος είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ασθενείς με νόσο του Paget, αφορά τελικά μόνο το 0,7% όλων των περιπτώσεων οστεοσαρκώματος <sup>[9]</sup>. Η αιτιοπαθογένεια της νόσου Paget δεν είναι γνωστή, φαίνεται όμως ότι γενετικοί παράγοντες παίζουν κάποιον ρόλο. Έτσι και στη νόσο Paget και στο οστεοσάρκωμα επί νόσου Paget υπάρχει απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) του χρωμοσώματος 18, θέση όπου πιθανολογείται η ύπαρξη κατασταλτικού ογκογονιδίου <sup>[34,35]</sup>. Εκτός από την νόσο Paget και άλλες καλοήθειες προϋπάρχουσες οστικές βλάβες που έχουν σχέση με αυξημένη επίπτωση οστεοσαρκώματος είναι το οστεοχόνδρωμα, το εγχόνδρωμα, η χρόνια οστεομυελίτις, η ινώδης δυσπλασία κ.α. <sup>[36,37]</sup>.

Δ. Ιογενής αιτία: Πιθανώς ιοί να εμπλέκονται στην παθογένεια και του οστεοσαρκώματος. Αποδεδειγμένη ογκογόνο δράση έχει ο ιός Simian Virus 40 ο οποίος παρεμβαίνει στην θέση 17p13, θέση που βρίσκεται το κατασταλτικό πρωτοογκογονίδιο p53 <sup>[38,39]</sup>.

Ε. Κληρονομικές παθήσεις: Κληρονομικές παθήσεις με γνωστή προδιάθεση για ανάπτυξη οστεοσαρκώματος αποτελούν το κληρονομικό ρετινοβλάστωμα (hereditary retinoblastoma), Li-Fraumeni σύνδρομο, Rothmund-Thomson σύνδρομο καθώς και το σύνδρομο Bloom and Werner. Λόγω της συσχέτισης των παθήσεων αυτών με την παθογένεση του οστεοσαρκώματος η λήψη λεπτομερούς οικογενειακού ιστορικού είναι επιβεβλημένη σε κάθε νεοδιαγνωζόμενη περίπτωση οστεοσαρκώματος.

Η γενετική ανωμαλία του κληρονομούμενου ρετινοβλαστώματος αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης άλλων πρωτοπαθών όγκων των οποίων το 60% αποτελούν οστεοσάρκωμα και σαρκώματα μαλακών μορίων <sup>[10,40,41]</sup>. Οι ασθενείς με τον σποραδικό τύπο του ρετινοβλαστώματος έχουν πολύ μικρότερη πιθανότητα. Σε μια μελέτη 1605 ατόμων με ρετινοβλάστωμα η επίπτωση δεύτερου καρκίνου στα 50 έτη ήταν 51% στις περιπτώσεις του κληρονομούμενου έναντι 5% του σποραδικού ρετινοβλαστώματος <sup>[10]</sup>. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB gene) βρίσκεται στην θέση 13q14.

Στο σύνδρομο Li-Fraumeni τα προσβεβλημένα μέλη της οικογένειας αναπτύσσουν ποικίλα νεοπλάσματα όπως καρκίνο μαστού, σαρκώματα μαλακών μορίων, εγκεφάλου, επινεφριδίων, λευχαιμία και οστεοσάρκωμα <sup>[42]</sup>. Η χαρακτηριστική μετάλλαξη αφορά το P53 κατασταλτικό πρωτοογκογονίδιο στην θέση 17p13 <sup>[43,44]</sup>.

Το σύνδρομο Rothmund-Thomson μεταβιβάζεται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από βλάβες του δέρματος, ατροφία, τηλαγγειεκτασία, στιγματισμό, αραιά μαλλιά, καταρράκτη, χαμηλό ανάστημα, σκελετικές ανωμαλίες και αυξημένη επίπτωση οστεοσαρκώματος <sup>[45,46]</sup>. Σε μελέτη που περιλάμβανε 41 ασθενείς με σύνδρομο Rothmund-Thomson το 32% ανέπτυξε οστεοσάρκωμα <sup>[45]</sup>. Στους ασθενείς αυτούς ενοχοποιείται βλάβη στο RECQL4 γονίδιο. Σε έρευνα που περιλάμβανε 33 ασθενείς με σύνδρομο Rothmund-Thomson 23 περιπτώσεις ασθενών με μετάλλαξη του RECQL4 γονιδίου εμφάνισαν οστεοσάρκωμα ενώ κανείς από τους 10 ασθενείς χωρίς την μετάλλαξη εμφάνισε οστεοσάρκωμα <sup>[47]</sup>. Το ίδιο γονίδιο φαίνεται να μεταλλάσσεται και στα σύνδρομα Bloom και Werner <sup>[47]</sup>.

### 1.1.3. Παθογένεια και Αυξητικοί Παράγοντες

Παρότι η αιτιολογία του οστεοσαρκώματος δεν είναι γνωστή, φαίνεται να υπάρχει μια άμεση συσχέτιση της φάσης ταχείας οστικής ανάπτυξης και την ανάπτυξης του οστεοσαρκώματος [48]. Έτσι είναι γνωστό ότι [48,49]:

- Η μέγιστη επίπτωση του οστεοσαρκώματος συμπίπτει με την φάση ταχείας σκελετικής ανάπτυξης
- Ο όγκος αναπτύσσεται συχνότερα σε περιοχές που αναπτύσσεται το οστόν σε μήκος και πάχος (μετάφυση του άπω μηριαίου, εγγύς κνήμη, εγγύς βραγχιόνιο).
- Στα θήλεα εμφανίζεται σε νεότερες ηλικίες συμβαδίζοντας με την πιο πρώιμη, σε σχέση με τους άρρενες, σκελετική τους ανάπτυξη. Η συχνότητα εμφάνισης οστεοσαρκώματος είναι ελαφρώς υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες, γεγονός που συμβαδίζει με μεγαλύτερη διάρκεια σκελετικής ανάπτυξης στα άρρενα [50].

Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην θεωρία ότι το οστεοσάρκωμα ξεκινά από ανωμαλία κατά την φυσιολογική διαδικασία της ανάπτυξης και ανακατασκευής του οστού την στιγμή που ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα είναι επιδεκτικά σε ογκογενετικούς μηχανισμούς και τελικά οδηγούνται σε νεοπλασματική μεταμόρφωση [51]. Παρόλα αυτά έρευνες που προσπάθησαν να συσχετίσουν παράγοντες που έχουν σχέση με την αύξηση και την πιθανότητα ανάπτυξης οστεοσαρκώματος δεν οδήγησαν σε σαφές συμπέρασμα [52,53].

Στο οστεοσάρκωμα ο παθογενετικός μηχανισμός της ογκογένεσης, ήτοι το σύνολο των διαταραχών που οδηγεί στην δημιουργία της νεοπλασίας, παραμένουν ανεξήγητα και αποτελούν θέμα εντατικής έρευνας [33,54]. Σε αντίθεση με άλλα σαρκώματα δεν υπάρχουν χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές μεταθέσεις ή γονιδιακές ανωμαλίες. Τα περισσότερα οστεοσαρκώματα έχουν πολύπλοκο ασύμμετρο καρυότυπο. Την υψηλότερη επίπτωση μετάλλαξης (loss of heterozygosity) αναφέρονται στα χρωμοσώματα 3q, 13q (τοποθεσία του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος), 17p και 18q [34,35,55-57].



## 1.2. Κλινική Έκφραση και Διαγνωστική Διαδικασία

### 1.2.1. Κλινική Εικόνα

Η πλειονότητα των ασθενών με οστεοσάρκωμα αναφέρουν εντοπισμένο πόνο διάρκειας μερικών μηνών. Στο ιστορικό μπορεί να αναφέρεται ως εκλυτική αιτία του πόνου κάποιος ασήμαντος τραυματισμός. Συστηματικές εκδηλώσεις όπως πυρετός, απώλεια βάρους και αδιαθεσία δεν είναι συνήθεις. Στην κλινική εξέταση το πιο σημαντικό εύρημα αποτελεί ψηλαφητή μάζα μαλακών μορίων, η οποία μπορεί να είναι ευμεγέθης και ευαίσθητη στην ψηλάφηση. Τα οστεοσαρκώματα προτιμούν την μετάφυση των μακρών οστών με πιο συχνή εντόπισή την άπω μετάφυση του μηριαίου, την η εγγύς κνήμη, το εγγύς βραγχιόνιο και το εγγύς μηριαίο <sup>[16]</sup>.

Ο εργαστηριακός έλεγχος είναι συνήθως χωρίς παθολογικά ευρήματα, με εξαίρεση την αυξημένη αλκαλική φωσφατάση σε 40% των ασθενών και την αυξημένη γαλακτική δευδρογενάση σε 30% των ασθενών <sup>[58,59]</sup>. Τα ευρήματα αυτά δεν σχετίζονται με την έκταση της νόσου, παρότι μια πολύ αυξημένη τιμή της LDH πιθανώς να υποδηλώνει πτωχή πρόγνωση <sup>[60]</sup>.

Κατά την διάγνωση περίπου 10-20% των ασθενών παρουσιάζουν μακρομεταστάσεις και ταξινομούνται στο στάδιο III κατά Enneking (βλέπε και πίνακα 2). Οι μεταστάσεις αφορούν κυρίως τους πνεύμονες και δευτερόντως άλλα οστά <sup>[61]</sup>. Υποκλινικές μικρομεταστάσεις θεωρούνται ότι υπάρχουν στους περισσότερους ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Πριν την είσοδο της χημειοθεραπείας στο θεραπευτικό πρωτόκολλο του οστεοσαρκώματος πάνω από 80% των ασθενών ανέπτυσαν μεταστατική νόσο παρά τη επίτευξη τοπικού ελέγχου της νόσου μέσω ακρωτηριασμού. Συμπεραίνεται έτσι, ότι οι ασθενείς είχαν μικρομεταστάσεις την στιγμή της διάγνωσης <sup>[62]</sup>. Με την συστηματική (σε όλους τους ασθενείς) χρήση χημειοθεραπείας τουλάχιστον τα 2/3 ασθενών με μη (μακρο)-μεταστατικό οστεοσάρκωμα θα επιβιώσουν άνω των 5 ετών.

### 1.2.2. Διαγνωστική Προσέγγιση

Η πρώτη παρακλινική εξέταση που ζητείται για την διερεύνηση οστικής βλάβης είναι η απλή ακτινογραφία <sup>[63]</sup>. Τυπικά το οστεοσάρκωμα ξεκινά ενδομυελικά και επεκτείνεται στον φλοιό, τον οποίο διαβρώνει, διασπά προχωρώντας στα μαλακά μόρια. Στην περιοχή της βλάβης υπάρχουν τα νεοπλασματικά κύτταρα που παράγουν τον όγκο. Έτσι στην απλή ακτινογραφία εμφανίζεται μια καταστροφική βλάβη μεικτού τύπου με οστεολυτικές και

οστεοπυκνωτικές περιοχές. Η ζώνη μετάπτωσης του όγκου είναι ευρεία και τα όρια ασαφή. Υπάρχει διάσπαση του φλοιού, περιοστική αντίδραση και επέκταση συνήθως του όγκου στα μαλακά μόρια. Όταν ο όγκος διασπά το περιόστεο μπορεί να σχηματίζεται το τρίγωνο Codman λόγω ανύψωσης του φλοιού, που θεωρείται παθολογικό ακτινολογικό εύρημα (εικόνα 2). Επίσης η περιοστική αντίδραση μπορεί να εμφανιστεί ακτινολογικά χαρακτηριστικά δίκην ακτίνων ηλίου “sun ray” ή “sunburst”.

Εικόνα 2: απλή ακτινογραφία οστεοσαρκώματος της άπω μετάφυσης του μηριαίου



Η διάσπαση του περιοστέου με ανύψωση του φλοιού και σχηματισμό τριγώνου Codman θεωρείται παθολογικό ακτινολογικό εύρημα.

Ορθή διάγνωση οστεοσαρκώματος αναμένεται στα 2/3 των περιπτώσεων με χαρακτηριστική ακτινολογική εικόνα, κλινική έκφραση και τυπική εντόπιση <sup>[64]</sup>. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει πάντοτε άλλους κακοήθεις όγκους των οστών όπως λέμφωμα, σάρκωμα Ewing, μεταστατική νόσος κ.α., καλοήθεις οστικές βλάβες όπως οστεοχόνδρωμα, χονδροβλάστωμα, οστέωμα καθώς και μη νεοπλασματικές εξεργασίες όπως οστεομυελίτις, ηωσινοφιλικό κοκκίωμα και ανευρυσματική κύστη.

Ο παρακλινικός έλεγχος ολοκληρώνεται με την αξονική τομογραφία της βλάβης και των πνευμόνων, την μαγνητική τομογραφία της βλάβης, το σπινθηρογράφημα οστών, ενίοτε της μαγνητικής αγγειογραφίας, του PET/CT και τέλος την βιοψία.

Η αξονική τομογραφία (CT) αποτελεί την εξέταση εκλογής για τον εντοπισμό πνευμονικών μεταστάσεων. Το 80% των μεταστάσεων του οστεοσαρκώματος αφορά τους πνεύμονες <sup>[62,65]</sup>. Λόγω της πιθανότητας ψευδώς θετικών ευρημάτων συστήνεται ιστολογική τεκμηρίωση των ύποπτων εστιών μετάστασης, ιδιαίτερα εάν η βλάβη δεν είναι εμφανής και στην απλή ακτινογραφία θώρακος. Από την άλλη είναι δυνατή η ύπαρξη ψευδών αρνητικών ευρημάτων <sup>[66,67]</sup>. Σύμφωνα με μια μελέτη περισσότερες από 30% των θωρακικών μεταστάσεων ανευρίσκονται μόνο με ανοικτή θωρακοτομή και άμεση ψηλάφηση του παρεγχύματος <sup>[66]</sup>.

Η μαγνητική τομογραφία (MRT) της βλάβης αποτελεί την εξέταση εκλογής για την ανάδειξη της ενδομυελικής επέκτασης του όγκου, των ακριβών ορίων του, την ύπαρξη skip μεταστάσεων και την επέκταση στα μαλακά μόρια. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία όταν ο όγκος γειτνιάζει με νευροαγγειακά στοιχεία <sup>[68]</sup>.

Το σπινθηρογράφημα οστών με Tc<sup>99m</sup> (BS) αποτελεί την εξέταση εκλογής για τον εντοπισμό πολλαπλών εντοπίσεων. Παρότι θεωρητικά το PET/CT έχει μεγαλύτερη χρηστικότητα για τον καθορισμό της απόκρισης του όγκου στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία, μελέτες επιβεβαιώνουν την υπεροχή του κλασσικού BS για τον εντοπισμό πιθανών οστικών μεταστάσεων και την υπεροχή της αξονικής τομογραφίας στον εντοπισμό πνευμονικών μεταστάσεων <sup>[69,70]</sup>. Ο συνδυασμός PET/CT με BS αυξάνει την ευαισθησία εντοπισμού οστικών μεταστάσεων <sup>[71]</sup>.

Η ψηφιακή ή μαγνητική αγγειογραφία ενίοτε περιλαμβάνεται στον απεικονιστικό έλεγχο για την καλύτερη απεικόνιση της σχέσης του όγκου με τα νευροαγγειακά στοιχεία ή σε περιπτώσεις χημειοεμβολισμού.

Η βιοψία πάντοτε έπεται του πλήρους απεικονιστικού ελέγχου. Η βιοψία πάντοτε διενεργείται από τον ίδιο χειρουργό που θα εκτελέσει και την κυρίως επέμβαση, κατά προτίμηση επέμβαση τύπου διάσωσης μέλους. Οι βασικές αρχές βιοψίας περιγράφονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1: Βασικές αρχές βιοψίας <sup>[72]</sup>.**

1.	Πάντα το τελευταίο βήμα της διαγνωστικής διαδικασίας
2.	Πάντοτε ο ίδιος χειρουργός που θα εκτελέσει την κυρίως επέμβαση
3.	τομή δέρματος στην περιοχή όπου προβλέπεται να γίνει η τομή της τελικής επέμβασης (η ουλή της βιοψίας θα αφαιρεθεί κατά την τελική επέμβαση).
4.	όταν γίνεται trocar biopsy να γίνεται πάντοτε μέσω μυϊκών μαζών και ποτέ διαμέσου μεσομύϊων διαφραγμάτων. Ποτέ διαρθρική βιοψία.
5.	όχι εγκάρσιες τομές
6.	υλικό από την περιφέρεια του όγκου
7.	να στέλνεται πάντοτε και καλλιέργεια
8.	επιμελή αιμόσταση, σύγκλιση κάψας, στρωμάτων ,αποφυγή τοποθέτησης παροχέτευσης
9.	πάντοτε στο ίδιο διαμέρισμα

### 1.2.3. Σταδιοποίηση

Μετά τον προεγχειρητικό έλεγχο έπεται η σταδιοποίηση του οστεοσαρκώματος που γίνεται συνήθως βάσει κλίμακος της Musculoskeletal Tumor Society (MSTS). Πρόκειται για σύστημα σταδιοποίησης που προτάθηκε από τον Enneking και αποτελεί σύστημα χειρουργικής σταδιοποίησης [73]. Χαρακτηρίζει τα μη μεταστατικά οστεοσαρκώματα ανάλογα με τον βαθμό κακοήθειας τους σε στάδιο I (χαμηλή κακοήθεια) και σε στάδιο II (υψηλή κακοήθεια). Περαιτέρω υποδιαιρεί τα στάδια ανάλογα με την τοπική επέκταση του όγκου (A= ενδοδιαμερισματικός όγκος, B= εξωδιαμερισματικός όγκος, όπου για το οστεοσάρκωμα ως εξωδιαμερισματικό ορίζεται η επέκταση του όγκου εκτός προσβεβλημένου οστού). Ασθενείς με μετάσταση χαρακτηρίζονται ως σταδίου III [73].

**Πίνακας 2: Σύστημα σταδιοποίησης του Enneking**

Stage	Grade	Site	Metastasis
IA	Low (G1)	Intracompartmental (T1)	No metastasis (M0)
IB	Low (G1)	Extracompartmental (T2)	No metastasis (M0)
IIA	High (G2)	Intracompartmental (T1)	No metastasis (M0)
IIB	High (G2)	Extracompartmental (T2)	No metastasis (M0)
III	Any (G)	Any (T)	Regional or distant metastasis (M1)

Ενίοτε χρησιμοποιείται η κλίμακα σταδιοποίησης της American Joint Committee on Cancer (AJCC), όπως φαίνεται στον πίνακα 3 [74]. Το G αντιπροσωπεύει τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, το T αντιπροσωπεύει το μέγεθος του όγκου, N αντιπροσωπεύει την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων και M την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων.

**Πίνακας 3: Σύστημα σταδιοποίησης AJCC**

Stage	Primary tumor (T)	Regional lymph node (N)	Distant metastasis (M)	Histologic grade (G)
IA	T1	N0	M0	G1 or GX
IB	T2 or T3	N0	M0	G1 or GX
IIA	T1	N0	M0	G2 or G3
IIB	T2	N0	M0	G2 or G3
III	T3	N0	M0	G2 or G3
IVA	Any T	N0	M1a	Any G
IVB	Any T	N1	Any M	Any G
	Any T	Any N	M1b	Any G

Λεζάντα: GX= κακοήθεια δεν μπορεί να καθορισθεί; G1= χαμηλή κακοήθεια; G3-4 = υψηλή κακοήθεια; T1= μέγιστη διάμετρος όγκου <8 εκ.; T2= μέγιστη διάμετρος του όγκου > ή = 8 εκ.; T3 = skip μεταστάσεις; M0=χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις; M1a= μετάσταση πνευμονική; M1b=μετάσταση απομακρυσμένη μη πνευμονική.

#### 1.2.4. Ιστολογική Ταξινόμηση

Η ιστολογική διάγνωση του οστεοσαρκώματος βασίζεται στην ύπαρξη κακοήθων σαρκοματωδών κυττάρων στρώματος που παράγουν άωρο (νεοπλασματικό) οστεοειδές και οστούν <sup>[75]</sup>. Το οστεοσάρκωμα πιστεύεται ότι προέρχεται από μεσεγχειματικό πολυδύναμο κυτταρικό κλώνο ικανό να διαφοροποιηθεί προς ινώδη ιστό, χόνδρο ή οστούν. Έτσι ιστολογικώς μπορεί να έχει ομοιότητες με χονδροσαρκώματα και ινοσαρκώματα από τα οποία πρέπει να διαφοροδιαγιγνώσκεται. Το κύριο διαγνωστικό κριτήριο είναι η παραγωγή άωρου οστού η οποία δεν ανευρίσκεται στους άλλους όγκους. Ορισμένα οστεοσαρκώματα παρουσιάζουν ελάχιστη παραγωγή άωρου οστού και ποικίλλουσα ιστομορφολογία. Σε αντίθεση με το σάρκωμα Ewing και πολλά σαρκώματα μαλακών μορίων στο οστεοσάρκωμα δεν ανευρίσκεται χαρακτηριστική παθογνωμονική χρωμοσωμική μετάθεση <sup>[75,76]</sup>.

Κλασσικό οστεοσάρκωμα: Το κλασσικό (ενδομυελικό υψηλής κακοήθειας) οστεοσάρκωμα αποτελεί το 90% των οστεοσαρκωμάτων. Οι όγκοι αυτοί αναπτύσσονται συνήθως στις μεταφύσεις των μακρών οστών σε έφηβους <sup>[77]</sup>. Ιστολογικώς όλα τα οστοσαρκώματα είναι μεικτού τύπου. Ανάλογα με την επικρατούσα κυτταρική σειρά διακρίνονται σε οστεοβλαστικού τύπου (50% των κλασσικών οστεοσαρκωμάτων), χονδροβλαστικού τύπου (25% των κλασσικών οστεοσαρκωμάτων) και ινοβλαστικού τύπου (25% των κλασσικών οστεοσαρκωμάτων) <sup>[63]</sup>. Στα οστεοβλαστικά οστεοσαρκώματα η άφθονη παραγωγή οστεοειδούς δίκην άκομψου δαντελωτού περιβλήματος γύρω από τα κύτταρα είναι χαρακτηριστική. Το ποσοστό επιμετάλλωσης ποικίλλει. Στα ινοβλαστικού τύπου οστεοσαρκώματα τα υψηλής κακοήθειας ατρακτοειδή κύτταρα στρώματος με εστιακή μόνο παραγωγή οστεοειδούς είναι χαρακτηριστικά. Ορισμένες περιπτώσεις ομοιάζουν με κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα, η διαφορική διάγνωση όμως μπορεί να γίνει με την ανίχνευση οστεοειδούς. Στα χονδροβλαστικά οστεοσαρκώματα χαρακτηριστική είναι η παραγωγή χονροειδούς μεσοκυττάριας ουσίας. Ενώ στην πλειονότητα ο όγκος έχει χαρακτηριστικά χαμηλής κακοήθειας, ορισμένες περιοχές παρουσιάζουν υψηλή κυτταρική ατυπία που είναι χαρακτηριστικό όγκων υψηλού βαθμού κακοήθειας. Οι χονδροβλαστικές εστίες αναμιγνύονται με καοήθη ατρακτοειδή κύτταρα που παράγουν οστεοειδές.

#### 1.2.5. Ιστολογικές Παραλλαγές

Εκτός από τις προαναφερθείσες τρεις υποκατηγορίες του κλασσικού οστεοσαρκώματος υπάρχουν κι άλλοι σπανιότεροι ιστολογικοί τύποι.

### Μικροκυτταρικό οστεοσάρκωμα

Το μικροκυτταρικό οστεοσάρκωμα σε απλή χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης κάτω από το μικροσκόπιο ομοιάζει με άλλους “small round cell” όγκους όπως το Ewing’s σάρκωμα [78]. Ο ανοσοιστοχημικός έλεγχος, κυτταρογενετικές μέθοδοι και μοριακή βιολογία θέτουν την σωστή διάγνωση [78,79].

### Τελαγγειεκτατικό οστεοσάρκωμα

Πρόκειται για υψηλής κακοήθειας αγγειοβριθή όγκο που παράγει ελάχιστο οστεοειδές. Στον απλό απεικονιστικό έλεγχο η καθαρά λυτική εικόνα του τελαγγειεκτατικού οστεοσαρκώματος μπορεί να ομοιάζει με ανευρυσματική κύστη ή γιγαντοκυτταρικό όγκο των οστών.

Μακροσκοπικώς πρόκειται για μια κύστη γεμάτη με αίμα (multicystic bag of blood) και η σαρκωματώδης μάζα μπορεί να μην είναι εμφανής [77]. Έτσι το υλικό της βιοψίας μπορεί να μην είναι διαγνωστικό. Ιστολογικώς η ελάχιστη παραγωγή οστεοειδούς και η ύπαρξη πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων θυμίζουν γιγαντοκυτταρικό όγκο των οστών [80].

### Πολυεστικά οστεοσάρκωμα

Σπανιότατα υπάρχει πολλαπλή εντόπιση του πρωτοπαθούς οστεοσαρκώματος κατά την διάγνωση. Δεν μπορεί να οριστεί αν πρόκειται για πραγματική ταυτόχρονη πολυεστιακή εντόπιση του όγκου ή μετάσταση στο οστό. Η πρόγνωση του τύπου αυτού είναι χειρότερη από τους προηγούμενους. Μπορεί να εμφανιστεί και ως δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα επι εδάφους παλιών οστικών βλαβών

### Κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα των οστών

Από πολλούς θεωρείται υπότυπος του οστεοσαρκώματος, χωρίς όμως παραγωγή οστεοειδούς. Η κλινική εικόνα, βιολογική συμπεριφορά και πρόγνωση είναι παρόμοια με του κλασσικού οστεοσαρκώματος [81].

### Επιφανειακό οστεοσάρκωμα

Σε αντίθεση με τους προηγούμενους τύπου, τα επιφανειακά οστεοσαρκώματα έχουν ήπια βιολογική συμπεριφορά και καλύτερη πρόγνωση. Εδώ ανήκουν τα χαμηλής κακοήθειας παροστικό και περιοστικό οστεοσάρκωμα και το υψηλής κακοήθειας επιφανειακό οστεοσάρκωμα [82,83]. Η χειρουργική θεραπεία χωρίς συμπληρωματική θεραπεία είναι αρκετή για τους χαμηλούς κακοήθειας υπότυπους, εφόσον δεν επεκτείνονται ενδοοστικά [84].

Παραοστικό οστέοσάρκωμα: Το τυπικό παραοστικό οστέοσάρκωμα είναι μια επιφανειακή βλάβη αποτελούμενη από χαμηλής κακοήθειας ινοβλάστες που παράγουν άωρο οστούν. Αφορά συνήθως μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες σε σχέση με το κλασικό οστέοσάρκωμα, μεταξύ 20 και 40 ετών. Με μόνη την χειρουργική θεραπεία η επιβίωση ανέρχεται 80-90% <sup>[84]</sup>.

Περιοστικό οστέοσάρκωμα: Πρόκειται για έναν όγκο ποικίλλουσας βιολογικής συμπεριφοράς με κύρια εντόπιση την εγγύς κνήμη σε ηλικιακές ομάδες παρόμοιες με αυτές του κλασικού οστέοσάρκωματος. Η πιθανότητα μετάστασης είναι σαφώς μικρότερη του κλασικού οστέοσάρκωματος αλλά σαφώς μεγαλύτερη του παραοστικού τύπου. Για τον λόγο αυτό ορισμένα κέντρα εφαρμόζουν και συμπληρωματική θεραπεία (μετεγχειρητική χημειοθεραπεία) <sup>[85]</sup>.

Εικόνα 3: Περιοστικό οστέοσάρκωμα μηριαίου



### 1.3. Βιολογική Συμπεριφορά –Πρόγνωση

Η επιθετική βιολογική συμπεριφορά του οστέοσάρκωματος εκφράζεται στην κλινική πράξη με ταχεία πορεία. Το μεσοδιάστημα μεταξύ πρώτου συμπτώματος και διάγνωσης κυμαίνεται μεταξύ 2 και 6 μήνες, ενώ ο χρόνος διπλασιασμού της νεοπλασματικής μάζας είναι 2 έως 4 εβδομάδες. Κατά την διάγνωση 80% των οστέοσάρκωμάτων είναι σταδίου II-B, μόνον 5% είναι II-A, και 15% είναι σταδίου III παρουσιάζοντας μετάσταση (απομακρυσμένη ή skip) <sup>[15]</sup>.

Πριν την χρήση χημειοθεραπείας 80-90% των ασθενών με οστέοσάρκωμα κατέληγαν λόγω μεταστατικής νόσου, παρότι η πρωτοπαθής εστία είχε αφαιρεθεί εξολοκλήρου

(ακρωτηριασμός)<sup>[62]</sup>. Υπό αυτής της έννοιας υποστηρίζεται ότι το 80-90% των οστεοσαρκωμάτων παρουσιάζει μικρομεταστάσεις (δηλαδή μη ορατές κατά τον απεικονιστικό έλεγχο) κατά την διάγνωση. Οι μεταστάσεις αφορούν κυρίως τους πνεύμονες<sup>[61]</sup>. Εξωπνευμονικές μεταστάσεις σε οστά ή άλλα όργανα είναι ιδιαίτερα σπάνιες. Σκίρ μεταστάσεις ανευρίσκονται κάτω από 5% των περιπτώσεων, και μεταστάσεις στους εγχώριους λεμφαδένες σε ποσοστό 1-2%<sup>[86,87]</sup>. Ο θάνατος επέρχεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς λόγω πνευμονικής ανεπάρκειας λόγω πολλαπλών πνευμονικών μεταστάσεων, πνευμονική αιμορραγία, πνευμοθώρακα<sup>[88]</sup>. Χωρίς χημειοθεραπεία η 10ετής επιβίωση ήταν περίπου 15%. Με τα σημερινά θεραπευτικά σχήματα το ποσοστό αυτό είναι 70% για τα μη μεταστατικά οστεοσαρκώματα κατά την διάγνωση που αφορούν τα μακρά οστά<sup>[17]</sup>.

Παράγοντες που καθορίζουν την πορεία-πρόγνωση του οστεοσαρκώματος είναι οι εξής<sup>[89-93]</sup>:

- Η έκταση της βλάβης: Ασθενείς με μεταστατική νόσο κατά την διάγνωση έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση, ιδίως όταν οι μεταστατικές εστίες δεν μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά. Μελέτη έδειξε ότι η 5ετής επιβίωση ασθενών με περισσότερες των 5 μεταστατικών εστιών κατά την διάγνωση είχαν ποσοστό 5ετούς επιβίωσης μόνο 19%<sup>[94]</sup>.
- Η εντόπιση της μάζας: Η εντόπιση στον αξονικό σκελετό και στα εγγύς τμήματα των μακρών οστών αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα.
- Το μέγεθος της μάζας αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη.
- Σκίρ μεταστάσεις: Καθορίζουν δυσμενώς, όπως και οι πνευμονικές μεταστάσεις, την πρόγνωση.
- Το παθολογικό κάταγμα κατά την διάγνωση αποτελεί ιδιαίτερα δυσμενή προγνωστικό παράγοντα.
- Βασικός προγνωστικός δείκτης αποτελεί και το ποσοστό νέκρωσης του όγκου στην χορηγούμενη προεγχειρητική χημειοθεραπεία (ιστολογική ανταπόκριση του οστεοσαρκώματος στην χημειοθεραπεία – βλέπε πίνακα 4 όπως και παράγραφο 1.4.1). Ανταπόκριση <90%, ήτοι βαθμού I και II ανταπόκρισης κατά Ηυνος αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη.

Πίνακας 4: Βαθμός ιστολογικής ανταπόκρισης στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία

Grade	Tumor necrosis
Grade I	0%-50%
Grade II	51%-90%
Grade III	91%-99%
Grade IV	100%



Η τοπική υποτροπή αναμένεται σε 5-7% των ασθενών με συντηρητική χειρουργική τεχνική (επέμβαση διάσωσης μέλους) και 4-5% σε περιπτώσεις ακρωτηριασμού<sup>[17,62]</sup>. Η επίπτωση τοπικής υποτροπής σχετίζεται με τα επιτευχθέντα χειρουργικά όρια και την ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία. Η εμφάνιση τοπικής υποτροπής αποτελεί ένα δυσοίωνο γεγονός που ακολουθείται συνήθως από μετάσταση<sup>[85,95]</sup>. Οι μεταστάσεις - κυρίως στους πνεύμονες- εμφανίζονται τα πρώτα 2-3 έτη. Για τον λόγο αυτό ο καθορισμός της 3ετούς επιβίωσης χωρίς νόσο (disease-free survival) είναι σημαντική για τα οστεοσαρκώματα. Αναφέρονται σπάνιες περιπτώσεις τοπικής υποτροπής ή/και μετάστασης 5-10 έτη μετά θεραπείας<sup>[96]</sup>.

Η έρευνα εστιάζεται στην ανεύρεση αξιόπιστων προγνωστικών δεικτών. Η ηλικία, το φύλο, το μέγεθος του όγκου, η εντόπιση, η αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης και της γαλακτικής δεϋδρογενάσης, ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας, ο ιστολογικός υπότυπος έχουν θεωρηθεί κατά διαστήματα ως προγνωστικοί δείκτες χωρίς όμως γενική αποδοχή από την επιστημονική κοινότητα. Οι προγνωστικοί δείκτες με την πιο ευρεία αποδοχή είναι<sup>[97]</sup>:

- η εντόπιση του όγκου (αξονικός σκελετός έναντι μακρά οστά),
- η ανταπόκριση του οστεοσαρκώματος στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία
- η έκφραση P γλυκοπρωτεΐνης από τα καρκινικά κύτταρα (υποδεικνύοντας αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα)<sup>[98]</sup> και
- η εκτομή σε υγιή όρια, ή αντιθέτως η ύπαρξη μακροσκοπικώς ή μικροσκοπικώς υπολειμματικής νόσου.

## **1.4. Θεραπεία**

Η σύγχρονη θεραπεία του οστεοσαρκώματος είναι συνδυασμός χημειοθεραπείας, χειρουργικής θεραπείας της πρωτοπαθούς εστίας και χειρουργικής θεραπείας των μεταστάσεων (συνήθως πνευμονικών).

### **1.4.1. Χημειοθεραπεία**

Η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία (adjuvant chemotherapy) άρχισε να χρησιμοποιείται συστηματικά στην θεραπεία του οστεοσαρκώματος το έτος 1971<sup>[99]</sup>. Τα αρχικά χρησιμοποιούμενα σκευάσματα ήταν αδριαμικίνη (doxorubicin, ADM), πλατίνα (cis-platin) και μεθοτρεξάτη (methotrexate MTX)<sup>[100]</sup>. Παρά την αρχική δυσπιστία των ορθοπαιδικών και ογκολόγων, μελέτες έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά της επιβίωσης (disease-free

survival), η οποία με χρήση της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας ανερχόταν >40% σε σύγκριση με επιβίωση 10-20% χωρίς την χρήση χημειοθεραπείας <sup>[101]</sup>. Συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν μετά το 1977, όπου ο Rosen με τους συνεργάτες του ανακοίνωσαν 4ετής επιβίωση 52% μετά από συνδυασμένη θεραπεία δηλαδή προ- και μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας (neoadjuvant chemotherapy) με υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης (HDMTX-High Dose Methotrexate). Το θεραπευτικό σχήμα που χρησιμοποιείται ακόμη σήμερα αναφέρεται ως Rosen T10 protocol <sup>[102-104]</sup>.

Τα κύρια χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα σήμερα είναι η αδριαμυκίνη (ADM), μεθοτρεξάτη (MTX), η πλατίνα (Cisdiaminoplatinum-CDP), και η ιφοσφαμίδη (IFO). Σε ορισμένα πρωτόκολλα χρησιμοποιούνται μπλεομυκίνη (Bleomycin), κυκλοφωσφαμίδη (CPM), ακτινομυκίνη- D και ετοποσίδη. Τα φάρμακα αυτά είναι μυελοτοξικά, επιπλέον η MTX, CDP και IFO είναι νεφροτοξικά, CDP και MTX νευροτοξικά και επιπλέον η ADM καρδιοτοξική.

Η χρήση προ- και μετεγχειρητικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας αποτελεί πλέον την καθιερωμένη προσέγγιση στα περισσότερα κέντρα <sup>[104-108]</sup>. Τα πλεονεκτήματα της neoadjuvant χημειοθεραπείας θεωρούνται:

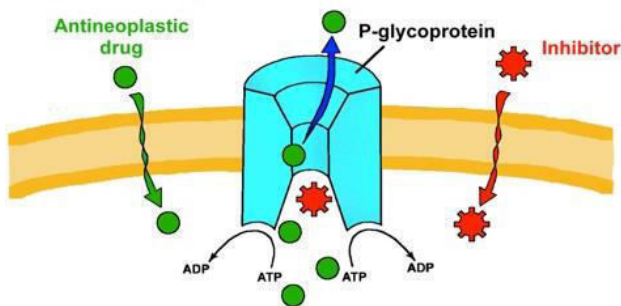
- Η χωρίς καθυστέρηση αντιμετώπιση ενδεχομένων μικρομεταστάσεων.
- Η μείωση του μεγέθους του όγκου και η διευκόλυνση της αφαίρεσης αυτού. Επιθυμητή είναι η υποσταδιοποίηση του όγκου μετά το πέρας της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας. Έτσι λ.χ. ένα οστεοσάρκωμα που είναι οριακά στάδιο IIB εξωδιαμερισματικό θα ήταν επιθυμητό να υποσταδιοποιηθεί σε IIA. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε όγκους που γειτνιάζουν σε νευροαγγειακά δεμάτια.
- Η ανταπόκριση του οστεοσαρκώματος στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία (ιστολογική ανταπόκριση κατά Huvos) αποτελεί κατά τους περισσότερους ερευνητές αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη της νόσου <sup>[109]</sup>. Ουσιαστικά σε περιπτώσεις όγκων με βαθμό III ή IV ανταπόκριση, το μετεγχειρητικό θεραπευτικό σχήμα είναι παρόμοιο με το προεγχειρητικό. Σε βαθμό I ή II ανταπόκριση μετεγχειρητικώς χρησιμοποιείται συνδυασμός χημειοθεραπευτικών στην προσπάθεια νέκρωσης του όγκου.

Μελέτες επισημαίνουν ότι ενδεχόμενα μειονεκτήματα της καθιερωμένης αυτής προσέγγισης αποτελεί η πιθανή δημιουργία χημειοανθεκτικών κλώνων σε ασθενείς με μη ικανοποιητική ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Προτείνουν μόνο μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με χρήση συνδυασμό χημειοθεραπευτικών ουσιών προτείνοντας ως πλεονεκτήματα <sup>[110-112]</sup>:

- Αυξημένη αντικαρκινική δράση
- Μείωση της τοξικότητας της χημειοθεραπείας
- Ταυτόχρονη δράση σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου
- Ελάττωση πιθανότητας ανάπτυξης αντοχής

Παρά την συνεχή έρευνα και βελτίωση της χημειοθεραπείας 20%-35% των ασθενών με οστεοσάρκωμα καταλήγουν. Ο κύριος λόγος αποτυχίας της θεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς είναι η ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας που ορίζεται ως η μη ανταπόκριση του καρκινικού κυττάρου στην χημειοθεραπευτική ουσία που του χορηγήθηκε <sup>[113-115]</sup>. Ο μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής του οστεοσαρκώματος φαίνεται να σχετίζεται με την P-γλυκοπρωτεΐνη, προϊόν έκφρασης του γονιδίου MDR-1<sup>[116,117]</sup>. Στο σχήμα 3 επεξηγούνται οι μηχανισμοί αντοχής στην χημειοθεραπεία.

**Σχήμα 3: Μηχανισμοί αντοχής στην χημειοθεραπεία.**



Για να είναι αποτελεσματικό ένα χορηγούμενο φάρμακο θα πρέπει να εισέλθει στο κύτταρο και να επιδράσει σε κάποιο μεταβολικό μονοπάτι. Η αυξημένη τριχοειδική πίεση, η μειωμένη αιμάτωση ενός νεοπλασματος αποτελούν φυσικούς φραγμούς στην είσοδο χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Οι αυξημένες τριχοειδικές πιέσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα της γρήγορης ανάπτυξης του όγκου σε ένα ανένδοτο διαμέρισμα. Η μειωμένη παροχή αίματος συνήθως οφείλεται στην αναλογικά ταχύτερη ανάπτυξη του όγκου σε σχέση με την αγγείωση αυτού. Τα νεοπλάσματα εξάλλου συνήθως είναι υποξικά και συνήθως η γλυκόζη μεταβολίζεται αναεροβίως σε γαλακτικό οξύ αντί για διοξείδιο του άνθρακα. Το γαλακτικό οξύ δρα ως ιόν και αυξάνει περαιτέρω την ενδοογκική πίεση. Πέραν των φυσικών αυτών φραγμών υπάρχουν και ειδική μηχανισμοί που εξυπηρετούν ορισμένα οστεοσαρκώματα στην αντοχή προς τα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα. Ένας μηχανισμός που έχει μελετηθεί επαρκώς είναι η ύπαρξη P γλυκοπρωτεΐνης, προϊόν έκφρασης του γονιδίου MDR (Multi-drug-resistance gene). Πιστεύεται ότι η γλυκοπρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως διαμεμβρανική αντλία και προστατεύει –απαγορεύει την συγκέντρωση παραγόντων εντός του κυττάρου. Οι σχετικές έρευνες με ανοσοιστοχημικές μεθόδους ανευρίσκουν έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης σε 1-40% των οστεοσαρκωμάτων.

Ο κύριος προβληματισμός, που δεν έχει απαντηθεί, αποτελεί το γεγονός γιατί σαρκώματα ίδιου ιστολογικού τύπου και υπότυπου έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά.

Συμπερασματικά το καθιερωμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο για οστεοσάρκωμα συνοψίζεται ως εξής <sup>[108-112,118]</sup>:

- Προεγχειρητική χημειοθεραπεία αμέσως μετά την διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου. Το προτεινόμενο διεθνώς σχήμα για ενήλικα κάτω των 35 ετών είναι HDMTX, ADM,CDP, το οποίο ονομάζεται σχήμα MAP, ενώ για ενήλικα άνω των 35 ετών είναι ADM,CDP συνήθως για 2 μήνες <sup>[75]</sup>.
- Επανασταδιοποίηση του όγκου αποτιμώντας την ανταπόκριση του στην θεραπεία:
  - Κλινικώς: μείωση του πόνου, ελάττωση της ψηλαφητής μάζας.
  - Εργαστηριακώς: ελάττωση της αλκαλικής φωσφατάσης
  - Απεικονιστικώς: μείωση του μεγέθους, ασβεστοποίηση του όγκου, δημιουργία κάψας, μειωμένη πρόσληψη ραδιοφαρμάκου, απεικονιστική υποσταδιοποίηση
- Χειρουργική θεραπεία μόλις η γενική κατάσταση του ασθενούς το επιτρέπει. Ιστολογική εξέταση του παρασκευάσματος εργαστήριο και καθορισμός της ιστολογικής ανταπόκρισης στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία.
- 1-2 εβδομάδες μετεγχειρητικώς έναρξη χημειοθεραπεία με ίδιο σχήμα του προεγχειρητικού σε ανταπόκριση βαθμού III ή IV. Σε ανταπόκριση βαθμού I ή II χρήση συνδυασμού άλλων φαρμάκων. Η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία διαρκεί 4-6 μήνες.

#### 1.4.2. Χειρουργική Θεραπεία

Η είσοδος της χημειοθεραπείας στο θεραπευτικό πρωτόκολλο του οστεοσαρκώματος, η βελτίωση των απεικονιστικών μεθόδων και η βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών και υλικών επιτρέπει πλέον την αντιμετώπιση του 80-85% των ασθενών με οστεοσάρκωμα των άκρων να αντιμετωπίζονται με επέμβαση τύπου διάσωσης μέλους <sup>[119,120]</sup>. Χωρίς την χρήση χημειοθεραπείας η τοπική υποτροπή μετά από επέμβαση διάσωσης μέλους ήταν 70-80%, ενώ σήμερα είναι 5-7% <sup>[99,119,121]</sup>.

Στόχος της χειρουργικής θεραπείας είναι τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά υγιή όρια εκτομής. Επιθυμητά όρια εκτομής είναι τα 3-5 εκ. στο οστόν και 2-3 εκ. στα μαλακά μόρια. <sup>[122-124]</sup>. Διεγχειρητικώς γίνεται πάντα έλεγχος των ορίων εκτομής με διεγχειρητική κυτταρολογική του μυελού των οστών και ταχεία βιοψία και κυτταρολογική στα όρια εκτομής των μαλακών μορίων. Όταν τα όρια εκτομής είναι υγιή, τότε η χωρίς συμπτώματα

(event-free) και η συνολική επιβίωση είναι παρόμοια σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε διάσωση μέλους του άκρου και σε ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με ακρωτηριασμό <sup>[99,125]</sup>.

Μετά την αφαίρεση του όγκου ακολουθεί η λειτουργική αποκατάσταση που αποτελείται από αποκατάσταση του οστικού ελλείματος, αποκατάσταση του ελλείματος μαλακών μορίων και πιθανώς αποκατάσταση του ελλείματος δέρματος.

Στις επεμβάσεις διάσωσης μέλους <sup>[123]</sup>:

- Πρωτεύον στόχος είναι ο τοπικός έλεγχος και δευτερεύον η λειτουργικότητα του άκρου
- Αντένδειξη αποτελεί η διήθηση αγγείων ή νεύρων. Η εκτομή και αντικατάσταση αγγείου είναι δυνατή με πτωχά όμως αποτελέσματα <sup>[126]</sup>.
- Το παθολογικό κατάγμα αποτελεί σχετική αντένδειξη. Αρκετή ογκολόγοι σε ικανοποιητική ανταπόκριση του οστεοσαρκώματος στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία προβαίνουν σε επέμβαση διάσωσης μέλους μετά από παθολογικό κατάγμα.

#### **1.4.3. Μεταστατικό Οστεοσάρκωμα**

Ασθενείς με πρωτοπαθές οστεοσάρκωμα και πνευμονικές μεταστάσεις μπορεί να είναι υποψήφιοι διάσωσης μέλους. Η χειρουργική αφαίρεση τόσο της πρωτοπαθούς εστίας όσο και των πνευμονικών μεταστάσεων όταν είναι εφικτή προσδίδει, σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία, πιθανότητα 30-50% επιβίωσης <sup>[127]</sup>.

#### **1.4.4. Ακτινοθεραπεία**

Η ακτινοθεραπεία δεν έχει θέση στην θεραπεία του οστεοσαρκώματος εκτός των εξής περιπτώσεων <sup>[128-130]</sup>:

- Ασθενείς με ανεγχείρητο όγκο (παρηγορητική θεραπεία )
- Πιθανώς σε θετικά όρια εκτομής
- Στην σπάνια περίπτωση ενός μικροκυτταρικού οστεοσαρκώματος (small cell osteosarcoma).

#### 1.4.5. Νεότερα φάρμακα και έρευνα

Από το 1978, με την είσοδο της προ- και μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας στο πρωτόκολλο αντιμετώπισης του οστεοσαρκώματος, δεν έχει ουσιαστικά γίνει καμία πρόοδος όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών <sup>[120,131,132]</sup>. Σκοπός της σύγχρονης έρευνας είναι η αύξηση της επιβίωσης ασθενών με οστεοσάρκωμα με ταυτόχρονη μείωση των παρενεργειών των φαρμάκων.

Μεθοτρεξάτη: Η μεθοτρεξάτη αποτελεί τον βασικό χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό παράγοντα, παρουσιάζοντας όμως σε υψηλές δόσεις μεγάλη τοξικότητα <sup>[133,134]</sup>. Σε έρευνα του St. Jude Childrens Research Hospital (OS99 Trial) χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικό σχήμα με Carboplatin, Ifosfamide, Doxorubicin χωρίς HDMTX με συγκρίσιμα της καθιερωμένης θεραπείας αποτελέσματα όσον αφορά την 5ετή επιβίωση <sup>[133]</sup>.

Διφωσφονικά: Έρευνες έχουν υποδείξει αντινεοπλασματική δράση των διφωσφονικών σε οστεοσάρκωμα. Συγκεκριμένα έχει υποδειχτεί άμεση επίδραση επί των καρκινικών κυττάρων σε in vitro μελέτες με αναστολή πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης <sup>[135,136]</sup>. Επίσης τα διφωσφονικά αναστέλλουν πιθανώς την πρόσφυση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλουν πιθανώς τις μεταλλοπρωτεϊνάσες <sup>[135,137]</sup>. Η ζολενδρονάτη μελετάτε ως διφωσφονικό με την δραστικότερη αντινεοπλασματική δράση στο ΟΣ σε κλινικές μελέτες <sup>[138-140]</sup>.

Imatinib mesylate και αναστολείς mTOR: Η κατανόηση των μηχανισμών που χρησιμοποιούνται σε μοριακό επίπεδο για την ογκογένεση αποτελεί τον επιθυμητό μελλοντικό στόχο της έρευνας. Μεταφράζοντας την βιολογική συμπεριφορά του όγκου σε μοριακό επίπεδο θα μας βοηθήσει τόσο να κατανοήσουμε την διαδικασία της ογκογένεσης, όσο και να παρέμβουμε θεραπευτικώς μπλοκάροντας συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια. Με άλλα λόγια η αποκρυπτογράφηση κάποιον έστω από τις μεταβολικές οδούς που χρησιμοποιεί κάποιος όγκος για να επιβιώσει, μας δίνει την δυνατότητα να παρέμβουμε στοχευμένα στην συγκεκριμένη μεταβολική διαδικασία με σκοπό να την αναστείλουμε. Παραδείγματα τέτοιας στοχευμένης θεραπείας (targeted therapy) αποτελεί το φάρμακο imatinib mesylate, ένας εκλεκτικός αναστολέας της τυροσινοκινάσης, αναστέλλοντας ειδικούς υποδοχείς τυροσινοκινάσης (RTK's) και οδηγώντας σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το φάρμακο αυτό εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στους στροματικούς όγκους <sup>[157,158]</sup>. Παρόμοιοι αναστολείς των υποδοχέων τυροσινοκινάσης δοκιμάζονται και στο οστεοσαρκώματα όπως το mTOR inhibitor <sup>[143,159]</sup>.

Η έρευνα σχετικώς με τον καρκίνο έχει στραφεί την τελευταία δεκαετία στην κατανόηση της συμπεριφοράς του όγκου μέσω της μοριακής βιολογίας. Νέοι τρόποι προσέγγισης που βρίσκονται υπό έρευνα σχετίζονται κυρίως με φάρμακα που μπλοκάρουν κάποια συγκεκριμένη φάση ή διαδικασία του κυτταρικού κύκλου του οστεοσαρκώματος. Τέτοια παραδείγματα είναι:

- Ο συνδυασμός gemcitabine (αντιμεταβολίτης- ανταγωνιστής της πυριμιδίνης) και docetaxel (αντινεοπλασματικός παράγων- φυτικό παράγωγο) <sup>[141]</sup>.
- Ο συνδυασμός αναστολέα mTOR με άλλους αναστολής των κινασών <sup>[142,143]</sup>.
- Ανοσοθεραπεία με MTP-PE. Ο παράγων αυτός προέρχεται από το γνωστό εμβόλιο BCG και έχει σχέση με την τροποποίηση της κυτταρικής ανοσίας <sup>[144-146]</sup>. Ο συνδυασμός κλασσικής χημειοθεραπείας (doxorubicin, cisplatin, HDMTX, ifosfamide) και MTP-PE (muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine) υποστηρίζεται από μελέτη να είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας του οστεοσαρκώματος με στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη επιβίωση (6ετής επιβίωση 78% έναντι 70% στην ομάδα ελέγχου χωρίς MTP-PE) <sup>[147]</sup>. Πρώτα αποτελέσματα συνδυασμού ifosfamide (ifosfamide) και MTP-PE που χρησιμοποιήθηκαν σε παιδιατρικές ογκολογικές κλινικές δείχνουν επιβίωση της τάξης του 65%, συγκρίσιμη με την αντίστοιχη επιβίωση με χρήση των κλασσικών χημειοθεραπευτικών <sup>[148]</sup>.
- Άλλος παράγων ανοσοθεραπείας υπό έρευνας είναι ο granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Μελέτη υποστηρίζει ότι η εισπνοή του συγκεκριμένου παράγοντα έχει αντινεοπλασματική δράση <sup>[149,150]</sup>.
- Άλλες προτάσεις-πρωτόκολλα σχετιζόμενα με το μη-χειρουργικό τμήμα της θεραπείας του οστεοσαρκώματος είναι η έγχυση χημειοθεραπευτικού στην τροφοφόρο αρτηρία του όγκου (infusion), η περιοχική μέσω εξωσωματικής χημειοθεραπείας του άκρου χρήση TNF alpha-1a (isolated limb perfusion), ο προεγχειρητικός χημειοεμβολισμός του όγκου <sup>[151-153]</sup>.
- Άλλοι παράγοντες υπό μελέτη είναι ο Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 και ο Insulin - like Growth Factor Pathway <sup>[154-156]</sup>.
- Ένας σημαντικός παράγων που φαίνεται να εμπλέκεται στους περισσότερους όγκους στον μηχανισμό αγγειογένεσης είναι ο VEGF A,-B,-C και -D. Μπλοκάροντας τον παράγων VEGF θεωρητικά μειώνεται η αγγειογενετική ικανότητα του όγκου . Σε ερευνητικό επίπεδο το πολυμερές “HPMA copolymer-ALN-TNP-470 conjugate” φαίνεται in vitro να μπλοκάρει το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι με πιθανή μελλοντική εφαρμογή σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα <sup>[160,161]</sup>.

- Η ενδοστατίνη είναι επίσης ένας αντιαγγειογενετικός παράγοντας που σε πειραματικά μοντέλα οστεοσαρκώματος με πνευμονικές μεταστάσεις έχει θετική θεραπευτική επίπτωση <sup>[162]</sup>.
- Η απομόνωση παραγόντων από τον αρθρικό χόνδρο (που αποτελεί έναν φυσικό φραγμό διείσδυσης του οστεοσαρκώματος) με αντιαγγειογενετική δράση, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο μελλοντικό θεραπευτικό μοντέλο <sup>[163]</sup>.
- Ο μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής του οστεοσαρκώματος φαίνεται να σχετίζεται με την P-γλυκοπρωτεΐνη, προϊόν έκφρασης του γονιδίου MDR-1, όπως αναφέρεται λεπτομερώς στην παράγραφο 1.4.1. Οι σχετικές έρευνες με ανοσοιστοχημικές μεθόδους ανευρίσκουν έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης σε 1-40% των οστεοσαρκωμάτων. Ευνόητο είναι πως το μπλοκάρισμα της μεταγραφής του γονιδίου MDR-1 θα είχε ως αποτέλεσμα την πολύ ικανοποιητική δράση των κοινών χημειοθεραπευτικών που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία του οστεοσαρκώματος <sup>[165,166]</sup>.
- Τα νεοπλασματικά κύτταρα διαθέτουν αυξημένη ευαισθησία σε αυξητικούς παράγοντες και αυτούσια ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Η αποκρυπτογράφηση μέρους του μηχανισμού αυτού αποτελεί σκοπό της παρούσας μελέτης. Η χρήση συνδυασμού σωματοστατίνης και doxorubicin προτείνεται ως θεραπεία σταδίου III καρκίνου του προστάτη. Για το οστεοσάρκωμα υπάρχουν μόνο μοντέλα με πειραματόζωα και in vitro μελέτες, όπου η χρήση παραγόντων που μπλοκάρουν τους υποδοχείς αυξητικής ορμόνης-σωματοστατίνης οδηγεί σε επιβράδυνση της κυτταρικής αύξησης του όγκου. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικώς με την έρευνα που ασχολείται με τους αυξητικούς παράγοντες και το οστεοσάρκωμα αναγράφονται στην παράγραφο 4 <sup>[167]</sup>.
- Η ανεύρεση στοχευμένης θεραπείας που θα μπλοκάρει εκλεκτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί επίσης ενδιαφέρον στόχος της σύγχρονης έρευνας. Η ανθρώπινη οστεοποντίνη φαίνεται, in vitro, να εξυπηρετεί αυτόν τον σκοπό <sup>[164]</sup>. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) είναι στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών με ικανότητα διαφοροποίησης σε οστά, μυς, τένοντες και λιπώδη ιστό <sup>[168,169]</sup>. Διάφοροι ενδογενείς και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν κρίσιμο ρόλο στη στενή ρύθμιση της οστεογονικής διαφοροποίησης, οδηγώντας σε σχηματισμό οστού <sup>[170]</sup>. Υπάρχουν επίσης αρκετοί δείκτες οστεοβλαστικής διαφοροποίησης που υποδεικνύουν συγκεκριμένα χρονικά σημεία αυτού του μεταβολικού καταρράκτη, συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα συνδετικού ιστού (CTGF), της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), Osterix, Runx2, osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) και κολλαγόνου <sup>[170-180]</sup>. Η μη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της τελικής διαφοροποίησης των MSC, που υποδεικνύεται από την υπερέκφραση ή την απουσία αυτών των δεικτών, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη όγκων. Ως παράδειγμα το Runx2 ρυθμίζει τη διαφοροποίηση που προκαλείται από την οστική μορφογενετική



πρωτεΐνη (BMP). Στο OS, το Runx2 υποεκφράζεται σημαντικά και συνεπώς οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και κακή διαφοροποίηση, συμβάλλοντας σε έναν κακοήθη φαινότυπο <sup>[171]</sup>.

- Η 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) είναι ένας άλλος αγωνιστής πυρηνικών υποδοχέων συμμετέχοντας στην προώθηση της διαφοροποίησης κατά μήκος του οστεογονικού καταρράκτη <sup>[181]</sup>. Η 1,25(OH)2D3 προκαλεί έκφραση p21, που καταστέλλει την έκφραση του P53 ογκογονιδίου. Επίσης οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην οστική διαφοροποίηση και μελετώνται ως στόχοι θεραπείας <sup>[174,182]</sup>.

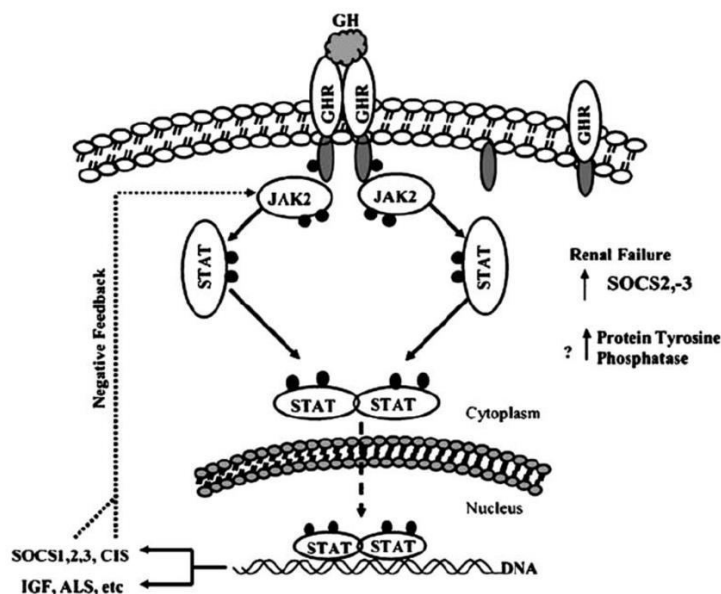
Παρότι οι ανακοινωθέντες εργασίες σχετικώς με την έρευνα και το οστεοσάρκωμα πληθαίνουν, δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως οι παθοφυσιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη, επιβίωση και μετάσταση του όγκου. Οι σημερινές διαθέσιμες πληροφορίες είναι τμήματα μόνο της συνολικής παθολογικής φυσιολογίας του όγκου. Ευχή και στόχος της έρευνας αποτελεί η συμπλήρωση των κενών και πλήρη αποκρυπτογράφηση της διεργασίας αυτής.

## 2. Αυξητική Ορμόνη

Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (hGH) ονομάζεται και σωματοτροπίνη. Είναι ένα πολυπεπτίδιο με τετραπλή ελικοειδή δομή, αποτελούμενο από 191 αμινοξέα και μοριακό βάρος 21500 Daltons. Παράγεται στην υπόφυση ως αποτέλεσμα ερεθισμού αυτής από την GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) που παράγεται από τον υποθάλαμο <sup>[183,184]</sup>.

**Βιολογική δράση της hGH:** Η αυξητική ορμόνη παρουσιάζει ειδικότητα δράσης ως προς το είδος από το οποίο προέρχεται, δηλαδή η αυξητική ορμόνη ζώων δεν έχει βιολογική δράση στον άνθρωπο και αντίστροφα. Αυτό οφείλεται στην ειδικότητα σύνδεσης που παρουσιάζει ο υποδοχέας GH (GHR Growth Hormone Receptor) στο όργανο στόχο του κάθε είδους για το αντίστοιχο ορμονικό μόριο. Η αυξητική ορμόνη όντας πολυπεπτίδιο δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Λειτουργεί βασιζόμενη σε υποδοχείς στο κυτταρικό τοίχωμα που θα μεταφέρουν το σήμα της ορμόνης για μεταγραφή στο DNA μέσω δευτερευόντων αγγελιοφόρων <sup>[185,186]</sup>. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο δευτερεύον αγγελιοφόρος είναι το c-AMP που συνδυασμένο με το συσσωμάτωμα ορμόνης-υποδοχέα ενεργοποιεί τις μεταγραφάσες του μεταβολικού μονοπατιού JAK/STAT, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα 4 <sup>[187,188]</sup>.

Σχήμα 4: Η ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού JAK



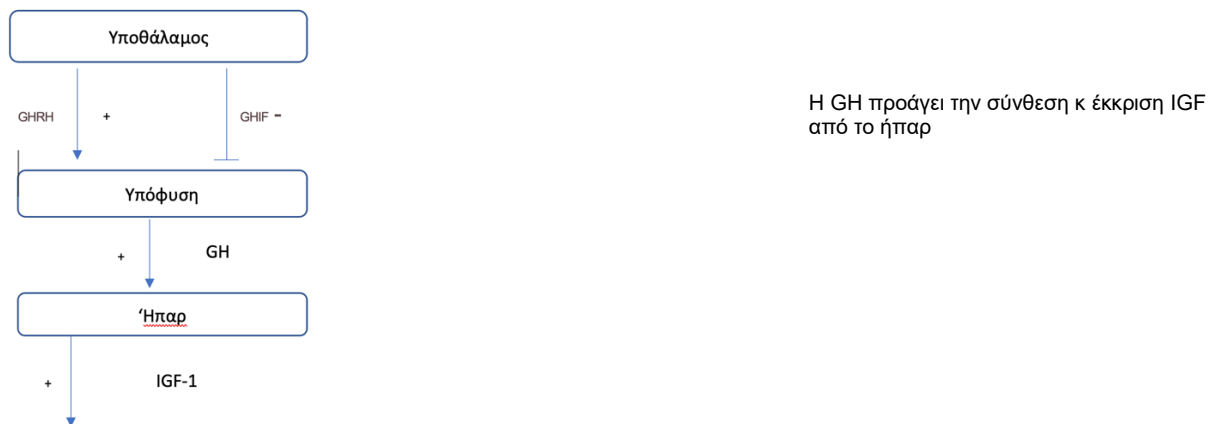
Η σύνδεση της GH με τον υποδοχέα της (GHR) ενεργοποιεί το JAK2, το οποίο στη συνέχεια αυτοφωσφορυλιώνεται. Ακολουθεί φωσφορυλίωση του STAT1a, STAT3, STAT5a και STAT5b, μέλη μιας μεγαλύτερης οικογένειας κυτταροπλασματικών παραγόντων μεταγραφής. Αυτά τα φωσφορυλιωμένα STAT σχηματίζουν διμερή που εισέρχονται στον πυρήνα, όπου συνδέονται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και ενεργοποιούν τα γονίδια-στόχους τους, τον IGF-1 και μερικούς καταστολείς της σηματοδότησης κυτοκίνης

Η αυξητική ορμόνη στα όργανα στόχους έχει δράση μεταβολική η οποία χαρακτηρίζεται από [189-191].

- Αναβολική δράση στα λευκώματα. Οφείλεται σε αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, με αύξηση της πρόσληψης αμινοξέων από τα κύτταρα και ταυτόχρονη διέγερση της παραγωγής νουκλεϊνικών οξέων (mRNA). Επιπλέον τείνει να μειώσει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών. Η δράση αυτή της αυξητικής ορμόνης στις πρωτεΐνες ομοιάζει με της ινσουλίνης (insulin like activity) και ασκείται διαμέσου ουσιών-μεσολαβητών που ονομάζονται σωματομεδίνες. Στο πλαίσιο του βιολογικού αποτελέσματος της δράσης της αυξητικής ορμόνης παρατηρείται αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κυττάρων (κατά την περίοδο ανάπτυξης των βλαστοκυττάρων- αρχέγονων αδιαφοροποίητων κυττάρων), λόγω αύξησης της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων. Έτσι έχουμε αφενός υπερπλασία των κυττάρων (αύξηση σε αριθμό) και αφετέρου λόγω της αναβολικής δράσης στην πρωτεϊνοσύνθεση, υπερτροφία τους (αύξηση σε μέγεθος). Στον αναπτυσσόμενο σκελετό η δράση αυτή οδηγεί στην κατά μήκος αύξηση του σώματος.
- Καταβολική δραστηριότητα στα λίπη, που είναι άμεση δράση της GH οφειλόμενη στην κινητοποίηση λιπαρών οξέων και χρησιμοποίησή τους σαν πηγή παροχής ενέργειας, δηλαδή δράση αντίθετη της ινσουλίνης.

- Άμεση αντι-ινσουλινική δράση στους υδατάνθρακες, μειώνοντας την είσοδο γλυκόζης στα κύτταρα. Η δράση αυτή οφείλεται κυρίως στη μείωση του αριθμού των υποδοχέων ινσουλίνης στους ιστούς στόχους.
- Έμμεση δράση μέσω των σωματομεδινών. Ένα μέρος της δράσης της αυξητικής ορμόνης (η ινσουλινική δράση αυτής) και ειδικότερα η αναβολική και μιτωτική ασκείται και μέσου δεύτερου ορμονικού αγγελιοφόρου, που είναι η σωματομεδίνη I (Sm-I) και σωματομεδίνη II (Sm-II). Ονομάζονται παράγοντες αύξησης σαν την ινσουλίνη (insulin like growth factors: IGF I, IGF II)<sup>[192,193]</sup>. Οι σωματομεδίνες παράγονται με την επίδραση της αυξητικής ορμόνης, έλλειψη της οποίας οδηγεί στην μη παραγωγή τους, ενώ ασκούν αρνητική παλινδρομη δράση στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης. Στο παρακάτω σχήμα 5 εικονική παράσταση της ρύθμισης έκκρισης GH και IGF-1.

**Σχήμα 5: Ρύθμιση έκκρισης GH και IGF-1**



### **Ρύθμιση έκκρισης GH:**

- Σωματοτροπικός άξονας. Υπάρχει ένας αναστροφικός ρυθμιστικός βρόγχος που ελέγχει την ποσότητα αυξητικής ορμόνης στην περιφέρεια. Εκτός από την GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone), κύριος εκφραστής αυτού του βρόγχου είναι η σωματοστατίνη (GHIF: Growth Hormone Inhibitory Factor), μια ορμόνη που παράγεται στον υποθάλαμο, δρα ανασταλτικά στην έκκριση GH και ανταγωνίζεται την δράση της αυξητικής ορμόνης σε επίπεδο υποδοχέα των οργάνων στόχων.
- Νευρογενής ρύθμιση. Ο νευρογενής έλεγχος της έκκρισης GH ασκείται από νευρομεταβιβαστικές ουσίες (ντοπαμίνη, α- αδρενεργικές ουσίες, σεροτονίνη κ.α.) και εκφράζεται

- με τον ημερονύκτιο ρυθμό που χαρακτηρίζεται από μεγάλες εκκριτικές ώσεις τις πρωινές ώρες του ύπνου
  - με την αύξηση των επιπέδων της σε καταστάσεις stress
- Μεταβολική ρύθμιση. Αμινοξέα όπως η αργινίνη αποτελούν εκλυτικό ερέθισμα έκκρισης GH, ενώ η γλυκόζη αίματος και τα λιπαρά οξέα μειώνουν την έκκρισή της με άμεση επίδραση στον υποθάλαμο.

Λόγω των πολλαπλών παραγόντων που συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης, παρατηρείται μεγάλη διακύμανση των επιπέδων της, με σταθερή όμως πάντα την αυξημένη έκκρισή της στην περίοδο ανάπτυξης και τον ημερονύκτιο ρυθμό έκκρισής αυτής (κατά της πρώτες πρωινές ώρες).

### **Συμπερασματικά :**

- Η αυξητική ορμόνη παρουσιάζει μια τεράστια αύξηση κατά τις περιόδους της ανάπτυξης των παιδιών. Είναι υπεύθυνη για την κατά μήκος και πάχος ανάπτυξη των οστών. Η αναβολική αυτή δράση της αυξητικής ορμόνης οφείλεται σε αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης και αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κυττάρων <sup>[194]</sup>.
- Η δράση της αυξητικής ορμόνης στο κύτταρο δεν είναι άμεση, αλλά οφείλεται στην ενεργοποίηση διαμεμβρανικού υποδοχέα. Η σύνδεση ορμόνης- υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση ουσιών- αγγελιοφόρων που θα μεταφέρουν την πληροφορία της ορμόνης (δηλαδή αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης και αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας) στο DNA του κυττάρου.
- Η σωματοστατίνη (SM) είναι μια ορμόνη που κύριο στόχο έχει την ρύθμιση της δραστηριότητας της αυξητικής ορμόνης την οποία ανταγωνίζεται σε επίπεδο υποδοχέα του οργάνου -στόχου <sup>[195,196]</sup>. Βρίσκεται στην θέση 3q28, κωδικοποιώντας μια αλληλουχία 116 αμινοξέων προ-προορμόνης, από την οποία προέρχεται η προορμόνη SM 92 αμινοξέων. Από την προορμόνη αυτή με την σειρά τους προέχονται οι δυο ενεργείς μορφές της SM, η SM-14 και SM-28. Αυτά τα πεπτίδια δεσμεύονται στους αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς, εκ των οποίων υπάρχουν 5 υπότυποι (SST1-5) <sup>[197,198]</sup>. Η SM έχει ανταγωνιστική δράση της GH.

### 3. Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί τομέα της ιστοπαθολογίας και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων. Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με την χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων- στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές που καθιστούν έτσι ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών. Η ουσιαστική ανάπτυξη της ανοσοϊστοχημείας άρχισε πριν 50 χρόνια από τους Coops και συν. που κατόρθωσαν να συνδέσουν αντισώματα με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθειοκυανική φλουροσκεΐνη, αναπτύσσοντας έτσι την μέθοδο του ανοσοφθορισμού [199]. Επόμενος σταθμός στην ιστορία εξέλιξης της ανοσοϊστοχημείας είναι η δεκαετία του 1970 όπου εξελίχθηκαν οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι και κυρίως η τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης και της αβιδίνης-βιοτίνης, με πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τον ανοσοφθορισμό [200]. Η σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη των μονοκλωνικών αντισωμάτων έδωσε μεγάλη ώθηση στην εξέλιξη της ανοσοϊστοχημείας. Έτσι είναι δυνατή σήμερα η εντόπιση ενζύμων, προϊόντων έκκρισης κυττάρων, πρωτεϊνών, κυτταρικών υποδοχέων, αντιγόνων μικροβίων-ιών καθώς και διαφόρων κυτταροπλασματικών και επιφανειακών ομάδων με κυτταρική ιστική ειδικότητα. Η εφαρμογή των μονοκλωνικών αντισωμάτων σημαίνει χρήση ειδικών αντι-ορών, δηλαδή ειδικά αντισώματα ενάντια στα αναζητούμενα αντιγόνα, χρησιμοποιώντας συμβατικά πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι λιγότερο εξειδικευμένα, επειδή στρέφονται εναντίον περισσότερων επιτόπων. Αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα, και ανιχνεύονται είτε σε τομές παραφίνης είτε σε τομές ψυκτικού [201].

#### Μονοκλωνικά αντισώματα

Η ανακάλυψη των μονοκλωνικών αντισωμάτων από τους G. Köhler, C. Milstein το 1975 αποτέλεσε επανάσταση στην ανοσοβιολογία με μεγάλες πρακτικές εφαρμογές όπως στην ογκολογία, στην διάγνωση νεοπλασματικών νοσημάτων, θεραπεία, μεταμόσχευση οργάνων κ.α. Η χρησιμοποίησή τους είναι ευρεία τόσο στην καθημερινή πράξη όσο και στην έρευνα [202]. Η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού σε κάθε αντιγόνο είναι πολυκλωνική, δηλαδή πολλοί κλώνοι Β-λεμφοκυττάρων διεγείρονται για να παράγουν αντίσωμα. Τα αντισώματα αυτά εμφανίζουν διαφορετική μοριακή δομή και αναγνωρίζουν αντίστοιχα διαφορετικές εικόνες του αντιγόνου. Για την ανοσοποίηση κάποιου ζωϊκού οργανισμού χρησιμοποιείται φαινομενικά καθαρό αντιγόνο, όμως ο οργανισμός παράγει ποικιλία αντισωμάτων έναντι πολύ μικρών δομών (ξένων ουσιών) που περιέχει το αντιγόνο. Στόχος των ανοσοβιολόγων ήταν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων με ομοιογένεια στην συμπεριφορά τους. Αυτό επιτεύχθηκε ως εξής [203].

Οι πρωτεΐνες του πολλαπλού μυελώματος είναι γνωστό ότι αποτελούν απόλυτα ομοιογενείς ανοσοσφαιρίνες, διότι η νεοπλασματική εξαλλαγή γίνεται μόνο σε έναν κλώνο Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών που είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους. Οι βιολόγοι ανέπτυξαν τη σύντηξη (Fusion) κυττάρων σε ιστικές καλλιέργειες, σχηματίζοντας έτσι υβριδικά κύτταρα που περιέχουν γενετικό υλικό από δύο μητρικά κύτταρα. Η παραγωγή ενός μονοκλωνικού αντισώματος γίνεται με την ευαισθητοποίηση του πειραματόζωου με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Έπειτα από καθορισμένο χρόνο γίνεται θανάτωση του πειραματόζωου και λήψη κυττάρων σπληνός, από τα οποία διαχωρίζονται τα Β-λεμφοκύτταρα και γίνεται σύντηξη τους με κύτταρα πολλαπλού μυελώματος. Η σύντηξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων που ονομάζονται υβριδώματα και έχουν την ιδιότητα να παράγουν συνέχεια κύτταρα με τα ίδια γνωρίσματα. Τα υβριδώματα μπορούν να συντηρούνται σε κατάψυξη στους  $-70^{\circ}\text{C}$  ενώ η ένεσή τους στην περιτοναϊκή κοιλότητα ζώου οδηγεί στην παραγωγή ασκίτικού υγρού με υψηλή περιεκτικότητα του επιθυμητού αντισώματος

## **Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι**

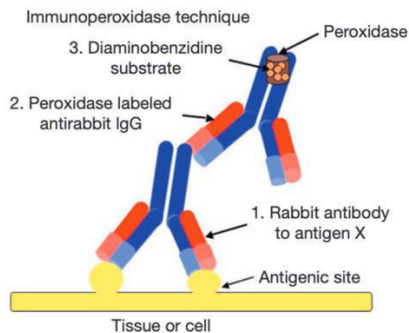
### Η μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης

Η μέθοδος βασίζεται στην σύνδεση των αντισωμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται είτε απευθείας είτε έμμεσα, αφού προηγηθεί σειρά μη συνδεδεμένων αντισωμάτων εναντίον του αντιγόνου -στόχου για την έμμεση μέθοδο. Η αναγνώριση των εναποθέσεων (αντιγόνων) με το κοινό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται τελικά με τη χρήση χρωμογόνων, συνηθέστερα από τα οποία είναι η διαμινοβενζιδίνη (DAB) και η ερυθροκαρβαζόλη. Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και  $\text{H}_2\text{O}_2$  σχηματίζοντας αδιάλυτο πολυμερές που εντοπίζεται στις θέσεις αντιγόνου-αντισώματος δίνοντας ένα καφέ χρώμα ορατό στο κοινό μικροσκόπιο. Οι μοριακές μεταβολές της DAB οδηγούν σε σχηματισμό μόνιμου χρώματος που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά ιστολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων.

- Άμεση μέθοδος : Τα αντισώματα συνδέονται κατευθείαν με την υπεροξειδάση. Η περίσσεια του αντισώματος ξεπλένεται με ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα (PBS). Η χρώση των εναποθέσεων επιτυγχάνεται με διάλυμα DAB και  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Έμμεση μέθοδος: Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη από την προηγούμενη και χρησιμοποιούνται δύο σειρές αντισωμάτων. Ο πρώτος αντιορός , ο οποίος είναι και ο πρωτογενής, δεν είναι συνδεδεμένος με υπεροξειδάση. Ο δεύτερος αντιορός είναι

συνδεδεμένος με υπεροξειδάση και στρέφεται εναντίον του πρώτου αντιορού, όπως φαίνεται στο σχήμα 6. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται τόσο σε τομές ψυκτικού όσο και σε τομές παραφίνης με σημαντικό πλεονέκτημα ότι τα διάφορα αντισώματα, είτε ζωικά είτε συνθετικά, διατίθενται έτοιμα στο εμπόριο, και όταν είναι κεκαθαρμένα δίνουν εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου [204].

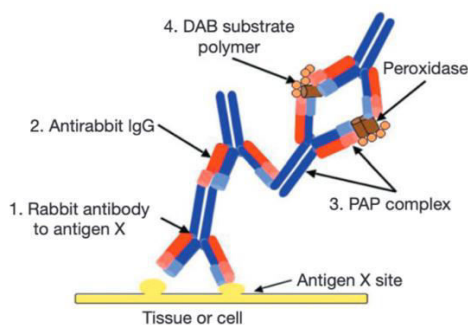
**Σχήμα 6: Έμμεση μέθοδος ανοσοϋπεροξειδάσης**



Η μέθοδος της γέφυρας: Προέκταση της έμμεσης μεθόδου όπου χρησιμοποιούνται τρεις σειρές αντισωμάτων

Η μέθοδος υπεροξειδάσης - ανοσοϋπεροξειδάσης: Στην μέθοδο αυτή υπεροξειδάση συνδέεται με το αντίσωμά της, την ανοσοϋπεροξειδάση σχηματίζοντας κυκλικό σύμπλεγμα σε αναλογία 3 μορίων υπεροξειδάσης με 2 μόρια ανοσοϋπεροξειδάσης, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω (σχήμα 7). Ο 1<sup>ος</sup> και ο 2<sup>ος</sup> ορός δεν είναι συνδεδεμένος ενώ το σύμπλεγμα υπεροξειδάσης – ανοσοϋπεροξειδάσης αποτελεί την 3<sup>η</sup> σειρά. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης του πρωτογενούς αντισώματος σε μεγάλη αραιώση, ελαττώνοντας έτσι την πιθανότητα σύνδεσης με ανεπιθύμητα αντιγόνα και αυξάνοντας την ειδικότητα της μεθόδου [204].

**Σχήμα 7: Μέθοδος υπεροξειδάσης – ανοσοϋπεροξειδάσης**



Το σύμπλεγμα αποτελείται από 3 μόρια υπεροξειδάσης με 2 μόρια ανοσοϋπεροξειδάσης.

Μέθοδος συμπλέγματος Αβιδίνης - Βιοτίνης - Υπεροξειδάσης: Ανοσοενζυμική μέθοδος ανάλογη της μεθόδου υπεροξειδάσης - ανοσουπεροξειδάσης. Υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης στη ίδια τομή του ιστού περισσοτέρων αντιγόνων.

#### **4. Αγωνιστές σωματοστατίνης και έρευνα**

Η αυξημένη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στους αυξητικούς παράγοντες, όπως και η αυτούσια ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων καταστρατηγεί το ισοζύγιο εισόδου των κυττάρων στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα αυξημένη κυτταρογένεση. Οι αγωνιστές σωματοστατίνης (SM-As) καταστέλλουν την από την GH εξαρτώμενη παραγωγή και έκκριση IGF-1 από το ήπαρ, καθώς και στο μικροπεριβάλλον του όγκου <sup>[205]</sup>. Θεωρητικώς η αναστολή της μεταβολικής αυτής διεργασίας θα οδηγήσει σε μη ικανότητα αύξησης και επιβίωσης του όγκου και έχει ονομαστεί “anti-survival factor manipulation strategy” <sup>[206]</sup>. Οι πρώτες κλινικές μελέτες της στρατηγικής αυτής σχετίζονται με την αναστολή των υποδοχέων αυξητικής ορμόνης με χορήγηση σωματοστατίνης σε στάδιο D3 καρκίνο του προστάτη <sup>[207,208]</sup>. Στόχος της θεραπείας είναι το μπλοκάρισμα των αντίστοιχων υποδοχέων από την συνθετική σωματοστατίνη και μείωση των IGF-1 στον όγκο (που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελούν μέρος του μηχανισμού έμμεσης επίδρασης της αυξητικής ορμόνης μέσω των σωματομεδινών). Τα πρώτα αποτελέσματα χρήσης συνθετικής σωματοστατίνης, σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα όπως δεξαμεθαζόνη, ζολενδρονάτη και οιστρογόνα είχε θετική κλινική απήχηση στους ασθενείς αυτούς <sup>[209]</sup>.

Η πρόσφατη ανακάλυψη υπερέκφρασης υποδοχέων αυξητικής ορμόνης -σωματοστατίνης σε νευροενδοκρινικούς όγκους όπως το νευροβλάστωμα, φαιοχρωμοκύττωμα, μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα όσο και σε μη νευροενδοκρινικούς συμπαγής όγκους, οδήγησε στην ιδέα παραγωγής συνθετικής σωματοστατίνης ή οποία χορηγούμενη στο νεόπλασμα θα μπλοκάρει τους αντίστοιχους υποδοχείς οδηγώντας σε υποστροφή της κυτταρικής ανάπτυξης <sup>[210-216]</sup>. Περιγραφικά η χορήγηση σωματοστατίνης σε υπόστρωμα με αντίστοιχους υποδοχείς οδηγεί σε “switch off”, σε πλήρη καταστολή, της αυξητικής δραστηριότητας του όγκου <sup>[197]</sup>.

Στην πραγματικότητα, οι πρώτοι συνθετικοί αναστολείς των υποδοχέων αυξητικής ορμόνης-σωματοστατίνης πρωτοεμφανίστηκαν στο εμπόριο το 1996, με κύριο πρόβλημα τον πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής τους (1-3 min), κάνοντας τους για κλινική χρήση δύσχρηστους



<sup>[217]</sup>. Η έρευνα στοχεύει στην παραγωγή συνθετικών αναστολέων της αύξησης που θα είναι εφικτή η χρήση τους στην κλινική πράξη.

Στην χορήγηση επίσης σωματοστατίνης σε κλινικό (σε ασθενείς με ακρομεγαλία και ασθενείς με νευροενδοκρινικούς όγκους) και πειραματικό επίπεδο παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του φαινομένου της ταχυφύλαξης, ήτοι της πολύ γρήγορης ανάπτυξης αντοχής στο φάρμακο <sup>[218-220]</sup>. Οι παθοφυσιολογικές διεργασίες που οδηγούν στο φαινόμενο της ταχυφύλαξης μετά χορήγησης συνθετικής σωματοστατίνης δεν έχουν εξηγηθεί ακόμη επαρκώς.

Η αντικαρκινική δράση των αναστολέων των υποδοχέων σωματοστατίνης-αυξητικής ορμόνης σε θεωρητικό και ερευνητικό επίπεδο συνοψίζεται στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5: Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των SM-As**

Δράση των SM-As	Παρατηρήσεις
<b><u>Άμεση αντικαρκινική δράση</u></b>	
Αντιμπτωτική (κυτταροστατική) δράση <sup>[221-223]</sup> .	Μέσω επίδρασης στους υποδοχείς SST1, SST2, SST4, και SST5.
Αποπτωτική (κυτταροτοξική) δράση <sup>[224,225]</sup> .	Μέσω επίδρασης στους υποδοχείς SST2 και SST3.
Άμεση καταστολή (block) της αυτο- και παρακρινικής έκκρισης αυξητικών παραγόντων (anti survival factors) IGF1, EGF και IL6 <sup>[226,227]</sup> .	Με συνέπεια την μείωση της "επιθετικότητας" του όγκου μέσω μείωσης της ικανότητας διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία, μείωση της ικανότητας μετάστασης και επαναφορά του μηχανισμού συγκόλλησης των κυττάρων.
<b><u>Έμμεση αντικαρκινική δράση</u></b>	
Καταστολή του άξονα GH-IGF1 <sup>[228-230]</sup> .	Μέσω αναστολή έκκρισης GH, αρνητική ρύθμιση παραγωγής IGF1, αυξημένη απελευθέρωση IGF1BPs.
Αρνητική ρύθμιση παραγωγής / έκκρισης άλλων ορμονών (π.χ. ινσουλίνης, προλακτίνης, γαστρίνης) <sup>197,231]</sup> .	
Μείωση της αιματικής παροχής του όγκου <sup>[232-235]</sup> .	Μέσω μείωσης προαγγειογενετικών παραγόντων, καταστολή της νεοαγγειογένεσης με επίδραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, σύσπασης των αγγείων vasoconstriction και μειωμένης διήθησης.
Επίδραση στην ανοσοποιητική απάντηση ξενιστή (host immune response) <sup>[236,237]</sup> .	
<b><u>Άλλες δράσεις</u></b>	
Αναλγητική δράση <sup>[238]</sup> .	

Η έμμεση δράση της αυξητικής ορμόνης μέσω των σωματομεδινών έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην παραγωγή οστεοειδούς σε πρωτοπαθή οστεοσαρκώματα σε πειραματόζωα [239-241]. Επίσης σε ασθενείς που χορηγήθει αυξητική ορμόνη για θεραπευτικό σκοπό πιθανολογείται υψηλή επίπτωση οστεοσαρκώματος [242-245]. Οι μελέτες που συσχετίζουν τους υποδοχείς αυξητικής ορμόνης-σωματοστατίνης με το οστεοσάρκωμα τεκμηριώνουν [242-245].

- Την κλινική ανταπόκριση του οστεοσαρκώματος σε χορήγηση αναστολέων των υποδοχέων αυτών σε πειραματικά μοντέλα με πειραματόζωα
- Την in vitro ανταπόκριση κλώνων κυττάρων οστεοσαρκώματος
- Την συσχέτιση χορήγησης αυξητικής ορμόνης για θεραπευτικούς σκοπούς με υψηλή επίπτωση οστεοσαρκώματος

## 5. Υπόθεση

Η μέγιστη επίπτωση του οστεοσαρκώματος με την φάση ταχείας σκελετικής ανάπτυξης και η ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος στις περιοχές των οστών που αναπτύσσονται σε μήκος και πάχος, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παράγοντες που σχετίζονται με την φάση ταχείας οστικής ανάπτυξης μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεια του οστεοσαρκώματος <sup>[49,51,254]</sup>. Έτσι υπάρχει πιθανή συσχέτιση της χορήγησης αυξητικής ορμόνης για θεραπευτικούς σκοπούς με υψηλή επίπτωση οστεοσαρκώματος <sup>[242-245]</sup>. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση αυξητικής ορμόνης ή σωματοστατίνης επηρεάζει την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος σε πειραματικά μοντέλα με πειραματόζωα <sup>[247,248,255]</sup>. Οι αγωνιστές σωματοστατίνης πιστεύεται ότι επηρεάζουν την ικανότητα αύξησης και επιβίωσης του όγκου οδηγώντας σε υποστροφή της κυτταρικής ανάπτυξης <sup>[210-216]</sup>.

Έτσι, είναι εύλογος ο συλλογισμός ότι στο ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μπορεί να εκφράζονται υποδοχείς αυξητικής ορμόνης. Η ανεύρεση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινο οστεοσάρκωμα μπορεί να έχει προγνωστική, ερευνητική και θεραπευτική χρησιμότητα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ανιχνεύσουμε υποδοχείς αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινο οστεοσάρκωμα (πρωτεύον στόχος) και να συσχετίσουμε τα πιθανά ευρήματά μας με την βιολογική συμπεριφορά του όγκου (δευτερεύον στόχος).

### 5.1. Υλικό και Μέθοδος

Στην παρούσα μελέτη σειράς συμπεριελήφθησαν 32 περιπτώσεις οστεοσαρκώματος που νοσηλεύτηκαν την χρονική περίοδο μεταξύ 1997 έως 2011 στο Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισιάς "Άγιοι Ανάργυροι", στο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιά "Μεταξά" και στο Γενικό Αντικαρκινικό - Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών "Άγιος Σάββας". Ο ελάχιστος χρόνος παρακολούθησης ήταν τα 7 έτη. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό έγινε καταγραφή των θανάτων εκ νόσου (DOD= died on disease), των περιπτώσεων εξέλιξης της νόσου (DP= disease progression), της εμφάνισης πνευμονικών μεταστάσεων (P.M.= pulmonary metastasis), της τοπικής υποτροπής (L.R.= local recurrence), της συνολικής επιβίωσης (OS= overall survival) και της επιβίωσης χωρίς ένδειξη νόσου (NED: no evidence of disease). Η ανίχνευση τυχόν υποδοχέων αυξητικής ορμόνης έγινε με ανοσοϊστοχημική ανάλυση επί των υπαρχόντων ιστολογικών παρασκευασμάτων. Για να ελέγξουμε εάν η παρουσία GHR επηρεάζει την βιολογική συμπεριφορά του οστεοσαρκώματος υπολογίσαμε τον σχετικό κίνδυνο θανάτου στην 5ετία, συγκρίνοντας την ομάδα ασθενών με έκφραση GHR με την ομάδα ασθενών χωρίς έκφραση GHR. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε το

STATA/SE15.1 (StataCorp, College Station, TX, USA). Οι τιμές που προκύπτουν εμφανίζονται ως σχετικός κίνδυνος με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%.

Στον πίνακα 6 αναγράφονται τα βασικότερα στοιχεία των περιπτώσεων της μελέτης.

**Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των ασθενών υπό μελέτη**

ΑΣ	Φ	Η	Εντόπιση	Παρατηρήσεις	Χειρουργική θεραπεία
1	A	28	ΘΜΣΣ		Δ.Μ.
2	Θ	16	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
3	Θ	19	Εγγύς Κνήμη		Ακρωτηριασμός
4	Θ	17	Εγγύς Κνήμη		Ακρωτηριασμός
5	Θ	39	Άπω Μηριαίο	Ινώδης δυσπλασία	Δ.Μ.
6	A	28	Άπω Μηριαίο		Ακρωτηριασμός
7	A	16	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
8	A	22	Άπω Μηριαίο	Πνευμονικές Μ	Δ.Μ.
9	Θ	18	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
10	Θ	27	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
11	Θ	18	Άπω Μηριαίο		Ακρωτηριασμός
12	Θ	35	Εγγύς Κνήμη		Δ.Μ.
13	A	16	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
14	A	24	Εγγύς Βαγχιόνιο		Δ.Μ.
15	A	18	Εγγύς Κνήμη		Δ.Μ.
16	A	32	Άπω Κνήμη		Δ.Μ.
17	Θ	34	Ισχίο	Θάνατος κατά χημειοθεραπεία	Θάνατος κατά χημειοθεραπεία
18	Θ	49	Εγγύς Κνήμη	Περισστικό ΟΣ	Δ.Μ.
19	Θ	24	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
20	A	44	Εγγύς Βαγχιόνιο	Εγχόνδρωμα	Δ.Μ.
21	Θ	39	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
22	Θ	25	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
23	A	18	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
24	A	44	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
25	A	40	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
26	A	20	Εγγύς Βαγχιόνιο		Δ.Μ.
27	A	30	Εγγύς Βαγχιόνιο		Δ.Μ.
28	A	16	Εγγύς Κνήμη		Δ.Μ.
29	Θ	28	Εγγύς Κνήμη		Δ.Μ.
30	A	19	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
31	A	19	Άπω Μηριαίο		Δ.Μ.
32	A	25	Εγγύς Κνήμη		Δ.Μ.

Λεζάντα: Δ.Μ.= διάσωση μέλους (επέμβαση διάσωσης μέλους); A= Άρρεν; Θ= θήλυ; ΑΣ= ασθενής; Φ= φύλο, Η= ηλικία;

Σε όλους τους ασθενείς είχε γίνει πλήρης κλινικοεργαστηριακός έλεγχος συμπεριλαμβανόμενων της απλής ακτινογραφίας της βλάβης και του θώρακος, CT θώρακος, CT βλάβης, MRT βλάβης και BS. Διάγνωση οστεοσαρκώματος είχε τεθεί με την βιοψία. Με εξαίρεση τους ασθενείς 8 και 18 όλοι οι υπόλοιποι ήταν κατά την διάγνωση σταδίου IIB κατά Enneking. Όλες οι περιπτώσεις ασθενών αφορούν πρωτοπαθή οστεοσαρκώματα με εξαίρεση τους ασθενείς 5 (δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα επί εδάφους ινώδους δυσπλασίας) και 20 (δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα επί εδάφους εγchonδρώματος). Μετά την σταδιοποίηση είχε εφαρμοστεί προεγχειρητική χημειοθεραπεία MAP (HDMTX, ADM, CDP) σε ασθενείς <35 ετών και ADM, CDP σε ασθενείς >35 για 2 μήνες. Εν συνέχεια είχε ακολουθηθεί χειρουργική θεραπεία (επέμβαση διάσωσης μέλους ή ακρωτηριασμός) και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με έναρξη περίπου 2 εβδομάδες μετά το χειρουργείο και διάρκειας 4-6 μήνες. Ο ασθενής 8 είχε κατά την διάγνωση πνευμονικές μεταστάσεις και ήταν επομένως σταδίου III κατά Enneking. Πέραν της επέμβασης διάσωσης μέλους έγινε και χειρουργική αφαίρεση των πνευμονικών μεταστάσεων. Ο ασθενής 18 είχε περισοτικό οστεοσάρκωμα κνήμης χαμηλής κακοήθειας, ήταν επομένως στάδιο IA κατά Enneking. Έγινε επέμβαση διάσωσης μέλους ακολουθούμενη από μετεγχειρητική χημειοθεραπεία, χωρίς προεγχειρητική χημειοθεραπεία.

Τα ιστολογικά δείγματα ήταν διαθέσιμα για όλους τους ασθενείς. Η ιστολογική ανάλυση έγινε σε όλες τις περιπτώσεις από τον ίδιο έμπειρο παθολογοανατόμο. Έγινε κοπή των ιστολογικών δειγμάτων ώστε να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα του όγκου. Εν συνέχεια τα δείγματα (οι φέτες) στερεώθηκαν σε 10% ουδέτερο διάλυμα ρυθμιστικής φορμαλδεΐδης και ενσωματώθηκαν χωριστά σε παραφίνη. Ακολούθησε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημεία. Για την ανίχνευση των υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε οστεοσαρκώματα χρησιμοποιήθηκε σεσημασμένη συνθετική κυκλική (1-14) σωματοστατίνη (Polyclonal Rabbit Anti-Human SST, Dako®, Denmark) με την μέθοδο της υπεροξειδάσης – ανοσοϋπεροξειδάσης<sup>[256]</sup>. Έτσι είχαμε το πλεονέκτημα της δυνατότητας χρησιμοποίησης ενός πολύ ειδικού πρωτογενούς αντισώματος σε μεγάλη αραιώση, ελατώνοντας την πιθανότητα σύνδεσης με ανεπιθύμητα αντιγόνα και αυξάνοντας την ειδικότητα της μεθόδου.

## 5.2. Αποτελέσματα

Από τα 32 περιστατικά οστεοσαρκώματος τα 14 (44%) ήταν γυναίκες και τα 18 (56%) άντρες. Σε όλους τους ασθενείς υπήρχε δυνατότητα μελέτης της πορείας της νόσου (follow up) για τουλάχιστον 7 έτη. Ο μέσος όρος ηλικίας κατά την διάγνωση ήταν τα 26,46 (16- 49) έτη. Ένα περιστατικό κατέληξε κατά την διάρκεια της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας και επομένως δεν εφαρμόσθει χειρουργική θεραπεία. Στα υπόλοιπα 31 περιστατικά ο τοπικός έλεγχος της νόσου επιτεύχθηκε σε 4 (13%) με ακρωτηριαστικού τύπου επέμβαση, ενώ σε 27 έγινε διάσωση μέλους (87%). Τοπική υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκε σε 2 εκ των 31 χειρουργηθέντων περιστατικών. Πνευμονική μετάσταση παρουσιάστηκε συνολικά σε 3 περιστατικά. Οι μεταστάσεις του οστεοσαρκώματος- κυρίως στους πνεύμονες- εμφανίζονται τα πρώτα 2-3 έτη, κάνοντας σημαντική την καταγραφή της 3ετούς επιβίωσης χωρίς νόσο (disease-free survival). Έγινε καταγραφεί των αποτελεσμάτων στην 3ετία, 5ετία και 7ετία. Σε έναν ασθενή (ασθενής 30) εμφανίστηκε καθυστερημένη πνευμονική μετάσταση μετά την 3ετία. Η ιστολογική ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία ήταν ικανοποιητική (>90%) σε 14 ασθενείς, μη ικανοποιητική (≤90%) σε 16 ασθενείς. Σε 2 ασθενείς (ασθενείς 17 και 18) δεν εφαρμόστηκε προεγχειρητική χημειοθεραπεία (βλέπε και παρακάτω). Επί του συνόλου των ασθενών η 3ετής, 5ετής και 7ετής συνολική επιβίωση ήταν 75%, 62,5% και 60% αντίστοιχα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 7.

Πίνακας 7: Ποσοστιαία ανάλυση πορείας ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη επί του συνόλου των ασθενών

	3 έτη	5 έτη	7 έτη
NED %	62,5	59,5	60
DP (P.M.) %	6,25	3	0
DP (L.R.) %	6,25	0	0
DOD %	25	37,5	40
<b>Overall Survival %</b>	<b>75</b>	<b>62,5</b>	<b>60</b>

Λεζάντα: DOD= died on disease (θάνατος εκ νόσου); NED= no evidence of disease (καμία ένδειξη νόσου); DP= disease progression (εξέλιξη νόσου); P.M.= pulmonary metastasis (πνευμονική μετάσταση); L.R.= local recurrence (τοπική υποτροπή).

Τα αποτελέσματα της μελέτης εμφανίζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα 8.

Πίνακας 8: Ογκολογικό αποτέλεσμα και έκφραση υποδοχέων GH των περιστατικών υπό μελέτη

ΑΣ	Φ	Η	Εντόπιση	Χειρουργική θεραπεία	Ογκολογικό Αποτέλεσμα 3 έτη	Ογκολογικό Αποτέλεσμα 5 έτη	Ογκολογικό Αποτέλεσμα 7 έτη	GHR	H.R.
1	A	28	ΘΜΣΣ	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		good
2	Θ	16	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
3	Θ	19	Εγγύς Κνήμη	Ακρωτηριασμός	<b>L.R.</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	+	poor
4	Θ	17	Εγγύς Κνήμη	Ακρωτηριασμός	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	+	poor
5	Θ	39	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		poor
6	A	28	Άπω Μηριαίο	Ακρωτηριασμός	NED	NED	NED		poor
7	A	16	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
8	A	22	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		poor
9	Θ	18	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		poor
10	Θ	27	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
11	Θ	18	Άπω Μηριαίο	Ακρωτηριασμός	NED	NED	NED		good
12	Θ	35	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
13	A	16	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
14	A	24	Εγγύς Βαγχιόνιο	Δ.Μ.	<b>DP (P.M.)</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	+	poor
15	A	18	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
16	A	32	Άπω Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
17	Θ	34	Ισχίο	DOD*	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		----
18	Θ	49	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		----
19	Θ	24	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
20	A	44	Εγγύς Βαγχιόνιο	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		poor
21	Θ	39	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	<b>DP (L.R.)</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>		good
22	Θ	25	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
23	A	18	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
24	A	44	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
25	A	40	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
26	A	20	Εγγύς Βαγχιόνιο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		poor
27	A	30	Εγγύς Βαγχιόνιο	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
28	A	16	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	+	good
29	Θ	28	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good
30	A	19	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	NED	<b>DP (P.M.)</b>	<b>DOD</b>		poor
31	A	19	Άπω Μηριαίο	Δ.Μ.	<b>DP (P.M.)</b>	<b>DOD</b>	<b>DOD</b>	+	poor
32	A	25	Εγγύς Κνήμη	Δ.Μ.	NED	NED	NED		good

Λεζάντα: Δ.Μ.= διάσωση μέλους (επέμβαση διάσωσης μέλους); DOD= died on disease (θάνατος εκ νόσου); NED= no evidence of disease (καμία ένδειξη νόσου); DP= disease progression (εξέλιξη νόσου); P.M.= Pulmonary metastasis (πνευμονική μετάσταση); L.R.= local recurrence (τοπική υποτροπή); \*= θάνατος από παρενέργειες χημειοθεραπείας; ΑΣ= ασθενής; Φ= φύλο, Η= ηλικία; H.R.= histologic response;

Ειδική μνεία αναφέρεται στα ακόλουθα περιστατικά, λόγω της ιδιαιτερότητας τους:

- Ασθενής 17: Θήλυ 34 ετών, με αρχική διάγνωση οστεοσαρκώματος ισχίου το έτος 1997. Η ασθενής κατέληξε από τοξικότητα της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας (HDMTX, ADM, CDP).
- Ασθενής 18: Πρόκειται για άρρεν 49 ετών κατά την διάγνωση οστεοσαρκώματος με εντόπιση την εγγύς κνήμη, το έτος 2002. Επρόκειτο για περιοστικό οστεοσάρκωμα κνήμης χαμηλής κακοήθειας, στάδιο IA κατά Enneking. Έγινε επέμβαση διάσωσης μέλους χωρίς προεγχειρητική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από μετεγχειρητική χημειοθεραπεία. Ο ασθενής σε όλους τους επανελέγχους ήταν ελεύθερος νόσου.
- Ασθενής 20: Πρόκειται για άρρεν 44 ετών κατά την διάγνωση το έτος 1997. Πρόκειται για δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα επί εδάφους προϋπάρχουσας βλάβης (εγchonδρώματος) στο εγγύς βραγχίονιο. Αντιμετωπίστηκε με επέμβαση διάσωσης μέλους τύπου Tikhoff-Linberg <sup>[257]</sup>. Η ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία ήταν πτωχή και ο ασθενής κατέληξε 2 έτη μετά την αρχική διάγνωση.
- Ασθενής 5: Θήλυ 39 ετών με εντόπιση του όγκου στο άπω μηριαίο, και πρώτη διάγνωση του οστεοσαρκώματος το έτος 2007. Πρόκειται και εδώ για δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα επί προϋπάρχουσας βλάβης (ινώδης δυσπλασία). Και αυτό το δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα παρουσίασε πτωχή ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Ο τοπικός έλεγχος επιτεύχθηκε με διάσωση μέλους. Η ασθενής κατέληξε 2 έτη αργότερα από πνευμονικές μεταστάσεις.
- Ασθενής 8: Πρόκειται για άρρεν 22 ετών με πρώτη διάγνωση οστεοσαρκώματος το έτος 2002. Ο ασθενής είχε κατά την διάγνωση πνευμονικές μεταστάσεις και ήταν επομένως σταδίου III. Η εντόπιση του οστεοσαρκώματος στο άπω μηριαίο αντιμετωπίσθει με διάσωση μέλους, ενώ παράλληλα έγινε και εκτομή των πνευμονικών μεταστάσεων. Ο όγκος παρουσίασε πτωχή ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία και ο ασθενής κατέληξε 2 έτη μετά την αρχική διάγνωση.
- Ασθενής 30: Άρρεν 19 ετών με αρχική διάγνωση οστεοσαρκώματος το έτος 2010 στο άπω μηριαίο. Ο τοπικός έλεγχος επιτεύχθηκε με διάσωση μέλους. Η ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία ήταν πτωχή. Στον 3ετή έλεγχο ο ασθενής ήταν ελεύθερος νόσου, παρουσίασε όμως μετέπειτα (καθυστερημένες) πνευμονικές μεταστάσεις από τις οποίες κατέληξε 6 έτη μετά την αρχική διάγνωση.

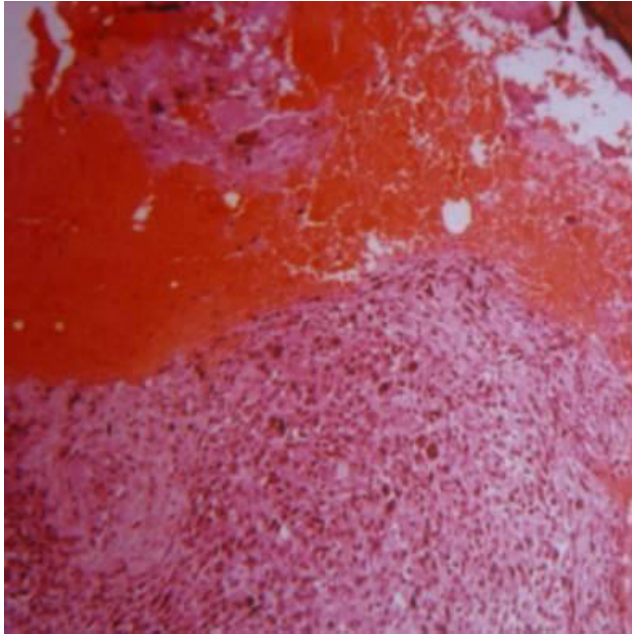
Όλα τα υπόλοιπα περιστατικά ήταν πρωτοπαθή οστεοσαρκώματα σταδίου IIB κατά την διάγνωση, όπου εφαρμόσθει προεγχειρητική χημειοθεραπεία, χειρουργική θεραπεία και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία.



### 5.2.1. Υποδοχείς αυξητικής ορμόνης

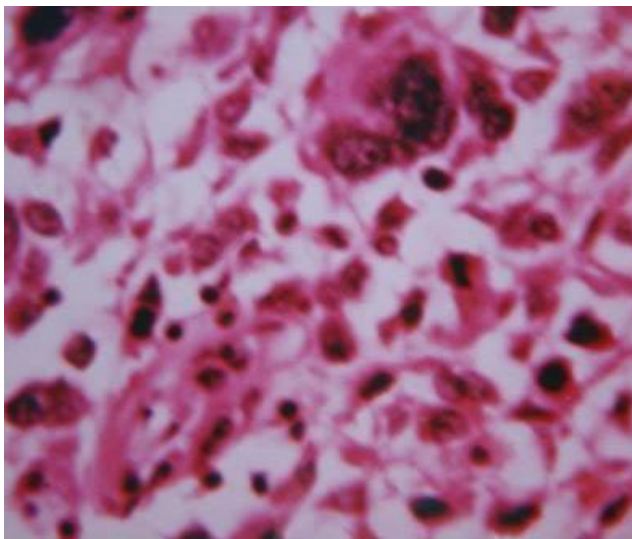
Με την αναδρομική ιστολογική μελέτη επί των 32 περιστατικών ανιχνεύτηκαν σε 5 περιπτώσεις υποδοχείς αυξητικής ορμόνης. Πρόκειται για τα περιστατικά 3, 4, 14, 28 και 31, όπως φαίνεται στον πίνακα 8. Στην εικόνα 4 και 5 παρουσιάζεται η ιστολογική εικόνα οστεοσαρκώματος χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε αντίθεση με την εικόνα 6, που αντιστοιχεί σε οστεοσάρκωμα όπου ανιχνεύτηκαν υποδοχείς GH.

**Εικόνα 4: Οστεοσάρκωμα GHR- (μεγέθυνση X 100)**



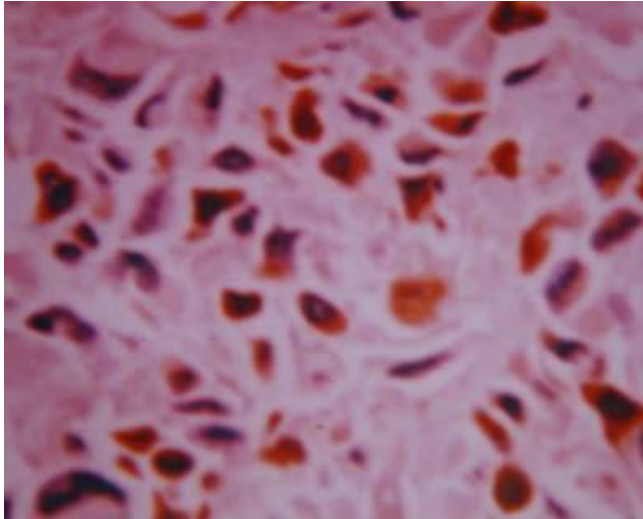
Οστεοσάρκωμα χωρίς υποδοχείς αυξητικής ορμόνης (χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης, μεγέθυνση X 100)

**Εικόνα 5: Οστεοσάρκωμα GHR- (μεγέθυνση X 300)**



Οστεοσάρκωμα χωρίς υποδοχείς αυξητικής ορμόνης. Διακρίνεται η μεγάλη κυτταρική ποικιλομορφία με εκτρωτικές γιγάντιες κυτταρικές μορφές, χαρακτηριστικό γνώρισμα του οστεοσαρκώματος και εστίες μιτώσεως με μικρά φλεγμονώδη κύτταρα. (χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης, μεγέθυνση X 300)

Εικόνα 6: Οστεοσάρκωμα GHR+ (μεγέθυνση X 630)



Οστεοσάρκωμα με υποδοχείς αυξητικής ορμόνης. Η καφέ- πορτοκαλί χρώση υποδηλώνει την αντίδραση του υποδοχέα με την σεσημασμένη SST (μεγέθυνση X 630)

Τα 5 περιστατικά όπου ανιχνεύτηκαν υποδοχείς αυξητικής ορμόνης ήταν:

- Ασθενής 3: Ασθενής 19 ετών επισκέφθηκε το τμήμα μας το έτος 1997 με μάζα άνω πέρατος δεξιάς κνήμης. Μετά τον πλήρη διαγνωστικό έλεγχο και ανοικτή βιοψία τέθηκε η διάγνωση του οστεοσαρκώματος σταδίου IIB. Εφαρμόστηκε προεγχειρητική χημειοθεραπεία MAP και εν συνεχεία μηριαίος ακρωτηριασμός. Το ιστολογικό παρασκεύασμα επιβεβαίωσε την διάγνωση του οστεοσαρκώματος με οστεοβλαστικές και κατά τόπους χονδροβλαστικές εστίες και ποσοστό νέκρωσης 80%. Η ασθενής παρουσίασε 2 έτη αργότερα τοπική υποτροπή της νόσου στην περιοχή του κολοβώματος του ισχιακού νεύρου και υπεβλήθη σε επανεγχείρηση απεξάρθρωσης του ισχίου και συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Η ασθενής παρουσίασε στην συνέχεια πνευμονικές μεταστάσεις, υπεβλήθη εκ νέου σε χημειοθεραπεία και κατέληξε στα 5 έτη από την διάγνωση της νόσου.
- Ασθενής 4: Ασθενής 17 ετών η οποία είχε νοσηλευτεί στο τμήμα μας το έτος 2001 με μάζα άνω πέρατος δεξιάς κνήμης με διήθηση αγγείων. Μετά τον πλήρη διαγνωστικό έλεγχο και ανοικτή βιοψία τέθηκε η διάγνωση οστεοσαρκώματος σταδίου IIB. Εφαρμόστηκε προεγχειρητική χημειοθεραπεία MAP και εν συνεχεία μηριαίος ακρωτηριασμός. Η ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία ήταν πτωχή. Η ασθενής παρουσίασε 6 μήνες μετά το πέρας της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας πνευμονικές μεταστάσεις και κατέληξε 2 μήνες μετά την διάγνωση αυτών.
- Ασθενής 14: Πρόκειται για άρρεν 24 ετών με διάγνωση οστεοσαρκώματος εγγύς βραγχιονίου το έτος 1999. Ο ασθενής μετά την προεγχειρητική χημειοθεραπεία υπεβλήθη σε διάσωση μέλους (τύπου Tikhoff-Linberg). Παρουσίασε πτωχή ιστολογική ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία. 3 έτη μετά την πρώτη

διάγνωση εμφάνισε πνευμονικές μεταστάσεις και κατέληξε 4 έτη μετά την αρχική διάγνωση.

- Ασθενής 28: Ασθενής 16 ετών με αρχική διάγνωση οστεοσαρκώματος το έτος 2010. Η εντόπιση ήταν στην εγγύς κνήμη. Χειρουργικώς αντιμετωπίσθαι με επέμβαση διάσωσης μέλους. Παρότι παρουσίασε ικανοποιητική (> 90%) ιστολογική ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία κατέληξε 1,5 έτη από την αρχική διάγνωση από πνευμονικές μεταστάσεις.
- Ασθενής 31: Πρόκειται για άρρεν 19 ετών με αρχική διάγνωση οστεοσαρκώματος το έτος 2008. Η εντόπιση του όγκου ήταν στο άπω μηριαίο και αντιμετωπίσθαι χειρουργικώς με διάσωση μέλους. Είχε πτωχή ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Εμφάνισε στην 3ετία πνευμονικές μεταστάσεις και κατέληξε 4 έτη από την αρχική διάγνωση.

### 5.2.2. Βιολογική συμπεριφορά οστεοσαρκωμάτων

Με την μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς των οστεοσαρκωμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα 8, δημιουργείται η υποψία ότι τα οστεοσαρκώματα που εκφράζουν υποδοχείς αυξητικής ορμόνης έχουν πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Στον παρακάτω πίνακα 9 γίνεται σύγκριση της επιβίωσης των ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη ανά ομάδα. Από την ομάδα με έκφραση GHR κανείς ασθενείς δεν επιβίωσε στα 5 έτη, σε αντίθεση με την ομάδα χωρίς έκφραση υποδοχέων όπου επιβίωσαν 20 από του 27 στην 5ετία. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία υπολογίστηκε σημαντικά αυξημένος κατά 3,86 95% CI (2,04/7,30) στην ομάδα έκφρασης GHR.

Πίνακας 9: Ανάλυση επιβίωσης ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη ανά ομάδα

	3 έτη		5 έτη		7 έτη	
	GH (+)	GH (-)	GH (+)	GH (-)	GH (+)	GH (-)
n total	5	27	5	27	5	27
NED n/%	0/0	20/74	0/0	19/70	0/0	19/70
DOD n/%	2/40	6/22	5/100	7/26	5/100	8/30
<b>Overall Survival n/%</b>	<b>3/60</b>	<b>21/77</b>	<b>0/0</b>	<b>20/74</b>	<b>0/0</b>	<b>19/70</b>

Λεζάντα: n = απόλυτος αριθμός; DOD= died on disease (θάνατος εκ νόσου); NED= no evidence of disease (καμία ένδειξη νόσου); overall survival= συνολική επιβίωση; GH (+)= περιστατικά με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης; GH (-)= περιστατικά χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης.

Εάν τώρα προσπαθήσουμε να γίνει όσο το δυνατόν ομογενοποίηση των δύο προς σύγκριση ομάδων περιορίζοντας τις μεταβλητές και κάνοντας τις δυο ομάδες όσο το δυνατόν συγκρίσιμες, θα αφαιρέσουμε τα περιστατικά 5 και 20 (δευτεροπαθή οστεοσαρκώματα), το περιστατικό 18 (περιστικό οστεοσάρκωμα σταδίου IA), το περιστατικό 17 λόγω θανάτου κατά την προεγχειρητική χημειοθεραπεία και το περιστατικό 8 που ήταν σταδίου 3 κατά την διάγνωση. Τα απομένοντα περιστατικά είναι έτσι όλα πρωτοπαθή οστεοσαρκώματα σταδίου IIB, σε όλα εφαρμόσθει προεγχειρητική και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία. Αν επιδιώξουμε σύγκριση της βιολογικής συμπεριφοράς αυτού του δείγματος μεταξύ των ασθενών με και χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης θα έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

**Πίνακας 10: Ανάλυση επιβίωσης ασθενών στα 3, 5 και 7 έτη ανά ομάδα επί ομογενοποιημένου δείγματος.**

	3 έτη		5 έτη		7 έτη	
	<b>GH (+)</b>	<b>GH (-)</b>	<b>GH (+)</b>	<b>GH (-)</b>	<b>GH (+)</b>	<b>GH (-)</b>
n total	5	22	5	22	5	22
NED n/%	0/0	19/86	0/0	18/82	0/0	18/82
DOD n/%	2/40	2/9	5/100	3/14	5/100	4/18
<b>Overall Survival n</b>	<b>3/60</b>	<b>20/90</b>	<b>0/0</b>	<b>19/86</b>	<b>0/0</b>	<b>18/82</b>

Λεζάντα: n = απόλυτος αριθμός; DOD= died on disease (θάνατος εκ νόσου); NED= no evidence of disease (καμία ένδειξη νόσου); overall survival= συνολική επιβίωση; GH (+).= περιστατικά με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης; GH (-).= περιστατικά χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης.

Έτσι σε αυτήν την σύγκριση η 5ετής επιβίωση των ασθενών GHR(+) είναι 0%, σε αντίθεση με την ομάδα GHR (-) που είναι 86%.

## 6. Συζήτηση

Πρωτεύων στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινα οστεοσαρκώματα. Με την αναδρομική ανοσοϊστοχημική μελέτη ανιχνεύτηκαν σε 5 από 32 περιπτώσεις οστεοσαρκωμάτων υποδοχείς αυξητικής ορμόνης (GHR).

Από όσο γνωρίζουμε, κατά την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης υπήρχε μόνο μία διεθνής έρευνα σε ανθρώπους, όπου σε 18 περιπτώσεις οστεοσαρκωμάτων έγινε έμμεση διερεύνηση ύπαρξης υποδοχέων αυξητικής ορμόνης με χρήση σεσημασμένης σωματοστατίνης και σπινθηρογραφικό έλεγχο (SSTR scintigraphy) <sup>[258]</sup>.

Λίγα είναι γνωστά για την αιτιολογία και την παθογένεια του οστεοσαρκώματος. Στις μέρες μας, η μοριακή βιολογία φαίνεται να είναι το επόμενο βήμα για την κατανόηση της παθογένεσης του. Η ανεύρεση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης συμβάλλει στην κατανόηση της μοριακής δομής του όγκου αυτού.

Η θέση του όγκου στη μετάφυση καθώς και η ηλικία των ασθενών που συμπίπτουν με την περίοδο της ταχείας ανάπτυξης υποδηλώνουν ότι παράγοντες που σχετίζονται με τη σκελετική ανάπτυξη εμπλέκονται στην παθογένεση αυτού του όγκου. Μέσω της ανίχνευσης των υποδοχέων επιβεβαιώθηκε αυτή η υποψία.

Ίσως αυτό το εύρημα να έχει και κλινική σημασία, καθώς υπάρχουν στοιχεία από μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η θεραπεία με αυξητική ορμόνη και σωματοστατίνη επηρεάζει την ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος σε ζωικά μοντέλα <sup>[247,248]</sup>. Υπάρχει επίσης μια μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς με μεταστατικό οστεοσάρκωμα που έλαβαν θεραπεία με ανάλογο σωματοστατίνης (OncoLar<sup>®</sup>), η οποία δείχνει ότι τα επίπεδα του ILF-1 μειώθηκαν. Ωστόσο, αυτή η μελέτη δεν απέδωσε σημαντικά κλινικά αποτελέσματα <sup>[259]</sup>.

Η πιθανή θεραπευτική αξία της ανίχνευσης υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε οστεοσαρκώματα εξηγείται από την αντικαρκινική δράση της σωματοστατίνης, όπως περιγράφεται στον πίνακα 5. Οι αγωνιστές σωματοστατίνης (SM-As) καταστέλλουν την από την GH εξαρτώμενη παραγωγή και έκκριση IGF-1 από το ήπαρ, καθώς και στο μικροπεριβάλλον του όγκου <sup>[205]</sup>. Θεωρητικώς η αναστολή της μεταβολικής αυτής διεργασίας θα οδηγήσει σε μη ικανότητα αύξησης και επιβίωσης του όγκου <sup>[206]</sup>. Η χορήγηση σωματοστατίνης σε υπόστρωμα με αντίστοιχους υποδοχείς οδηγεί σε “switch off”, σε πλήρη καταστολή, της αυξητικής δραστηριότητας του όγκου <sup>[197]</sup>.

Δευτερεύον στόχος της παρούσας μελέτης τέθηκε η συσχέτιση των πιθανών ευρημάτων, ήτοι η έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης, με την βιολογική συμπεριφορά των όγκων. Στην μελέτη των Ferrari και συν. γίνεται έμμεσος προσδιορισμός υποδοχέων αυξητικής ορμόνης επί 18 οστεοσαρκωμάτων <sup>[258]</sup>. Οι συγγραφείς πιθανολογούν ότι υποδοχείς αυξητικής ορμόνης εκφράζονται μόνο σε υψηλού βαθμού κακοήθειας πρωτοπαθή οστεοσαρκώματα, όχι όμως σε μεταστατικές βλάβες. Επίσης πιθανολογούν διαφορετική χημειοευαισθησία των όγκων με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε σύγκριση με όγκους χωρίς έκφραση αυτών, υποσημαίνοντας ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ έκφραση υποδοχέων και βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου.

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της ύπαρξης υποδοχέων αυξητικής ορμόνης και βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου. Επί του συνολικού δείγματος η 5ετής επιβίωση ασθενών με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης ήταν 0% σε αντίθεση με 74%

5ετής επιβίωση ασθενών χωρίς έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία υπολογίστηκε σημαντικά αυξημένος κατά 3,86 95% CI (2,04/7,30) στην ομάδα έκφρασης GHR. Το γεγονός ότι τα οστεοσαρκώματα με έκφραση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με τους GH(-) όγκους, εξηγείται από την δράση της αυξητικής ορμόνης, ή αντίθετα από την κατασταλτική δράση που επιταχύνουμε μπλοκάροντας του υποδοχείς αυξητικής ορμόνης, όπως περιγράφεται στον πίνακα 5.

Έτσι η ύπαρξη υποδοχέων αυξητικής ορμόνης αποτελεί την προϋπόθεση να μπορεί να συνδεθεί η ενδογενής αυξητική ορμόνη και να ενεργοποίηση το μεταβολικό μονοπάτι JAK2, για να ακολουθήσει η φωσφορυλίωση των STAT1a, STAT3, STAT5a και STAT5b, τα οποία εν συνεχεία θα ενεργοποιούν τα γονίδια-στόχους τους, τον IGF-1 και μερικούς καταστολείς της σηματοδότησης κυτοκίνης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 και στο σχήμα 4. Έτσι η ανίχνευση έκφρασης η μη υποδοχέων αυξητικής ορμόνης θα μπορούσε να ωφελήσει ως προγνωστικός δείκτης.

Βασικός περιορισμός της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός, όπως επίσης και η ανομοιογένεια των ασθενών του δείγματος. Επιθυμητό θα ήταν όλα τα περιστατικά της μελέτης να είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά ως προς την εντόπιση, τον βαθμό κακοήθειας του οστεοσαρκώματος, την χρονική έναρξη της χημειοθεραπείας κλπ. Ο σχεδιασμός μια τέτοιας προδρομικής μελέτης θα ήταν όμως κυρίως λόγω της σπανιότητας του όγκου αυτού πολύ δύσκολη έως ανέφικτη. Λόγω της καινοτομίας της μελέτης, μέρος της οποίας δημοσιεύτηκε το έτος 2008, και δεδομένου ότι επί του δείγματος της μελέτης αυτής οι όγκοι που εκφράζουν υποδοχείς αυξητικής ορμόνης είχαν πιο επιβλαβή πορεία με πολύ χαμηλότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης (overall survival) όπως και επιβίωσης χωρίς ένδειξη νόσου (NED) σε σύγκριση με το οστεοσάρκωμα χωρίς έκφραση υποδοχέα, μπορεί να υποστηριχτεί η ανάγκη διερεύνησης του ευρήματος αυτού με περαιτέρω μελέτες και κύριο στόχο την διερεύνηση της πιθανής θεραπευτικής αξίας του ευρήματος αυτού <sup>[260]</sup>.

## 7. Συμπεράσματα

Σε αυτή τη μελέτη εντοπίσαμε υποδοχείς αυξητικής ορμόνης σε ανθρώπινα οστεοσαρκώματα. Το εύρημα αυτό βοηθά στην κατανόηση της παθογένεσης του όγκου και στην αποκρυπτογράφηση της μοριακής του δομής. Η ανίχνευση υποδοχέων αυξητικής ορμόνης σε οστεοσαρκώματα φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, πιθανολογώντας μια επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου στην 5ετία σε περιστατικά με έκφραση GHR υπολογίστηκε 3,86 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με περιστατικά χωρίς έκφραση GHR. Το εύρημα αυτό πιθανώς να έχει και μελλοντική θεραπευτική αξία.

## Βιβλιογραφία

1. A. G. Huvos, *Bone Tumors: Diagnosis, Treatment, Prognosis*. Philadelphia : W.B. Saunders Co 1991, 2<sup>nd</sup> ed.
2. H. A. Sissons "The WHO classification of bone tumors", *Recent Results Cancer Res*, vol. 54, pp. 104-8, 1976.
3. R. J. McKenna, C. P. Schwinn, K.Y. Soong, N. L. Higinbotham "Sarcomas of the osteogenic series (osteosarcoma, chondrosarcoma, parosteal osteogenic sarcoma, and sarcomata arising in abnormal bone): an analysis of 552 cases", *J. Bone Joint Surg*, vol. 48-A, pp. 1-26, 1966.
4. L. A. G. Ries et al. "Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents", United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub.No.99-4649. Bethesda,MD,1999
5. G. Ottaviani ,N. Jaffe "The epidemiology of osteosarcoma", *Cancer Treat Res*, vol. 152, pp. 3-13, 2009.
6. L. Mirabello, R. J. Troisi, S. A. Savage " Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004", *Cancer*, vol. 115, no. 7, pp. 1531-1543, 2009.
7. C. A. Stillier, S. S. Bielack,, G. Jundt, E. Steliarova-Foucher "Bone tumours in European children and adolescents: 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project", *Eur J Cancer*, vol. 42, no. 13 pp. 2124-35, 2006.
8. R. J. Grimmer et al. "Osteosarcoma over the age of forty", *Eur J Cancer*, vol. 39, no. 2, pp. 157-63, 2003.
9. A. Hadjipavlou, P. Lander, H. Srolovitz, I. P. Enker "Malignant transformation in Paget disease of bone", *Cancer*, vol. 70, no. 12, pp. 2802-8, 1992.
10. F. L. Wong et al. "Cancer incidence retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk", *JAMA*, vol. 278, no. 15, pp. 1262-7, 1997.
11. M. M. Hawkins et al. «Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer", *J Natl Cancer Inst*, vol. 88, no. 5, pp. 270-8, 1996
12. B. Le Vu et al. "Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumors during childhood", *Int J Cancer*, vo. 77, no. 3, no. 370-7, 1998.
13. M. A. Tucker et al. «Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children", *N Engl J Med*, vol. 317, no. 10, pp. 588-93, 1987.
14. W. A. Newton, A. T. Meadows, H. Shimada, G. R. Bunin, G. F. Vawter "Bone sarcomas as second malignant neoplasms following childhood cancer", *Cancer* , vo. 67, no. 1,pp. 193-201, 1991.
15. M. Campanacci, *Bone and Soft Tissue Tumors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1990, 2<sup>nd</sup> edition, p 464-487.
16. P. A. Meyers, R. Gorlick "Osteosarcoma", *Pediatr Clin North Am*, vol. 44, no. 4, pp. 973-89, 1997.
17. J. S. Whelan "Osteosarcoma", *Eur J Cancer*, vol. 33, no. 10, pp. 1611-19, 1997.
18. G. Bacci et al. "Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report", *J Clin Oncol.*, vol. 18, no. 24, pp. 4016-27, 2000.
19. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics", *Br J Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 26:239-257, 1972.
20. D. Hanahan, R. A. Weinberg "The hallmarks of cancer", *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70, 2000.
21. S. W. Lowe, A. W. Lin "Apoptosis in cancer", *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 485-495, 2000.
22. K. Radig, R. Schneider-Stock, Y. Oda, W. Neumann, U. Mittler, A. Roessner "Mutation spectrum of P53 gene in highly malignant human osteosarcoma", *Gen Diagn Pathol*, vol. 142, no. 1, pp. 25-32, 1996.
23. L. Hayflick "Mortality and immortality at the cellular level: A review", *Biochemistry*, vol. 62, no. 11, pp. 1180-90, 1997.
24. C. V. Dang, G. L. Semeza "Oncogenic alterations of metabolism", *Trends Biochem Sci* , vol. 24, no. 2, pp. 68-72, 1999.
25. S. M. Sebti, A. D. Hamilton "Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties", *Oncogene*, vol. 19, no. 56, pp. 6566-73, 2000.
26. P. G. Dharmawardana, B. Peruzzi, A. Giubellino, T. R. Burke Jr., D. P. Bottaro "Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy", *Anticancer Drugs*, vol. 17, no. 1, pp. 13-20, 2006.
27. R. Gorlick et al. "Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma", *J Clin Oncol*, vol. 17, no. 9, pp. 2781-88, 1999.
28. P. Kloen et al. "Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta) isoforms in osteosarcomas: TGF-beta 3 is related to disease progression", *Cancer*, vol. 80, no. 12, pp. 2230-39, 1997.



29. S. Heinsohn, U. Evermann, U. Zur Stadt, S. Bielack, H. Kabisch "Determination of the prognostic value of loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene in osteosarcoma", *Int J Oncol*, vol- 30, no. 5, pp. 1205-14, 2007.
30. R. S. Kerbel "Tumor angiogenesis: Past, present, and near future", *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 505-15, 2000.
31. A. F. Chambers "The metastatic process: basic research and clinical implications", *Oncol Res*, vol. 11, no. 4, pp. 161-8, 1999.
32. M. A. Forget, R. R. Derosiers, R. Beliveau "Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis", *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 77, no. 7, pp. 465-80, 1999.
33. K. Bjørnland, K. Flatmark, S. Pettersen, A. O. Aaasen, O. Fodstad, G. M. Maelandsmo "Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion", *J Surg Res*, vol. 127, no. 2, pp. 151-6, 2005.
34. M. F. Hansen, M. J. Nellissery, P. Bhatia "Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease", *J Bone Miner Res*, vol. 14, no. 2, pp. 39-44, 1999.
35. M. J. Nellissery et al. «Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone», *Am J Hum Genet*, vol. 63, no. 3, pp. 817-24, 1998.
36. P. Desai, G. Perino, D. Present, G. C. Steiner „Sarcoma in association with bone infarcts. Report of five cases”, *Arch Pathol Lab Med*, vol. 120, no. 5, pp. 482-9, 1996.
37. G. D. Smith, J. Chalmers, M. M. McQueen "Osteosarcoma arising in relation to an enchondroma. A report of three cases", *J Bone Joint Surg Br*, vol. 68, no. 2, pp. 315-9, 1986.
38. S. M. Mendoza, T. Konishi, C. W. Miller "Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA" *Oncogene*, vol. 17, no. 19, pp. 2457-62, 1998.
39. K. V. Shah "SV40 and human cancer: a review of recent data", *Int J Cancer*, vol. 120, no. 2, pp. 215-23, 2007.
40. M. M. Hawkins, G. J. Draper, J. E. Kingston "Incidence of second primary tumours among childhood cancer survivors", *Br J Cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 339-47, 1987.
41. M. F. Hansen et al. "Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, no. 18, pp. 6216-20, 1985.
42. F. P. Li, et al. "A cancer family syndrome in twenty-four kindreds", *Cancer Res*, vol. 48, no. 18, pp. 5358-62, 1988.
43. D. Malkin, et al. "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms", *Science*, vol. 250, pp. 1233-8, 1990.
44. J. Toguchida, et al. "Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma", *N Engl J Med*, vol. 326, no. 20, pp. 1301-8, 1992.
45. L. L. Wang et al. "Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients", *Am J Med Genet*, vol. 102, no. 1, pp. 11-7, 2001.
46. A. Leonard, A. W. Craft, C. Moss, A. J. Malcolm "Osteogenic sarcoma in the Rothmund-Thomson syndrome", *Med Pediatr Oncol*, vol. 26, no. 4, pp. 249-53, 1996.
47. L. L. Wang et al. "Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome", *J Natl Cancer Inst*, vol. 95, no. 9, pp. 669-74, 2003.
48. A. Longhi, C. Errani, M. De Paolis, M. Mercuri, G. Bacci "Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art", *Cancer Treat Rev*, vol. 32, no. 6, pp. 423-36, 2006.
49. S. J. Cotterill, C. M. Wright, M. S. Pearce, A. W. Craft "Stature of young people with malignant bone tumors", *Pediatr Blood Cancer*, vol. 42, no. 1, pp. 59-63, 2004.
50. M. Rytting et al. "Osteosarcoma in preadolescent patients", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 373, pp. 39-50, 2000.
51. P. A. Pizzo, D. G. Poplack, *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2002. 4<sup>th</sup> ed., p.1051.
52. J. D. Buckley et al. "Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: a study of 305 cases by the Children's Cancer Group" *Cancer*, vol. 83, no. 7, pp. 1440-8, 1998.
53. R. Troisi, M. N. Masters, K. Joshipura, C. Douglass, B. F. Cole, R. N. Hoover "Perinatal factors, growth and development, and osteosarcoma risk", *Br J Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 1603-7, 2006.
54. R. Gorlick et al. "Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary", *Clin Cancer Res*, vol. 9, no. 15, pp. 5442-9, 2003.
55. R. P. Kruzelock, E. C. Murphy, L. C. Strong, S. L. Naylor, M. F. Hansen "Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis", *Cancer Res*, vol 57, no. 1, pp. 106-9, 1997.

56. T. Yamaguchi et al. "Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q", *Cancer Res*, vol. 52, pp. 2419-23, 1992.
57. M. Tarkkanen et al. "Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization", *Cancer Res*, vol. 55, no. 6, pp.1334-8, 1995.
58. W. P. Thorpe, J. J. Reilly, S. A. Rosenberg "Prognostic significance of alkaline phosphatase measurements in patients with osteogenic sarcoma receiving chemotherapy", *Cancer*, vol. 43, no. 6, pp. 2178-81,1979.
59. M. P. Link et al. "Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study", *Clin Orthop*, vol. 270, pp. 8-14, 1991.
60. S. Ferrari et al. "Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy", *Ann Oncol*, vol. 8, pp. 765-71, 1997.
61. V. Mialou, et al. « Metastatic osteosarcoma at diagnosis", *Cancer* , vol. 104, no. 5, pp. 1100-9, 2005.
62. W. S. Ferguson, A. M. Goorin "Current treatment of osteosarcoma" *Cancer Invest* , vol. 19, no. 3, pp. 292-315, 2011.
63. P. J. Papagelopoulos et al. « Current concepts in the evaluation and treatment of osteosarcoma", *Orthopedics*, vol. 23, no. 8, pp. 858-67, 2000.
64. F. O. Kesselring, W. Penn "Radiological aspects of 'classic' primary osteosarcoma: value of some radiological investigations: A review", *Diagn Imaging*, vol. 51, no. 2, pp. 78-92,1982.
65. G. F. Jeffree, C. H. Price, H. A. Sissons "The metastatic patterns of osteosarcoma", *Br J Cancer*, vol. 32, no. 1, pp. 87-107, 1975.
66. M. L. Kayton, et al. «Computed tomographic scan of the chest underestimates the number of metastatic lesions in osteosarcoma", *J Pediatr Surg*, vol. 41, no. 1, pp. 200-6, 2006.
67. U. Pastorino et al. "Long-term results of lung metastasectomy: prognostic analyses based on 5206 cases. The International Registry of Lung Metastases", *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 113, no. 1, pp. 37-49, 1997.
68. K. R. Sajadi et al. "The incidence and prognosis of osteosarcoma skip metastases", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 426, pp. 92-6, 2004.
69. C. Franzius, J. Sciuk, H. E. Daldrup-Link, H. Jürgens, O. Schoner "FDG-PET for detection of osseous metastases from malignant primary bone tumours: comparison with bone scintigraphy", *Eur J Nucl Med*, vol. 27, no. 9, pp. 1305-11, 2000.
70. C. Franzius et al. "FDG-PET for detection of pulmonary metastases from malignant primary bone tumors: comparison with spiral CT", *Ann Oncol*, vol. 12, no. 4, pp. 479-86, 2001.
71. F. Liu, Q. Zhang, D. Zhou, J. Dong "Effectiveness of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and staging of osteosarcoma: a meta-analysis of 26 studies", *BMC Cancer*, vol. 19, no.323, 2019.
72. T. D. Peabody, M. A. Simon "Making the diagnosis: keys to a successful biopsy in children with bone and soft-tissue tumors", *Orthop Clin North Am*, vol. 27, no. 3., pp. 453-9, 1996.
73. W. F. Enneking "A system of staging musculoskeletal neoplasms", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 204, pp. 9-24, 1986.
74. K. Tanaka, T. Ozaki "New TNM classification (AJCC eighth edition) of bone and soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group", *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 49, no. 2, pp. 103-107, 2019.
75. C. A. Arndt, P. S. Rose, A. L. Folpe, N. n. Laack "Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence", *Mayo Clin Proc*, vol. 87, no. 5, pp. 475-87. 2012.
76. J. A. Fletcher, M. C. Gebhardt, H. P. Kozakewich «Cytogenetic aberrations in osteosarcomas. Nonrandom deletions, rings, and double-minute chromosomes", *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 77, no. 1, pp. 81-8, 1994.
77. C. Y. Inwards, K. K. Unni "Classification and grading of bone sarcomas", *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 9, no. 3, pp. 545-69, 1995.
78. H. Nakajima, F. H. Sim, J. R. Bond, K. K. Unni "Small cell osteosarcoma of bone. Review of 72 cases», *Cancer*, vol. 79, no. 11, pp. 2095-106, 1997.
79. S. E. Martin, A. Dwyer, J. M. Kissane, J. Costa "Small-cell osteosarcoma", *Cancer*, vol. 50, no. 5, pp. 990-6, 1982.
80. G. Rosen, A. G. Huvos, R. Marcove, A. Nirenberg "Telangiectatic osteogenic sarcoma. Improved survival with combination chemotherapy", *Clin Orthop*, vol. 207, pp. 164-73, 1986.
81. P. Picci, G. Bacci, S. Ferrari, M. Mercuri "Neoadjuvant chemotherapy in malignant fibrous histiocytoma of bone and in osteosarcoma located in the extremities: analogies and differences between the two tumors", *Ann Oncol* , vol. 8, no. 11, pp. 1107-15,1997.
82. F. Schajowicz, M. H. McGuire, E.Santini Araujo, D. L. Muscolo, S. Gitelis "Osteosarcomas arising on the surfaces of long bones", *J Bone Joint Surg Am*, vol. 70, no 4, pp. 555-64, 1988.

83. A. K. Raymond "Surface osteosarcoma", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 270, pp. 140-8, 1991.
84. D. S. Sheth et al. "Conventional and dedifferentiated parosteal osteosarcoma. Diagnosis, treatment, and outcome», *Cancer*, vol. 78, no. 10, pp. 2136-45, 1996.
85. T. Assi et al. "Chemotherapy in the management of periosteal osteosarcoma: A narrative review", *J Bone Oncol*, vol. 30, 2021.
86. P. J. Leavey, M. D Day, T. Booth, G. P. Maale "Skip metastasis in osteosarcoma", *J Pediatr Hematol Oncol.*, vol 25, no. 10, pp. 806-8, 2003.
87. M. B. Harris et al. "Treatment of metastatic osteosarcoma at diagnosis: a Pediatric Oncology Group Study", *J Clin Oncol.*, vol 16, no. 11, pp. 3641-8, 1998.
88. G. Ottaviani, N. Jaffe "The epidemiology of osteosarcoma", *Cancer Treat Res.*, vol 152, pp. 3-13, 2009.
89. S. Ferrari et al. "The treatment of nonmetastatic high grade osteosarcoma of the extremity: review of the italian rizzoli experience. Impact on the future", *Cancer Treat Res*, vol 152, pp. 275-87, 2010.
90. J. A. M. Bramer, J. H. van Linge, R. J. Grimer, R. J. P. M. Scholten "Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: a systematic review", *Eur J Surg Oncol*, vo. 35, no. 10, pp. 1030-6, 2009.
91. I. Munajat, W. Zulmi, M. Z. Norazman, W. I. Wan Faisham "Tumour volume and lung metastasis in patients with osteosarcoma", *J Orthop Surg (Hong Kong)*, vol. 76, no. 2, pp. 182-5, 2008.
92. A. Abudu, N. K. Sferopoulos, R. M. Tillman, S. R. Carter, R. J. Grimer "The surgical treatment and outcome of pathological fractures in localised osteosarcoma", *J Bone Joint Surg Br*, vol 78, no. 5, pp. 694-8, 1996.
93. S. Xin, G. Wei "Prognostic factors in osteosarcoma: A study level meta-analysis and systematic review of current practice", *J Bone Oncol*, vol. 21, 2020.
94. L. Kager et al. «Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols", *J Clin Oncol*, vol 21, no. 10, pp 2011-8, 2003.
95. S. S. Nathan et al. "Treatment algorithm for locally recurrent osteosarcoma based on local disease-free interval and the presence of lung metastasis", *Cancer*. vol. 107, no. 7, pp. 1607-16, 2006.
96. K. Winkler, S. S. Bielack, G. Delling, H. Jürgens, R. Kotz, M. Salzer-Kuntschik "Treatment of osteosarcoma: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS).", *Cancer Treat Res*, vol. 62, pp. 269-77, 1993.
97. J. C. M. Clark, C. R. Dass, P. F. M. Choong "A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma, " *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 134, pp. 281-297, 2008.
98. N. Baldini et al. "P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy", *J Orthop Res*, vol. 15, no. 5, pp. 629-32, 1999.
99. N. Jaffe "Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience", *Cancer Treat Res*, vol. 152, pp. 239-62, 2009.
100. G. Rosen "Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy for osteogenic sarcoma: a ten year experience", *Orthopedics*, vol. 8, no. 5, pp. 659-64, 1985.
101. R. B. Weiss, V. T. DeVita Jr. "Multimodal primary cancer treatment (adjuvant chemotherapy): current results and future prospects", *Ann Intern Med*, vol. 91, no. 2, pp. 251-60, 1979.
102. G. Rosen et al. "Osteogenic sarcoma: eight-percent, three-year, disease-free survival with combination chemotherapy (T-7)", *Natl Cancer Inst Monogr*, vol 56, pp. 213-20
103. A. G. Huvos, G. Rosen, R. C. Marcove "Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement", *Arch Pathol Lab Med*, vol 101, no. 1, pp. 14-8, 1977.
104. G. Rosen, M. L. Murphy, A. G. Huvos, M. Gutierrez, R. C. Marcove "Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma", *Cancer*, vol. 37, no. 1, pp. 1-11, 1976
105. S. Ferrari, E. Palmerini "Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma", *Curr Opin Oncol*, vol. 19, no. 4, pp. 341-6, 2007.
106. G. Bacci, S. Lari "Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma", *Chir Organi Mov*, vol. 86, no. 4, pp. 253-68, 2001.
107. G. Bacci et al. "Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma of the extremities. The Istituto Rizzoli Experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intraarterial cisplatin", *Cancer*, vol. 65, no. 11, pp. 2539-53, 1990.
108. H. T. Ta, C. R. Dass, P. F. Choong, D. E. Dunstan «Osteosarcoma treatment: state of the art", *Cancer Metastasis Rev*, vol. 28, no. 1, pp. 247-63, 2009.

109. D. B. Glasser, J. M. Lane, A. G. Huvos, R. C. Marcove, G. Rosen "Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. The Memorial Hospital experience", *Cancer*, vol. 69, no. 3, pp. 698-708, 1992.
110. X. Wang, H. Zheng, T. Shou, C. Tang, K. Miao, P. Wang "Effectiveness of multi-drug regimen chemotherapy treatment in osteosarcoma patients: a network meta-analysis of randomized controlled trials", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 12, no. 52, 2017.
111. A. J. Chou, R. A. Gorlick "Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions", *Expert Rev Anticancer Ther.*, vol. 6, no. 7, pp. 1075-85, 2006.
112. A. Sakamoto A, Y. Iwamoto "Current status and perspectives regarding the treatment of osteo-sarcoma: chemotherapy", *Rev Recent Clin Trials.*, vol. 3, no. 3, pp. 228-31, 2008.
113. M. Serra et al. "Establishment and characterization of multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines", *Anticancer Res*, vol. 13, no. 2, pp. 323-9, 1993.
114. T. Rajkumar, M. Yamuna "Multiple pathways are involved in drug resistance to doxorubicin in an osteosarcoma cell line", *Anticancer Drugs*, vol. 19, no. 3, pp. 257-65, 2008.
115. G. Agiostratidou, N. Demertzis, E. S. Gonos "Evaluation of cytotoxic treatment of patients with osteosarcoma by an in vitro chemoresistance assay", *Anticancer Res*, vol. 10, no. 2B, pp. 3603-8, 2000.
116. M. Serra et al. "Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma", *Eur J Cancer*, vol. 31, no.12, pp. 1998-2002, 1995.
117. N. Baldini et al. "P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy", *J Orthop Res*, vol. 15, no. 5, pp. 629-32, 1999.
118. M. S. Isakoff, S. S. Bielack, P. Meltzer, R. Gorlick "Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success", *J Clin Oncol.*, vol. 33, no. 27, pp. 3029–35, 2015.
119. P. X. Tan et al. "Analysis of the efficacy and prognosis of limb-salvage surgery for osteosarcoma around the knee", *Eur J Surg Oncol*, vol. 38, no. 12, pp. 1171-7, 2012.
120. G. Bacci et al. "Neoadjuvant chemotherapy for high grade osteosarcoma of the extremities: long-term results for patients treated according to the Rizzoli IOR/OS-3b protocol", *J Chemother*, vol 13, no. 1, pp. 93-0, 2001.
121. A. M. Goorin et al. "Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651", *J Clin Oncol*, vol. 21, no. 8, pp. 1574–80, 2003.
122. M. A. Ayerza, G. L. Farfalli, L. Aponte-Tinao, D. L. Muscolo "Does increased rate of limb-sparing surgery affect survival in osteosarcoma?", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 468, no. 11, pp. :2854–9, 2010.
123. M. Xu, Z. Wang, X. Yu, J. Lin, Y. Hu "Guideline for Limb-Salvage Treatment of Osteosarcoma", *Orthopaedic Surgery*, vol. 12, no. 4, pp. 1021-29, 2020.
124. S. S: Bielack et al. "Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols", *J Clin Oncol*, vol. 20, no. 3, pp. 776–90, 2002.
125. P. J. Messerschmitt, R. M. Garcia, F. W. Abdul-Karim, E. M. Greenfield, P. J. Getty "Osteosarcoma", *J Am Acad Orthop Surg*, vol. 17, no. 8, pp. 515-27, 2009.
126. E. C. R. Merchán, S. S. Herrera, J. M. G. Lopez "Limb salvage procedures in osteosarcomas around the knee joint", *Sao Paulo Med J*, vol 112, no. 4, pp. 661-7, 1994.
127. K. D. Diemel, H. J. Klippe, D. Branseheid "Pulmonary metastasectomy for osteosarcoma: is it justified?", *Recent Results Cancer Res*, vol. 179, pp. 183-208, 2009.
128. N. Federman, N. Bernthal, F. C. Eilber, W. D. Tap "The multidisciplinary management of osteosarcoma", *Curr Treat Options Oncol*, vol. 10, no. 1-2, pp. 82-93, 2009.
129. R. Schwarz, O. Bruland, A. Cassoni, P. Schomberg, S. Bielack "The role of radiotherapy in osteosarcoma", *Cancer Treat Res*, vol. 152, pp. 147-64, 2010.
130. X. Dai, W. Ma, X. He, R. K. Jha "Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma", *Med Sci Monit*, vol. 17, no. 8, pp. 177–90, 2011.
131. S. S. Nathan et al. "Treatment algorithm for locally recurrent osteosarcoma based on local disease-free interval and the presence of lung metastasis", *Cancer*, vol. 107, no. 7, pp. : 1607–16, 2006.
132. M. T. Harting et al. "Long-term survival after aggressive resection of pulmonary metastases among children and adolescents with osteosarcoma", *J Pediatr Surg*, vol. 41, no. 1, pp. 194–9, 2006.

133. N. C. Daw et al. "Frontline treatment of localized osteosarcoma without methotrexate: results of the St. Jude Children's Research Hospital OS99 trial", *Cancer*, vol. 117, no. 12, pp. 2770–8, 2011.
134. K. R. Crews et al. "High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma", *Cancer*, vol. 100, no. 8, pp.1724–33, 2004.
135. P. A. Meyers et al. "Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma", *Cancer*, vol. 117, no. 8, pp. 1736–44, 2011.
136. S. G. Senaratne, G. Pirianov, J. L. Mansi, T. R. Arnett, K. W. Colston "Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines", *Br J Haematol*, vol. 82, no. 8, pp. 1459–68, 2000.
137. S. Boissier et al. "Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices", *Cancer research*, vol. 57, no. 18, pp. 3890–4, 1997.
138. Evaluation of Zoledronic Acid as a Single Agent or as an Adjuvant to Chemotherapy in High Grade Osteosarcoma. 2012. Accessed August 28, 2012, at <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00691236>
139. Combination Chemotherapy With or Without Zoledronic Acid in Treating Patients With Osteosarcoma. 2012. Accessed August 28, 2012, at <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470223>
140. R. M. Conry, M. G. Rodriguez, J. G. Pressey "Zoledronic acid in metastatic osteosarcoma: encouraging progression free survival in four consecutive patients", *Clin Sarcoma Res.*, vol. 6, np. 6, 2016.
141. K. M. Leu et al. "Laboratory and clinical evidence of synergistic cytotoxicity of sequential treatment with gemcitabine followed by docetaxel in the treatment of sarcoma", *J Clin Oncol*, vol. 22, no. 9, pp. 1706-12, 2004.
142. K. Hu H. Dai, Z. Qiu "mTOR signaling in osteosarcoma: Oncogenesis and therapeutic aspects (Review)", *Oncol Rep*, vol. 36, no. 3, pp. 1219-25, 2016.
143. L. Ding et al. "mTOR: An attractive therapeutic target for osteosarcoma?", *Oncotarget.*, vol. 7, no. 31, pp. 50805–13, 2016.
144. T. Asano, E. S. Kleinerman " Liposome-encapsulated MTP-PE: a novel biologic agent for cancer therapy", *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, vol. 14, no. 4, pp. 286-92, 1993.
145. K. Biteau et al. "L-MTP-PE and zoledronic acid combination in osteosarcoma: preclinical evidence of positive therapeutic combination for clinical transfer", *Am J Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 677–89, 2016.
146. P. A. Meyers, A. J. Chou "Muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine encapsulated in liposomes (L-MTP-PE) in the treatment of osteosarcoma", *Adv Exp Med Biol*, vol. 804, pp. 307-21, 2014.
147. P. Meyers et al. " Osteosarcoma: The Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy Improves Overall Survival--A Report From the Children's Oncology Group", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 4, pp. 633-8, 2008.
148. A. J. Chou et al. "Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed Metastatic Osteosarcoma: a Report from the Children's Oncology Group", *Cancer*, vol. 115, no. 22, pp. 5339-48, 2010.
149. G. Dranoff et al. "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity", *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 8, pp. 3539-43, 1993.
150. R. Kumar, J. Yoneda, I. J.Fidler, Z. Dong "GM-CSF-transduced B16 melanoma cells are highly susceptible to lysis by normal murine macrophages and poorly tumorigenic in immune-compromised mice", *J Leukoc Biol*, vol. 65, no. 1, pp. 102-8, 1999.
151. H. J. Wanebo et al. "Preoperative regional therapy for extremity sarcoma. A tricenter update", *Cancer*, vol. 75, no. 9, pp. 2299-306, 1995.
152. F. J. Lejeune, D. Liénard, M. Matter, C. Rüegg "Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy", *Cancer Immun*, vol. 6, no. 6, 2006.
153. R. J. T. Owen "Embolization of musculoskeletal tumors", *Radiol Clin North Am*, vol. 46, no. 3, pp. 535-43, 2008.
154. D. Ebb et al. "Phase II Trial of Trastuzumab in Combination With Cytotoxic Chemotherapy for Treatment of Metastatic Osteosarcoma With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression: A Report From the Children's Oncology Group", *J Clin Oncol*, vol. 30, no. 20, pp. 2545–51, 2012.
155. K. Scotlandi et al. "Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma", *Eur J Cancer*, vol. 41, no. 9, pp. 1349–61, 2005.
156. E. A. Kolb et al. «Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program", *Pediatr Blood Cancer*, vol. 50, no. 6, pp. 1190–7, 2008.
157. A. Gronchi, J. Y. Blay, J. C. Trent "The role of high-dose imatinib in the management of patients with gastrointestinal stromal tumor", *Cancer*, vol. 116, no. 8, 2010.

158. M. Ioannou, N. Demertzis, I. Iakovidou, S. Kottakis "The role of imatinib mesylate in adjuvant therapy of extra-abdominal desmoid tumors", *Anticancer Res*, vol. 27, no. 2, pp. 1143-7, 2007.
159. P. J. Houghton et al. "Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program", *Pediatr Blood Cancer*, vol. 50, no. 4, pp. 799– 805, 2008.
160. E. Segal et al. "Enhanced anti-tumor activity and safety profile of targeted nano-scaled HPMA copolymer-alendronate-TNP-470 conjugate in the treatment of bone malignances", *Biomaterials*, vol. 32, no. 19, pp. 4450-63, 2011.
161. E. Segal et al. "Targeting angiogenesis-dependent calcified neoplasms using combined polymer therapeutics", *PLoS ONE*, vol. 4, no. 4, 2009.
162. M. Kaya, T. Wada, S. Nagoya, T. Yamashita "Prevention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin", *J Orthop Sci*, vol.12, no. 6, pp. 562-7, 2007.
163. G. M. Quan, P. F. Choong "Anti-angiogenic therapy for osteosarcoma", *Cancer Metastasis Rev*, vol. 25, no. 4, pp.707-13, 2006.
164. S. J. Liu et al. "Effect of human osteopontin on proliferation, transmigration and expression of MMP-2 and MMP-9 in osteosarcoma cells", *Chin Med J (Engl)*, vol. 117, no. 2, pp. 235-40, 2004.
165. J. S. Wunder et al. "MDR1 gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study", *J Clin Oncol*, vol. 18, no. 14, pp. 2685-94, 2000.
166. K. Mori, F. Rédini, F. Gouin, B. Cherrier, D. Heymann "Osteosarcoma: current status of immunotherapy and future trends (Review)", *Oncol Rep*, vol. 15, no. 3, pp. 693-700, 2006.
167. P. Msaouel, E. Galanis, M. Koutsilieris "Somatostatin and somatostatin receptors: implications for neoplastic growth and cancer biology", *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 18, no. 9, pp. 1297-316, 2009.
168. J. E. Aubin "Regulation of osteoblast formation and function", *Rev Endocr Metab Disord*. vol. 2, no. 1, pp. 81–94, 2001.
169. Z. L. Deng et al. «Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development», *Front Biosci*, vol. 13, pp. 2001–21, 2008.
170. E. R. Wagner et al. "Therapeutic Implications of PPAR $\gamma$  in Human Osteosarcoma", *PPAR Res*, 2010.
171. E. R. Wagne, et al. "Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma", *Sarcoma*, 2011.
172. J. Luo et al. "Gene therapy for bone regeneration", *Curr Gene Ther*, vol. 5, no. 2, pp. 167–79, 2005.
173. T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman "Stem cells, cancer, and cancer stem cells", *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105–11, 2001.
174. H. H. Luu, et al. «Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells», *J Orthop Res*, vol. 25, no. 5, pp. 665–77, 2007.
175. D. A. Glass, G. Karsenty "In vivo analysis of Wnt signaling in bone", *Endocrinology*, vol. 148, no.6, pp. 2630–4, 2007.
176. R. C. Haydon, H. H. Luu, T. C. He "Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis" *Clin Orthop Relat Res*, vol. 454, pp. 237–46, 2007.
177. J. Luo et al. «Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?», *Lab Invest*, vol. 87, no. 2, pp. 97–103, 2007.
178. X. Luo et al. "Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects", *Lab Invest*, vol. 88, no. 12, pp. 1264–77, 2008.
179. T.Reya, H. Clevers "Wnt signalling in stem cells and cancer", *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–50, 2005.
180. L. L. Wang "Biology of osteogenic sarcoma", *Cancer J*, vol. 11, no. 4, pp. 294–305, 2005.
181. M. Zenmyo et al. "Transcriptional activation of p21 by vitamin D(3) or vitamin K(2) leads to differentiation of p53-deficient MG-63 osteosarcoma cells", *Hum Pathol*, vol. 32, no. 4, pp. 410–6, 2001.
182. Q. Kang et al. «Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery», *Gene Ther*, vol. 11, no. 17, pp. 1312–20, 2004.
183. S. Rodriguez, T. R. Gaunt, I. N. M. Day "Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth factors and their pathways in common disease", *Human Genetics*, vol. 122, pp. 1–21, 2007.
184. L. S. Mathews "Molecular biology of growth hormone receptors", *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 2, no. 5, pp. 176-180, 1991.
185. F. Dehkhoda, C. M. M. Lee, J. Medina, A. J. Brooks "The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects", *Front. Endocrinol*, vol. 9, no. 35, 2018.

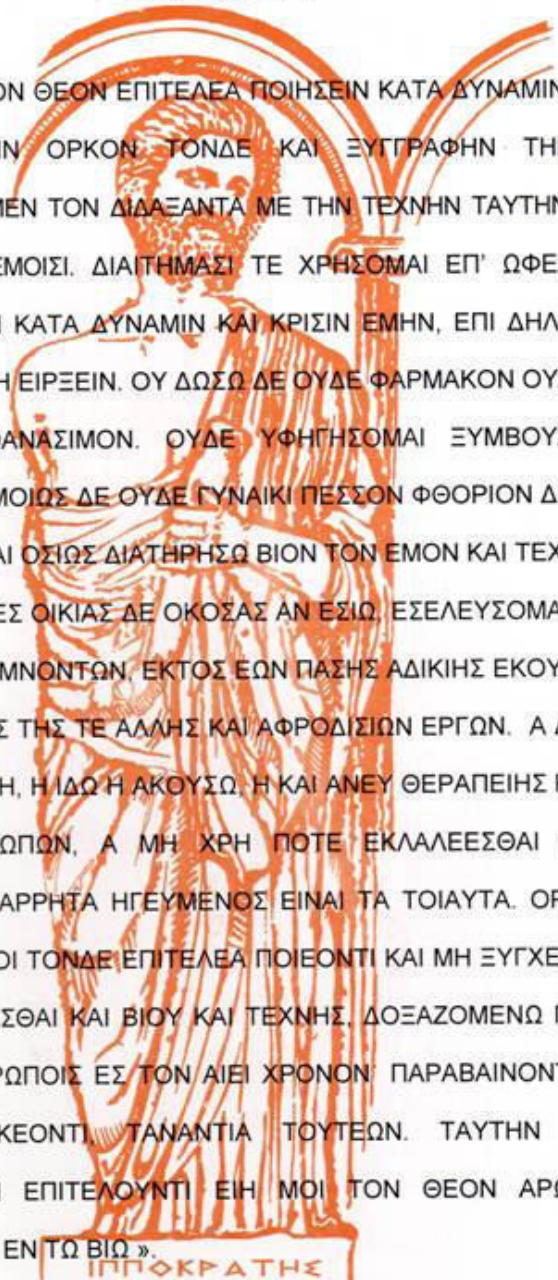
186. A. J. Brooks, M. J. Waters "The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications", *Nat. Rev. Endocrinol*, vol. 6, pp. 515–525, 2010.
187. M. J. Waters, A. J. Brooks, A. J. "JAK2 activation by growth hormone and other cytokines", *Biochem. J*, vol. 466, pp. 1–11, 2015.
188. A. J. Brooks et al. "Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor", *Science*, vol. 344, 2011).
189. C. Carter-Su, J. Schwartz, L. S. Argetsinger "Growth hormone signaling pathways", *Growth Horm. IGF Res*, vol. 28, pp. 11–15, 2016.
190. M. Bidlingmaier, C. J. Strasburger "Growth hormone", *Handb Exp Pharmacol*, vol. 195, pp. 187-200, 2010.
191. J. E. Brinkman et al. «Physiology, Growth Hormone», *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482141/>
192. V. Roelfsema, R. G. Clark "The Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Axis: Its Manipulation for the Benefit of Growth Disorders in Renal Failure", *JASN*, vol. 12, no. 6, pp. 1297-1306, 2001.
193. W. F. Blum et al. "The growth hormone–insulin-like growth factor-I axis in the diagnosis and treatment of growth disorder", *Endocr Connect.*, vol. 7, no. 6, pp. 212–222, 2018.
194. K. Y. Ho et al. "Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 64, no. 1, pp. 51–8, 1998.
195. P. Brazeau et al. "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone", *Science*, vol. 179, no. 68, pp. 77-9, 1973.
196. G. Pelletier, D. Dube, R. Puviani "Somatostatin: electron microscope immunohistochemical localization in secretory neurons of rat hypothalamus", *Science*, vol. 196, no. 4297, pp. 1469-70, 1977.
197. Y. C. Patel "Somatostatin and its receptor family", *Front Neuroendocrinol*, vol. 20, no. 3, pp. 157-98, 1999.
198. L. P. Shen, R. L. Pictet, W. J. Rutter "Human somatostatin I: sequence of the cDNA", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 79, no. 15, pp. 4575-9, 1982.
199. A. H. Coons, E. H. Leduc, J. M. Connolly "Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit", *J Exp Med*, vol. 102, no. 1, pp. 49-60, 1955
200. L. A. Sternberger "The unlabeled antibody (PAP) method, introduction", *J Histochem Cytochem*, vol. 27, no. 12, pp. 1657, 1979.
201. P. N. Nelson, G. M. Reynolds, E. E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos, P. G. Murray "Monoclonal antibodies", *Mol Pathol*, vol. 53, no. 3, pp. 111-7, 2000.
202. G. Köhler, C. Milstein "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495-7., 1975
203. K. Sikora "Monoclonal antibodies in oncology", *J Clin Pathol*, vol. 35, no. 4, pp. 369-75, 1982.
205. L. M. McManus, R. N. Mitchell, *History of Immunohistochemistry*. Elsevier Science Publishers Editors 2014: Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms Chapter: History of Immunohistochemistry A. Pokrajac, J. Frystyk, A. Flyvbjerg, P. J. Trainer "Pituitary-independent effect of octreotide on IGF-I generation", *Eur J Endocrinol*, vol. 160, no. 4, pp. 543-8, 2009.
206. D. Cervia, P. Bagnoli "An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology", *Pharmacol Ther*, vol. 116, no. 2, pp. 322-41, 2007.
207. C. Reyes-Moreno et al. "Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta I expression in human PC-3 prostate cancer cells", *Prostate*, vol. 26, no. 5, pp. 260-9, 1995.
208. M. A. Dimopoulos et al. "Combination of LHRH analog with somatostatin analog and dexamethasone versus chemotherapy in hormone-refractory prostate cancer: a randomized phase II study", *Urology*, vol. 63, no. 1, pp. 120-5, 2004.
209. A. Mosca, L. Dogliotti, A. Berruti, S. W. J. Lamberts, L. J. Hofland "Somatostatin receptors: from basic science to clinical approach. Unlabeled somatostatin analogues-1: Prostate cancer", *Dig Liver Dis*, vol. 36, no. 1, pp. 60-7, 2004.
210. J. C. Reubi et al. «Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas», *Cancer Res*, vol. 50, no. 18, pp. 5969-77, 1990.
211. S. Grozinsky-Glasberg, I. Shimon, M. Korbonits, A. B. Grossman "Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms", *Endocr Relat Cancer*, vol. 15, no. 3, pp. 701-20, 2008.

212. J. C. Reubi "Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy", *Endocr Rev*, vol. 24, no. 4, pp. 389-427, 2003.
213. W. W. de Herder, L. J. Hofland, A. J. van der Lely, S. W. Lamberts "Somatostatin receptors in 55. gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours", *Endocr Relat Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 451-8, 2003.
214. H. Pisarek et al. "Expression of somatostatin receptor subtypes in human thyroid tumors: the immunohistochemical and molecular biology (RT-PCR) investigation", *Thyroid Res*, vol. 2, no. 1, 2009.
215. H. Pisarek, T. Stepien, R. Kubiak, M. Pawlikowski "Somatostatin receptors in human adrenal gland tumors—immunohistochemical study", *Folia Histochem Cytobiol*, vol. 46, no. 3, pp. 45-51, 2008.
216. M. C. Smitha, M. Maggi, C. Orlando "Somatostatin receptors in non-endocrine tumours", *Dig Liver Dis*, vol. 36, no. 1, pp. 78-85, 2004.
217. R. T. Bass et al. "Identification and characterization of novel somatostatin antagonists", *Mol Pharmacol*, vol. 50, no. 4, pp. 709-15, 1996.
218. L. J. Hofland, S. W. Lamberts "The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance", *Endocr Rev*, vol. 24, no. 1, pp. 28-47, 2003.
219. D. Murray, S. A. Melmed "A. critical analysis of clinically available somatostatin analog formulations for therapy of acromegaly", *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 93, no. 8, pp. 2957-68, 2008
220. K. Oberg "Established clinical use of octreotide and lanreotide in oncology", *Chemotherapy*, vol. 47, no. 2, pp. 40-53, 2001.
221. H. Lahlou et al. "sst2 Somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation", *J Biol Chem*, vol. 278, no. 41, pp. 39356-71, 2003.
222. T. Florio et al. "Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1)", *Mol Endocrinol*, vol. 13, no. 1, pp. 24-37, 1999.
223. P. Cordelier et al. "Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 94, no. 17, pp. 9343-8, 1997.
224. K. Sharma, Y. C. Patel, C. B. Srikant "Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3", *Mol Endocrinol*, vol. 10, no. 12, pp. 1688-96, 1996.
225. R. Teijeiro et al. "Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53", *Cell Physiol Biochem*, vol. 12, no. 1, pp. 31-8, 2002.
226. H. Gastpar, M. Zoltbrocki, P. W. Weissgerber "The inhibition of cancer cell stickiness by somatostatin", *Res Exp Med (Berl)*, vol. 182, no. 1, pp. 1-6, 1983.
227. D. Cervia, P. Bagnoli "An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology", *Pharmacol Ther*, vol. 116, no. 2, pp. 322-41, 2007.
228. A. Pokrajac, J. Frystyk, A. Flyvbjerg, P. J. Trainer "Pituitary-independent effect of octreotide on IGF-I generation", *Eur J Endocrinol*, vol. 160, no. 4, pp. 543-8, 2009.
229. G. R. Ambler et al. "The effects of octreotide on GH receptor and IGF-I expression in the GH-deficient rat", *J Endocrinol*, vol. 149, no. 2, pp. 223-31, 1996.
230. S. G. Ren, S. Ezzat, S. Melmed, G. D. Braunstein "Somatostatin analog induces insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) expression in human hepatoma cells", *Endocrinology*, vol. 131, no. 5, pp. 2479-81, 1992.
231. G. Weckbecker et al. "Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects", *Nat Rev Drug Discov*, vol. 2, no. 12, pp. 999-1017, 2003.
232. A. Albini et al. "Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis.", *FASEB J*, vol. 13, no. 6, pp. 647-55, 1999.
233. N. Davies et al. "Effects of octreotide on liver regeneration and tumour growth in the regenerating liver", *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, no. 1, pp. 47-53, 1997.
234. W. D. Jia et al. "Octreotide acts as an antitumor angiogenesis compound and suppresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts", *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 129, no. 6, pp. 327-34, 2003.
235. H. H. Li et al. "Effects of short-term treatment of somatostatin on angiogenesis of gastric carcinoma.", *Ai Zheng*, vol. 22, no. 9, pp. 990-3, 2003.
236. D. Ferone et al. "Somatostatin receptor distribution and function in immune system", *Dig Liver Dis*, vol. 36, no. 1, pp. S68-77, 2004.
237. E. Pinter, Z. Helyes, J. Szolcsanyi "Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception.", *Pharmacol Ther*, vol. 112, no. 2, pp. 440-56, 2006.



238. J. A. Paice , R. D. Penn, J. S. Kroin "Intrathecal octreotide for relief of intractable nonmalignant pain: 5-year experience with two cases", *Neurosurgery*, vol. 38, no. 1, pp. 203-7, 1996.
239. M. A. Goodman et al. "Metabolic and endocrine alterations in osteosarcoma patients", *Cancer*, vol. 42, no. 2, pp. 603-10, 1978.
240. A. Giustina, G. Mazziotti, E. Canalis "Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton", *Endocr Rev*, vol. 29, no. 5, pp. 535-559, 2008.
241. M. Cheng et al. "Growth hormone receptor promotes osteosarcoma cell growth and metastases", *FEBS Open Bio*, vol. 10, no. 1, pp. 127-134, 2020.
242. A. Poidvin, J. C. Carel, E. Ecosse, D. Levy, J. Michon, J. Coste "Increased risk of bone tumors after growth hormone treatment in childhood: A population-based cohort study in France", *Cancer Med*, vol. 7, no. 7, pp. 3465-3473, 2018.
243. C. Libbrecht, S. Collardeau-Frachon, P. Marec, C. F. Conter, D. Frappaz "Sarcoma Occurring at the Site of Growth Hormone Therapy", *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 42, no. 4, pp. 335, 2020.
244. C. Sandoval, J. Dunbar, M. Ozkaynak, S. Jayabose "Osteosarcoma following growth hormone therapy in recurrent acute lymphoblastic leukemia and Rapadilino syndrome", *Pediatr Hematol Oncol*, vol. 29, no. 3, pp. 270-1, 2012.
245. K. M. Makielski et al. "Risk Factors for Development of Canine and Human Osteosarcoma: A Comparative Review", *Vet Sci*, vol. 6, no. 2, pp. 48, 2019.
246. J. Yang, W. Zhang "New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy", *Curr Opin Oncol*, vol. 25, no. 4, pp. 398-406, 2013.
247. J. Pinski, A. V. Schally, G. Halmos, K. Szepeshazi, K. Groot "Somatostatin analog RC-160 inhibits the growth of human osteosarcomas in nude mice", *Int J Cancer*, vol. 65, no. 6, pp. 870-4, 1996.
248. M. G. Conzemius, J. C. Graham, J. Si Haynes, C. A. Graham "Effects of treatment with growth hormone and somatostatin on efficacy of diammine [1,1-cyclobutane dicarboxylato (2-)-0,0']-(SP-4-2) in athymic rats with osteosarcoma", *Am J Vet Res*, vol. 61, no. 6, pp. 646-50, 2000.
249. C. Susini, L. Buscail "Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents", *Ann Oncol*, vol. 17, no. 12, pp. 1733-42, 2006.
250. P. J. Mansky et al. "Treatment of metastatic osteosarcoma with the somatostatin analog OncoLar: significant reduction of insulin-like growth factor-1 serum levels", *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 24, no. 6, pp. 440-6, 2002.
251. A. V. Schall, J. L. Varga "Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology", *Comb Chem High Throughput Screen*, vol. 9, no. 3, pp. 163-70, 2006.
252. J. H. McMaster, P. El Scranton, A. L. Drash "Growth and hormone control mechanisms in osteosarcoma. Evidence for a new therapeutic approach", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 106, pp. 366-76, 1975.
253. J. Pinski et al. "Inhibition of growth of human osteosarcomas by antagonists of growth hormone-releasing hormone", *J Natl Cancer Inst*, vol. 87, no. 23, pp. 1787-94, 1995.
254. R. A. James, R. B. Dymock "Osteosarcoma associated with acromegaly: a case report", *Pathology*, vol. 8, pp. 57-59, 1976.
255. C. Khanna et al. "A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy", *Clin Cancer Res*, vol. 8, pp. 2406-12, 2002.
256. K. Hasegawa, S. Kudoh, T. Ito "Somatostatin receptor staining in FFPE sections using a ligand derivative dye as an alternative to immunostaining", *PLoS One*, vol. 12, no. 2, 2017.
257. R. C. Marcove, M. M. Lewis, A. G. Huvos "En bloc upper humeral interscapulo-thoracic resection. The Tikhoff-Linberg procedure", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 124, pp. 219-28, 1977.
258. S. Ferrari et al. "Somatostatin receptor (SSTR) scintigraphy in patients with osteosarcoma", *Cancer Biother Radiopharm*, vol. 18, no. 5, pp. 847-51, 2003.
259. P. J. Mansky et al. "Treatment of metastatic osteosarcoma with the somatostatin analog OncoLar: significant reduction of insulin-like growth factor-1 serum levels", *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 24, no. 6, pp. 440-6, 2002.
260. M. Ioannou, P. J. Papagelopoulos, I. Papanastassiou, I. Iakovidou, S. Kottakis, N. Demertzis "Detection of somatostatin receptors in human osteosarcoma", *World J Surg Onc*, vol. 6, no. 99, 2008.

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ  
ΚΕΙΜΕΝΟ**



« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

## Βιογραφικό Σημείωμα



### Προσωπικά στοιχεία

Επώνυμο, Όνομα Ιωάννου, Μάρκος

Διεύθυνση ηλεκ. ταχ. [markosioannou@yahoo.gr](mailto:markosioannou@yahoo.gr)

Ημ. γέννησης 07. Απριλίου 1971

Εθνικότητα Ελληνική

### Σπουδές

1989 έως 1995

Τμήμα ιατρικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

13/10/1995

Λήψη πτυχίου με βαθμό λίαν καλώς

### Μεταπτυχιακή δραστηριότητα

15/01/1996 bis 15/06/1996

Στρατιωτική θητεία ως σπλίτης ιατρός

16/08/1996 μέχρι 24/08/1997

Θητεία υπαίθρου (αγροτικός ιατρός) στην νήσο Σίκινο

01/10/1997 μέχρι 01/12/03

Ειδικευόμενος ιατρός ορθοπαιδικής και τραυματολογίας στην 6η ορθοπαιδική κλινική του νοσοκομείου ΚΑΤ, Αθήνα. Τα εξάμηνα επιλογής ήταν αφενός η μικροχειρουργική και χειρουργική άκρας χειρός στο νοσοκομείο ΚΑΤ και η ορθοπαιδική ογκολογία στο νοσοκομείο Μεταξά.

22/01/2004

Λήψη τίτλου ειδικότητας

## Επαγγελματική δραστηριότητα

15.02.2016 έως σήμερα  
Υπεύθυνος τμήματος ισχίου και γόνατος στο Νοσοκομείο Spital Zollikerberg, Trichtenhäuserstrasse 20, 8125 Zürich, Ελβετία.

23/08/2011 έως 31.01.2016  
Επιμελητής Α΄ΕΣΥ Γενικού Νοσοκομείου Κύμης <Γεώργιος Παπανικολάου>. Κατά το διάστημα αυτό είχα έντονη επιστημονική συνεργασία με το τμήμα ορθοπαιδικής ογκολογίας του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς <Άγιοι Ανάργυροι>, υπό διεύθυνσης κυρίου Δεμερτζή Ν.

13/12/2011 έως 22/08/2011  
Επιμελητής Β΄ΕΣΥ στο τμήμα ορθοπαιδικής ογκολογίας του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς <Άγιοι Ανάργυροι>, υπό διεύθυνσης κυρίου Δεμερτζή Ν. (απόσπαση θέσης).

04/04/2007 έως 12/12/2010  
Επιμελητής Β΄ΕΣΥ Γενικού Νοσοκομείου Κύμης <Γεώργιος Παπανικολάου>.

09/02/2004 έως 03/04/2007  
Επικουρικός ιατρός στο τμήμα Ορθοπαιδικής του Γενικού Νοσοκομείου Χαλκίδος.

## Ειδική εκπαίδευση

Isolated Limb Perfusion με χρήση TNF-alpha/1a, Lausanne, Ελβετία. Από το έτος 2005 ανήκω στο ILP (Beromun) Expert Group.

Εκπαίδευση σε ελάχιστα επεμβατική προσπέλαση ισχίου (AMIS) στο Παρίσι, Ελβετία και Ιταλία τα έτη 2016 έως 2018. Μέλος του AMIS expert group.

Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική σπονδυλικής στήλης (Cervical and Sacroiliac RF ablation neurotomy and biacuplasty for chronic discogenic pain., Nottingham GB, 2009)

## Επιστημονικό Έργο

Το επιστημονικό έργο μου επικεντρώνεται κυρίως σε θέματα ορθοπαιδικής ογκολογίας.

## Ανακοινώσεις σε εθνικά και διεθνή συνέδρια

Σύνολο 154 εκ των οποίων:  
- Εθνικά συνέδρια: 112  
- Διεθνή συνέδρια: 42

- 1.P53 Oncogene Expression As A Prognostic Marker For Giant Cell Tumors Of Bone  
Ioannou M, Lekarakou I, I, Iakowidou I, Papanastasiou, Kottakis S, Demertzis N.  
14th International Symposium on Limb Salvage, Hamburg, Germany, September 11th- 14th 2007.
- 2.Multimodality treatment for high Grade shoulder Girdle fibrosarcoma, Including Chemoembolization And Limb Sparing Sugery  
Papanastasiou I, Magoulas S, Ioannou M, Iakovidou I., Ziras N., Demertzis N.  
14th International Symposium on Limb Salvage, Hamburg, Germany, September 11th- 14th 2007.
- 3.Distal Femur Osteosarcoma Complicated By Bone Leishmaniasis: A Case Report.

Papanastassiou I.,Iakovidou I., Lekarakou M., Ioannou M, Kottakis S., Ziras N., Demertzis N.  
 14th International Symposium on Limb Salvage, Hamburg,Germany ,September 11th- 14th 2007.

4.A New Reconstructive Technique for Limb-Sparing Surgery involving Tumors of the Shoulder Girdle: Preliminary Results.  
 N. Demertzis, M.E. Ioannou, G.D. Chloros, S. Kottakis.  
 13th International Conference of Limb Salvage, Seoul, Korea 2005

5.C-Kit positivity in Extra-abdominal Desmoid Tumors.  
 M.E. Ioannou, P.J. Papagelopoulos, S. Kottakis, I. Iakovidou, G.D. Chloros, N. Demertzis.  
 13th International Conference of Limb Salvage, Seoul, Korea 2005

6.. Overexpression of the tumorsuppressor gene P53 in giant cell tumors of bone.  
 M.E.Ioannou, I.Papanastassiou ,I.Iakowidou, S.Kottakis and N.Demertzis  
 AAOS (American Academy of Orthopaedic Surgeons) 2009

7. Soft tissue lumps and bumps of the hand:the role of FNA in differential diagnosis.  
 M.Ioannou, N.Demertzis, S.Kottakis. International Congress Hand – Upper limb – Microsurgery.  
 September 7-10, 2005, Pythagorio, Samos, Greece

8. Osteosarcoma: response to preoperative chemotherapy.  
 M.Ioannou ,S.Kottakis ,I.Iakowidou ,N.Ziras and N.Demertzis.:5th Congress of the Balkan Union of Oncology (BUON) ,Belgrade 14-17/10/2004

9. Treatment of 3 cases of clear cell SA of the hand.  
 M.Ioannou ,S. Wuertzner ,S.Kottakis and N.Demertzis.: 5th Congress of the Balkan Union of Oncology (BUON), Belgrade 14-17/10/2004

10. Congenital Bilateral complete carpal coalition: a case report  
 M.Ioannou, E.Gigas, S.Flesouras, C.Mirtsios ,N.Pekopoulos, A.P.Sotos. International Congress Hand – Upper limb – Microsurgery 2006

11. Treatment of phalangeal and metacarpal fractures with external fixation  
 M.Ioannou, A.P.Sotos, E.Gigas, N.Pekopoulos, S.Flesouras, C.Mirtsios .International Congress Hand – Upper limb – Microsurgery 2006

12.Primary malignant bone tumors of the metacarpal and phalanx treated with ray amputation  
 M.Ioannou, S.Kottakis, and N.Demertzis. International Congress Hand – Upper limb – Microsurgery 2006

13.Low –grade chondrosarcoma of bone: how safe is histological diagnosis?  
 8th EFORT (European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology) Congress.M.E. Ioannou, S.G. Kottakis and N.S. Demertzis

14.Parathyroid hormone levels, renal osteodystrophy and ectopic calcification in hemodialysis patients.M.Ioannou, E.Gigas, P.Ioannou, N.Pekopoulos, E.Limaxis, S.Flesouras  
 34th european symposium on calcified tissues

15.Homocystein serum levels in hemodialysis patients with normal PTH status  
 M.Ioannou, E.Gigas, P.Ioannou ,N.Pekopoulos  
 7th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis

16.Limb salvage surgery for primary malignant bone tumors in the region of the elbow :report of a case.M.E.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis and N.Demertzis  
 XII FESSH Congress (12th Congress of the Federation of European Societies for Surgery of the Hand27-30 June2007 , Athens)

17.Limb salvage procedures for malignancies of the proximal humerus with endoprosthesis.  
 Papanastassiou I., Ioannou M, Kottakis S., Demertzis N.  
 XII FESSH Congress (12th Congress of the Federation of European Societies for Surgery of the Hand27-30 June2007 , Athens)

18.Aggressive Giant Cell Tumors of distal radius treated by limb salvage surgery.  
 Papanastassiou I., Ioannou M, Kottakis S., Demertzis N  
 XII FESSH Congress (12th Congress of the Federation of European Societies for Surgery of the Hand27-30 June2007 , Athens)

19.Pertrochanteric Fracture Treatment with External Fixation  
 G.Roumeliotis ,M.Ioannou  
 World Congress on External Fixation 2007, Cairo ,October 17th-19th 2007

20.The use of external fixation in the treatment of comminuted fractures of the distal radius.  
 S.Flesouras,N.Pekopoulos,M.Ioannou,E.Gigas,A.Sotos,G.Roumeliotis  
 World Congress on External Fixation 2007, Cairo ,October 17th-19th 2007

21.False picture of non-union in an Akin osteotomy. Case report.  
 G. Roumeliotis, M. Ioannou, I.Papanastassiou, K. Anagnostakos, E.Papadimitriou, P.Ioannou  
 1st Hellenic Austrian Congress in Foot and Ankle Disorders, Myconos 21st to 23rd September 2007

22.Early vs late mobilization of grade I and II inversion ankle sprains.  
 M.Ioannou, G.Roumeliotis, I.Papanastassiou, K.Anagnostakos ,P.Ioannou, E.Papadimitriou  
 1st Hellenic Austrian Congress in Foot and Ankle Disorders, Myconos 21st to 23rd September 2007

23.Malignant Tumors of Foot and Ankle  
 I.Papanastassiou, M.Ioannou, M.Terzi, A.Simoulis, S.Kottakis and N.Demertzis  
 1st Hellenic Austrian Congress in Foot and Ankle Disorders, Myconos 21st to 23rd September 2007

24.Complication rate in LSS with endoprosthesis reconstruction  
 Papanastassiou I., Ioannou M, Mpakalis S., Psychas Ch., Kottakis S., Demertzis N.  
 26th Annual Meeting of European Infection Society, 20-22 September 2007, Corfu

25. Deep infection in total femur replacement for malignancies.  
Papanastasiou I., Ioannou M., Psichas S., Kottakis S. and Demertzis N.  
26th Annual Meeting of the European Bone & Joint Infection Society
26. Malignant tumors of popliteal fossa-therapy and diagnostic approach. M.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis, N.Demertzis.  
8th World Biomaterial Congress , Amsterdam 28/05-01/06/2008
27. Re-Infusion of drained blood in patients undergoing total knee arthroplasty.  
M.Ioannou, I.Papanastassiou, G.Roumeliotis, C.Michas  
8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Istanbul April 09-12,2008
28. Preliminary results of sacroiliac radiofrequency neurotomy in patients with chronic low back pain. M.Ioannou, G.Roumeliotis, E.Limaxis, E.Koiliari. ECTS 2010 (accepted)
29. Synovial chondromatosis with chondrolysis of the shoulder:report of a case. M.Ioannou, G.Roumeliotis, I.Papanastassiou, P.Ioannou, E.Gikas, G.Kourkouvelis. 9th Efort Congress 2008
30. Treatment of unstable extra-articular distal radius fractures with intrafocal (Kapandji) pinning. M.Ioannou, G.Roumeliotis. 54th South African orthopaedic congress
31. The role of external fixation in the treatment of comminuted fractures of the distal radius. M.Ioannou, E.Gigas, C.Mirtsios, S.Flesouras, N.Pekopoulos, A.Sotos.  
International Congress Hand – Upper limb – Microsurgery. September 7-10, 2005, Pythagorio, Samos, Greece
32. Extensor mechanism restoration in megaprosthesis reconstruction for malignant tumors of the proximal tibia  
M.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis and N.Demertzis, BUON (Balcan Union of Oncology)2008
33. Preliminary results of cervical radiofrequency ablation in patients with cervical spondylosis. M.Ioannou, G.Roumeliotis, E.Limaxis, O.Theodorou. ECTS 2010
34. Early treatment of unstable shaft humerus fractures with external fixation.  
G.Roumeliotis, M.Ioannou, I.Papanastassiou, G.Anagnostakos, E.Papadimitriou  
Πανκύπριο Συνέδριο 2008
35. Effects of tourniquet release and hemostasis before wound closure in blood loss in total knee arthroplasty..M.Ioannou, G.Roumeliotis, I.Papanastassiou, E.Gikas, C.Michas  
8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, Istanbul April 09-12,2008
36. Treatment of acute acromioclavicular dislocation with double coracoclavicular and acromioclavicular ligament reconstruction using braided polyester prosthetic ligament.  
M.Ioannou, G.Roumeliotis, K.Anagnostakos, E.Papadimitriou  
10th EFFORT Congress, 2009
37. Malignant tumors of the popliteal fossa:therapy and diagnostic approach  
M.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis and N.Demertzis,  
10th EFFORT Congress, 2009
38. Herbert screw fixation of undisplaced scaphoid fractures versus conservative management. M.Ioannou, G.Roumeliotis, I.Papanastassiou, K.Anagnostakos, E.Gikas  
10th EFFORT Congress, 2009
39. Management of stage-3 giant cell tumors of bone  
Main author: Markos Ioannou, S.kottakis, N.Demertzis accepted at the 83d annual meeting of the Japanese Orthopaedic Association
40. Radial wedge osteotomy with partial resection of the posterior intraosseous nerve in painful osteoarthritis of the wrist  
M.Ioannou, G.Roumeliotis, E.Lymaxis, Ch.Mirtsios accepted at 11th EFFORT Congress
41. Functional outcome in cases of shoulder reconstruction for malignant tumors of the proximal humerus  
M.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis and N.Demertzis ,BUON (Balcan Union of Oncology)2008-
42. Results of spectral determination of metals in human tissues adjacent to megaprosthesis used in limb salvage surgery. M.Ioannou, I.Papanastassiou, S.Kottakis and N.Demertzis  
World Biomaterial Congress 2008, Amsterdam

## Δημοσιεύσεις /Papers

## Σύνολο: 15

1. M.Ioannou, N.Demertzis, I.Iakovidou, S.Kottakis "The Role of Imatinib Mesylate in Adjuvant Therapy of Extra-abdominal Desmoid Tumors", *Anticancer Res.* 2007 Mar-Apr;27(2):1143-7.
2. M. Ioannou, P. J. Papagelopoulos, I. Papanastassiou, I. Iakovidou, S. Kottakis, N. Demertzis "Detection of somatostatin receptors in human osteosarcoma", *World J Surg Onc*, vol. 6, no. 99, 2008.
3. M. Ioannou, I. Papanastassiou, A.E. Athanassiou, N. Ziras, S. Kottakis, N. Demertzis "Surgical options in cases of tumorous destruction of the proximal humerus: Twenty-one patients followed 5,7(4-9)years", *JBuon*, vol. 4, no 1, 2009.
4. N. Demertzis, M. Ioannou, A. Stamatoukou, S.Kottakis, I. Iakowidou "Detection of Growth Hormone receptors in osteosarcoma", *ANTICANCER RESEARCH*, vol. 24, no. 5D, September-

October 2004 :3523.

5. S. Wuerztner-Tsiapi, M. Ioannou, S. Kottakis, N. Demertzis "Treatment of 3 cases of clear cell sarcoma in the hand", *J Bone Joint Surg Br* 2004 86-B: 186-d

6. M. Ioannou, S. Kottakis, E. Papaggeli, I. Iakovidou, N. Ziras, N. Demertzis " Osteosarcoma: response to preoperative chemotherapy", *J Bone Joint Surg Br* 2004 86-B: 187

7. I. Papanastassiou, M. Ioannou, P.J. Papagelopoulos, G. Arealis, C. Mihas, I. Iakovidou, N. Demertzis "P53 expression as a prognostic marker in giant cell tumor of bone", *Orthopedics.*, vol. 12, no. 33, 2010.

8. M. Ioannou, I. Papanastassiou, G. Roumeliotis, C. Michas "Re-Infusion of drained blood in patients undergoing total knee arthroplasty", *Osteoporosis International*, vol. 19, no. 1, pp. 79-80, 2008.

9. M. Ioannou, G. Roumeliotis, I. Papanastassiou, E. Gikas, C. Michas "Effects of tourniquet release and hemostasis before wound closure in blood loss in total knee arthroplasty", *Osteoporosis International*, vol. 19, no. 1, 2008:79-80.

10. 10. G. Roumeliotis, M. Ioannou, E. Limaxis, O. Theodorou "Interspinous Process Distraction Devices For The Treatment Of Multilevel Degenerative Lumbar Spinal Stenosis", *The Internet Journal of Minimally Invasive Spinal Technology*. 2010 Supplement III to IJMIST IV, No 5

11. 11. M. Ioannou, G. Roumeliotis, E. Limaxis, O. Theodorou "Six-Months Results Of Cervical Radiofrequency Ablation Neurotomy In Patients With Chronic Neck Pain", *The Internet Journal of Minimally Invasive Spinal Technology*. 2010 Supplement III to IJMIST IV, No 5

12. 12.M. Ioannou, G. Roumeliotis, E. Limaxis, O. Theodorou "Efficacy And Safety Of Balloon Kyphoplasty-Are High Cement Volumes Required?", *The Internet Journal of Minimally Invasive Spinal Technology*. 2010 Supplement III to IJMIST IV, No 5

13. I. Papanastassiou; M. Ioannou, S. Mpakalis, C. Psychas, S. Kottakis, N. Demertzis "Complication rate in limb salvage surgery with endoprosthetic reconstruction", [http://proceedings.jbjs.org.uk/cgi/content/abstract/91-B/SUPP\\_II/305-a?eaf](http://proceedings.jbjs.org.uk/cgi/content/abstract/91-B/SUPP_II/305-a?eaf)

14. M. Ioannou, I. Papanastassiou, I. Iakowidou, S. Kottakis, N. Demertzis "Plexiform schwannoma of the posterior tibial nerve: a case report.", *Cases J.* 2009 Aug 17;2:8392.

## Συνέδρια και σεμινάρια

Συμμετοχή σε 174 εθνικά και διεθνή συνέδρια, συμπόσια, σεμινάρια και Workshops

## Εκπαιδευτικό έργο (Διαλέξεις)

Management of soft tissue sarcomas (2006)

Benign chondroblastic lesions (2007)

Pain management in skeletal metastasis (2008)

Limb salvage surgery in malignant bone tumors (2008)

External fixation in femoral and tibia fractures (2009)

Neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma (2009)

Benign bone tumors: diagnostic approach (2010)

Benign bone tumors: therapy (2010)

Kyphoplasty: indications and mistakes (2010)

Pigmented villonodular synovitis (PVNS) (2011)

GCT of bone (2012)

Reconstructive surgery of the knee: total knee arthroplasty (2011)

MIS of the spine: RF biacuplasty vs endoscopic transforaminal discectomy (2012)

Reconstructive surgery of the hip: indications of total hip arthroplasty (2011)

Benign bone tumors: diagnosis and therapy (2012)

Giant Cell Tumor of Bone , Benign osteolytic lesions (2015)

Advances in management of MS Tumors (MIS techniques, limb salvage surgery, chemotherapy, radiation therapy, gene therapy- MS Tumor Review Course-University of Athens) (2014)

### **Επιστημονικές Εταιρείες**

ISOLS – International Society of Limb Salvage

AGA – Deutschsprachige Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (γερμανόφωνη εταιρεία για αρθροσκόπηση και χειρουργική αρθρώσεων)

AE – Deutsche Gesellschaft für Endoprothetik (γερμανική εταιρεία για αρθροπλαστικές)

Verbindung der Schweizer Ärztinnen und Ärzte FMH  
(Σύλλογος Ιατρών Ελβετίας)

Ärzttekammer des Kantons Zürich (Ιατρικός Σύλλογος Ζυρίχης)

### **Ξένες Γλώσσες**

Γερμανικά

Αγγλικά

Γαλλικά