



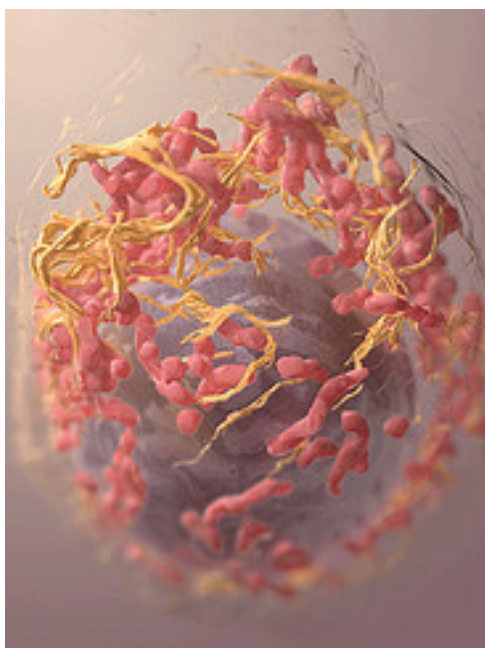
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΕΓΑΤΟΥ ΜΑΡΙΝΑ

**Ο ρόλος της ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH) στην προσκόλληση
κυττάρων του μελανώματος.**



Επιβλέπων: καθηγητής ΤΖΑΝΑΚΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιστολογίας/Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το παρών κείμενο αποτελεί τη Διπλωματική μου Εργασία όπως ορίζεται από το πρόγραμμα σπουδών μου στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψή του καθηγητή της Ιατρικής σχολής και Διευθυντή του εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κ. Γεωργίου Τζανακάκη τον οποίο και θέλω πρωτίστως να ευχαριστήσω για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας αλλά και για την καθοδήγηση του στην πρώτη ερευνητική μου δουλειά.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Δρ. Γεωργία Χαλκιαδάκη για την υπομονή ,τις πολύτιμες συμβουλές της αλλά και για τις ώρες που αφιέρωσε δίπλα μου προκειμένου να μάθω τις τεχνικές και τις ανάγκες του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Κατερίνα Μπερδιάκη για την υποστήριξη και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε καθώς επίσης και για τον χρόνο που αφιέρωσε τόσο κατά την αρχική εκπαίδευση μου στο εργαστήριο όσο και κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Εμβρυολογίας/Ιστολογίας και ειδικά στην Λέκτορα Dragana Nicitonic, στην Κουβίδα Κατερίνα, στην Ρόη Βουδούρη και στον Νικόλα Γιαννάκη που αποτέλεσαν μια εξαιρετική επιστημονική ομάδα με ζεστή και φιλική ατμόσφαιρα η οποία συνέβαλλε στην αρμονική μας συνεργασία.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη, την ενίσχυση και την υπομονή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1 ΜΕΛΑΝΩΜΑ	
1.1.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	2
1.1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	3
1.1.3 ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ (Malignant Melanoma)	4
1.1.4 ΑΙΤΙΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	7
1.1.5 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	7
1.1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	9
1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΘΕΜΕΛΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ	11
1.3 ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΕΣ	
1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ	12
1.3.1.α ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (HA)	14
1.3.1.β ΘΕΙΚΗ ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗ (CS)	15
1.3.1.γ ΘΕΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΑΝΗ (DS)	16
1.3.1.δ ΘΕΙΚΗ ΚΕΡΑΤΑΝΗ (KS)	16
1.3.1.ε ΘΕΙΚΗ ΗΠΑΡΑΝΗ (HS) ΚΑΙ ΗΠΑΡΙΝΗ (heparin)	17
1.4 ΗΠΑΡΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	19
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	22
2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ	22
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	23

2.3.1 ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (SDS PAGE) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	
ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)	24
2.3.2 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ LMWH ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ	
ΤΩΝ M5 ΚΥΤΤΑΡΩΝ	28
3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ PKCa ΑΠΟ ΤΗΝ LMWH	28
3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ pPKCa ΑΠΟ ΤΗΝ LMWH	
ΣΤΑ M5 ΚΥΤΤΑΡΑ	30
3.4 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ LMWH ΣΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ M5 ΚΥΤΤΑΡΩΝ	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κακοήθες μελάνωμα (malignant melanoma) αποτελεί μαζί με το βασικοκυτταρικό και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα τις τρεις κύριες μορφές του καρκίνου του δέρματος. Προέρχεται από τον μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων της επιδερμίδας, είναι κακοήθης όγκος υψηλής επιθετικότητας και αποτελεί νόσημα αυξανόμενης συχνότητας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων αλλά και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των γύρω από αυτά φυσιολογικών κυττάρων, ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η προσκόλληση, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του μελανώματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζουμε τους μηχανισμούς δράσης της γλυκοζαμινογλυκάνης ηπαρίνης (heparin) και το ρόλο της στην κυτταρική προσκόλληση. Η ηπαρίνη είναι ένας γραμμικός και αρνητικά φορτισμένος πολυσακχαρίτης που συντίθεται και αποθηκεύεται στα σιτευτικά κύτταρα του συνδετικού ιστού και εντοπίζεται στο ήπαρ, στους μύες, στο δέρμα, στο έντερο, στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου μελανώματος M5 καθώς και τεχνικές απομόνωσης και ανάλυσης πρωτεϊνών όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western και ο ανοσοφθορισμός.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποδεικνύουν τον ρόλο της ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH) στην ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης των κυττάρων του μελανώματος. Η προσθήκη της LMWH μείωσε σημαντικά τόσο την προσκόλληση των M5 κυττάρων του μελανώματος όσο και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C άλφα (PKCα), η οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην σηματοδότηση της κυτταρικής προσκόλλησης. Επιπρόσθετα, η LMWH προκάλεσε μεταβολές στη μορφολογία των κυττάρων οι οποίες σχετίζονται με τη μειωμένη προσκολλητική ικανότητα που παρατηρήθηκε. Μελέτες που αφορούν μηχανισμούς δράσης διαφορετικών μορφών της ηπαρίνης μπορούν να βοηθήσουν στην στοχευμένη θεραπεία του μελανώματος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΛΑΝΩΜΑ

1.1.1.ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το δέρμα αποτελεί το εξωτερικό ελαστικό περίβλημα του σώματος, που αυτοαναγεννάται, είναι πολυλειτουργικό, προσαρμοζόμενο εύκολα στις πολλαπλές αλλαγές του περιβάλλοντος και στις ανάγκες των υποκείμενων οργάνων. Κύρια λειτουργία του δέρματος είναι η προστασία των υποκείμενων οργάνων του σώματος από εξωτερικούς παράγοντες όπως : μηχανικές κακώσεις, ηλιακή ακτινοβολία, μεταβολές της θερμοκρασίας, χημικές ουσίες αλλά και από την διείσδυση ξένων μικρο- και μακρο-μορίων. Αποτελείται από τρεις στιβάδες, εξωτερικά την επιδερμίδα, ενδιάμεσα το χόριο ή δερμίδα και τον υποδόριο ιστό ή υποδερμίδα εσωτερικά. Το δέρμα περιέχει τρίχες, νύχια, ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες, αγγεία και νεύρα. Η επιδερμίδα είναι ένα πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο που αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα. Το κερατινοκύτταρο γεννιέται στην κατώτερη στιβάδα της επιδερμίδας και καθώς μετακινείται προς την επιφάνεια διαφοροποιείται σχηματίζοντας 4 στιβάδες οι οποίες από κάτω προς τα πάνω ονομάζονται: βασική, ακανθωτή ή μαλπιγιανή, κοκκώδης και κεράτινη. Η σύνδεση μεταξύ επιδερμίδας και χορίου (χοριοεπιδερμική ένωση ή δερματοεπιδερμικός σύνδεσμος) δεν είναι μια ευθεία γραμμή αλλά κυματοειδής με προσεκβολές του χορίου πρὸς την επιδερμίδα που ονομάζονται θηλές του χορίου και αντίστοιχες καταδύσεις της επιδερμίδας προς το χόριο που ονομάζονται επιθηλιακές καταδύσεις ή δερματοεπιδερμικές καταδύσεις. Το χόριο αποτελείται από συνδετικό ιστό και περιέχει κυρίως ινοβλάστες, ινοκύτταρα, κολλαγόνες, ελάστικές και δικτυωτές ίνες. Παρουσιάζει δύο τμήματα: το επιπολής, λεπτό ή θηλώδες χόριο που βρίσκεται σε επαφή με την επιδερμίδα και το δικτυωτό χόριο που είναι παχύτερο και μεταπίπτει στην υποδερμίδα. Τέλος η

υποδερμίδα αποτελείται από λιπώδη ιστό που διασχίζεται από προεκβολές του χορίου, τις ινώδη δεσμίδες και περιέχει το κύριο δίκτυο αρτηριών και φλεβών του δέρματος (Χρυσομάλλης,Φ. et al., 1994).

1.1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες δερματικών καρκίνων:

- Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC)
- Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC)
- Μελάνωμα

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC) είναι η συχνότερη μορφή δερματικού καρκίνου, εμφανίζεται συνήθως σε ηλικία άνω των 40 ετών. Εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε έντριχα μέρη, κυρίως στο πρόσωπο, στα ώτα και στο λαιμό καταδεικνύοντας τη σχέση εμφάνισης του με την δράση της ηλιακής ακτινοβολίας στα εκτεθειμένα μέρη του σώματος και πιο ειδικά σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα (φωτότυποι I,II,III). Το BCC συνιστά όγκο από άωρα μάλλον παρά αναπλαστικά κύτταρα που μοιάζουν με αυτά της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, αλλά στερούνται μεσοκυττάρων γεφυρών και έχουν μεγαλύτερη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Διακρίνονται 5 κλινικές μορφές BCC: οζεοελκωτικό, μελαγχρωματικό, σκληροδερμοειδές ή ινωτικό, επιπολής και ινοεπιθηλίωμα. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC) μπορεί να εντοπισθεί σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος και των βλεννογόνων με πλακώδες επιθήλιο. Στο φαινομενικά υγιές δέρμα εμφανίζεται σπάνια. Συχνότερα εμφανίζεται σε δέρμα αλλοιωμένο από την ηλιακή ακτινοβολία ή ως εξέλιξη των ηλιακών κερατώσεων (συχνότητα μετάστασης 0,5%). Το SCC μεθίσταται στο 80-90% λεμφογενώς και 10-20% αιματογενώς. Τρεις ιδιαίτερες και σπάνιες μορφές του SCC είναι το αδеноειδές ή ακανθολυτικό, το παράγων βλεννίνη SCC και το μυρμηκιδώδες καρκίνωμα (Χρυσομάλλης,Φ. et al., 1994).

1.1.3 ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ (Malignant melanoma)

Το μελάνωμα είναι κακοήθης όγκος που προέρχεται από νεοπλασματικά μελανοκύτταρα (κύτταρα του μελανώματος-melanoma cells). Οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό σε επαναλαμβανόμενα ηλιακά εγκαύματα ατόμων ανοιχτόχρωμου δέρματος, με εσφαλμένη προσαρμογή στην ηλιακή έκθεση που είναι γενετικά καθορισμένη. Επομένως για την ανάπτυξη του μελανώματος απαιτείται αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και φαινοτυπικών παραγόντων. Το μελάνωμα παρουσιάζεται σπάνια κατά την εφηβεία επάνω σε γιγάντιους συγγενείς μελανοκυτταρικούς σπίλους. Η μέση ηλικία εμφάνισης του μελανώματος είναι στα 60 έτη.

Οι φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου της εμφάνισης του μελανώματος είναι:

1. Ο μεγάλος αριθμός μελανοκυττάρων, κυανών ή δυσπλαστικών σπίλων
2. Τα ξανθά ή κόκκινα μαλλιά
3. Το ανοιχτόχρωμο δέρμα
4. Η ευαισθησία στον ήλιο
5. Οι εφηλίδες
6. Το οικογενειακό ιστορικό μελανώματος

Το μελάνωμα μπορεί να είναι ενδοεπιδερμικό - in situ ή διηθητικό - invasive. Το διηθητικό μελάνωμα μπορεί να είναι ογκογόνο - tumorigenic (φάση κάθετης ανάπτυξης - vertical growth phase) ή μη ογκογόνο - non tumorigenic (φάση οριζόντιας ανάπτυξης - radial growth phase). Οι δυο αυτές φάσεις ανάπτυξης συνιστούν διαδοχικά στάδια, από το ένα στο άλλο, βαθμιαίας εξέλιξης του όγκου.

Στο ενδοεπιδερμικό μελάνωμα και στο μη ογκογόνο διηθητικό περιλαμβάνονται:

1. Το επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα
2. Το φακοειδές μελάνωμα των άκρων

3. Το φακοειδές μελάνωμα των βλεννογόνων
4. Η κακοήθης εφηλίδα

Το ογκογόνο μελάνωμα μπορεί να αποτελεί εξέλιξη των προηγούμενων μη ογκογόνων μορφών ή να αναπτυχθεί σε υγιές δέρμα (de novo) οπότε ονομάζεται οζώδες μελάνωμα (nodular). Παρά το ότι περισσότερα του 50% των μελανωμάτων αναπτύσσονται σε υγιές δέρμα, συχνά βλάβες μελανώματος εμφανίζονται σε προϋπάρχον μελανοκυτταρικό σπίλο.

Το σημαντικότερο ιστολογικό γνώρισμα που χαρακτηρίζει ένα ογκογόνο μελάνωμα είναι η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μελανώματος στο μεσέγχυμα του χορίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός όγκου. Αντίθετα, τα κύτταρα του μη ογκογόνου μελανώματος μπορούν να πολλαπλασιαστούν έντονα στο επιδερμικό τμήμα και μπορούν να διηθήσουν το χόριο αλλά δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν περαιτέρω μέσα σε αυτό.

Ο ιστολογικός καθορισμός του μελανώματος είναι σημαντικός για την χειρουργική θεραπεία που θα ακολουθήσει. Τα βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά του μελανώματος είναι:

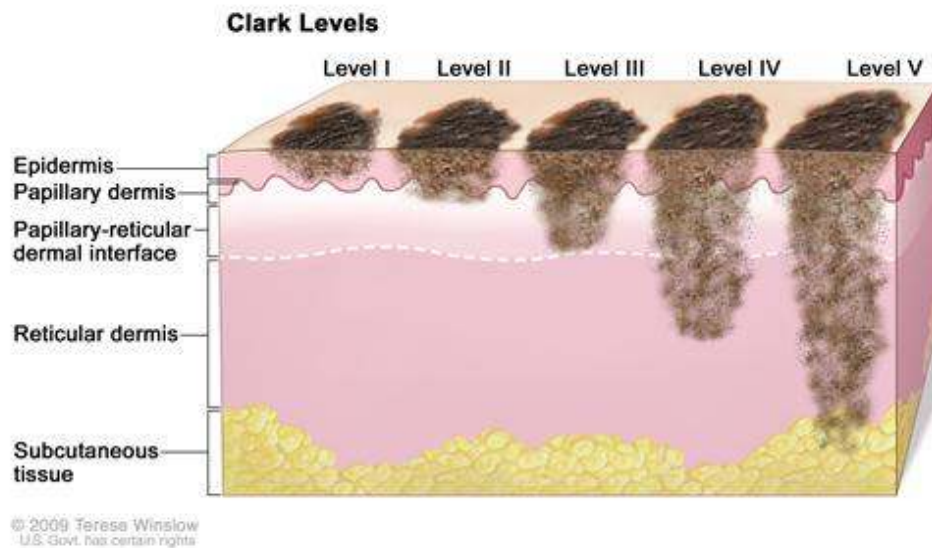
1. Παρουσία κακοήθων μελανοκυττάρων στην επιδερμίδα, όχι μόνο σε αυτήν που καλύπτει τη βλάβη αλλά και σε αυτήν που βρίσκεται στα πλάγια όρια της βλάβης.
2. Άτυπα και άωρα μελανοκύτταρα στο χόριο με απουσία τάσης ωρίμανσης.
3. Άτυπες μιτώσεις των μελανοκυττάρων.
4. Παρουσία λεμφοκυτταρικής διήθησης στη βάση της βλάβης.
5. Εμφανής παρουσία νεόπλαστων αγγείων.

Τα στάδια του μελανώματος διακρίνονται 1) κατά Clark ανάλογα με την θέση των κυττάρων του μελανώματος και 2) κατά Breslow ανάλογα με το πάχος της βλάβης. Το πάχος του μελανώματος μετριέται από την υπερκείμενη κοκκώδη στιβάδα μέχρι τα κύτταρα που βρίσκονται βαθύτερα. Η μέτρηση γίνεται σε mm με προσοφθάλμιο

μικρόμετρο στο μικροσκόπιο, σε τομή από το φαινομενικά παχύτερο σημείο της βλάβης. Το πάχος σε mm πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε ιστολογική έκθεση πρωτογενούς μελανώματος.

Το βάθος της διήθησης του πρωτογενούς μελανώματος στους ιστούς (5 επίπεδα κατά Clark) εκτιμά το συσχετισμό του επιπέδου με την πρόγνωση. Τα ποσοστά της πενταετούς επιβίωσης μειώνονται με την αύξηση του βάθους του επιπέδου (I έως V). Στο επίπεδο I (100% δεκαετής επιβίωση ελεύθερη νόσου) τα κύτταρα του μελανώματος περιορίζονται στην επιδερμίδα και στα εξαρτήματα της (*in situ*). Στο επίπεδο II (96% επιβίωση) τα κύτταρα του μελανώματος εκτείνονται στη θηλώδη μοίρα του χορίου(μικροδιηθητικό-microinvasive μελάνωμα). Στο επίπεδο III (86% επιβίωση) τα κύτταρα του μελανώματος καταλαμβάνουν ολόκληρη τη θηλώδη μοίρα του χορίου φθάνοντας στο δικτυωτό χόριο χωρίς όμως να το διηθούν. Στο επίπεδο IV (66% επιβίωση) τα κύτταρα του μελανώματος διηθούν και καταλαμβάνουν και το δικτυωτό χόριο. Στο επίπεδο V (53% επιβίωση) τα κύτταρα του μελανώματος διηθούν το υποδόριο λίπος ή και τους υποκείμενους ιστούς (ΕΙΚΟΝΑ 1.1).

Άλλα προγνωστικά ιστολογικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην φτωχότερη πρόγνωση είναι η ελίκωση, η διήθηση των αγγείων, ο μικρότερος βαθμός της λεμφοκυτταρικής διήθησης και ο υψηλός αριθμός μιτώσεων (μεγαλύτερος των 6 μιτώσεων ανά τετραγωνικό χιλιοστό).



ΕΙΚΟΝΑ 1.1 Στάδια του μελανώματος κατά Clark
(<http://www.qualityoflife.org/cancer/patientinfo/list/summary/?id=CDR62713>).

1.1.4 Αίτια εμφάνισης του μελανώματος

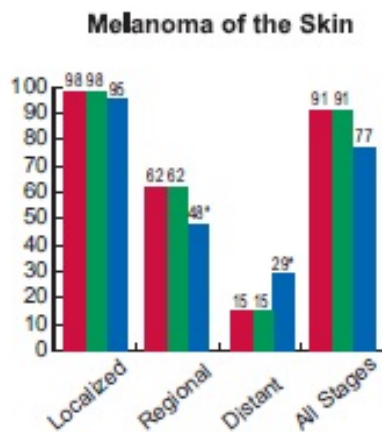
Περίπου το 65% των μελανωμάτων εξαρτώνται από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Beral et al., 1983; Katsambas and Nicolaidou, 1996; Whiteman and Green, 1999). Η χρήση σολαρίου, η χημική έκθεση ή η υπερβολική έκθεση στον ήλιο που προκαλούν εγκαύματα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει ο φωτότυπος του ατόμου, όπως ειπώθηκε προηγουμένως. Το ανοιχτό χρώμα του δέρματος και το ανοιχτό χρώμα μαλλιών ή ματιών, αυξάνουν το ποσοστό εμφάνισης του μελανώματος, σε σχέση με τα σκουρόχρωμα άτομα στα οποία εμφανίζεται πιο σπάνια. Επίσης ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος είναι μεγαλύτερος σε ανθρώπους που παρουσιάζουν περισσότερους από 5 δυσπλαστικούς σπίλους ή σπίλους μεγαλύτερους από 5mm (Naldi et al., 2000; Newton et al., 1993; Schneider et al., 1994). Τέλος μελέτες έδειξαν ότι σημαντικός παράγοντας εμφάνισης του μελανώματος είναι η κληρονομικότητα. Οι μεταλλάξεις στο CDKN2A γονίδιο για παράδειγμα αποτελούν το 8-12% των μελανωμάτων που εμφανίζουν οικογενειακό ιστορικό (Grange et al., 1995; Greene et al., 1983).

1.1.5 Επιδημιολογία του μελανώματος

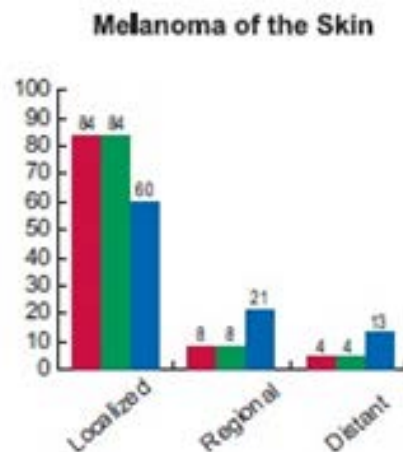
Το κακόηθες μελάνωμα εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 5% σε σχέση με τους υπόλοιπους καρκίνους του δέρματος, ωστόσο το 60% των νεοπλασιών είναι θανατηφόροι (Radovic-Kovacevic et al., 1997). Στις ΗΠΑ μέχρι το 2008 διαγνώστηκαν περίπου 62.000 ασθενείς με κακόηθες μελάνωμα (Tawbi and Nimmagadda, 2009). Η συχνότητα εμφάνισης του είναι μεγαλύτερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες και παρουσιάζεται κυρίως σε μεγάλες ηλικίες άνω των 40 ετών τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνιο στα παιδιά. Συχνά σημεία εμφάνισης του είναι ο θώρακας, τα άκρα και το κεφάλι / λαιμός, με ποσοστό που κυμαίνεται στα 43%, 34% και 11% αντίστοιχα (Radovic-Kovacevic et al., 1997). Στην Ελλάδα δεν έχει μελετηθεί αρκετά η επίπτωση του μελανώματος. Ωστόσο, κατά την περίοδο 1999-2002 διαγνώστηκαν 102 ασθενείς με πρωτοπαθές μελάνωμα στο νησί της Κρήτης, αριθμός μεγαλύτερος από αυτόν που εμφανίστηκε στην υπόλοιπη Ελλάδα και ίδιος με αυτόν που παρατηρείται στις νοτιοευρωπαϊκές χώρες (Lasithiotakis et al., 2006).

Στην ΕΙΚΟΝΑ 1.2 φαίνεται ότι από αυτούς που διαγνώστηκαν με μελάνωμα αρχικού σταδίου το 98% θα επιβιώσει στην 5ετία (1999-2010), ενώ από εκείνους που διαγνώστηκαν με μεταστατικό μελάνωμα θα επιβιώσει το 15 % στην 5ετία. Εάν γίνει διαχωρισμός ανάλογα με τη φυλή, οι Αφρικανοί των Η.Π.Α. πρωτοδιαγιγνώσκονται με μεταστατικό μελάνωμα σε υψηλότερο ποσοστό από τους ασθενείς της λευκής φυλής με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης στην 5ετία.

Στην ΕΙΚΟΝΑ 1.3 φαίνεται ότι στο 84% των ασθενών γίνεται διάγνωση με εντοπισμένη νόσο και μόνο στο 4% με μεταστατικό μελάνωμα. Απ' αυτούς οι ασθενείς της Αφρικανικής φυλής διαγιγνώσκονται με μεταστατικό μελάνωμα σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με αυτούς της λευκής.



ΕΙΚΟΝΑ 1.2 Πενταετής επιβίωση ασθενών ανάλογα με την φυλή και το στάδιο της νόσου, Η.Π.Α., από 1999 έως 2010 (Jemal et al., 2010). Ο κάθετος άξονας δείχνει το ποσοστό εκείνων που επιβίωσαν και ο οριζόντιος το στάδιο του μελανώματος. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς της λευκής φυλής, το μπλέ της Αφρικανικής και το κόκκινο όλους τους ασθενείς ανεξαρτήτου φυλής.



ΕΙΚΟΝΑ 1.3 Κατανομή μελανώματος ανάλογα με τη φυλή και το στάδιο διάγνωσης, Η.Π.Α, από 1999 έως 2010 (Jemal et al., 2010). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς της λευκής φυλής, το μπλέ της Αφρικανικής και το κόκκινο όλους τους ασθενείς ανεξαρτήτου φυλής.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών στην πενταετία (1999-2010) ανεξάρτητα από τη φυλή (Jemal et al., 2010). Φαίνεται ότι η έγκαιρη διάγνωση του μελανώματος αποτελεί σημαντικό ανασταλτικό παράγοντα στην εξέλιξη του μελανώματος.

1.1.6 Θεραπεία μελανώματος

Η θεραπεία του μελανώματος εξαρτάται από τα ιστολογικά ευρήματα της πρωτοπαθούς βλάβης, από την προσβολή ή όχι των επιχώριων λεμφαδένων και από την ύπαρξη μεταστάσεων. Η βιοψία και ο ιστολογικός έλεγχος παραμένουν ως ο χρυσός κανόνας για τη διάγνωση του μελανώματος. Ο ορθότερος τρόπος είναι η αφαίρεση ολόκληρης της ύποπτης βλάβης με όρια φυσιολογικού δέρματος 1-2 mm. Η επιπλέον χειρουργική αφαίρεση, εφόσον η βλάβη διαγνωσθεί ως μελάνωμα, θα εξαρτηθεί από το βάθος της βλάβης και θα πρέπει να γίνει σε διάστημα από 7 -10 ημερών από τη διαγνωστική βιοψία. Σε βλάβες μικρού μεγέθους - λεπτές, με σχεδόν σίγουρη κλινική διάγνωση η βιοψία και η κλινική διάγνωση γίνονται ταυτόχρονα με έπαρμα φυσιολογικού δέρματος 1cm και βάθος 1 cm και με έπαρμα 2-3 cm υγιούς δέρματος για βλάβες παχύτερες του 1 mm. Δεν συνιστάται η μερική αφαίρεση της βλάβης για ιστολογικό έλεγχο, ενώ η βιοψία με punch θα πρέπει να αποφεύγεται λόγω του φόβου πιθανής μετάστασης. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγεται η επιπολής βιοψία (shave ή curetting) επειδή δεν δίνεται επαρκής εικόνα της μορφολογίας και δεν είναι δυνατό να καθορισθεί το βάθος της διήθησης, στοιχείο απαραίτητο για την πρόγνωση και την χειρουργική επέμβαση.

Όπως έχει δειχθεί, η χρήση ιντερφερόνης (interferon alpha 2b-IFNa2b) που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του μελανώματος αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης σε πολλούς ασθενείς. Επίσης πολλές φορές γίνεται χρήση χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων σε συνδυασμό ή όχι (π.χ. Dacarbazin και interleukin 2). Πρόσφατα μελετήθηκε η χρήση νέων φαρμάκων σε ασθενείς με μελάνωμα και όπως φαίνεται στον πίνακα 1.3 επηρέασαν σημαντικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην εξέλιξη του όγκου. Τα περισσότερα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τα ήδη υπάρχοντα και όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα

σε πολλούς ασθενείς σταθεροποιήθηκε η εξέλιξη του όγκου για αρκετούς μήνες (Tawbi and Nimmagadda,2009).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1

Drug	Function	Target(s)	Study phase
BAY 43-9006 (sorafenib)	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Raf kinases	II
CHIR-265	Kinase inhibitor	Raf kinases, VEGFR	I
PD0325901	Kinase inhibitor	MEK	I/II
AZD6244	Kinase inhibitor	MEK	II
Oblimersen	Antisense oligonucleotide	Bcl-2	III (with dacarbazine)
SU11248 (sunitinib)	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Kit, FLT3	III (renal cancer)
SU5416 (semaxanib)	Kinase inhibitor	VEGFR	II
AG013736	Kinase inhibitor	VEGFR, PDGFR, Kit	II (renal cancer)
PD0332991	Kinase inhibitor	Cdk4/6	I (neoplasms, non-Hodgkin's lymphoma)
CCI-779 (temsirolimus)	mTOR inhibitor	mTOR, PTEN/PI(3)K/Akt pathway	II
RAD001 (everolimus)	mTOR inhibitor	mTOR, PTEN/PI(3)K/Akt pathway	I
R115777 (tibifarnib)	Farnesyl transferase inhibitor	Ras	Preclinical
P5-341 (bortezomib, velcade)	Proteasome inhibitor	NF- κ B	II
BMS-345541	Kinase inhibitor	I κ B	Preclinical
Vitaxin	Humanized antibody to $\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_3$ integrin	II
EMD-121974 (cilengitide)	Angiogenesis inhibitor	Integrin	II
17AAG	Hsp90 inhibitor	Hsp90	II
ZSTK474	PI(3)K inhibitor	PI(3)K	Preclinical

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1 .Σκευάσματα που χορηγούνται για την αντιμετώπιση του μελανώματος και σημεία δράσης τους(drug: φάρμακο, function: δράση, target: στόχος, study phase: στάδιο μελέτης) (Tawbi and Nimmagadda, 2009).

1.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΘΕΜΕΛΙΑΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) αποτελεί ένα δίκτυο μακρομορίων, σημαντικό για την αρχιτεκτονική των ιστών. Είναι πλούσια σε δομικές πρωτεΐνες, όπως κολλαγόνο και ελαστίνη, δομικά και λειτουργικά σύμπλοκα μακρομόρια όπως οι πρωτεογλυκάνες (PGs), καθώς και δομικές γλυκοπρωτεΐνες όπως η λαμίνη και η ινονεκτίνη. Τα μακρομόρια αυτά αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα επηρεάζοντας έτσι σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Η ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων εξαρτάται από την έκφραση μορίων

προσκόλλησης στην επιφάνεια τους, όπως οι ιντεγκρίνες. Τα μόρια της ECM μέσω των υποδοχέων τους μεταφέρουν πληροφορίες από το εξωκυττάριο τμήμα στο εσωτερικό του κυττάρου, ρυθμίζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μετανάστευση. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούνται οι κινάσες της τυροσίνης όπως η κινάση εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinase, FAK), κινάσες σερίνης/θρεονίνης όπως η πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC), η λιπιδική κινάση (lipid kinase) όπως PI3-κινάση και τέλος η φωσφατάση (phosphatase) όπως η RPTPα. Η ενεργοποίηση των κινασών έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση μορίων που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, την έκφραση των γονιδίων και τις κυτταρικές λειτουργίες (Hervy et al., 2006). Ο κυτταροσκελετός περιλαμβάνει τρεις ινιδικές δομές, την F-ακτίνη, τα ενδιάμεσα ινίδια και τους μικροσωλινίσκους η οργάνωση των οποίων συμβάλει στη ρύθμιση της μετανάστευσης και τον σχηματισμό των μεμβρανικών προεξοχών (membrane protrusions).

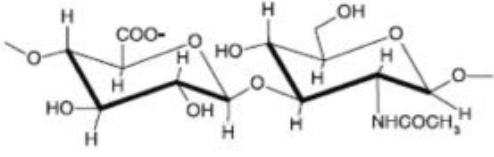
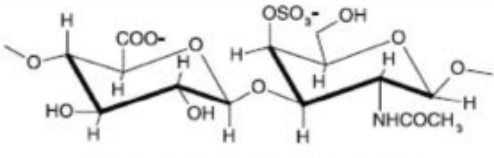
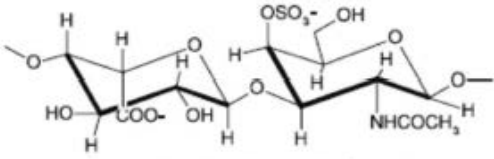
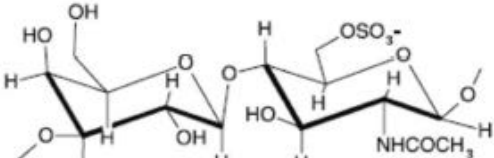
1.3 ΓΛΥΚΟΖΑΜΙΝΟΓΛΥΚΑΝΕΣ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) είναι πολυμερή, τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες (Εικόνα 1.4). Οι μονάδες αυτές περιλαμβάνουν ένα ουρονικό οξύ (D-γλυκουρονικό ή L-ιδουρονικό οξύ ή D-γαλακτόζη) και μια εξοζαμίνη/αμινοσάκχαρο, (D-γαλακτοζαμίνη ή D-γλυκοζαμίνη) ενώ στη δισακχαριτική τους μονάδα εντοπίζονται N-ακέτυλο, O- ή N-θεικές ομάδες (Gandhi and Mancera, 2008; Salmivirta et al., 1996; Turnbull et al., 2001). Σχηματίζεται ένας γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ της εξοζαμίνης και του ουρονικού οξέως. Ο αριθμός των δισακχαριτικών μονάδων που αποτελούν μια γλυκοζαμινική αλυσίδα κυμαίνεται συνήθως στους 50 δισακχαρίτες. Οι GAGs διαφέρουν ως προς τον τύπο της εξοζαμίνης, της εξόζης ή του ουρονικού οξέος καθώς και στη γεωμετρία του γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ των μονάδων αυτών. Είναι θειωμένα και συνεπώς υψηλά αρνητικά φορτισμένα μόρια που εντοπίζονται στη φύση,

έχοντας ανά δισακχαριτική μονάδα ένα αρνητικό φορτίο από το οξικό ανιόν (COO^-) και έως τέσσερα από τηθεική ρίζα (SO_4^-). Βρίσκονται είτε ελεύθερες στην ECM είτε συνδεδεμένες (σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό) στην επιφάνεια των κυττάρων. Συμμετέχουν σε φυσιολογικές και παθολογικές κυτταρικές λειτουργίες-γεγονότα όπως η διαφοροποίηση, η αγγειογένεση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η προσκόλληση, αφού έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με πολλά μόρια. Διακρίνονται σε δύο κύριους τύπους, τις μη θειωμένες όπου κατατάσσεται το υαλουρονικό οξύ (HA) και τις θειωμένες GAGs που περιλαμβάνουν τηνθεική χονδροϊτίνη (CS), τηνθεική δερματάνη (DS), τηνθεική κερατάνη (KS), τηνθεική ηπαράνη (HS) και την ηπαρίνη (Heparin). Στην εικόνα 1.5 φαίνονται οι δομές των GAGs. Οι περισσότερες GAGs συνδέονται ομοιοπολικά με πρωτεϊνικούς κορμούς εκτός από το HA, το οποίο βρίσκεται ελεύθερο στον εξωκυττάριο χώρο όπου και αλληλεπιδρά με τα υπόλοιπα μόρια του ECM. Οι GAGs εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αν και κάθε τύπος εκφράζεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επηρεάζοντας συγκεκριμένες λειτουργίες. Ο αριθμός των δισακχαριτών, ο βαθμός θείωσης και η δομή γενικότερα των GAGs ποικίλουν ανάλογα με τον ιστό προέλευσης, τις συνθήκες και τις λειτουργίες που εκτελούν, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Mankin and Lippiello, 1971; Plaas et al., 1998; Lewis et al., 1999).

EIKONA 1.4

Glycosaminoglycan	Disaccharide units	Features
Hyaluronic acid	 <p>D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)</p>	<p>Molecular weight 4-8000 kDa</p> <p>Non-sulphated non-covalently attached to proteins in the ECM; also found in bacteria</p> <p>Usually found in synovial fluid, vitreous humour, ECM of loose connective tissue</p> <p>Excellent lubricators and shock absorbers</p>
Chondroitin sulphate	 <p>D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<p>Molecular weight 5-50 kDa</p> <p>Most abundant GAG in the body</p> <p>Found in cartilage, tendon, ligament, aorta</p> <p>Bind to proteins (like collagen) to form proteoglycan aggregates</p>
Dermatan sulphate	 <p>L-IdoA-α(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<p>Molecular weight 15-40 kDa</p> <p>Found in skin, blood vessels, heart valves</p>
Keratan sulphates I and II	 <p>D-Gal-β(1→4)-D-GalNAc6S-β(1→3)</p>	<p>Molecular weight 4-19 kDa</p> <p>Most heterogeneous GAG</p> <p>KS I is found in the cornea</p> <p>KS II is found in cartilage aggregated with CS</p>

Εικόνα 1.4. Δομή γλυκοζαμινογλυκανικών αλυσίδων. Οι δισακχαριτικές μονάδες των GAGs περιλαμβάνουν ένα ουρονικό οξύ συνδεδεμένο γλυκοζιτικά με μια εξοζαμίνη (Gandhi et al., 2008).

1.3.1.α ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ (HA)

Το υαλουρονικό οξύ (HA) αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες β-D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (D-GlcA-β1,3-D-GlcNAc-β1,4), οι οποίες συνδέονται αποκλειστικά με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Girish and Kemparaju, 2007; Kogan et al., 2007; Stern et al., 2006; Tammi et al., 2008). Ο αριθμός των δισακχαριτών ποικίλει από 2000 έως 25000 μονάδες και

διαφέρει ανάλογα με τον ιστό προέλευσης (Toole, 2002; Tammi et al., 2008). Το HA δεν φέρει θεικές ομάδες και δεν συνδέεται ομοιοπολικά με τον πρωτεϊνικό κορμό. Εντοπίζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος καθώς και σε άλλα σπονδυλωτά, ενώ είναι πιο άφθονο στην ECM του συνδετικού ιστού των μαλακών μορίων (Girish and Kemparaju, 2007; Kogan et al., 2007). Το HA αλληλεπιδρά με πρωτεογλυκάνες και με άλλες δομικές πρωτεΐνες οργανώνοντας το περικυττάριο και τον εξωκυττάριο χώρο (Laurent and Fraser, 1992; Tammi et al., 2008). Επίσης παρά την απλή του δομή επηρεάζει τη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών και συμμετέχει στην ομοίωση των ιστών (Toole et al., 2002; Kogan et al., 2007). Ρυθμίζει την ενυδάτωση και τις φυσικές ιδιότητες των ιστών χάρις στην ικανότητά του να προσδένει μεγάλα ποσά νερού έως και περίπου 1000 φορές το βάρος του. Το HA ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια και επηρεάζει την κυτταρική συμπεριφορά μέσω της δέσμευσης και της αλληλεπίδρασής του με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, όπως τους CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, LEC και TLR-4 (Girish and Kemparaju, 2007). Μετά από πρόσφατες μελέτες αναγνωρίζεται ο σημαντικός ρόλος του HA στην εμβρυογένεση, στην κυτταρική προσκόλληση, διαφοροποίηση, μετανάστευση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

1.3.1.β ΘΕΙΚΗ ΧΟΝΔΡΟΪΤΙΝΗ (CS)

Η θεική χονδροϊτίνη (CS) αποτελείται από το β-D-γλυκουρονικό οξύ και D- N ακετυλο-γαλακτοζαμίνη (D-GlcA-β1,3-D-GalNAc-β1,4), αλλά μπορεί να τροποποιηθεί από τις θεικές ομάδες, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις θέσεις C-4 και/ή C-6 της γαλακτοζαμίνης και/ή στις θέσεις C-2 ή C-3 του γλυκουρονικού οξέος. Η CS προσδένεται στις υπομονάδες της σερίνης των πρωτεϊνικών κορμών μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού τεσσάρων σακχάρων που αποτελείται από ξυλόζη, δύο μόρια γαλακτόζης και γλυκουρονικό οξύ (Asimakopoulou et al., 2008; Lamari and Karamanos, 2006; Lauder, 2009). Οι αλυσίδες CS εντοπίζονται στον άνθρωπο, αλλά και σε πολλά άλλα θηλαστικά ασπόνδυλα. Αποτελεί κύριο δομικό στοιχείο του αρθρικού χόνδρου παρέχοντάς του ελαστικότητα. (Lauder, 2009). Δομικές αλλαγές

των CS αλυσίδων επηρεάζουν τις βιολογικές ιδιότητες των CSPGs. Μελέτες δείχνουν ότι οι CS επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών αλλά και των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης την κινητικότητα, την προσκόλληση και την μεταναστευτική τους ικανότητα (Aguilar et al., 2005; Fthenou et al., 2007; Nikitovic et al., 2007; Sirko et al., 2007; Zou et al., 2004).

1.3.1.γ ΘΕΙΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΑΝΗ (DS)

Η DS είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης του οποίου οι δισακχαριτικές ομάδες αποτελούνται από μια N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη και ένα ουρονικό οξύ, και μπορεί να βρίσκεται είτε με τη μορφή γλυκουρονικού οξέος, είτε ιδουρονικού οξέος (L-IdoU- α 1,3-D-GalNAc- β 1,4) (Rosenberg et al., 1985; Choi et al., 1989). Η DS εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος αλλά κυρίως στο δέρμα. Απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες κατά την επούλωση των πληγών, ενώ συμμετέχει τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές λειτουργίες όπως στην πήξη του αίματος, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στις μολύνσεις και στην καρκινογένεση (Trowbridge and Gallo, 2002; Denholm et al., 2000; Westergren-Thorsson et al., 1993; Daidouji et al., 2002). Μελέτες αναφέρουν ότι αλλαγές στις DS αλυσίδες που αφορούν το μέγεθος, τη σύνθεση των δισακχαριτών και τη θείωση, καθορίζουν την ικανότητα πρόσδεσής της και ελέγχουν λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με πιθανά πρωτεϊνικά μόρια- προσδέτες.

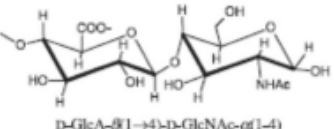
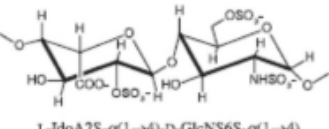
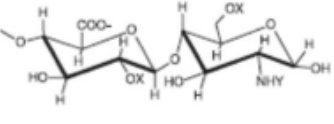
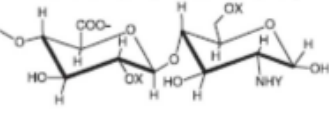
1.3.1.δ ΘΕΙΙΚΗ ΚΕΡΑΤΑΝΗ (KS)

Η θειική κερατάνη (KS) αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες γαλακτόζης και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης ενωμένες με β 1 \rightarrow 4 γλυκοζιτικό δεσμό (D-Gal- β 1,4-D-GlcNAc- β 1,3). Υπάρχουν εστεροποιημένες θειικές ομάδες στη θέση C-6 της γαλακτόζης και/ή της γλυκοζαμίνης. Το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας της KS, καθώς επίσης και ο βαθμός θείωσής της ποικίλουν με αποτέλεσμα το μοριακό της βάρος να κυμαίνεται από 4-20 kDa (Hascall and Riolo,

1972; Murata and Yokoyama, 1987). Η KS εντοπίζεται κυρίως στον κερατοειδή χιτώνα του ματιού, στο χόνδρο και στον εγκέφαλο. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας KS στον κερατοειδή χιτώνα σχετίζεται με τη διατήρηση της ενυδάτωσης του ιστού, που είναι κρίσιμη για τη διαφάνεια του κερατοειδούς. Στους άλλους ιστούς οι KS αλυσίδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αναγνώριση των πρωτεϊνών που λειτουργούν ως προσδέτες καθώς και στην κινητικότητα των κυττάρων (Funderburgh, 2000).

1.3.1.ε ΘΕΙΚΗ ΗΠΑΡΑΝΗ (HS) ΚΑΙ ΗΠΑΡΙΝΗ (heparin)

Η ηπαρίνη και η θεική ηπαράνη (HS) είναι γραμμικοί και αρνητικά φορτισμένοι πολυσακχαρίτες. Η επαναλαμβανόμενη δισακχαριτική μονάδα αποτελείται από N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και ουρονικό οξύ, είτε με τη μορφή γλυκουρονικού οξέος ή του επιμερούς του (στη θέση C-5) ιδουρονικού οξέος (DGlcA-β1,4-D-GlcNAc-α1,4 ή L-IdoA-α1,4-D-GlcN-α1,4). Εστεροποιημένες O-θεικές ομάδες μπορούν να υπάρξουν στη θέση C-6 της γλυκοζαμίνης και στη θέση C-2 του ουρονικού οξέος. Επίσης, δεν είναι τόσο σπάνια η O-θειώση στον C-2 του ουρονικού οξέος και του C-3 της N-θειωμένης γλυκοζαμίνης. Η γλυκοζαμίνη μπορεί να είναι N-ακετυλιωμένη ή N-θειωμένη, γεγονός που δημιουργεί περιοχές υποψήφιες για περαιτέρω δομικές τροποποιήσεις στην αλυσίδα (Skidmore et al., 2008). Στον πίνακα 1.2 φαίνονται οι διαφορές μεταξύ της ηπαρίνης και της θεικής ηπαράνης. Στα M5 κύτταρα του μελανώματος μετά από HPLC ανάλυση και μετά τη χορήγηση ηπαριτινάσης μελετήθηκε υψηλή, ολική περιεκτικότητα N-θειωμένων 2S ολιγοσακχαριτών, ενώ το ποσοστό των HS που εκκρίνεται από το κύτταρο δεν διαφέρει από εκείνο που εντοπίζεται μέσα στο κύτταρο ή επάνω στην επιφάνεια του κυττάρου (Nikitovic et al., 2007).

Property	HS	Heparin
Sulphate versus hexosamine content	0.8-1.8	1.8-2.4
2-deoxy-2-sulphamido-a-D-glucopyranosyl content	40-60%	>85%
a-L-iduronic acid content	30-50%	>70%
Mass	10-70kDa	10-12kDa
Major disaccharide repeating units	 $\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow3)\text{-D-GlcNAc-}\alpha(1\rightarrow4)$	 $1\text{-IdoA}2\text{S-}\alpha(1\rightarrow3)\text{-D-GlcNS6S-}\alpha(1\rightarrow4)$
Minor (variable) disaccharide repeating units(X = H or SO ₃), Y = Ac, SO ₃ or H)	 $\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow3)\text{-D-GlcNAc-}\alpha(1\rightarrow4)$	 $1\text{-IdoA}2\text{S-}\alpha(1\rightarrow3)\text{-D-GlcNS6S-}\alpha(1\rightarrow4)$

Πίνακας 1.2 Διαφορές μεταξύ ηπαρίνης και θεικής ηπαράνης (Gandhi and Mancera, 2008)

Οι αλυσίδες HS περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό ακετυλιωμένης γλυκοζαμίνης, είναι λιγότερο θειωμένες και παρουσιάζουν μεγαλύτερη δομική ποικιλία σε σχέση με την ηπαρίνη. Το ιδουρονικό οξύ εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στην ηπαρίνη, γεγονός που την καθιστά έντονα θειωμένη και περισσότερο αρνητικά φορτισμένη (Turnbull and Gallagher, 1991; Mulloy and Forster, 2000; Salmivirta et al., 1996; Skidmore et al., 2008; Gandhi and Mancera, 2008). Η ηπαρίνη συντίθεται και αποθηκεύεται στα σιτευτικά κύτταρα του συνδετικού ιστού και εντοπίζεται στο ήπαρ, στους μύες, στο δέρμα, στο έντερο, στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες. Οι HS αλυσίδες στις πρωτεογλυκάνες της ECM όλων σχεδόν των κυττάρων των θηλαστικών (Skidmore et al., 2008; Gandhi and Mancera, 2008; Middeldorp, 2008). Για πολλές δεκαετίες η ηπαρίνη χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό για τη θεραπεία και την πρόληψη της θρόμβωσης, λόγω της ικανότητας πρόσδεσης της στην αντιθρομβίνη III. Αρχικά δεσμεύει την αντιθρομβίνη III αλλάζοντας έτσι τη στερεοδιάταξή της και αυτή με τη σειρά της αναστέλλει τη θρομβίνη και άλλες πρωτεάσες που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος (Middeldorp, 2008). Μελέτες

έδειξαν ότι η ηπαρίνη και οι αλυσίδες HS αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τη δράση ενζύμων, κυτοκινών, μορίων της ECM (ινονεκτίνη, λαμινίνη), μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, σελεκτίνες) και μεμβρανικών πρωτεϊνών (Powell et al., 2004; Taylor et al., 2006; Pelosi et al., 2007). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι HS και η ηπαρίνη αλληλεπιδρούν με ποικίλους αυξητικούς παράγοντες (FGF2, HGF, VEGF, PDGF-AA, μέλη της EGF οικογένειας) και/ή με τους υποδοχείς τους συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και κατ'επέκταση σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως η εμβρυογένεση, η απόπτωση, η μετανάστευση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Skidmore et al., 2008; Taylor et al., 2006; Aguiar et al., 2005; Flint et al., 1994; Wu et al., 2006; Sasaki et al., 2000; Forsten et al., 2000). Επίσης πολλές μελέτες επισημαίνουν την ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στον *in vitro* πολλαπλασιασμό ποικίλων κυτταρικών σειρών όπως των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων, των φυσιολογικών ινοβλαστών, των οστεοβλαστών και των κυττάρων ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (Au et al., 1993; Ferrao and Mason, 1993; Westergren-Thorsson and Persson, 1993; Nikitovic et al., 2005; Hausser and Brenner, 2004; Flint et al., 1994). Η ανασταλτική επίδραση της ηπαρίνης στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων των αρουραίων έχει επίσης συσχετιστεί με την αναστολή της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPKs).

1.4 ΗΠΑΡΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι HS αλυσίδες και ηπαρίνη συμμετέχουν στην εξέλιξη του μελανώματος παίζοντας ανασταλτικό ρόλο στην προσκόλληση και στη μετανάστευση των μελανοκυττάρων (Bobek and Kovarik, 2004). Μελέτες δείχνουν, ότι η ηπαρίνη αναστέλλει τις σελεκτίνες στα αρχικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας, γεγονός που αποδεικνύει την αντιμεταστατική δράση της (Varki and Varki, 2001; Engelberg, 1999). Η ηπαρίνη αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες GAGs που προσφέρουν

σημαντικές βιολογικές λειτουργίες κυρίως ως αντιπηκτικοί παράγοντες (Linhardt et al., 2003). Η βιοχημική τροποποίηση της δημιουργεί τα παράγωγα της ηπαρίνης όπως είναι η υψηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (UFH), η ηπαρίνη μικρού μοριακού βάρους (LMWH) και οι ηπαρίνες με διαφορετικές αντιπηκτικές δράσεις (Borsig, 2010; Smorenburg and Cornelis, 2001). Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί στη δράση της ηπαρίνης περιλαμβάνουν την αναστολή της πρόσδεσης στην P- και στην L-σελεκτίνη, τη ρύθμιση της δράσης των αυξητικών παραγόντων, της αγγειογένεσης καθώς και την μεταβολή της σύνθεσης της ECM (Smorenburg 2001; Varki and Varki, 2002; Maraveyas, 2010; Engelberg, 1999; Folkman, 1992). Αν και πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η χρόνια λήψη της UFH εμποδίζει την εξέλιξη του όγκου, εντούτοις οι θεραπευτικές της ιδιότητες είναι περιορισμένες διότι δεν απορροφάται εύκολα από το έντερο και αποδομείται γρήγορα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για το καθαρισμό της ηπαρίνης. Επίσης συνδέεται με παρενέργειες όπως δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων, διαφορές στα λιπίδια και θρομβοκυτταροπενία (Salzman et al., 1980; Saltissi et al., 1999; Teraoka et al., 1982; Kelton, 1986). Αυτές οι παρενέργειες μειώνονται όταν χρησιμοποιείται η LMWH η οποία προσδένεται λιγότερο στο ενδοθήλιο και δεν προκαλεί διέγερση της λιπάσης του πλάσματος (plasma lipase) (Street and McPherson, 1996). Για αυτό το λόγο προτιμάται η χρήση της LMWH λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής της αλλά και λόγω των παρόμοιων δράσεων της με την UFH (Young et al., 1999). Μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση της LMWH αυξάνει σημαντικά την επιβίωση των καρκινοπαθών, κυρίως μέσω της ικανότητας της να αναστέλλει την αγγειογένεση (Borsig 2010; Klas Norrby, 2006).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η προτεινόμενη αντικαρκινική δράση της LMWH καθιστά σημαντική την μελέτη του ρόλου της στη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών που συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δράση της LMWH στην προσκόλληση των κυττάρων του μελανώματος. Επίσης μελετήθηκαν πιθανά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια που εμπλέκονται στην ρύθμιση της προσκολλητικής ικανότητας των κυττάρων του μελανώματος σε υπόστρωμα ινονεκτίνης. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης C άλφα (PKCa) μετά από την προσθήκη LMWH. Τέλος διερευνήθηκαν οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό των κυττάρων μετά την προσθήκη LMWH, παρατηρώντας την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης. Η κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης της προσκολλητικής ικανότητας των κυττάρων θα μπορούσε πιθανόν να αποτελέσει μέρος μιας στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης στην αντιμετώπιση του μελανώματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Στη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μελανώματος M5 (Liao et al., 1975), οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας ή πιάτα καλλιέργειας στους 37°C και σε CO₂ 5% (v/v). Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το RPMI-1640 (GIBCO, UK) παρουσία 10% (v/v) ορού fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, UK) και αντιβιοτικού 0,5% ζενταμυκίνη (GIBCO, UK). Δύο φορές την εβδομάδα γινόταν αλλαγή της φλάσκας μετά από αποκόλληση των κυττάρων. Τα κύτταρα ξεκολλήθηκαν είτε μετά από την ενζυμική κατεργασία με 0.25% τρυψίνη (για να σπάσουν οι δεσμοί των κυττάρων με το υπόστρωμα τους) σε PBS 0.1% (w/v) Na₂EDTA (GIBCO, UK) ή μετά από PBS/EDTA pH7,7 για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθούσε απενεργοποίηση της τρυψίνης με 5 ml θρεπτικού 10% FBS, φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στα 1500 rpm και επαναδιάλυσή τους σε 2-5 ml θρεπτικού. Συνήθως, 1/6 αραιώση των κυττάρων ήταν αρκετή για 48h καλλιέργειας σε 10% FBS θρεπτικό καλλιέργειας ή 1/10 RPMI για πάνω από 72h καλλιέργειας σε 10%. Για τη μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε Neubauer hemocytometer αφού προηγουμένως αραιώθηκαν τα κύτταρα σε χρωστική (1:10 και 1:2), (0,25% trypan blue). Μετά τη μέτρηση των κυττάρων γινόταν η κατάλληλη αραιώση στις νέες φλάσκες ή πιάτα καλλιέργειας.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ

Σε πιάτο 24 οπών καλλιεργήθηκαν 10⁵ κύτταρα παρουσία ορού για 24 h και έπειτα σε συνθήκες έλλειψης FBS για άλλες 24 ώρες. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε φλάσκα στα κύτταρα έγινε αραιώση 1/10. Στη συνέχεια, τα

κύτταρα επώαστηκαν με τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή, για ακόμα 48 h. Μετά από 48h, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με το PBS/EDTA pH 7,7 και 10^4 κύτταρα στρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 96 οπών για 30min. Μετά από 30min αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε μια πλύση με RPMI 0% FBS. Ο αριθμός των κυττάρων που έμεινε στο πιάτο μετρήθηκε με το CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε όλα τα πειράματα προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκε πιάτο που είχε επωαστεί προηγουμένως με (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ινονεκτίνη (FN, μη κολλαγενική γλυκοπρωτεΐνη) σε 100 μl PBS για 1h στους 37°C . Μετά την επώαση με την FN, οι ελεύθερες περιοχές του πιάτου δεσμεύτηκαν με 1% BSA σε 200 μl PBS (blocking) για 30min σε RT(Room Temperature), το οποίο είχε φιλτραριστεί και βραστεί στους 100°C για 3min.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα κύτταρα απομονώθηκαν με τη χρήση ενός διαλύματος RIPA (Πίνακας 2.1). Πριν τη χορήγηση RIPA τα νεκρά κύτταρα απομακρύνθηκαν με μια πλύση PBS και έπειτα προστέθηκε το RIPA μαζί με αναστολείς πρωτεασών (1/200) για 5 min περίπου. Τα κύτταρα μαζεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Σε αυτήν την περίπτωση, τα κύτταρα στο τέλος της επώασης με τους παράγοντες αποκολλήθηκαν με PBS/EDTA, και μετά απο φυγοκέντρηση, το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο διάλυμα A (100 μl για 10^6 κύτταρα) όπου έμεινε στον αναδευτήρα για 15 min στους 4°C . Μετά από φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που απομονώθηκε αντιστοιχούσε στο κυτταρόπλασμα ενώ το ίζημα στους πυρήνες. Στους πυρήνες προστέθηκαν 20 μl από το διάλυμα C και έμεινε για 30min στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και διαχωρισμός του ιζήματος από το υπερκείμενο. Το ίζημα αντιστοιχεί στις μεμβράνες, ενώ το υπερκείμενο αντιστοιχεί στους πυρήνες. Στους πυρήνες προστέθηκαν 10 μl από το διάλυμα D και όλο μαζί αποθηκεύτηκε στους -80°C (Parakonstanti et al., 2007). Το ποσοστό πρωτεϊνών που περιείχαν τα δείγματα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford στα 620nm.

2.3.1. ΗΛΕΚΤΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (SDS PAGE) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Στην τεχνική αυτή, σε μια πρωτεΐνη ή μείγμα πρωτεϊνών προστίθεται ρυθμιστικό που περιέχει SDS, το οποίο είναι ένα απορρυπαντικό με αρνητικό φορτίο. Το SDS συνδέεται ισχυρά με τις πρωτεΐνες και έτσι προσδίδει αρνητικό φορτίο σε κάθε πρωτεΐνη του δείγματος. Επιπλέον, στο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει SDS προστίθεται συνήθως ένας παράγοντας αναγωγής δισουλφιδικών δεσμών όπως η μερκαπτοαιθανόλη. Η μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών, επιτρέποντας το διαχωρισμό των πολυμερών πρωτεϊνών στις επιμέρους πολυπεπτιδικές υπομονάδες τους. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι προέκταση της SDS-PAGE και πρόκειται για μια σημαντική μέθοδο που χρησιμοποιείται πολύ συχνά για ανοσολογικές μελέτες (Goodman, 1994). Πιο συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου 8%, το οποίο περιλαμβάνει το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το stacking gel εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή των δειγμάτων στο separating gel. 25 μg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα αναμείχθηκε με ειδικό διάλυμα αποδιάταξης και μετά από 10 λεπτά βρασμού το μείγμα φορτώθηκε στο πήκτωμα ακρυλαμίδιου και ηλεκτροφορήθηκε στα 200 V για 1-2 ώρες (ανάλογα το μοριακό μέγεθος της υπό μελέτη πρωτεΐνης). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (CAPs 1x, pH 11). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε για 2-3 ώρες (ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης) στα 15 V. Στη συνέχεια, οι ελεύθερες πρωτεϊνικές περιοχές της μεμβράνης δεσμεύτηκαν (blocking) μέσω επώασης της μεμβράνης με 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλακτος σε PBS/Tween για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C για 16-20 ώρες. Έπειτα, ακλούθησαν πλύσεις της μεμβράνης για μισή ώρα με PBS/Tween (10 λεπτά η καθεμιά). Κατόπιν, προστέθηκε διάλυμα ειδικής αραίωσης του πρώτου αντισώματος σε διάλυμα PBS/Tween που περιείχε 1%γάλα και επώαση της

μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με PBS/Tween και στη συνέχεια η προσθήκη του αντίστοιχου δεύτερου αντισώματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια πλύθηκε χρησιμοποιώντας PBS/Tween όπως και προηγουμένως. Τέλος, η μεμβράνη μετά την επώασή της για 5 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL (buffer που δημιουργεί το υπόστρωμα για την πρόσδεση του ενζύμου στο δεύτερο αντίσωμα μέσω αντίδρασης οξειδοαναγωγής), εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώθηκε η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια τα φιλμ εμφανίστηκαν σε ειδικό μηχάνημα της Kodak. Η πυκνότητα των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε αναλύοντας τη ψηφιακή εικόνα με το πρόγραμμα J image. Η ημιποσοτικοποίηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό του λόγου της πυκνότητας της ζώνης της πρωτεΐνης στόχου προς την πυκνότητα της ζώνης της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

2.3.2 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Κύτταρα σε συγκέντρωση 10^5 στρώθηκαν πάνω σε ειδικές γυάλινες καλυπτρίδες μέσα σε πιάτο 24 οπών και στο τέλος της επώασης τους (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2), ξεκίνησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού αφού πρώτα απομακρύνθηκαν τα νεκρά κύτταρα με μια πλύση PBS. Ακολούθησε μονιμοποίηση (πίνακας 2.1) των κυττάρων για 10 min ,πλύση σε PBS και επώαση με triton (πίνακας 2.1) για 10 min. Μετά από μια πλύση σε PBS ακολούθησε η επώαση με τα αντισώματα, που έγινε για μια ώρα σε 1%FBS/PBS. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1/50 για τα πρώτα και 1/200 για τα δεύτερα αντισώματα. Τα ινίδια της ακτίνης βάφτηκαν χρησιμοποιώντας τη Phalloidin/Rhodamine, 1/200 αραιωμένη σε PBS για 40min. Μετά τις πλύσεις με PBS έγινε η χρώση των πυρήνων χρησιμοποιώντας είτε το (1/1000) TO-PRO3 είτε τη Hoechst χρώση για 10 min. Στο τέλος χρησιμοποιήθηκε Glycerol (DACO) προκειμένου να μονιμοποιηθεί η καλυπτρίδα στο slide. Για την ανάλυση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το confocal μικροσκόπιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όνομα Διαλύματος	Συνταγή	Εφαρμογή
Separating gel	1,5M Tris/HCl pH 8,8	WB
Stacking gel	1M Tris/HCl pH 6,8	WB
RIPA	Tris/HCL 50 mM, EDTA 0.5 M, Triton X-100 1%, NaCl 0.1%, and protease/phosphatase inhibitors (PMSF 1 mM, NEM 5 mM, benzamidin 5 mM, sodium cholate 1%, orthovanadate 1 mM)	PE
Running buffer	24.2 gr Tris (MB121.14), 115.3gr glycine, 8gr SDS, 2lt H ₂ O, pH 8.3	WB
CAPs 10x	11.05 gr Caps, 500ml H ₂ O, pH11	WB
Buffer A	0.01M Hepes pH 7.9, 0.01M KCl, 0.002M MgCl ₂ , 0.0001M EDTA, 0.5% NP-40, 1/200 protease inhibitor	NE
Buffer C	0.02M Hepes pH 7.9, 0.0015M MgCl ₂ , NaCl 0.42M, 0.0002M EDTA, 25% glycerol,, 1/200 protease Inhibitor	NE
Buffer D	0.02M Hepes pH7.9, 0.05M KCl, 0.0002M EDTA, 20% glycerol, 1/200 protease inhibitor	NE
Permeabilization	1% Triton in PBS	IF
Fixation	0.4gr sucrose, 5% formaldehyde, in 20ml PBS	IF

WB: western blot, IF:immunofluorescence, NE: nuclear extraction, PE: protein

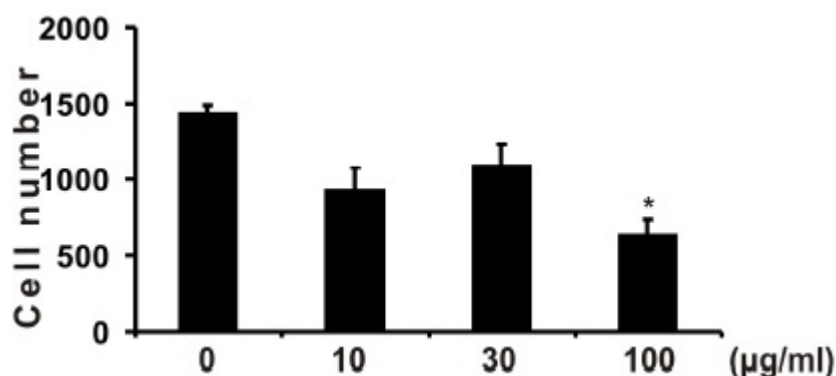
ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2 ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.

ΟΝΟΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΑΡΑΙΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ
pPKCa (Rabbit)	Santa Cruz Biochemicals	1:200	80kDa
Actin (Goat)	Santa Cruz Biochemicals	1:200	43kDa

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ LMWH ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΤΩΝ M5 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έχει αποδειχθεί ότι η ανασταλτική δράση της ηπαρίνης στην εξαρτώμενη από την ινونهκτίνη προσκόλληση και μετανάστευση, εμπλέκει το P53/FAK σηματοδοτικό μονοπάτι (Chalkiadaki et al., 2011). Στη συγκεκριμένη μελέτη ασχοληθήκαμε με τη δράση μιας μικρού μοριακού βάρους ηπαρίνης (LMWH) της ενοξαπαρίνης (enoxaparin). Σε κύτταρα μελανώματος M5 προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 30 και 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) της LMWH και μετρήθηκαν οι διαφορές στην προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων (υλικά και μέθοδοι 2.2). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1 η χορήγηση 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ LMWH προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή στην προσκόλληση των M5 κυττάρων ($p < 0.05$). Επομένως, η LMWH είναι ικανή να ρυθμίσει την προσκολλητική ικανότητα κυττάρων του μελανώματος.

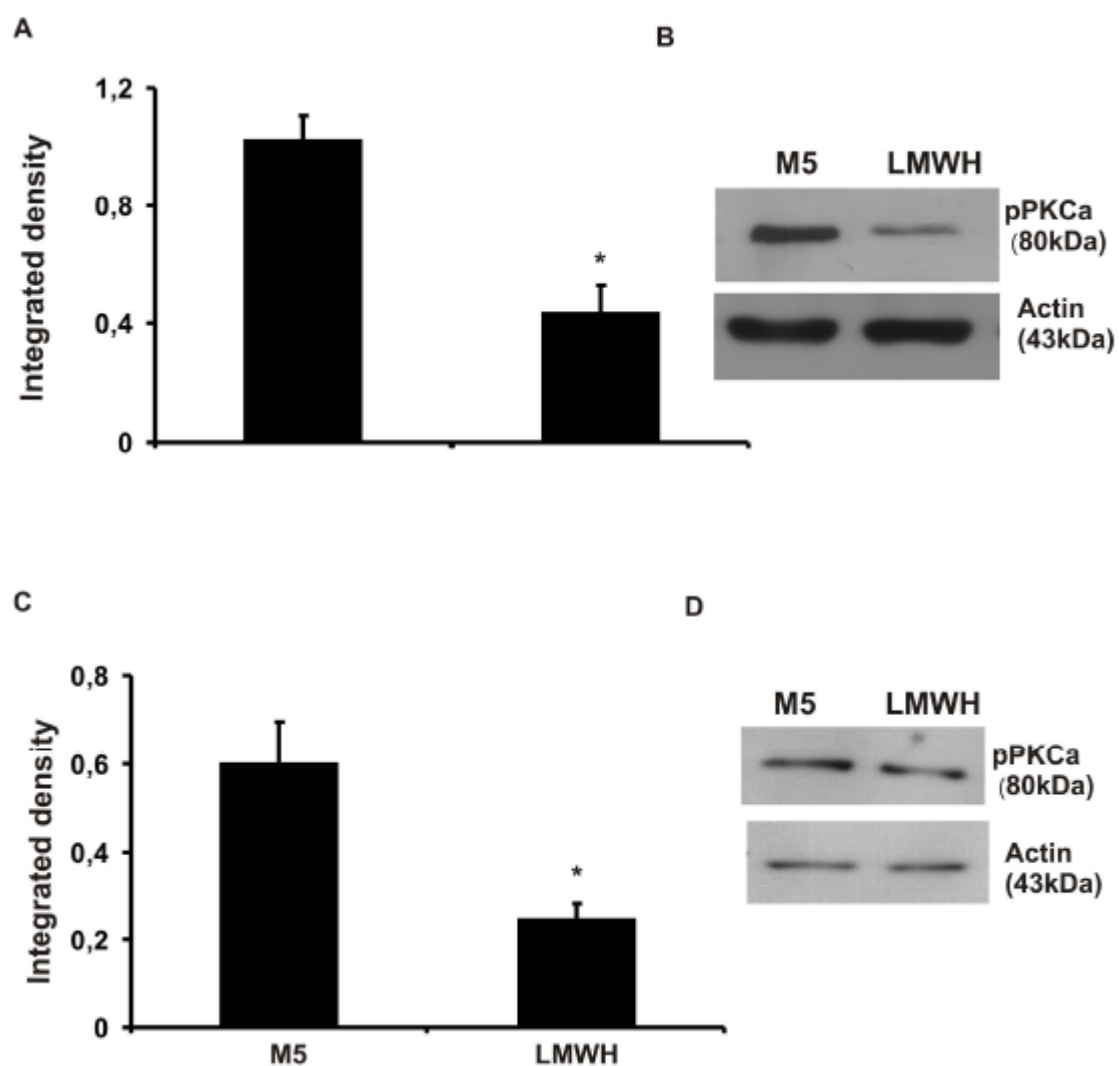


ΕΙΚΟΝΑ 3.1 Δράση της LMWH στην προσκόλληση των M5 κυττάρων μετά από επώαση με LMWH (10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$) για 48h..

3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ PKCa ΑΠΟ ΤΗΝ LMWH

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετήσουμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην δράση της LMWH εξετάσαμε την ενεργοποίηση του

ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μορίου PKCa. Πραγματοποιήθηκε western blot με την χρήση αντισώματος εναντίον της pPKCa στα κύτταρα που επώασθηκαν με τη LMWH είτε πριν την προσκόλληση είτε κατά τη διάρκεια των 30 min της προσκόλλησης στην FN (ινονεκτίνη). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η LMWH μείωσε την ενεργοποίηση της PKCa πριν αλλά και μετά την προσκόλληση ($p \leq 0.05$) (εικόνα 3.2). Συμπερασματικά η LMWH έδειξε να ρυθμίζει την προσκολλητική ικανότητα των κυττάρων του μελανώματος μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μορίου PKCa.

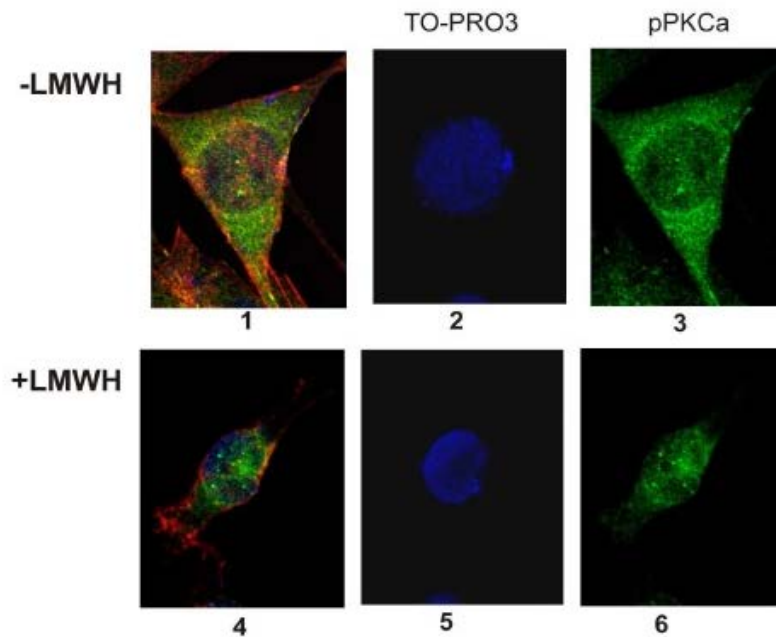


ΕΙΚΟΝΑ 3.2 Δράση της LMWH στην ενεργοποίηση της pPKCa. Η δράση της LMWH τόσο στη βασική A,B) όσο και επαγόμενη από την FN ενεργοποίηση της pPKCa C, D). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 διαφορετικά πειράματα. Στατιστική σημασία: και $p^* < 0,05$ ηπαρίνης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

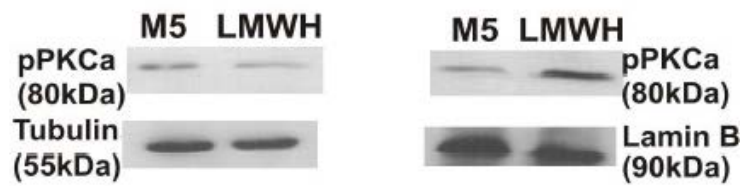
3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΗΣ pPKCa ΑΠΟ ΤΗΝ LMWH ΣΤΑ M5 ΚΥΤΤΑΡΑ

Προηγούμενες μελέτες αποδεικνύουν ότι η ρύθμιση της ενεργοποίησης της PKCa εξαρτάται από την κατανομή της στο κύτταρο. Η φωσφορυλίωση της στην σερίνη και τη θρεονίνη είναι απαραίτητη για την καταλυτική ικανότητα της και την ρύθμιση της θέσης της μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του ενδοκυττάριου χώρου (Woods, 1992). Με την χρήση πειραμάτων ανοσοφθορισμού διαπιστώθηκε η θέση της PKCa μετά τη χορήγηση της LMWH. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3 όταν προστέθηκε το αντίσωμα έναντι της pPKCa στα κύτταρα ελέγχου η χρώση ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένη στο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα όμως που είχαν επωαστεί προηγουμένως με την LMWH είχαν μια χρώση λιγότερο έντονη στην περιφέρεια του κυττάρου και περισσότερο εμφανή στον πυρήνα, σε σχέση με τη χρώση που παρατηρήθηκε στα κύτταρα ελέγχου. Ακολούθησε η απομόνωση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο κυτταροπλάσμα και στον πυρήνα και η εξέταση του western blot επιβεβαίωσε τα παραπάνω που αφορούν την κατανομή της pPKCa στο κύτταρο (εικόνα 3.3 B, C). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η LMWH ρυθμίζει την κατανομή της pPKCa διότι προκαλεί τη μετακίνηση της pPKCa από τη κυτταρική μεμβράνη/κυτταρόπλασμα ($p \leq 0,05$) στον πυρήνα ($p \leq 0,001$).

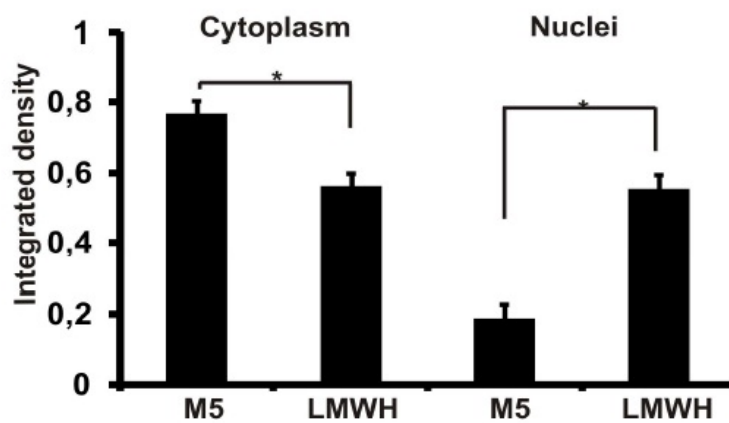
A



B



C

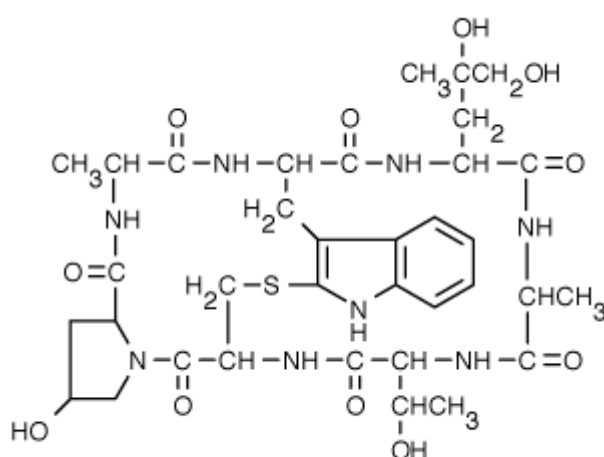


ΕΙΚΟΝΑ 3.3 Επίδραση της LMWH στην κατανομή της pPKCa όπως φαίνεται κατά τον ανοσοφθορισμό. Α) Μετά από 48h επώασης με τη LMWH ακολούθησε χρώση των κυττάρων χρησιμοποιώντας φθορίζον αντίσωμα εναντίον της pPKCa (Alexa 488) (πράσινη χρώση). Για τους πυρήνες χρησιμοποιήθηκε χρώση με το TO-PRO3 (μπλε

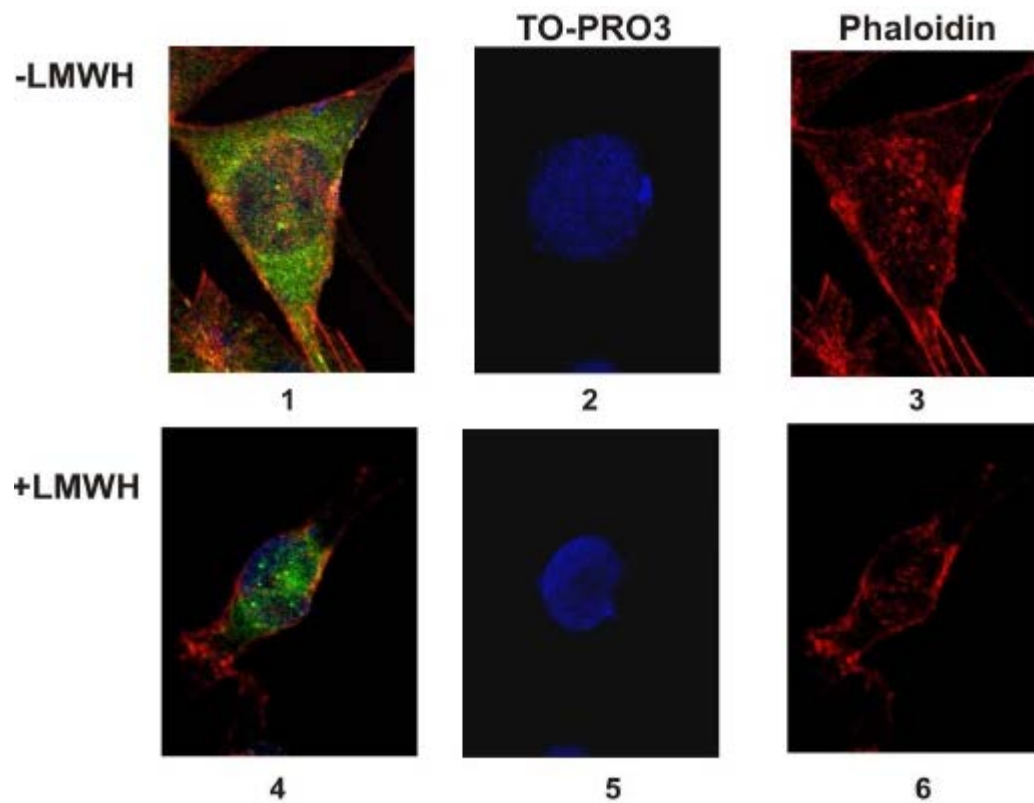
χρώση). B) western blot με πρωτεΐνες απομονωμένες από το κυτταροπλάσμα και τον πυρήνα, των κυττάρων που χορηγήθηκε LMWH και των κυττάρων ελέγχου. C) Ανάλυση της πυκνότητας των ζωνών που αντιστοιχούν στη pPKCa σε σχέση με την tubulin (κυτταρόπλασμα) και την Lamin B (πυρήνας).

3.4 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ LMWH ΣΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ M5 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο η LMWH μεταβάλλει την προσκόλληση των M5 κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ειδική χρώση φαλοϊδίνης (εικόνα 3.4), η οποία ανιχνεύει τα ινίδια της ακτίνης. Η χρώση αυτή έδειξε αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων μετά την προσθήκη LMWH. Τα κύτταρα ελέγχου ήταν περισσότερο τεντωμένα λόγω της παρουσίας των ινιδίων της ακτίνης και με έναν φαινότυπο που χαρακτηρίζει τα κύτταρα προσκόλλησης (εικόνα 3.5). Η LMWH προκαλεί την αποδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης που χαρακτηρίζεται από μια πιο διάχυτη κατανομή μη πολυμερισμένης ακτίνης. Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η LMMW επηρεάζει την ενεργοποίηση και την κατανομή της PKCa στα κύτταρα γεγονός που οδηγεί στην αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της αλλοίωσης της μορφολογίας των κυττάρων του μελανώματος.



ΕΙΚΟΝΑ 3.4 Το μόριο της φαλοϊδίνης (Μαργαρίτης et al., 2003).



ΕΙΚΟΝΑ 3.5 Επίδραση της LMWH στον κυτταροσκελετό της ακτίνης όπως φαίνεται κατά τον ανοσοφθορισμό. Μετά από 48h επώασης με τη LMWH ακολούθησε χρώση των κυττάρων χρησιμοποιώντας τη φαλοϊδίνη για 1h (κόκκινη χρώση). Για τους πυρήνες χρησιμοποιήθηκε χρώση με το TO-PRO3 (μπλε χρώση). (Πράσινη χρώση: αντίσωμα εναντίον της pPKCa).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων και ECM επηρεάζουν την ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται και να μεταναστεύουν, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο το διηθητικό τους φαινότυπο (Cavallaro and Christofori, 2001). Η ενεργοποίηση των μονοπατιών προσκόλλησης επηρεάζεται από ειδικούς υποδοχείς της προσκόλλησης, από την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την συνάθροιση των σηματοδοτικών διαβιβαστών και ενζύμων σε ειδικές δομές (Yamada and Geiger, 1997). Οι αλλαγές στις δομές προσκόλλησης φαίνεται ότι επηρεάζουν την εξέλιξη του πρωτοπαθούς μελανώματος (Satyamoorthy and Herlyn, 2002).

Στη μελέτη αυτή αποδεικνύουμε ότι η χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH) αναστέλλει την κυτταρική προσκόλληση των κυττάρων του μελανώματος σε υπόστρωμα ινονεκτίνης (FN) και ο ρόλος της συσχετίζεται με τις αλλαγές στην ενεργοποίηση /κατανομή της PKCa και στη μορφολογία των κυττάρων. Η ινονεκτίνη, η οποία επιλέχθηκε ως ειδικό υπόστρωμα προσκόλλησης, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους της ECM (Pankov 2002), που περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για τις θειωμένες GAGs και τους επιφανειακούς υποδοχείς των ιντεγκρινών. Η έκφρασή της έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του μελανώματος (Jaeger et al., 2007).

Πολλές μελέτες συσχετίζουν την PKCa με την προσκόλληση που εξαρτάται από την ηπαρίνη και τις HS. Η PKCa ανήκει στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης και αποτελείται από 12 διαφορετικά ισοένζυμα τα οποία μεταφέρουν τις πληροφορίες μέσω της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών G, καθώς και των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης και θρεονίνης (Newton, 2001). Αποδείξαμε ότι η LMWH ρυθμίζει τα βασικά και τα επαγόμενα από τη προσκόλληση στην FN επίπεδα φωσφορυλίωσης της PKCa. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η ηπαρίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση της PKCa μέσω του υποδοχέα inositol 1,4,5 - triphosphate (Murthy,

1992) ή της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} (Tanabe, 1996). Επίσης η δράση της PKCa συσχετίζεται με την κατανομή της στο κύτταρο. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε μια απενεργοποιημένη μορφή και αφού ενεργοποιηθεί μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη ή σε ενδοκυττάρια οργανιδιακές μεμβράνες (Newton, 2001). Επίσης έχειδειχθεί ότι μεταφέρεται πολλές φορές από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες (Martelli et al., 1999). Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι η LMWH εκτός από το ρυθμιστικό ρόλο της στην ενεργοποίηση της PKCa ρυθμίζει και την κατανομή της, κάτι που συμβαίνει και στα φυσιολογικά και φλεγμονώδη ηπατικά κύτταρα (Aoyagi, 2003). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η LMWH επηρεάζει την ενεργοποίηση και την κατανομή της pPKCa δεν είναι εντελώς γνωστός. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η δράση της PKCa ρυθμίζεται από την πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης συνδεκάνη-4 (Kuriyama, 2009). Πιθανόν η LMWH αλληλεπιδρώντας με τις αλυσίδες HS της συνδεκάνης -4 επηρεάζει το σύμπλεγμα και την ενεργοποίηση της PKCa.

Επίσης η LMWH μείωσε τη δημιουργία των ινιδίων ακτίνης και προκάλεσε τη διάχυτη κατανομή μη πολυμερισμένης ακτίνης. Είναι δεδομένο ότι η PKCa διεγείρει την F-ακτίνη (πολυμερισμένη ακτίνη) προκειμένου να δημιουργηθούν οι εστίες προσκόλλησης (Larson, 2005; Berrier and Yamada, 2007). Συνεπώς η ρύθμιση της pPKCa από τη LMWH συσχετίζεται με τη μείωση των ινιδίων ακτίνης, που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας. Η PKCa επίσης εντοπίζεται στα σημεία των ινιδίων έντασης και μετά την ενεργοποίηση της συμμετέχει στη ρύθμιση και οργάνωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (Larsson, 2005).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης εισηγούνται το μηχανισμό δράσης της LMWH μέσω της PKCa στην προσκόλληση των κυττάρων του μελανώματος που επηρεάζει τη μορφολογία τους και πιθανόν να σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου. Το κακοήθες μελάνωμα είναι υψηλής επιθετικότητας κακοήθης νεοπλασία του δέρματος και είναι νόσημα με αυξανόμενη συχνότητα. Η συστηματική μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εξέλιξη του μελανώματος αποσκοπεί στην άντληση βασικών πληροφοριών ικανών να οδηγήσουν σε στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπεία του μελανώματος.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Au, Y.P., R.D. Kenagy, M.M. Clowes, and A.W. Clowes. 1993. Mechanisms of inhibition by heparin of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Haemostasis* 23 Suppl 1:177-182.

Aguiar, C.B., B. Lobao-Soares, M. Alvarez-Silva, and A.G. Trentin. 2005. Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol* 6:31.

Aoyagi, K., Y. Kuzure, S. Shahrzad, A. Hirayama, S. Nagase, and A. Ueda. 2003. Inhibition by heparin of protein kinase C activation and hydroxyl radical generation in puromycin aminonucleoside treated isolated rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 244(1-2):3-9.

Asimakopoulou, A.P., A.D. Theocharis, G.N. Tzanakakis, and N.K. Karamanos. 2008. The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. *In Vivo* 22(3):385-389.

Beral, V., S. Evans, H. Shaw, and G. Milton. 1983. Cutaneous factors related to the risk of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 109(2):165-172.

Berrier, A.L., and K.M. Yamada. 2007. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213(3):565-573.

Bobek, V., and J. Kovarik. 2004. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother* 58(4):213-219.

Borsig, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb Res* 125 Suppl 2:S66-71.

Cavallaro, U., and G. Christofori. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552(1):39-45.

Chalkiadaki, G., D. Nikitovic, A. Berdiaki, P. Katonis, N.K. Karamanos, and G.N. Tzanakakis. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration. *IUBMB Life* 63(2):109-119.

Choi, H.U., T.L. Johnson, S. Pal, L.H. Tang, L. Rosenberg, and P.J. Neame. 1989. Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J Biol Chem* 264(5):2876-2884.

Daidouji, K., K. Takagaki, S. Yoshihara, H. Matsuya, M. Sasaki, and M. Endo. 2002. Neoplastic changes in saccharide sequence of dermatan sulfate chains derived from human colon cancer. *Dig Dis Sci* 47(2):331-337.

Denholm, E.M., E. Cauchon, C. Poulin, and P.J. Silver. 2000. Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur J Pharmacol* 400(2-3):145-153.

Engelberg, H. 1999. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer* 85(2):257-272.

Ferrao, A.V., and R.M. Mason. 1993. The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180(3):225-230.

Fjeldstad, K., and S.O. Kolset. 2005. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets* 6(6):665-682.

Flint, N., F.L. Cove, and G.S. Evans. 1994. Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture. *J Cell Sci* 107 (Pt 2):401-411.

Folkman, J., and Y. Shing. 1992. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* 313:355-364.

Forsten, K.E., M. Fannon, and M.A. Nugent. 2000. Potential mechanisms for the regulation of growth factor binding by heparin. *J Theor Biol* 205(2):215-230.

Fthenou, E., A. Zafiropoulos, P. Katonis, A. Tsatsakis, N.K. Karamanos, and G.N. Tzanakakis. 2008. Chondroitin sulfate prevents platelet derived growth factor-

mediated phosphorylation of PDGF-Rbeta in normal human fibroblasts severely impairing mitogenic responses. J Cell Biochem 103(6):1866-1876.

Funderburgh, J.L. 2000. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. Glycobiology 10(10):951-958.

Gandhi, N.S., and R.L. Mancera. 2008. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Chem Biol Drug Des 72(6):455-482.

Girish, K.S., and K. Kemparaju. 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. Life Sci 80(21):1921-1943.

Goodman,S.R.1994. ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ 'ΓΡ.ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ'.ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1,ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ(ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΒΙΟΛΟΓΟΥ).

Grange, F. 1995. [Multiple primary melanoma and familial melanoma. Risk evaluation and screening tests. How to evaluate the risk of developing a second melanoma? In what family? Should screening methods be implemented? Which ones and why?]. Ann Dermatol Venereol 122(5):365-371.

Greene, M.H., L.R. Goldin, W.H. Clark, Jr., E. Lovrien, K.H. Kraemer, M.A. Tucker, D.E. Elder, M.C. Fraser, and S. Rowe. 1983. Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. Proc Natl Acad Sci U S A 80(19):6071-6075.

Hascall, V.C., and R.L. Riolo. 1972. Characteristics of the protein-keratan sulfate core and of keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan. *J Biol Chem* 247(14):4529-4538.

Hausser, H.J., and R.E. Brenner. 2004. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J Cell Biochem* 91(5):1062-1073.

Hervy, M., L. Hoffman, and M.C. Beckerle. 2006. From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Curr Opin Cell Biol* 18(5):524-532.

Invasive J.,Health Management Publication,2009

Jaeger, J., D. Koczan, H.J. Thiesen, S.M. Ibrahim, G. Gross, R. Spang, and M. Kunz. 2007. Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin Cancer Res* 13(3):806-815.

Jemal Ah.,R.Siegel,J. Xu and E Ward.Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60;277-300; originally published online Jul 7, 2010; DOI: 10.3322/caac.20073

Katsambas, A., andE. Nicolaidou. 1996. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol* 132(4):444-450.

Kelton, J.G. 1986. Heparin-induced thrombocytopenia. *Haemostasis* 16(2):173-186.

Klass, C.M., J.R. Couchman, and A. Woods. 2000. Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):493-506.

Kogan, G., L. Soltes, R. Stern, and P. Gemeiner. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 29(1):17-25.

Kuriyama, S., and R. Mayor. 2009. A role for Syndecan-4 in neural induction involving ERK- and PKC-dependent pathways. *Development* 136(4):575-584.

Lamari, F.N., and N.K. Karamanos. 2006. Structure of chondroitin sulfate. *Adv Pharmacol* 53:33-48.

Larsson, C. 2006. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18(3):276-284.

Lasithiotakis, K., S. Kruger-Krasagakis, A. Manousaki, D. Ioannidou, I. Panagiotides, and A. Tosca. 2006. The incidence of cutaneous melanoma on Crete, Greece. *Int J Dermatol* 45(4):397-401.

Lauder, R.M. 2009. Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complement Ther Med* 17(1):56-62.

Laurent, T.C., and J.R. Fraser. 1992. Hyaluronan. *Faseb J* 6(7):2397-2404.

Lewis, D.E., L. Yang, W. Luo, X. Wang, and J.R. Rodgers. 1999. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte precursors exist in a CD28-CD8⁺ T cell subset and increase with loss of CD4 T cells. *Aids* 13(9):1029-1033.

Liao, S.K., P.B. Dent, and P.B. McCulloch. 1975. Characterization of human malignant melanoma cell lines. I. Morphology and growth characteristics in culture. *J Natl Cancer Inst* 54(5):1037-1044.

Linhardt, R.J. 2003. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J Med Chem* 46(13):2551-2564.

Lippiello, L., and H.J. Mankin. 1971. Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate, and keratan sulfate. *Anal Biochem* 39(1):54-58.

Maraveyas, A., M.J. Johnson, Y.P. Xiao, and S. Noble. Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins. *Cancer Metastasis Rev* 29(4):777-784.

Martelli, A.M., N. Sang, P. Borgatti, S. Capitani, and L.M. Neri. 1999. Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem* 74(4):499-521.

- Middeldorp, S. 2008. Heparin: from animal organ extract to designer drug. *Thromb Res* 122(6):753-762.
- Mulloy, B., E. Gray, and T.W. Barrowcliffe. 2000. Characterization of unfractionated heparin: comparison of materials from the last 50 years. *Thromb Haemost* 84(6):1052-1056.
- Murata, K., and Y. Yokoyama. 1987. Dermatan sulfate isomers in human articular cartilage characterized by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int* 15(1):87-94.
- Murthy, K.S., J.R. Grider, and G.M. Makhlouf. 1992. Receptor-coupled G proteins mediate contraction and Ca^{++} mobilization in isolated intestinal muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 260(1):90-97.
- Naldi, L., A.B. Fortina, S. Lovati, A. Barba, E. Gotti, G. Tessari, D. Schena, A. Diociaiuti, G. Nanni, I.L. La Parola, C. Masini, S. Piaserico, A. Peserico, T. Cainelli, and G. Remuzzi. 2000. Risk of nonmelanoma skin cancer in Italian organ transplant recipients. A registry-based study. *Transplantation* 70(10):1479-1484.
- Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101(8):2353-2364.

Newton, J.A. 1993. Familial melanoma. Clin Exp Dermatol 18(1):5-11.

Nikitovic, D., A. Zafiropoulos, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, and A.M. Tsatsakis. 2005. Effects of glycosaminoglycans on cell proliferation of normal osteoblasts and human osteosarcoma cells depend on their type and fine chemical compositions. Anticancer Res 25(4):2851-2856.

Nikitovic, D., M. Assouti, M. Sifaki, P. Katonis, K. Krasagakis, N.K. Karamanos, and G.N. Tzanakakis. 2008. Chondroitin sulfate and heparan sulfate containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines. Int J Biochem Cell Biol 40(1):72-83.

Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. J Cell Sci 115(Pt 20):3861-3863.

Papakonstanti, E.A., A.J. Ridley, and B. Vanhaesebroeck. 2007. The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. Embo J 26(13):3050-3061.

Powell, A.K., E.A. Yates, D.G. Fernig, and J.E. Turnbull. 2004. Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches. Glycobiology 14(4):17R-30R.

Radovic-Kovacevic, V., T. Pekmezovic, B. Adanja, M. Jarebinski, J. Marinkovic, and R. Tomin. 1997. [Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma]. *Srp Arh Celok Lek* 125(5-6):132-137.

Rosenberg, L.C., H.U. Choi, L.H. Tang, T.L. Johnson, S. Pal, C. Webber, A. Reiner, and A.R. Poole. 1985. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem* 260(10):6304-6313.

Salmivirta, M., K. Lidholt, and U. Lindahl. 1996. Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* 10(11):1270-1279.

Saltissi, D., C. Morgan, J. Westhuyzen, and H. Healy. 1999. Comparison of low-molecular-weight heparin (enoxaparin sodium) and standard unfractionated heparin for haemodialysis anticoagulation. *Nephrol Dial Transplant* 14(11):2698- 2703.

Salzman, E.W., R.D. Rosenberg, M.H. Smith, J.N. Lindon, and L. Favreau. 1980. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest* 65(1):64-73.

Sasaki, M., M. Kashima, T. Ito, A. Watanabe, M. Sano, M. Kagaya, T. Shioya, and M. Miura. 2000. Effect of heparin and related glycosaminoglycan on PDGF-induced lung fibroblast proliferation, chemotactic response and matrix metalloproteinases activity. *Mediators Inflamm* 9(2):85-91.

Satyamoorthy, K., and M. Herlyn. 2002. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 1(1):14-17.

Schneider, J.S., D.H. Moore, 2nd, and R.W. Sagebiel. 1994. Risk factors for melanoma incidence in prospective follow-up. The importance of atypical (dysplastic) nevi. *Arch Dermatol* 130(8):1002-1007.

Sirko, S., A. von Holst, A. Wizenmann, M. Gotz, and A. Faissner. 2007. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Development* 134(15):2727-2738.

Skidmore, M.A., S.E. Guimond, T.R. Rudd, D.G. Fernig, J.E. Turnbull, and E.A. Yates. 2008. The activities of heparan sulfate and its analogue heparin are dictated by biosynthesis, sequence, and conformation. *Connect Tissue Res* 49(3):140-144.

Smorenburg, S.M. 2001. Inhibition of angiogenesis with heparin? *Haemostasis* 31 Suppl 1:25-29.

Smorenburg, S.M., and C.J. Van Noorden. 2001. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev* 53(1):93-105.

Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara. 2006. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85(8):699-715.

Street, A.M. 1996. Hunter's syndrome with an endogenous anticoagulant. *Am J Hematol* 53(4):277.

Tammi, R.H., A. Kultti, V.M. Kosma, R. Pirinen, P. Auvinen, and M.I. Tammi. 2008. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* 18(4):288-295.

Tanabe, T., H. Otani, K. Mishima, R. Ogawa, and C. Inagaki. 1996. Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated rheumatoid synovial cells. *Rheumatol Int* 16(4):159-167.

Tawbi, H., and N. Nimmagadda. 2009. Targeted therapy in melanoma. *Biologics* 3:475-484.

Taylor, K.R., and R.L. Gallo. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J* 20(1):9-22.

Teraoka, J., N. Matsui, S. Nakagawa, and J. Takeuchi. 1982. The role of heparin in the changes of lipid patterns during a single hemodialysis. *Clin Nephrol* 17(2):96-99.

Toole, B.P. 2002. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* 12(3):37R-42R.

Trowbridge, J.M., and R.L. Gallo. 2002. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 12(9):117R-125R.

Turnbull, J.E., and J.T. Gallagher. 1991. Sequence analysis of heparan sulphate indicates defined location of N-sulphated glucosamine and iduronate 2-sulphate residues proximal to the protein-linkage region. *Biochem J* 277 (Pt 2):297-303.

Varki, A., and N.M. Varki. 2001. P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz J Med Biol Res* 34(6):711-717.

Wegrowski, Y., and F.X. Maquart. 2004. Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3):259-268.

Westergren-Thorsson, G., J. Hernnas, B. Sarnstrand, A. Oldberg, D. Heinegard, and A. Malmstrom. 1993. Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Clin Invest* 92(2):632-637.

Westergren-Thorsson, G., S. Persson, A. Isaksson, P.O. Onnervik, A. Malmstrom, and L.A. Fransson. 1993. L-iduronate-rich glycosaminoglycans inhibit growth of normal fibroblasts independently of serum or added growth factors. *Exp Cell Res* 206(1):93-99.

Whiteman, D.C., and A.C. Green. 1999. Melanoma and sun exposure: where are we now? *Int J Dermatol* 38(7):481-489.

Woods, A., and J.R. Couchman. 1992. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci* 101 (Pt 2):277-290.

Wu, R.R., and J.R. Couchman. 1997. cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein, bamacan: a five domain structure including coiled-coil motifs. *J Cell Biol* 136(2):433-444.

Yamada, K.M., and B. Geiger. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9(1):76-85.

Young, E., T. Venner, J. Ribau, S. Shaughnessy, J. Hirsh, and T.J. Podor. 1999. The binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin to thrombin-activated human endothelial cells. *Thromb Res* 96(5):373-381.

Μαργαρίτης,Λ.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη,Ι.Σ., Στραβοπόδης,Δ.Ι., Τρουγκάκος,Ι.Π., 2003. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ. ΤΕΤΑΡΤΗ ΕΚΔΟΣΗ- Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.

Χρυσομάλλης,Φ. και συνεργάτες, 2005. Δερματολογία-Αφροδισιολογία. University studio press, Θεσσαλονίκη.

<http://www.qualityoflife.org/cancer/patientinfo/list/summary/?id=CDR62713>

