

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
&  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΟΝ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟ  
ΦΡΑΓΜΟ ΚΑΙ ΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ  
ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**

**ΘΩΜΑΣ ΒΡΕΚΟΥΣΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ  
ΟΔΥΣΣΕΑΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ ΖΩΡΑΣ  
ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**

## *Αντί προλόγου ...*

Η δημιουργία αυτής της ερευνητικής μελέτης, όπως και κάθε ερευνητική προσπάθεια, δεν είναι αποτέλεσμα ενός και μόνο ανθρώπου. Είναι η μορφοποίηση μιας ευρύτερης, συλλογικής προσπάθειας, στην οποία συνεισέφεραν πολλοί, σε διάφορες χρονικές περιόδους, άλλος περισσότερο και άλλος λιγότερο.

Στα πλαίσια αυτής της διαπίστωσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Αν. Καθηγητή κ. Οδυσσέα-Ιωάννη Ζώρα που με ετίμησε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και με καθοδήγησε με θέρμη κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Η αγάπη του και η επιμονή προς την μοριακή και την κυτταρική λογική στα πλαίσια της χειρουργικής ογκολογίας ήταν στοιχεία που τροφοδότησαν την προσπάθεια μας με τον απαιτούμενο ενθουσιασμό για να τα καταφέρουμε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω επίσης στον Αν. Καθηγητή κ. Δημήτρη Καρδάση, στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος αυτής της μελέτης. Η πάντα ευγενική του στάση και η επιστημονική αρτιότητα που διαθέτει, μου έδειξαν ότι η έρευνα πάντα βρίσκει τη διέξοδο της, ακόμη και όταν τα πειράματα δε δουλεύουν όπως θα θέλαμε. Η επιμονή του στην τελειότητα, θα αποτελεί πάντα για μένα το γνώμονα πλεύσης, στον αβέβαιο ωκεανό της ερευνητικής προσέγγισης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω σε ένα φίλο και πλέον συνεργάτη, τον Αρχιπλοίαρχο ε.α και νυν Αν. Καθηγητή κ. Ευστάθιο Σταθόπουλο, όχι μόνο γιατί με φιλοξένησε και με στήριξε ερευνητικά στο μέρος των ιστολογικών μελετών, αλλά διότι με τις ατελείωτες συζητήσεις μας εντός και εκτός του αντικειμένου της παρούσας μελέτης, κατόρθωσε να μου φωτίσει ένα καταπληκτικό δρόμο που γεφυρώνει το χάσμα ανάμεσα στη μοριακή βιολογία και την κλινική ιατρική.

Στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Ηλιόπουλο οφείλω επίσης πολλά, γιατί πέρα από δάσκαλος μου στην Παθολογία (όπου έπαιξε το σημαντικότερο ρόλο στη δημιουργία «ιατρικής» σκέψης), ως μέλος της τριμελούς επιτροπής μου έκανε καίριες και χρήσιμες παρατηρήσεις.

Στην προσπάθεια αυτή, εξίσου σημαντικό ρόλο έπαιξαν τα ερευνητικά μου «αδέλφια», οι φίλοι που περάσαμε ουκ ολίγες ώρες – πολλές φορές συνεχόμενες- στο εργαστήριο. Ο Γιώργος Κουτσοδόντης, η Βίκυ Πρόκοβα και η Βέτα Παπακώστα δεν

ήταν απλά οι συνοδοιπόροι στην προσπάθεια μου. Ήταν οι φίλοι που ζήσαμε πολλά μαζί -εντός και εκτός εργαστηρίου- τα τελευταία χρόνια και οι οποίοι με δίδαξαν ακούραστα πολλές από τις τεχνικές που χρησιμοποίησα στην παρούσα διατριβή. Η Ελευθερία Βασιλάκη συνέβαλε αφενός με τις συμβουλές της και αφετέρου με το γέλιο της που ήταν πάντα η νότα που έκανε τη μέρα να φαίνεται ευχάριστη, όσο δύσκολη και αν προβλέπονταν. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα υπόλοιπα παιδιά τη Βαρβάρα Νικολαΐδου και τη Σοφία Μαυρίδου για την παρέα που κάναμε στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερα επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Εφη Θυμιάκου, με την οποία δουλέψαμε μαζί το θέμα της ΤΑΤ πρωτεΐνης. Η Έφη στάθηκε εξαιρετική συνεργάτης και πολύ καλή φίλη.

Η Μαρία Καφούση, με το πιο ζεστό χαμόγελο ακόμη και όταν την πίεζε αφόρητα η διαγνωστική ανάγκη αμέτρητων περιστατικών στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας, ήταν επίσης από τους βασικούς μου συνεργάτες καθώς είδαμε μαζί τις ιστολογικές τομές μετά από τις χρώσεις. Ευχαριστώ επίσης την Κατερίνα Δαριβιανάκη που συνέβαλε με τις τεχνικές της γνώσεις στην επιτυχία των χρώσεων και την Μαρία Κλινάκη για την βοήθεια επί του «πάγκου».

Κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής ήμουν ταυτόχρονα για μεγάλο διάστημα ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου του νομού Λασιθίου. Το καλό κλίμα που επικρατούσε, απόρροια παραδειγματικής διεύθυνσης ενός εξαιρετικού ανθρώπου και ιατρού, του Πανίκου Καρατσή, με βοήθησαν να αντέξω την πίεση χρόνου καθώς η καθημερινότητα διαμοιράζονταν περί τις 8 ώρες στην κλινική και άλλες 8 ώρες στο εργαστήριο. Ο κ. Καρατσής ήταν ο δάσκαλος μου στην χειρουργική. Είναι αυτός που με εμπιστεύθηκε στο χειρουργείο και του οποίου οι απόψεις και η χειρουργική του λογική πιστεύω ότι καθόρισαν και θα καθορίζουν και στο μέλλον τον τρόπο τόσο της χειρουργικής όσο και της ανθρώπινης προσέγγισης του ασθενούς από εμένα.

Σε δυο καλούς φίλους, τους χειρουργούς Λίζα Φραγκιαδάκη και Γιώργο Κωστάκη χρωστάω επίσης πολλά, γιατί αφενός με δίδαξαν πολλά και αφετέρου στάθηκαν περισσότερο ως φίλοι παρά ως επιμελητές στη συνεργασία που είχαμε επί 3ετία.

Τέλος αυτή η διατριβή δεν θα ήταν δυνατό να εκπονηθεί, χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση των γονέων μου Γιώργου και Νέλλης, του αδελφού μου Μιχάλη και

της συζύγου μου Μαίρης. Αυτοί απετέλεσαν τους ακοίμητους φρουρούς των ονείρων και των φιλοδοξιών μου, όταν η καθημερινότητα ήταν αμείλικτη και ενθουσιασμός παροδικά γινόταν απογοήτευση. Η ενθάρρυνση τους και κυρίως η αντοχή τους να με ακούνε στις δύσκολες στιγμές, ελάττωνε το άγχος και με φόρτιζε με το πάθος για νέα προσπάθεια. Ήταν οι άνθρωποι που πίστεψαν σε μένα και με στήριξαν σε δύσκολες στιγμές. Για αυτό το λόγο τους αφιερώνω αυτή τη διατριβή, ελπίζοντας να φανώ στο μέλλον αντάξιος της εμπιστοσύνης που μου έδειξαν.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b> .....	8
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT</b> .....	17
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	21
<b>A. Η Αγγειογένεση: βασικά μοριακά στοιχεία που συμμετέχουν</b> .....	22
Εισαγωγή-Ορισμοί-Φυσιολογία .....	22
Ο Αυξητικός Παράγον των Αγγειακών Ενδοθηλίων (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) και οι υποδοχείς του VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-2, VEGFR-3/FLT-4, VEGFR-4/Neuropilin .....	25
Ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor – PDGF) και οι υποδοχείς του PDGFR-α και PDGFR-β. ....	29
Ο μετασχηματίζων παράγοντας αύξησης β (Transforming Growth Factor β– TGFβ) και οι υποδοχείς του TGFRI, TGFRII και CD105/Endoglin.....	30
Ο παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor – FGF) και οι υποδοχείς του.....	34
Το σύστημα Αγγειοποιητίνης (Ang-1, Ang-2) και των υποδοχέων της (Tie-1, Tie-2). ....	35
Η Αγγειακή-Ενδοθηλιακή Καντερίνη (Vascular-Endothelial Cadherin – VE-cadherin) και η σημασία της στην αγγειογένεση .....	37
Η κυκλοξυγενάση-2 (Cyclooxygenase-2 – Cox-2) και η συσχέτιση της με την αγγειογένεση.....	38
Άλλοι παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση. ....	39
<b>B. Η αγγειογένεση της νεοπλασίας (Tumor Angiogenesis)</b> .....	41
Μορφολογία των νεόπλαστων τριχοειδών.....	42
Η σχέση της αγγειογένεσης με την καρκινογένεση. ....	42
Συσχέτιση διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων με την νεοπλασματική αγγειογένεση. ..	44
<i>O VEGF και οι υποδοχείς του.</i> ....	45
<i>O FGF και οι υποδοχείς του.</i> ....	46
<i>Η Αγγειοποιητίνη-2 (Ang-2)</i> .....	46
<i>Ο υποδοχέας CD105/Endoglin</i> .....	47
<i>Άλλα διαλυτά μόρια που σχετίζονται με την νεοπλασματική αγγειογένεση.</i> .....	47
Αναφορά στους αναστολείς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. ....	48
<b>Γ. Η διαπερατότητα των ενδοθηλιακών μονοστρωμάτων σε κυτταρικά στοιχεία – Η εμπλοκή των μορίων προσκόλλησης.</b> .....	50
Αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα.....	50
Το μόριο ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1).....	51
Το μόριο VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1).....	53
Το μόριο E-Selectin.....	55
Ο Καρκίνος και η σχέση του με τη φλεγμονή. Σχέση επαγωγής ή αναστολής; .....	57
<b>Δ. Ο κυτταρικός κύκλος και η ρύθμισή του. Οι εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases-CDKs) και ο αναστολέας p21<sup>WAF1/Cip1</sup> των κινασών CDK</b> .....	58
Ο Κυτταρικός κύκλος .....	58
Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.....	59
Κυτταρικός κύκλος, νεοπλασία και αγγειογένεση. Μια άρρηκτη σχέση.....	61
Η δομή και η λειτουργία του p21 <sup>WAF1</sup> .....	62
Η πρωτεΐνη P21 <sup>WAF1</sup> ως παράγοντας συναρμολόγησης των συμπλόκων CDK-κυκλίνης. ..	64
Ο διπλός ρόλος της πρωτεΐνης P21 <sup>WAF1</sup> ως επαγωγέας και αναστολέας της απόπτωσης...65	
Τελικά όμως ποιος ρόλος της P21 <sup>WAF1</sup> είναι ο πιθανότερος να συμβαίνει in vivo; .....	68
Άλλοι ρόλοι της p21 <sup>WAF1</sup> .....	69
<b>E. Το μόριο Imatinib mesylate/STI-571 και οι δράσεις του</b> .....	71
Βασικά βιοχημικά στοιχεία.....	71
Μοριακός μηχανισμός δράσης.....	72
<b>ΣΤ. Τα ερευνητικά ερωτήματα που τέθηκαν σε αυτή τη μελέτη</b> .....	72
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	75
<b>Κυτταρικές καλλιέργειες</b> .....	76
A. Βασικές τεχνικές κυτταροκαλλιέργειών.....	76
i. Υποκαλλιέργεια κυττάρων (Subculture or split).....	76
ii. Ψύξη ζώντων κυττάρων .....	77
iii. Απόψυξη ζώντων κυττάρων:.....	78

B. Καλλιέργεια σε υάλινα πλακίδια με αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο.....	79
<i>Αποστείρωση των πλακιδίων SFP</i> .....	79
<i>Καλλιέργεια κυττάρων επί των πλακιδίων SFP</i> .....	80
Γ. Συγκαλλιέργειες κυτταρικών πληθυσμών.....	80
Δ. Καλλιέργεια κυττάρων σε ημιδιαπερατά φίλτρα και εκτίμηση της διαπερατότητας.....	81
E. Μονιμοποίηση κυττάρων.....	82
Z. Πείραμα εκτίμησης της ενδοθηλιακής μεταναστευτικότητας.....	82
<b>Τεχνικές Ανοσοανίχνευσης</b> .....	83
1. Η ανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot).....	83
2. Ανοσοϊστοχημεία.....	91
3. Ανοσοκυτταροχημεία.....	96
4. Ανοσοφθορισμός.....	97
<b>Η ημιποσοτική ανίχνευση του επιπέδου μεταγραφής του γονιδίου p21<sup>WAF1</sup></b> .....	99
A. Εκχύλιση RNA από κύτταρα:.....	99
B. Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής.....	100
Γ. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	100
<b>Η κατασκευή της υβριδικής πρωτεΐνης TAT-p21<sup>WAF1/Cip1</sup></b> .....	102
A. Απομόνωση της κωδικοποιού αλληλουχίας του p21 <sup>WAF1</sup> και κατασκευή της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου TAT.....	103
B. Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	104
Γ. Πέψεις.....	104
Δ. Εκχύλιση DNA από τμήμα πηκτής αгарόζης.....	105
E. Συγκόλληση τμημάτων DNA.....	105
ΣΤ. Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού shock.....	106
Z. Καλλιέργεια θετικών αποικιών σε μικρή κλίμακα (mini-preps) και απομόνωση DNA.....	106
H. Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.....	107
Θ. Παραγωγή και απομόνωση της TAT-p21 <sup>WAF1</sup> .....	108
I. Πειράματα χορήγησης TAT-p21 σε ενδοθηλιακά κύτταρα.....	111
<b>Πειράματα που σχετίζονται με τη χορήγηση Imatinib (STI-571/Gleevec)</b> .....	112
A. Προετοιμασία διαλύματος Imatinib.....	112
B. Πειράματα συσχέτισης της επίδρασης του STI571 σε σχέση με τη χρονική διάρκεια και τη δρώσα συγκέντρωση.....	112
Γ. Πείραμα εκτίμησης αλλαγών κυτταρικής μορφολογίας.....	112
Δ. Έλεγχος της απόπτωσης με TUNEL.....	113
E. Ανίχνευση της απόπτωσης με τη χρήση Annexin V – FITC.....	114
<b>Στατιστική Ανάλυση</b> .....	114
<b>Λοιπά Υλικά</b> .....	115
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	116
<b>A. Αγγειογένεση – Μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας</b> .....	117
A1. Αγγειογένεση – Εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με αντι-CD31.....	117
A2. Αγγειογένεση – Μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με αντι-CD105.....	120
A3. Αγγειογένεση-Εκτίμηση της θετικότητας των νεόπλαστων τριχοειδών μέσω της έντασης χρώσης με αντι CD105.....	122
A4. Αγγειογένεση – Συσχέτιση των δυο μεθόδων ποσοτικοποίησης της μικροαγγειακής πυκνότητας.....	124
<b>B. Η έκφραση διαφόρων μορίων που σχετίζονται με την ενδοθηλιακή λειτουργικότητα και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο του μαστού.....</b>	126
B1. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα Flt-1.....	127
B2. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα Flk-1.....	127
B3. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα PDGFRα.....	129
B4. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα PDGFRβ.....	130
B5. Μελέτη της έκφρασης της COX-2.....	132
B6. Μελέτη της έκφρασης του ICAM-1.....	133
B7. Μελέτη της έκφρασης της E-selectin.....	134
B8. Μελέτη της έκφρασης της VCAM-1.....	136
<b>Γ. Συσχετίσεις μεταβολής έκφρασης των μορίων της μελέτης με την αγγειογένεση των όγκων.....</b>	138
Γ1. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Flt-1 με την αγγειογένεση των όγκων.....	138
Γ2. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Flk-1 με την αγγειογένεση των όγκων.....	139
Γ3. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του PDGFRα με την αγγειογένεση των όγκων.....	140

Γ4. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του PDGFRβ με την αγγειογένεση των όγκων.....	141
Γ5. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Cox-2 με την αγγειογένεση των όγκων.....	142
Γ6. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του ICAM-1 με την αγγειογένεση των όγκων.....	143
Γ7. Σχέση της μεταβολής έκφρασης της E-Selectin με την αγγειογένεση των όγκων.....	144
Γ8. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του VCAM-1 με την αγγειογένεση των όγκων.....	145
<b>Δ. Μελέτη του κυτταρικού κύκλου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.....</b>	<b>146</b>
Δ1. Η μελέτη έκφρασης του αναστολέα p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> επί της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926.....	146
Δ1α. Ανοσοκυτταροχημεία εναντίον του p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> .....	147
Δ1β. Ανίχνευση του μετάγραφου του p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> .....	147
Δ2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> σε δείγματα ιστών φυσιολογικού μαστού και δειγμάτων καρκίνου του μαστού.....	148
Δ3. Συσχέτιση της έκφρασης του p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> με την αγγειογένεση.....	150
<b>Ε. Η προσπάθεια ακύρωσης του αγγειογενετικού μηνύματος in vitro με τη χρήση της τεχνολογίας διαμεταγωγής πρωτεϊνών.....</b>	<b>151</b>
Ε1. Σχεδιασμός, παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης TAT- p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> .....	152
Ε2. Μελέτη της διαμεταγωγής της TAT-p21 επί της κυτταρικής σειράς EA.hy 926.....	155
Ε3. Επίδραση της TAT-p21 στην μετάδοση του αγγειογενετικού μηνύματος.....	156
<b>Στ. Η επίδραση του αντικαρκινικού σκευάσματος Imatinib στην αγγειογένεση, όπως προκύπτει από την επίδρασή της στην ενδοθηλιακή σειρά EA.hy 926.....</b>	<b>157</b>
Στ1. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία της Imatinib.....	157
Στ2. Χαρακτηρισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 για την έκφραση των υποδοχέων PDGFR.....	158
Στ3. Μορφολογικές αλλαγές που προκαλεί η επίδραση της Imatinib επί των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926.....	159
Στ4. Η μελέτη της μεταναστευτικότητας των ενδοθηλίων υπό την επίδραση της imatinib.....	160
Στ5. Η imatinib αυξάνει την μεσοκυττάρια διαπερατότητα των ενδοθηλίων στις μεγάλο-μοριακές ουσίες.....	161
Στ6. Πιθανές αιτίες αυξημένης διαπερατότητας.....	162
Α. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της Imatinib γίνονται αποπτωτικά.....	162
Β. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της Imatinib ελαττώνουν την έκφραση της VE-cadherin.....	162
<b>ΣΧΟΛΙΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ &amp; ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>164</b>
<b>Σχόλια - Συζήτηση.....</b>	<b>165</b>
Α. Η μέθοδος εκτίμησης της μικροαγγειακής πυκνότητας με τη χρήση του CD105 αποτελεί ένα ευαίσθητο και αξιόπιστο τρόπο προσέγγισης της αγγειογένεσης.....	165
Β. Η έκφραση των αγγειογενετικών υποδοχέων σε νεοπλασματικό περιβάλλον καρκίνου του μαστού.....	168
Γ. Τα μόρια προσκόλλησης και η έκφραση τους σε φυσιολογικό μαστό και σε καρκίνωμα του μαστού.....	169
Δ. Οι συσχετίσεις των μορίων της μελέτης αποκάλυψαν μια πιθανή εμπλοκή του ICAM-1 στην αγγειογένεση.....	171
Ε. Το επίπεδο ενδοθηλιακής έκφρασης του p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> είναι το αποτέλεσμα επίδρασης του αγγειογενετικού μηνύματος στα ενδοθήλια.....	171
ΣΤ. Η πρωτεΐνη TAT- p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> αποτελεί πρωτότυπη μέθοδο μοριακής αναστολής της αγγειογένεσης των όγκων in vitro.....	174
Ζ. Τελικά το p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> μπορεί να αποτελέσει στόχο παρέμβασης στο μέλλον;.....	175
Η. Η Imatinib ως μέσο αλλαγής της διαπερατότητας του ενδοθηλιακού φραγμού.....	176
Θ. Προσπάθειες μοριακής παρέμβασης στο μηχανισμό της αγγειογένεσης: παρόν και μέλλον.....	183
<b>Τα τελικά συμπεράσματα και η σημασία των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης.....</b>	<b>185</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>188</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>202</b>
Παράρτημα Α.....	203
Παράρτημα Β.....	204
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....</b>	<b>210</b>

---

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

---



Επώνυμο: Βρεκούσης  
Όνομα: Θωμάς  
Ημερομηνία γέννησης : 17/2/1975  
E-mail: [tvrek@med.uoc.gr](mailto:tvrek@med.uoc.gr)  
Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

## **Αναλυτικό βιογραφικό σημείωμα**

**1992 :** Απολυτήριο Γενικού Λυκείου με βαθμό 19 και 13/15

**1993 :** Εισαγωγή στο Ιατρικό τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης

**1998 :** Εκπαίδευση στο Dpt. Of Medical Oncology - CRC Beatson Laboratories ,Glasgow University στην τεχνολογία των κυτταρικών μονοστρωμάτων εντερικού και αναπνευστικού επιθηλίου .

**1999 :** Πτυχίο Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης με βαθμό 9,02 και χαρακτηρισμό Άριστα.

**Σεπτέμβριος 1999-Δεκέμβριος 1999:** τρίμηνη ειδίκευση στο Βενιζέλειο νοσοκομείο Ηρακλείου ως υπόχρεος άσκησης καθηκόντων υπηρεσίας υπαίθρου.

**Δεκέμβριος 1999 – Δεκέμβριος 2000 :** υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι. Μεσοχωριού, ΚΥ Χάρακα, νομού Ηρακλείου

**Δεκέμβριος 2000 – Φεβρουάριος 2001 :** Παράταση υπηρεσίας υπαίθρου επί θητεία

**Μάρτιος 2001 – Νοέμβριος 2001:** Ειδικότητα Γενικής Χειρουργικής (Διευθυντής Κλινικής Γενικής Χειρουργικής: Δρ. Πανίκος Καρατσής), Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου, νομού Λασιθίου Κρήτης

**Δεκέμβριος 2001 – Δεκέμβριος 2003 :** Παράταση επί θητεία στο τμήμα Γενικής Χειρουργικής, Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου, νομού Λασιθίου Κρήτης

**Ιανουάριος 2004 – Ιανουάριος 2005 :** Σμηνίτης Ιατρός, *124 Πτέρυγα Βασικής Εκπαίδευσης, 251-Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, 126 Σμηναρχία Μάχης, 3<sup>ο</sup> Κέντρο Ελέγχου Περιοχής, Αεροπορικό Απόσπασμα Καρπάθου.*

**Μάιος 2005 – σήμερα :** Ειδικότητα Μαιευτικής-Γυναικολογίας (Διευθυντής Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής: Καθηγητής Ευάγγελος Παρασκευαΐδης), Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.

## **Εκπαιδευτική εμπειρία**

**1994-1996 :** Συμμετοχή στην Διδασκαλία του μαθήματος Σχέση γιατρού -ασθενούς που διεξάγεται στο 1ο εξάμηνο σπουδών του Ιατρικού τμήματος.

**1996-1999 :** Συμμετοχή στο μάθημα Μοριακή Βάση Κληρονομικών Νοσημάτων -Μάθημα 6ου εξαμήνου με θέμα : Η Μοριακή βάση της καρκινογένεσης

**1996:** Παρακολούθηση σεμιναρίου Ανοσολογίας

**2003:** - Ομιλία σε κοινό με θέμα «Παθήσεις του μαστού»

- Εκπαίδευση καθηγητών μέσης εκπαίδευσης στην παροχή πρώτων βοηθειών

**2003-2005:** Μάθημα στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα: «Μοριακή αιτιολογία Β'παθούς υπέρτασης»

### **Γλώσσες**

Αγγλικά (FCE Grade A), Γαλλικά (Certificat – tres bien), Πιστοποιητικό γνώσης Ιατρικών όρων στην Αγγλική γλώσσα (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή)

### **Διακρίσεις**

**1987-1993:** - Μετάλλια αριστείας από το Δήμο Αθηναίων για όλες τις τάξεις της Β'βάθμιας εκπαίδευσης

- Βραβεία επίδοσης από το Υπουργείο παιδείας και θρησκευμάτων για όλες τις τάξεις της Β'βάθμιας εκπαίδευσης

**1993 - 1999 :** Υπότροφος επίδοσης του ΙΚΥ ως περατώσας πρώτος κάθε έτος σπουδών του Ιατρικού τμήματος

**1997 :** 2ο βραβείο Ολυμπιάδας Ιατρικής γνώσης.

**1999 :** - Απονομή διπλώματος από το Ιατρικό τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης ως αναγνώριση συμμετοχής στην οργάνωση της αίθουσας ηλεκτρονικών υπολογιστών του τμήματος.

- Υποτροφία της εταιρίας Glaxo-Wellcome η οποία χορηγείται ετησίως στον πρώτο αποφοιτήσαντα από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης για μεταπτυχιακές σπουδές στο εξωτερικό

- Βραβείο επίδοσης του Εμμ.Δρεττάκη (τ.υπουργού) που επιδίδεται ετησίως στον πρώτο αποφοιτήσαντα κάθε τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης

### **Οργανωτική Εμπειρία**

**1996:** Συμμετοχή στην οργάνωση αίθουσας πληροφορικής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

**1997 :** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 3ου Πανελλήνιου συνεδρίου Φοιτητών Ιατρικής στο Ηράκλειο Κρήτης και του δορυφορικού πανευρωπαϊκού συμποσίου φοιτητών Ιατρικής

**1999 :** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του ετησίου σεμιναρίου γαστρεντερολογίας στο Ηράκλειο της Κρήτης

**1999 :** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 6<sup>th</sup> postgraduate course in liver neoplasias and their therapeutic options

**2003:** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του ετησίου σεμιναρίου γαστρεντερολογίας στο Ηράκλειο της Κρήτης

**2003:** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 1st Mediterranean Melanoma Meeting

## **Άλλες ασχολίες**

- Πτυχίο ερμηνείας από τον οργανισμό Yamaha Music Foundation σε επίπεδο Grade 6 στο δίσκαλο ηλεκτρονικό αρμόνιο.
- Σκοποβολή

## **Ανακοινώσεις σε Ελληνικά και Διεθνή συνέδρια**

### **1. PATIENT MANAGEMENT INTEGRATED NETWORK: A STUDENT EFFORT OF ESTABLISHING A NETWORK CONNECTION BETWEEN THE UNIVERSITY HOSPITAL AND A HEALTH CENTRE IN CRETE.**

D. Papadimitriadis, N. Kartakis, T.Vrekoussis, K. Filippopolitis, A. Koutis, C.Lionis, M.Fioretos (First Scientific Congress of Greek Medical Students 1995)

### **2. MOLECULAR BASIS OF CANCER: A BRIEF REVIEW.**

T. Vrekoussis, D. Kardasis, V. Zannis

(Poster – 3<sup>rd</sup> Scientific Congress of Greek Medical Students 1997)

### **3. ORGANISATION OF A HEALTH EDUCATION PROCEDURE REFERRING TO A DISTRICT PLACED FAR FROM THE CENTRE IN HERAKLION'S COUNTY - STUDENT'S PARTICIPATION**

Adrianaki, K. Anifantakis, M. Vitsaksaki, T.Vrekoussis, J.Vlahakis, M.Genetzakis, M.Kafetzi, M. Konsolaki, N.Makrigiannis, G.Mihalopoulos, M.Mpathianaki, G.Notas, E. Padiaditi, E. Stefanou, C.Lionis.

(3<sup>rd</sup> Scientific Congress of Greek Medical Students 1997)

### **4. ASTHMA IN CHILDREN.**

E. Matzourani, T. Vrekoussis, C. Petraki, E. Papadopoyli, K. Askoksilakis, K. Haritakis

(Round Table - 3<sup>rd</sup> Scientific Congress of Greek Medical Students 1997)

### **5. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΓΚΑΙΡΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΣΕ ΑΓΡΟΤΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ ΤΟΥ ΚΥ ΧΑΡΑΚΑ**

Ι.Ψαρουδάκη, Ε.Μαστοράκης, Θ.Βρεκούσης, Α.Κουτσογεωργοπούλου, Δ. Αλεγκάκης, Δ.Μπρίμης, Γ.Παπαδόπουλος, Ε.Σεβαστάκη, Γ.Κουβίδης, Ε.Σπυριδάκη, Ν.Δρακωνάκης.

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2000

### **6. ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΚΥ ΧΑΡΑΚΑ**

Ν.Δρακωνάκης, Δ.Χατζησυμεών, Δ.Μπρίμης, Α.Κουτσογεωργοπούλου, Ε.Σταυρακάκη, Θ.Βρεκούσης, Γ.Παπαδόπουλος, Ε.Λαδουκάκη, Κ.Σεραφειμίδου, Ε.Παναγιωτάκη

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2000

### **7. ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΟΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ ΤΟΥ ΚΥ ΧΑΡΑΚΑ ΓΙΑ ΘΕΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

Χ.Δασκαλάκη, Α.Ιερωνυμίδου, Δ. Αλεγκάκης, Κ.Σεραφειμίδου, Ε.Χατζίδη, Ε.Σταυρακάκη, Α.Κουτσογεωργοπούλου, Θ.Βρεκούσης, Ι.Μεσσαριτάκης, Ε.Σεβαστάκη, Ν.Δρακωνάκης

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2000

### **8. ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΙΑΤΡΕΙΟ ΑΣΗΜΙΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΙΑΤΡΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Ζωή Τρουλάκη, Κωνσταντίνα Πατσιά, Θ.Βρεκούσης, Γ.Παπαδόπουλος, Δ.Μπρίμης, Ε.Σταυρακάκη

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2001

### **9. ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΥΓΕΙΑΣ ΘΗΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΙΣ ΥΠΟΛΟΙΠΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΡΟΚΕΙΜΕΝΟΥ ΝΑ ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΘΟΥΝ ΤΑ ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΥΘΥΝΗΣ ΤΟΥ Κ.Υ.**

Εμμ.Τζώρτζης, Ν.Δρακωνάκης, Χαρίκλεια Μακρυγιαννάκη, Θ. Βρεκούσης, Ι.Χριστοδούλου, Γ.Πατεράκης, Γ.Παπαδόπουλος, Δ.Μπρίμης

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2001

### **10. Η ΑΝΤΙΣΥΛΛΗΨΗ ΣΤΙΣ ΑΡΧΑΙΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ**

Γ.Παπαδόπουλος, Ν.Δρακωνάκης, Θ. Βρεκούσης

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2001

**11. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΕ ΕΝΑ ΧΩΡΙΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΥΘΥΝΗΣ ΤΟΥ Κ.Υ. ΧΑΡΑΚΑ. ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ.**

Θ. Βρεκούσης,, Κωνσταντίνα Πατσιά, Μ. Βρεκούσης, Γ.Παπαδόπουλος, Δ.Μπρίμης, Κ.Σεραφειμίδου

13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής 2001

**12. The experience of breast cancer management the last 8 years by the breast unit of the surgery department of Agios Nikolaos General Hospital**

P.Karatsis, T.Vrekoussis, E.Fragkiadaki, J.Stavrakis, , G.Hatzipavlis, E.Schiniotaki G.Konstantoudakis

HSBCR 5<sup>th</sup> International Congress 2001

**13. The experience of the breast unit of the surgical department of St.Nicolas General Hospital**

P.Karatsis, T.Vrekoussis, E.Fragkiadaki, J.Stavrakis, G.Kostakis G.Hatzipavlis, E.Schiniotaki HSBCR 5<sup>th</sup> International Congress 2001

**14. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ ΜΑΛΑΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωνσταντουδάκης, Γ.Κωστάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Χατζηπαυλής

5ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 2001

**15. ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ ΤΗΣ ΣΚΩΛΗΚΟΕΙΔΟΥΣ ΑΠΟΦΥΣΗΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Ε.Δημοσθένους, Θ.Βρεκούσης

5ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 2001

**16. Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΠΛΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΗΛΩΝ ΥΗΣ ΒΟΥΒΩΝΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Ε.Δημοσθένους

5ο Ελλαδο-Κυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο 2001

**17. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΜΕ ΗΠΑΡΙΝΗ ΧΑΜΗΛΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΣΤΗΝ ΘΡΟΜΒΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΥΠΟ ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ ΠΟΥ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας,, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Ε.Δημοσθένους

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειολογίας Αγγειοχειρουργικής

**18. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΦΛΕΒΩΝ ΚΑΤΩ ΑΚΡΩΝ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Χατζηπαυλής

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγγειολογίας Αγγειοχειρουργικής

**19. Η ΙΑΤΡΟΓΝΩΣΙΑ ΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΦΑΝΗ**

Ε. Φραγκιαδάκη, Π. Καρατσής, Θ. Κούνουνας, Ι. Σταυράκης, Γ. Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης Θ. Βρεκούσης

28ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο , Αθήνα 2002

**20. PAIN AFTER LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY, FOLLOWING LOCAL INFUSION WITH ROPIVACAINE 0,75%**

E.Fragkiadaki, P.Karatsis, J.Stavrakis, T.Vrekoussis, H. Psomopoulos, S. Papantonaki

1<sup>st</sup> International Conference: Laparoscopic and open Hepatopancreatobiliary Surgery, Athens 2002

**21. ACUTE CHOLECYSTITIS: LAPAROSCOPIC APPROACH AND COMPLICATIONS**

P.Karatsis, E.Fragkiadaki, T.Vrekoussis, J.Stavrakis, G.Kostakis, G.Konstantoudakis, E. Dimosthenous

European Association for Endoscopic Surgery: 10<sup>th</sup> International Congress, Lisboa 2002

**22. LAPAROSCOPIC MANAGEMENT OF NON PARASITIC CYSTS**

P.Karatsis, E.Fragkiadaki, J.Stavrakis, G.Kostakis, T.Vrekoussis, G.Konstantoudakis, E. Dimosthenous

European Association for Endoscopic Surgery: 10<sup>th</sup> International Congress, Lisboa 2002

**23. BILOMA FOLLOWING LAPAROSCOPIC CHOLOCYSTECTOMY. A CASE REPORT OF 2 CASES**

P.Karatsis, E.Fragkiadaki, J.Stavrakis, G.Kostakis, G.Konstantoudakis, T.Vrekoussis, E. Dimosthenous

European Association for Endoscopic Surgery: 10<sup>th</sup> International Congress, Lisboa 2002

**24. VARICOSE VEINS AND EARLY SAPHENECTOMY. IS A SAFE METHOD FOR PREVENTION OF MAJOR SAPHENOUS VEIN THROMBOSIS?**

P.Karatsis, E.Fragkiadaki, Th. Kounounas, G.Konstantoudakis, G.Kostakis, T.Vrekoussis  
XII Mediterranean congress of Angiology and Vascular Surgery, Paphos 2002

**25. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΑΝΑΦΕΡΟΜΕΝΟ ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΑΛΓΟΣ ΣΤΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΑ ΙΑΤΡΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΑΓΙΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΥ**

Μουστερης Π., Παϊσιου Α., Φιλίππιδη Α., Τεριζάκη Α., Στεφανάκη Ε., Παπαδήμας Μ., Μανιουδάκη Α., Βρεκούσης Θ., Καρατσής Π., Φραγκιαδάκη Ε.  
40ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2002

**26. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ Π. ΕΝΤΕΡΟΥ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**27. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΔΡΑ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**28. ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΕΣ ΣΥΜΦΥΣΕΙΣ Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΗΜΑΣΙΑ**

Ε.Φραγκιαδάκη, Π.Καρατσής, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης,  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**29. ΔΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΟΙ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΣΠΛΗΝΟΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Θ.Κούνουνας, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**30. ΥΠΕΡΗΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ**

Ε.Φραγκιαδάκη, Π.Καρατσής, Θ.Κούνουνας, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**31. ΠΑΡΕΚΤΟΠΙΣΗ ΟΡΧΕΩΣ ΑΠΟ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΡΟΧΑΙΟ ΑΤΥΧΗΜΑ**

Ι.Σταυράκης, Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Στ. Μουντράκης  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**32. ΕΧΙΝΟΚΟΚΚΙΑΣΗ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ 23 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ**

Π.Καρατσής, Α.Πάγκαλος, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Θ.Κούνουνας, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
11ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 2002

**33. ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΤΙΔΕΣ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥΣ ΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΔΕΚΑΕΤΙΑ**

Π.Καρατσής, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος  
23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα 2002

**34. ΧΟΛΟΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Θ.Κούνουνας, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Αθήνα 2002

**35. ΔΙΑΤΡΗΣΗ ΠΑΧΕΩΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΚΟΛΟΝΟΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕ ΛΗΨΗ ΒΙΟΨΙΑΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος

22ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2002

**36. Παγκρεατικό κυσταδένωμα: «Αναφορά σε μια ενδιαφέρουσα περίπτωση»**

Π.Καρατσής, Ι.Σταυράκης, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος

22ο Πανελλήνιο Γαστρεντερολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2002

**37. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΑΠΟ ΤΗ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΒΑΡΕΩΣ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Σ.Μυτάς, Μ.Καραλάκη

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

**38. ΞΑΝΘΟΚΟΚΚΙΩΜΑΤΩΔΗΣ ΧΟΛΟΚΥΣΤΙΤΙΣ: Η ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ**

Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Δ.Κούρτης, Π.Καρατσής

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

**39. ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΣΚΩΛΗΚΟΕΙΔΕΚΤΟΜΗ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ**

Γ.Κωστάκης, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Γ.Φλουρής, Ε.Σφακιωτάκης, Π.Καρατσής

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

**40. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΟΛΩΔΕΚΑΛΑΚΤΥΛΙΚΟΥ ΣΥΡΙΓΓΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Σ.Μυτάς, Γ.Φλουρής, Ε.Σφακιωτάκης,

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

**41. Η ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗΣ ΣΤΙΣ ΠΟΛΥΠΟΕΙΔΕΙΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΗΣ ΧΟΛΗΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ**

Ε.Φραγκιαδάκη, Π.Καρατσής, Γ.Κωστάκης, Α.Δασκαλάκη, Θ.Βρεκούσης, Σ.Μυτάς, Γ.Φλουρής, Μ.Καραλάκη,

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

**42. ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ. ΑΙΤΙΟ ΘΞΕΙΑΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ**

Ε.Φραγκιαδάκη, Π.Καρατσής, Γ.Κωστάκης, Θ.Κούνουνας, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Ε.Σφακιωτάκης, Γ.Φλουρής

23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη 2003 (Η περίληψη δημοσιεύτηκε στο Annals of Gastrenterology, vol 16;Supplement October 2003: 36

**43. ΞΕΝΑ ΣΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Ι.Σταυράκης, Α.Δασκαλάκη, Θ.Βρεκούσης, Γ.Φλουρής, Ε.Σφακιωτάκης

23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη 2003 (Η περίληψη δημοσιεύτηκε στο Annals of Gastrenterology, vol 16;Supplement October 2003: 36

**44. ΕΠΕΙΓΟΥΣΕΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΓΙΑ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ**

Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Ι.Σταυράκης, Α.Δασκαλάκη, Θ.Βρεκούσης, Γ.Φλουρής, Ε.Σφακιωτάκης, Μ.Καραλάκη

23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη 2003 (Η περίληψη δημοσιεύτηκε στο Annals of Gastrenterology, vol 16;Supplement October 2003: 55

**45. ENDOTHELIAL P21<sup>WAF 1</sup> CELL CYCLE INHIBITOR IS DOWN-REGULATED IN BREAST CANCER.**

T. Vrekoussis, EN Stathopoulos, M.Kafousi, O.Zoras

XXXIX Congress of the European Society for Surgical Research

**46. STI-571 CAN INCREASE ENDOTHELIAL PERMEABILITY VIA VE-CADHERIN DOWN-REGULATION AND REDUCE ENDOTHELIAL MIGRATION IN VITRO.**

**Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά επιστημονικά περιοδικά:**

- **Αποτελέσματα απο την αντικατάσταση κουμαρινικών με ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους στην θρομβοπροφύλαξη ασθενών υπο αντιπηκτική αγωγή που υποβάλλονται σε προγραμματισμένες χειρουργικές επεμβάσεις**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας,, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Ε.Δημοσθένους  
Ελληνική Αγγειοχειρουργική, Τόμος 10, Τεύχος 3, 2001
- **Μηχανικός ειλεός οφειλόμενος σε εγκολεασμό της νήστιδος λόγω φλεγμονώδους ινώδους πολύποδα**  
Ε.Φραγκιαδάκη, Π.Καρατσής, Ι.Σταυράκης, Δ.Κούρτης, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
ΙΑτρικά Χρονικά, τόμος ΚΣΤ', τεύχος 6-7-8, σελ. 374-376

**Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά:**

1. Kalogeraki A, Kafousi M, Ieromonachou P, Giannikaki E, **Vrekoussis T**, Zoras O, Tsiftsis D, Stathopoulos E. Telomerase activity as a marker of invasive ductal breast carcinomas on FNABs and relationship to other prognostic variables.  
Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3B):1927-30.
2. Kalogeraki A, Ieromonachou P, Kafousi M, Giannikaki E, **Vrekoussis T**, Zoras O, Tsiftsis D, Delides G, Stathopoulos E. Topoisomerase II alpha expression in breast ductal invasive carcinomas and correlation with clinicopathological variables.  
In Vivo. 2005 Sep-Oct;19(5):837-40.
3. **Vrekoussis T**, Stathopoulos EN, Kafousi M, Saridaki Z, Sanidas E, Zoras O. Endothelial p21(WAF1/CiP1) cell cycle inhibitor is down-regulated in breast cancer.  
Anticancer Res. 2005 Jul-Aug;25(4):2743-8.
4. **Vrekoussis T**, Stathopoulos EN, Kafousi M, Darivianaki A, Zoras O. Establishment of a new co-culture model using negatively-charged slides.  
In Vivo. 2004 Jul-Aug;18(4):471-6.
5. **Vrekoussis T**, Stathopoulos EN, De Giorgi U, Kafousi M, Pavlaki K, Kalogeraki A, Chrysos E, Fiorentini G, Zoras O. Modulation of vascular endothelium by imatinib: a study on the EA.hy 926 endothelial cell line. (Submitted in revised form, J Chemotherapy, 2005)

**Βραβευμένες εργασίες:**

- **ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΟΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΙΚΟΥ ΣΥΡΙΓΓΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωστάκης, Θ.Βρεκούσης, Α.Δασκαλάκη, Σ.Μυτάς, Γ.Φλουρής, Ε.Σφακιωτάκης,  
6ο Πανελλήνιο Συνέδριο λαπαροενδοσκοπικής χειρουργικής & International Symposium on advanced laparoendoscopic surgery, Αθήνα 2003

- **ΤΟ ΜΟΡΙΟ STI571 ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΑΣΙΑ IN VITRO. ΕΙΝΑΙ ΠΙΘΑΝΗ Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΩΣ ΑΓΓΕΙΟΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ;**  
Θ.Βρεκούσης, Ε.Ν.Σταθόπουλος, Μ.Καφούση, Ο.Ζώρας. Βραβείο Οδυσσέα Καλλιγιάνη, 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ελούντα Λασιθίου Κρήτης, 2004

**Συμμετογή σε συγγραφή βιβλίων:**

1. **ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΩΣΗ ΜΑΛΑΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Γ.Κωνσταντουδάκης, Γ.Κωστάκης,  
Θ.Βρεκούσης, Ε.Δημοσθένους  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2001, σελ.23 – Εκδόσεις Σύνεδρον
2. **Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΑΝΑΣΤΟΜΩΤΗΡΑ (STAPLER ETHICON 33 ΡΡΗ) ΣΤΙΣ ΑΙΜΟΡΡΟΪΔΕΚΤΟΜΕΣ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Θ. Κούνουνας, Γ.Κωνσταντουδάκης,  
Ε.Δημοσθένους, Θ.Βρεκούσης  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2001, σελ.191 – Εκδόσεις Σύνεδρον
3. **Η ΧΡΗΣΗ ΔΙΠΛΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΗΛΩΝ ΥΗΣ ΒΟΥΒΩΝΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης,  
Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης, Ε.Δημοσθένους  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2001, σελ.305 – Εκδόσεις Σύνεδρον
4. **Η ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΛΕΓΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΙΛΙΟΚΗΛΩΝ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Θ. Κούνουνας, Ι. Σταυράκης,  
Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2001, σελ.307 – Εκδόσεις Σύνεδρον
5. **ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΤΙΔΕΣ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥΣ ΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΔΕΚΑΕΤΙΑ**  
Π.Καρατσής, Γ.Κωστάκης, Γ.Κωνσταντουδάκης, Ε.Φραγκιαδάκη,  
Ι.Σταυράκης, Θ.Κούνουνας, Θ.Βρεκούσης, Γ.Τσώνος  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2002, σελ.550– Εκδόσεις Σύνεδρον
6. **ΧΟΛΟΠΕΡΙΤΟΝΑΙΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗ**  
Π.Καρατσής, Ε.Φραγκιαδάκη, Ι.Σταυράκης, Γ.Κωστάκης, Θ.Κούνουνας,  
Γ.Κωνσταντουδάκης, Θ.Βρεκούσης  
Εξελίξεις στη χειρουργική 2002, σελ.613– Εκδόσεις Σύνεδρον



---

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT

---

## Περίληψη:

Εισαγωγή: Ο αγγειακός ενδοθηλιακός φραγμός είναι το ανατομικό σημείο που καθορίζει την ανάπτυξη και την δευτεροπαθή εντόπιση των νεοπλασιών. Ευθύνεται για την μεταφορά και απόδοση στον όγκο, των απαραίτητων συστατικών για τη συντήρηση και την αύξηση του. Η αλληλεπίδραση του αγγειακού ενδοθηλιακού φραγμού με το νεοπλασματικό περιβάλλον περιγράφεται με τον ευρύτερο όρο της αγγειογένεσης, ο οποίος περιλαμβάνει αλλαγές διαφόρων ενδοθηλιακών ιδιοτήτων όπως η μεταναστευτικότητα, η διαπερατότητα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού. Η αγγειογένεση των όγκων ρυθμίζεται από πλήθος παραγόντων που εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και το στρώμα του όγκου. Το σύνολο των παραγόντων απαρτίζουν το νεοπλασματικό περιβάλλον το οποίο θα αποτελέσει τον αγγειογενετικό διακόπτη ευοδώνοντας ή αναστέλλοντας κατά περίπτωση την αγγειογένεση. Στην αγγειογενετική διαδικασία των όγκων επίσης συμμετέχει και η φλεγμονή άλλοτε υποβοηθώντας και άλλοτε αναστέλλοντας τη φλεγμονή. Υλικά, ασθενείς και μέθοδοι: Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η έκφραση των μορίων VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , COX-2, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin καθώς επίσης και αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p21<sup>WAF1/Cip1</sup> σε περιστατικά καρκίνου μαστού και σε περιστατικά φυσιολογικού μαστού. Το προς μελέτη υλικό δείγματα βιοψιών καρκίνου μαστού και φυσιολογικών μαστών, τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η έκφραση των μορίων συσχετίστηκε με την αγγειογένεση σε όπως αυτή ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση του προσοφθάλμιου φακού Chalkey με βάση χρώσεις εναντίον των CD31 και CD105. Επιπλέον με τη χρήση της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926 μελετήθηκε η έκφραση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> σε καρκινικό περιβάλλον (από την κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MDA-MB-468) προκειμένου να αποσαφηνιστεί το επίπεδο ρύθμισης του p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Ακολούθως σχεδιάστηκε, παρήχθη και απομονώθηκε, υβριδική πρωτεΐνη TAT-p21<sup>WAF1/Cip1</sup> με στόχο την ακύρωση του αγγειογενετικού μηνύματος των όγκων και χορηγήθηκε σε κύτταρα EA.hy 926 καλλιεργημένα σε θρεπτικό από τη σειρά MDA-MB-486. Με στόχο την αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλίων, μελετήθηκε η επίδραση του αναστολέα των τυροσινικών κινασών Imatinib, στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy 926. Αποτελέσματα: Η ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης με την παραπάνω μέθοδο απέδειξε ότι στον καρκίνο του μαστού η αγγειογένεση είναι αυξημένη σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό ( $p < 0.05$ ). Η χρήση του CD105 ως αγγειογενετικού δείκτη αποδείχτηκε περισσότερο ευαίσθητη στην ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης των όγκων. Από τα παραπάνω μόρια που μελετήθηκαν στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσίασαν ο PDGFR $\beta$  (αύξηση στον καρκίνο του μαστού), η COX-2 (αύξηση στον καρκίνο του μαστού) και το VCAM-1 (ελάττωση στον καρκίνο του μαστού). Περαιτέρω συσχέτιση των ευρημάτων με την αγγειογένεση αποκάλυψε και μια πιθανή συσχέτιση (αύξηση στον καρκίνο του μαστού) του ICAM-1. Η έκφραση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> σε καρκινικό περιβάλλον τόσο σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας όσο και σε ιστολογικό επίπεδο αποδείχτηκε ότι μειώνεται ( $p < 0,05$ ) και ότι η ρύθμιση είναι μεταγραφική. Η TAT-p21<sup>WAF1/Cip1</sup> κατάφερε να αναστείλει ( $p < 0,05$ ) το αγγειογενετικό μήνυμα της σειράς MDA-MB 468 επί της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926. Τέλος η χρήση της Imatinib αποδείχτηκε ότι αυξάνει τη

διαπερατότητα των ενδοθηλίων, ελαττώνοντας της έκφραση της VE-cadherin. Επιπλέον αποδείχτηκε αποπτωτική δράση της Imatinib επί των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συζήτηση: Τα παραπάνω αποτελέσματα οριοθετούν το μοριακό προφίλ των ενδοθηλιακών κυττάρων του καρκίνου του μαστού και αποτελούν εύρημα προς μελλοντική αξιοποίηση. Διαφαίνεται ότι στον καρκίνο του μαστού παρατηρούνται σημεία τοπικής ανοσοκαταστολής που ευοδώνουν την εξέλιξη της νεοπλασίας. Αυτό το φαινόμενο έρχεται σε αντιδιαστολή με την άποψη ότι στοιχεία φλεγμονής απαιτούνται για την επαγωγή της αγγειογένεσης. Στον καρκίνο του μαστού, το νεόπλασμα φαίνεται να μπορεί να συντηρήσει και από μόνο του την αγγειογένεση. Η εφαρμογή της τεχνολογίας TAT προς αναστολή της αγγειογένεσης είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται και αποτελεί μια νέα μέθοδο μοριακής παρέμβασης. Απαιτούνται όμως αρκετά πειράματα για να αποδειχθεί η κλινική αποτελεσματικότητα μιας τέτοιας παρέμβασης. Τέλος η Imatinib φαίνεται ότι αποκτά ιδιαίτερο ρόλο στην αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και προτείνεται να δοκιμαστεί σε μοντέλα τοπικής χημειοθεραπείας ως συγχορηγούμενο σκεύασμα μαζί με κλασικά σχήματα. Είναι πολύ πιθανό να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων σχημάτων, χρησιμοποιώντας μικρότερες συγκεντρώσεις κυτταροστατικών με λιγότερες, κατά το δυνατό, ανεπιθύμητες ενέργειες.

### **Abstract:**

Introduction: The endothelial barrier is the anatomical boundary that controls tumor growth rate and metastasis, supplying the tumor with oxygen and nutrients. The interaction between the endothelial barrier and the primary tumor can be well described by angiogenesis, a process that involves several endothelial features such as growth rate, migration ability and permeability. The tumor environment consists of several factors secreted either by the tumor cells or by stromal cells and acts as the angiogenic switch, thus controlling whether endothelial cells will acquire an angiogenic profile. Another component that regulates angiogenesis, is inflammation. It is described that inflammatory cells secrete cytokines that interfere with the angiogenic process usually as inducers. However there is always a possibility for the inflammatory cells to participate in host's local immune defense, thus suppressing tumor growth. Materials and methods: A group of normal breast tissue samples and a group of breast tissue samples were randomly chosen from the archives of the Pathology Laboratory of the University of Crete. In this study several molecules (VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , COX-2, VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin) were assessed by immunohistochemistry (IHC) in order to detect differences in expression between normal and malignant breast tissue. At the same time angiogenesis was quantified by Chalkey count using CD31 and CD105 as endothelial markers. Endothelial cell cycle inhibitor p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expression was detected both in tissue samples and in a co-culture model of endothelial cells (EA hy 926) and breast cancer cells (MDA-MB 468) and by RT-PCR it was defined whether p21<sup>WAF1/Cip1</sup> alterations due to transcription regulation or not. Applying TAT technology a TAT-p21<sup>waf1</sup> fusion protein was designed, expressed, isolated and administered to EA hy 926 cells grown in tumor conditioned medium, in the aim of canceling the tumor-derived angiogenic message. Finally, having in mind to increase the endothelial permeability in order to maximize drug delivery to the tumors, we

examined the effects of imatinib on the EA.hy 926 endothelial cell line. Results: Angiogenesis quantification revealed a significant increase of the microvascular density (MVD) in the breast cancer tissue samples ( $p < 0.05$ ). Moreover CD105 was found to be a more sensitive marker regarding tumor angiogenesis. From all the above mentioned molecules only PDGFR $\beta$ , Cox-2 and VCAM-1 were significantly altered in breast cancer, with the first two to present an increased and the third a decreased expression. P21<sup>waf1</sup> was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in breast cancer as shown both by the IHC results and by the results on the EA.hy 926 endothelial cells. This decrease was rather transcriptional. TAT-p21<sup>WAF1</sup> fusion protein succeeded in canceling the angiogenic message, as shown by the cell growth rate of cells grown in TCM with or without TAT-p21. Finally imatinib resulted in increased endothelial permeability possibly via Ve-cadherin down-regulation. At the same time imatinib was proved to induce apoptosis to endothelial cells, a fact that supports imatinib's anti-angiogenic effect. Discussion: This study suggests a certain molecular profile of the endothelial cells participating in breast cancer angiogenesis. This profile may be a possible molecular target in the future. Our findings suggest that in breast cancer the disease progresses via local immunosuppression, a fact that seems to be different from the thesis that inflammation is necessary for the primary tumor to progress and disseminate. It seems that breast cancer may support its own angiogenesis. To our knowledge it is the first time that TAT technology is applied to inhibit tumor angiogenesis. Our results are though very primitive and further experimentation is imperative in the aim of clarifying clinical applicability and efficiency. Finally our results suggest imatinib as a future anti-angiogenic agent. However caution is needed in order to extract safe conclusions. The most possible way to test imatinib's anti-angiogenic action is in locoregional therapy modes. It is highly possible for imatinib to increase endothelial permeability, thus maximizing the therapeutic benefit with lower concentrations of cytotoxic drugs administered.

---

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

---

## **A. Η Αγγειογένεση: βασικά μοριακά στοιχεία που συμμετέχουν**

---

### **Εισαγωγή-Ορισμοί-Φυσιολογία**

Η δημιουργία του αγγειακού δικτύου σε έναν οργανισμό είναι μια διαδικασία που παρατηρείται κυρίως κατά την εμβρυογένεση, όταν οι αγγειοβλάστες, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν δημιουργώντας ένα πρώτο απλό δίκτυο που καλείται πρωτογενές αγγειακό πλέγμα (Risau W, 1997). Η επόμενη αυτή δημιουργία αγγείων κατ'ουσίαν παρατηρείται μόνο σε αυτή τη φάση της ζωής και καλείται νεοαγγείωση (vasculogenesis). Η ολοκλήρωση του αγγειακού δικτύου επισυμβαίνει με διαμόρφωση και επέκταση των αγγείων από ήδη υπάρχοντα, μια διαδικασία που καλείται αγγειογένεση (angiogenesis). Κατά την αγγειογένεση λαμβάνουν χώρα μια σειρά βιοχημικών και κυτταρικών μηχανισμών που ως στόχο έχουν την κινητοποίηση των «εν ηρεμία» ενδοθηλιακών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση τους, προκειμένου αυτά να οργανωθούν σε τριχοειδή. Απώτερος βιολογικός στόχος είναι η ικανοποιητική άρδευση μιας υποξαιμικής ή ανεπαρκώς τροφοδοτούμενης με θρεπτικά συστατικά, περιοχής.

Η διαδικασία που συμβαίνει με την πυροδότηση των αγγειογενετικών μηχανισμών είναι σύνθετη και συντονίζεται μέσω της έκκρισης κυτταρικών παραγόντων τόσο από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και από τα κυτταρικά στοιχεία της περιοχής που αλληλεπιδρά με τα προϋπάρχοντα αγγεία και απαιτεί την περαιτέρω άρδυσή της.

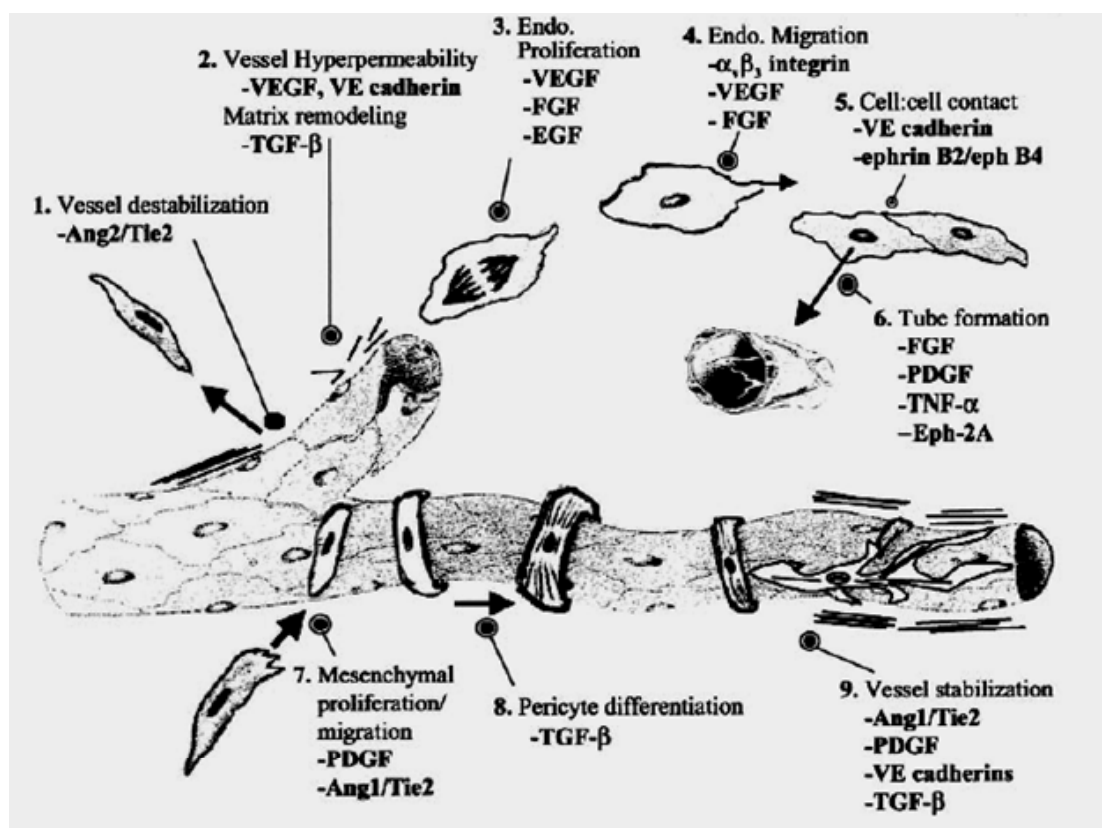
Τα βήματα που ορίζουν την αγγειογενετική διαδικασία επιγραμματικά έχουν ως εξής:

- i. Αποσταθεροποίηση του υπάρχοντος αγγείου μέσω αλληλεπίδρασης της αγγειοποιητίνης-2 με τον υποδοχέα Tie-2. Σε αυτή τη φάση τα περικύτταρα -που οργανώνουν, στηρίζουν μεταβολικά και ορίζουν το αγγείο ως ανατομική οντότητα- αποδιοργανώνονται χαλαρώνοντας αρχικώς τις μεσοκυττάρειες συνδέσεις τους και εν συνεχεία απομακρύνονται από τη θέση τους.

- ii. Η απομάκρυνση των περικυττάρων σε συνδυασμό με τον παράγοντα VEGF, αυξάνει τη διαπερατότητα των ενδοθηλίων με αποτέλεσμα διάφορες πρωτεΐνες να εξαγγειωθούν στο μεσεγχυματικό περιαγγειακό χώρο. Αποτέλεσμα είναι η τροποποίηση της βασικής μεμβράνης (επί της οποίας προσανατολίζονται και αναπτύσσονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα).
- iii. Χωρίς τη βασική μεμβράνη, όπου τα ενδοθήλια βρίσκονται σε αναστολή πολλαπλασιασμού λόγω αλληλεπιδράσεων επαφής, και σε συνδυασμό με την ύπαρξη ισχυρών αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, FGF, EGF) τα ενδοθηλιακά κύτταρα εγκαταλείπουν την κατάσταση ηρεμίας (quiescent state) και αποκτούν πολλαπλασιαστικό δυναμικό.
- iv. Πέραν του πολλαπλασιασμού, υπό την επίδραση των παραπάνω αγγειογενετικών παραγόντων και αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες του μεσεγχύματος (α & β ιντεγκρίνες) τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν προς την περιοχή που ανεπαρκεί.
- v. Αφού μεταναστεύσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα έρχονται σε μεσοκυττάρια επαφή με την έκφραση της VE-Cadherin.
- vi. Ακολουθώς σχηματίζουν τον πρωτογενή αγγειακό αυλό που χαρακτηρίζει τα νεόπλαστα τριχοειδή.
- vii. Παράλληλα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που οργανώνονται σε πρώιμες αγγειακές δομές, τα μεσεγχυματικά κύτταρα, υπό την επίδραση του παράγοντα PDGF και της αγγειοποιητίνης-2, πολλαπλασιάζονται και ακολουθούν συνοδεύοντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα
- viii. Όταν τα μεσεγχυματικά κύτταρα φτάσουν στην περιαγγειακή τους θέση, διαφοροποιούνται σε περικύτταρα με την επίδραση του TGF-β.
- ix. Η συνολική δομή σταθεροποιείται με την οργάνωση των περικυττάρων και αποτελεί πλέον ένα λειτουργικό νεόπλαστο τριχοειδές με σταθερή αιματική παροχή και καθορισμένη διαπερατότητα.

Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά και στην εικόνα A1.

Η αγγειογένεση πέραν της εμβρυϊκής φάσης όπου συμμετέχει σαφώς στην οργανογένεση, είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε λίγες φυσιολογικές λειτουργίες. Παρατηρείται κατά την εμφύτευση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο προκειμένου να σχηματιστεί ο πλακούντας, ενώ χαρακτηρίζει την αύξηση του ενδομητρίου κατά την παραγωγική φάση του κύκλου στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. (Pappetti M, Herman I, 2002)



**Εικόνα A1:** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αγγειογένεσης και των παραγόντων που εμπλέκονται σε κάθε στάδιο. (Pappetti M, 2002)

Πέραν όμως των φυσιολογικών, η αγγειογένεση χαρακτηρίζει και παθολογικές καταστάσεις. Έτσι είναι πλέον σαφής η συμμετοχή της στην επούλωση μετά από τραυματισμούς, στην φλεγμονή είτε είναι άσηπτη-αυτοάνοση είτε είναι σηπτική, και φυσικά στις διάφορες νεοπλασίες, είτε χαρακτηρίζονται καλοήθειες ή κακοήθειες.

Η αγγειογένεση είναι μια στενά ελεγχόμενη διεργασία, γεγονός που αναδύεται από την ποικιλία των μηχανισμών που την ελέγχουν και τη φύση των μορίων που εμπλέκονται. Είναι πλέον σαφές ότι στο αγγειογενετικό μήνυμα εμπλέκονται :

1. Διαλυτοί παράγοντες όπως είναι οι VEGF, FGF, PDGF, EGF



2. Υποδοχείς των αντίστοιχων παραγόντων
3. Πρωτεΐνες του διάμεσου χώρου όπως οι ιντεγκρίνες
4. Οι μεσοκυττάρειες συνδέσεις όπως η VE-Cadherin
5. Αιμοδυναμικοί παράγοντες όπως είναι η επιφανειακή τάση.

Ο τρόπος ελέγχου και ρύθμισης της αγγειογένεσης αναλύεται παρακάτω.

### **Ο Αυξητικός Παράγων των Αγγειακών Ενδοθηλίων (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) και οι υποδοχείς του VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-2, VEGFR-3/FLT-4, VEGFR-4/Neuropilin**

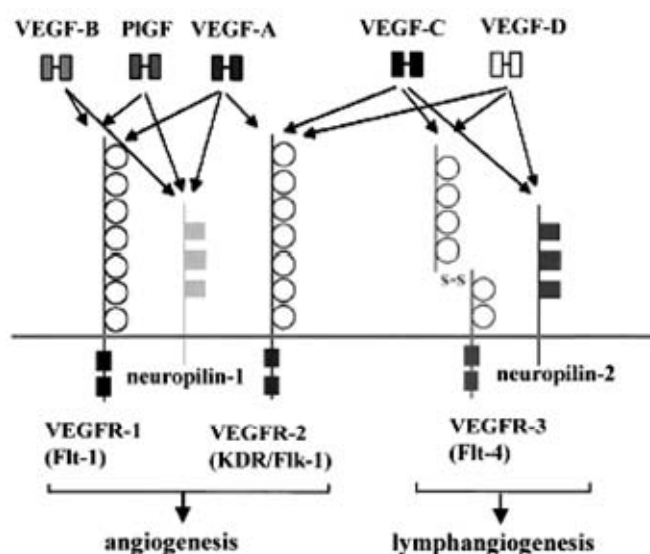
Το 1983 ο Senger και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν μια πρωτεΐνη που προκαλεί αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και την ονόμασαν Παράγοντα Αγγειακής Διαπερατότητας-Vascular Permeability factor (VPF) (Senger DR et al, 1983). Ο Ferrara έδειξε ότι ο VPF είναι ο ίδιος με τον VEGF (Leung DW et al, 1989). Επιπλέον η έκφραση του VEGF βρέθηκε να σχετίζεται με την έκταση της αγγείωσης εμβρύων μυών (Breier G et al, 1992) ενώ η απώλεια ενός αλληλίου του VEGF προκαλεί σημαντικά προβλήματα στην αγγειακή ανάπτυξη εμβρύων μυών (Veikolla T and Alitalo K, 1999). Από την μικρή αυτή ιστορική αναδρομή διαφαίνεται ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του VEGF και της αγγειογένεσης.

*Δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των πεπτιδίων VEGF.* Μέχρι σήμερα έχουν δειχτεί έξι μέλη της οικογένειας του VEGF: οι VEGF-A, VEGF-B (Olofsson B et al, 1996), VEGF-C, VEGF-D (Achen MG et al, 1998), VEGF-E/Orf virus VEGF (Meyer M et al, 1999) και ο PlGF (Veikolla et al, 1999). Κάθε ένας από αυτούς εμφανίζεται με διαφορετικές μοριακές παραλλαγές καθότι τα mRNA τους ωριμάζουν με εναλλακτικούς τρόπους, δίνοντας διαφορετικά μετάγραφα. Το κυριότερο μέλος της οικογένειας είναι ο VEGF-A. Πρόκειται για σειρά πεπτιδίων με μήκη 121, 145, 165, 183, 189, 206 με πιο συχνό τον VEGF<sub>165</sub>. Τα διαφορετικά μετάγραφα έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που καθορίζονται από την πρωτοταγή τους δομή και σαφώς ερμηνεύουν τη διαφορετική συμπεριφορά των πεπτιδίων. Τα μεγαλύτερα πεπτίδια (VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) έχουν στο καρβόξυ –τελικό άκρο τους θέση πρόσδεσης με ηπαρίνη που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο και ως εκ τούτου είναι αποκλειστικώς προσδεδεμένα σε αυτόν. Αντιθέτως τα μικρότερα πεπτίδια

(VEGF<sub>145</sub> και VEGF<sub>165</sub>) είναι περισσότερο ελεύθερα (αν και κλάσμα αυτών συνδέεται με την εξωκυττάρια ουσία) και είναι αυτά που μεταδίδουν το αγγειογενετικό μήνυμα (Poltorak Z et al, 1997). Ακόμη και τα μεγαλύτερα όμως πεπτιδία δύνανται να ελευθερωθούν από την εξωκυττάρια ουσία με πρωτεόλυση (Keyt BA et al, 1996), ελευθερώνοντας το αμινοτελικό άκρο τους. Κατ'αυτό τον τρόπο η αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας κατά την έναρξη της αγγειογένεσης ενισχύει το υπάρχον αγγειογενετικό μήνυμα. Η δραστηριότητα των πεπτιδίων που είναι μικρότερη του VEGF<sub>165</sub> είναι 50 έως 100 φορές μικρότερη και αποτελεί μέσο μικροποσοτικής ρύθμισης της αγγειογένεσης.

Βιοχημικά οι παράγοντες VEGF φέρουν στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους θέση πρόσδεσης με τους αντίστοιχους υποδοχείς, γεγονός που εξηγεί την ελαττωμένη δραστηριότητα των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πρωτεόλυση των μεγαλύτερων κλασμάτων. Επιπλέον ο VEGF είναι δραστικός κυρίως ως ομο-ή ετεροδιμερές και συνδέεται με τους υποδοχείς του με υδρόφοβους δεσμούς (Muller YA et al, 1997) .

*Δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων του VEGF.* Παρά την μεγάλη ποικιλότητα της οικογένειας του VEGF, οι υποδοχείς είναι σαφώς λιγότεροι γεγονός που από μόνο του οδήγησε στο συμπέρασμα ότι περισσότεροι του ενός πεπτιδίου VEGF αντιστοιχούν σε κάθε υποδοχέα. Η οικογένεια των VEGFR-1,2 και 3 είναι μια υποομάδα της οικογένειας των υποδοχέων PDGF και αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή που είναι ομόλογη με την υπεροικογένεια των



ανοσοσφαιρινών (εμπεριέχει 7 περιοχές που ομοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες-7Ig) , μια μεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή που δρα ως τυροσινική κινάση (Sawano A et al, 2001) .

**Εικόνα Α2:** Τα μόρια VEGF και οι υποδοχείς τους (Sato Y, 2003)

Στον άνθρωπο, οι υποδοχείς VEGFR 1 & 2 εντοπίζονται αποκλειστικά στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ ο VEGFR-3 εντοπίζεται στα λεμφαγγεία. Είναι χαρακτηριστικό ότι από τους δύο πρώτους υποδοχείς ο VEGFR-1 έχει σαφώς μεγαλύτερη συγγένεια για τον VEGF από ότι ο VEGFR-2 (Beck L, 1997). Παραδόξως όμως, ο δεύτερος είναι που ευθύνεται για την επίδραση του VEGF στον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό, την μεταναστευτική ικανότητα και την αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλίων (Waltenberger J et al, 1994). Η πρόσδεση των VEGF στους υποδοχείς επάγει τον διμερισμό τους καθώς επίσης την αυτό- και τρανσφωσφορυλίωση τους από την ενδοκυττάρια τυροσινική κινάση τους (Barleon B et al 1997).

Ενας υποδοχέας VEGF ο οποίος δεν ανήκει στην οικογένεια των προαναφερομένων είναι η νευροπιλίνη-1 (neuropilin-1). Πρόκειται για υποδοχέα του VEGF<sub>165</sub> με ξεχωριστό ρόλο στην αγγειογένεση (Soker S et al, 1998). Μύες που υπερεκφράζουν νευροπιλίνη-1 παρουσιάζουν σαφώς αυξημένο αγγειακό δίκτυο ενώ knock-out μύες οι οποίοι δεν εκφράζουν νευροπιλίνη-1 παρουσιάζουν ελλιπές αγγειακό δίκτυο (Kawasaki T et al, 1999).

Η πρόσδεση των διαφορετικών μορίων VEGF, σε σχέση με τους υποδοχείς, παρουσιάζεται σε σχετικό πίνακα.

*Οι αγγειογενετικές επιδράσεις του VEGF και η συσχέτιση τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς.*

Ιστορικά ο VEGF απομονώθηκε από καλλιεργητικό μέσο καρκινικών σειρών (Tumor-conditioned medium) ως η πρωτεΐνη που οφείλεται για την αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας των μικρών αγγείων σε μικρομαριακές ουσίες (Kohn S et al, 1992). Η επεξήγηση που δόθηκε σχετίστηκε με το γεγονός ότι ο VEGF αυξάνει την ενδοκυττάρια διαπερατότητα των ενδοθηλίων μέσω της αυξημένης κινητικότητας των κυστικών οργανιδίων που ευθύνονται για τη μεταφορά ουσιών, διαμέσου των ενδοθηλίων, από τον ενδαγγειακό στον εξωαγγειακό χώρο και αντιστρόφως (Senger DR et al, 1997). Επιπλέον όμως φαίνεται ότι υπάρχει και αύξηση της μεσοκυττάριας διαπερατότητας με την χαλάρωση των μεσοκυττάριας συνδέσεων λόγω αναδιάταξης του συστήματος κατενινών/καντερινών (Esser S et al, 1998). Η αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλίων ευνοεί την εξαγγείωση πρωτεϊνών από το πλάσμα, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό περιβάλλον στο διάμεσο χώρο προκειμένου να γίνει μετανάστευση ενδοθηλιακών και άλλων μεσεγγυματικών κυττάρων. Πέραν της διαπερατότητας,

ο VEGF επάγει την έκφραση των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen activators, uPA & tPA) του αναστολέα των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) και της κολλαγενάσης που συναντάται στον διάμεσο χώρο (Unemori EN et al, 1992). Είναι σαφές λοιπόν ότι με την αύξηση της διαπερατότητας και την ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων ο VEGF αναδιατάσσει την εξωκυττάρια ουσία με τρόπο που ευνοεί την αγγειογένεση.

Έχει δειχθεί επίσης ότι ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Connolly DT et al, 1989). Η επαγωγή του πολλαπλασιασμού είναι απολύτως ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα αφού αντίστοιχα πειράματα έδειξαν ότι ο VEGF δεν προκαλεί πολλαπλασιασμό σε κύτταρα επιθηλιακού τύπου, ινοβλάστες και άλλα κύτταρα διαφόρων ιστολογικών προελεύσεων. (Ferrara N, 1999). Ταυτόχρονα ο VEGF φαίνεται ότι προστατεύει και από την απόπτωση (Gerber HP et al, 1998) επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι ο VEGF λειτουργεί και ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Επιπροσθέτως ο VEGF επάγει την ενδοθηλιακή μετανάστευση προς τα σημεία που ο ίδιος παράγεται (Dimmeler S et al, 2000).

Οι παραπάνω δράσεις λαμβάνουν χώρα μέσω των υποδοχέων του VEGF. Η άμεση εμπλοκή των υποδοχέων FLT-1 και FLK-1 στην αγγειογένεση αποδείχτηκε *in vivo* με πειράματα αποσιώπησης των γονιδίων των δύο υποδοχέων. Πειραματόζωα που δεν εκφράζουν τον FLT-1 δημιουργούν πρώιμες αγγειακές δομές, δεν είναι σε θέση όμως να οργανώσουν ώριμα-λειτουργικά αγγεία (Fong GH et al, 1995) και ωθούνται σε ενδομήτριο θάνατο. Η διαγραφή όμως του τμήματος της τυροσινικής κινάσης από τον FLT-1 αφήνει ανεπηρέαστη την νεοαγγείωση και τα έμβρυα επιβιώνουν φυσιολογικά (Hiratsuka S et al 1998). Αντιθέτως πειραματόζωα που δεν εκφράζουν FLK-1 αδυνατούν να σχηματίσουν αγγειακά δίκτυα και συνεπώς δεν επιβιώνουν (Shalaby F et al 1995). Συνεπώς είναι φανερό ότι οι δύο κύριοι υποδοχείς του VEGF είναι υπεύθυνοι για διαφορετικές φάσεις ωρίμανσης του ενδοθηλίου, πιθανώς μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

*Η ρύθμιση της έκφρασης του VEGF και των υποδοχέων του.* Ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση του VEGF είναι η τοπική κατάσταση υποξίας στους ιστούς. Η χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου στους ιστούς πυροδοτεί την παραγωγή του «παράγοντος που επάγεται από την υποξία» (Hypoxia-inducible Factor –

HIF). Ειδικότερα ο HIF1α, προσδένεται σε cis στοιχεία του εκκινητή του γονιδίου του VEGF και αυξάνει την μεταγραφική του δραστηριότητα (Kimura H, Weisz A et al 2000). Η αύξηση αυτή εξασφαλίζει επαρκή αγγείωση και οξυγόνωση σε υποξικούς ιστούς, στοιχείο που παρατηρείται και στην αγγειογένεση της νεοπλασίας όπως θα περιγραφεί ειδικότερα παρακάτω. Η έκφραση των υποδοχέων του VEGF ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο. Το επίπεδο έκφρασης του FLT-1 αυξάνεται κατά την υποξία, πιθανώς μέσω του HIF1α. Ο FLK-1 υπερεκφράζεται: α) παρουσία του VEGF (Kremmer C, Breier G et al, 1997), πολλαπλασιάζοντας το αγγειογενετικό σήμα και β) μέσω του HIF2α (Elvert G, Lanz S et al, 1999). Πέραν των παραπάνω διάφοροι άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τον άξονα VEGF - FLT-1/FLK-1.

### **Ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (Platelet-derived growth factor – PDGF) και οι υποδοχείς του PDGFR-α και PDGFR-β.**

Αν και ιστορικά απομονώθηκε από τα αιμοπετάλια, ο PDGF έχει απομονωθεί πλέον και από άλλου είδους κύτταρα όπως ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα, μυοβλάστες, αστροκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (Heldin CH et al, 1999). Ο παράγοντας PDGF προκύπτει από την ομοδιμερή ένωση δύο αλυσίδων Α ή Β (οπότε προκύπτει ο PDGF-AA ή ο PDGF-BB) ή από την ετεροδιμερή ένωση των παραπάνω αλυσίδων (οπότε προκύπτει η μορφή του PDGF-AB). Τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν και τις δυο αλυσίδες (A&B) με αποτέλεσμα να εκκρίνονται όλες οι ισομορφές του PDGF, με διαφορετική αναλογία αναλόγως της ποσοτικής διαφοράς έκφρασης των δύο αλυσίδων. Προσφάτως ανακαλύφθηκαν και οι ισομορφές C (Li X et al, 2000) και D (Li H et al, 2003) χωρίς όμως να εντοπιστεί διαφορετική λειτουργία συγκριτικά με τις μορφές Α και Β. Παρόμοια είναι και η δομή των αντίστοιχων υποδοχέων. Κάθε υποδοχέας είναι το αποτέλεσμα ένωσης δύο υπομονάδων (Heldin CH et al, 1999). Με δεδομένη την έκφραση δύο διαφορετικών υπομονάδων που ονομάζονται α και β, οι πιθανοί τύποι υποδοχέα είναι αντιστοίχως τρεις (αα, ββ, αβ). Παραταύτα μόνο η α υπομονάδα δύναται να προσδεθεί και με τις δύο αλυσίδες του PDGF. Η β υπομονάδα των υποδοχέων προσδένεται μόνο με την Β αλυσίδα των PDGF ισομορφών. Η έκφραση των ισομορφών των υποδοχέων του PDGF διαφέρει μεταξύ των κυττάρων και των ιστών. Συνήθως κάθε κύτταρο εκφράζει μόνο μια

υπομονάδα και για αυτό παραδοσιακώς οι υποδοχείς PDGF είναι δύο και όχι τρεις δηλαδή ο PDGFR $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) και ο PDGFR $\beta$  ( $\beta\beta$ ).

Οι αγγειογενετικές επιδράσεις του PDGF και των υποδοχέων του. Οι πολλαπλές δράσεις του PDGF και των υποδοχέων του εξαρχής θεωρήθηκαν αγγειογενετικές. Τα ενδοθήλια των τριχοειδών αγγείων σε πολλούς ιστούς εκφράζουν PDGFR $\beta$  και διεγείρονται ως αποτέλεσμα της έκκρισης PDGF-BB. Η διέγερση αυτή δεν περιλαμβάνει μόνο τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Battergay EJ et al, 1994), αλλά και την οργάνωση τους σε αγγειογενετικές δομές όπως αγγειακά δίκτυα σε υποστρώματα διάμεσης ουσίας *in vitro* (Nicosia RF et al, 1994). Αν και έχει περιγραφεί η έκκριση PDGF-BB από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εντούτοις δεν αποδεικνύεται αυτοκρινής δράση του PDGF-BB μέσω των PDGFR $\beta$  διότι συνήθως υποδοχέας και συνδέτης δεν συνεκφράζονται. Ο PDGF επίσης ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών των αγγείων, καθώς επίσης των περικυττάρων, των οποίων επάγει και την οργάνωση (Benjamin L et al 1998).

Η σημασία των υποδοχέων του PDGF στην αγγειογένεση αποδείχτηκε με πειράματα αποσιώπησης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες των υποδοχέων. Στην περίπτωση της αποσιώπησης του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπομονάδα  $\beta$ , τα πειραματόζωα αναπτύσσονται κανονικά αλλά πεθαίνουν κατά την περιγεννητική περίοδο ή αμέσως μετά λόγω οιδημάτων και αιμορραγιών. Οι βιοψίες από διάφορα όργανα έδειξαν απώλεια των περικυττάρων σε αγγεία ζωτικής σημασίας όπως τα νεφρικά πειραματικά αγγεία (Soriano P, 1994). Η περαιτέρω μελέτη αυτών των πειραματοζώων έδειξε ότι η απώλεια των περικυττάρων προκάλεσε διαστολή των τριχοειδών αγγείων και αυξημένη διαρροή πλάσματος στον εξω-αγγειακό χώρο (Lindahl P et al, 1997). Επιπλέον δείχτηκε ότι η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των περικυττάρων στις θέσεις ενεργούς αγγειογένεσης είναι φαινόμενο που εξαρτάται από την ύπαρξη PDGF (Helstrom M et al, 1999). Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν την ικανότητα του PDGF και των υποδοχέων του να συνεισφέρουν στην σταθερότητα των νεο-αγγείων.

**Ο μετασχηματίζων παράγοντας αύξησης  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ -TGF $\beta$ ) και οι υποδοχείς του TGFRI, TGFRII και CD105/Endoglin.**

Η σχέση του TGFβ με την αγγειογένεση είναι αποδεδειγμένη και πολλαπλή. Άλλωστε τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και τα περικύτταρα των αγγείων εκφράζουν TGFβ και τους ανάλογους υποδοχείς (Miyazono K et al, 2003).

Οι δράσεις του TGFβ στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι κυρίως ανασταλτικές. Αρχικά παρουσιάστηκε ότι ο TGFβ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και ελαττώνει την μεταναστευτική ικανότητα των ενδοθηλίων (Myoken Y et al 1990). Φαίνεται όμως ότι αυτή η δράση του είναι δόσο-εξαρτώμενη. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<0,5ng/ml) ο TGFβ επάγει τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό (Merwin JR et al, 1991). Αντιθέτως σε μεγαλύτερες δόσεις παρατηρείται αναστολή του πολλαπλασιασμού. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε μελέτες που πραγματοποίησαν πειράματα δημιουργίας πρώιμων αγγείων σε πηκτή (gel) κολλαγόνου. Σε μικρές συγκεντρώσεις ο TGFβ ευόδωσε τη δημιουργία αγγείων. Σε μεγαλύτερες δόσεις (1-5 ng/ml) όμως παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της μετανάστευσης και του σχηματισμού αγγείων.

Η ανασταλτική δράση του TGFβ προκύπτει και μέσω άλλου μηχανισμού. Ο TGFβ αναστέλλει την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων με την επαγωγή αναστολέων όπως ο ιστικός αναστολέας της μεταλλοπρωτεϊνάσης (Lash GE et al, 2003), ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει προς αυτή την κατεύθυνση και την έκφραση του PAI και του uPA. Χωρίς πρωτεολυτική δραστηριότητα δεν είναι δυνατή η λύση της εξωκυττάριας ουσίας που απαιτείται για την έναρξη της αγγειογένεσης και ως εκ τούτου η διαδικασία σταματάει. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης η αναστολή του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού μέσω TGFβ κατά την επαφή των περικυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο TGFβ μαζί με τον PDGFβ σταθεροποιούν τις συνδέσεις των περικυττάρων, δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο στεγανά αγγεία.

Επιπροσθέτως η *in vivo* συμμετοχή του TGFβ στην επαγωγή της αγγειογένεσης, όπως αυτή περιγράφηκε να συμβαίνει *in vitro* σε χαμηλές χορηγούμενες δόσεις, αποδείχτηκε έμμεση. Ο TGFβ δρα χημειοτακτικά για κυτταρικά στοιχεία της φλεγμονής όπως είναι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά με τη σειρά τους εκκρίνουν τους αγγειογενετικούς παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κατά αυτόν τον τρόπο είναι σαφές ότι ο TGFβ δρα αγγειογενετικά μόνο παρουσία φλεγμονωδών στοιχείων.

*Οι υποδοχείς του TGFβ.* Η ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος του TGFβ γίνεται μέσω δύο διαφορετικών ειδών υποδοχέων: των ετερο-τετραμερών TGFRI/TGFRII και του μορίου CD105/Endoglin.

Το σύστημα των TGFRI/TGFRII είναι πλέον ευρέως γνωστό. (Miyazono K et al, 2003) Ο ενεργός TGFβ προσδένεται και στους δύο υποδοχείς (RI & RII) οι οποίοι συμπλησιάζουν (Hart PJ et al, 2002). Ο RII, καθώς είναι ενεργοποιημένος από τον συνδέτη του, φωσφορυλιώνει τον RI ο οποίος με τη σειρά του, ενεργοποιημένος πλέον, φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες R-smad ή αλλιώς smad-2 και smad-3, μεταδίδοντας το σήμα στον πυρήνα. Ο ενεργός TGFβ υποδοχέας είναι ένα ετερο-τετραμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες RI και δύο υπομονάδες RII. Στον ανθρώπινο οργανισμό έχει εντοπιστεί μόνο ένα είδος υπομονάδων RII. Αντιθέτως έχουν εντοπιστεί δύο διαφορετικές υπομονάδες RI που ονομάζονται ALK-5, που είναι και η συχνότερη, και ALK-1 που συναντάται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Oh SP et al, 2000). Η ALK-1 υπομονάδα ενεργοποιεί εναλλακτικά μονοπάτια σηματοδότησης και όχι το κλασσικό μονοπάτι που περιγράφηκε παραπάνω και σχετίζεται με αυξημένη μεταναστευτικότητα των ενδοθηλίων (Goumans M-J et al, 2002).

Ο υποδοχέας όμως που χαρακτηρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα -και από ότι θα παρουσιαστεί και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, χαρακτηρίζει κυρίως ενδοθήλια που συμμετέχουν ενεργά στην αγγειογενετική διαδικασία- είναι ο CD105/Endoglin.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του περιγράφονται εν συντομία: α) Πρόκειται για ένα μόριο 180 kDa το οποίο εμφανίζεται ως ομοδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη (Gougos A, Letarte M, 1988α). β) Η περαιτέρω ανάλυση του απέδειξε ότι πρόκειται κατ'ουσίαν για μια γλυκοπρωτεΐνη (Gougos A, Letarte M, 1988β). γ) Το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τον TGFβ<sub>1</sub> και TGFβ<sub>3</sub> (Cheifetz S et al, 1992). δ) Η παρουσία του CD105 στην κυτταρική μεμβράνη άλλοτε συνδυάζεται και άλλοτε όχι, τόσο με την παρουσία των κλασσικών RI και RII υποδοχέων όσο ταυτόχρονα και με την πρόσδεση με αυτούς (Guerrero-Esteo M et al, 2002). ε) Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι μόνο οι προσδεδεμένες μορφές του CD105 είναι ικανές να συνδεθούν με τον TGFβ (Barbara NP et al, 1999).

Οι μέχρι σήμερα μελέτες σχετικά με το μόριο CD105 το θεωρούσαν έναν αρνητικό ρυθμιστή του μηνύματος του TGFβ (Lastres P et al, 1996). Σε ό,τι



λοιπόν αφορούσε τα ενδοθήλια αναμένονταν μια θετική συσχέτιση του CD105 με την αγγειογένεση. Υπό αυτό το πρίσμα πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου του CD105 σε πειραματόζωα απέδειξαν ότι πρόκειται για ένα μόριο πολύ σημαντικό στην νεοαγγείωση, αφού τα πειραματόζωα που ήταν ομόζυγα αρνητικά (-/-) απεβίωσαν ενδομητρίως λόγω καρδιαγγειακών παθήσεων και αδυναμίας αγγείωσης του λεκιθικού σάκου (Bourdeau A et al, 2000 / Arthur HM et al, 2000 / Li DY et al, 1999). Επιπλέον το CD105 υπερεκφράζεται σε υποξία (Sanchez-Elsner T et al, 2002), γεγονός που σίγουρα το συσχετίζει με την αγγειογένεση που πυροδοτείται από αυτή την κατάσταση. Τέλος σχετικά *in vitro* πειράματα αναφέρουν μια ανταγωνιστική σχέση του CD105 με τους κλασσικούς υποδοχείς για την μετάδοση του σήματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Παρά αυτές τις υποθέσεις και τις μελέτες, η αλήθεια για το μόριο CD105 είναι ακόμη πολύπλοκη στην κατανόηση καθώς αρκετά σημεία της ενεργοποίησης του μονοπατιού που περιλαμβάνει τον TGFβ και το CD105 δεν έχουν ακόμη ανακαλυφθεί. Το μόνο σημείο που έχει αποσαφηνιστεί επαρκώς είναι ο μοριακός μηχανισμός αλληλεπίδρασης του CD105 με τους υποδοχείς RI και RII (Guerrero-Esteo M, 2002).

Ο υποδοχέας RII φαίνεται ότι δύναται να προσδεθεί με το CD105 ανεξαρτήτως της κατάστασης ενεργοποίησης του, και φωσφορυλιώνει σταθερά το CD105. Αυτή η φωσφορύλιωση οδηγεί τον ίδιο τον υποδοχέα σε χαμηλότερα επίπεδα αυτοφωσφορύλιωσης και συνεπώς σε χαμηλότερη ενεργότητα. Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για αυτό το γεγονός: 1) ανταγωνισμός της κινάσης του RII λόγω των θέσεων φωσφορύλιωσης του CD105 που δρουν ως νέο υπόστρωμα, 2) αποκλεισμός των σημείων αυτοφωσφορύλιωσης του RII λόγω άμεσης πρόσδεσης του CD105, 3) αλλαγή της στερεοδομής του RII και συνεπώς λειτουργική απενεργοποίηση της κινάσης του, και δ) στρατολόγηση φωσφατασών από το σύμπλοκο RII- CD105 που τελικά αποφωσφορυλιώνουν το RII. Όποια και να είναι η αιτία, θα περίμενε κανείς ότι το τελικό αποτέλεσμα είναι η ελαττωμένη ενεργότητα του RII. Το τελικό αποτέλεσμα διαφέρει γιατί το CD105 προκαλεί ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα στην υπομονάδα RI. Σε αυτή την περίπτωση το CD105 αυξάνει την αυτοφωσφορύλιωση του RI με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητά της. Η RI με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την Smad-2 όχι όμως και την Smad-3. Το μήνυμα που θα φτάσει στον πυρήνα είναι τελικά το σύμπλοκο Smad-2/Smad-4 το οποίο και θα αλληλεπιδράσει με τους τελικούς στόχους του

TGFβ μονοπατιού. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι και το σύμπλοκο RII/ CD105 ενεργοποιεί την υπομονάδα RI, συμβάλλοντας στην αυξημένη ενεργοποιημένη Smad-2.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ένας ρυθμιστικός-τροποποιητικός ρόλος του CD105 στη σηματοδότηση του TGFβ. Απαιτείται ακόμη μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για την πλήρη αποσαφήνιση του ρόλου του.

### **Ο παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor – FGF) και οι υποδοχείς του.**

Η οικογένεια των FGF ανήκει στην ομάδα των υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης και περιλαμβάνει δύο μέλη, τον όξινο FGF (aFGF) και το βασικό (bFGF). Πρόκειται για σχετικά μικρά μόρια (18 kDa και 25 kDa αντιστοίχως) τα οποία φαίνεται ότι εμπλέκονται ενεργά στην αγγειογένεση. Ειδικότερα ο aFGF είναι ο πρώτος βιολογικός παράγοντας που σχετίστηκε με την αγγειογένεση. Οι FGF ασκούν παρόμοιες δράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τους VEGF –και δρουν σε συνέργεια με αυτούς- αλλά δεν εμφανίζουν αποκλειστική δράση επί των ενδοθηλίων (Powers CJ et al, 2000). Έχει περιγραφεί ότι επάγουν τον πολλαπλασιασμό σχεδόν πολλών κυττάρων, κυρίως όμως όλων των κυττάρων που προέρχονται από το εμβρυϊκό μεσόδερμα και νευροεξώδερμα (Thomas KA, 1987). Έτσι συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, των μυοβλαστών, των οστεοβλαστών, των περικυττάρων κ.α.

Η συμμετοχή των FGF στην αγγειογένεση συνίσταται στις παρακάτω δράσεις: 1) επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλίων (Gospodarowicz D et al, 1989), 2) επάγει τη μετανάστευσή τους προς τα σημεία έκκρισης του – χημειοτακτική δράση (Terranova VP et al, 1985), 3) Επάγει την παραγωγή ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και κολλαγενάσης, συμμετέχοντας στην αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας και 4) επάγει τη δημιουργία αγγειακών δομών σε τρισδιάστατο περιβάλλον κολλαγόνου (Montesano R et al, 1986). Η σημασία αυτών των παρατηρήσεων όμως μετριάστηκε από τα πειράματα *in vivo* αποσιώπησης των γονιδίων των aFGF και bFGF, τα οποία έδειξαν ότι η αποσιώπηση των γονιδίων αυτών άφησε ανεπηρέαστα τα πειραματόζωα σε ότι αφορά την ενδομήτρια, αλλά και την μετέπειτα επιβίωση τους (Miller DL et al, 2000). Όλες οι αγγειακές δομές σχηματίστηκαν κανονικά, χωρίς κανένα δομικό

πρόβλημα, γεγονός που απέδειξε ότι οι FGF δεν είναι πρωταρχικής σημασίας στην αγγειογένεση. Αντιθέτως φαίνεται να είναι σημαντικοί σε διαδικασίες ιστικής επιδιόρθωσης μετά από κυτταρική καταστροφή. Αποδείχτηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των FGF παραμένει ενδοκυττάριο ή συνδεδεμένο με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (Healy AM et al, 1992), λόγω συγγένειας τους με την ηπαράνη. Είναι εύλογο ότι η απελευθέρωση FGF προϋποθέτει είτε κυτταρικό θάνατο και λύση του κυττάρου, είτε καταστροφή της εξωκυττάριας ουσίας. Και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν τόσο στη φλεγμονή (αγγειογένεση φλεγμονής) όσο και στην νεοπλασματική αγγειογένεση κατά τη διήθηση της εξωκυττάριας ουσίας (νεοπλασματική αγγειογένεση).

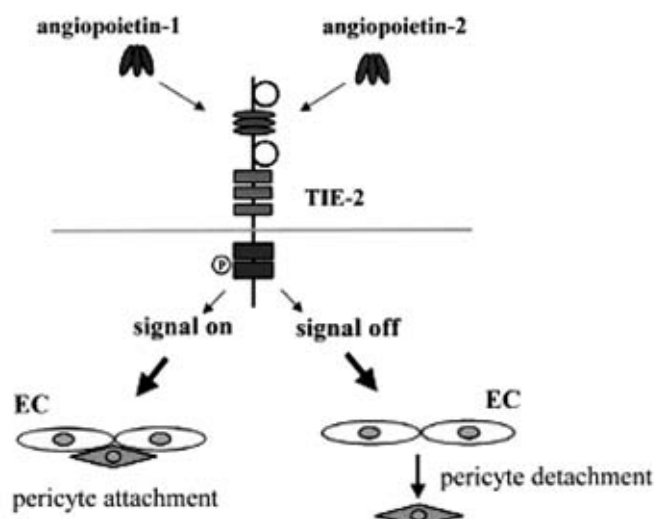
Οι υποδοχείς που είναι γνωστοί μέχρι σήμερα είναι τέσσερις (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4). Από αυτούς οι τρεις πρώτοι έχουν μελετηθεί επαρκώς. Ο FGFR-4 έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα και η γνώση περί αυτόν είναι ελλιπής.

### **Το σύστημα Αγγειοποιητίνης (Ang-1, Ang-2) και των υποδοχέων της (Tie-1, Tie-2).**

Το σύστημα της Αγγειοποιητίνης και των υποδοχέων της δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Περιλαμβάνει δύο συνδέτες (αγγειοποιητίνη-1 και αγγειοποιητίνη-2) και δύο υποδοχείς (Tie-1 και Tie-2). Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί ότι και οι δύο συνδέτες σχετίζονται μόνο με τον υποδοχέα Tie-2, χωρίς να αναφέρεται γνωστός συνδέτης για τον υποδοχέα Tie-1.

Η σχέση των αγγειοποιητινών με την αγγειογένεση είναι διαφορετική από τα προαναφερθέντα μόρια. Η αγγειοποιητίνη-1 δεν προκαλεί *in vitro* πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Davis S et al, 1996) αλλά ευοδώνει την μετανάστευση τους και τη δημιουργία εστιών (sprouts) αγγειογένεσης (Koblizek TI et al, 1998). Η *in vivo* γονιδιακή αποσιώπηση των μορίων της Ang-1 ή του Tie-2 οδηγεί τα πειραματόζωα σε ενδομήτριο θάνατο λόγω σοβαρών καρδιαγγειακών ανωμαλιών (Suri C et al, 1996). Χαρακτηριστικά σχηματίζονται οι πρώιμες αγγειακές δομές, πλην όμως ο σχηματισμός αυτός δεν ακολουθείται από οργάνωση μικρότερων αγγείων. Επιπλέον τα υπάρχοντα αγγεία εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα ενώ ταυτόχρονα στερούνται περικυττάρων. Αντιθέτως η *in vivo* γονιδιακή υπερέκφραση των ανωτέρω γονιδίων σε τρανσγενωμικά ποντίκια οδήγησε σε πυκνά και πολυδιακλαδιζόμενα αγγειακά

δίκτυα τα οποία ήταν ιδιαίτερος στεγανά και ανθεκτικά στην αύξηση της διαπερατότητας που προκαλεί ο VEGF (Suri C et al, 1998 / Thurston G et al, 1999). Φάνηκε λοιπόν ότι ο άξονας Ang-1/Tie-2 ενισχύει και σταθεροποιεί τις αγγειακές δομές και ευθύνεται για τη διαφοροποίηση των αγγείων σε μεγάλα, μικρά και τριχοειδή.



**Εικόνα A3:** Η αγγειοποιητίνη-1 και η αγγειοποιητίνη-2 επιδρούν επί του υποδοχέα Tie-2 με αντίθετα αποτελέσματα. (Sato Y, 2003)

Η Ang-2 από την άλλη φαίνεται ότι ανταγωνίζεται την Ang-1 στη σύνδεση της με τον υποδοχέα Tie-2. Έχει αποδειχτεί ότι η Ang-2 αναστέλλει την αυτοφωσφορύλιωση του Tie-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα γεγονός όμως που δεν συμβαίνει σε κύτταρα άλλων ιστών όπου συναγωνίζεται την Ang-1. Η Ang-2 σχετίζεται με τη χαλάρωση των μεσοκυττάρων συνδέσεων των περικυττάρων και των ενδοθηλίων και θεωρείται ότι, κατά αυτόν τον τρόπο, συμβάλλει στην έναρξη της αγγειογένεσης. Υπερέκφραση της Ang-2 όμως σε τρανσγενωμικά ποντίκια οδηγεί σε ενδομήτριο θάνατο λόγω βλαβών παρομοίων σε φύση με εκείνες της αποσιώπησης των Ang-1 και Tie-2, βαρύτερων όμως σε σοβαρότητα (Maisonpierre PC et al, 1997). Η Ang-2 λοιπόν δρα ως αναστολέας-ρυθμιστής του άξονα Ang-1/Tie-2 παίζοντας διπλό ρόλο. Παρουσία VEGF χαλαρώνει τους αγγειακούς μεσοκυττάρους δεσμούς δίνοντας ευκαιρία για κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Απουσία VEGF ωθεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε απόπτωση.

Συμπερασματικά όλα τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ ενός σημαντικού ρόλου των αγγειοποιητινών στην διαφοροποίηση και σταθεροποίηση των αγγείων.

### **Η Αγγειακή-Ενδοθηλιακή Καντερίνη (Vascular-Endothelial Cadherin – VE-cadherin) και η σημασία της στην αγγειογένεση**

Οι καντερίνες είναι μια μεγάλη οικογένεια μεμβρανικών μορίων που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και συμμετέχουν στη σύνδεση και επικοινωνία μεταξύ ομοίων κυττάρων (Gumbiner BM, 1996). Το ενδοκυττάριο τμήμα των καντερινών σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό μέσω των β-κατενίνης, εξασφαλίζοντας έτσι σταθερότερη μεσοκυττάρια σύνδεση. Επιπλέον οι καντερίνες συμμετέχουν σε διαμεταγωγή σημάτων αφού μετά από φωσφορυλίωση οι β-κατενίνη ελευθερώνεται και εισάγεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Behrens J et al, 1996).

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει περιγραφεί η παρουσία δύο καντερινών της VE-cadherin και της N-cadherin (Blaschuk OW et al, 2000). Η πρώτη εκφράζεται αποκλειστικά από τα ενδοθήλια και είναι το μόριο που αποκλειστικά συμμετέχει στη σύνδεση μεταξύ των ενδοθηλίων. Η δεύτερη αν και ανευρίσκεται και σε άλλους ιστούς δε συμμετέχει στην διενδοθηλιακή σύνδεση και επικοινωνία.

Η σχέση της VE-cadherin με την αγγειογένεση είναι ισχυρή. Αρχικά η επίδραση του VEGF στην αύξηση της διαπερατότητας οφείλεται στην φωσφορυλίωση και αποσύνδεση της VE-cadherin (Esser S et al, 1998 / Kevil CG et al, 1998). Αυτή η παρατήρηση έδωσε στην VE-cadherin πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση της μεσοκυττάριας ενδοθηλιακής διαπερατότητας. Επιπλέον η VE-cadherin ευθύνεται για την αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλείται από την κυτταρική επαφή (contact inhibition) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μονόστιβου ενδοθηλιακού στρώματος το οποίο είναι αρκούντως στεγανό και ικανό να επενδύσει την ενδοαυλική επιφάνεια των αγγείων (Caveda L et al, 1996). Η επιβεβαίωση της σημασίας της VE-cadherin στη σταθερότητα των ενδοθηλιακών δομών αποδείχτηκε με *in vivo* πειράματα αποσιώπησης του εν λόγω γονιδίου (Carmeliet P et al, 1999). Τα πειραματόζωα που δεν εξέφραζαν VE-cadherin παρουσίασαν σοβαρές αγγειακές ανωμαλίες. Αν και οι αγγειοβλάστες διαφοροποιήθηκαν σε ενδοθηλιακά κύτταρα και δημιουργήθηκε το αρχέγονο αγγειακό πλέγμα, εντούτοις δεν ήταν δυνατός ο περαιτέρω σχηματισμός αγγείων.

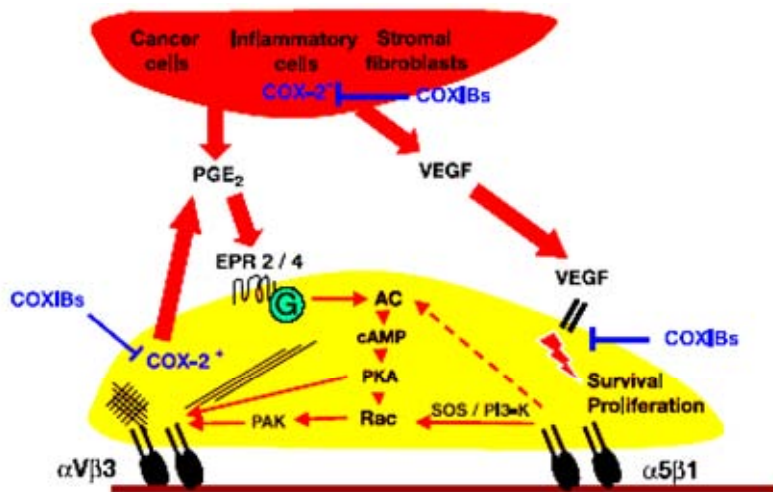
Η δημιουργία διακλαδώσεων και τριχοειδών ήταν σαφώς ελαττωμένη σε έκταση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προοδευτικά αποσυνδέονταν μεταξύ τους, και εν τέλει οι αγγειακές δομές υποχωρούσαν και εξαφανίζονταν. Τέλος η VE-cadherin παίζει σημαντικό ρόλο ως αντι-αποπτωτικός μεσάζοντας αφού ευοδώνει το αντι-αποπτωτικό μήνυμα του VEGF στον πυρήνα.

Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι ακόμη και αν η VE-cadherin δε συμμετέχει στον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό ή τη μετανάστευση, εντούτοις είναι καθοριστικής σημασίας στην οργάνωση ώριμων αγγειακών δομών.

### **Η κυκλοξυγενάση-2 (Cyclooxygenase-2 – Cox-2) και η συσχέτιση της με την αγγειογένεση.**

Η παρατήρηση ότι η κυκλοξυγενάση-2 σχετίζεται με την αγγειογένεση προέκυψε από αναδρομικές μελέτες που παρατήρησαν χαμηλότερη επίπτωση καρκινογένεσης στον πληθυσμό που χρησιμοποιεί εντατικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Ruegg C et al, 2004). Με δεδομένη την εμπλοκή των προσταγλανδινών θεωρήθηκαν ως υπεύθυνα καρκινογένεσης τα μόρια της κυκλοξυγενάσης (Williams CS et al, 1999). Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί και οι τρεις διαφορετικές μορφές κυκλοξυγενάσης με πιο πιθανή να συμμετέχει τόσο σε ογκογένεση όσο και σε αγγειογένεση την κυκλοξυγενάση-2.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η κυκλοξυγενάση-2 εμπλέκεται στην αγγειογένεση είναι διπλός. Καταρχήν η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> που είναι και το προϊόν της Cox-2 επιδρά στην παραγωγή VEGF από τα κύτταρα (κύτταρα της φλεγμονής, νεοπλασία) που πυροδοτούν την αγγειογένεση. Σε πειράματα *in vivo* γονιδιακής αποσιώπησης της Cox-2 η παραγωγή VEGF ελαττώνεται σημαντικά (Williams CS et al, 2000). Το ίδιο παρατηρείται και σε περίπτωση χορήγησης αναστολέων της Cox-2 όπως είναι η σελεκοξίμη (Masferrer JL et al, 2000). Στο ίδιο το ενδοθηλιακό κύτταρο, αναστέλλοντας την Cox-2, παρατηρήθηκε μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα στην εξωκυττάρια ουσία (Dormond O et al, 2001). Αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται μικρότερος του επιθυμητού αριθμός αγγείων και η περιοχή-αγγειογενετικός στόχος να υποξαιμεί. Εξωγενής χορήγηση προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> αποκατέστησε την αγγειογένεση σε επίπεδα συγκρίσιμα με το φυσιολογικό (Dormond O et al, 2002).



**Εικόνα Α4:**

Μηχανισμός της επίδρασης της Cox-2 και των προσταγλανδινών στην αγγειογένεση- Ruegg 2004 (βλ. Κείμενο)

Ο μοριακός μηχανισμός περιλαμβάνει ένα μονοπάτι ενεργοποίησης των υποδοχέων προστάνης-E οι οποίοι επάγουν την παραγωγή cAMP. Το τελευταίο ενεργοποιεί τελικά την κινάση Rac η οποία ως μέλος του κυτταροσκελετού απαιτείται για την αύξηση της ενδοθηλιακής μεταναστευτικότητας. Επιπλέον η Cox-2 μέσω της παραγωγής PGE<sub>2</sub> προκαλεί αυξημένη ενδοθηλιακή προσκόλληση στην ιντεγκρίνη αVβ<sub>3</sub> η οποία ευδοτώνει με τη σειρά της την αγγειακή μεταναστευτικότητα (Hynes RO, 2002). Η χορήγηση αναστολέα της Cox-2 αποδείχτηκε ότι αναστέλλει τα δύο περιγραφόμενα μονοπάτια.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ένας σημαντικός ρόλος της Cox-2 που αφορά συσχέτιση παθολογικών καταστάσεων, όπως η φλεγμονή και η νεοπλασία, με την αγγειογένεση.

***Άλλοι παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση.***

*Το σύστημα EphB<sub>4</sub>/EphrinB<sub>2</sub>.* Ευθύνεται για τη διαφοροποίηση των μικρών αγγείων σε αρτηρίδια και φλεβίδια. Σχετίζεται με την αγγειογένεση μέσω TNFα (Cheng N et al, 2002).

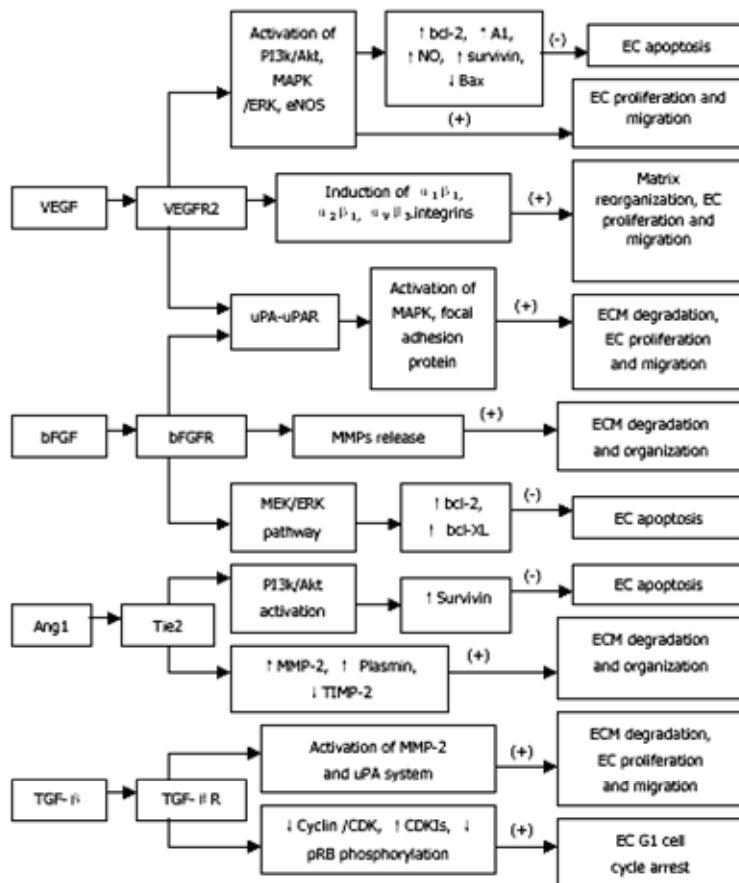
*Αιματική ροή και επιφανειακή τάση.* Η αύξηση της επιφανειακής τάσης των αγγείων, κατά την αιματική ροή, προκαλεί έκκριση bFGF και βFGF, ωθώντας σε αγγειογένεση. Φαίνεται ότι το αγγειακό δίκτυο κατά την αυξημένη μηχανική του καταπόνηση αντιρροπεί την επιφανειακή τάση με αύξηση της ενδοθηλιακής επιφάνειας (Asano Y et al, 2005).

Ο *TNF-α*. Εκκρίνεται από μακροφάγα και προκαλεί in vivo οργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε αγγεία, ενώ αναστέλλει τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό (Naldini A, Carraro F, 2005).

Οι παράγοντες *G-CSF* και *GM-CSF*. Επάγουν τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό (Bussolino F et al, 1993).

*Αγγειογενίνη*. Αναφέρεται ότι προσδένεται στην εξωκυττάρια ουσία και ευοδώνει την μεταναστευση των ενδοθηλίων (Distler Jh et al, 2003).

*Αγγειοτροπίνη*. Επάγει την ενδοθηλιακή μετανάστευση και το σχηματισμό αγγείων, όχι όμως και τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό (Hockel M et al, 1988).

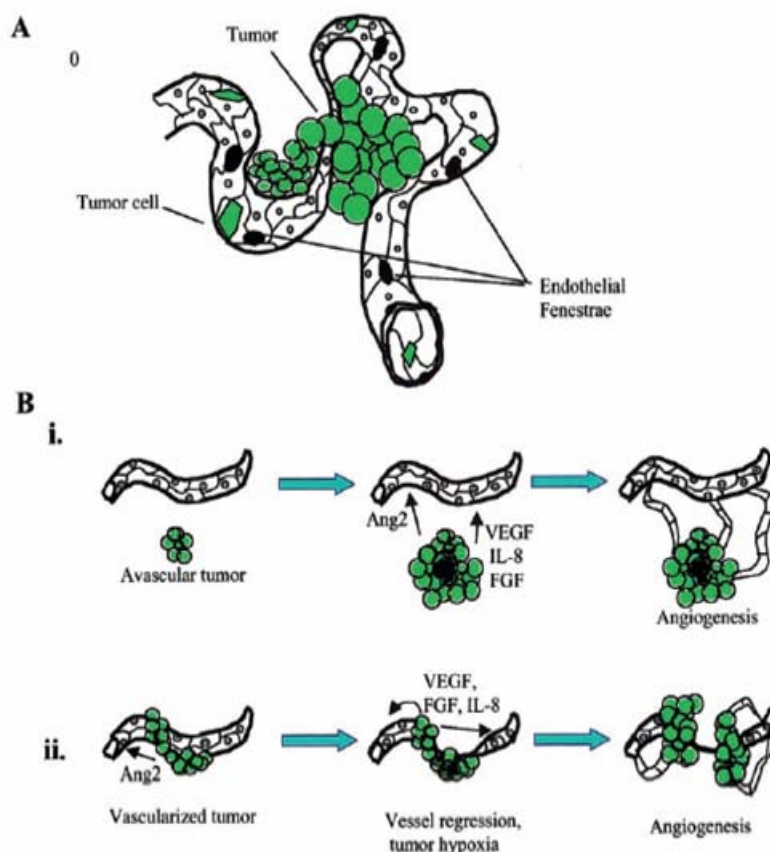


**Εικόνα Α5:**  
Ανακεφαλαίωση των αγγειογενετικών παραγόντων και των δράσεών τους.



## B. Η αγγειογένεση της νεοπλασίας (Tumor Angiogenesis)

Η αγγειογένεση της νεοπλασίας είναι μια ξεχωριστή κατηγορία αγγειογένεσης με χαρακτηριστικές διαφορές από τη φυσιολογική αγγειογένεση. Είναι γνωστό ότι ένας ανάγγειος όγκος δύναται να αναπτυχθεί ως τη διάμετρο των 2 mm. Πέραν αυτού του μεγέθους, η διαδικασία της διάχυσης δεν είναι ικανή να τον τροφοδοτήσει με το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται προκειμένου να διατηρήσει το ρυθμό ανάπτυξής του (Folkman J, 2002). Χωρίς αγγειακά στοιχεία ο όγκος αυτός ωθείται σε απόπτωση που ξεκινάει από το υποξικότερο σημείο, το κέντρο του, και επεκτείνεται στην περιφέρεια. Τελικό αποτέλεσμα είναι η κεντρική νέκρωση του όγκου και η ανάπτυξη του μόνο κατά το μέτωπο διήθησης, ωστόσο τελικά νεκρωθεί τμηματικά και αυτό, λόγω εκτεταμένης επιφάνειας που είναι αδύνατο να συντηρηθεί (Carmeliet P, Jain RK, 2000).



**Εικόνα B1:** Α. Ο όγκος αναπτύσσεται περιαγγειακά και κύτταρά του εισέρχονται στην κυκλοφορία από τα κενά που αφήνουν τα τριχοειδή. Β Μοντέλα αγγειογένεσης. Ι Ανάγγειος όγκος επάγει αγγειογένεση για να διατηρηθεί. ΙΙ. Όγκος που αναπτύσσεται περιαγγειακά προκαλεί απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και δημιουργεί νέο δίκτυο τριχοειδών αγγείων (Pappeti M, 2002)

Είναι λοιπόν εύλογη η ανάγκη του όγκου για μαζικότερη προσφορά θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου, που πρακτικά μόνο αγγειακοί σχηματισμοί

προσφέρουν. Με αυτό το στόχο κάθε όγκος δημιουργεί στην περιφέρεια του ένα ιδιαίτερο νεοπλασματικό περιβάλλον που ως στόχο έχει την πυροδότηση της αγγειογένεσης (Fidler IJ, 2000). Το περιβάλλον αυτό περιλαμβάνει τους περισσότερους παράγοντες που περιγράφηκαν παραπάνω, και πάντα τους VEGF, PDGF, FGF, ANG-1&2. Πολλοί όγκοι επίσης εκκρίνουν TGFβ και PGE<sub>2</sub>. Ως αποτέλεσμα ενδοθηλιακά κύτταρα από γειτονικά αγγεία καθώς επίσης ενδοθηλιακά κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα οργανώνουν πρώιμο αγγειακό πλέγμα το οποίο αρδευόμενο παρουσιάζει την τελική μορφή των νεόπλαστων τριχοειδών (Asahara T et al, 1999 / Mancuso P et al, 2001). Ειδικότερα σημεία της αγγειογένεσης της νεοπλασίας αναλύονται παρακάτω.

### **Μορφολογία των νεόπλαστων τριχοειδών.**

Τα τριχοειδή που αναπτύσσονται εντός ή πέριξ του όγκου διαφέρουν σημαντικά από τα κλασσικά τριχοειδή (Verheul HMW et al, 2004). Πρόκειται για αγγεία των οποίων τα ενδοθήλια είναι σαφώς χαλαρότερα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Πολλές φορές οι αγγειακές δομές στερούνται περικυττάρων ή εμφανίζουν περικύτταρα με δομικές ανωμαλίες (Morikawa S et al, 2002). Επιπλέον το τοίχωμα των αγγείων πέρα από τα ενδοθήλια, δύναται να επενδύεται από τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα καθώς η ανώμαλη αγγειογένεση δημιουργεί σωληνώδεις δομές που εμφανίζουν κενά τα οποία προλαμβάνει να καλύψει ο όγκος (Chang YS et al, 2000). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεόπλαστων τριχοειδών εμφανίζουν αυξημένο κυτταρόπλασμα και αντιστοίχως αυξημένο αριθμό οργανιδίων ενώ παράλληλα ελαττώνονται οι μεσοκυττάρειες συνδέσεις μεταξύ τους. Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν υπέρ της κυτταρικής ενεργοποίησης των ενδοθηλίων. Η κυτταρική ενεργοποίηση διαφαίνεται και από την αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Σε πειράματα αυτοραδιογραφίας, περίπου το 10% των ενδοθηλιακών κυττάρων ενός νεοπλάσματος σημάνθηκε με θυμιδίνη σεσημασμένη με τρίτιο, εν αντιθέσει με το 0,2% του αντίστοιχου ενδοθηλιακού πληθυσμού φυσιολογικού ιστού (Verheul HMW et al, 2004).

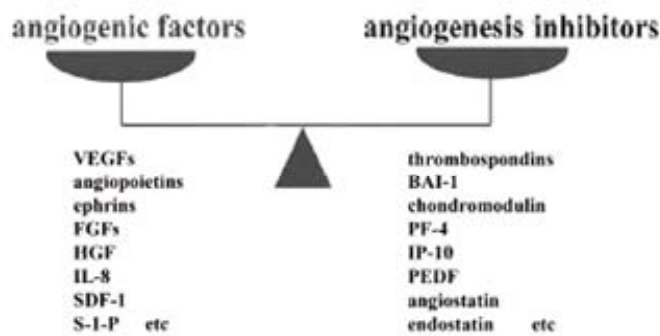
### **Η σχέση της αγγειογένεσης με την καρκινογένεση.**

Πρώτος ο Folkman ανέφερε ότι νεόπλασμα δύναται να επάγει αγγειογένεση εμφυτεύοντας *in vivo* νεοπλασματικό τεμαχίδιο ιστού σε κερατοειδή κουνελιού (Gimbone MA et al, 1972). Ο νεοπλασματικός ιστός αυξήθηκε σε μέγεθος μόνο

όταν τροφοδοτήθηκε από ένα ικανό αγγειακό δίκτυο, το οποίο δημιουργήθηκε εκ νέου στον ανάγγειο κερατοειδή. Οποιαδήποτε παρέμβαση εναντίον της αγγειογένεσης, είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία του όγκου να αυξηθεί πέραν των 0,4 mm. Επιπλέον μη νεοπλασματικός ιστός, εμφυτευμένος σε κερατοειδή ιδίου ζώου, δεν παρουσίαζε αγγειογενετική επιρροή στα γειτνιάζοντα αγγεία και ως εκ τούτου παρέμεινε στο αρχικό του μέγεθος.

**Ο αγγειογενετικός διακόπτης (angiogenic switch).** Το βασικό ερώτημα που προέκυψε μέσα από το πρίσμα της αγγειογένεσης αφορούσε τη διαδικασία και τις συνθήκες που απαιτούνται προκειμένου να πυροδοτηθεί η αγγειογένεση. Αν και πολλά βιοχημικά μονοπάτια έχουν περιγραφεί σχετικά με τους παράγοντες που παρεμβαίνουν στην αγγειογένεση, εντούτοις παραμένει αναπάντητο το ερώτημα πότε, πώς και γιατί ένας «ανενεργός» -σε ρυθμό πολλαπλασιασμού- όγκος αποκτά αγγειογενετική δραστηριότητα (Hanahan D et al, 2000).

Το ερώτημα αυτό προσεγγίστηκε θεωρητικά από τους Hanahan και Folkman το 1996, οι οποίοι μίλησαν πρώτοι φορά για τον αγγειογενετικό διακόπτη τον οποίο περιέγραψαν ως το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των επαγωγέων και των αναστολέων της αγγειογένεσης (Hanahan D et al, 1996).



**Εικόνα B2:** Ο αγγειογενετικός διακόπτης είναι μια διαρκής ισορροπία μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης (Sato Y, 2003)

Το σύνολο αυτών των παραγόντων φαίνεται ότι δεν περιλαμβάνει μόνο τα σχετικά γονίδια και τους γνωστούς αυξητικούς παράγοντες ή τα ανασταλτικά μόρια (τα οποία θα περιγραφούν παρακάτω), αλλά λαμβάνει υπόψιν και την περιβαλλοντική επίδραση (Hanahan D et al, 2000). Τα πειράματα που ανέδειξαν τη σημασία αντίληψης του τρόπου λειτουργίας του αγγειογενετικού διακόπτη, διενεργήθηκαν *in vivo*. Σε μοντέλο παγκρεατικής καρκινογένεσης σε ποντίκια, μόνο το 50% των νησιδίων παρουσίασαν υπερπλασία και μόνο 10% των υπερπλαστικών νησιδίων εμφάνισαν αγγειογενετική δραστηριότητα και τελικά αναπτύχθηκαν σε νεόπλασμα (Folkman J et al, 1989). Σε μια δεύτερη μελέτη αναφέρεται ότι αρκετοί

εμφυτευμένοι σε ποντίκια όγκοι για άγνωστο λόγο δεν αυξήθηκαν ως αναμένονταν. Το φαινόμενο αυτό παρακάμφθηκε με την διαμόλυνση των κυττάρων με το γονίδιο του VEGF, οπότε και οι όγκοι αναπτύχθηκαν κανονικά (Udagawa T et al, 2002).

Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα:

Σε έναν αδρανή όγκο ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αντirroπείται από το ρυθμό της απόπτωσης των κυττάρων. Ο αγγειογενετικός διακόπτης όταν ενεργοποιηθεί μετατοπίζει την ισορροπία αυτή υπέρ του πολλαπλασιασμού με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση των όγκων (Hanahan D et al, 2000 / Holgren L et al, 1995).

Βασικό ρόλο στη λειτουργία του αγγειογενετικού διακόπτη φαίνεται να παίζει μια ομάδα πρωτεϊνών που καλούνται αναστολείς διαφοροποίησης (Inhibitors of differentiation-Id). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της λανθάνουσας περιόδου ( $G_0$ ), της διαφοροποίησης και της νεοπλασματικής εξαλλαγής, κυρίως μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές θέσεις στο DNA (Norton JD, 2000). Ενώ ποντίκια που είναι ομόζυγα αρνητικά για τα για τις Id1 και Id3 δεν είναι βιώσιμα, έχει παρατηρηθεί ότι αποκατάσταση του ενός αλληλίου για κάθε γονίδιο δημιουργεί ποντίκια που ανθίστανται στην αύξηση και διασπορά των όγκων μέσω ελαττωμένης αγγειογένεσης (Lyden D et al, 1999). Αποκατάσταση και του δεύτερου αλληλίου επαναφέρει τα πειραματόζωα στην αρχική –ευοδωτική για την ανάπτυξη νεοπλασμάτων- κατάσταση (Lyden D et al, 2001). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η Id1 ελαττώνει την έκφραση της θρομβοσπονδίνης, η οποία δρα ως αναστολέας της συλλογής κυκλοφορούντων ενδοθηλίων (Volpert OV et al, 2002).

Συμπερασματικά, ο αγγειογενετικός διακόπτης παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασμάτων. Χωρίς την ενεργοποίησή του είναι αδύνατη η τοπική νεοπλασματική αύξηση και διήθηση, και κυρίως η διασπορά και η ανάπτυξη μεταστάσεων.

**Συσχέτιση διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων με την νεοπλασματική αγγειογένεση.**

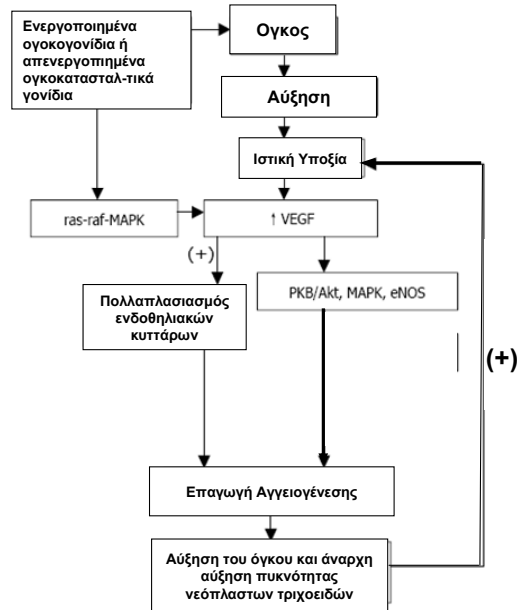
### ***O VEGF και οι υποδοχείς του.***

Ο VEGF συναντάται συχνότατα σε νεοπλάσματα. Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί ότι VEGF παράγουν καρκινώματα του γαστρεντερικού σωλήνα, του πνεύμονα, του γυναικείου και ανδρικού γενετικού συστήματος, του μαστού, του ουροποιητικού συστήματος. Εκτός των καρκινωμάτων εκφράζεται και από όγκους του νευρικού

συστήματος, από μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα όπως είναι τα αιμαγγειοσαρκώματα και από

νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος (Ferrara N, 1999). Επιπλέον, πέραν των ίδιων των νεοπλασματικών κυττάρων, VEGF παράγουν, υπό την επίδραση του πρωτογενούς όγκου, και στρωματικά στοιχεία όπως είναι οι ινοβλάστες, πολλαπλασιάζοντας έτσι το αγγειογενετικό μήνυμα (Fukumura D, Xavier R, 1998).

Η απόδειξη της σημασίας του άξονα VEGF/VEGF-υποδοχέων, αποδείχτηκε από πειράματα αναστολής έκφρασης ή παρεμπόδισης της λειτουργίας του. Έτσι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αντισώματος εναντίον του VEGF σε μοντέλα ενδοπεριτονεϊκής καρκινογένεσης γλοιοβλαστώματος, ελάττωσε την μικροαγγειακή πυκνότητα και ανέστειλε την νεοπλασματική ανάπτυξη (Kim KJ et al, 1993). Επιπλέον η μοριακή αποσιώπηση του VEGF σε πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (Stem cells) ανέστειλε την ικανότητα τους να δημιουργούν τερατοκαρκινώματα σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν με την αναστολή του ενδοκυττάρου μηνύματος του VEGF κατά την ενεργοποίηση των VEGF υποδοχέων. Η χρήση ρετροϊών για τη δημιουργία επικρατούσας αρνητικής μετάλλαξης στον FLK-1 έδειξε δραστική μείωση της αγγειογένεσης καθώς και της νεοπλασματικής αύξησης σε διάφορους όγκους που αναπτύχθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (Millauer B et al, 1996).



**Εικόνα Β3:** Σχηματική παράσταση της σχέσης VEGF – υποξίας – αγγειογένεσης στις νεοπλασίες (Gupta MK et al, 2003)

Παραδόξως δε, η παρέμβαση αυτή επηρέασε μόνο τον όγκο και όχι τον ξενιστή του.

Η ρύθμιση του VEGF σχετίζεται κυρίως με την ύπαρξη υποξίας στην περιοχή ανάπτυξης. Η υποξία είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης μεταβολικής και πολλαπλασιαστικής ικανότητας του όγκου. Αποτέλεσμά της είναι η δημιουργία νεκρωτικών περιοχών κυρίως στο κέντρο του νεοπλασματος. Με μηχανισμό παρόμοιο του φυσιολογικού, τα νεοπλασματικά κύτταρα που βρίσκονται σε φάση υποξίας, σταθεροποιούν τον HIF1a, ο οποίος προσδεδεμένος στον HIF1b δημιουργεί σύμπλοκο που θα ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του VEGF (Huang Z, Bao SD, 2004). Ο VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των υποδοχέων του τελικά δρα τόσο ως αντιαποπτωτικός όσο και ως προ-αγγειογενετικός παράγοντας.

#### ***Ο FGF και οι υποδοχείς του.***

Η σημασία του άξονα FGF και των υποδοχέων του στην νεοπλασματική αγγειογένεση διαφαίνεται από πειράματα που παρεμβαίνουν στη σηματοδότηση. Τμήματα διαλυτών υποδοχέων, τα οποία ανταγωνίζονται τους FGF, αναστέλλουν την αύξηση όγκων που προκλήθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, μέσω ελάττωσης της μικροαγγειακής πυκνότητας. Ομοίως ενδοθηλιακά κύτταρα που είναι τροποποιημένα για να εκκρίνουν διαλυτούς FGF υποδοχείς δεν ανταποκρίνονται στην επίδραση του VEGF που εκκρίνεται από όγκους (Compagni A et al, 2000).

Έχει επίσης αναφερθεί συνέργεια μεταξύ VEGF και FGF στην αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των ενδοθηλίων τόσο in vivo, όσο και in vitro. Παράλληλα φαίνεται ότι ο FGF πυροδοτεί την παραγωγή VEGF από στρωματικά κύτταρα (Stavri GT et al, 1995).

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι το σύστημα του FGF δύναται να συντηρήσει το αγγειογενετικό προφίλ των όγκων, κυρίως ενισχύοντας την επίδραση του VEGF στα ενδοθήλια.

#### ***Η Αγγειοποιητίνη-2 (Ang-2)***

Ο ρόλος της Ang-2 στην φυσιολογική αγγειογένεση έχει περιγραφεί παραπάνω. Στην νεοπλασματική αγγειογένεση αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην αρχική άρδευση των τόσο των πρωτοπαθών όγκων όσο και των δευτεροπαθών

εντοπίσεων. Εκτός από το μοντέλο της δημιουργίας όγκων σε αρχικώς ανάγγειες περιοχές, πλέον αναφέρεται ότι είναι πολύ συχνή η ανάπτυξη όγκων περιαγγειακά (Yancopoulos GD et al, 2000). Οι όγκοι αυτοί ακριβώς λόγω της γειννίας τους με αγγεία μέσω διάχυσης λαμβάνουν επαρκείς ποσότητες οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Αναπτυσσόμενοι λοιπόν εγγύς των αγγείων φαίνεται στα πρώτα τουλάχιστον στάδια ανάπτυξης ότι δεν βρίσκονται σε φάση υποξίας και για το λόγο αυτό δεν παράγουν VEGF. Παραταύτα τα αγγεία που σχετίζονται με όγκους φαίνονται να αποσύρονται από το προσκήνιο με μια διαδικασία δύο φάσεων. Στην πρώτη φάση τα περικύτταρα χαλαρώνουν τους μεσοκυττάριους δεσμούς τους και αποσύρονται. Στη δεύτερη φάση τα ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται απόπτωση με αποτέλεσμα πλέον ο αγγειακός σχηματισμός να υποχωρεί στο σύνολο του. Αναφέρεται ότι το φαινόμενο αυτό προκαλείται από την εκκρινόμενη Ang-2 την οποία επάγουν τα νεοπλασματικά κύτταρα (Holash J et al, 1999). Μετά την αποσταθεροποίηση των ώριμων αγγείων και εφόσον ο όγκος αποκτήσει την κρίσιμη μάζα του (πάνω από την οποία η διάχυση αδυνατεί να τον στηρίξει), η έκκριση VEGF προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την επαγομένη από την Ang-2 απόπτωση, ωθώντας τελικώς τα αποδιοργανωμένα ενδοθηλιακά κύτταρα σε αγγειογένεση (Lobov IB et al, 2002).

Διαφαίνεται λοιπόν ότι η Ang-2 συνεργάζεται με τον VEGF στην έναρξη της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Επιπροσθέτως η χαρακτηριστική μορφολογία των νεόπλαστων τριχοειδών είναι πιθανό να οφείλεται στην Ang-2 η οποία δεν επιτρέπει την οργάνωση ώριμων αγγειακών σχηματισμών.

### ***O υποδοχέας CD105/Endoglin***

Πρόκειται για ένα μόριο το οποίο έχει αναφερθεί ότι εκφράζεται σε αρκετά νεοπλάσματα (Duff SE et al, 2003). Η έκφρασή του επάγεται από την υποξία. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει συσχέτιση της παραγωγής VEGF από τα νεοπλασματικά κύτταρα και της έκφρασης του υποδοχέα CD105 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η σημασία του ανακαλύφθηκε όταν η γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδίου in vitro ανέκοψε τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό (Li C et al, 2000).

***Άλλα διαλυτά μόρια που σχετίζονται με την νεοπλασματική αγγειογένεση.***

Η ιντερλευκίνη-8 και η μεταλλοπρωτεϊνάση – 2 (*Matrix metalloproteinase-2, MMP-2*). Η ιντερλευκίνη-8 εκκρίνεται από αρκετά είδη καρκίνου, πιο συχνά όμως συναντάται στο μελάνωμα και στο καρκίνωμα του πνεύμονα (Yuan A et al, 2000). Έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αύξηση της μεταναστευτικότητας κυρίως λόγω επαγωγής της MMP-2 (Bar-Eli M, 1999). Η MMP-2 είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση της μεσοκυττάριας ουσίας και ως εκ τούτου συμβάλλει στα αρχικά στάδια της αγγειογένεσης. Η παραπάνω διαδικασία είναι από τις λίγες που δεν σχετίζονται με την έκκριση και λειτουργία του άξονα VEGF και των υποδοχέων του (Kitadai Y et al, 1999).

#### **Αναφορά στους αναστολείς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.**

Η νεοπλασματική αγγειογένεση είναι μια διαδικασία που κατά τη θεωρία του αγγειογενετικού διακόπτη απαιτεί λεπτή ισορροπία μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης. Ο εντοπισμός των αναστολέων της αγγειογένεσης εξακολουθεί να είναι επίπονος γιατί συνήθως πρόκειται για μικρά μόρια τα οποία εκκρίνονται από λίγες κατηγορίες κυττάρων που καλούνται να παίξουν ρυθμιστικό ρόλο. Μέχρι σήμερα αναφέρονται πέντε κατηγορίες μορίων των οποίων η δράση ακόμη μελετάται. Τα μόρια αυτά εν συντομία αναφέρονται παρακάτω:

A) οι Ιντερφερόνες. Πρόκειται για τουλάχιστο τριμελή ομάδα με μέλη της τις μορφές  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ . Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες με πολλαπλές λειτουργίες. Η IFN- $\alpha$  αναστέλλει την κινητικότητα των ενδοθηλίων ενώ οι IFN- $\alpha/\beta$  αναστέλλουν την έκκριση του bFGF και επάγουν την απόπτωση (Slaton JW et al, 1999), (Ozawa S et al, 2001). Αναφέρεται επίσης ελάττωση της μεταγραφής των γονιδίων VEGF και bFGF από την IFN $\gamma$  (Sasamura H et al, 2002).

B) η Ιντερλευκίνη-4. Πρόκειται για κυτταροκίνη που επάγει την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή εναντίον των κυττάρων του όγκου. Επιπλέον αναστέλλει την νεοπλασματική αγγειογένεση *in vivo* κυρίως αναστέλλοντας την έκκριση του bFGF (Volpert OV et al, 1998).

Γ) οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMP. Πρόκειται για τους αναστολείς των πρωτεασών που λύουν την εξωκυττάρια ουσία προκειμένου να ξεκινήσει η αγγειογένεση.

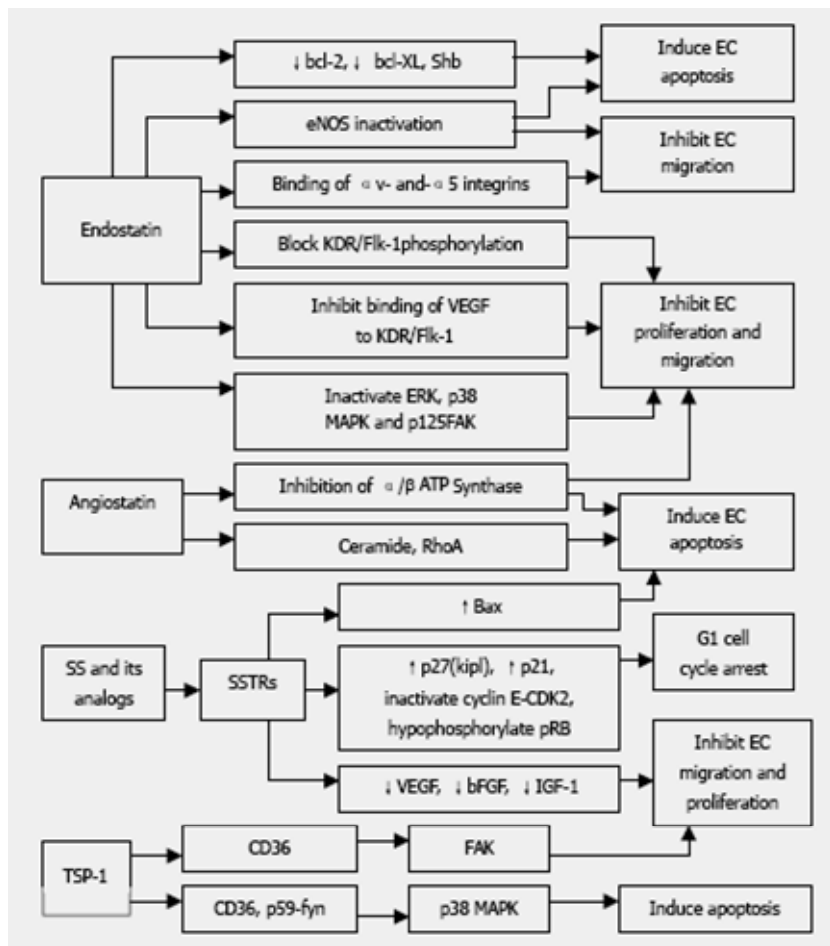
Δ) η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη. Η αγγειοστατίνη είναι ένα εσωτερικό τμήμα του πλασμινογόνου και είναι προϊόν πρωτεόλυσης. Αναφέρεται ότι η έκφραση αγγειοστατίνης από νεοπλασματικά κύτταρα αναστέλλει τον



ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση, μέσω αναστολής του FLK-1 (Kim YM et al, 2002). Η ενδοστατίνη είναι επίσης προϊόν πρωτεόλυσης του κολλαγόνου XVIII. Σχετίζεται με την αναστολή της μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 (Kim YM et al, 2000), ενώ ταυτόχρονα επάγει την ενδοθηλιακή απόπτωση (Dixelius J et al, 2000).

Ε) η θρομβοσπονδίνη, TSP-1. Πρόκειται για αναστολέα της ενδοθηλιακής μεταναστευτικότητας καθώς επίσης και για αναστολέα της μετακίνησης και εγκατάστασης -δια της αιματικής ροής- κυκλοφορούντων ενδοθηλίων. Ο υποδοχέας της (CD36) επάγει το ανασταλτικό της μήνυμα το οποίο σχετίζεται με ιντεγκρίνες της εξωκυττάριας ουσίας (Lawler J, 2000).

**Εικόνα Β4:** Ανακεφαλαίωση των αναστολέων της αγγειογένεσης και των μηχανισμών δράσης τους



---

## Γ. Η διαπερατότητα των ενδοθηλιακών μονοστρωμάτων σε κυτταρικά στοιχεία – Η εμπλοκή των μορίων προσκόλλησης.

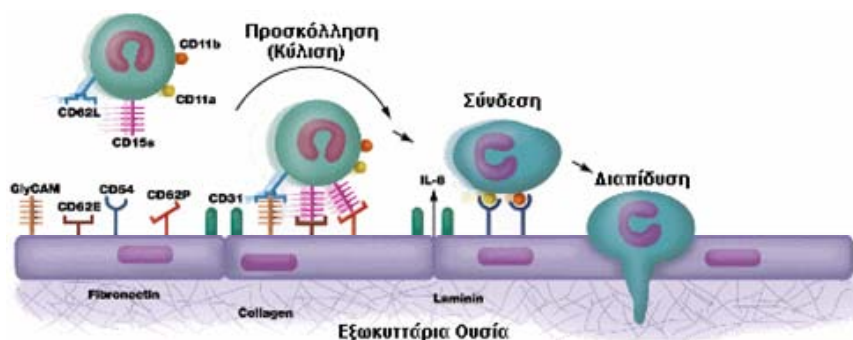
---

**Αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα.**

Η αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το ιστικό τους περιβάλλον είναι μια δυναμική διαδικασία που δεν περιλαμβάνει μόνο αλλαγές σε τοπικό επίπεδο. Αντιθέτως αφορά και κινητοποίηση κυτταρικών στοιχείων που ανήκουν σε άλλα συστήματα του ανθρώπινου σώματος. Τα κύτταρα που κινητοποιούνται συνήθως αφορούν στοιχεία του αμυντικού συστήματος, ήτοι πολυμορφοπύρρηνα, μακροφάγα, και άλλα, τα οποία μέσω μιας αλληλουχίας γεγονότων προσδένονται στην ενδοαυλική επιφάνεια των αγγείων και μεταναστεύουν στο διάμεσο χώρο.

Στη διαδικασία προσκόλλησης και μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, κύριο ρόλο παίζουν τα μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στη κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει περιγραφεί ότι υπεύθυνα για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων επί των ενδοθηλίων είναι κυρίως τα μόρια ICAM-1, VCAM-1 και η E-Selectin (Worthylake RA and Burridge K, 2001).

**Εικόνα Γ1:** Η διαπερατότητα του ενδοθηλίου σε κυτταρικά στοιχεία και η συμμετοχή των μορίων προσκόλλησης



Ο μηχανισμός προσκόλλησης όπως έχει περιγραφεί περιλαμβάνει τρία βήματα:

1. Την κύλιση (*rolling*) των λευκοκυττάρων επί της ενδοαυλικής επιφάνειας των ενδοθηλίων
2. Τη σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων σε ένα ενδοθηλιακό κύτταρο
3. Την διαπίδυση του κυττάρου ανάμεσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

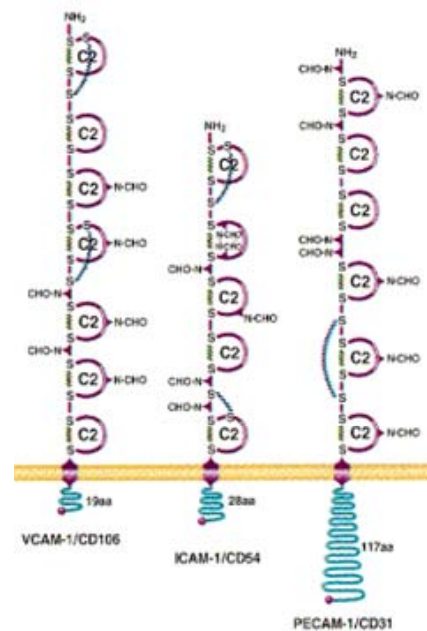
Βασικά στοιχεία των παραπάνω μορίων καθώς και ο τρόπος εμπλοκής τους στον παραπάνω μηχανισμό περιγράφονται παρακάτω.

### Το μόριο ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1)

Το μόριο ICAM-1 ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη με έναν πολυπεπτιδικό κορμό 500 περίπου αμινοξέων, της οποίας το μοριακό βάρος ποικίλει από 80-114 KDa αναλόγως του βαθμού γλυκοζυλίωσης των αμινοξέων της (van der Stolpe and van der Saag, 1996). Τη δομή της αποτελούν ένα ενδοκυττάριο τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα, και πέντε εξωκυττάριας περιοχές που εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας με τις ανοσοσφαιρίνες.

Εκφράζεται από ανοσολογικά διεγερμένα ενδοθηλιακά κύτταρα, από Τ-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και λοιπά κυτταρικά στοιχεία που σχετίζονται με την παρουσίαση αντιγονικών ερεθισμάτων (Witkowska AM and Borawska MH, 2004). Πέραν της φλεγμονής φαίνεται ότι εκφράζεται επίσης και από νεοπλασματικά κύτταρα.

Περιγράφεται ότι ICAM-1 εκφράζουν τα κύτταρα του μελανώματος (Johnson JP, 1999), του καρκινώματος του παχέος εντέρου (Agrez MW, 1996), και άλλα, και αναφέρονται συσχετίσεις είτε θετικές, είτε αρνητικές με την πορεία της νόσου και τη συνολική επιβίωση. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι πέραν της μεμβρανικής μορφής του, το ICAM-1 εμφανίζεται και με διαλυτή μορφή (sICAM-1) που κυκλοφορεί και ανιχνεύεται στο αίμα με τεχνικές ανοσοανίχνευσης (ELISA) (Witkowska AM and Borawska MH, 2004). Λόγω της ευκολίας ανίχνευσης, αυτή η μορφή του ICAM-1 είναι η πλέον μελετημένη σε παθολογικές καταστάσεις. Αλλαγές στη συγκέντρωση του sICAM-1 έχουν αναφερθεί σε όλες τις μορφές νεοπλασίας και έχουν γίνει προσπάθειες να αξιοποιηθεί σαν κλινικός προγνωστικός δείκτης, πλην όμως τα



Εικόνα Γ2: Σχηματική απεικόνιση των ICAM-1, VCAM-1 και CD31

πολλά διαφορετικά και συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία, προκαλούν δυσπιστία ως προς την αξιοπιστία του.

Το ICAM-1 λειτουργεί ως υποδοχέας πρωτεϊνών που εκφράζονται από τα κύτταρα που τείνουν να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο των αγγείων. Οι πρωτεΐνες-συνδέτες του ICAM-1 είναι κυρίως οι ιντεγκρίνες και ιδιαιτέρως δύο μέλη της ομάδας της ιντεγκρίνης  $\beta_2$  που ονομάζονται LFA-1 (CD11a/CD18) και Mac-1 (CD11b/CD18) (Edwards CP et al, 1995 / Diamond MS et al, 1990). Η ιντεγκρίνη LFA-1 εκφράζεται από τα πολυμορφοπύρρηνα και τα λεμφοκύτταρα, ενώ η ιντεγκρίνη Mac-1 εκφράζεται από τα μακροφάγα. Άλλος συνδέτης του ICAM-1, που αναφέρεται, είναι ο ρινοϊός (Stanciu LA and Djuganovic R, 1998).

Η ρύθμιση της έκφρασης του ICAM-1 γίνεται από πολλούς παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω:

1. Το μονοπάτι του NF $\kappa$ b. Πρόκειται για το μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον παράγοντα TNF $\alpha$  και την IL-2b. Ο NF $\kappa$ b μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του ICAM-1 (Shrikant P et al, 1994).
2. Η ιντερφερόνη- $\gamma$ . Η IFN- $\gamma$  με την ενεργοποίηση των αντίστοιχων υποδοχέων, τελικά ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Stat οι οποίες προσδένονται στα στοιχεία IRE-interferon response elements που επάγουν τη μεταγραφή του ICAM-1 (Shrikant P et al, 1994 / Spoelstra FM et al, 1999).
3. Η εφαρμογή stress ή διαφόρων αυξητικών παραγόντων μέσω της ενεργοποίησης των στοιχείων AP-1 του εκκινήτη του ICAM-1, που συμβαίνει ως το τελικό αποτέλεσμα σύνθετων βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες MAPK, JNK, p38 kinase, c-jun και ATF-2 (Karin M et al, 1996 / Karin et al. 1997).
4. Η Φωσφοκινάση C (PKC). Αναφέρεται ότι η PKC είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των παραπάνω μηχανισμών (Rahman A et al., 1999).

Το μόριο ICAM-1 εμπλέκεται ενεργά στην σταθερή προσκόλληση των λευκοκυττάρων και των μακροφάγων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η σύνδεση LFA-1 ή Mac-1 στο ICAM-1, σταθεροποιεί το κύτταρο προς διαπίδυση ώστε να μη παρασύρεται από την αιματική ροή και εν συνεχεία ευθύνεται και για δομικές αλλαγές επί του κυτταροσκελετού που θα οδηγήσουν εν τέλει στη χαλάρωση των ενδοθηλιακών μεσοκυττάρων συνδέσεων και τη μετανάστευση στο διάμεσο χώρο (Adamson P et al, 1999). Η σημασία του ICAM-1 στην κυτταρική

προσκόλληση διαφαίνεται και από τα σχετικά πειράματα *in vivo* αποσιώπησης του εν λόγω γονιδίου, η οποία οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και χαμηλό ποσοστό κυτταρικής διήθησης των ιστών σε περίπτωση φλεγμονής (Sligh JE et al, 1993).

Η επαγωγή της έκφρασης του ICAM-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς η μετανάστευση λευκοκυττάρων ή μακροφάγων στο διάμεσο χώρο, πέραν της φλεγμονής σχετίζεται επίσης με νεοπλασία μέσω της έκκρισης κυτταροκινών από τα νεοπλασματικά κύτταρα (Bissacchi D et al, 2003). Το τελικό αποτέλεσμα της επαγωγής ή αναστολής της έκφρασης του ICAM-1 από τα νεόπλαστα τριχοειδή ενός όγκου είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης αυξητικών και άλλων παραγόντων που σκιαγραφούν το προφίλ μιας τοπικής φλεγμονής. Η σχέση της φλεγμονής με τη νεοπλασία και ο επαγωγικός ή ανασταλτικός της ρόλος της πρώτης επί της ανάπτυξης και διασποράς της δεύτερης θα αναλυθεί παρακάτω.

### **Το μόριο VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)**

Το μόριο VCAM-1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 100-110 KDa (Hession C et al, 1992). Ο βασικός πολυπεπτιδικός κορμός του μορίου αποτελείται από 715 αμινοξέα που αντιστοιχούν σε ένα μοριακό βάρος περίπου 80 KDa. Το υπόλοιπο τμήμα του μορίου στοιχειοθετούν οι ομάδες γλυκοζυλίωσης. Το VCAM-1 αποτελείται από ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα εξωκυττάριο τμήμα. Το εξωκυττάριο τμήμα από επτά περιοχές που προσομοιάζουν ανοσοσφαιρίνες. Το τμήμα αυτό αναφέρεται ότι δεν είναι απολύτως σταθερό ως προς τη δομή του. Περιγράφεται ανθρώπινο VCAM-1 το οποίο φέρει έξι αντίστοιχες περιοχές (Hession C et al, 1991).

Τα κύτταρα που εκφράζουν VCAM-1 εκτός από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι οι νευρώνες (Birdsall HH et al, 1992), οι λείες μυικές ίνες (Ardehali A et al, 1995), οι ινοβλάστες (Meng H et al, 1995), τα κύτταρα του Kupffer (van Oosten et al, 1995), δενδριτικά κύτταρα (Huang MJ et al, 1995), ωοκύτταρα (Cambell S et al, 1995) και κύτταρα Sertoli (Riccioli A et al, 1995). Πέραν των φυσιολογικών ιστών το VCAM-1 σχετίζεται με νεοπλασίες

(Zetter BR, 1993). Εκτός από τη μεμβρανική μορφή του το VCAM-1 υπάρχει και ως ελεύθερη-διαλυτή μορφή στην αιματική κυκλοφορία (Kitani A et al, 1998). Ο πιθανός μηχανισμός δημιουργίας της διαλυτής μορφής σχετίζεται με διαφορετικό τρόπο ωρίμανσης του mRNA ή με πρωτεολυτική παρέμβαση στη μεμβρανική μορφή. Η διαλυτή μορφή είναι εύκολο να προσδιοριστεί ποσοτικά (Chang PY et al, 2005) (με ανοσο-ανιχνευση τύπου ELISA) και ως εκ τούτου έχει μελετηθεί στις περισσότερες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με ενεργοποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου. Στη νεοπλασία, το sVCAM-1 σχετίζεται με αυξημένη αγγειογένεση, αυξημένη ενεργότητα της πρωτοπαθούς νόσου και ελαττωμένο προσδόκιμο επιβίωσης (Byrne GJ et al, 2000). Παραταύτα δεν έχει αποδειχτεί άμεση σχέση του επιπέδου συγκέντρωσης του sVCAM-1 με το επίπεδο έκφρασης του VCAM-1 στα νεόπλαστα ενδοθηλιακά κύτταρα της πρωτοπαθούς νεοπλασματικής εντόπισης.

Το VCAM-1 λειτουργεί ως μεμβρανικός υποδοχέας μεταβιβάζοντας σήματα πρόσδεσης κυττάρων που φέρουν τον κατάλληλο συνδέτη προς το κύτταρο στόχο. Ως κύριος συνδέτης του VCAM-1 αναγνωρίζονται οι ιντεγκρίνες και ιδιαιτέρως το μέλος  $\alpha_4\beta_1$ /VLA-4 της ομάδας  $\beta_1$  (Chan BMC et al, 1992). Η πρόσδεση του VLA-4 στο VCAM-1 ενεργοποιεί μια αλυσίδα αντιδράσεων που περιλαμβάνει ενεργοποίηση των Rho και Rac κινασών. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυτταροπλασματικών ινιδίων του stress που με τη σειρά τους αλλάζουν το κυτταρικό σχήμα (Alevriadou BR, 2003). Ιδιαιτέρως στα ενδοθηλιακά κύτταρα η αλλαγή του κυτταροσκελετού και κατά συνέπεια του κυτταρικού σχήματος ακολουθείται από αναστολή έκφρασης της VE-cadherin. Κατά αυτόν τον τρόπο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όχι μόνο δημιουργούν χώρο ικανό για την διαπίδυση των προσκολλημένων κυττάρων αλλά ταυτόχρονα καταργούν και τη σταθερή μεσοκυττάρια σύνδεση που λειτουργεί ως ανυπέβλητο μηχανικό εμπόδιο (Hordijk PL, Anthony E, 1999). Η αλληλεπίδραση VLA-4 και ενδοθηλιακού VCAM-1 αφορά κυρίως την εξαγγείωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων τα οποία και εκφράζουν VLA-4. Εν τούτοις το VCAM-1 φαίνεται ότι εκφράζεται και σε ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν εμπλακεί με προσκόλληση και εξαγγείωση πολυμορφοπυρήνων, χωρίς όμως να επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά η εξαγγείωση των τελευταίων από την παρουσία του VCAM-1.

Η ρύθμιση της έκφρασης του VCAM-1 εξαρτάται από την παρουσία προφλεγμονωδών ή αυξητικών παραγόντων. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί επαγωγείς του VCAM-1 είναι οι ακόλουθοι:

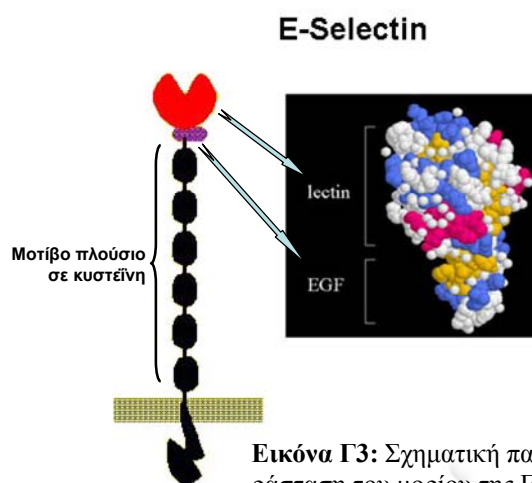
1. Η IL-1 και ο TNFα. Και οι δύο αυξάνονται σημαντικά σε περίπτωση φλεγμονής. Πυροδοτούν την έκφραση τόσο και των τριών βασικών μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1 και E-Selectin) (Zhang F et al, 2002).
2. Η IL-4. Πρόκειται για έναν ειδικό επαγωγέα του VCAM-1. Σχετίζεται με ειδική παρουσία μονοκυττάρων στο χώρο που παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της (Verdergaal EM et al, 1993).
3. Η IL-13 (Fukushi J et al, 2000).

Το μόριο VCAM-1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκειμένου να ενισχύσει και να σταθεροποιήσει την προσκόλληση των μονοκυττάρων, που αρχικά επετεύχθησαν μέσω του ICAM-1. Η υπόθεση της ενίσχυσης στηρίχτηκε στην παρατήρηση ότι το VCAM-1 επάγεται αργότερα από το ICAM-1 σε περιπτώσεις ενεργοποίησης των ενδοθηλίων (Worthylake RA and Burrige K, 2001). Είναι σαφές λοιπόν ότι και το VCAM-1 όπως ακριβώς και το ICAM-1 εμπλέκονται στο δεύτερο στάδιο της εξαγγελίωσης κυτταρικών στοιχείων.

### Το μόριο E-Selectin

Το μόριο της E-Selectin είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με βασικό κορμό αμινοξέων που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 66,6 kDa. Πρόκειται για μόριο που αποτελείται από ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα εξωκυττάριο τμήμα που απαρτίζεται από μια περιοχή ομόλογη στη λεκτίνη, μια περιοχή ομόλογη στον

παραγόνα EGF και μια περιοχή επαναλαμβανόμενων μοτίβων (Graves BJ et al, 1994).



**Εικόνα Γ3:** Σχηματική παράσταση του μορίου της E-Selectin

Η E-Selectin εκφράζεται κατά αποκλειστικότητα από ενδοθηλιακά κύτταρα είτε σε φυσιολογικούς είτε σε παθολογικούς ιστούς. Η έκφρασή της σχετίζεται κυρίως με τη φλεγμονή αλλά και την μεταστασιμότητα των νεοπλασματικών κυττάρων (Mareel M and Leroy A, 2003). Πέραν της μεμβρανικής μορφής της, η E-Selectin περιγράφεται ότι συναντάται και ως ελεύθερη-διαλυτή μορφή, εντοπιζόμενη στο αίμα. Η ευκολία στον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό της sE-Selectin οδήγησε στην λεπτομερέστερη διερεύνησή της και το συσχετισμό των μεταβολών της με διάφορες νόσους όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο καρκίνος του μαστού, του εντέρου και άλλων συμπαγών οργάνων, το μελάνωμα, οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα. (Krause T and Turner GA, 1999)

Η E-Selectin λειτουργεί ως υποδοχέας δύο υδατανθράκων των σιαλυλο-Lewis-X και σιαλυλο-Lewis A (Tei K et al, 2002). Τα μόρια αυτά εμπλέκονται τόσο στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων, όσο και στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων επί του αγγειακού ενδοθηλίου προκειμένου να διαπιδύσουν στον ενδιάμεσο χώρο. Η εμπλοκή της E-Selectin αφορά το πρώτο στάδιο προσκόλλησης των παραπάνω κυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο και αφορά κυρίως την κύλιση (rolling) των κυττάρων επί του ενδοθηλίου. Η κύλιση επιτυγχάνεται με τη συνεχή χαλαρή σύνδεση της E-Selectin με τους συνδέτες της σε συνδυασμό με της δυνάμεις ροής που ασκούνται στα κυτταρικά στοιχεία της αιματικής κυκλοφορίας (Worthylake RA and Burridge K, 2001). Η διαδικασία της κύλισης θα ωθήσει σε συνδυασμό με τους λοιπούς εκκρινόμενους παράγοντες στην έκφραση ICAM-1 και VCAM-1 που θα εξασφαλίσουν την τελική σταθερή προσκόλληση.

Η έκφραση της E-Selectin ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι:

1. Ο TNF $\alpha$  (Zhang F et al, 2002).
2. Αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τους όγκους.
3. Η επιφανειακή τάση (Chiu JJ, Lee PL, 2004).

Η E-Selectin σχετίζεται ταυτόχρονα με την αγγειογένεση. Ενδοθηλιακά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται εκφράζουν E-Selectin in vitro (Bischoff J, Brasel C, 1997). Τμήματα του μορίου έχει αποδειχτεί ότι επάγουν την αγγειογένεση τόσο in vitro όσο και in vivo (Kumar P, Amin M, 2003). Φαίνεται λοιπόν ότι η E-Selectin είναι απαραίτητη για τον ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό,



την μεταναστευτικότητα και την ικανότητα δημιουργίας σωληνωτών δομών in vitro.

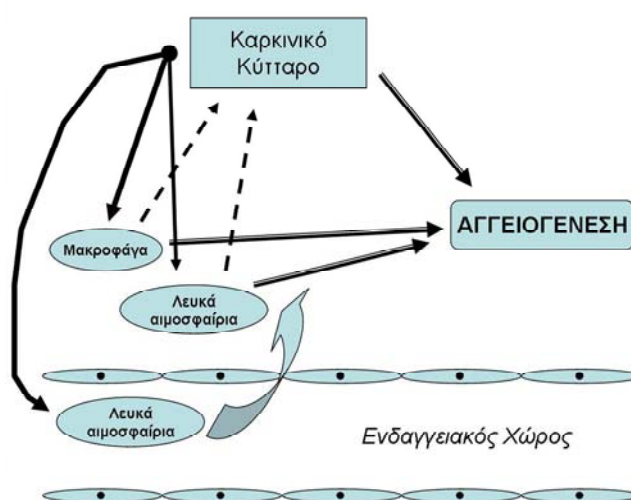
Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι η E-Selectin λειτουργεί ως βασικός υποδοχέας στην διενδοθηλική κυτταρική διαπίδυση.

### **Ο Καρκίνος και η σχέση του με τη φλεγμονή. Σχέση επαγωγής ή αναστολής;**

Η διαδικασία της ογκογένεσης περιλαμβάνει γεγονότα γονιδιακών αλλοιώσεων που θεωρητικά δημιουργούν κύτταρα τα οποία δεν έχουν ιδιαίτερη σχέση με τα κύτταρα του ξενιστή. Θα αναμένονταν λοιπόν μια ανοσολογική αντίδραση του πάσχοντος οργανισμού με στόχο την απόρριψη τουλάχιστον του πρωτοπαθούς όγκου. Από την άλλη, είναι γνωστή η σχέση καταστάσεων χρόνιας φλεγμονής με την καρκινογένεση (π.χ. ελκώδης κολίτις). Προς την ίδια κατεύθυνση ήταν και οι αρχικές παρατηρήσεις ότι η χρόνια χρήση αντιφλεγμονώδους αγωγής ελαττώνει την πιθανότητα ανάπτυξης διαφόρων νεοπλασιών. Εύλογη ήταν λοιπόν η απορία, αν η φλεγμονή επάγει ή αναστέλλει την ανάπτυξη και τη διασπορά της νεοπλασίας.

Η απάντηση στην παραπάνω απάντηση δεν έχει απαντηθεί οριστικά από την επιστημονική κοινότητα. Έχει αναφερθεί ότι CD8 T-

λεμφοκύτταρα προκαλούν άμεση λύση καρκινικών κυττάρων in vivo. Το ίδιο αναφέρεται και για τα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer Cells), καθώς και για τα μονοκύτταρα που συναντώνται εντός των όγκων. Η ανάπτυξη νεοπλασιών in vivo, επιτείνεται επίσης σε μοντέλο αναστολής των T



**Εικόνα Γ4:** Η άποψη της υποβοηθούμενης αγγειογένεσης κατά την οποία το αγγειογενετικό μήνυμα ενισχύεται από κυτταροκίνες που εκκρίνουν τα φλεγμονώδη στοιχεία που το ίδιο το καρκινικό κύτταρο προσκάλεσε (χημειοτακτισμός). Τα φλεγμονώδη κύτταρα επάγουν επίσης την έκκριση αγγειογενετικών παραγόντων από το καρκινικό κύτταρο και ταυτόχρονα με τις πρωτεάσες τους υδρολύουν την εξωκυττάρια ουσία, υποβοηθώντας την μετατροπή της in situ νεοπλασματικής ανάπτυξης σε μικροδιαθητική. (Mareel M et al, 2003 / Bisacchi D, 2003)

λεμφοκυττάρων. Από την άλλη, υπάρχει η άποψη ότι ο καρκίνος μέσω χημειοτακτισμού προσκαλεί φλεγμονώδη στοιχεία από την περιφέρεια τα οποία εν συνεχεία διεγείρει προκειμένου αυτά να εκκρίνουν με τη σειρά τους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες προς όφελος του όγκου. Επιπλέον η προσπάθεια απόρριψης των νεοπλασματικών κυττάρων από μονοκύτταρα και μακροφάγα, αναφέρεται ότι προκαλεί λύση της συνέχειας της εξωκυττάριας ουσίας με άμεσο αποτέλεσμα την έναρξη της διήθησης. Η τοπική φλεγμονή συνεπικουρεί στη συντήρηση ικανού αγγειογενετικού μηνύματος προκειμένου να αυξηθεί ο όγκος και να προσκαλέσει νέα φλεγμονώδη στοιχεία από την περιφέρεια.

Στα παραπάνω στοιχεία προστίθεται και η ογκογένεση που παρατηρείται σε ενεργή HIV-1 λοίμωξη. Η ανοσοκαταστολή κατά την ενεργή νόσο φαίνεται ότι σχετίζεται με την εμφάνιση του αγγειοσαρκώματος Kaposi, χωρίς ακόμη να διευκρινίζεται αν το τελευταίο είναι αποτέλεσμα της ανοσοκαταστολής ή άμεσης ογκογόνου δράσης του εν λόγω ιού.

Η μικρή αυτή προσέγγιση έδειξε ότι η σχέση της νεοπλασίας με την φλεγμονή είναι άρρηκτη, πλην όμως παραμένει ασαφής ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης. Το ενδοθηλιακό κύτταρο αποτελεί ένα βασικό σημείο μελέτης αυτής της αλληλεπίδρασης, καθώς διαμέσου του αγγειακού ενδοθηλίου φλεγμονώδη κύτταρα διαπιδούν προς την θέση ανάπτυξης του νεοπλάσματος.

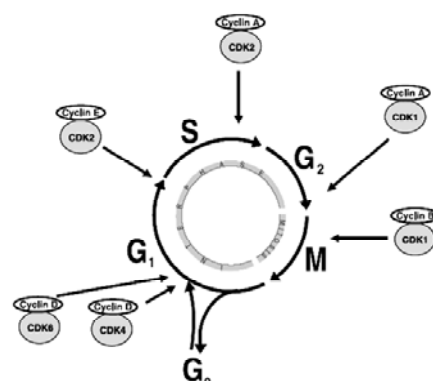
---

## **Δ. Ο κυτταρικός κύκλος και η ρύθμισή του. Οι εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases-CDKs) και ο αναστολέας p21<sup>WAF1/Cip1</sup> των κινασών CDK.**

---

### **Ο Κυτταρικός κύκλος.**

Η χρονική διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου αποτελείται από διαδοχικές φάσεις που ως στόχο έχουν την κυτταρική αναπαραγωγή μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει πολύπλοκες βιοχημικές



**Εικόνα Δ1:** Ο κυτταρικός κύκλος και η εμπλοκή των συμπλόκων CDK-κυκλινών (Vermeulen 2003)

αλλαγές που πέραν της σύνθεσης του DNA, αφορούν την προετοιμασία του κυττάρου από πλευράς σύνθεσης πρωτεϊνών που θα συμμετέχουν με τη σειρά τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι φάσεις αυτές είναι οι γνωστές G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M, G<sub>0</sub> και η μετάβαση από τη μία στην άλλη ρυθμίζεται από μια σειρά πρωτεϊνών που καλούνται κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK). Οι CDK κινάσες συνδέονται με τις αντίστοιχες κυκλίνες ενεργοποιούνται και εν συνεχεία πυροδοτούν δευτερογενείς αντιδράσεις φωσφορυλιώνοντας διάφορες πρωτεΐνες ή ενεργοποιώντας διάφορους υποκινητές γονιδίων (Sherr CJ and Roberts GM, 1999).

Οι CDK κινάσες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα είναι εννέα. Από αυτές μόνο πέντε εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα οι CDK6, CDK4, CDK2 ρυθμίζουν τη φάση G<sub>1</sub>, η CDK2 ρυθμίζει τη μετάβαση G<sub>1</sub>/S και τη φάση S, και η CDK1 ρυθμίζει τη μετάβαση S/G<sub>2</sub> και τις φάσεις G<sub>2</sub> και M. Περιγράφεται και η CDK7 η οποία εμπλέκεται σε ρύθμιση όλων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

CDK	κυκλίνη	Φάση κυτταρικού κύκλου
CDK4	Κυκλίνη D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub> ,D <sub>3</sub>	G <sub>1</sub>
CDK6	Κυκλίνη D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub> ,D <sub>3</sub>	G <sub>1</sub>
CDK2	Κυκλίνη E	G <sub>1</sub> /S μετάβαση
CDK2	Κυκλίνη A	S
CDK1	Κυκλίνη A	G <sub>2</sub> /M μετάβαση
CDK1	Κυκλίνη B	Μίτωση
CDK7	Κυκλίνη H	Σε όλες τις φάσεις

Η σύνδεση των κυκλινών με τις CDK κινάσες είναι ειδική. Κάθε κινάση προσδέεται μόνο με μία ή κάποιες κυκλίνες προκειμένου η πρώτη να ενεργοποιηθεί. Οι σχέσεις CDK-κινασών και κυκλινών περιγράφεται σε σχετικό πίνακα.

### **Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.**

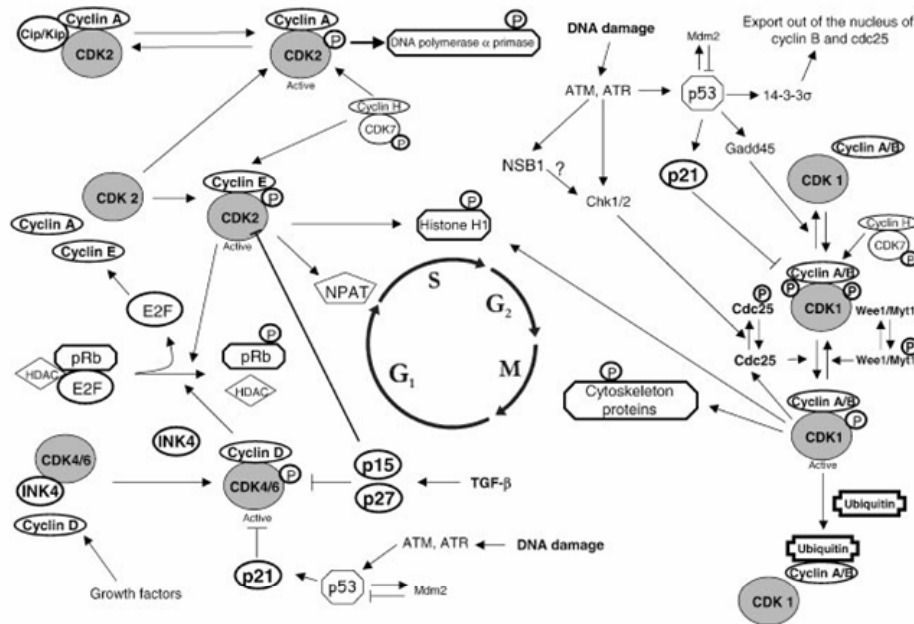
Η επίτευξη της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου γίνεται σε δύο επίπεδα.

Το πρώτο επίπεδο αφορά τη μεταβολή των συγκεντρώσεων των κυκλινών. Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση των κυκλινών μεταβάλλεται κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Evans et al, 1983 / Pines J, 1991). Όταν η συγκέντρωση μιας κυκλίνης είναι αυξημένη, τότε επιτυγχάνεται αυξημένη ποσοτικά παρουσία των αντίστοιχων συμπλόκων που αφορούν μία φάση του κυτταρικού κύκλου. Είναι σαφές ότι η ρύθμιση αφορά στοιχειομετρικές αλλαγές. Ένα σύμπλοκο CDK-κυκλίνη θεωρείται ότι επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του ξεπεράσει κάποιο όριο. Παρά τη μεταβλητότητα της συγκέντρωσης των κυκλινών, οι συγκεντρώσεις των CDK παραμένουν σταθερές.

Το δεύτερο επίπεδο ρύθμισης επιτυγχάνεται μέσω των πρωτεϊνών αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors-CKIs). Αναφέρονται μέχρι σήμερα δύο οικογένειες αναστολέων αναλόγως της δράσης τους επί του συμπλόκου CDK-κυκλίνη (Sherr CJ and Roberts JM, 1995). Η πρώτη οικογένεια περιλαμβάνει τα μόρια INK (p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>) τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Τα μόρια αυτά αναστέλλουν τη δημιουργία συμπλόκων με απευθείας πρόσδεσή τους στις CDK κινάσες 4 και 6 παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της κυκλίνης D (Carnero A and Hannon GJ, 1998). Η δεύτερη οικογένεια περιλαμβάνει τα μόρια p21<sup>Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> και p57<sup>Kip2</sup>, τα οποία προσδέονται στα ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα CDK-κυκλίνης και τα αναστέλλουν (Nakanishi M et al, 1995 / Warbrick E et al, 1995). Τα παραπάνω τρία μόρια αναστέλλουν τα σύμπλοκα της φάσης G1 ήτοι τα σύμπλοκα των CDK 4 και 6 με τις κυκλίνες D, έχουν όμως και ανασταλτική δράση επί του συμπλόκου CDK1-κυκλίνη B. Η συνολική ρύθμιση του επιπέδου των αναστολέων CKI επιτυγχάνεται μέσω ποικίλων μονοπατιών. Η έκφραση του p21<sup>Waf1</sup> ρυθμίζεται άμεσα από την πρωτεΐνη p53 (πρωτεϊνικό προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53) (el Deiry WS et al, 1993) και από άλλα ανεξάρτητα μονοπάτια. Οι άλλοι δύο αναστολείς p15 και p57 ρυθμίζονται θετικά κυρίως από τον παράγοντα TGF-β. Παρουσία του TGF-β οι αναστολείς p15 και p27 ενεργοποιούνται ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται και το επίπεδο έκφρασης τους (Hannon GJ and Beach D, 1994; Reynisdottir I et al, 1995). Άμεσο αποτέλεσμα είναι μια πολυεπίπεδη ρύθμιση -μέσω αναστολής- του κυτταρικού κύκλου.

**Πίνακας Δ1:** Οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου

CKI οικογένεια	Δράση	Μέλη οικογένειας	
INK4	Απενεργοποίηση των G <sub>1</sub> CDK (CDK4, CDK6)	p15	INK4b
		p16	INK4a
		p18	INK4c
		p19	INK4d
Cip/Kip	Απενεργοποίηση των G <sub>1</sub> συμπλόκων CDK-κυκλινών και του CDK1-κυκλίνη B	p21	WAF1,Cip1
		p27	Cip2
		p57	Kip2



**Εικόνα Δ2:** Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Vermeulen 2003)

**Κυτταρικός κύκλος, νεοπλασία και αγγειογένεση. Μια άρρηκτη σχέση.**

Η νεοπλασία εξ'ορισμού αφορά τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήτοι μια μετατόπιση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου προς την κυτταρική διαίρεση. Σε αυτή την κατάσταση αναμένεται ότι οι αναστολείς CKI, που μόλις περιγράφηκαν παραπάνω, είτε είναι απενεργοποιημένοι με κάποιο τρόπο (μοριακή αναστολή με απευθείας αλληλεπίδραση ή έλλειψη διαδικασίας ενεργοποίησης) είτε η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους είναι ελαττωμένη (ελάττωση έκφρασης ή αυξημένη αποικοδόμηση). Το ίδιο ακριβώς αναμένεται να συμβαίνει όχι μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και στα

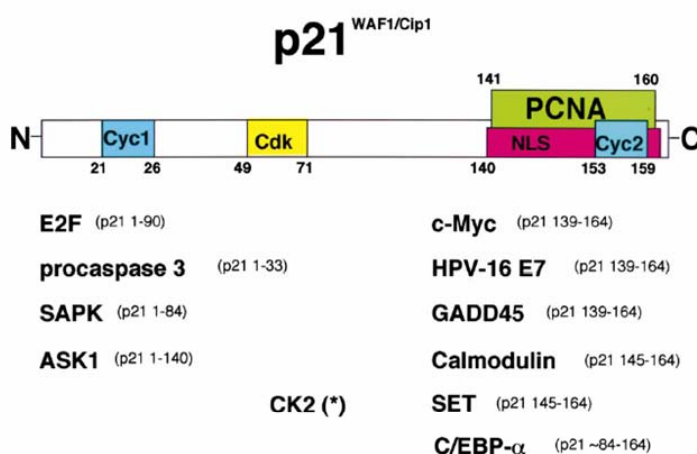
στρωματικά κύτταρα των οποίων επάγεται ο πολλαπλασιασμός από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από την νεοπλασία. Η νεοπλασματική αγγειογένεση είναι ακριβώς μια τέτοια περίπτωση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των -πέριξ του όγκου- αγγείων μεταπίπτουν από την κατάσταση ηρεμίας (φάση G0) σε κατάσταση πολλαπλασιασμού, αυξάνοντας το ρυθμό των κυτταρικών κύκλων. Η ίδια υπόθεση, σχετικά με εμπλοκή των αναστολέων CKI, προέκυψε συνεπώς και για τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η μελέτη της επίδρασης του νεοπλασματικού περιβάλλοντος επί του ενδοθηλιακού φραγμού ήταν βέβαιο ότι θα απαιτούσε συσχέτιση της αγγειογένεσης με τον ενδοθηλιακό κυτταρικό κύκλο. Πέραν της αξιολόγησης της έκτασης της αγγειογένεσης που σχετίζεται με ταχύτερο ενδοθηλιακό κυτταρικό κύκλο, προέκυψαν ερωτήματα σχετικά με ποιο μόριο εμπλέκεται καθώς και με ποιόν τρόπο στον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Το μόριο που επιλέχθηκε ως πιο πιθανό να συμμετέχει στην αγγειογένεση ήταν το p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Τα χαρακτηριστικά του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> αναλύονται παρακάτω.

### Η δομή και η λειτουργία του p21<sup>WAF1</sup>.

*Δομή.* Το p21<sup>WAF1/Cip1</sup> είναι ένα μόριο 21kDa το οποίο συναντάται πρακτικά σε κάθε



**Εικόνα Δ3:** Σχηματική παράσταση των περιοχών πρόσδεσης των κυκλινών (Cyc), των CDK και του PCNA. Αναφορά και άλλων σημείων πρόσδεσης (Dotto, 2000)

κύτταρο του ανθρώπινου οργανισμού. Πρόκειται για τον πρώτο αναστολέα του κυτταρικού κύκλου που ανακαλύφθηκε. Το p21<sup>WAF1/Cip1</sup> περιγράφεται ως ο άμεσος μεσολαβητής της δράσης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου

p53, καθώς επίσης ως ένας άμεσος αναστολέας των CDK. Αυξημένη έκφραση του σχετίζεται επίσης με τη διαδικασία της γήρανσης. Η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1/Cip1</sup>

ως μέλος της οικογένειας Cip/Kip των CKI αναστολέων εμφανίζει σημαντική ομολογία με τα υπόλοιπα δύο μέλη p27 και p57.

Έχει αποδειχτεί ότι το άμινο-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης επαρκεί για να αναστείλει τα σύμπλοκα CDK-κυκλίνης, γεγονός που παρατηρείται και στα μόρια p27 και p57 (Dotto GP, 2000). Το καρβόξυ-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει θέση πρόσδεσης με το πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Proliferating Nuclear Cell Antigen-PCNA), μια υπομονάδα της DNA πολυμεράσης δ, το οποίο και αναστέλλει, εμποδίζοντας το διπλασιασμό του DNA, όχι όμως και την επιδιόρθωσή του (Chen J et al, 1995). Η δομή του μορίου αφορά δύο περιοχές που αλληλεπιδρούν με τις κυκλίνες καθώς επίσης και μια περιοχή που αντιδρά με τις CDK. Η αναστολή των συμπλόκων CDK-κυκλίνης προϋποθέτει την πρόσδεση της κυκλίνης και της CDK με την p21. Επιπλέον η p21 φέρει αλληλουχία που σχετίζεται με την μεταφορά της στον πυρήνα (NLS) καθώς επίσης και σχετικές αλληλουχίες αλληλεπίδρασης με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες (Dotto GP, 2000).

*Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.* Υπό κανονικές συνθήκες οι κινάσες CDK βρίσκονται στο κύτταρο με τη μορφή τετραμερών που αποτελούνται: α) από την CDK, β) μια κυκλίνη, γ) από το μόριο PCNA και δ) από ένα μόριο p21 (Xiong Y et al, 1992 / Zhang H et al, 1993). Οι CDK που αναφέρονται ότι συμμετέχουν σε αυτά τα σύμπλοκα είναι ως επί το πλείστον οι CDK 2 και 4, ενώ η απομόνωση των συμπλόκων έδειξε ότι οι κυκλίνες που προσδέονται σε αυτές τις CDK είναι οι κυκλίνες A, B, D και E (Xiong Y et al, 1993 / Zhang H et al. 1994). Η κλωνοποίηση του γονιδίου της p21<sup>WAF1</sup> και η in vitro παραγωγή της σε καθαρή μορφή επέτρεψε τη διεξαγωγή πειραμάτων αλληλεπίδρασης με κυκλίνες και CDK κινάσες, με αποτέλεσμα την απόδειξη ότι η p21<sup>WAF1</sup> αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο.

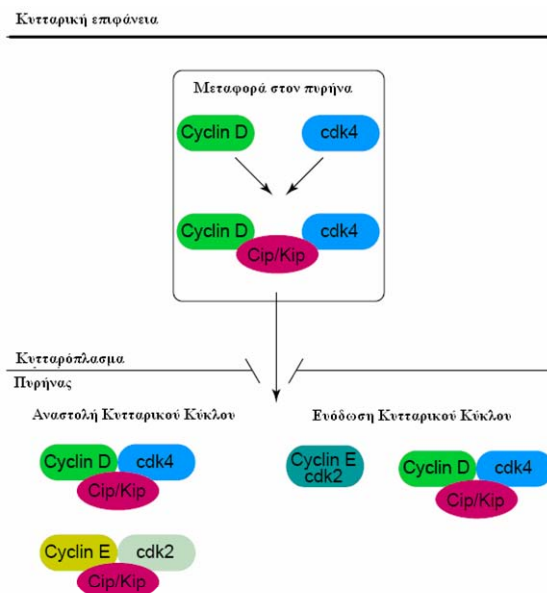
Παραταύτα, παρατηρήθηκε ότι λεμφοκύτταρα που πολλαπλασιάζονταν εμφάνιζαν αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση p21<sup>WAF1</sup>, γεγονός που αντέκρουε την υπόθεση του κυτταρικού αναστολέα (Noda A et al, 1994 / Nourse J et al, 1994 / Sheikh MS et al, 1994). Ταυτόχρονα το p21 φάνηκε να παρευρίσκεται σε πολλά κύτταρα που εμφανίζουν φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Όλα τα παραπάνω απέκτησαν σημασία μετά από την παρατήρηση ότι ακόμη και σε πολλαπλασιάζοντα κύτταρα, η p21<sup>WAF1</sup> είναι συνδεδεμένη στα σύμπλοκα CDK-κυκλίνης χωρίς να αναστέλλει τη δράση της κινάσης του συμπλόκου.

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η συμμετοχή ενός μορίου  $p21^{WAF1}$  ανά σύμπλοκο. Η διατάραξη της στοιχειομετρίας υπέρ του  $P21^{WAF1}$  (είτε ελαττώνοντας τη συγκέντρωση CDK ή κυκλίνης, είτε αυξάνοντας το  $P21^{WAF1}$ ) οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Σε αντίθετη περίπτωση ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται κανονικά.

Επιπλέον η πρωτεΐνη  $P21^{WAF1}$  αλληλεπιδρά με το PCNA το οποίο και αναστέλλει. Αναφέρεται ότι παρά αυτή την αναστολή, το PCNA συνεχίζει να συμμετέχει στη συναρμολόγηση της DNA πολυμεράσης δ, χωρίς να είναι ικανή πλέον η κίνηση της πολυμεράσης επί του DNA. Η φυσική αλληλεπίδραση  $P21^{WAF1}$  και PCNA από την άλλη επιτρέπει τη διατήρηση της ικανότητας του δεύτερου να επιδιορθώνει το DNA. Φαίνεται λοιπόν ότι πέραν της άμεσης αναστολής της σύνθεσης DNA, το  $P21^{WAF1}$  ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ επιμήκυνσης και επιδιόρθωσης του DNA.

### Η πρωτεΐνη $P21^{WAF1}$ ως παράγοντας συναρμολόγησης των συμπλόκων CDK-κυκλίνης.

Έχει παρατηρηθεί ότι η έλλειψη  $P21^{WAF1}$  ή  $p27^{Kip1}$  από τα κύτταρα οδηγεί



**Εικόνα Δ4:** Οι αναστολείς CKI συμμετέχουν στην συναρμολόγηση των συμπλόκων CDK-κυκλινών και διευκολύνουν την είσοδο τους στον πυρήνα (Coqueret, 2003)

σε αδυναμία συναρμολόγησης των συμπλόκων CDK-κυκλίνης (Cheng M et al, 1999). Φαίνεται ότι η  $P21^{WAF1}$  λειτουργεί ως συνδετική γέφυρα μεταξύ των δύο μορίων τα οποία συγκρατεί σε λειτουργική σύνδεση μεταξύ τους. Η συναρμολόγηση των συμπλόκων λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, πιθανώς μετά την πρωτεϊνοσύνθεση και αναδιάταξη των CDK (Cheng M et al, 1999).

Επιπλέον η απουσία αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού, τόσο στις CDK όσο και στις κυκλίνες, σε αντίθεση με την  $P21^{WAF1}$  η οποία



διαθέτει τέτοια αλληλουχία, προσδίδει στην τελευταία το μοριακό ρόλο του μεσολαβητή μεταφοράς του συμπλόκου από την περιφέρεια στον πυρήνα (Cheng M et al, 1999).

Βέβαια αναφέρεται ότι η κυκλίνη D δύναται να εισέλθει σε μικρό ποσοστό στον πυρήνα χωρίς διαμεσολάβηση. Ως εκ τούτου η P21<sup>WAF1</sup> λειτουργεί κυρίως ως ενισχυτής της πυρηνικής εισόδου των συμπλόκων. Επιπλέον αναφέρεται ότι η P21<sup>WAF1</sup> εμποδίζει την επιστροφή της κυκλίνης D<sub>1</sub> στο κυτταρόπλασμα μέσω απευθείας αναστολής της εξπορτίνης, μιας πρωτεΐνης που επιτρέπει την έξοδο μορίων διαμέσου της πυρηνικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα (Alt JR et al, 2002).

Η παρουσία λοιπόν του P21<sup>WAF1</sup> κρίνεται σημαντική για την πυρηνική δράση των συμπλόκων του κυτταρικού κύκλου.

### **Ο διπλός ρόλος της πρωτεΐνης P21<sup>WAF1</sup> ως επαγωγέας και αναστολέας της απόπτωσης.**

Πέραν της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, υποστηρίζεται ότι η P21<sup>WAF1</sup> συμμετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω διαφόρων μηχανισμών που αναλύονται παρακάτω.

Η υπερέκφραση P21<sup>WAF1</sup> σε θυμοκύτταρα *in vivo* σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην ακτινοβολία, μηχανισμός που περιλαμβάνει και την αύξηση της πρωτεΐνης p53 (Fotedar R et al, 1999). Ομοίως υπερέκφραση της P21<sup>WAF1</sup> σε όγκους μαστού που δεν εξέφραζαν p53 οδήγησε σε αυξημένο αποπτωτικό δείκτη (Shibata MA et al, 2001). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος και καρκίνου των ωοθηκών (Kondo S et al, 1996 / Lincet H et al, 2000). Αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση P21<sup>WAF1</sup> ενίσχυσε την απόπτωση που προκαλούσε η χορήγηση *cis*-πλατίνης. Η δημιουργία κυτταρικής σειράς καρκίνου ωοθηκών με αυξημένη έκφραση P21<sup>WAF1</sup> παρουσίασε επίσης αυξημένη ευαισθησία σε επαγόμενη απόπτωση από αντινεοπλασματικά φάρμακα. Στον καρκίνο των ωοθηκών το φαινόμενο αυτό αναφέρεται και για άλλες κυτταρικές σειρές.

Επίσης περιγράφεται σαφής σχέση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax με την P21<sup>WAF1</sup>. Η καλλιέργεια κυτταρικής σειράς ηπατώματος με την ουσία C<sub>6</sub>-

ceramide, οδήγησε στην απόπτωση των κυττάρων του ηπατώματος (Kang KH et al, 1999). Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίστηκε από αυξημένη συγκέντρωση P21<sup>WAF1</sup> και Bax. Το ίδιο φαινόμενο προκλήθηκε και με τη χορήγηση ρετινοϊκού οξέος (Hsu SL et al, 1999). Η χρησιμοποίηση μικρών αλληλουχιών RNA με στόχο την αποσιώπηση του mRNA του P21<sup>WAF1</sup> ελάττωσε σημαντικά τον αποπτωτικό φαινότυπο. Οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών προκαλούν επίσης απόπτωση μέσω του ίδιου μηχανισμού. Αναφέρονται παρόμοια αποτελέσματα από τον αναστολέα τυροσινικών κινασών genistein (Li Y et al, 1999).

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα προκύπτουν από την χορήγηση της κωδικοποιού αλληλουχίας του P21<sup>WAF1</sup> σε κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Tsao YP et al, 1999). Η διαμόλυνση των εν λόγω κυττάρων με αδενοϊό που φέρει την κωδικοποιού αλληλουχία για το P21<sup>WAF1</sup> ωθεί τα κύτταρα αυτά σε απόπτωση. Το φαινόμενο αυτό δε συμβαίνει στην περίπτωση διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική της κωδικοποιού αλληλουχία. Η είσοδος του αδενοϊού και η έκφραση του P21<sup>WAF1</sup> σχετίστηκε με αύξηση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου bcl-2, το οποίο όμως δεν ήταν αρκετό για να εμποδίσει την απόπτωση. Το παραπάνω φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε σε αντίστοιχα πειράματα που έλαβαν χώρα με μελανωματικά κύτταρα, υπονοώντας ότι η επαγόμενη από το P21<sup>WAF1</sup> απόπτωση παρουσιάζει εξειδίκευση αναλόγως του οργάνου και πιθανώς του ιστολογικού τύπου.

Συσχέτιση αναφέρεται και με τον αποπτωτικό μηχανισμό Fas-FasL/CD95. Η μειωμένη έκφραση του P21<sup>WAF1</sup> σε T-λεμφοκύτταρα παρεμποδίζει σε μεγάλο βαθμό την απόπτωση που ενεργοποιείται από το παραπάνω μονοπάτι. Το αντίθετο παρατηρείται σε T-λεμφοκύτταρα που δύνανται να εκφράσουν P21<sup>WAF1</sup> και τα οποία παρουσία του FasL αποπίπτουν σε συντριπτικό ποσοστό (Hingorani R et al, 2000).

Παρόμοιες μελέτες έχουν διενεργηθεί και σε επίπεδο πρόκλησης απόπτωσης με διάφορες ουσίες και κυτταροστατικά φάρμακα. Έτσι παρουσία της P21<sup>WAF1</sup> αυξάνεται η επαγόμενη απόπτωση από αντιοξειδωτικές ουσίες (reservatrol, βιταμίνη E) (Kuo PL et al, 2002) και από γνωστά κυτταροστατικά φάρμακα όπως η μεθοτρεξάτη και η ντοξορουμικίνη (Li WW et al, 1997).

Πέραν όμως της δράσης της P21<sup>WAF1</sup> ως επαγωγέας της απόπτωσης, ως ισχυρή πλέον εμφανίζεται και η αντίθετη άποψη που προτείνει την P21<sup>WAF1</sup> ως αντι-αποπτωτικό παράγοντα. Η άποψη αυτή έχει δημιουργήσει μια νέα αντίληψη για τις λειτουργίες της P21<sup>WAF1</sup> στην οποία αποδίδονται έτσι τόσο ιδιότητες ογκοκατασταλτικού γονιδίου όσο και ογκογονιδίου. Η αντι-αποπτωτική της δράση προτείνεται ότι συμβαίνει μέσα από διαφορετικούς μηχανισμούς.

Η P21<sup>WAF1</sup> φαίνεται ότι προσδέεται με την προκασπάση 3 και την απενεργοποιεί προστατεύοντας από απόπτωση. Η χορήγηση ουσιών που επηρεάζουν το DNA ωθεί σε απόπτωση αφού η P21<sup>WAF1</sup> αποδεσμευθεί από την προκασπάση-3. Η μετατροπή της τελευταίας σε κασπάση-3 έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της P21<sup>WAF1</sup> με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Zhang Y et al, 1999). Το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο τριπτολίδη ενισχύει την απόπτωση που επάγει η ντοξορουμπικίνη μέσω αύξησης της p53 και ελάττωσης της συγκέντρωσης της P21<sup>WAF1</sup> (Chang WT et al, 2001). Η ετοποσίδη – αναστολέας της τοποϊσομεράσης II – αδυνατεί να προκαλέσει απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος που υπερεκφράζουν P21<sup>WAF1</sup> (Prabhu NS et al, 1999)

Ομοίως το οξειδωτικό stress επάγει απόπτωση μέσω της p53 αλλά ταυτόχρονα αυξάνει και την έκφραση του P21<sup>WAF1</sup> τόσο μέσω όσο και ανεξαρτήτως της p53 (Migliaccio E et al, 1999). Σε μακροφάγα, το νιτρικό οξείδιο επάγει την έκφραση της p53 και της P21<sup>WAF1</sup>. Η εξουδετέρωση του mRNA του P21<sup>WAF1</sup> με συμπληρωματική αλληλουχία (anti-sense) κατ' ουσία μειώνει την P21<sup>WAF1</sup> και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα για απόπτωση (Yang F et al, 2000). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε λείες μυϊκές ίνες αγγείων. Παρόμοια επίσης αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε καταστάσεις υπεροξίας (Gartel AL and Tyner AL, 2002). Η παρουσία της P21<sup>WAF1</sup> εξασφαλίζει σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση. Η απουσία του P21<sup>WAF1</sup> έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου και την ταυτόχρονη επαγωγή της απόπτωσης.

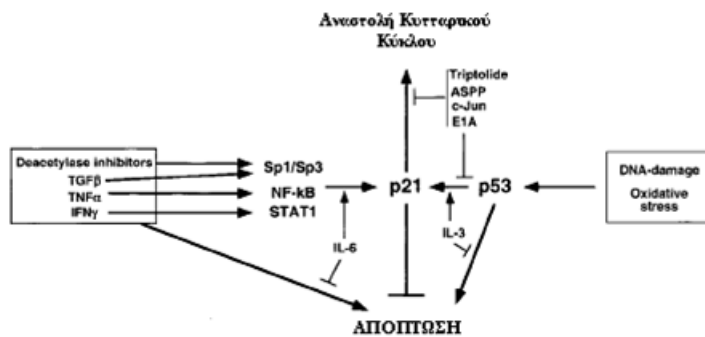
Ο TGFβ επάγει την έκφραση του P21<sup>WAF1</sup> και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, προστατεύοντας από απόπτωση (Gartel AL and Tyner AL, 2002).

Ο TNFα και ο FasL/CD95 αναφέρεται ότι είναι τοξικοί για συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές κυρίως μέσω απόπτωσης που οφείλεται σε δράση κασπασών. Ο TNFα πυροδοτεί απόπτωση μέσω μονοπατιών που εξαρτώνται από τον NFκB. Αποδείχτηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της P21<sup>WAF1</sup> παρουσία του TNFα

εξαρτάται από τον NFκB. Αναστολή του NFκB ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στη δράση του TNFα. Αντιθέτως υπερέκφραση P21<sup>WAF1</sup> προστατεύει από απόπτωση (Javelaud D et al, 2000). Τα ίδια αποτελέσματα αναφέρονται και σε καρκινικές σειρές μαστού όπου μικρά παρεμβάλλοντα μόρια RNA που αποσιωπούν το μήνυμα του P21<sup>WAF1</sup> γονιδίου αυξάνουν το ποσοστό απόπτωσης των κυττάρων. Παρομοίως αποσιώπηση του P21<sup>WAF1</sup> αύξησε το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων μετά από χορήγηση FasL σε κυτταρική σειρά γλοιώματος (Gartel AL and Tyner AL, 2002).

Η ιντερφερόνη-γ αυξάνει την έκφραση του P21<sup>WAF1</sup> μέσω του STAT μονοπατιού. Η χορήγηση ιντερφερόνης τόσο σε κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου όσο και σε μακροφάγα, αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 αλλά ταυτοχρόνως προστατεύει από απόπτωση. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και με τη χορήγηση ιντερλευκίνης-6 η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι STAT (Hobeika AC et al, 1999).

Στοιχεία επίσης υπέρ της αντι-αποπτωτικής δράσης της P21<sup>WAF1</sup> προκύπτουν από τη χορήγηση αναστολέων του ενζύμου αποακετυλάσης των



ιστονών και διαφόρων κυτταροστατικών φαρμάκων όπως η BCNU και η ταξόλη.

**Εικόνα Δ5:** Το p21<sup>WAF1</sup> φαίνεται ότι αναστέλλει την απόπτωση τόσο μέσω όσο και ανεξαρτήτως του p53 (Gartel & Tyner, 2002)

**Τελικά όμως ποιός ρόλος της P21<sup>WAF1</sup> είναι ο πιθανότερος να συμβαίνει in vivo;**

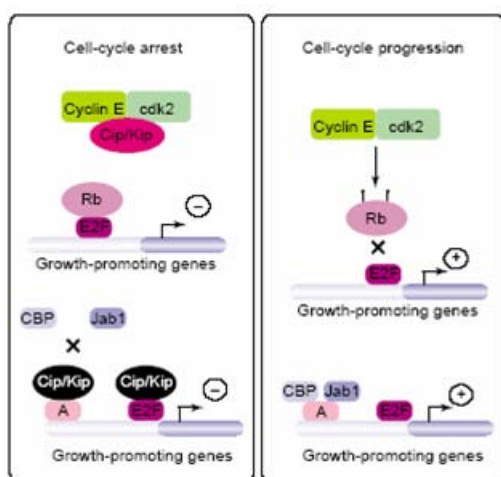
Η απάντηση δεν δύναται να δοθεί με βεβαιότητα. Φαίνεται ότι η έκφραση της P21<sup>WAF1</sup> είναι μεν σημαντική αλλά όχι και η μοναδική αιτία προκειμένου ένα κύτταρο να προχωρήσει σε απόπτωση. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει το

ιστολογικό περιβάλλον. Η έκφραση και η ρύθμιση της P21<sup>WAF1</sup> διαφέρει στους διάφορους ιστούς. Επιπλέον η απόπτωση είναι ο φαινότυπος μιας αλληλεπίδρασης προ- και αντι- αποπτωτικών παραγόντων τους οποίους συνήθως και εκ του αντικειμένου αδυνατούν να συνυπολογίσουν οι διάφορες μελέτες. Παράδειγμα είναι το φάρμακο ντοξορουμπικίνη (επαγωγέας έκφρασης P21<sup>WAF1</sup>) που αναφέρεται να επάγει και να αναστέλλει την απόπτωση κατά περίπτωση καθώς και η καμπτοθεκίνη (επαγωγέας έκφρασης P21<sup>WAF1</sup>) που σε μικρή συγκέντρωση αναστέλλει και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση επάγει την απόπτωση (Liu S et al, 2003).

Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα γίνεται ακόμα πιο σύνθετη λαμβάνοντας υπόψη αποτελέσματα από ποντίκια που δεν εξέφραζαν p21<sup>WAF1</sup>. Τα ποντίκια αυτά σε ηλικία 16 μηνών ανέπτυξαν ενδοθηλιακούς όγκους ή αιμοποιητικές νεοπλασίες και σε μικρότερο ποσοστό ενδοθηλιακά νεοπλάσματα (Martin-Caballero et al, 2001). Τα ίδια ποντίκια όμως ήταν ανθεκτικά στην πρόκληση όγκων του δέρματος με ιοντίζουσα ακτινοβολία. Στον ίδιο δηλαδή οργανισμό το ίδιο γονίδιο δρα τόσο ως ογκοκατασταλτικό όσο και ως ογκογονίδιο.

Είναι λοιπόν σαφές ότι η τελική απάντηση σχετικά με τη δράση του P21<sup>WAF1</sup> προκύπτει με την αξιολόγηση του γενετικού υπόβαθρου πάνω στο οποίο επισυμβαίνουν οι παρεμβάσεις ογκογένεσης ή θεραπείας του καρκίνου.

### Άλλοι ρόλοι της p21<sup>WAF1</sup>.



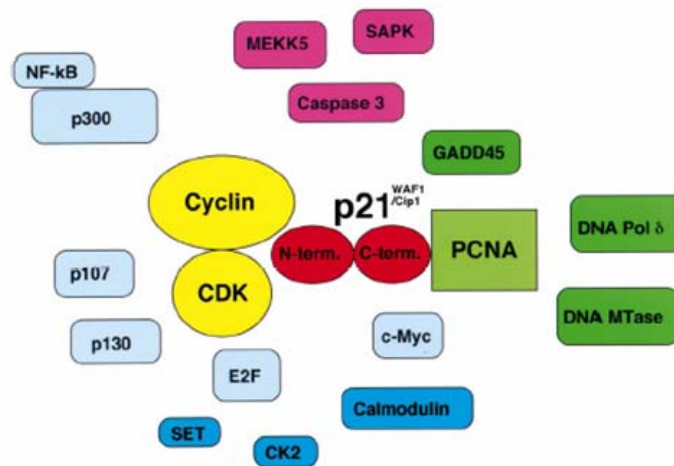
**Εικόνα Δ6:** Η p21<sup>WAF1</sup> αναστέλλει έμμεσα και άμεσα την κυτταρική αύξηση μέσω αλληλεπίδρασης με τους E2F

Πέραν της πρόσδεσης στα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλίνης, η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1</sup> ρυθμίζει έμμεσα ή άμεσα διάφορα γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε διαδικασίες κυτταρικής αύξησης και προαγωγής του κυτταρικού κύκλου. Έχει παρατηρηθεί ότι η διαδικασία ρύθμισης είναι ανεξάρτητη από την αναστολή των CDK, καθώς μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης που δεν συνδέονται με τις CDK, μπορούν να

συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση των εν λόγω γονιδίων (Delavaine L and La Thangue NB, 1999). Μερικά από τα βασικά γονίδια που εμπλέκονται περιγράφονται παρακάτω:

1. Ο παράγοντας E2F. Αναστέλλεται εμμέσως μέσω αποφωσφορυλίωσης του γονιδίου RB, που συμβαίνει κατά την αναστολή της CDK καθώς και άμεσα με απευθείας επαφή.
2. Ο παράγοντας NFκB. Παρατηρείται αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του μονοπατιού του NFκB, μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα CBP/P300. Περιγράφεται ότι η CBP/P300 συναντάται σε ανενεργή μορφή όταν είναι προσδεδεμένη με ενεργά σύμπλοκα CDK-κυκλίνης. Η πρόσδεση της  $p21^{WAF1}$  απελευθερώνει την CBP/P300 η οποία πλέον ρυθμίζει την ακετυλίωση των ιστονών. Κατ'αυτόν τον τρόπο η  $p21^{WAF1}$  εμπλέκεται σε βασικές αλληλεπιδράσεις το DNA με τους μεταγραφικούς παράγοντες.
3. Ο παράγοντας STAT3.
4. Το ογκογονίδιο Myc.

**Εικόνα Δ7:** Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της  $p21^{WAF1}$  με άλλες πρωτεΐνες (Dotto, 2000)



Ανακεφαλαιώνοντας την παρουσίαση της  $p21^{WAF1}$  είναι σαφής ο πολυδύναμος ρόλος της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η συμμετοχή της σε κάθε διαδικασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποδεικνύεται ουσιαστική. Σε περίπτωση υπερπλασίας, η παρουσία ή η απουσία του  $p21^{WAF1}$  καθορίζει σε μεγάλο ποσοστό την αποτελεσματικότητα θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Στα πλαίσια αυτά και με δεδομένο το γεγονός ότι η αγγειογένεση θεωρείται μια προκλητή υπερπλαστική διαδικασία, είναι λογικό να ρυθμίζεται και από την p21<sup>WAF1</sup>. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους που αποφασίστηκε η μελέτη της έκφρασης του στην αγγειογένεση της νεοπλασίας.

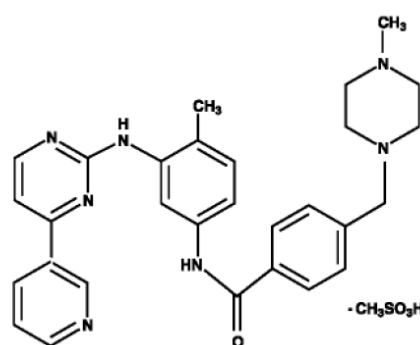
## E. Το μόριο Imatinib mesylate/STI-571 και οι δράσεις του

Πρόκειται για ένα μόριο που κυκλοφόρησε το 2001 με άδεια από το FDA με αρχική ένδειξη τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Από τότε το συγκεκριμένο σκεύασμα έχει αποκτήσει άδεια για τη χορήγησή του σε θεραπεία στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού σωλήνα.

### Βασικά βιοχημικά στοιχεία.

Η Imatinib αφορά την χημική ένωση 4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phenyl]benzamide methanesulfonate με μοριακό τύπο C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O • CH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub> και εκτιμώμενο μοριακό βάρος 589,7. Συναντάται ως κρυσταλλική σκόνη λευκωπού έως υποκίτρινου χρώματος, η οποία είναι λίαν διαλυτή σε νερό και όξινα υδατικά

ρυθμιστικά διαλύματα (pH ≤ 5.5) και αδιάλυτη σε βασικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τα έκδοχα που συνοδεύουν το εμπορικό σκεύασμα είναι τα colloidal silicon dioxide (NF), crospovidone (NF), magnesiumstearate (NF) and microcrystalline cellulose (NF). Η κάψουλα που περικλείει τη σκόνη της Imatinib αποτελείται από τα gelatin, iron oxide, red(E172); iron oxide, yellow (E172); titanium dioxide (E171). Τα έκδοχα που συνοδεύουν τη σκόνη της Imatinib είναι αποδεδειγμένα ανενεργές ουσίες και αδιάλυτες σε υδατικό περιβάλλον (US Food and Drug Administration-Centre for Drug Evaluation and Research: Imatinib Mesylate Revised Product Label (12/8/2003)-<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2003/021588s0021bl.pdf>)



Εικόνα E1: Ο συντακτικός τύπος της Imatinib

### **Μοριακός μηχανισμός δράσης**

Η Imatinib είναι αναστολέας τυροσινικών κινασών (Roskorski Jr, 2003). Έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλει με επιτυχία την υβριδική κινάση BCR-ABL, η οποία είναι προϊόν του χρωμοσώματος Philadelphia της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (R.Kurzrock et al, 2003). Για το λόγο αυτό έλαβε ένδειξη χορήγησης ως μονοθεραπεία με θεαματικά αποτελέσματα (O'Dweyer et al, 2000). Επιπλέον βρέθηκε να αναστέλλει τον υποδοχέα c-kit (Heinrich MC et al, 2000) με άμεσο αποτέλεσμα την αντινεοπλασματική του δράση επί νεοπλασμάτων που εκφράζουν τον εν λόγω υποδοχέα. Πρόσφατα για αυτό το λόγο η Imatinib ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως εγκεκριμένη θεραπεία των στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού σωλήνα (GIST) και παραμένει ανοιχτό το θέμα σε άλλες νεοπλασίες που εκφράζουν c-kit (DeMateo RP, 2002 / Zhang P et al, 2002). Τέλος η Imatinib έχει δείχτει να αναστέλλει τους αναστολείς του PDGF (Greco A et al, 2001 / McGary et al, 2002 / George D, 2001). Η εμπλοκή με αυτούς τους υποδοχείς, έθεσε την Imatinib ανάμεσα στους υποψήφιους αντι-αγγειογενετικούς πρωταγωνιστές. Με αυτό το σκεπτικό η Imatinib χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

---

### **ΣΤ. Τα ερευνητικά ερωτήματα που τέθησαν σε αυτή τη μελέτη**

---

Κατά την παρούσα μελέτη μελετήθηκε η επίδραση του νεοπλασματικού περιβάλλοντος στα ενδοθηλιακά κύτταρα που με τη σειρά τους ορίζουν τον ενδοθηλιακό αγγειακό φραγμό (endothelial barrier) δια του οποίου γίνεται η τροφοδότηση του νεοπλασματικού όγκου με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την τοπική αύξηση και ακολούθως η μετάσταση. Με τον όρο νεοπλασματικό περιβάλλον θεωρήθηκε το σύνολο των εκκρινόμενων ή απεκκρινόμενων ουσιών που προέρχονται από το νεοπλασματικό κύτταρο ασχέτως του τρόπου δράσης του, (ενδοκρινής, αυτοκρινής ή παρακρινής δράση). Ο ενδοθηλιακός φραγμός στην παρούσα μελέτη αποκτά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά: αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως αυτά είναι οργανωμένα τελικώς σε νεόπλαστα τριχοειδή ή μεγαλύτερα αγγεία, αλλά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε προ του οργανωμένου τριχοειδούς φάσεις ήτοι τα συμμετέχοντα



στην αγγειογένεση. Το γεγονός αυτό αποφασίστηκε καθώς ο ενδοθηλιακός φραγμός είναι μια έννοια που αφορά το σύνολο των ενδοθηλίων τα οποία συνεχώς οργανώνονται σε ένα δυναμικά ρυθμιζόμενο σύστημα, το αγγειακό δίκτυο. Η αγγειογένεση εκτιμάται σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο στο πρώτο μέρος της μελέτης. Επιπλέον ο ενδοθηλιακός φραγμός διακρίνεται για τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας του. Εν προκειμένω η διαπερατότητα αφορά α) χημικές ενώσεις και στοιχεία και β) κυτταρικά στοιχεία όπως είναι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα μακροφάγα και στην περίπτωση νεοπλασίας και τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα. Η διαπερατότητα σε κυτταρικά στοιχεία εκτιμάται σε ιστολογικό επίπεδο με τη μελέτη των μορίων προσκόλλησης στο πρώτο μέρος και η διενδοθηλιακή-παραενδοθηλιακή διαπερατότητα σε ουσίες καθώς και τρόποι αλλαγής αυτής περιγράφονται στο δεύτερο μέρος της μελέτης

**Μέρος Α (Ενότητες αποτελεσμάτων Α-Ε):** Το πρώτο μέρος αφορά την επίδραση του νεοπλασματικού περιβάλλοντος στον αγγειακό ενδοθηλιακό φραγμό. Με δεδομένο το μεγάλο εύρος των επιδράσεων η μελέτη περιορίστηκε σε έκφραση μορίων που σχετίζονται με την αγγειογενετική διαδικασία και στη μελέτη του τρόπου αλλαγής του ενδοθηλιακού κυτταρικού κύκλου όταν ένα ενδοθηλιακό κύτταρο δέχεται αγγειογενετικό μήνυμα από ένα νεόπλασμα. Απώτερος στόχος ήταν η εντόπιση μοριακών δεικτών που χαρακτηρίζουν τα ενδοθήλια των όγκων και η εύρεση πιθανών τρόπων παρέμβασης στην αγγειογενετική διαδικασία.

Τα επιστημονικά ερωτήματα που τέθηκαν για απάντηση ήταν τα ακόλουθα:

1. Με δεδομένη τη διαφορά έκτασης της αγγειογένεσης σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς, υπάρχει τρόπος ποσοτικής ανίχνευσης της διαφοράς αυτής;
2. Μπορούν άλλοι ενδοθηλιακοί δείκτες να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση της έκτασης της αγγειογένεσης;
3. Υπάρχουν συγκεκριμένα μόρια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται όταν ένα ενδοθηλιακό κύτταρο αναπτύσσεται εντός νεοπλασματικού περιβάλλοντος; Εάν ναι πώς σχετίζονται αυτά με την αγγειογένεση
4. Πως μεταβάλλεται ο κυτταρικός κύκλος των ενδοθηλιακών κυττάρων όταν δεχθούν αγγειογενετική επίδραση από νεοπλασματικά κύτταρα;

5. Υπάρχει κάποιο μοριακό «σταυροδρόμι» από το οποίο θα διέρχεται κάθε αυξητική ή ανασταλτική επίδραση επί του ενδοθηλιακού κυττάρου;
6. Είναι δυνατή η αναστολή του αγγειογενετικού μηνύματος μέσω μοριακής ή άλλης παρέμβασης;

**Μέρος Β (Ενότητα αποτελεσμάτων ΣΤ):** Στο δεύτερο μέρος της μελέτης διενεργήθηκαν προσπάθειες παρέμβασης στη διαπερατότητα του ενδοθηλιακού φραγμού με την εξωγενή χορήγηση ουσιών. Η λογική αυτής της παρέμβασης στηρίζεται στην παρατήρηση ότι ο ενδοθηλιακός φραγμός είναι ένα σημαντικό ανατομικό και λειτουργικό εμπόδιο κατά την εφαρμογή τοπικών και τοπικο-περιοχικών χημειοθεραπειών σε διάφορα νεοπλάσματα. Ο ενδοθηλιακός φραγμός ως όρος περιλαμβάνει όχι μόνο τα νεόπλαστα τριχοειδή αλλά και μεγαλύτερα αγγεία που διατηρούν μεν την δομή ενός φυσιολογικού αγγείου, πλην όμως γειτνιάζουν με τον πρωτοπαθή όγκο ή τις δευτερογενείς εντοπίσεις και αργά ή γρήγορα θα δεχθούν αγγειογενετικές επιδράσεις για να συμβάλλουν στην εξάπλωση της νόσου. Με δεδομένο το γεγονός ότι η τοπική ή η περιοχική χημειοθεραπεία λειτουργεί και ως τρόπος ογκολογικής «αποστείρωσης» του πληγέντος οργάνου, η μελέτη αποφασίστηκε να διενεργηθεί επί των EA.hy 926 ενδοθηλιακών κυττάρων αρχικώς με και χωρίς την επίδραση του όγκου, με ή χωρίς δηλαδή την συγκαλλιέργεια των παραπάνω κυττάρων με Tumor Conditioned Medium.

Μελετήθηκαν οι αλλαγές που προκαλεί στο ενδοθηλιακό κύτταρο ο αναστολέας τυροσινικής κινάσης Imatinib. Έχοντας υπόψη: α) τη συσχέτιση του PDGF και των υποδοχέων του με την αγγειογένεση και κυρίως με την δημιουργία συμπαγούς και αδιαπέραστου αγγείου-μέσω οργάνωσης των περικυττάρων- και β) την δεδομένη αντι-PDGFR δράση της Imatinib, τα ερωτήματα που τέθηκαν ήταν τα παρακάτω:

1. α. Υπάρχει επίδραση της Imatinib στο ενδοθήλιο;  
β. Εάν ναι, σχετίζεται με αναστολή υποδοχέων PDGF;
2. α. Η Imatinib επηρεάζει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα;  
β. Εάν ναι, με ποιόν πιθανό μηχανισμό;

---

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

## Κυτταρικές καλλιέργειες

### **A. Βασικές τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών**

Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκε η ενδοθηλιακή σειρά EA.hy 926 η οποία ήταν μια ευγενική προσφορά της Prof CJ Edgell, του πανεπιστημίου της Βόρειας Καρολίνας, Η.Π.Α. καθώς και η κυτταρική σειρά MDA-MB-468, η οποία προέρχεται από καρκίνωμα μαστού. Οι δύο κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστή που διατηρούσε σταθερή θερμοκρασία (37°C) και ατμόσφαιρα (5% CO<sub>2</sub>, 95% ατμοσφαιρικό αέρα). Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω:

#### Θρεπτικό μέσο για τη σειρά EA,hy 926:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη εμπλουτισμένο με Glutamax (γλουταμίνη-αλανίνη).
- 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη

#### Θρεπτικό μέσο για τη σειρά MDA-MB-468:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη εμπλουτισμένο με Glutamax (γλουταμίνη-αλανίνη).
- 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum-FBS)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη

Η συντήρηση των εν λόγω σειρών έγινε σε στείρες πλαστικές φλάσκες που υπέστησαν ειδική επεξεργασία προκειμένου να προσκολλώνται κύτταρα σε μια από τις εσωτερικές τους επιφάνειες. Κατά την καλλιέργεια, το θρεπτικό μέσο ανανεώνονταν κάθε τρεις ημέρες και το πέρασμα από μια φλάσκα σε μια άλλη πραγματοποιούνταν επί κορεσμού της επιφάνειας (confluence). Η διαδικασία πέρασματος από τη μια φλάσκα στην επόμενη πραγματοποιούνταν ως εξής:

#### **i. Υποκαλλιέργεια κυττάρων (Subculture or split)**

- Αναρρόφηση και απόρριψη του θρεπτικού μέσου

- Ξέπλυμα του μονοστρώματος της καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό ή διάλυμα PBS, και εν συνεχεία αναρρόφηση του διαλύματος
- Προσθήκη 2ml διαλύματος τρυψίνης και επώαση στους 37°C για 5 min
- Εξουδετέρωση της τρυψίνης με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό.
- Ανάδευση του εναιωρήματος των κυττάρων με πιπέτα προκειμένου να σπάσουν και οι τελευταίες μεσοκυττάρια συνδέσεις και να προκύψει εναιώρημα απλών κυττάρων και όχι συσσωματωμάτων
- Μεταφορά ενός μέρους από το εναιώρημα σε νέα φλάσκα στην οποία έχει ήδη προστεθεί φρέσκο θρεπτικό μέσο.
- Ήπια ανάδευση της νέας φλάσκας και επώαση.

Η διατήρηση των κυτταρικών σειρών επί μακρό χρονικό διάστημα γίνεται με την τοποθέτηση αυτών σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου. Η θερμοκρασία που εξασφαλίζει την απόλυτη βιωσιμότητα των κυττάρων είναι η θερμοκρασία εντός υγρού αζώτου (περίπου -170°C). Έχει αποδειχτεί όμως ότι και σε υψηλότερες θερμοκρασίες δύνανται να συντηρηθούν κύτταρα με αυξημένο ρυθμό όμως απόπτωσης ανά μήνα. Η αδυναμία συντήρησης διατάξεων υγρού αζώτου οδήγησε στη χρήση υπερκαταψύκτη (θερμοκρασία από -70°C έως και -85°C). Η εμπειρία από τη χρήση του έδειξε δυνατότητα συντήρησης κυττάρων περίπου επί διετία. Περαιτέρω διατήρηση της κυτταρικής σειράς απαιτεί απόψυξη, επανακαλλιέργεια αυτής και νέα συντήρηση σε υπερκαταψύκτη. Τα πρωτόκολλα ψύξης και απόψυξης των κυττάρων περιγράφονται παρακάτω:

## ii. Ψύξη ζώντων κυττάρων

- Στη φάση του εξουδετερωμένου εναιωρήματος, όπως αυτό περιγράφεται στο πρωτόκολλο υποκαλλιέργειας, λαμβάνεται μικρό δείγμα για να μετρηθεί η συγκέντρωση των κυττάρων.

- Το εναιώρημα φυγοκεντρείται (3000rpm/10min) και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο ψύξης (Freezing medium) έως επίτευξης συγκέντρωσης  $10^6$  κύτταρα ανά ml.
- Το νέο εναιώρημα μοιράζεται σε φύσιγγες ανθεκτικές σε χαμηλές θερμοκρασίες (Cryo-vials) και τοποθετείται σε διάταξη (Mr. Frosty, Nalgene, U.S.A.) η οποία εξασφαλίζει σταθερή ελάττωση θερμοκρασίας  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  όταν τοποθετείται σε θερμοκρασία  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Οι φύσιγγες εν συνεχεία τοποθετούνται σε υπερκαταψύκτη και διατηρούνται.

Σύνθεση του μέσου ψύξης:

- 50% DMEM
- 40% FBS
- 10% Διάλυμα DMSO

**iii. Απόψυξη ζώντων κυττάρων:**

- Προετοιμασία υδατόλουτρου στους  $40^{\circ}\text{C}$ .
- Ταχεία έξοδος της φύσιγγας από τον υπερκαταψύκτη, κάλυψη της με υδατοστεγή μεμβράνη (parafilm) και εμβάπτιση της στο υδατόλουτρο.
- Μόλις η φύσιγγα αποψυχθεί, αποσύρεται από το υδατόλουτρο, αφαιρείται η μεμβράνη, καθαρίζεται εξωτερικά με διάλυμα αιθανόλης 70% και εν συνεχεία ανοίγεται στον αποστειρωμένο πάγκο εργασίας (Hood).
- Το εναιώρημα φυγοκεντρείται (3000rpm/10min) και η πελλέτα επαναδιαλύεται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο.
- Το νέο πλέον εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας και τοποθετείται στον επωαστή.
- Την επόμενη ημέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου, προκειμένου να αφαιρεθούν τα νεκρά κύτταρα από την καλλιέργεια τα οποία πυροδοτούν αποπτωτικούς μηχανισμούς.

Επιλογή ζώντων κυττάρων σε φύσιγγες με χαμηλή βιωσιμότητα:

Σε περίπτωση που η βιωσιμότητα των κυττάρων μιας φύσιγγας είναι μικρότερη του 50% η αλλαγή του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται έξι ώρες μετά την έναρξη της επώασης. Κατ'αυτόν τον τρόπο ο αρχικός πληθυσμός είναι μικρότερος του αναμενόμενου, απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος για την λήψη ικανού κυτταρικού πληθυσμού προκειμένου να σταθεροποιηθεί η καλλιέργεια, πλην όμως ο μικρός ενεργός πληθυσμός είναι σε θέση να πολλαπλασιαστεί χωρίς να δέχεται ισχυρά αποπτωτικά μηνύματα από το πλήθος των νεκρών κυττάρων.

## **B. Καλλιέργεια σε υάλινα πλακίδια με αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο.**

Η ανάγκη πραγματοποίησης ανοσοϊστοχημικών μελετών καθώς και συγκαλλιιεργειών οδήγησαν στην ανάγκη εύρεση κατάλληλης επιφάνειας που αφενός πάνω της τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν, αφετέρου είναι δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία χωρίς δυσκολία. Προς αυτή την κατεύθυνση δοκιμάστηκαν διάφορα υάλινα πλακίδια, εκ των οποίων, από συγκριτική παρατήρηση του ρυθμού καλλιέργειας και της συμπεριφοράς των κυττάρων, αποδείχτηκε ότι η καλύτερη επιλογή είναι τα αρνητικώς φορτισμένα πλακίδια τύπου SuperFrost Plus. Τα πλακίδια αυτά λόγω του φορτίου τους επιτρέπουν την προσκόλληση των ζώντων κυττάρων σε εναιώρημα χωρίς πρόσθετη επεξεργασία. Είναι χαρακτηριστικό ότι άλλες υάλινες επιφάνειες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια κυττάρων, απαιτούν προηγούμενη επεξεργασία με Gelatin, κολλαγόνο ή φμπρονεκτίνη, αυξάνοντας το κόστος της καλλιέργειας. Παρακάτω παρουσιάζονται τα πρωτόκολλα καλλιέργειας σε πλακίδια SuperFrost Plus (SFP), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

### ***Αποστείρωση των πλακιδίων SFP***

Αποστείρωση των  
πλακιδίων SFP

- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε διάλυμα απόλυτης αιθανόλης για 2 λεπτά.
- Ανάσυρση τους με αποστειρωμένη, σε φλόγα, λαβίδα και τοποθέτηση τους σε τριβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10cm ή 15cm.

Εναλλακτικά στην παρούσα μελέτη τα πλακίδια αποστειρώθηκαν μέσα στα τριβλία καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας τον κλίβανο πλάσματος του Γενικού Νοσοκομείου Αγίου Νικολάου, Λασιθίου,

Κρήτης. Με τον κλίβανο πλάσματος εξασφαλίζεται αποστείρωση σε μικρή θερμοκρασία χωρίς να καταστρέφονται ευαίσθητα υλικά όπως είναι τα πλαστικά τριβλία.

### ***Καλλιέργεια κυττάρων επί των πλακιδίων SFP***

Καλλιέργεια επί των SFP

- Τοποθέτηση ενός SFP πλακιδίου μέσα σε ένα τριβλίο καλλιέργειας διαμέτρου 10cm
- Εναπόθεση 400μl εναιωρήματος κυττάρων με συγκέντρωση  $10^6$  κύτταρα/ml και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10min.
- Πλήρωση του τριβλίου με 10ml θρεπτικό μέσο και τοποθέτηση στον επωαστή.

### **Γ. Συγκαλλιέργειες κυτταρικών πληθυσμών.**

Η αλληλεπίδραση του νεοπλασματικού περιβάλλοντος με τον ενδοθηλιακό φραγμό, προϋποθέτει την αλληλεπίδραση τουλάχιστον δύο διαφορετικών πληθυσμών, των ενδοθηλιακών και των νεοπλασματικών κυττάρων. Στα πλαίσια αυτής της διατριβής και σε επίπεδο κυτταρικής καλλιέργειας, οι δύο αυτοί πληθυσμοί αντιπροσωπεύονται από τις δύο προαναφερόμενες κυτταρικές σειρές. Εύλογος ήταν λοιπόν ο σχεδιασμός και η εφαρμογή μοντέλων συγκαλλιέργειας.

Με δεδομένο το φαινόμενο της παρακρινούς δράσης των νεοπλασμάτων στα αγγεία χρησιμοποιήθηκαν δύο μοντέλα συγκαλλιέργειας. Το ένα αφορά τη χρήση θρεπτικού μέσου στο οποίο αναπτύχθηκε η καρκινική σειρά. Το δεύτερο αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της διατριβής και αφορά συγκαλλιέργειες σε πραγματικό χρόνο με την χρήση πλακιδίων SFP (Vrekoussis et al, 2004). Τα μοντέλα αυτά αναλύονται παρακάτω:

**i. Χρήση θρεπτικού μέσου στο οποίο καλλιεργήθηκε μια καρκινική σειρά (Tumor Conditioned Medium-TCM).** Πρόκειται για θρεπτικό μέσο χωρίς ορό FBS το οποίο συλλέγεται μετά από καλλιέργεια μιας καρκινικής σειράς μετά από καθορισμένο χρόνο. Η χρήση του στηρίζεται στην ιδέα ότι πέρα από την παροχή θρεπτικών συστατικών το TCM είναι και το μέσο στο οποίο εκκρίνονται ουσίες από τα καρκινικά κύτταρα. Η συγκέντρωση και η αναλογία των ουσιών αυτών είναι υπεύθυνες για το τελικό αποτέλεσμα επί των κυττάρων-στόχων της



επίδρασης, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο αποκλεισμός του FBS από το TCM εξασφαλίζει ότι η παρουσία παραγόντων στο μέσο προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα και μόνο και όχι και από τον ορό. Το TCM μετά τη συλλογή του καθαρίζεται από νεκρά κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα με φυγοκέντρηση και αποθηκεύεται σε υπερκατάψυξη (-70°C).

**ii. Ανάπτυξη μοντέλου συγκαλλιέργειας χρησιμοποιώντας πλακίδια SFP.** Πρόκειται για μοντέλο κατά το οποίο κυτταρικοί πληθυσμοί που έχουν αναπτυχθεί σε πλακίδια SFP αλληλεπιδρούν όντας στο ίδιο τριβλίο. Χρησιμοποιήθηκαν δύο παραλλαγές του μοντέλου.

iiα. Στην πρώτη παραλλαγή ο ένας πληθυσμός (η σειρά EA.hy 926) καλλιεργήθηκε σε πλακίδια και ο δεύτερος πληθυσμός (η σειρά MDA MB 468) σε τριβλίο διαμέτρου 10cm. Σε δεδομένη χρονική στιγμή, αλλάχτηκε το θρεπτικό μέσο στο τριβλίο που περιείχε την MDA MB 468 με θρεπτικό μέσο χωρίς FBS και εν συνεχεία το πλακίδιο με τη σειρά EA.hy 926 τοποθετήθηκε εντός του τριβλίου. Μετά από καθορισμένη διάρκεια καλλιέργειας το πλακίδιο αποσύρθηκε προς επεξεργασία ανοσοϊστοχημείας που περιγράφεται παρακάτω.

iiβ. Στη δεύτερη παραλλαγή και οι δύο πληθυσμοί καλλιεργήθηκαν σε πλακίδια και εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε κοινό τριβλίο με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό. Μετά από προκαθορισμένη διάρκεια καλλιέργειας τα πλακίδια αποσύρθηκαν από το μέσο για περαιτέρω επεξεργασία.

#### **Δ. Καλλιέργεια κυττάρων σε ημιδιαπερατά φίλτρα και εκτίμηση της διαπερατότητας.**

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση των συγκεκριμένων φίλτρων είναι η ικανότητα της προς εξέταση κυτταρικής σειράς να δημιουργεί μονοστρώματα. Η σειρά EA.hy 926 ως ενδοθηλιακή δημιουργεί μονόστρωμα και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα εκτίμησης της ενδοθηλιακής διαπερατότητας. Η διαδικασία της εκτίμησης της ενδοθηλιακής διαπερατότητας περιγράφεται παρακάτω:



- Τοποθέτηση 100 μl κυτταρικού εναιωρήματος (50000 κύτταρα/ml ανά φίλτρο και επώαση για 48-72 ώρες
- Έλεγχος μονοστρώματος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

- Επώαση με παράγοντες που πιθανώς να επηρεάζουν τη διαπερατότητα.
- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και τοποθέτηση διαλύματος ανθρώπινης αλβουμίνης 20% στο πάνω διαμέρισμα και διαλύματος 0,9% NaCl στο κάτω διαμέρισμα της διάταξης του φίλτρου.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα.
- Μέτρηση της διαχεόμενης πρωτεΐνης στο κάτω διαμέρισμα του φίλτρου με μέθοδο Bradford.

### **E. Μονιμοποίηση κυττάρων**

Τα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε πλακίδια SFP, προκειμένου να γίνει η περαιτέρω επεξεργασία, μονιμοποιούνται ως εξής:

#### ***Μονιμοποίηση κυττάρων επί πλακιδίων SFP.***

- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα των πλακιδίων με διάλυμα PBS
- Μονιμοποίηση των πλακιδίων με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε PBS για 10-15 min
- Αφαίρεση του διαλύματος παραφορμαλδεΐδης, προσθήκη διαλύματος αιθανόλης 70% και αεροστεγές σφράγισμα του δοχείου που περιέχει τα πλακίδια
- Συντήρηση των πλακιδίων στους 4°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

### **Z. Πείραμα εκτίμησης της ενδοθηλιακής μεταναστευτικότητας**

Κατά το πείραμα αυτό ενδοθηλιακά κύτταρα καλούνται να καλύψουν κενό που δημιουργείται με συγκεκριμένο τρόπο, παρουσία ή απουσία κάποιου παράγοντα. Το ποσοστό κάλυψης του κενού εκτιμάται ποιοτικά. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

#### ***Εκτίμηση ενδοθηλιακής μεταναστευτικότητας.***

- Σε τριβλία διαμέτρου 6 cm ή 10 cm καλλιεργούνται κύτταρα EA.hy 926 μέχρι την πλήρωση των τριβλίων και τη δημιουργία σταθερού μονοστρώματος

- Με αποστειρωμένο πλαστικό ρύγχος μικροπιπέτας χαράσσεται επίμηκες κενό, «τραυματίζοντας» το μονόστρωμα. Ανάλογα το τριβλίο και για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας δημιουργούνται τρία έως πέντε κενά ανά τριβλίο.
- Επώαση με ή χωρίς τον προς εξέταση παράγοντα για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα.
- Παρακολούθηση, αναγνώριση και φωτογράφιση των θέσεων «τραυματισμού» και μέτρηση του κενού.

## Τεχνικές Ανοσοανίχνευσης

---

Προκειμένου να ανιχνευθεί η έκφραση διαφόρων μορίων πραγματοποιήθηκαν τεχνικές ανοσοανίχνευσης τόσο *in situ* επί πλακιδίων με μονιμοποιημένα κύτταρα από κυτταροκαλλιέργεια και επί ιστών μονιμοποιημένων σε φορμαλδεΰδη και εμβαπτισμένων σε παραφίνη, όσο και σε κυτταρικά εκχυλίσματα. Οι *in situ* τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανοσοκυτταροχημεία, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ανοσοϊστοχημεία. Για τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η αποτύπωση και ανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western. Η ανάλυση των μεθόδων αυτών γίνεται παρακάτω.

### 1. Η ανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Κατά τη μέθοδο αυτή, τα κύτταρα προς ανάλυση διασπώνται, και ακολουθεί εκχύλιση του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης ανά δείγμα διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη SDS-πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτρομεταφέται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη αυτή υφίσταται επεξεργασία ανοσοανίχνευσης. Η τελική εικόνα λαμβάνεται μέσω φθορισμού επί ακτινογραφικού φιλμ. Η ακριβής μέθοδος που εφαρμόστηκε έχει ως εξής:

### 1Α. Συλλογή κυττάρων και εκχύλιση ολικής πρωτεΐνης με χρήση διαλύματος:

- Απόρριψη του θρεπτικού των προς μελέτη κυττάρων και ξέπλυμα των τριβλίων με διάλυμα κρύο PBS.
- Μεταφορά των τριβλίων σε πάγο και συλλογή των κυττάρων με ξύστρα σε συνολικό όγκο 1ml PBS ανά δείγμα.
- Μεταφορά των εναιωρημάτων σε μικροσωληνίσκους Eppendorf
- Φυγοκέντρηση (5000rpm/4°C/10min) και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελλέτας σε PBS και επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- Πρόσθεση 100μl διαλύματος εκχύλισης ανά μικροσωληνίσκο και επώαση με περιστρεφόμενη ανάδευση για 30min στους 4°C.
- Φυγοκέντρηση (13000rpm/4°C/5min) και συλλογή του υπερκείμενου.

Το υπερκείμενο εάν πρόκειται να αναλυθεί κατευθείαν, συντηρείται σε πάγο. Ειδάλλως αποθηκεύεται σε υπερκαταψύκτη (-70°C)

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

A. Phosphate Buffer Saline

B. Διάλυμα εκχύλισης.

Διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών		
Σύσταση	stock solutions	για 50 ml
20mM Tris-Cl pH7.5	1 M	1 ml
150 mM NaCl	5M	1,5 ml
10% Glycerol	100 %	5 ml
1% Triton X-100	20 %	2,5 ml

Το διάλυμα εκχύλισης διατηρείται σε ψύξη 4°C. Αμέσως πριν τη χρήση προστίθεται **PMSE** 10 μl / ml από 100 mM αρχικό διάλυμα και **Benzamidine** 1 μl / ml από 0,5 M αρχικό διάλυμα.

**1B. Συλλογή πρωτεϊνών με τη μέθοδο ψύξης-απόψυξης:**

- Απόρριψη του θρεπτικού των προς μελέτη κυττάρων και ξέπλυμα των τριβλίων με διάλυμα κρύο PBS.
- Μεταφορά των τριβλίων σε πάγο και συλλογή των κυττάρων με ξύστρα σε συνολικό όγκο 1ml PBS ανά δείγμα.
- Μεταφορά των εναιωρημάτων σε μικροσωληνίσκους Eppendorf
- Φυγοκέντρηση (5000rpm/4°C/10min) και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Επαναδιαλυτοποίηση της πελλέτας σε PBS και επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Προσθήκη διαλύματος 100-200 μl WCE.
- Εφαρμογή τριών κύκλων ψύξης (-70°C) και απόψυξης (σε πάγο).
- Φυγοκέντρηση (13000rpm/4°C/5min) και συλλογή του υπερκείμενου.

Το υπερκείμενο εάν πρόκειται να αναλυθεί κατευθείαν, συντηρείται σε πάγο. Ειδιάλλως αποθηκεύεται σε υπερκαταψύκτη (-70°C)

A. Phosphate Buffer Saline

B. Διάλυμα εκχύλισης.

WCE Buffer
20mM Tris-HCl pH 7.4
400mM KCl
10% Glycerol
Αναστολείς Πρωτεασών : PMSF, benzamidine, DTT (πρόσθεση πριν τη χρήση)

**1Γ. Εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη χρήση του kit της Bio-Rad.**

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το kit της Bio-Rad σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Εν

συντομία ετοιμάζονται αντιδράσεις – δύο ανά δείγμα – οι οποίες επωάζονται 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα προϊόντα ανιχνεύονται με φωτομέτρηση στα 750 nm και με βάση το νόμο Lambert-Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών επί πρότυπης καμπύλης  $ABS = a(\mu\text{g πρωτεΐνης})+b$ . Η αντίδραση περιγράφεται παρακάτω:

Αντιδρώντα	για 1 αντίδραση
H <sub>2</sub> O	190 μl
Δείγμα	10 μl
Αντιδρών Α'	100 μl
Αντιδρών Β	800 μl
Σύνθεση Αντιδρώντος Α'	1ml αντιδρών Α και 20 μl αντιδρών S

#### 1Δ. Διαλυτοποίηση πρωτεϊνών.

Η διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών περιλαμβάνει την αποδιάταξη τους σε γραμμικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες προκειμένου να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη με το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και βράσιμο (100°C) για 5 min. Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος (4X) είναι:

stock διαλύματα	για 20 ml
Tris	0,6057 g ή 2,5ml Tris 2M
β-mercaptoethanol	1,6 ml
20% SDS	8 ml ή 1,6g SDS
Glycerol	4ml
Bromophenol Blue	8 mg

### *1E. Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE*

Το διάλυμα των πρωτεϊνών μετά το βράσιμο φορτώνεται σε γέλη πολυακρυλαμιδίου προκειμένου να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες καθυστερούν να διασχίσουν τη διαδρομή μέσα στη γέλη, σε αντίθεση με τις μικρότερες πρωτεΐνες που εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η διάταξη mini-protean της Bio-Rad. Η πηκτική ακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο τμήματα. Το πάνω τμήμα καλείται stacking και συνεισφέρει στην ταυτόχρονη είσοδο των πρωτεϊνών στο κατώτερο τμήμα. Το κατώτερο τμήμα καλείται running και συνεισφέρει στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα παρουσία διαλύματος TGS και σε τάση 200V και ρεύμα 70-75mA.

<i>Running Gel</i>	<i>7%</i>	<i>8.5%</i>	<i>10.5%</i>	<i>12.5%</i>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	5 ml	4.6 ml	4.0 ml	3.2 ml
<b>30% acrylamide</b>	2.3 ml	2.8 ml	3.5 ml	4.2 ml
<b>Separating buffer</b>	2.4 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
<b>10% APS</b>	160 μl	160 μl	160 μl	160 μl
<b>TEMED</b>	8 μl	8 μl	8 μl	8 μl
<i>Τελικός όγκος</i>	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

<b>Stacking Gel</b>	
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	3.6 ml
<b>30% acrylamide</b>	900 μl
<b>Stacking buffer</b>	1500 μl
<b>10% APS</b>	60 μl
<b>TEMED</b>	6 μl
<i>Τελικός όγκος</i>	6 ml

<i>Running gel buffer</i>		
<b>Tris</b>	18.165 g	1.5M
<b>SDS</b>	0.4 g	0.4% w/v
<i>Τελικός όγκος</i>		100 ml

<i>Stacking gel buffer</i>		
<b>Tris</b>	6.05 g	0.5 M
<b>SDS</b>	0.4 g	0.4% w/v
<i>Τελικός όγκος</i>		100 ml

<i>30% acrylamide</i>	
<b>Acrylamide</b>	29 g
<b>Bis acrylamide</b>	1 g
<i>Τελικός όγκος</i>	
100 ml	

<i>10% APS</i>	
<b>APS</b>	1 g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10 ml
<i>Τελικός όγκος</i>	
10 ml	

<i>10x TGS</i>	
<b>Tris</b>	30.3 g
<b>Glycine</b>	144.2 g
<b>SDS</b>	10 g
<i>Τελικός όγκος</i>	
1 litre	



### ***1ΣΤ. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.***

Η διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση της πηχτής πολυακρυλαμίδιου σε κατάλληλη διάταξη της BioRad και την εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού πεδίου (150V, 240mA) μέσω κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (transfer buffer). Η διαδικασία διαρκεί περίπου δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η θερμοκρασία διατηρείται, παρά την εξώθερμη μεταφορά, με τη συνεχή ανάδευση του ρυθμιστικού διαλύματος και την χρήση ειδικής κυψέλης πάγου. Η σύνθεση του transfer buffer αναφέρεται παρακάτω:

<b><i>1X Transfer Buffer</i></b>	
<b>10X TGS</b>	100 ml
<b>Μεθανόλη</b>	200 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	700 ml
<b><i>Τελικός όγκος</i></b>	1000 ml

### Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η διαδικασία ανοσοανίχνευσης περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- Ξέπλυμα της μεμβράνης με νερό
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T 0,05%
- Επώαση με διάλυμα αναστολής μη ειδικής σύνδεσης (Blocking solution για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης τρεις φορές με διάλυμα TBS-T 0,05%
- Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα στους 4°C με ανάδευση μέχρι την επόμενη μέρα.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης τρεις φορές με διάλυμα TBS-T 0,05%
- Πλύσιμο της μεμβράνης με ανάδευση τρεις φορές από 10 min διάλυμα TBS-T 0,05%
- Επώαση με ανάδευση με το δευτεροταγές αντίσωμα για 1 ώρα
- Πλύσιμο της μεμβράνης με ανάδευση τρεις φορές από 10 min διάλυμα TBS-T 0,05%
- Πλύσιμο της μεμβράνης με ανάδευση μια φορά με διάλυμα TBS

- Πρόσθεση μείγματος ECL στη μεμβράνη και επώαση για 5 min στο σκοτάδι.
- Ανίχνευση της θετικότητας με έκθεση της μεμβράνης σε ακτινογραφικό φιλμ για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Σε περίπτωση που πρόκειται για ανοσοανίχνευση του p21<sup>WAF1</sup>, το παραπάνω πρωτόκολλο διαφέρει σε τρία σημεία: 1. Χρησιμοποιείται TBST-0,1%, 2. Η αναστολή της μη ειδικής σύνδεση και η επώαση του πρωτοταγούς αντισώματος διαρκούν 24 ώρες η κάθε μία, και 3. Η αναστολή της μη ειδικής σύνδεσης γίνεται με γάλα 10%. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους σχετικούς πίνακες.

<b>10X TBS σε όγκο 2lt, pH 7.3</b>		<b>TBS-T</b>	
<b>NaCl</b>	180 g	<b>TBS-T 0,05%</b>	1lt TBS+0,5 ml Tween20
<b>Tris</b>	121.14 g	<b>TBS-T 0,1%</b>	1lt TBS+1 ml Tween20

<b>Blocking solution</b>	
<b>5%</b>	5 gr γάλα σκόνη + 100 ml TBST 0,05%
<b>10% (για αντι-p21 WB)</b>	10 gr γάλα σκόνη + 100 ml TBST 0,1%

## 2. Ανοσοϊστοχημεία

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας ως στόχο έχει την ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα ιστών.

### 2Α. Πληθυσμός ασθενών.

Στη συγκεκριμένη διατριβή τα δείγματα ιστών ήταν δείγματα βιοψιών φυσιολογικού μαστού ή δείγματα ιστών από καρκίνο μαστού. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με τυχαίο τρόπο. Ο αριθμός των δειγμάτων ανά κατηγορία επελέγη να είναι 30 ασθενείς ή περισσότερο κατά περίπτωση ώστε το προκύπτον δείγμα να θεωρηθεί ισχυρό με βάση τη θεωρία των μεγάλων δειγμάτων. Όλα τα δείγματα αφορούσαν ιστούς που μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλδεύδη και εγκλείσθησαν σε παραφίνη προκειμένου να κοπούν.

### 2Β. Κοπή ιστικών τομών.

Η διαδικασία της κοπής των ιστικών τομών περιγράφεται παρακάτω:

#### Κοπή ιστικών τομών

- Επιλογή του κατάλληλου κύβου από το αρχαιακό υλικό
- Ευθειασμός μιας επιφάνειας προκειμένου να γίνει η κοπή
- Διατήρηση του κύβου σε καταψύκτη (-20°C) για μια ώρα προκειμένου να σκληρύνει η παραφίνη και ο ιστός.
- Κοπή τομών με πάχος 3μm και τοποθέτηση των τομών σε υδατόλουτρο 40°C.
- Επιλογή των καλύτερων τομών και απόσυρση τους από το υδατόλουτρο με τη βοήθεια πλακιδίου SuperFrost Plus.
- Τα πλακίδια με τις τομές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν τελείως.
- Συλλογή των πλακιδίων σε ειδικά καλάθια.

### 2Γ. Κλιβανισμός, αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των ιστικών τομών

Τα πλακίδια υφίστανται επεξεργασία προκειμένου να εκδιωχθεί η παραφίνη από τα δείγματα. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Τοποθέτηση των πλακιδίων σε κλίβανο θερμού αέρα με θερμοκρασία 50°C-56°C για 1-1,5 ώρες

- Μεταφορά των πλακιδίων σε ξυλόλη ενώ είναι ακόμη ζεστή η παραφίνη.
- Ανά 5 min τα πλακίδια μεταφέρονται σε δοχείο με φρέσκια ξυλόλη.
- Μετά από 3 εναλλαγές τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε αιθανόλη 100° για 15 min
- Τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης 96° για 10-15 min.
- Τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης 80° για 5 min.
- Τα πλακίδια εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης 70° για 5 min.
- Μεταφορά των πλακιδίων σε δοχείο με νερό βρύσης
- Ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό βρύσης για 15 min προσέχοντας να μη παρασυρθούν οι ιστικές τομές από τη ροή του νερού.
- Μεταφορά των πλακιδίων σε δοχείο με απεσταγμένο νερό προκειμένου να ακολουθήσει η περαιτέρω διαδικασία.

#### **2Δ. Ανάκτηση της αντιγονικότητας**

Η ανάκτηση της αντιγονικότητας γίνεται με τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας, η οποία επιτυγχάνεται μέσω θέρμανσης με μικροκύματα. Χρησιμοποιείται φούρνος μικροκυμάτων οικιακού τύπου όπου τα πλακίδια θερμαίνονται στα 350W για 5 min και εν συνεχεία αφήνονται να κρυώσουν για 20-30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η θέρμανση επαναλαμβάνεται τουλάχιστον άλλη μια φορά και ομοίως τα πλακίδια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αναλόγως του αντισώματος χρησιμοποιούνται και διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα εντός του οποίου θερμαίνονται τα πλακίδια. Τα ρυθμιστικά διαλύματα και η σύνθεσή τους αναφέρονται σε σχετικό πίνακα. Πέραν των μικροκυμάτων για την ανάκτηση της αντιγονικότητας χρησιμοποιείται και η Σαπωνίνη. Η μέθοδος ανάκτησης της αντιγονικότητας που επιλέχθηκε για κάθε αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αναφέρεται σε επόμενο συγκεντρωτικό πίνακα.

<i>Citrate Buffer, pH 6.2, για MW</i>	
<b>Stock A</b>	21 gr κιτρικό οξύ /1 lt dH <sub>2</sub> O, 4°C
<b>Stock B</b>	29,5 gr κιτρικό νάτριο /1 lt dH <sub>2</sub> O, 4°C
<b>Διαλύμα Εργασίας</b>	9 ml A + 41 ml B
<b>Τελικός όγκος</b> 500 ml	

<i>EDTA, pH 8.0, για MW</i>	
<b>EDTA</b>	0,74 gr
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2 lt
<b>NaOH</b>	Σταγόνες μέχρι ρύθμισης του pH
<b>Συντήρηση στους 4°C</b>	

<i>Saponine</i>	
<b>Saponine</b>	50 mg
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100 ml
<b>Επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, και ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O.</b>	

<i>Dako Buffer, pH 9.0, για MW</i>	
<b>Dako buffer (10X)</b>	10 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	90 ml
<b>Προετοιμασία πριν τη χρήση</b>	

## *2E. Επώαση των πρωτοπαγών αντισωμάτων*

Τα χαρακτηριστικά επώασης των πρωτοπαγών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον επόμενο πίνακα.

<b>Όνομα Αντισώματος</b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Ανάκτηση αντιγονικότητας</b>	<b>Αραίωση</b>	<b>Χρόνος επώασης</b>	<b>Σύστημα Ανίχνευσης</b>
CD31	DAKO	MW	1/25	1 h	Optimax
CD105	Neomarkers	MW, pH 9.0	1/40	2 h	AP polymer
COX-2	Novocastra	MW με EDTA	1/120	1h	Optimax
FLT-1	SantaCruz	MW	1/20	1 h	AP polymer
FLK-1	SantaCruz	MW	1/40	2 h	Optimax
PDGFR-α	Neomarkers	Saponine	1/40	ON	AP polymer
PDGFR-β	SantaCruz	Saponine	1/40	ON	AP polymer
ICAM-1	Neomarkers	MW	1/20	2 h	AP polymer
VCAM-1	Neomarkers	MW	1/20	2 h	AP polymer
E-selectin	Neomarkers	MW	1/20	2 h	AP polymer
P21 <sup>WAF1</sup>	Oncogene	MW	1/25	1 h	DAKO

## **2ΣΤ. Ανίχνευση θετικής χρώσης**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης, αναλόγως του αντισώματος και αναλόγως της προσφορότητας συστημάτων ανίχνευσης από το εμπόριο. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

### **ι) Σύστημα διπλής ανίχνευσης (DAKO)**

#### **Σύστημα διπλής ανίχνευσης (DAKO)**

- Επώαση με το αντιδραστήριο X902 με αραίωση 1/20 σε TBS, για 30 min.
- Επώαση με πρωτοταγές αντίσωμα.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το αντιδραστήριο Z259 με αραίωση 1/25 σε διαλυμα BSA-TBS 1/20, 30 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το αντιδραστήριο D651 με αραίωση 1/25 σε διαλυμα BSA-TBS 1/20, 30 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το αντιδραστήριο Z259 με αραίωση 1/25 σε διαλυμα BSA-TBS 1/20, 15 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το αντιδραστήριο D651 με αραίωση 1/25 σε διαλυμα BSA-TBS 1/20, 15 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με σύστημα αλκαλικής φωσφατάσης K699, DAKO, για 30 min. Μια ταμπλέτα Fast Red διαλύεται σε 2ml διαλύτου.
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης για 10 min.
- Εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη Harris Papanikolaou για 30 sec
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
- Κάλυψη με Glycergel.

**ii) Σύστημα ανίχνευσης Optimax (Biogenex)**

- Επώαση με διάλυμα Power Block για 10 min
- Ξέπλυμα με TBS
- Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα
- Τίναγμα των πλακιδίων και επώαση με το διάλυμα Link για 20 min.
- Ξέπλυμα με TBS
- Επώαση με το διάλυμα Label για 20 min
- Επώαση με χρωστική Fast Red για 20 min (1 ταμπλέτα / 5ml και 1 σταγόνα LEVAMISOLE
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- Εμβάπτιση πλακιδίων σε αιματοξυλίνη Mayer για 3 min
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- 10 βουτήματα των πλακιδίων σε διάλυμα αμμωνίας
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- Κάλυψη με Glycergel.

**iii) Σύστημα ανίχνευσης AP polymer – Ultra Vision Detection System (LAB VISION)**

- Επώαση με διάλυμα Ultra V Block για 7 min.
- Τίναγμα πλακιδίων.
- Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το διάλυμα Primary Antibody Enhancer για 20 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Επώαση με το διάλυμα AP Polymer για 30 min.
- Ξέπλυμα με TBS.
- Βούτημα σε απεσταγμένο νερό
- Επώαση με διάλυμα Fast Red για 20 min
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- Εμβάπτιση πλακιδίων σε αιματοξυλίνη Mayer για 3 min
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης

- 10 βουτήματα των πλακιδίων σε διάλυμα αμμωνίας
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- Κάλυψη με Glycergel.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

<i>Διάλυμα αμμωνίας</i>	
<b>NH<sub>4</sub>OH</b> <b>29.5%</b>	2,5 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1 lt dH <sub>2</sub> O
<i>Φυλάσσεται σε σκούρο δοχείο, 25° C</i>	

<i>Glycergel</i>	
<b>Gelatin</b>	10 gr
<b>Glycerol</b>	70 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	60 ml
<i>Διαλύεται η gelatin στο dH<sub>2</sub>O στους 50° C. Κατόπιν προστίθεται η Glycerol και μερικοί κρύσταλλοι φαινόλης ή θυμόλης. Ανάδευση για 30 min και φιλτράρισμα.</i>	

### 3. Ανοσοκυτταροχημεία

Πρόκειται για τροποποίηση της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας καθώς ως υπόστρωμα των αντιδράσεων δεν χρησιμοποιούνται ιστικές τομές αλλά κυτταρικά επιχρίσματα που αναλόγως του δείγματος συλλέγονται και επικολλώνται σε πλακίδια με διαφορετικό τρόπο. Στη παρούσα διατριβή τα κύτταρα προς μελέτη ήταν τα κύτταρα της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926, τα οποία καλλιεργήθηκαν επί των πλακιδίων SFP. Η αρχική διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων έχει περιγραφεί παραπάνω. Το πρωτόκολλο της ανοσοκυτταροχημείας είναι σαφές ότι δε περιλαμβάνει τα πρώτα στάδια προετοιμασίας τομών αλλά περιλαμβάνει όλα τα στάδια που αφορούν την



επώαση του πρωτοταγούς αντισώματος, τη χρήση συστήματος ανίχνευσης, την τελική επεξεργασία σταθεροποίησης της χρώσης και την επικάλυψη.

Το σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκείνο της διπλής ενίσχυσης (DAKO) με στόχο την ανίχνευση της θετικότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων της σειράς EA.hy 926 στον αναστολέα των CDK, p21<sup>WAF1</sup>.

#### 4. Ανοσοφθορισμός.

Η διαδικασία του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση της προς εξέταση πρωτεΐνης. Η οπτικοποίηση της θετικότητας επιτυγχάνεται με την πρόσδεση ενός συμπλόκου με ιδιότητες φθορισμού. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της VE-cadherin. Το πρωτόκολλο της μεθόδου έχει ως ακολούθως:

#### Ανοσοφθορισμός

- Καλλιέργεια των κυττάρων αναλόγως του πειράματος και επώαση τους για το επιθυμητό χρονικό διάστημα.
- Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές.
- Μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεϋδη σε PBS +/- για 5 min.
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.
- Επικάλυψη των πλακιδίων με διάλυμα 0,5% Triton-X σε διάλυμα B-1 και επώαση για 5 min χωρίς ανάδευση ή κούνημα.
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.
- Αναστολή της μη ειδικής αντίδρασης μέσω της επώαση των πλακιδίων με διάλυμα 1,5% FBS σε PBS +/- (Blocking buffer) – Δύο φορές από 3 min.
- Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για 30 min στους 4°C, στο σκοτάδι χωρίς ανάδευση.
- Πλύσιμο των πλακιδίων και αναστολή μη ειδικής αντίδρασης με διάλυμα PBS +/- / 1,5% FBS σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.

- Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 30 min στους 4°C, στο σκοτάδι χωρίς ανάδευση.
- Πλύσιμο των πλακιδίων και αναστολή μη ειδικής αντίδρασης με διάλυμα PBS +/-1,5% FBS σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.
- Επικάλυψη των πλακιδίων με τη χρήση διαλύματος PBS:Glycerol σε αναλογία 1:1.
- Συντήρηση στους 4°C στο σκοτάδι ή
- Απευθείας παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας το ανάλογο φίλτρο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

<i>Buffer 1 (10X), pH 6.0-6.5</i>	
NaCl	137 mM
KCl	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · (2H <sub>2</sub> O)	1,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
Γλυκόζη	5,5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EDTA	2 mM
EGTA	2 mM
MES	20 mM

<i>PBS +/-</i>	
PBS	1lt
CaCl <sub>2</sub>	0,9 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM

<i>Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν</i>	
Anti-Ve cadherin	1:50
Anti-mouse IgG FITC	1:50

## Η ημιποσοτική ανίχνευση του επιπέδου μεταγραφής του γονιδίου p21<sup>WAF1</sup>

---

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε τα εξής στάδια. Αρχικά εκχυλίστηκε RNA από κύτταρα EA.hy 926, το οποίο μετατράπηκε σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Η τμήμα της αλληλουχίας του μετάγραφου του p21<sup>WAF1</sup> ενισχύθηκε στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές. Το επίπεδο έκφρασης εκτιμήθηκε ημιποσοτικά με τη σύγκριση του παραγώγου του p21<sup>WAF1</sup> με το αντίστοιχο μετάγραφο του γονιδίου ARPP0 που θεωρείται ανεπηρέαστο στα κύτταρα (house keeping gene). Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

### Εκχύλιση RNA από κύτταρα

#### A. Εκχύλιση RNA από κύτταρα:

- Αφαίρεση θρεπτικού
- Προσθήκη 1ml Trypsin
- Επώαση για 5 λεπτά στους 37°C
- Προσθήκη 1ml θρεπτικού
- Μάζεμα κυττάρων με scraper
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml 1xPBS
- Ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 500μl Trizol
- Vortex
- 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 300μl CHCl<sub>3</sub>
- Vortex
- 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε καθαρό μικροσωλήνα 1,5ml
- Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλη και 10 μg γλυκογόνο

- Ανάδευση και αποθήκευση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ο/n
- Φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές για 15 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 1ml αιθανόλη 70%
- Vortex
- Φυγοκέντρωση στις 14000 στροφές για 20 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Στέγνωμα πελέττας
- Προσθήκη 25μl  $\text{H}_2\text{O}$
- Φωτομέτρηση στα 260nm
- Υπολογισμός μg RNA με τη βοήθεια του τύπου :  

$$\mu\text{g}/\mu\text{l RNA}=(\text{OD}_{260}\times 40\times 200)/1000$$

#### **B. Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής**

- 1μg RNA
- $\text{H}_2\text{O}$  ως τα 30,5μl
- 3μl random hexamer primers 100ng/μl
- 10μl 5x Reverse Transcription buffer
- 5μl dNTP's mix 2mM
- Επώαση για 5 λεπτά στους  $65^{\circ}\text{C}$
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- 1μl M-MLV reverse transcriptase
- 0,5μl RNase inhibitor
- Flash spin
- Επώαση για 1-2 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$

#### **Γ. Αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)**

Τα αντιδρώντα της αντίδρασης είναι:

- 2 μl cDNA
- 8μl dNTPs mix,
- 0,5 μl Taq DNA πολυμεράση
- 5 μl 10X Taq DNA polymerase Buffer

- 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  25mM
- 5  $\mu\text{l}$  forward primer 10  $\mu\text{M}$
- 5  $\mu\text{l}$  reverse primer 10  $\mu\text{M}$
- 21.5  $\mu\text{l}$  DNase free  $\text{H}_2\text{O}$  .

Η αντίδραση PCR για την ενίσχυση του  $\text{p}21^{\text{WAF1}}$  και του ARPPO έλαβε χώρα σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

- Αποδιάταξη στους 94 °C για 3 min
- 30 κύκλοι:
  - i. Αποδιάταξη στους 94 °C για 1min
  - ii. Υβριδισμός στους 57 °C για 40 sec
  - iii. Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min
- Τελική επιμήκυνση 72 °C για 1 min

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του  $\text{p}21^{\text{WAF1}}$  και του ARPPO παρουσιάζονται σε σχετικό πίνακα:

Ολιγονουκλεοτίδια	Αλληλουχία	Μήκος
Εκκινητές $\text{p}21^{\text{WAF1/Cip1}}$	Sense: 5'-CTGCCCAAGCTCTACCTTCC-3' Anti-sense: 5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3'	123bp
Εκκινητές ARPPO	Sense: 5'-GGAAGGCTGTGGTGCTGATGG-3' Anti-sense: 5'-AAGGAGAAGGGGGAGATGTTG-3'	480bp

## **Η κατασκευή της υβριδικής πρωτεΐνης TAT-p21<sup>WAF1/Cip1</sup>**

Η τεχνολογία διαμεταγωγής πρωτεϊνών έχει περιγραφεί πρόσφατα ως τρόπος εισόδου μιας πολυπετιδικής αλυσίδας σε ένα κύτταρο. Έχει παρατηρηθεί ότι πρωτεΐνες μιας πολυπετιδικής αλυσίδας μπορούν να εισέλθουν σε ένα κύτταρο όταν φέρουν και μια περιοχή 15 αμινοξέων που αποτελεί τμήμα της πρωτεΐνης TAT του ιού HIV1. Ο τρόπος εισόδου των TAT-πρωτεϊνών στο κύτταρο είναι ακόμη αδιευκρίνιστος. Οι TAT-πρωτεΐνες εισέρχονται στο κύτταρο και αναδιπλώνονται στη λειτουργική τους μορφή μέσω των τσαπερονών (Chaperones). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι διπλό. Αφενός επιτυγχάνεται είσοδος των TAT-πρωτεϊνών σε ποσοστό που προσεγγίζει το 100% του κυτταρικού πληθυσμού-στόχου και αφετέρου έχει αποδειχτεί ότι οι TAT-πρωτεΐνες μπορούν να εισέλθουν σχεδόν σε όλους τους ιστούς *in vivo*.

Η κατασκευή της υβριδικής πρωτεΐνης TAT-p21<sup>WAF1</sup> (TAT-p21) επιτεύχθηκε με τη χρήση διαφορετικών μεθόδων που ως στόχο είχαν την ενσωμάτωση σε κοινό φορέα DNA όλων των τμημάτων που πρέπει να εκφραστούν για να παραχθεί το μόριο TAT-p21. Τα τμήματα που ενσωματώθηκαν στο φορέα έκφρασης είναι : α. Η κωδικοποιός αλληλουχία του p21<sup>WAF1</sup>, β. Η αλληλουχία TAT και γ. Ο επίτοπος His6x.

Η ενσωμάτωση μιας αλληλουχίας DNA σε ένα φορέα περιλαμβάνει μια αλληλουχία διαδικασιών. Αρχικώς απαιτείται η απομόνωση της αλληλουχίας που θα μεταφερθεί με τρόπο που να δημιουργούνται στα άκρα της αλληλουχίας θέσεις περιορισμού (restriction sites). Ακολουθώς, ακολουθεί τόσο η πέψη της αλληλουχίας, όσο και του φορέα έκφρασης με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα και η αντίδραση σύνδεσης (ligation) των δύο τμημάτων. Το προϊόν της αντίδρασης μεταφέρεται σε βακτήρια -ικανά να μετασχηματιστούν- με τη μέθοδο του θερμικού shock. Θετικές αποικίες απομονώνονται και καλλιεργούνται σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Ακολουθεί η εκχύλιση του DNA από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας για επαλήθευση της ενσωμάτωσης. Μια θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας χρησιμοποιείται για ενοφθαλμισμό καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας από την οποία και απομονώνεται ο φορέας με την αλληλουχία που ενσωματώθηκε. Στην παρούσα διατριβή, ο φορέας που

χρησιμοποιήθηκε ήταν ο PRSETB ο οποίος ήδη φέρει κωδικοποίηση για His6x. Τα πρωτόκολλα των επιμέρους διαδικασιών παρουσιάζονται παρακάτω:

**A. Απομόνωση της κωδικοποιού αλληλουχίας του p21<sup>WAF1</sup> και κατασκευή της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου TAT**

Για την απομόνωση της κωδικοποιού αλληλουχίας του p21<sup>WAF1</sup>, κύτταρα ηπατώματος HepG2 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες παρουσία του φαρμάκου 5-φθοριουρακίλη. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του RNA και η αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA. Η κωδικοποιούσα αλληλουχία προέκυψε με ενίσχυση μέσω PCR όπως περιγράφεται παρακάτω:

Αντιδρώντα PCR:

- 11.5 μl dd H<sub>2</sub>O
- 5 μl DMSO
- 10μl cDNA
- 5μl 10X Vent polymerase buffer
- 5 μl p21 sense εκκινητή
- 5 μl p21 antisense εκκινητή
- 8 μl dNTPs mix
- 0.5 μl Vent polymerase

Το πρόγραμμα ενίσχυσης είχε ως ακολούθως:

- Αποδιάταξη στους 94 °C για 1 min 30 sec
- 30 κύκλοι:
  - iv. Αποδιάταξη στους 94 °C για 1min
  - v. Υβριδισμός στους 57 °C για 1min 30 sec
  - vi. Επιμήκυνση στους 72 °C για 2 min

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Ολιγονουκλεοτίδια	Αλληλουχία
Εκκινητές	Sense: 5-GGGGAATTCTCAGAACCGGCTGGGGATGTCCGTCAG -3'
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> CDS	Anti-sense: 5' - TCAAGCTTCTTAGGGCTTCCTCTTGGAGAAGATCAG-3'

Η σύνθεση του ολιγονουκλεοτιδίου TAT έγινε από το Τμήμα Μικροχημείας του Ινστιτούτου Έρευνας και Τεχνολογίας σύμφωνα με την παρακάτω αλληλουχία:

TAT	Αλληλουχία
Sense	5-GATCCGGGTTACGGTAGAAAGAAGAAGAGAAGACAGAGAAGAAGAG -3'
Anti-sense	5-CTAGGCCCAATGCCATCTTTCTTCTTCTTCTTCTGTCTCTTCTTCTC-3'

## B. Καθαρισμός προϊόντων PCR

### Καθαρισμός προϊόντων PCR

- Απομάκρυνση το PCR oil (πάνω σε parafilm) και ένωση των προϊόντων των ομοειδών αντιδράσεων PCR
- Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 200μl
- Προσθήκη 1/2 όγκο φαινόλη, και 1/2 όγκο χλωροφόρμιο
- Ανάδευση με vortex
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm (max)
- Συλλογή του υπερκείμενου (υδατική φάση)
- Προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa (pH 5.5, 3M) και 2,5 όγκους Et-OH abs (παγωμένη)
- Ανάδευση με vortex
- Τοποθέτηση για 5 λεπτά στους -80°C ή O/N στους -20°C
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Προσθήκη ~300μl 75% Et-OH (παγωμένη)
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα πελέτας σε Speed-vac
- Επαναδιάλυση σε 50μl ddH<sub>2</sub>O

## Γ. Πέψεις

Πραγματοποιήθηκαν πέψεις με τα ένζυμα EcoRI, HindIII, BamHI και Kpn. Οι πέψεις έγιναν όπως περιγράφονται στον επόμενο πίνακα.



	pRSETB	pRSETB-TAT	TAT	cDNA p21 <sup>WAF1</sup>	Σκοπός
<b>BamHI</b>	+	-	+	-	Ενσωμάτωση του TAT
<b>Kpn</b>	+	-	+	-	στο pRSETB
<b>EcoRI</b>	-	+	-	+	Ενσωμάτωση του
<b>HindIII</b>	-	+	-	+	p21 <sup>WAF1</sup> στο pRSET-TAT

Τα προϊόντα ανιχνεύτηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%-EtBr υπό UV. Τα τμήματα της πηκτής που περιείχαν τα προϊόντα, αφαιρέθηκαν με νυστέρι τεμαχίστηκαν εκ νέου και υπεβλήθησαν σε επεξεργασία εκχύλισης του DNA.

#### Δ. Εκχύλιση DNA από τμήμα πηκτής αγαρόζης

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα εκχύλισης της Qiagen. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Εκχύλιση DNA από τμήμα πηκτής αγαρόζης

- Ζύγισμα του τμήματος αγαρόζης προς εκχύλιση
- Πρόσθεση 3 όγκων QG buffer.
- Επώαση στους 50 °C για 10 min ή μέχρι να λιώσει η αγαρόζη.
- Πρόσθεση 1 όγκου ισοπροπανόλης.
- Πέρασμα του δείγματος μέσα από κολόνα QIAquick.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 14500rpm.
- Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση του μικροσωληνίσκου κάτω από το κολονάκι.
- Πρόσθεση 750λ PE (+αιθανόλη) και επώαση για 2-5 min.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 14500rpm.
- Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση του μικροσωληνίσκου κάτω από το κολονάκι.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 14500rpm.
- Τοποθέτηση νέου μικροσωληνίσκου.
- Πρόσθεση 50λ EB, επώαση για 1 λεπτό.
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 14500rpm.

#### Ε. Συγκόλληση τμημάτων DNA.

Η αντίδραση συγκόλλησης πραγματοποιείται με τα εξής αντιδρώντα:

- 1μl φορέας (1μg/μl)
- xμl ένθεμα
- 1μl ligation buffer
- 1μl T4 DNA ligase
- H<sub>2</sub>O μέχρι τα 10μl

Η ποσότητα του ενθέματος υπολογίζεται από τον εξής τύπο :  
(500 x ζεύγη βάσεων ενθέματος/ζεύγη βάσεων φορέα) (ng)

Επώαση της αντίδρασης στους 16°C όλη νύχτα

### **ΣΤ. Μετασηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού shock.**

Με μέθοδο αυτή ένα τμήμα DNA εισέρχεται μέσα σε ένα βακτήριο προκειμένου να αναπαραχθεί. Αναλόγως του φορέα και του βακτηριακού στελέχους το τμήμα DNA μπορεί να εκφραστεί. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη E.coli DH10b και DH5a ως στελέχη αύξησης του φορέα pRSETB. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος E.coli BL-21(p-lys) προκειμένου να εκφραστεί ο ολοκληρωμένος φορέας TAT-p21<sup>WAF1</sup>. Το πρωτόκολλο μετασηματισμού έχει ως εξής:

- Τοποθέτηση 100μl βακτηρίων σε σωλήνα των 15ml
- Προσθήκη 0,5μg καθαρού πλασμιδίου ή 10μl αντίδραση συγκόλλησης
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά
- Θέρμανση στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση για 2 λεπτά σε πάγο
- Προσθήκη 900μl LB
- Επώαση για 1 ώρα στους 37°C στις 225 στροφές
- Άπλωμα σε πιάτο LB+Amp και επώαση στους 37°C όλη νύχτα

### **Z. Καλλιέργεια θετικών αποικιών σε μικρή κλίμακα (mini-preps) και απομόνωση DNA**

- Μόλυνση καλλιιεργειών των 2ml LB-amp και επώαση O/N στους 37°C

- Μεταφορά 1,5ml από κάθε καλλιέργεια σε eppendorf
- Φυγοκέντρωση για 1 min στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στην πελέτα προστίθενται 600μl Lysis Buffer και 20-30μl Lysozyme (stock solution 10mg/ml)
- Επαναδιάλυση πελέτας με vortex
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Βράσιμο δειγμάτων για 90 sec
- Μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για περίπου 15 min
- Φυγοκέντρωση για 15 min στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση πελέτας με οδοντογλυφίδα.
- Πρόσθεση 600μl ισοπροπανόλης (παγωμένη) και ανάδευση
- Τοποθέτηση στους -20°C για ~20-30 min
- Φυγοκέντρωση για 15 min στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλη
- Φυγοκέντρωση για 5 min στις 13000rpm (max)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα της πελέτας
- Επαναδιάλυση σε H<sub>2</sub>O ή TE με 100 μg/ml RNase A

## Η. Απομόνωση DNA από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας

Η καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας προκύπτει από ενοφθαλμισμό 200 ml θρεπτικού LB εμπλουτισμένου με αμπικιλίνη. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα εκχύλισης της Qiagen ως ακολούθως:

1. Μεταφορά της καλλιέργειας σε falcon των 50 ml
2. Φυγοκέντρωση για 20 min στις 3.500rpm στους 4°C
3. Απομάκρυνση υπερκείμενου

Ανά 100ml καλλιέργειας:

4. Προσθήκη 4 ml από το P1 (resuspension buffer με 100 μg/ml RNase A στους 4°C) και διάλυση της πελέτας με vortex
5. Προσθήκη 4 ml από το P2 (lysis buffer)
6. Ανάδευση 4-6 φορές ήπια και γρήγορα

7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
8. Προσθήκη 4 ml από το P3 (neutralization buffer, στους 4°C)
9. Ανάδευση 4-6 φορές ήπια και γρήγορα
10. Επώαζουμε για 15 min στον πάγο
11. Φυγοκέντρηση για 30 min στις 3.500rpm στους 4°C
12. Προσθήκη 4 ml από το QBT (equilibration buffer) σε κολόνα 100-tip
13. Τοποθέτηση ψαρόμαλλου στο στόμιο της κολόνας ή φιλτράρισμα του υπερκείμενου που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση
14. Προσθήκη του υπερκείμενου στην κολόνα
15. Προσθήκη δύο φορές από 10 ml από το QC (wash buffer)
16. Αφού περάσει το QC, ακολουθεί τοποθέτηση ενός σωλήνα φυγοκέντρηση τύπου falcon 15ml κάτω από την κολόνα
17. Προσθήκη στην κολόνα 5 ml από το QF (elution buffer) το οποίο συγκεντρώνεται στο falcon
18. Προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλη (0,7 του συνολικού όγκου), ανάδευση και διαμοιρασμός την ποσότητα σε 8 eppendorfs
19. Φυγοκέντρηση για 30 min στις 11.000rpm στους 4°C
20. Απομάκρυνση υπερκείμενου

Τα βήματα 12-20 επαναλαμβάνονται προκειμένου να εκχυλιστεί DNA από το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στα υπόλοιπα 100ml καλλιέργειας. Χρησιμοποιούνται η ίδια κολόνα και τα ίδια eppendorfs για να συγκεντρωθεί το DNA.

### Θ. Παραγωγή και απομόνωση της TAT-p21<sup>WAF1</sup>

Η παραγωγή της TAT-p21<sup>WAF1</sup> επιτεύχθηκε μέσω της έκφρασής της σε κύτταρα E.coli BL-21. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας και εν συνεχεία λύθηκαν, και απομονώθηκε η πρωτεΐνη με χρωματογραφία συγγένειας. Τα επιμέρους πρωτόκολλα της διαδικασίας περιγράφονται παρακάτω:

#### ι. Παραγωγή TAT-p21.

- Μετασχηματισμός κυττάρων E.coli BL-21 με την μοριακή κατασκευή TAT-p21<sup>WAF1</sup>.

- Ενοφθαλμισμός μικρής καλλιέργειας (20 ml) και επώαση της στους 37°C για όλη τη νύχτα
- Ενοφθαλμισμός μεγάλης καλλιέργειας (200 ml) με 10 ml από την κορεσμένη καλλιέργεια των 20 ml. Επώαση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας προσεγγίσει την τιμή 1.0
- Συλλογή της καλλιέργειας και φυγοκέντρωση (3500 rpm, 30 min, 4°C)
- Απόρριψη του υπερκείμενου και αποθήκευση της πελέτας στους -20°C για περαιτέρω επεξεργασία

*ii. Απομόνωση της TAT-p21 υπό αποδιατακτικές συνθήκες.*

- Επαναδιάλυση των πελετών σε 6 ml Buffer B/100 ml καλλιέργειας
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min σε παλλόμενη πλατφόρμα
- Κατακερματισμός του ομογενοποιημένου μίγματος με τη χρήση υπερήχων (sonication). Εφαρμογή προγράμματος 10 κύκλων των 20-30 sec με 20 sec παύση ενδιάμεσα για την ψύξη των δειγμάτων
- Φυγοκέντρωση σε 13000 rpm/30 min/4°C
- Συλλογή υπερκείμενου
- Εξισορρόπηση 1 ml σφαιριδίων Ni-NTA με Buffer B
- Επώαση του υπερκείμενου που συλλέχθηκε προηγουμένως με τα εξισορροπημένα σφαιρίδια σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min σε παλλόμενη πλατφόρμα
- Επικάθηση των σφαιριδίων σε αυτοσχέδια κολόνα χρωματογραφίας
- Συλλογή της υγρής φάσης (Flow through)
- Πλύση της κολόνας με Buffer C και συλλογή του εκπλύματος (Wash) – 2 φορές
- Έκλυση της πρωτεΐνης με Buffer E (Elution) και συλλογή της – 4 φορές.
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και χρώση του με Coomassie Blue για αναγνώριση των προϊόντων

- Αποθήκευση των εκλούσεων σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$

<b>Buffer B</b>	
Urea	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M
Tris-Hcl, pH:8.0	0.01 M
<i>Ρύθμιση του pH με NaOH</i>	

<b>Buffer C</b>	
Urea	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M
Tris-Hcl, pH:6.3	0.01 M
<i>Ρύθμιση του pH με NaOH</i>	

<b>Buffer E</b>	
Urea	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M
Tris-Hcl, pH:4.5	0.01 M
Imidazole	250 mM
<i>Ρύθμιση του pH με HCl</i>	

<b>Εξισορρόπηση σφαιριδίων</b>
1. Φυγοκέντρωση 1 ml σφαιριδίων και απόρριψη του υπερκείμενου 2. Προσθήκη 2,5 ml Buffer B φυγοκέντρωση και απόρριψη του υπερκείμενου – 2 φορές

### *iii) Αφαίρεση της περίσσειας άλατος και ουρίας.*

Γίνεται εναλλαγή αλάτων και ύδατος μέσω ημιδιαπερατής μεμβράνης. Το διάλυμα που αναγνωρίστηκε ότι περιέχει TAT-p21 αραιώθηκε με κλίση συγκεντρώσεων. Ως αραιό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ένα λίτρο PBS που περιείχε αναστολείς πρωτεασών όπως PMSF και βενζαμιδίνη. Η διαδικασία έλαβε χώρα στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το διάλυμα αραιώσεως άλλαζε κάθε 24 ώρες για 3 ημέρες. Ομοίως σε διαδικασία αραιώσεως υπεβλήθη και ίση ποσότητα Buffer E για να χρησιμεύσει ως έλεγχος συγκρινόμενο με το διάλυμα της TAT-p21. Το τελικό προϊόν αποστειρώθηκε με φιλτράρισμα (φίλτρο  $0.2\mu\text{m}$ ) και αποθηκεύτηκε σε μικρές ποσότητες (100  $\mu\text{l}$ ) στους  $-80^{\circ}\text{C}$  προς επιτέλεση των πειραμάτων.

Εναλλακτικά η απομόνωση της TAT-p21 έγινε και σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η διαδικασία παραγωγής ήταν η ίδια. Διαφορές παρουσιάζει η απομόνωση της πρωτεΐνης. Απαιτείται σταθερό περιβάλλον εργασίας 4°C και χρήση διαλυμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζόλης. Η χρωματογραφία συγγένειας ακολουθεί και εδώ τα ίδια βήματα δηλαδή επώαση με διάλυμα Α και sonication, πλύση με διάλυμα Β και έκλουση με διάλυμα Γ. Εν συνεχεία ακολουθεί πάλι η αραίωση του διαλύματος καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl και η ιμιδαζόλης είναι τοξικές για περαιτέρω χορήγηση του διαλύματος TAT-p21 σε κύτταρα.

Διαλυμα Α: 25mM Imidazole, 300mM NaCl, 0,01M Tris-HCl, pH 8.0

Διαλυμα Β: 50mM Imidazole, 300mM NaCl, 0,01M Tris-HCl, pH 8.0

Διαλυμα Γ: 500mM Imidazole, 300mM NaCl, 0,01M Tris-HCl, pH 8.0

## **I. Πειράματα χορήγησης TAT-p21 σε ενδοθηλιακά κύτταρα**

**i) Μελέτη χρονοεξαρτώμενης ενδοκυττάριας παραμονής της p21 στα κύτταρα.**

Κατά το πείραμα αυτό κύτταρα EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία της TAT-p21 για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα κατόπιν λύθηκαν και σε εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε η TAT-p21 χρησιμοποιώντας anti-his αντίσωμα εναντίον του επιτόπου 6xHis της πρωτεΐνης.

**ii) Μελέτη της επίδρασης της TAT-p21 πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που καλλιεργούνται μέσα σε TCM.** Κατά το πείραμα αυτό, κύτταρα της σειράς EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν σε TCM, παρουσία ή απουσία της TAT-p21 για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίστηκε με αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer).

## Πειράματα που σχετίζονται με τη χορήγηση Imatinib (STI-571/Gleevec)

---

### A. Προετοιμασία διαλύματος Imatinib

Για τη δημιουργία διαλύματος ιματινίμπης χρησιμοποιήθηκαν κάψουλες του εμπορικού σκευάσματος που περιέχει την εν λόγω ουσία (caps Gleevec 100mg, Novartis Pharmaceuticals, Ελβετία). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν μια τροποποίηση αντίστοιχου πρωτοκόλλου που έχει περιγραφεί πρόσφατα από τους Zhang και συνεργάτες . Η ακριβής διαδικασία έχει ως εξής:

Προετοιμασία διαλύματος  
Imatinib

- Με αποστειρωμένα εργαλεία (λαβίδα και νυστέρι) ανοίγεται μια κάψουλα Gleevec και το περιεχόμενό της αδειάζεται σε σωλήνα φυγοκέντρηση 15 ml.
- Προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού
- Ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο για δοκιμαστικούς σωλήνες για 15 min
- Φιλτράρισμα του εναιωρήματος μέσω φίλτρου 0,2  $\mu\text{M}$
- Αποθήκευση του διηθήματος στους 4°C

Για την πραγματοποίηση κάθε πειράματος παρασκευαζόταν νέο διάλυμα.

### B. Πειράματα συσχέτισης της επίδρασης του STI571 σε σχέση με τη χρονική διάρκεια και τη δρώσα συγκέντρωση.

Η ενδοθηλιακή σειρά Eahy 926 καλλιεργήθηκε σε τριβλία κυτταροκαλλιέργειας με αρχική συγκέντρωση 50000 κύτταρα ανά τριβλίο. Η καλλιέργεια διατηρήθηκε για 3 ημέρες με την συγχορήγηση STI571 σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\mu\text{M}$  σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ή όχι FBS. Ακολούθησε μέτρηση των ζώντων κυττάρων με τη χρήση της χρώσης Trypan Blue. Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση των 10 $\mu\text{M}$  STI571 διενεργήθηκε πείραμα χρονικής απόκρισης. Η μέτρηση των κυττάρων έγινε με την ίδια μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Ως χρονικά σημεία μέτρησης ορίστηκαν οι 0, 2, 4, 6 ημέρες.

### Γ. Πείραμα εκτίμησης αλλαγών κυτταρικής μορφολογίας.

Τριβλία κυτταρικής καλλιέργειας με κύτταρα της σειράς Eahy 926 διατηρήθηκαν έως ότου επιτευχθεί ενδοθηλιακό μονόστρωμα. Εν συνεχεία το



θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε από αντίστοιχο άνευ ορού εμβρύου βοός συγχωρηγούμενου STI571 με τελική συγκέντρωση 10μΜ. Οι δίσκοι φωτογραφήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης μετά από 0, 2, 4, 6 ημέρες.

#### **Δ. Έλεγχος της απόπτωσης με TUNEL.**

Χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο σύστημα ανίχνευσης της Roche σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Η διαδικασία είχε ως ακολούθως:

#### **Έλεγχος της απόπτωσης με TUNEL**

- Καλλιέργεια των EA.hy 926 σε πλακίδια SFP. Επίδραση με ιματινίμπη (σε συγκέντρωση που προέκυψε από σχετικά πειράματα δοσο-εξάρτησης και χρονο-εξάρτησης) για 72 ώρες.
- Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές.
- Μονιμοποίηση με 4% παραφορμαλδεΰδη σε PBS +/- για 5 min.
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3min.
- Επικάλυψη των πλακιδίων με διάλυμα 0,5% Triton-X σε διάλυμα B-1 και επώαση για 5 min χωρίς ανάδευση ή κούνημα.
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS +/- σε περιστρεφόμενη έδρα (rotating platform) – Δύο φορές από 3 min.
- Επώαση με το διάλυμα TUNEL label της Roche για 60 min στους 37°C
- Επικάλυψη των πλακιδίων με τη χρήση διαλύματος PBS:Glycerol σε αναλογία 1:1.
- Συντήρηση στους 4°C στο σκοτάδι ή
- Απευθείας παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας το ανάλογο φίλτρο.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο κεφάλαιο του ανοσοφθορισμού.

### Ε. Ανίχνευση της απόπτωσης με τη χρήση Annexin V – FITC

Η Annexin V ανιχνεύει πρόωρες αλλαγές της κυτταρικής μεμβράνης που προκαλούνται από την απόπτωση. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανίχνευσης της Roche. Η διαδικασία είχε ως ακολούθως:

#### Annexin V – FITC

- Καλλιέργεια των EA.hy 926 σε πλακίδια SFP. Επίδραση με ιματινίμπη (σε συγκέντρωση που προέκυψε από σχετικά πειράματα δοσο-εξάρτησης και χρονο-εξάρτησης) για 72 ώρες.
- Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου
- Πλύσιμο των πλακιδίων με διάλυμα PBS
- Κάλυψη του πλακιδίου με διάλυμα Annexin V και τοποθέτηση καλυπτρίδας
- Επώαση για 15 min σε 15°C-25°C.
- Απευθείας παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας το ανάλογο φίλτρο.

### Στατιστική Ανάλυση

---

Αναλόγως του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν:

- δοκιμασίες  $\chi^2$
- η δοκιμασία Fisher
- η δοκιμασία Mann-Whitney
- η δοκιμασία Wilcoxon
- η δοκιμασία ANOVA

## Λοιπά Υλικά

ΟΝΟΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
DMEM	<i>Invitrogen</i>
FBS	<i>Invitrogen</i>
Trypsin	<i>Invitrogen</i>
DMSO	<i>Sigma</i>
SFP πλακίδια	<i>O.Kindler GmbH</i>
Papanicolaou 1a Harris hematoxylin	<i>Merck</i>
BSA	<i>Eurobio Biotechnology &amp; NEB</i>
Taq Polymerase	<i>Promega</i>
Vent Polymerase	<i>Invitrogen</i>
dNTP mix	<i>Pharmacia</i>
Rnase inhibitors	<i>Promega</i>
Εκκινητές για PCR	<i>ITE</i>
Hind III	<i>ITE</i>
ECorI	<i>ITE</i>
Kpn I	<i>ITE</i>
BamH I	<i>ITE</i>
M-MLV RT	<i>Invitrogen</i>
Protein DC assay	<i>BioRad</i>
ECL kit	<i>Pierce</i>
Nitrocellulose membrane	<i>Amersham</i>
Anti mouse IgG-HRP	<i>Chemicon</i>
Anti mouse IgG-FITC	<i>Chemicon</i>
Trypan Blue	<i>Sigma</i>
Anti-Cip1 (WB)	<i>Transduction Laboratories</i>

Όλα τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια προήλθαν από το εμπόριο με το μεγαλύτερο διαθέσιμο δείκτη ποιότητας.

---

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---

## **Αποτελέσματα**

### **A. Αγγειογένεση – Μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας**

Στην παρούσα διατριβή η αγγειογένεση μελετήθηκε με τη μέθοδο της μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (Microvascular Density). Χρησιμοποιήθηκαν 30 δείγματα από φυσιολογικό μαστό, τα οποία προέκυψαν από ισάριθμες βιοψίες θήλων ασθενών και 33 δείγματα καρκίνου μαστού που προέκυψαν είτε από ογκεκτομές, είτε από μαστεκτομές ισάριθμων ασθενών. Τα δείγματα αυτά μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και εγκλείσθησαν σε παραφίνη προκειμένου να ληφθούν τομές προς χρώση. Πραγματοποιήθηκαν χρώσεις ανοσοϊστοχημείας με πρωτοταγές αντίσωμα εναντίον επιτόπου των μορίου CD31. Η εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας έγινε σε μια περιοχή υψηλής αγγειογενετικής δραστηριότητας (Hot Spot) χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο Nikon FXA και τον αντίστοιχο προσοφθάλμιο που περιέχει το πεδίο μέτρησης Chalkey. Το πεδίο αυτό είναι ένα πεδίο στίξεων των οποίων η κατανομή σχεδιάστηκε να καλύπτει με τυχαίο τρόπο την επιφάνεια προς ανάλυση. Ο αριθμός των θετικών ενδοθηλιακών κυττάρων που επικαλύπτουν οι στίξεις αποτελεί και την ποσοτική εκτίμηση θετικότητας του πεδίου. Στην προκειμένη περίπτωση η μικροαγγειακή πυκνότητα περιγράφει την αγγειογενετική δραστηριότητα.

#### **A1. Αγγειογένεση – Εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με αντι-CD31**

Η χρώση με αντίσωμα εναντίον του CD31 έδειξε ότι η μέση τιμή της μικροαγγειακής πυκνότητας διαφέρει στους φυσιολογικούς μαστούς (μέση τιμή CD31  $1.16 \pm 0.15$ ) σε σχέση με τα δείγματα του καρκίνου του μαστού (μέση τιμή CD31  $3.33 \pm 0.27$ ). Η διαφορά αυτή, όπως προκύπτει από τη σχετική δοκιμασία Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ), είναι στατιστικά σημαντική. Ακολουθούν η παρουσίαση της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τα σχετικά διαγράμματα.

i. Οι τιμές της μικροαγγειακής πυκνότητας παρουσιάζονται παρακάτω

A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD
1	NL	2	17	NL	3	3	CA	3	19	CA	5
2	NL	2	18	NL	1	4	CA	1	20	CA	4
3	NL	2	19	NL	1	5	CA	1	21	CA	4
4	NL	3	20	NL	2	6	CA	4	22	CA	2
5	NL	1	21	NL	1	7	CA	2	23	CA	5
6	NL	2	22	NL	1	8	CA	5	24	CA	2
7	NL	2	23	NL	1	9	CA	6	25	CA	3
8	NL	1	24	NL	0	10	CA	2	26	CA	4
9	NL	1	25	NL	0	11	CA	5	27	CA	7
10	NL	1	26	NL	2	12	CA	2	28	CA	2
11	NL	0	27	NL	1	13	CA	6	29	CA	3
12	NL	1	28	NL	0	14	CA	4	30	CA	2
13	NL	0	29	NL	1	15	CA	5	31	CA	2
14	NL	1	30	NL	1	16	CA	2	32	CA	2
15	NL	0	1	CA	4	17	CA	4	33	CA	2
16	NL	1	2	CA	2	18	CA	3			

(NL: Φυσιολογικός μαστός-σκιαγραφείται από γκρι χρώμα, CA:Καρκίνος μαστού)

ii. Περιγραφική ανάλυση του δείγματος

Δείγμα	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	N <sub>x</sub>
Normal	1,16667	0,83391	0,15225	0	3	3	35	30
Cancer	3,33333	1,55456	0,27061	1	7	6	110	33

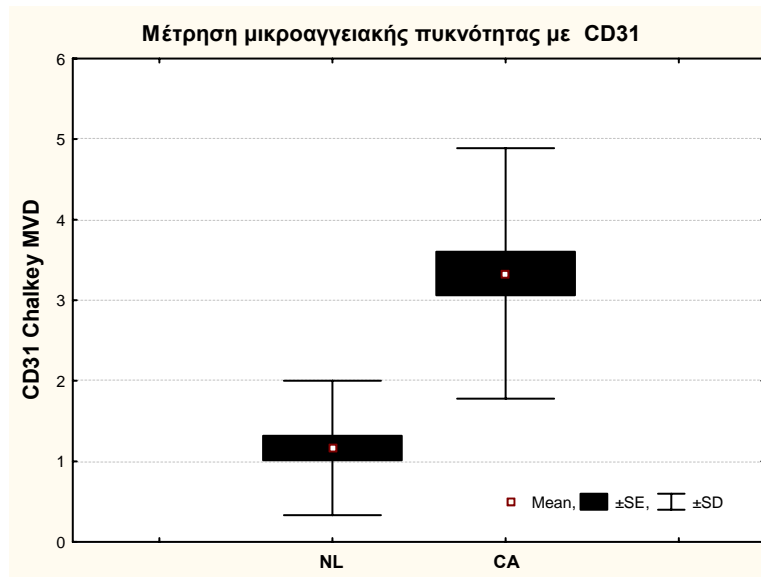
(Normal: Φυσιολογικός μαστός, Cancer:Καρκίνος μαστού)

iii. Δοκιμασία Mann-Whitney μεταξύ των τιμών μικροαγγειακής πυκνότητας των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

	Rank Sum NL	Rank Sum CA	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N (NL)	Valid N (CA)
CD31 chalkey	568,000	1448,00	103,000	-5,39472	<10 <sup>-5</sup>	-5,53625	<10 <sup>-5</sup>	30	33

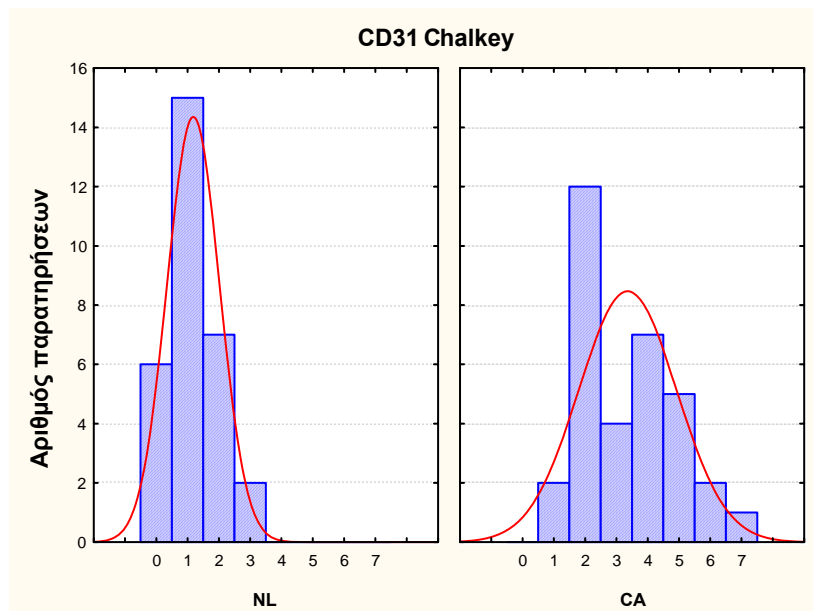
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA:Καρκίνος μαστού)

iv. Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων (διάγραμμα Box-Whisker). Είναι σαφής η διαφορά της μικροαγγειακής πυκνότητας υπέρ των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.



(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

v. Κατανομή των τιμών μέσα στα δείγματα. Διαφάνεται μια σημαντική διαφορά στις συχνότερα συναντώμενες τιμές σε κάθε δείγμα.



(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

## A2. Αγγειογένεση - Μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με αντι-CD105

Η συσχέτιση της έκφρασης ενδογλίνης (CD105) με τα νεόπλαστα τριχοειδή είναι ένα γεγονός που αναφέρθηκε λίαν προσφάτως (όπως περιγράφεται στην «Εισαγωγή» της παρούσας διατριβής). Ο έλεγχος της έκφρασης της σε περιστατικά καρκίνου του μαστού κρίθηκε αναγκαία για δύο λόγους. Αφενός σχετίζεται με τη σηματοδότηση του παράγοντα TGFβ ο οποίος αναφέρεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νεοπλασιών (βλ. Εισαγωγή) και αφετέρου διότι είναι πολύ λίγες οι αναφορές που χρησιμοποίησαν το συγκεκριμένο μόριο με στόχο την ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης και δη στον καρκίνο του μαστού.

Στην προκειμένη περίπτωση εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή θετικότητα ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον εφαρμόστηκε μέτρηση σε περιοχή αγγειογενετικής δραστηριότητας (hot-spot) με τη χρήση του προσοφθάλμιου φακού chalkey όπως αυτό περιγράφεται στην υποενότητα A1.

Η χρώση με αντίσωμα εναντίον του CD105 έδειξε ότι η μέση τιμή της μικροαγγειακής πυκνότητας διαφέρει στους φυσιολογικούς μαστούς (μέση τιμή CD105  $0.23 \pm 0.11$ ) σε σχέση με τα δείγματα του καρκίνου του μαστού (μέση τιμή CD105  $2.63 \pm 0.20$ ). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική όπως προκύπτει από τη σχετική δοκιμασία Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Ακολουθούν η παρουσίαση της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τα σχετικά διαγράμματα.

ι) Παρουσίαση των πρωτογενών αποτελεσμάτων σε μορφή πίνακα.

A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD	A/A	Δείγμα	MVD
1	NL	0	17	NL	0	3	CA	2	19	CA	4
2	NL	0	18	NL	1	4	CA	1	20	CA	3
3	NL	0	19	NL	0	5	CA	1	21	CA	3
4	NL	0	20	NL	0	6	CA	4	22	CA	2
5	NL	0	21	NL	0	7	CA	2	23	CA	3
6	NL	0	22	NL	0	8	CA	4	24	CA	2
7	NL	1	23	NL	0	9	CA	5	25	CA	3
8	NL	0	24	NL	0	10	CA	2	26	CA	3
9	NL	0	25	NL	0	11	CA	5	27	CA	5
10	NL	0	26	NL	3	12	CA	2	28	CA	1
11	NL	0	27	NL	0	13	CA	3	29	CA	2
12	NL	1	28	NL	0	14	CA	2	30	CA	2
13	NL	0	29	NL	0	15	CA	4	31	CA	2
14	NL	0	30	NL	1	16	CA	1	32	CA	2
15	NL	0	1	CA	4	17	CA	3	33	CA	1
16	NL	0	2	CA	2	18	CA	2			

(NL: Φυσιολογικός μαστός-σκιαγραφείται από γκρι χρώμα, CA: Καρκίνος μαστού)



ii) Τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν με μέθοδο περιγραφικής στατιστικής προκειμένου να προκύψουν τα βασικά στατιστικά μεγέθη για κάθε δείγμα.

Δείγμα	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
<i>Normal</i>	0,23333	0,62606	0,1143	0	3	3	7	30
<i>Cancer</i>	2,63636	1,19421	0,20789	1	5	4	87	33

(*Normal*: Φυσιολογικός μαστός, *Cancer*: Καρκίνος μαστού. Διαφαίνεται η μέση τιμή- $\bar{x}$ , η τυπική απόκλιση-SD και το τυπικό σφάλμα-SE)

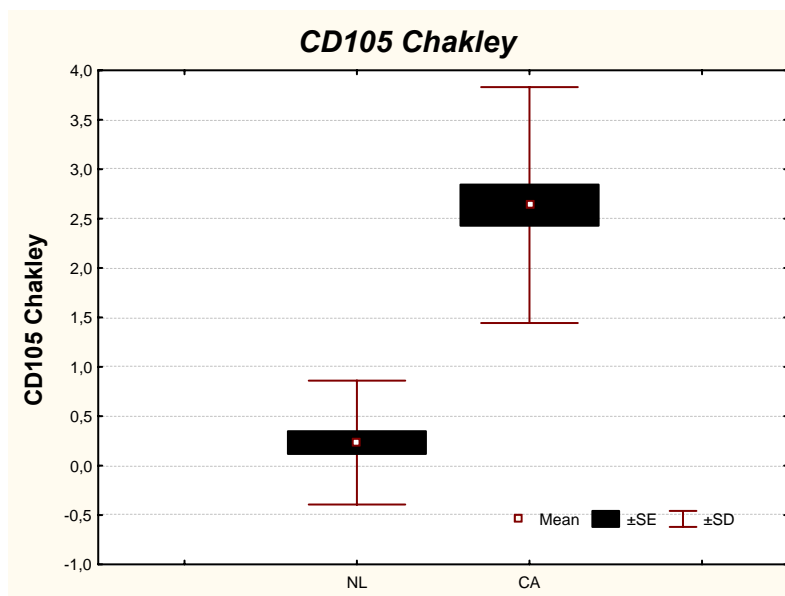
iii) Τα ανωτέρω στοιχεία χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της δοκιμασίας Mann-Whitney. Η διαφορά αγγειογενετικής πυκνότητας μεταξύ των δύο ομάδων (φυσιολογικών και καρκινικών ιστών) κρίθηκε σημαντική ( $p < 0.05$ ).

	Rank Sum NL	Rank Sum CA	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N (NL)	Valid N (CA)
<b>CD 105 chalkey</b>	496,5000	1519,500	31,50000	-6,37871	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	-6,63806	<b>&lt;10<sup>-5</sup></b>	30	33

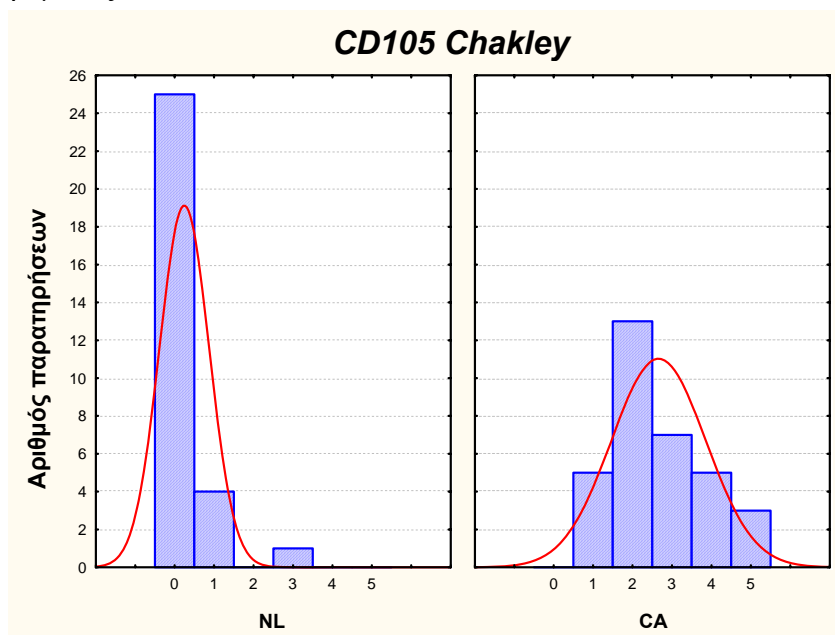
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

iv) Η διαφορά αυτή απεικονίζεται στο παράπλευρο διάγραμμα με τη μορφή Box-Whisker.

NL: Φυσιολογικός μαστός  
CA: Καρκίνος μαστού



ν) Ομοίως απεικονίζεται η διαφορά και στην κατανομή των τιμών μέσα στις προς εξέταση ομάδες.



(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

### **A3. Αγγειογένεση-Εκτίμηση της θετικότητας των νεόπλαστων τριχοειδών μέσω της έντασης χρώσης με αντι CD105.**

Εκτός από την ποσοτική προσέγγιση της αγγειογένεσης, η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης με τη μέθοδο chalkley, έγινε προσπάθεια να υπάρξει και ποιοτική εκτίμηση της έντασης χρώσης. Η λογική αυτής της ανάλυσης στηρίχτηκε στην υπόθεση ότι πιθανώς τα νεόπλαστα τριχοειδή όχι μόνο εκφράζουν την ενδογλίνη σε υψηλότερο κυτταρικό ποσοστό συγκρινόμενα με ενδοθήλια αγγείων που δε δέχονται αγγειογενετικά μηνύματα, αλλά ταυτόχρονα η πυκνότητα των υποδοχέων ανά ενδοθηλιακό κύτταρο να ποικίλει.

Η ένταση χρώσης εκτιμήθηκε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές. Στα περιστατικά που υπήρχε διαφωνία, τρίτος παρατηρητής έδινε λύση και οριστική εκτίμηση. Η βαθμονόμηση της κλίμακας έγινε με ακέραιες τιμές από το 0 έως το 3, θεωρώντας 0 την ανυπαρξία χρώσης, 1 την ύπαρξη αχνής θετικότητας σε μεγέθυνση 400X, 2 τη σαφή θετικότητα σε μεγέθυνση 400X και 3 την αναγνώριση σαφούς θετικότητας με τη χρήση μεγέθυνσης 100X.

Η χρώση με αντίσωμα εναντίον του CD105 έδειξε ότι η μέση τιμή της έντασης χρώσης διαφέρει στους φυσιολογικούς μαστούς (μέση τιμή έντασης χρώσης

CD105  $0.23 \pm 0.10$ ) σε σχέση με τα δείγματα του καρκίνου του μαστού (μέση τιμή έντασης χρώσης CD105  $1.75 \pm 0.83$ ). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική όπως προκύπτει από τη σχετική δοκιμασία Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Ακολουθούν η παρουσίαση της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τα σχετικά διαγράμματα.

i) Παρουσίαση των πρωτογενών αποτελεσμάτων σε μορφή πίνακα.

A/A	Δείγμα	CD105i	A/A	Δείγμα	CD105i	A/A	Δείγμα	CD105i	A/A	Δείγμα	CD105i
1	NL	0	17	NL	0	3	CA	2	19	CA	1
2	NL	0	18	NL	1	4	CA	1	20	CA	2
3	NL	0	19	NL	0	5	CA	1	21	CA	2
4	NL	0	20	NL	0	6	CA	1	22	CA	2
5	NL	0	21	NL	0	7	CA	2	23	CA	0
6	NL	0	22	NL	0	8	CA	3	24	CA	2
7	NL	1	23	NL	0	9	CA	3	25	CA	2
8	NL	0	24	NL	0	10	CA	2	26	CA	1
9	NL	0	25	NL	0	11	CA	2	27	CA	3
10	NL	0	26	NL	2	12	CA	1	28	CA	2
11	NL	0	27	NL	0	13	CA	1	29	CA	2
12	NL	1	28	NL	0	14	CA	0	30	CA	1
13	NL	0	29	NL	0	15	CA	2	31	CA	3
14	NL	0	30	NL	2	16	CA	2	32	CA	3
15	NL	0	1	CA	1	17	CA	2	33	CA	3
16	NL	0	2	CA	1	18	CA	2			

(NL: Φυσιολογικός μαστός-σκιαγραφείται από γκρι χρώμα, CA: Καρκίνος μαστού, CD105i: Ένταση χρώσης με αντι-CD105)

ii) Τα αποτελέσματα αυτά αναλύθηκαν με μέθοδο περιγραφικής στατιστικής προκειμένου να προκύψουν τα βασικά στατιστικά μεγέθη για κάθε δείγμα.

Δείγμα	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Normal	0,23333	0,56832	0,10376	0	2	2	7	30
Cancer	1,75758	0,8303	0,14454	0	3	3	58	33

(Normal: Φυσιολογικός μαστός, Cancer: Καρκίνος μαστού. Διαφαίνεται η μέση τιμή- $\bar{x}$ , η τυπική απόκλιση-SD και το τυπικό σφάλμα-SE)

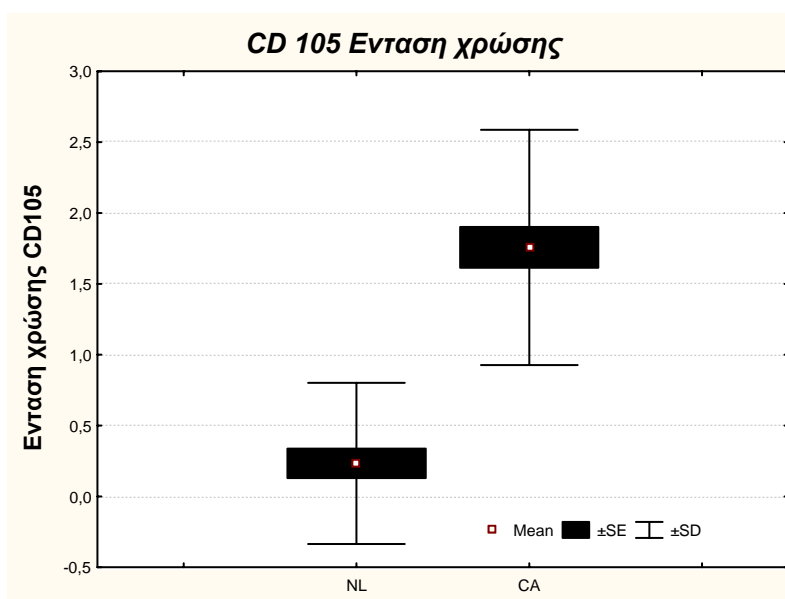
iii) Τα ανωτέρω στοιχεία χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της δοκιμασίας Mann-Whitney. Η διαφορά έντασης χρώσης με αντι-CD105 μεταξύ των δύο ομάδων (φυσιολογικών και καρκινικών ιστών) κρίθηκε σημαντική ( $p < 0.05$ ).

	Rank Sum NL	Rank Sum CA	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N (NL)	Valid N (CA)
CD105 Ένταση Χρώσης	550,0000	1466,000	85,00000	-5,64244	$<10^{-5}$	-5,97356	$<10^{-5}$	30	33

(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

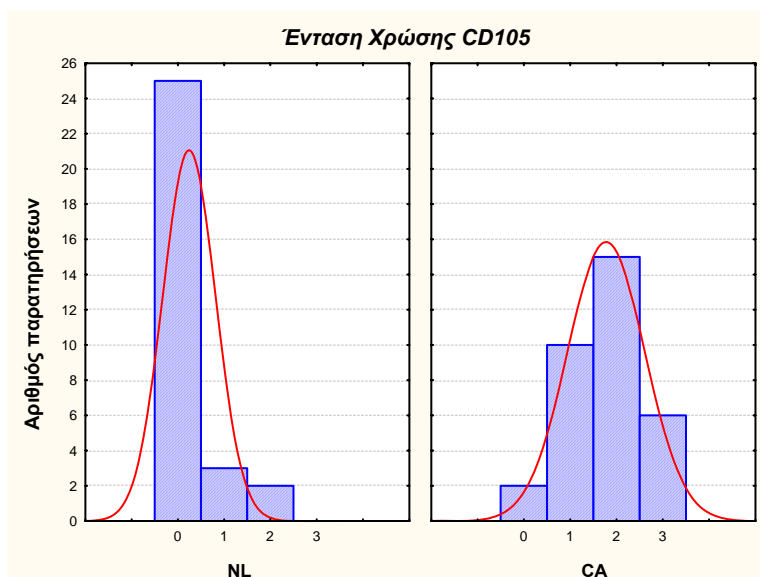
iv) Η διαφορά αυτή απεικονίζεται στο παράπλευρο διάγραμμα με τη μορφή Box-Whisker.

NL: Φυσιολογικός μαστός,  
CA: Καρκίνος μαστού



v) Ομοίως απεικονίζεται η διαφορά και στην κατανομή των τιμών μέσα στις προς εξέταση ομάδες.

NL: Φυσιολογικός μαστός,  
CA: Καρκίνος μαστού



#### A4. Αγγειογένεση – Συσχέτιση των δυο μεθόδων ποσοτικοποίησης της μικροαγγειακής πυκνότητας

Με δεδομένη την παρατήρηση στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ του δείγματος των ιστών από φυσιολογικό μαστό και του δείγματος από ιστούς καρκίνων του μαστού, προέκυψε η υπόθεση ότι πιθανώς οι δύο μέθοδοι σχετίζονται μεταξύ τους. Προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκαν στατιστικές δοκιμασίες συσχέτισης. Αναλόγως της δυνατότητας θεώρησης των δειγμάτων ως κανονικές ή μη κανονικές κατανομές, χρησιμοποιήθηκαν τόσο η δοκιμασία του Pearson (κανονική κατανομή) όσο και η δοκιμασία του Spearman (μη κανονική κατανομή). Τα αποτελέσματα των δύο δοκιμασιών παρουσιάζονται συνοπτικά στους ακόλουθους πίνακες.

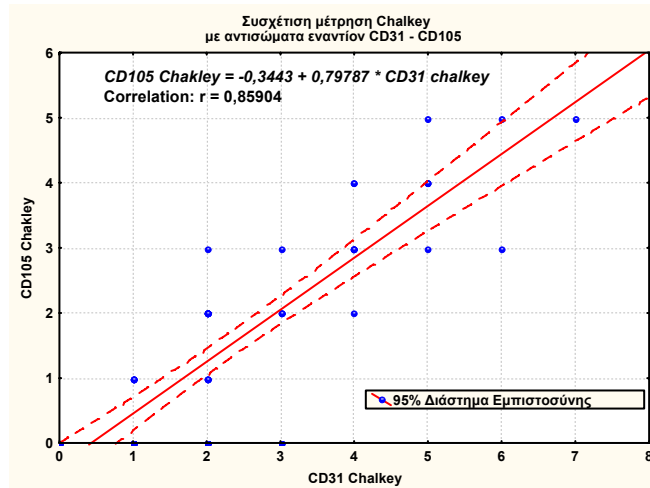
i) Pearson r

Ο συντελεστής r είναι 0,86 που κρίνεται στατιστικά σημαντικός ( $p < 0,05$ ).

	CD105 Chalkey	CD31 chalkey
CD105 Chalkey	1,00	0,86
CD31 chalkey	0,86	1,00
<b>r(CD105,CD31)</b>		
0,859041		
<b>r<sup>2</sup></b>		
0,737951		
<b>t</b>		
13,10653		
<b>p</b>		
p<0,0001		

Πίνακας A4α: Παρουσίαση της ανάλυσης συσχέτισης Pearson των μεθόδων CD31 Chalkey και CD105 Chalkey.

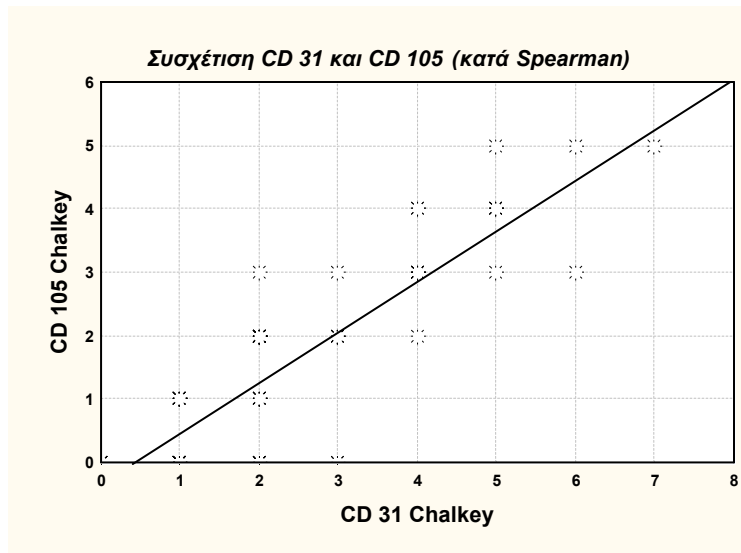
Συνεπώς εάν θεωρηθεί κανονική η κατανομή των δειγμάτων, η μέθοδος μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας Chalkey με αντίσωμα εναντίον του CD31 και η μέθοδος μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας Chalkey με αντίσωμα εναντίον του CD 105, σχετίζονται θετικά. Η γραφική απεικόνιση της συσχέτισης παρουσιάζεται παραπλεύρως.



ii) Η ανάλυση κατά Spearman οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα. Όπως διαφαίνεται η τιμή του Spearman r είναι 0,81 και κρίνεται στατιστικώς σημαντική. Ακολουθεί ο σχετικός πίνακας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Spearman, καθώς και η σχετική γραφική απεικόνιση.

	Valid	Spearman r	t(N-2)	p-level
CD105 Chalkey Vs. CD31 Chalkey	63	0,814735	10,97432	<10 <sup>-5</sup>

Πίνακας A4β: Παρουσίαση της ανάλυσης συσχέτισης Spearman των μεθόδων CD31 Chalkey και CD105 Chalkey.



Συμπερασματικά διαφαίνεται ότι η αξιολόγηση της αγγειογένεσης τόσο με CD31 όσο και με CD105 οδηγούν σε ασφαλή συμπεράσματα. Παραταύτα η χρήση του CD105 φαίνεται ότι υπερτερεί καθώς αυτό εκφράζεται κυρίως σε ενεργούς

αγγειογενετικά ιστούς (όπως στην προκειμένη περίπτωση ο καρκίνος του μαστού) Όπως προκύπτει από την υποενοότητα A2 μόνο 5 επί συνόλου 30 δειγμάτων φυσιολογικού μαστού (ποσοστό 16,6%) παρουσίασε θετικότητα για το CD105, ενώ όλα τα δείγματα καρκίνου του μαστού ανιχνεύτηκαν θετικά. Αντιθέτως σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ενότητας A1, όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν θετικά για CD31. Η διαφορά αυτή αποδεικνύει την ευαισθησία ανίχνευσης των ενεργών αγγειογενετικά ενδοθηλίων με αντίσωμα εναντίον του CD105 και στατιστικά προκύπτει από την ανάλυση των θετικών vs αρνητικών περιστατικών στα δείγματα φυσιολογικού μαστού σε πίνακα 2x2, εφαρμόζοντας δοκιμασία Fisher.

	Θετική χρώση	Αρνητική Χρώση
CD105 Chakley	5	25
CD31 chalkey	30	0
		p <0,0001

---

## **B. Η έκφραση διαφόρων μορίων που σχετίζονται με την ενδοθηλιακή λειτουργικότητα και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο του μαστού.**

---

Κατά την παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τρεις ομάδες μορίων που ως κοινό χαρακτηριστικό έχουν την έκφρασή τους από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η πρώτη ομάδα μορίων αφορά αγγειογενετικά μόρια. Πρόκειται για τα FLK-1 και FLT-1 που όπως αναφέρεται στην ενότητα «Εισαγωγή» λειτουργούν ως υποδοχείς των VEGF, οπότε παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Επιπλέον μελετήθηκαν οι υποδοχείς παράγοντα PDGF και συγκεκριμένα ο υποδοχέας PDGFR $\alpha$  και ο PDGFR $\beta$ , δεδομένου του γεγονότος ότι αναφέρεται η έκφραση τους

επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς επίσης αποτελούν στόχο μοριακών παρεμβάσεων με φαρμακευτικά σκευάσματα όπως το μόριο Imatinib. Ο πρώτος στόχος της μελέτης αυτών των μορίων ήταν η αναγνώριση ενός ιδιαίτερου μοριακού προφίλ το οποίο θα μπορούσε στο μέλλον να στοχευθεί φαρμακευτικώς.

Η δεύτερη ομάδα μορίων που μελετήθηκε ήταν μόρια της οικογένειας των μορίων προσκόλλησης και συγκεκριμένα τα μόρια ICAM-1/CD56, VCAM-1/CD106 και E-Selectin/CD62E. Και τα τρία αυτά μόρια συμμετέχουν κυρίως σε διαδικασίες φλεγμονής. Στον καρκίνο του μαστού, όπως και σε άλλους καρκίνους είναι μέχρι στιγμής αντικρουόμενες οι απόψεις σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης τους. Άλλωστε, φλεγμονή, αγγειογένεση και μεταστασιμότητα είναι στενά συνδεδεμένα με την ανάπτυξη νεοπλασμάτων, χωρίς να υπάρχει σαφής απόδειξη για το εάν τελικά η φλεγμονή παρεμποδίζει ή ευοδώνει την πορεία της νεοπλασματικής νόσου. Στα πλαίσια αυτά η μελέτη της έκφρασης των παραπάνω μορίων αποφασίστηκε προκειμένου να αναγνωριστεί ένας τρόπος αντίδρασης των ενδοθηλιακών κυττάρων στην νεοπλασία και να χρησιμοποιηθεί αναλόγως.

Η τρίτη ομάδα αποτελείται από ένα ξεχωριστό μόριο το οποίο εμμέσως σχετίζεται τόσο με τη φλεγμονή όσο και με την αγγειογένεση. Πρόκειται για την κυκλοξυγενάση-2 που όπως αναφέρεται στην «Εισαγωγή» ευοδώνει την ενδοθηλιακή μετανάστευση, συμμετέχει όμως παράλληλα και στην παραγωγή προσταγλανδίνης E2, και συνεπώς και στη φλεγμονή.

Τα επιμέρους αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

### **B1. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα Flt-1.**

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο υποδοχέας Flt-1 εκφράζεται από όλα ανεξαιρέτως τα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε επρόκειτο για ιστούς φυσιολογικού μαστού, είτε επρόκειτο για δείγματα καρκίνων του μαστού. Συνεπώς δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης.

### **B2. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα Flk-1.**

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

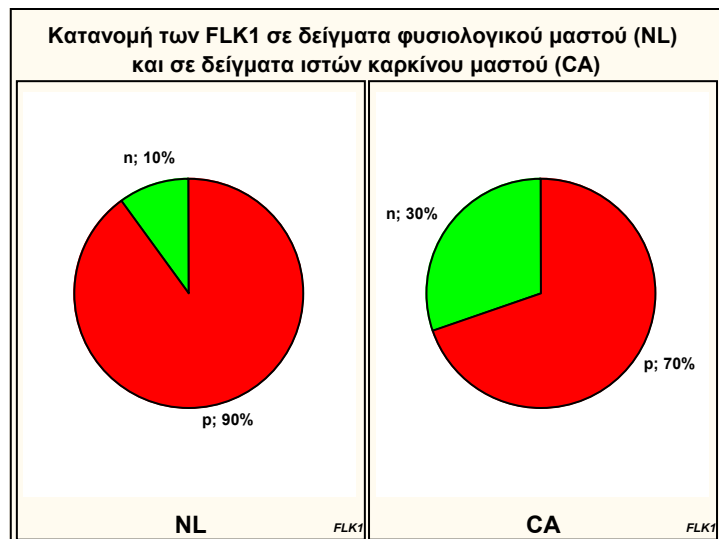
A/A	Δείγμα	FLK-1	A/A	Δείγμα	FLK-1	A/A	Δείγμα	FLK-1	A/A	Δείγμα	FLK-1
1	NL	p	17	NL	p	3	CA	n	19	CA	p
2	NL	p	18	NL	p	4	CA	n	20	CA	p
3	NL	p	19	NL	p	5	CA	p	21	CA	p
4	NL	p	20	NL	p	6	CA	n	22	CA	p
5	NL	p	21	NL	p	7	CA	n	23	CA	p
6	NL	p	22	NL	n	8	CA	p	24	CA	p
7	NL	p	23	NL	p	9	CA	p	25	CA	p
8	NL	p	24	NL	p	10	CA	p	26	CA	p
9	NL	p	25	NL	p	11	CA	p	27	CA	n
10	NL	p	26	NL	p	12	CA	p	28	CA	p
11	NL	p	27	NL	p	13	CA	n	29	CA	p
12	NL	p	28	NL	n	14	CA	p	30	CA	p
13	NL	p	29	NL	p	15	CA	n	31	CA	n
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	n	32	CA	n
15	NL	p	1	CA	p	17	CA	p	33	CA	p
16	NL	p	2	CA	p	18	CA	p			

(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι ο Flk-1 εκφράζεται στο 90% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 69,7% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

	FLK1 (+)	FLK1 (-)	Row Totals
NL	27	3	30
%	90,00%	10,00%	
CA	23	10	33
%	69,70%	30,30%	
Column Totals	50	13	63

Πίνακας Β2α: Χρώση για Flk-1. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.



Εικόνα Β2α: Χρώση για Flk-1. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική όμως ανάλυση έδειξε ότι αν και υπάρχει τάση για ελάττωση της έκφρασης του FLK-1 στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, εντούτοις η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	3,955343	df=1	p=0,04673
<b>M-L Chi-square</b>	4,153950	df=1	p=0,04154
<b>Yates Chi-square</b>	<b>2,812752</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,09352</b>
<b>Fisher exact, one-tailed</b>			p=0,04501
<b>two-tailed</b>			p=0,06371
<b>McNemar Chi-square (A/D)</b>	6,918919	df=1	p=0,00853
<b>(B/C)</b>	13,88461	df=1	p=0,00019

*Πίνακας Β2β: Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  με διόρθωση κατά Yates, προκύπτει αρνητική ( $p > 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, μη σημαντική.*

### B3. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα PDGFR $\alpha$ .

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	PDGFR $\alpha$	A/A	Δείγμα	PDGFR $\alpha$	A/A	Δείγμα	PDGFR $\alpha$	A/A	Δείγμα	PDGFR $\alpha$
1	NL	p	17	NL	p	3	CA	n	19	CA	p
2	NL	p	18	NL	p	4	CA	p	20	CA	p
3	NL	n	19	NL	p	5	CA	p	21	CA	n
4	NL	p	20	NL	p	6	CA	p	22	CA	p
5	NL	p	21	NL	p	7	CA	p	23	CA	p
6	NL	p	22	NL	n	8	CA	n	24	CA	p
7	NL	p	23	NL	p	9	CA	p	25	CA	p
8	NL	p	24	NL	p	10	CA	n	26	CA	p
9	NL	p	25	NL	p	11	CA	p	27	CA	p
10	NL	p	26	NL	p	12	CA	p	28	CA	p
11	NL	p	27	NL	p	13	CA	p	29	CA	p
12	NL	p	28	NL	p	14	CA	p	30	CA	p
13	NL	p	29	NL	p	15	CA	p	31	CA	p
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	p	32	CA	p
15	NL	p	1	CA	n	17	CA	n	33	CA	n
16	NL	p	2	CA	p	18	CA	n			

(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

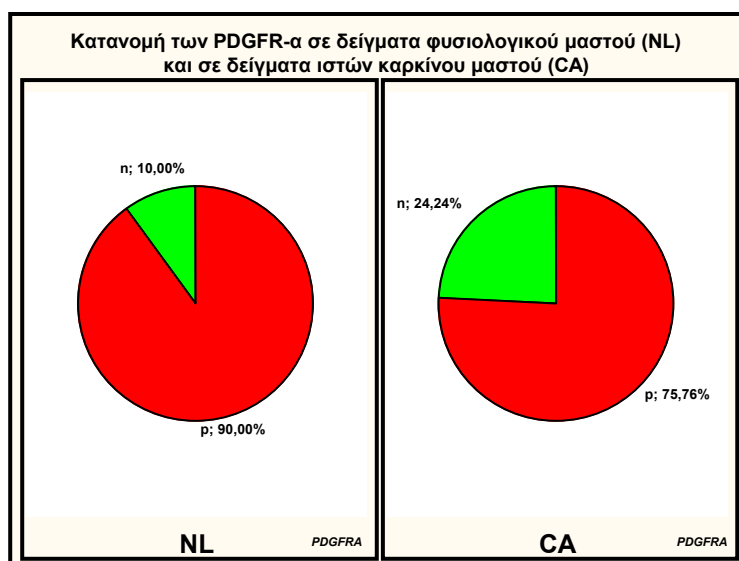
Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι ο PDGFR $\alpha$  εκφράζεται στο 90% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 75.76% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

*Πίνακας Β3α: Χρώση για PDGFR $\alpha$ . Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.*

	PDGFR $\alpha$ (+)	PDGFR $\alpha$ (-)	Row Totals
<b>NL</b>	27	3	30
<b>%</b>	90,00%	10,00%	
<b>CA</b>	25	8	33
<b>%</b>	75,76%	24,24%	
<b>Column Totals</b>	52	11	63

Εικόνα Β3α: Χρώση για PDGFRβ.

Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική όμως ανάλυση έδειξε ότι αν και παρατηρείται ελάττωση της έκφρασης του PDGFRα στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, εντούτοις η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
Pearson Chi-square	2,211809	df=1	p=0,13696
M-L Chi-square	2,292311	df=1	p=0,13002
Yates Chi-square	<b>1,333944</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,24811</b>
Fisher exact, one-tailed			p=0,12361
two-tailed			p=0,18943
McNemar Chi-square (A/D)	9,257143	df=1	p=0,00235
(B/C)	15,75000	df=1	p=0,00007

Πίνακας Β3β: Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  με διόρθωση κατά Yates, προκύπτει αρνητική ( $p > 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, μη σημαντική

#### B4. Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα PDGFRβ.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	PDGFRB	A/A	Δείγμα	PDGFRB	A/A	Δείγμα	PDGFRB	A/A	Δείγμα	PDGFRB
1	NL	p	17	NL	p	3	CA	p	19	CA	n
2	NL	n	18	NL	n	4	CA	p	20	CA	p
3	NL	p	19	NL	n	5	CA	p	21	CA	p
4	NL	p	20	NL	p	6	CA	n	22	CA	p
5	NL	n	21	NL	n	7	CA	n	23	CA	n
6	NL	p	22	NL	p	8	CA	p	24	CA	n
7	NL	p	23	NL	n	9	CA	p	25	CA	p
8	NL	n	24	NL	n	10	CA	p	26	CA	p
9	NL	p	25	NL	n	11	CA	p	27	CA	p
10	NL	n	26	NL	n	12	CA	n	28	CA	p
11	NL	n	27	NL	n	13	CA	n	29	CA	p

12	NL	p	28	NL	n	14	CA	p	30	CA	p
13	NL	n	29	NL	n	15	CA	n	31	CA	p
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	n	32	CA	p
15	NL	p	1	CA	n	17	CA	p	33	CA	p
16	NL	p	2	CA	p	18	CA	p			

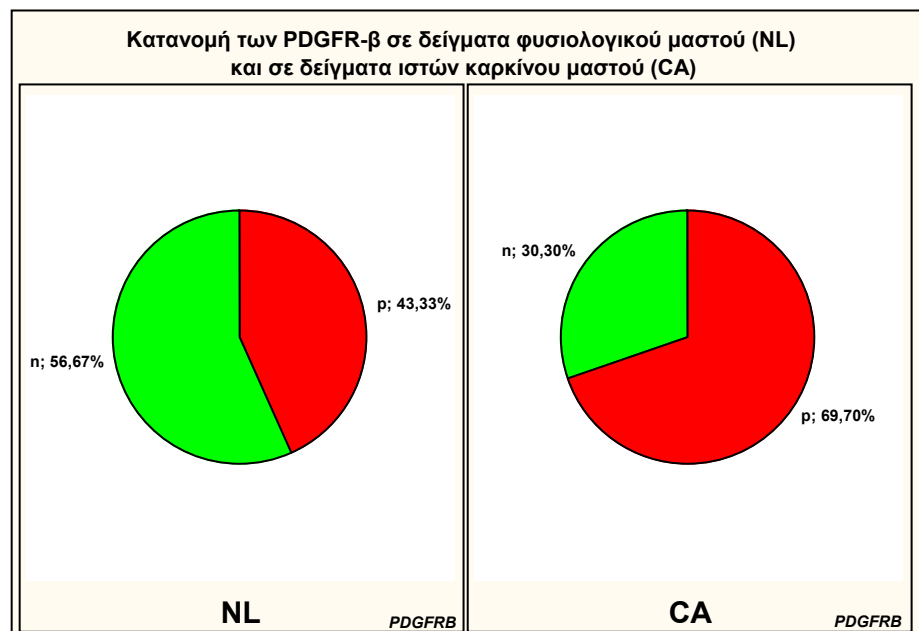
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι ο PDGFRβ εκφράζεται στο 43,33% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 69,70% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

**Πίνακας Β4α:** Χρώση για PDGFRβ. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.

	PDGFRB (+)	PDGFRB (-)	Row Totals
NL	13	17	30
%	43,33%	56,67%	
CA	23	10	33
Row %	69,70%	30,30%	
Column Totals	36	27	63

**Εικόνα Β4α:** Χρώση για PDGFRβ. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική όμως ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει τάση για αύξηση της έκφρασης του PDGFRβ στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, και ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	<b>4,459848</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,03470</b>
M-L Chi-square	4,507452	df=1	p=0,03375
Yates Chi-square	3,448295	df=1	p=0,06332
Fisher exact, one-tailed			p=0,03131
two-tailed			p=0,04398
McNemar Chi-square (A/D)	0,1739130	df=1	p=0,67666
(B/C)	0,6250000	df=1	p=0,42920

**Πίνακας Β4β:** Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson, προκύπτει θετική ( $p < 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, στατιστικώς σημαντική

## B5. Μελέτη της έκφρασης της COX-2.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	COX-2	A/A	Δείγμα	COX-2	A/A	Δείγμα	COX-2	A/A	Δείγμα	COX-2
1	NL	p	17	NL	p	3	CA	p	19	CA	p
2	NL	p	18	NL	n	4	CA	p	20	CA	p
3	NL	n	19	NL	n	5	CA	p	21	CA	n
4	NL	p	20	NL	n	6	CA	p	22	CA	p
5	NL	p	21	NL	n	7	CA	p	23	CA	n
6	NL	p	22	NL	n	8	CA	p	24	CA	n
7	NL	p	23	NL	p	9	CA	n	25	CA	p
8	NL	n	24	NL	n	10	CA	p	26	CA	n
9	NL	n	25	NL	n	11	CA	p	27	CA	p
10	NL	n	26	NL	p	12	CA	p	28	CA	p
11	NL	n	27	NL	n	13	CA	n	29	CA	p
12	NL	p	28	NL	n	14	CA	p	30	CA	p
13	NL	n	29	NL	n	15	CA	p	31	CA	p
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	p	32	CA	p
15	NL	n	1	CA	n	17	CA	n	33	CA	n
16	NL	p	2	CA	p	18	CA	p			

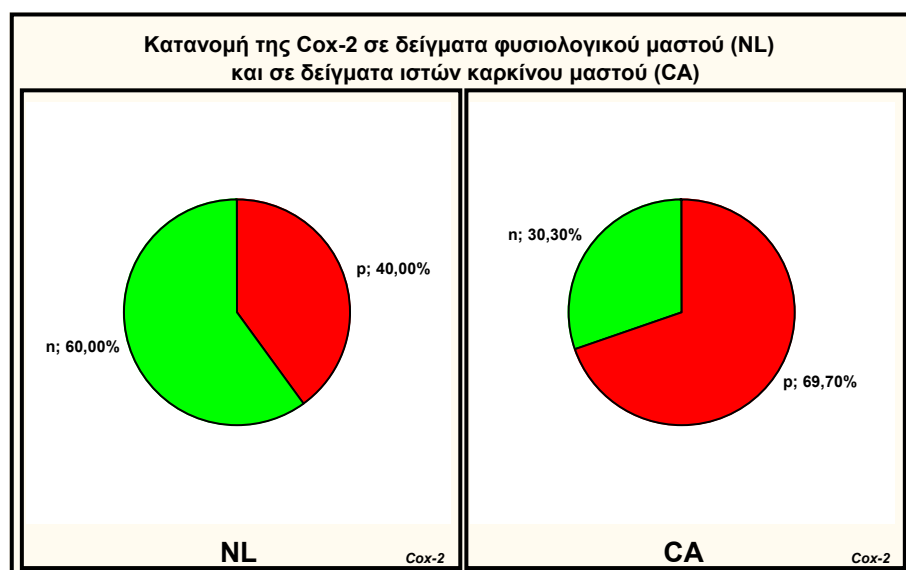
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι η Cox-2 εκφράζεται στο 40,00% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 69,70% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

Πίνακας B5a: Χρώση για Cox-2. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.

	Cox-2 (+)	Cox-2 (-)	Row Totals
NL	12	18	30
%	40,00%	60,00%	
CA	23	10	33
%	69,70%	30,30%	
Column Totals	35	28	63

Εικόνα B5a:  
Χρώση για Cox-2.  
Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης.  
NL: Φυσιολογικός μαστός,  
CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει τάση για αύξηση της έκφρασης του Cox-2 στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, και ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	<b>5,612727</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,01783</b>
M-L Chi-square	5,691395	df=1	p=0,01705
Yates Chi-square	4,474432	df=1	p=0,03441
Fisher exact, one-tailed			p=0,01684
two-tailed			p=0,02352
McNemar Chi-square (A/D)	0,0454545	df=1	p=0,83117
(B/C)	0,3902439	df=1	p=0,53217

*Πίνακας Β5β: Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson, προκύπτει θετική ( $p < 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, στατιστικώς σημαντική*

### B6. Μελέτη της έκφρασης του ICAM-1.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	ICAM-1	A/A	Δείγμα	ICAM-1	A/A	Δείγμα	ICAM-1	A/A	Δείγμα	ICAM-1
1	NL	n	17	NL	n	3	CA	n	19	CA	p
2	NL	n	18	NL	p	4	CA	n	20	CA	n
3	NL	n	19	NL	n	5	CA	n	21	CA	p
4	NL	n	20	NL	n	6	CA	n	22	CA	n
5	NL	n	21	NL	n	7	CA	n	23	CA	n
6	NL	n	22	NL	n	8	CA	n	24	CA	n
7	NL	n	23	NL	n	9	CA	p	25	CA	n
8	NL	n	24	NL	n	10	CA	n	26	CA	n
9	NL	n	25	NL	n	11	CA	n	27	CA	n
10	NL	n	26	NL	n	12	CA	p	28	CA	p
11	NL	n	27	NL	n	13	CA	p	29	CA	n
12	NL	n	28	NL	n	14	CA	n	30	CA	n
13	NL	n	29	NL	n	15	CA	n	31	CA	n
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	n	32	CA	n
15	NL	n	1	CA	n	17	CA	n	33	CA	n
16	NL	n	2	CA	n	18	CA	n			

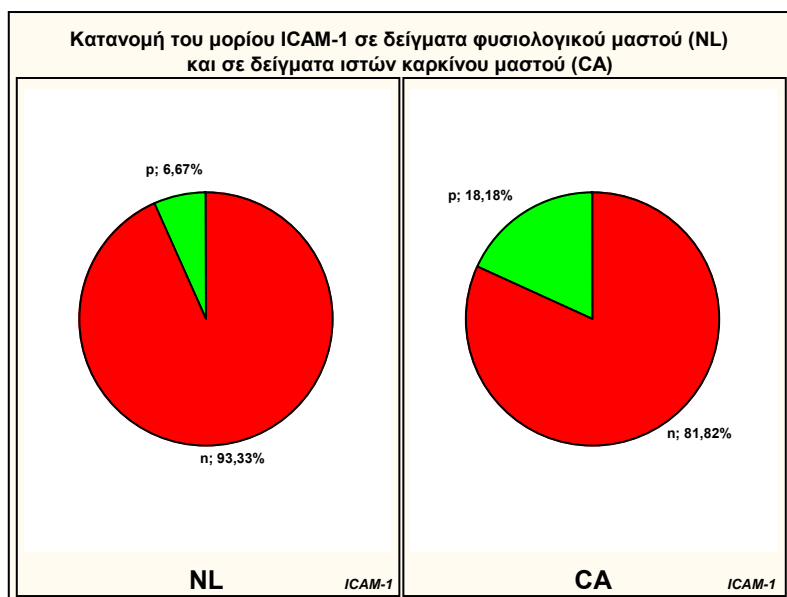
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι το ICAM-1 εκφράζεται στο 6.67% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 18.18% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

	ICAM-1 (-)	ICAM-1 (+)	Row Totals
NL	28	2	30
%	93,33%	6,67%	
CA	27	6	33
%	81,82%	18,18%	
<b>Column Totals</b>	<b>55</b>	<b>8</b>	<b>63</b>

*Πίνακας Β6α: Χρώση για ICAM-1. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.*

**Εικόνα Β6α:** Χρώση για ICAM-1. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική όμως ανάλυση έδειξε ότι αν και παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του ICAM-1 στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, εντούτοις η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	1,879587	df=1	p=0,17038
<b>M-L Chi-square</b>	1,968264	df=1	p=0,16064
<b>Yates Chi-square</b>	0,9843750	df=1	p=0,32112
<b>Fisher exact, one-tailed</b>			p=0,16108
<b>two-tailed</b>			p=0,26089
<b>McNemar Chi-square (A/D)</b>	12,97059	df=1	p=0,00032
<b>(B/C)</b>	19,86207	df=1	p=0,00001

**Πίνακας Β6β:** Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  με διόρθωση κατά Yates, προκύπτει αρνητική ( $p > 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, μη σημαντική

### B7. Μελέτη της έκφρασης της E-selectin.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	E-Selectin	A/A	Δείγμα	E-selectin	A/A	Δείγμα	E-selectin	A/A	Δείγμα	E-Selectin
1	NL	p	17	NL	p	3	CA	n	19	CA	n
2	NL	p	18	NL	p	4	CA	p	20	CA	n
3	NL	p	19	NL	p	5	CA	p	21	CA	p
4	NL	n	20	NL	n	6	CA	n	22	CA	p
5	NL	n	21	NL	n	7	CA	n	23	CA	n
6	NL	p	22	NL	n	8	CA	n	24	CA	n
7	NL	p	23	NL	p	9	CA	p	25	CA	p
8	NL	n	24	NL	n	10	CA	p	26	CA	n
9	NL	p	25	NL	p	11	CA	p	27	CA	n

10	NL	p	26	NL	p	12	CA	p	28	CA	n
11	NL	p	27	NL	n	13	CA	n	29	CA	p
12	NL	p	28	NL	n	14	CA	p	30	CA	n
13	NL	n	29	NL	p	15	CA	n	31	CA	n
14	NL	n	30	NL	p	16	CA	p	32	CA	p
15	NL	p	1	CA	n	17	CA	n	33	CA	p
16	NL	p	2	CA	p	18	CA	n			

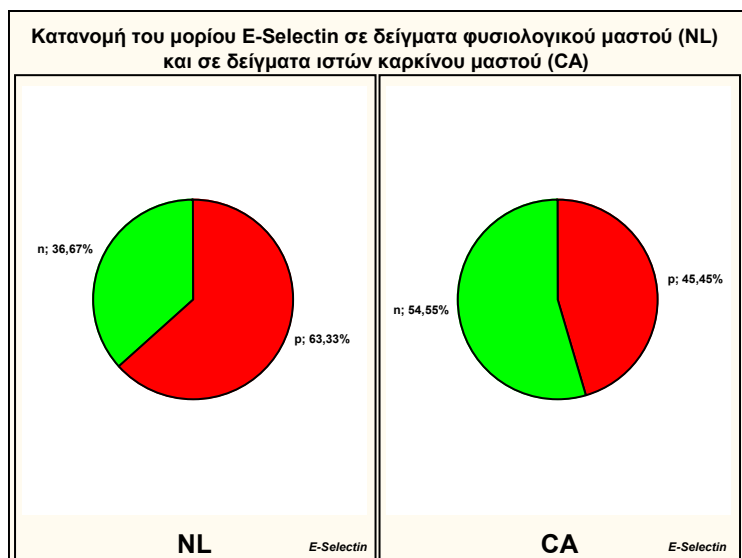
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι το ICAM-1 εκφράζεται στο 63.33% των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και στο 45.45% των δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

	E sel (+)	E sel (-)	Row Totals
NL	19	11	30
%	63,33%	36,67%	
CA	15	18	33
%	45,45%	54,55%	
<b>Column Totals</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>63</b>

**Πίνακας Β7α:** Χρώση για E-selectin. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων.

**Εικόνα Β7α:** Χρώση για E-selectin. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική όμως ανάλυση έδειξε ότι αν και παρατηρείται τάση ελάττωσης της έκφρασης της E-Selectin στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, εντούτοις η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	<b>2,021971</b>	<b>df=1</b>	<b>p=0,15504</b>
M-L Chi-square	2,035226	df=1	p=0,15369
Yates Chi-square	1,366326	df=1	p=0,24245
Fisher exact, one-tailed			p=0,12112
two-tailed			p=0,20759
McNemar Chi-square (A/D)	0,000000	df=1	p=1,0000
(B/C)	0,3461539	df=1	p=0,55630

**Πίνακας Β7β:** Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεχόμενη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson, προκύπτει αρνητική ( $p > 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, μη σημαντική

### B8. Μελέτη της έκφρασης της VCAM-1.

Πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας όπως αυτό περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Παρατηρήθηκε θετικότητα σε όλα τα δείγματα και των δύο ομάδων, πλην όμως υπήρχε διαφορά στην έκταση της χρώσης. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε ποσοτικοποίηση με τον προσοφθάλμιο Chalkey όπως ακριβώς περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο. Τα πρωτογενή αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

A/A	Δείγμα	VCAM-1	A/A	Δείγμα	VCAM-1	A/A	Δείγμα	VCAM-1	A/A	Δείγμα	VCAM-1
1	NL	3	17	NL	2	3	CA	1	19	CA	1
2	NL	4	18	NL	2	4	CA	1	20	CA	1
3	NL	3	19	NL	2	5	CA	2	21	CA	1
4	NL	5	20	NL	1	6	CA	1	22	CA	1
5	NL	5	21	NL	1	7	CA	2	23	CA	2
6	NL	6	22	NL	1	8	CA	1	24	CA	1
7	NL	6	23	NL	2	9	CA	5	25	CA	2
8	NL	2	24	NL	2	10	CA	3	26	CA	2
9	NL	4	25	NL	2	11	CA	2	27	CA	3
10	NL	5	26	NL	2	12	CA	2	28	CA	4
11	NL	3	27	NL	1	13	CA	2	29	CA	2
12	NL	2	28	NL	1	14	CA	3	30	CA	4
13	NL	3	29	NL	5	15	CA	1	31	CA	1
14	NL	1	30	NL	2	16	CA	1	32	CA	5
15	NL	3	1	CA	1	17	CA	1	33	CA	1
16	NL	4	2	CA	2	18	CA	3			

(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

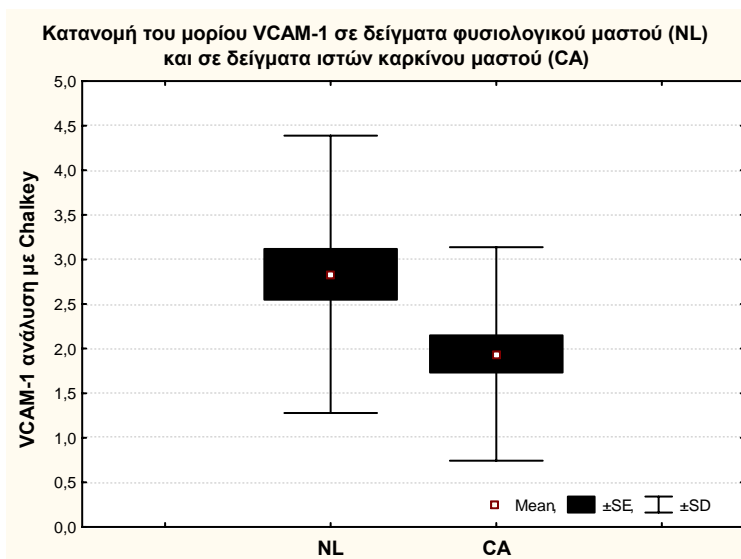
Η περιγραφική ανάλυση του δείγματος έδειξε ότι το VCAM-1 εκφράζεται με μέση τιμή  $2,83 \pm 0,28$  στα δειγμάτων φυσιολογικού μαστού και με μέση τιμή  $1,93 \pm 0,20$  στα δείγματα καρκίνου του μαστού.

Δείγμα	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Normal	2,83333	1,55549	0,28399	1	6	5	85	30
Cancer	1,93939	1,19738	0,20844	1	5	4	64	33

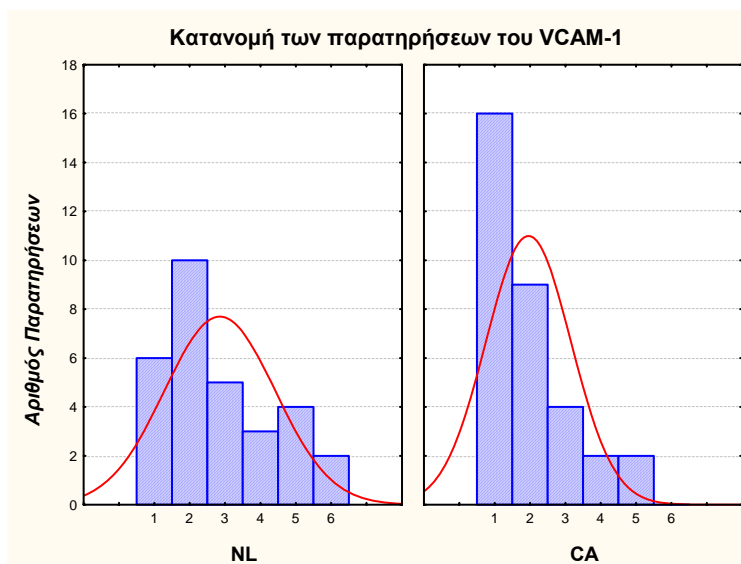
Πίνακας B8α: Χρώση για E-selectin. Περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων. (Normal: Φυσιολογικός μαστός, Cancer: Καρκίνος μαστού)



**Εικόνα Β8α:** Χρώση για VCAM-1. Γραφική απεικόνιση (διάγραμμα Box-Whisker) των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



**Εικόνα Β8β:** Χρώση για VCAM-1. Γραφική απεικόνιση της κατανομής των τιμών του VCAM-1 μέσα στις δυο ομάδες μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει τάση για ελάττωση της έκφρασης του VCAM-1 στα περιστατικά καρκίνου του μαστού, και ότι η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

	Rank Sum NL	Rank Sum CA	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N (NL)	Valid N (CA)
<b>VCAM-1 Chalkey Count</b>	1137,000	879,0000	318,0000	2,435882	<b>0,0149</b>	2,531469	<b>0,0114</b>	30	33

**Πίνακας Β8β:** Δοκιμασία Mann-Whitney μεταξύ των τιμών που προέκυψαν από τις μετρήσεις θετικών αγγείων φυσιολογικού μαστού και των δειγμάτων καρκίνου του μαστού, μετά από χρώση με VCAM-1. (NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού)

---

## **Γ. Συσχετίσεις μεταβολής έκφρασης των μορίων της μελέτης με την αγγειογένεση των όγκων.**

---

Τα αποτελέσματα όπως προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν συνυπάρχουν με τα νεοπλασματικά κύτταρα, αποκτούν μια μοριακή «ταυτότητα» που χαρακτηρίζεται από αλλαγή στην έκφραση διαφόρων μορίων-υποδοχέων που εντοπίζονται στην κυτταρική τους μεμβράνη. Το ερώτημα που τέθηκε είναι κατά πόσον αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με τη διαδικασία της αγγειογένεσης ή αποτελούν αλλαγές που παρατηρούνται μεν αλλά είναι ανεξάρτητες της αγγειογένεσης. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό βέβαια δεν αποκλείει και άλλες ανεξάρτητες αλλαγές να συμμετέχουν, πλην όμως οι τελευταίες δε θα χαρακτηρίζουν αποκλειστικά την αγγειογένεση των όγκων αλλά την αγγειογένεση εν γένει.

Κατά την ανάλυση αυτή τα δεδομένα που προέκυψαν από τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, όπως περιγράφηκαν παραπάνω, ομαδοποιήθηκαν σε σχέση με την εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας. Ως μέσο έκφρασης της μικροαγγειακής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος μέτρησης των θετικά κεχρωσμένων αγγείων με τον προσοφθάλμιο Chalkey μετά από χρώση και εναντίον και του CD31 όσο και του CD105. Η ταυτόχρονη χρήση και των δύο μεθόδων δικαιολογείται και από τη θετική συσχέτισή τους, όπως αυτή αποδείχτηκε στην υποενότητα A4. Ως στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε κάθε παρατήρηση που παρουσίασε  $p < 0.05$ . Το τελικό αποτέλεσμα συσχέτισης με την αγγειογένεση κρίθηκε θετικό στην περίπτωση συμφωνίας (στατιστικώς σημαντική παρατήρηση) και των δύο μεθόδων, καθώς και στην περίπτωση που προέκυπτε στατιστικώς σημαντική παρατήρηση μόνο με τη μία μέθοδο. Αυτού του είδους η αντιμετώπιση επιτρέπεται λόγω της ισχυρής συσχέτισης των δύο μεθόδων (αναφερόμενο  $p < 10^{-5}$ ) και του μικρού σχετικά δείγματος ( $n=63$ ) που επιτρέπει σε μη παραμετρικές δοκιμασίες μια απόκλιση σε κάποιες από το σύνολο των παρατηρήσεων. Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων συνοδευόμενων από τη σχετική στατιστική ανάλυση.

### **Γ1. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Flt-1 με την αγγειογένεση των όγκων.**

Η αναφερθείσα ανοσοϊστοχημική μελέτη κατέδειξε ότι ο Flt-1 εκφράζεται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανεξαρτήτως καλοήθους ή κακοήθους ιστού. Ως εκ τούτου είναι αδύνατη η απόδειξη ειδικής στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης του εν λόγω υποδοχέα με την αύξηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας.

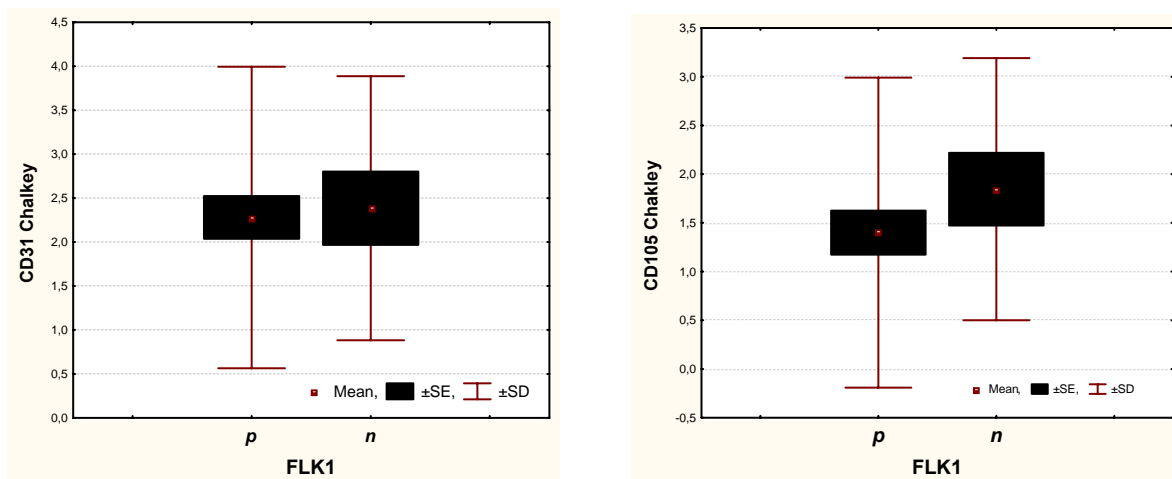
## Γ2. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Flk-1 με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας B2 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης του Flk-1, και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν Flk-1 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,28 \pm 0,24$  (με CD31 Chalkey) και  $1,4 \pm 0,22$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν Flk-1 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,38 \pm 0,41$  (με CD31 Chalkey) και  $1,84 \pm 0,37$  (με CD105 Chalkey).

FLK-1 (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,28	1,71476	0,2425	0	7	7	114	50
Negative	2,38462	1,50214	0,41662	0	5	5	31	13

FLK-1 (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	1,4	1,59079	0,22497	0	5	5	70	50
Negative	1,84615	1,3445	0,3729	0	4	4	24	13

Πίνακας Γ2α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση του Flk-1.



Εικόνα Γ2α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) Flk-1

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε όμως ότι δεν κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για Flk-1)

	Rank Sum <sub>p</sub>	Rank Sum <sub>n</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>p</sub>	Valid N <sub>n</sub>
CD31 chalkey	1576,000	440,0000	301,000	-0,407620	>0.05	-0,418	>0.05	50	13
CD105 Chakley	1533,500	482,5000	258,500	-1,12945	>0.05	-1,175	>0.05	50	13

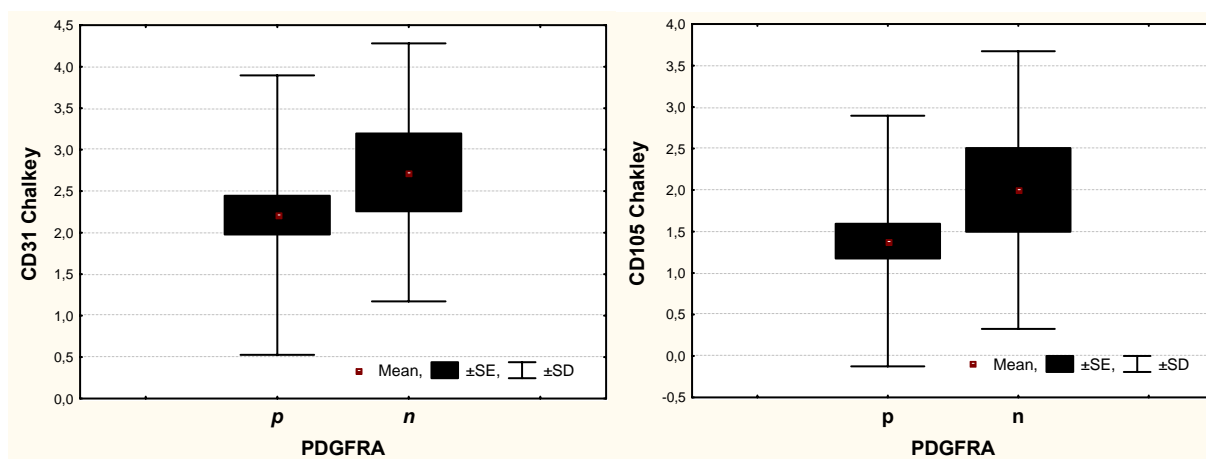
### Γ3. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του PDGFRα με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας Β3 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης του PDGFRα, και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν PDGFRα εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,21 \pm 0,23$  (με CD31 Chalkey) και  $1,38 \pm 0,20$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν PDGFRα εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,72 \pm 0,46$  (με CD31 Chalkey) και  $2 \pm 0,50$  (με CD105 Chalkey).

PDGFRα (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,21154	1,68426	0,23356	0	7	7	115	52
Negative	2,72727	1,55505	0,46887	1	6	5	30	11

PDGFRα (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	1,38462	1,51015	0,20942	0	5	5	72	52
Negative	2	1,67332	0,50452	0	5	5	22	11

Πίνακας Γ3α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση του PDGFRα.



Εικόνα Γ3α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) PDGFRα.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε όμως ότι δεν κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για PDGFRα)

	Rank Sum <sub>p</sub>	Rank Sum <sub>n</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>p</sub>	Valid N <sub>n</sub>
CD31 chalkey	1576,000	440,0000	301,0000	-0,4076	>0.05	-0,418314	>0.05	50	13
CD105 Chakley	1601,000	415,0000	223,0000	-1,14063	>0.05	-1,18700	>0.05	52	11

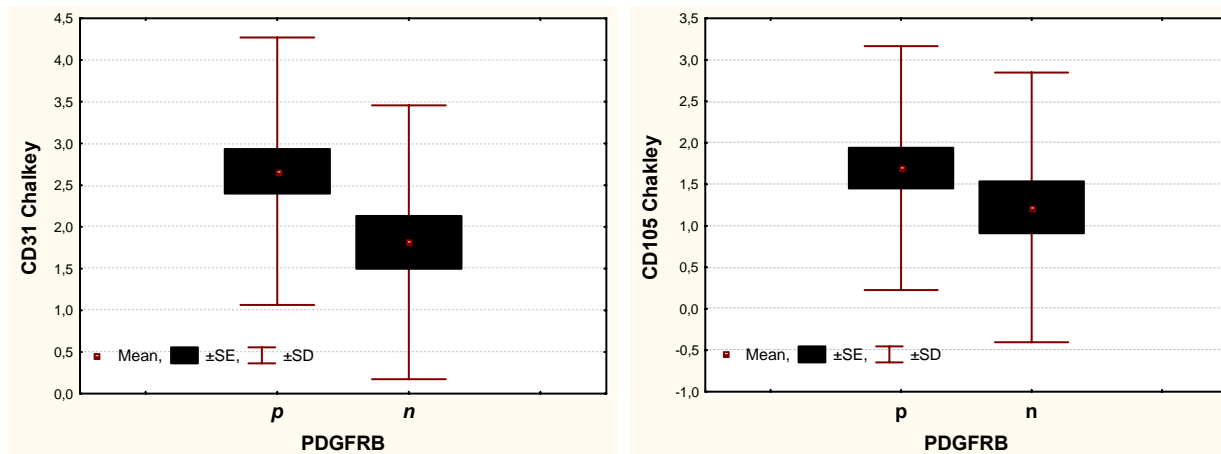
#### Γ4. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του PDGFRβ με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας B4 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης του PDGFRβ, και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν PDGFRβ εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,66 \pm 0,26$  (με CD31 Chalkey) και  $1,69 \pm 0,24$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν PDGFRβ εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $1,81 \pm 0,31$  (με CD31 Chalkey) και  $1,22 \pm 0,31$  (με CD105 Chalkey).

PDGFRβ (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,66667	1,60357	0,26726	0	7	7	96	36
Negative	1,81481	1,64169	0,31594	0	5	5	49	27

PDGFRβ (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	1,69444	1,47007	0,24501	0	5	5	61	36
Negative	1,22222	1,62512	0,31276	0	5	5	33	27

Πίνακας Γ4α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση του PDGFRβ.



Εικόνα Γ4α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) PDGFRβ.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε ότι κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για PDGFRβ) στην περίπτωση του CD31 αλλά όχι και του CD105. Το αποτέλεσμα τελικά κρίνεται σημαντικό για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή της ενότητας Γ.

	Rank Sum <sub>p</sub>	Rank Sum <sub>n</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>p</sub>	Valid N <sub>n</sub>
CD31 chalkey	1326,000	690,0000	312,000	2,41666	<0.05	2,48006	<0.05	36	27
CD105 Chakley	1258,000	758,0000	380,000	1,47222	>0.05	1,53208	>0.05	36	27

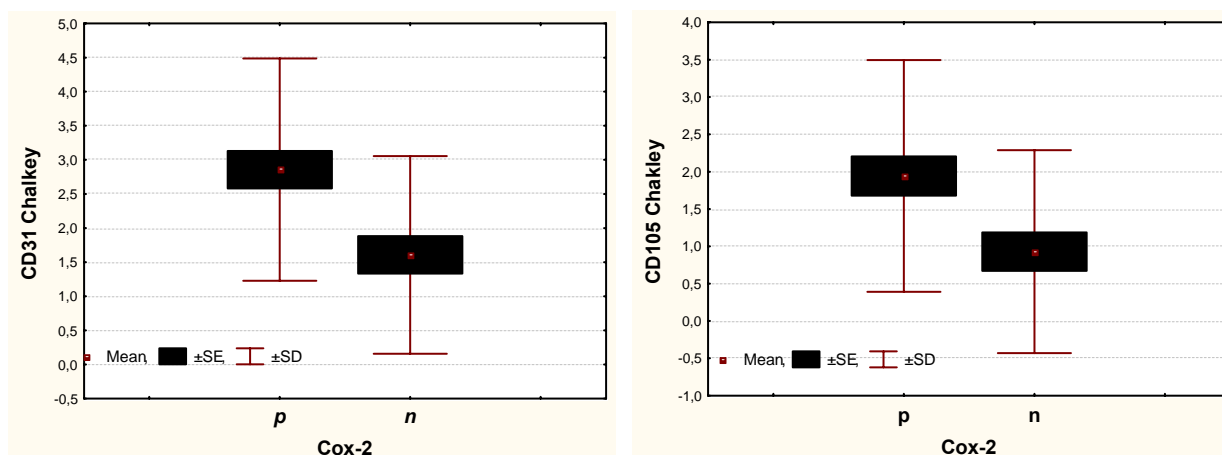
### Γ5. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του Cox-2 με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας Β5 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης του Cox-2, και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν Cox-2 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,85 \pm 0,27$  (με CD31 Chalkey) και  $1,94 \pm 0,26$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν Cox-2 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $1,60 \pm 0,27$  (με CD31 Chalkey) και  $0,92 \pm 0,25$  (με CD105 Chalkey).

Cox-2 (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,85714	1,62956	0,27545	1	7	6	100	35
Negative	1,60714	1,44886	0,27381	0	5	5	45	28

Cox-2 (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	1,94286	1,5519	0,26232	0	5	5	68	35
Negative	0,92857	1,35888	0,2568	0	4	4	26	28

Πίνακας Γ5α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση του Cox-2



Εικόνα Γ5α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) Cox-2.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε ότι κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για Cox-2) τόσο στην περίπτωση του CD31 όσο και στην περίπτωση του CD105. Το αποτέλεσμα κρίνεται σαφώς σημαντικό για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή της ενότητας Γ.

	Rank Sum <sub>p</sub>	Rank Sum <sub>n</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>p</sub>	Valid N <sub>n</sub>
CD31 chalkey	1348,500	667,5000	261,500	3,16063	<0.01	3,24355	<0.01	35	28
CD105 Chakley	1311,500	704,5000	298,500	2,64884	<0.01	2,75654	<0.01	35	28

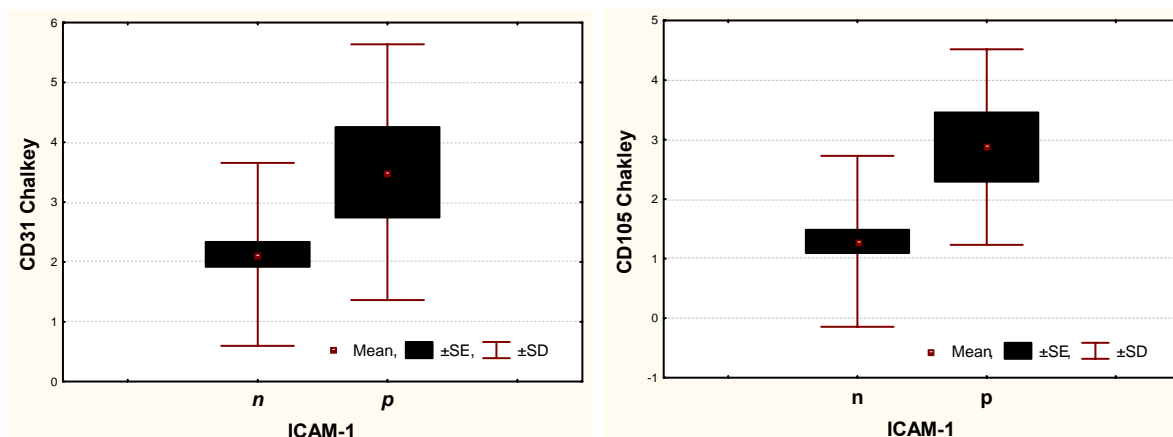
### Γ6. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του ICAM-1 με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας Β6 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης του ICAM-1 και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν ICAM-1 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $3.5 \pm 0,75$  (με CD31 Chalkey) και  $2.87 \pm 0,58$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν ICAM-1 εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2.12 \pm 0,20$  (με CD31 Chalkey) και  $1.29 \pm 0,19$  (με CD105 Chalkey).

ICAM-1 (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	3,5	2,13809	0,75593	1	7	6	28	8
Negative	2,12727	1,52819	0,20606	0	6	6	117	55

ICAM-1 (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,875	1,64208	0,58056	1	5	4	23	8
Negative	1,29091	1,43595	0,19362	0	5	5	71	55

Πίνακας Γ5α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση του ICAM-1



Εικόνα Γ6α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) ICAM-1.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε ότι κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για ICAM-1) στην περίπτωση του CD105 αλλά όχι και του CD31. Το αποτέλεσμα τελικά κρίνεται σημαντικό για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή της ενότητας Γ.

	Rank Sum <sub>n</sub>	Rank Sum <sub>p</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>n</sub>	Valid N <sub>p</sub>
CD31 chalkey	1676,500	339,5000	136,500	-1,7237	<b>0,084</b>	-1,7689	<b>0,0769</b>	55	8
CD105 Chakley	1640,500	375,5000	100,500	-2,4668	<b>&lt;0.05</b>	-2,5671	<b>&lt;0.05</b>	55	8

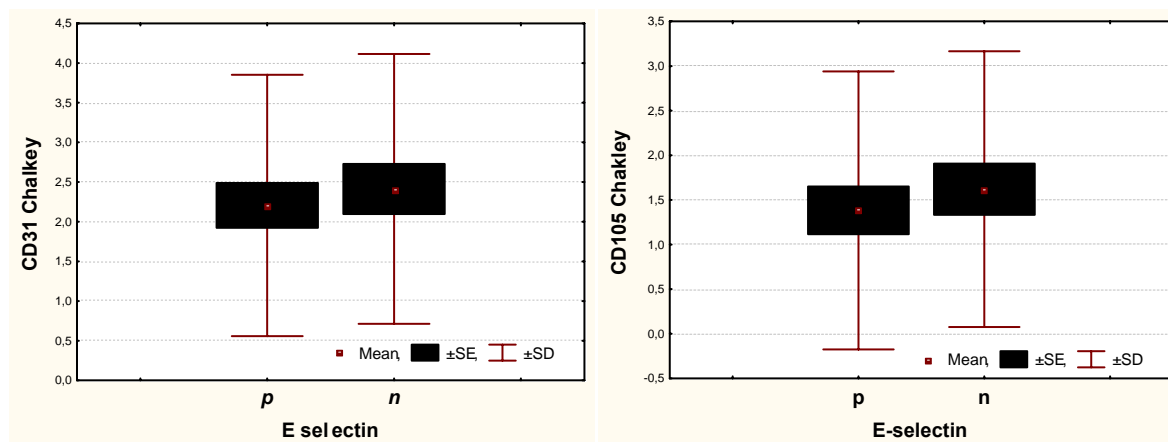
### Γ7. Σχέση της μεταβολής έκφρασης της E-Selectin με την αγγειογένεση των όγκων.

Τα αποτελέσματα της ενότητας B7 ομαδοποιήθηκαν με βάση της έκφρασης της E-Selectin και αναλύθηκαν με βάση την εκτίμηση της αγγειογένεσης τόσο με το CD31 Chalkey όσο με το CD105 Chalkey. Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν E-Selectin εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,20 \pm 0,28$  (με CD31 Chalkey) και  $1,38 \pm 0,26$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν E-Selectin εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,41 \pm 0,31$  (με CD31 Chalkey) και  $1,62 \pm 0,28$  (με CD105 Chalkey).

E-Selectin (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	2,20588	1,64739	0,28253	0	6	6	75	34
Negative	2,41379	1,7012	0,31591	0	7	7	70	29

E-Selectin (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	$N_x$
Positive	1,38235	1,55728	0,26707	0	5	5	47	34
Negative	1,62069	1,54489	0,28688	0	5	5	47	29

Πίνακας Γ7α: Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση της E-Selectin.



Εικόνα Γ7α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) E-Selectin.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε όμως ότι δεν κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για E-Selectin)

	Rank Sum <sub>p</sub>	Rank Sum <sub>n</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>p</sub>	Valid N <sub>n</sub>
CD31 chalkey	1048,500	967,5000	453,500	-0,54470	>0,05	-0,55899	>0,05	34	29
CD105 Chakley	1043,000	973,0000	448,000	-0,62054	>0,05	-0,64577	>0,05	34	29



**Γ8. Σχέση της μεταβολής έκφρασης του VCAM-1 με την αγγειογένεση των όγκων.**

Οι τιμές που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση του VCAM-1 συσχετίστηκαν με μη παραμετρικές δοκιμασίες με τις τιμές του CD31 και του CD105. Χρησιμοποιήθηκαν η δοκιμασία *Spearman*, η δοκιμασία *Kendal T* και η δοκιμασία συσχέτισης  $\gamma$ . Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
<b>CD31 chalkey &amp; VCAM</b>	63	-0,070036	-0,548341	0,585459

	Valid	Gamma	Z	p-level
<b>CD31 chalkey &amp; VCAM</b>	63	-0,074380	-0,678819	0,497252

	Valid	Kendall T	Z	p-level
<b>CD31 chalkey &amp; VCAM</b>	63	-0,058603	-0,678819	0,497252

Πίνακας Γ8α: Συσχέτιση του CD31 Chalkey με το VCAM-1

	Valid	Spearman	t(N-2)	p-level
<b>CD105 Chakley &amp; VCAM</b>	63	-0,198614	-1,58276	0,118648

	Valid	Gamma	Z	p-level
<b>CD105 Chakley &amp; VCAM</b>	63	-0,214475	-1,88469	0,059472

	Valid	Kendall T	Z	p-level
<b>CD105 Chakley &amp; VCAM</b>	63	-0,162706	-1,88469	0,059472

Πίνακας Γ8β: Συσχέτιση του CD105 Chalkey με το VCAM-1

Εκ των αποτελεσμάτων δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην ελάττωση του VCAM-1 και στην αγγειογένεση των όγκων.

---

## **Δ. Μελέτη του κυτταρικού κύκλου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.**

---

Τα παραπάνω αποτελέσματα απέδειξαν σαφώς ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον προκειμένου να ευνοήσουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και να οδηγήσουν τελικά στη δημιουργία νέων αγγείων που θα τροφοδοτήσουν τον πρωτοπαθή όγκο και θα ευνοήσουν τη μεταφορά και εμφύτευση του σε απομακρυσμένα όργανα. Όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή η αγγειογένεση είναι το βιολογικό αποτέλεσμα πολλαπλών βιοχημικών διεργασιών και στην ουσία είναι η έκφραση της ισορροπίας μεταξύ των δρώντων αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων.

Προκειμένου να υπάρξει μια ποιοτική διάκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι ο κυτταρικός κύκλος των ενδοθηλιακών κυττάρων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση είναι ταχύτερος και συνεπώς αναμένεται μια ελάττωση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Προς αυτή την κατεύθυνση αποφασίστηκε η μελέτη του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο.

### **Δ1. Η μελέτη έκφρασης του αναστολέα p21<sup>WAF1/Cip1</sup> επί της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926.**

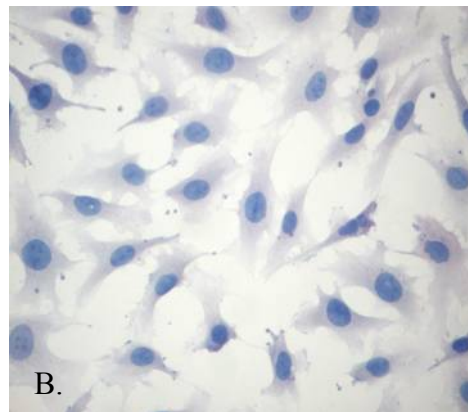
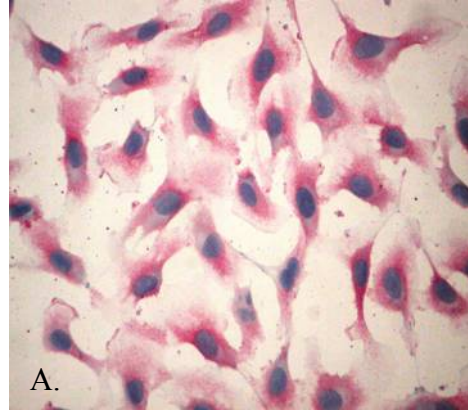
Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> επί της εν λόγω σειράς χρησιμοποιήθηκε μοντέλο συγκαλλιέργειας όπου θρεπτικό μέσο που προέρχεται από κυτταρική σειρά καρκίνου μαστού χορηγείται σε κύτταρα της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926, τα οποία καλλιεργούνται επί αρνητικώς φορτισμένων πλακιδίων SuperFrostPlus. Οι λεπτομέρειες του μοντέλου περιγράφονται παρακάτω:

- i) Σε φλάσκα που περιέχει κύτταρα της σειράς MDA-MB-468 (καρκίνος μαστού) με πληρότητα 100% το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και προστίθεται στην καλλιέργεια θρεπτικό μέσο (DMEM χωρίς FBS). Η καλλιέργεια διατηρείται για 48 ώρες και το υπερκείμενο (Tumor Conditioned Medium-TCM) φυγοκεντρείται και φυλάσσεται στους -80°C.
- ii) Τα κύτταρα της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926 καλλιεργούνται επί των πλακιδίων SuperFrost Plus όπως περιγράφηκε στην ενότητα «Υλικά και μέθοδοι».

- iii) Η συγκαλλιέργεια κυττάρων και θρεπτικού μέσου από την καρκινική κυτταρική σειρά, διήρκησε 24 ώρες. Ακολούθησε τεχνική ανοσοκυτταροχημείας για την ανίχνευση του  $p21^{WAF1/Cip1}$ .

***Δ1α. Ανοσοκυτταροχημεία εναντίον του  $p21^{WAF1/Cip1}$ .***

Η ανοσοκυτταροχημεία εναντίον του  $p21^{WAF1/Cip1}$  έδειξε μια σαφή θετικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων όταν αυτά καλλιεργούνται σε απλό θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία FBS. Αντιθέτως τα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο προερχόμενο από καρκινική σειρά ήταν πλήρως αρνητικά. Η θετικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων όταν αυτά δεν βρίσκονται σε καρκινικό περιβάλλον ήταν τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική.

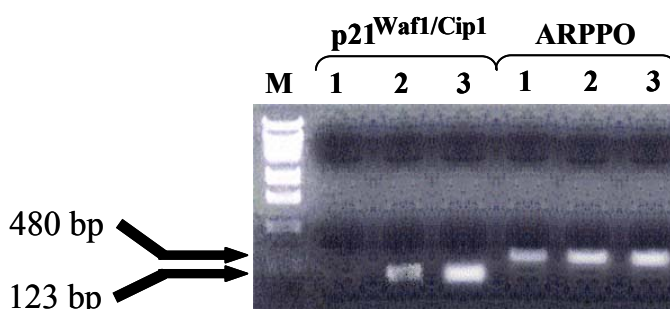


***Εικόνα Δ1α:*** Ανοσοκυτταροχημεία σε κύτταρα EA.hy 926 με πρωτοταγές αντίσωμα εναντίον του  $p21^{WAF1/Cip1}$ . (A). Απουσία TCM παρατηρείται τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική θετικότητα. (B). Παρουσία TCM δεν παρατηρείται θετικότητα.

***Δ1β. Ανίχνευση του μετάγραφου του  $p21^{WAF1/Cip1}$ .***

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε σε φλάσκες και τα κύτταρα συνελέγησαν προκειμένου να διενεργηθεί RT-PCR. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πλήρη εξαφάνιση του μετάγραφου του  $p21^{WAF1/Cip1}$  στα ενδοθηλιακά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του TCM. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το  $p21^{WAF1/Cip1}$  ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο όταν πρόκειται να ελαττωθεί λόγω αγγειογενετικής επίδρασης.

**Εικόνα Δ1β:** RT-PCR σε κύτταρα EA.hy 926 για ανίχνευση του μετάγραφου του  $p21^{WAF1/Cip1}$ . (1). Παρουσία TCM, παρατηρείται πλήρης απουσία του σχετικού mRNA. (2). Απουσία TCM ανιχνεύεται το σχετικό μετάγραφο. (3). Θετικός μάρτυρας είναι cDNA από κύτταρα HepG2 υπό 24ωρη επίδραση 5FU



## Δ2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του $p21^{WAF1/Cip1}$ σε δείγματα ιστών φυσιολογικού μαστού και δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

Κατά τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Έγινε τυχαία επιλογή 43 δειγμάτων που αφορούσαν φυσιολογικό μαστό και 44 δειγμάτων που αφορούσαν καρκίνο του μαστού. Κάθε δείγμα προέρχονταν από διαφορετικό ασθενή και η ιστολογική διάγνωση των εν λόγω καρκινωμάτων ήταν πορογενές διηθητικό καρκίνωμα του μαστού. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα εναντίον του  $p21^{WAF1/Cip1}$  όπως περιγράφεται στο μέρος «Υλικά και Μέθοδοι». Ως θετικό χαρακτηρίστηκε κάθε περιστατικό που εμφάνιζε ένα ή παραπάνω αγγεία θετικά για τη χρώση είτε αυτό αφορούσε πυρηνική είτε κυτταροπλασματική θετικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

A/A	Δείγμα	p21	A/A	Δείγμα	p21	A/A	Δείγμα	p21	A/A	Δείγμα	p21
1	nl	n	24	nl	p	4	ca	n	27	ca	n
2	nl	p	25	nl	p	5	ca	n	28	ca	n
3	nl	p	26	nl	p	6	ca	n	29	ca	n
4	nl	p	27	nl	n	7	ca	n	30	ca	n
5	nl	p	28	nl	n	8	ca	n	31	ca	n
6	nl	p	29	nl	p	9	ca	n	32	ca	n
7	nl	p	30	nl	p	10	ca	n	33	ca	n
8	nl	p	31	nl	p	11	ca	n	34	ca	n
9	nl	p	32	nl	p	12	ca	n	35	ca	n
10	nl	p	33	nl	p	13	ca	n	36	ca	n
11	nl	n	34	nl	n	14	ca	n	37	ca	n
12	nl	p	35	nl	n	15	ca	n	38	ca	n
13	nl	p	36	nl	n	16	ca	n	39	ca	n
14	nl	p	37	nl	n	17	ca	n	40	ca	n
15	nl	p	38	nl	n	18	ca	p	41	ca	n
16	nl	p	39	nl	n	19	ca	n	42	ca	n

17	nl	p	40	nl	n	20	ca	n	43	ca	n
18	nl	p	41	nl	n	21	ca	n	44	ca	n
19	nl	p	42	nl	n	22	ca	n			
20	nl	p	43	nl	n	23	ca	n			
21	nl	p	1	ca	n	24	ca	n			
22	nl	n	2	ca	n	25	ca	n			
23	nl	n	3	ca	n	26	ca	n			

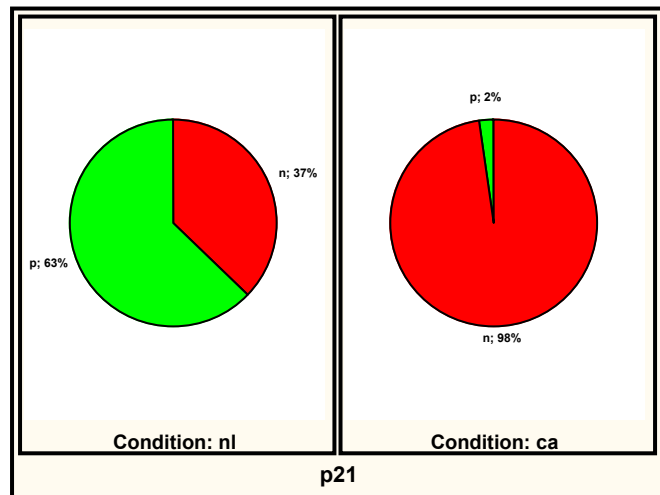
(NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού, p: θετικό αποτέλεσμα χρώσης, n: αρνητικό αποτέλεσμα χρώσης)

Η περιγραφική ανάλυση έδειξε ότι το 62,7% (27/43) των δειγμάτων φυσιολογικού μαστού εμφάνιζε ενδοθηλιακά κύτταρα με θετική χρώση για το p21<sup>Waf1/Cip1</sup> εν αντιθέσει με τα δείγματα καρκίνου του μαστού όπου μόνο 2,27% (1/44) των δειγμάτων εμφάνισε την αντίστοιχη θετικότητα.

Πίνακας Δ2α: Χρώση για p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. Περιγραφική ανάλυση των ομάδων μελέτης

	p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> (-)	p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> (+)	Row Totals
nl	16	27	43
%	37,21%	62,79%	
ca	43	1	44
%	97,73%	2,27%	
Column Totals	59	28	87

Εικόνα Δ2α: Χρώση για p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της περιγραφικής ανάλυσης των δυο ομάδων μελέτης. NL: Φυσιολογικός μαστός, CA: Καρκίνος μαστού



Η στατιστική ανάλυση μέσω της δοκιμασίας  $\chi^2$  διορθωμένης κατά Yates έδειξε ότι η ελάττωση της έκφρασης του p21<sup>Waf1/Cip1</sup> στα δείγματα καρκίνου του μαστού είναι στατιστικώς σημαντική παρατήρηση.

**Πίνακας Δ2β:** Στατιστική ανάλυση με δοκιμασίες  $\chi^2$ . Η ενδεδειγμένη δοκιμασία  $\chi^2$  με διόρθωση κατά Yates, προκύπτει θετική ( $p < 0.05$ ), και η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων, σημαντική.

	Chi-square	df	p
<b>Pearson Chi-square</b>	36,49212	df=1	$<10^{-5}$
<b>M-L Chi-square</b>	43,00448	df=1	$<10^{-5}$
<b>Yates Chi-square</b>	<b>33,77202</b>	<b>df=1</b>	<b><math>&lt;10^{-5}</math></b>
<b>Fisher exact, one-tailed</b>			$<10^{-5}$
<b>two-tailed</b>			$<10^{-5}$
<b>McNemar Chi-square (A/D)</b>	11,52941	df=1	p=,00069
<b>(B/C)</b>	3,214286	df=1	p=,07300

### Δ3. Συσχέτιση της έκφρασης του p21<sup>Waf1/Cip1</sup> με την αγγειογένεση.

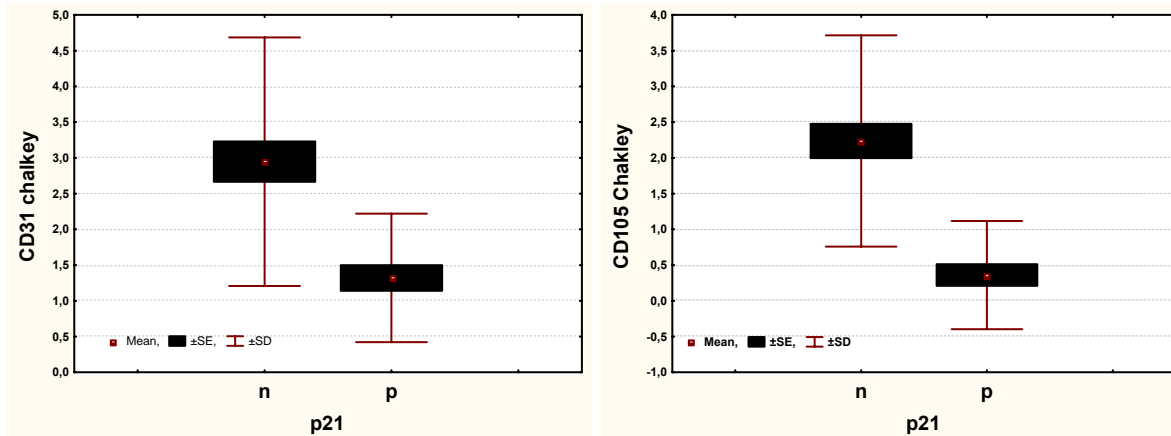
Η συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με διασταύρωση της παρούσας ομάδας περιστατικών και που μελετήθηκαν στις προηγούμενες ενότητες και για τις οποίες είχε ήδη γίνει ανάλυση αγγειογένεσης με τις μεθόδους CD31 και CD105 Chalkey. Κατά την περιγραφική ανάλυση των δειγμάτων έγινε διαγραφή των περιστατικών που δεν είχε γίνει είτε αντι-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> χρώση, είτε ποσοτική μελέτη της αγγειογένεσης. Προέκυψαν 2 ομάδες: α) ομάδα δειγμάτων φυσιολογικού μαστού (n=30) και β) ομάδα δειγμάτων καρκίνου του μαστού (n=33). Η ανάλυση περιέλαβε και τις δύο μεθόδους εκτίμησης της αγγειογένεσης.

Η περιγραφική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι ιστοί που εκφράζουν p21<sup>Waf1/Cip1</sup> εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $1,32 \pm 0,18$  (με CD31 Chalkey) και  $0,36 \pm 0,15$  (με CD105 Chalkey). Αντιθέτως οι ιστοί που δεν εκφράζουν p21<sup>Waf1/Cip1</sup> εμφανίζουν μικροαγγειακή πυκνότητα  $2,94 \pm 0,28$  (με CD31 Chalkey) και  $2,23 \pm 0,23$  (με CD105 Chalkey).

p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> (CD31)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	N <sub>x</sub>
Positive	1,32	0,9	0,18	0	3	3	33	25
Negative	2,94737	1,73902	0,28211	0	7	7	112	38

p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> (CD105)	$\bar{x}$	SD(yEr±)	SE(yEr±)	Min	Max	Εύρος	$\sum x$	N <sub>x</sub>
Positive	0,36	0,75719	0,15144	0	3	3	9	25
Negative	2,23684	1,47839	0,23983	0	5	5	85	38

**Πίνακας Δ3α:** Περιγραφική ανάλυση των δεδομένων μικροαγγειακής πυκνότητας με βάση την έκφραση της E-Selectin.



Εικόνα Δ3α: Γραφική απεικόνιση της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή μετρήθηκε με τις προαναφερόμενες μεθόδους σε ιστούς μαστού που εκφράζουν (p) ή που δεν εκφράζουν (n) p21<sup>Waf1/Cip1</sup>.

Η δοκιμασία Mann-Whitney κατέδειξε ότι κρίνεται στατιστικώς σημαντική η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (θετικών και αρνητικών ιστών για p21<sup>Waf1/Cip1</sup>) τόσο στην περίπτωση του CD31 όσο και στην περίπτωση του CD105. Το αποτέλεσμα κρίνεται σαφώς σημαντικό για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή της ενότητας Γ.

	Rank Sum <sub>n</sub>	Rank Sum <sub>p</sub>	U	Z	p-level	Z	p-level	Valid N <sub>n</sub>	Valid N <sub>p</sub>
CD31 Chalkley	1487,50	528,500	203,5	3,814	<10 <sup>-3</sup>	3,914	<10 <sup>-4</sup>	38	25
CD105 Chalkley	1556,50	459,500	134,5	4,783	<10 <sup>-5</sup>	4,978	<10 <sup>-5</sup>	38	25

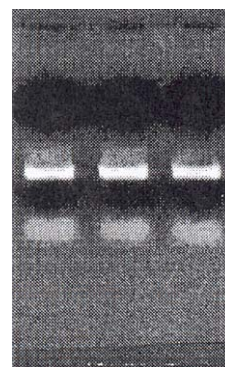
### Ε. Η προσπάθεια ακύρωσης του αγγειογενετικού μηνύματος in vitro με τη χρήση της τεχνολογίας διαμεταγωγής πρωτεϊνών.

Με δεδομένη την σαφή ελάττωση του ενδοθηλιακού p21<sup>Waf1/Cip1</sup> στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι πιθανή αποκατάσταση των ενδοκυττάρων επιπέδων του p21<sup>Waf1/Cip1</sup> ίσως να ακύρωνε το αγγειογενετικό μήνυμα. Προς αυτή την κατεύθυνση σχεδιάστηκε και παρήχθη μια υβριδική πρωτεΐνη που αποτελείται από την αλληλουχία της πρωτεΐνης p21<sup>Waf1/Cip1</sup> και την αντίστοιχη αλληλουχία ενός 15πεπτιδίου της TAT πρωτεΐνης του ιού HIV. Είναι ήδη γνωστό ότι η αλληλουχία TAT επιτρέπει την είσοδο πρωτεϊνικών αλυσίδων, που τη φέρουν, απευθείας στο κυτταρόπλασμα. Αναλόγως δε της ύπαρξης ή μη αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού, η πρωτεΐνη δύναται να εισέλθει και στον πυρήνα.

Ο σχεδιασμός, η παραγωγή και η απομόνωση της υβριδικής πρωτεΐνης TAT-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> αναφέρονται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ακολουθεί μια λεπτομερής και εν σειρά περιγραφή όλων των αποτελεσμάτων που οδήγησαν στην απόκτηση της πρωτεΐνης. Σε επόμενο μέρος της ενότητας Ε περιγράφονται πειράματα επίδρασης επί του πολλαπλασιασμού της σειράς EA.hy 926.

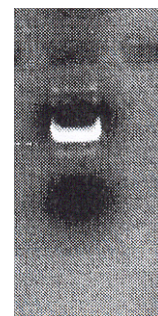
### **E1. Σχεδιασμός, παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης TAT- p21<sup>Waf1/Cip1</sup>.**

**E1α. Απομόνωση και ενίσχυση της κωδικοποιού αλληλουχίας (cds) του γονιδίου p21<sup>Waf1/Cip1</sup>.** Πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR όπως περιγράφεται στην σχετική ενότητα της μεθοδολογίας. Το προϊόν οπτικοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1% και κατόπιν καθαρίστηκε με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου.



**Εικόνα E1α:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντος της παραπάνω αντίδρασης. Παρουσιάζεται το προϊόν τριών ομοίων αντιδράσεων.

**E1β. Κατασκευή του TAT ολιγονουκλεοτιδίου, ενσωμάτωση του στο φορέα pRSETB και παραγωγή καθαρού pRSETB-TAT.** Το ολιγονουκλεοτίδιο TAT κατασκευάστηκε στο τμήμα μικροχημείας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Κρήτης. Ακολούθησε πέψη των άκρων του με τα περιοριστικά ένζυμα Kpn I και BamH I. Ομοίως ακολούθησε πέψη του pRSETB φορέα με τα ίδια ένζυμα περιορισμού. Τα προϊόντα από τις δύο πέψεις, αφού καθαρίστηκαν από την πηκτική αγαρόζη με το σύστημα εκχύλισης της Qiagen, συμμετείχαν σε αντίδραση συγκόλλησης προκειμένου να προκύψει το πλασμίδιο pRSETB-TAT. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων E.Coli DH10β με τη μέθοδο του θερμικού shock (χρησιμοποιώντας το προϊόν της αντίδρασης συγκόλλησης), καλλιέργεια των αποικιών σε μικρή κλίμακα και εκχύλιση του DNA προς επιλογή των θετικών κλώνων. Μια θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό αντίστοιχης καλλιέργειας μεγάλη κλίμακας και την εκχύλιση του DNA με το αντίστοιχο σύστημα της Qiagen.

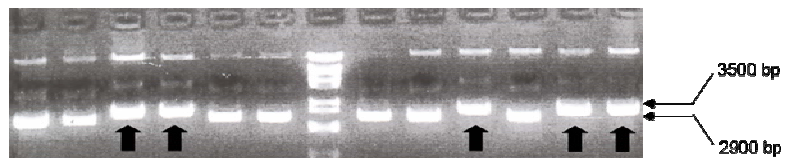


**Εικόνα E1β:** Ηλεκτροφόρηση του τελικού προϊόντος TAT-pRSETB

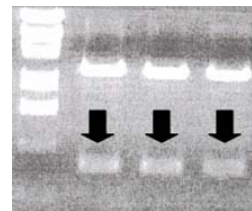


**Ε1γ. Ενσωμάτωση του CDS  $p21^{Waf1/Cip1}$  στο φορέα TAT-pRSETB και παραγωγή καθαρού pRSETB-TAT-p $21^{Waf1/Cip1}$ .** Πραγματοποιήθηκε πέψη των άκρων του cds  $p21^{Waf1/Cip1}$  με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII. Ομοίως ακολούθησε πέψη του pRSETB-TAT φορέα με τα ίδια ένζυμα περιορισμού. Τα προϊόντα από τις δύο πέψεις, αφού καθαρίστηκαν από την πηκτική αγαρόζη με το σύστημα εκχύλισης της Qiagen, συμμετείχαν σε αντίδραση συγκόλλησης προκειμένου να προκύψει το πλασμίδιο pRSETB-TAT-  $p21^{Waf1/Cip1}$ . Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηρίων E.Coli DH10β με τη μέθοδο του θερμικού shock (χρησιμοποιώντας το προϊόν της αντίδρασης συγκόλλησης), καλλιέργεια των αποικιών σε μικρή κλίμακα και εκχύλιση του DNA προς επιλογή των θετικών κλώνων. Μια θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό αντίστοιχης καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας και την εκχύλιση του DNA με το αντίστοιχο σύστημα της Qiagen.

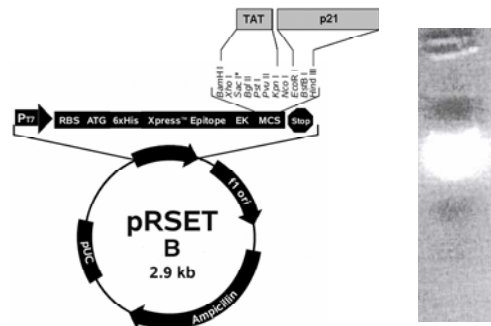
**Εικόνα Ε1γ<sub>1</sub>:** Τυπική εικόνα ηλεκτροφόρησης του DNA από καλλιέργειες μικρής κλίμακας μετά από μετασχηματισμό με το τελικό προϊόν TAT -pRSETB-p $21^{WAF1/Cip1}$ . Τα βέλη υποδεικνύουν τις θετικές καλλιέργειες



**Εικόνα Ε1γ<sub>2</sub>:** Τυπική εικόνα ηλεκτροφόρησης του DNA από 3 από τις παραπάνω θετικές καλλιέργειες μικρής κλίμακας μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και HindIII. Τα βέλη υποδεικνύουν το ένθεμα  $p21^{WAF1/Cip1}$  του οποίου επαληθεύθηκε η παρουσία.



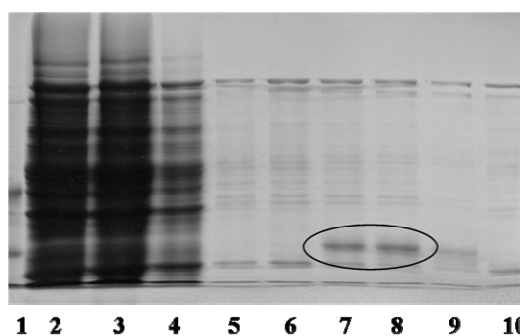
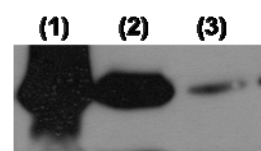
**Εικόνα Ε1γ<sub>3</sub>:** Η παρουσίαση του χάρτη και η ηλεκτροφόρηση του τελικού προϊόντος TAT -pRSETB-p $21^{WAF1/Cip1}$ .



### ***E1δ. Παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης TAT-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (TAT-p21)***

Η παραγωγή της πρωτεΐνης TAT-p21 έλαβε χώρα στα βακτήρια E.Coli (p-lys). Τόσο τα βακτήρια όσο και το θρεπτικό τους υλικό συνελέχθησαν προκειμένου να γίνει ανίχνευση της TAT-p21 και ημιοσοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης ποσότητας. Ακολούθως τα βακτήρια λύθηκαν και το προκύπτον διάλυμα υπεβλήθη σε χρωματογραφία συγγενείας. Για την τέλεση της μεθόδου εφαρμόστηκαν τα σχετικά πρωτόκολλα που περιγράφονται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ο όγκος της καλλιέργειας ήταν 500 ml και ο όγκος των εκλούσεων ήταν 0,5 ml/έκλυση. Το αποτέλεσμα της ανίχνευσης καθώς και της εκούσης της πρωτεΐνης TAT-p21 από τα σφαιρίδια Ni-NTA παρουσιάζονται σε σχετικές εικόνες.

**Εικόνα E1δ<sub>1</sub>:** Ανάλυση πρωτεϊνών (Western Blot) με χρήση πρωτοταγούς αντισώματος αντι-6His που φέρεται στην αλληλουχία της TAT-p21. Η πρωτεΐνη ανιχνεύεται τόσο στο θρεπτικό μέσο (3), όσο και στο υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει μετά από την λύση των βακτηρίων (2). Πρωτεΐνη ανιχνεύεται και στα υπολείμματα της βακτηριακής λύσης (1) γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη βακτηριακών σωματιών έγκλειστης πρωτεΐνης – inclusion bodies.



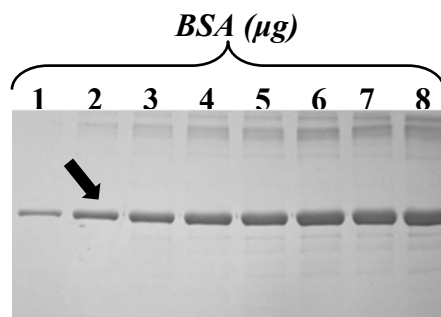
- 1: Marker**
- 2: Υπερκείμενο**
- 3: Flow-through**
- 4: Πλύση 1**
- 5: Πλύση 2**
- 6: Έκλυση 1**
- 7: Έκλυση 2**
- 8: Έκλυση 3**
- 9: Έκλυση 4**
- 10: Σφαιρίδια Ni-NTA**

**Εικόνα E1δ<sub>2</sub>:** Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Blue. Αποτέλεσμα της έκλυσης της πρωτεΐνης TAT-p21 από τα σφαιρίδια Ni-NTA. Είναι σαφές ότι η πρωτεΐνη εκλύεται στη δεύτερη και την τρίτη προσπάθεια. Κατά την παραπάνω ανάλυση ο όγκος κάθε δείγματος ήταν 30 μl.

Παράλληλα με την ανάλυση SDS-PAGE του προφίλ έκλυσης της πρωτεΐνης TAT-p21, πρότυπες συγκεντρώσεις από αλβουμίνη από ορό βοός (Bovine Serum Albumin)

αναλύθηκαν σε ξεχωριστή γέλη και ακολούθησε ανίχνευση τους με χρώση Coomassie Blue, στο ίδιο σκεύος που περιείχε την ανάλυση του προφίλ έκλυσης. Η ανιχνευόμενη πρωτεΐνη συγκρίθηκε ποσοτικά με αντίστοιχη πρότυπη ζώνη προκειμένου να γίνει ημιποσοτικός προσδιορισμός της παραγώμενης συγκέντρωσης.

**Εικόνα E1δ<sub>3</sub>:** Ανάλυση πρότυπων ποσοτήτων BSA με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Blue. Το βέλος υποδεικνύει την ποσότητα που αντιστοιχεί στην έκλυση της TAT-p21.



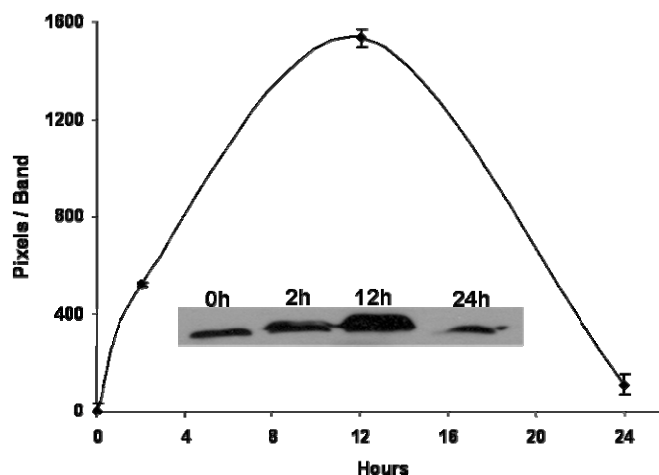
Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στις εκλούσεις 2 και 3 είναι περίπου τα 2μg/30μl δείγματος. Αυτή η συγκέντρωση αντιστοιχεί σε συγκέντρωση περίπου 2,67 μM (MW TAT-p21~25kDa).

Η αραίωση σε διάλυμα PBS, προκειμένου να απαλλαχθεί το διάλυμα από την περίσσεια άλατος και από την ουρία, δεν άλλαξε σημαντικά τον όγκο του διαλύματος, δεδομένου του γεγονότος ότι τα πλαστικά σωληνάρια που περιείχαν το διάλυμα ήταν εξαρχής γεμάτα και συνεπώς η εισροή του διαλύματος αραίωσης ήταν δυσχερής.

## **E2. Μελέτη της διαμεταγωγής της TAT-p21 επί της κυτταρικής σειράς EA.hy 926.**

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι η TAT-p21 πρωτεΐνη έχει διατηρήσει την ικανότητα της να εισέρχεται στα κύτταρα και ιδιαιτέρως στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 που είναι και τα κύτταρα μελέτης, διενεργήθηκαν πειράματα χρονικής απόκρισης (time response). Συγκεκριμένα κύτταρα της εν λόγω ενδοθηλιακής σειράς ( $10^5$  κύτταρα/δίσκο καλλιέργειας P60) καλλιεργήθηκαν παρουσία της πρωτεΐνης (με τελική αραίωση 1/20 του αρχικού διαλύματος) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0, 2, 12, 24 ώρες). Η ποσότητα της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης TAT-p21 ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο Western Blot με πρωτοταγές αντίσωμα εναντίον του επίτοπου 6His. Η εικόνα αναλύθηκε ψηφιακά (με τη χρήση αντίστοιχου λογισμικού) και το αποτέλεσμα απεικονίστηκε ως διάγραμμα συνάρτησης χρόνου. Παρατηρήθηκε ότι η TAT-p21 πρωτεΐνη εισέρχεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα περί το 2ωρο μετά την χορήγηση της. Η συγκέντρωση της αυξάνει μέχρι και 12 ώρες από την έναρξη της επίδρασης και σχεδόν εξαφανίζεται 24 ώρες μετά.

**Εικόνα E2:** Ανάλυση πρωτεϊνών (Western Blot) με χρήση πρωτοταγούς αντισώματος αντι-6His που φέρεται στην αλληλουχία της TAT-p21. Παρατηρήθηκε ότι η TAT-p21 πρωτεΐνη εισέρχεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα περί το 2ωρο, η συγκέντρωση της αυξάνει μέχρι και 12 ώρες από την έναρξη της επίδρασης και σχεδόν εξαφανίζεται 24 ώρες μετά.

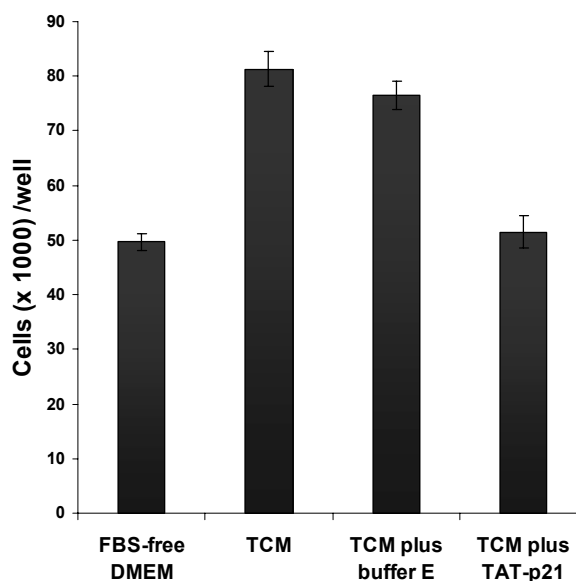


### E3. Επίδραση της TAT-p21 στην μετάδοση του αγγειογενετικού μηνύματος

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της TAT-p21 στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων σχεδιάστηκε πείραμα κατά το οποίο σε τριβλίο 24 θέσεων επώαστηκε αρχικός πληθυσμός 30000 κύτταρα/θέση για 24 ώρες. Εν συνεχεία ακολούθησε επώαση με TCM με ή χωρίς την παρουσία της πρωτεΐνης TAT-p21 για άλλες 48 ώρες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε διάλυμα έκλουσης το οποίο υπεβλήθη στη διαδικασία αραίωσης με τον ίδιο τρόπο με την TAT-p21 πρωτεΐνη. Η διαδικασία περιελάμβανε την ανανέωση όλων των διαλυμάτων ανά 12 ώρες προκειμένου να εξασφαλιστεί ικανή συγκέντρωση πρωτεΐνης ενδοκυττάρια. Η χορηγηθείσα συγκέντρωση ήταν τελική αραίωση 1:4 του αρχικού διαλύματος. Ακολούθησε μέτρηση των ζώντων κυττάρων με χρώση trypan blue.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική διαφορά ( $p < 0.001$ ) μεταξύ του δείγματος που καλλιεργήθηκε σε TCM και του δείγματος TCM και TAT-p21. Το τελευταίο μάλιστα δείγμα είχε συγκρίσιμη τιμή με το αρχικό δείγμα που καλλιεργήθηκε σε απλό θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία FBS. Ως παράπλευρο συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε εκ νέου η επίδραση του TCM στον αυξημένο ενδοθηλιακό ρυθμό. Τα αποτελέσματα αυτά περιγράφονται στην σχετική εικόνα. Είναι επίσης άξιο λόγου το φαινόμενο της ελάττωσης του ρυθμού πολλαπλασιασμού από τον ίδιο το διαλύτη της πρωτεΐνης. Η ελάττωση αυτή, συγκρινόμενη με την ελάττωση που προκαλεί η ίδια η TAT-p21 κρίνεται αμελητέα.

**Εικόνα E3:** Μέτρηση κυτταρικού πληθυσμού EA.hy 926 μετά από επίδραση 48 ωρών με TAT-p21. Είναι σαφές ότι η TAT-p21 αναστέλλει την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού, όπως αυτός προκαλείται από το TCM σε επίπεδο συγκρίσιμο με κυτταρικό πληθυσμό που καλλιεργείται χωρίς την παρουσία TCM. Ταυτόχρονα παρατηρείται και μια μικρή ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού από την επίδραση του διαλύτη της TAT-p21. Η συγκεκριμένη όμως ελάττωση κρίνεται αμελητέα σε σχέση με εκείνη που προκαλεί η TAT-p21. Συμπερασματικά η TAT-p21 υπόσχεται μια αποτελεσματική αναστολή της αγγειογένεσης των όγκων.



---

## **Στ. Η επίδραση του αντικαρκινικού σκευάσματος Imatinib στην αγγειογένεση, όπως προκύπτει από την επίδρασή της στην ενδοθηλιακή σειρά EA.hy 926.**

---

Η ουσία Imatinib είναι ένας αναστολέας τυροσινικών κινασών. Ιδιαίτερος έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα στην αναστολή της Abl κινάσης που ανευρίσκεται στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία και στην αναστολή του μορίου c-kit που εντοπίζεται σε στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα. Πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι η Imatinib αναστέλλει και μια ακόμη τυροσινική κινάση, τον υποδοχέα του παράγοντα PDGF. Με δεδομένη την έκφραση του PDGFR από τα ενδοθηλιακά κύτταρα έγιναν πειράματα μελέτης της δράσης της imatinib, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο την κυτταρική σειρά EA.hy 926. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.

### **Στ1. Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία της Imatinib.**

Τα κύτταρα της σειράς EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν όπως ακριβώς περιγράφεται στην αντίστοιχη ενότητα του μέρους «Υλικά και Μέθοδοι». Εν συντομία 50,000 κύτταρα ανά τριβλίο καλλιέργειας καλλιεργήθηκαν για 3 ημέρες υπό την επίδραση διαφόρων

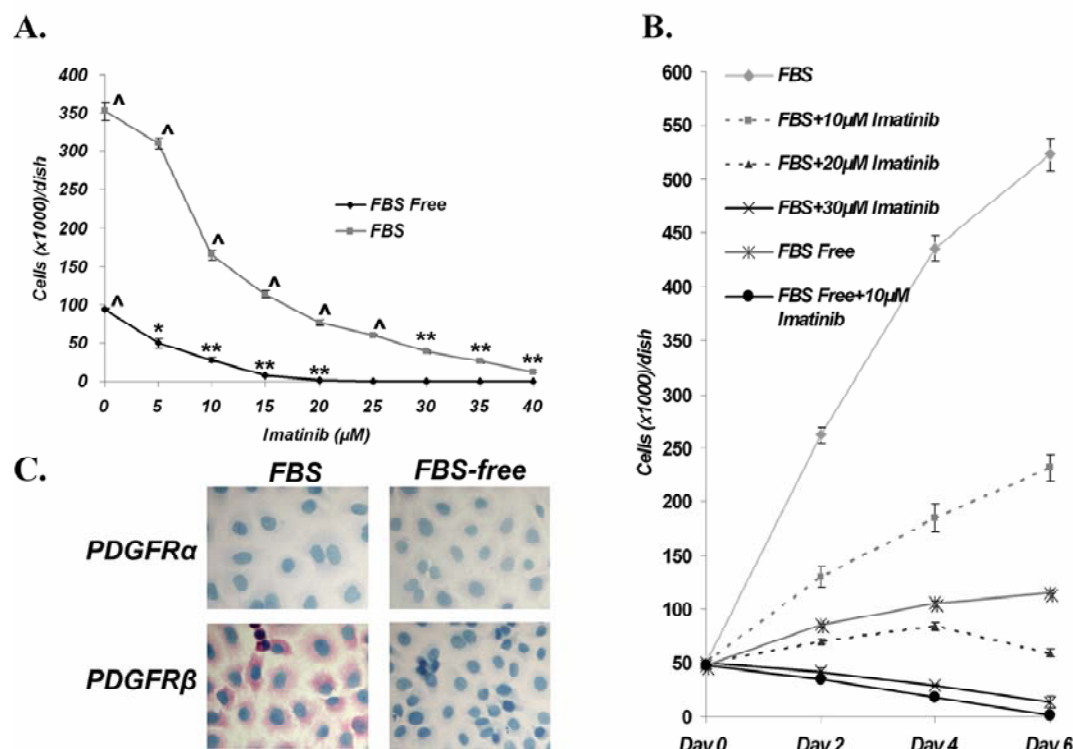
συγκεντρώσεων Imatinib, τόσο παρουσία όσο και απουσία FBS. Εν συνεχεία μετρήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός ανά περίπτωση. Ακολούθως, έγινε πείραμα χρονικής απόκρισης, ομοίως παρουσία ή όχι FBS και υπό διάφορες συγκεντρώσεις Imatinib. Στις προκαθορισμένες χρονικές στιγμές εκτιμήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός ανά περίπτωση.

Όπως φαίνεται στην εικόνα ΣΤ1, στην περίπτωση απουσίας FBS η συγκέντρωση των 5μM ανέστειλε την ανάπτυξη των ενδοθηλίων, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10-20μM) ελάττωσαν δραστικά τον ενδοθηλιακό πληθυσμό. Χρησιμοποιώντας την μικρότερη συγκέντρωση που ελάττωσε τον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό, ήτοι 10μM διενεργήθη αντίστοιχο πείραμα χρονικής απόκρισης το οποίο έδειξε ότι η καλλιέργεια στην ουσία καταστρέφεται ολοσχερώς περίπου σε διάστημα 6 ημερών. Το αρχικό λοιπόν συμπέρασμα ήταν ότι σε περιβάλλον έλλειψης FBS, η Imatinib δρα με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε πραγματοποιώντας παρόμοια πειράματα παρουσία FBS. Οι συγκεντρώσεις όμως που απαιτήθηκαν προκειμένου να επιτευχθεί το ίδιο φαινόμενο ήταν σαφώς υψηλότερες και τα απαιτούμενα χρονικά διαστήματα επίδρασης παρατεταμένα. Η ανάλυση του σχετικού γραφήματος αναδεικνύει μια ισοδυναμία των 10μM σε περιβάλλον απουσίας FBS και των 30μM παρουσία FBS.

## **Στ2. Χαρακτηρισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 για την έκφραση των υποδοχέων PDGFR.**

Η διαφορά στην απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην Imatinib όταν καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία FBS οδήγησε στην υπόθεση ότι είναι πιθανή μια διαφορά στο επίπεδο έκφρασης των υποδοχέων PDGFR. Προς αυτή την κατεύθυνση έγινε ανίχνευση των υποδοχέων με μέθοδο ανοσοκυτταροχημείας σε κύτταρα EA.hy 926 που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με ή χωρίς FBS για 24 ώρες. Τα πρωτοταγή αντισώματα αντι-RDGFRΑ και αντι-PDGFRB και λοιπές λεπτομέρειες της μεθόδου περιγράφονται σε αντίστοιχο κεφάλαιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι απουσία FBS τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν ούτε PDGFRA ούτε PDGFRB. Αντιθέτως σε περιβάλλον εμπλουτισμένο με FBS, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να εκφράζουν PDGFRB. Η χρώση για τον υποδοχέα PDGFRA απέβη αρνητική. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα ΣΤ1. Τα παραπάνω ευρήματα υποστήριζαν μια πιθανή δράση της Imatinib μέσω ενός ανεξάρτητου από τους μέχρι

σήμερα γνωστούς μηχανισμούς. Προς αυτή την κατεύθυνση τα επόμενα πειράματα διενεργήθηκαν απουσία FBS.



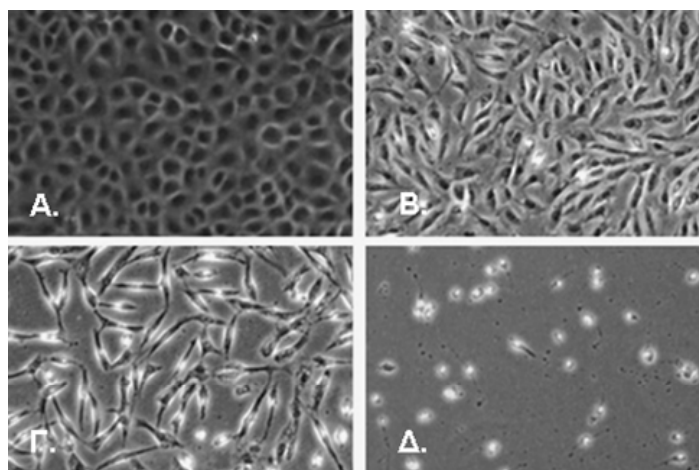
**Εικόνα ΣΤ1.** Α. Πείραμα απόκρισης δόσεων. Τα κύτταρα EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων imatinib παρουσία ή απουσία FBS για 3 ημέρες. Είναι σαφές ότι απουσία FBS συγκέντρωση 5 μM imatinib μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ 10 μM δύνανται να τον ελαττώσουν δραστικά. Σε περιβάλλον εμπλουτισμένο με FBS απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα. Διαφαίνεται ότι σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία FBS συγκεντρώσεις της τάξης των 30 μM προκαλούν το ίδιο αποτέλεσμα. Β. Πείραμα χρονικής απόκρισης. Τα κύτταρα EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις Imatinib και για διάφορα χρονικά διαστήματα. Παρατεταμένη επίδραση επηρεάζει δραστικά τον ενδοθηλιακό κυτταρικό πληθυσμό. (^): Σημαντικά μεγαλύτερος του αρχικού πληθυσμός ( $p < 0,001$ ), (\*\*): Σημαντικά μικρότερος του αρχικού πληθυσμός ( $p < 0,001$ ), (\*): Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά από τον αρχικό πληθυσμό. C. Εικόνες ανοσοκυτταροχημείας που υποδεικνύουν την αύξηση έκφρασης του υποδοχέα PDGFRβ παρουσία FBS. Αντιθέτως φαίνεται ότι η ενδοθηλιακή σειρά EA.hy 926 δεν εκφράζει PDGFRα.

### ΣΤ3. Μορφολογικές αλλαγές που προκαλεί η επίδραση της Imatinib επί των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926.

Τα κύτταρα της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926 καλλιεργήθηκαν υπό την επίδραση 10 μM σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS για 2, 4 και 6 ημέρες. Τα κύτταρα εν συνεχεία

παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης. Όπως διαφαίνεται από τα αποτελέσματα, σε καλλιέργεια μικρής διάρκειας, το ενδοθηλιακό μονόστρωμα χάνει τη συνεκτικότητα του και τα κύτταρα από πολυγωνικά μεταπίπτουν σε ατρακτοειδή. Η παράταση της επίδρασης οδηγεί σε συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και την πύκνωση του πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την πυροδότηση μιας διαδικασίας που θα μπορούσε να είναι είτε κυτταροτοξικότητα είτε απόπτωση. Ταυτοχρόνως η ελάττωση της συνοχής των κυττάρων αποτελεί ένδειξη μιας πιθανής απώλειας των στενών διακυττάρων συνδέσεων που χαρακτηρίζουν τα ενδοθήλια. Οι αλλαγές στη μορφολογία περιγράφονται στη σχετική εικόνα.

**Εικόνα ΣΤ3:** Μορφολογικές αλλοιώσεις κατά την επίδραση της 10  $\mu\text{M}$  imatinib στα κύτταρα EA.hy 926 για 0 (Α), 2 (Β), 4 (Γ) και 6 (Δ) ημέρες. Είναι σαφής η αλλαγή του κυτταρικού σχήματος και η απώλεια συνοχής του μονο-στρώματος. Η παρατεταμένη επίδραση (6 ημέρες) με imatinib οδήγησε πρακτικά σε καταστροφή της κυτταροκαλλιέργειας.

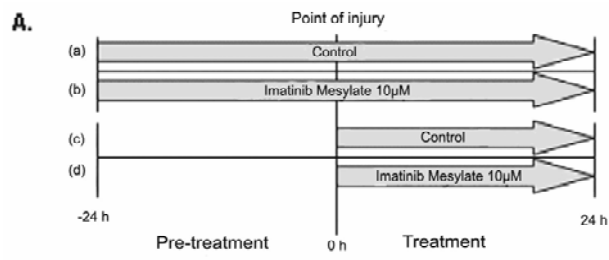


#### **ΣΤ4. Η μελέτη της μεταναστευτικότητας των ενδοθηλίων υπό την επίδραση της imatinib.**

Η διάταξη και η μεθοδολογία του πειράματος περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Πέραν των αλλαγών στη μορφολογία, η ανάλυση μεταναστευτικής ικανότητας έδειξε ότι ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν παραμείνει σε Imatinib για 24 ώρες, αδυνατούν να καλύψουν προκαθορισμένη απόσταση, την οποία καλύπτουν όταν δεν επιδράσει πάνω τους η εν λόγω ουσία. Η ελαττωμένη μεταναστευτικότητα, ικανότητα που σχετίζεται άρρηκτα με την αγγειογένεση, και ο τρόπος με τον οποίο αυτή εκλύεται, υποδηλώνει μια αγγειογενετική δράση της Imatinib σε περίπτωση χρόνιας χορήγησης. Τα αποτελέσματα του πειράματος περιγράφονται παρακάτω στην σχετική εικόνα.

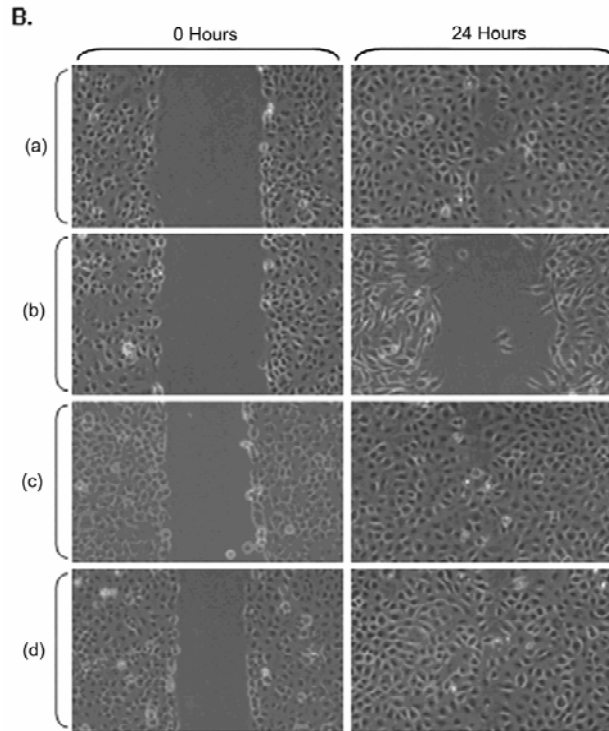


**Εικόνα ΣΤ4:** Α. Σχηματική παράσταση της πειραματικής διάταξης. Β. Όπως είναι φανερό (B.b) μόνο τα ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν προετοιμαστεί ένα 24ωρο με Imatinib, αναστέλλουν την αγγειο-γενετική – μεταναστευτική τους λειτουργία.

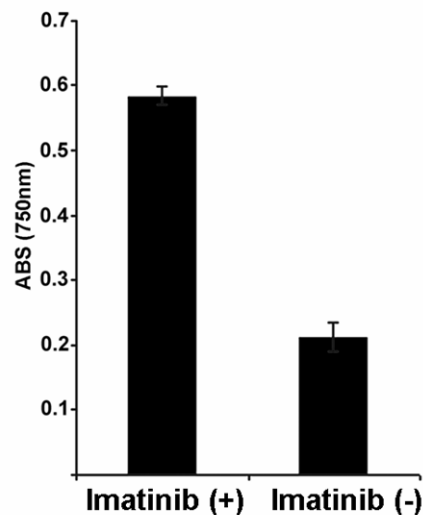


**Στ5. Η imatinib αυξάνει την μεσοκυττάρια διαπερατότητα των ενδοθηλίων στις μεγαλομοριακές ουσίες.**

Η αλλαγή στη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία της Imatinib και η χαλάρωση των στενών μεσοκυττάρων συνδέσεων οδήγησε στην υπόθεση ότι η imatinib αυξάνει την μεσοκυττάρια επικοινωνία των ενδοθηλίων. Προς απόδειξη της υπόθεσης ενδοθηλιακά μονοστρώματα καλλιεργήθηκαν σε ημιδιαπερατές μεμβράνες, όπου μελετήθηκε η μεσοκυττάρια διαπερατότητα μετά από επίδραση με 10 µM Imatinib επί 2 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ κυτταρικών μονοστρωμάτων επί των οποίων έδρασε η Imatinib σε σχέση με μονοστρώματα που διατηρήθηκαν σε απλό θρεπτικό μέσο, ως ομάδα ελέγχου.



**Εικόνα ΣΤ5:** Πείραμα διαπερατότητας με τη χρήση ημιπερατών μεμβρανών. Τα μονοστρώματα που καλλιεργήθηκαν με Imatinib είναι κατά 2,76 φορές πιο διαπερατά στην ανθρώπινη αλβουμίνη, γεγονός στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,001$ )

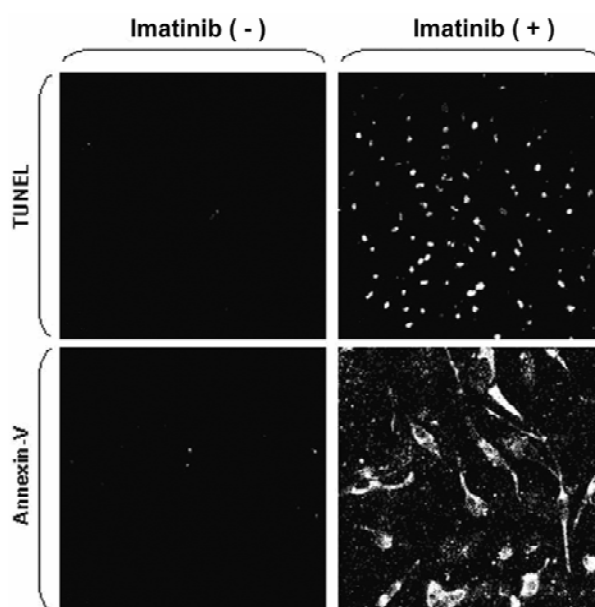


## ΣΤ6. Πιθανές αιτίες αυξημένης διαπερατότητας

### *A. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της Imatinib γίνονται αποπτωτικά.*

Η μελέτη της απόπτωσης υπό την επίδραση imatinib ήταν κάτι που απαιτήθηκε από τα αποτελέσματα της μορφολογίας και του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Η επίτευξη της μελέτης απαιτήσε την εφαρμογή δύο μεθόδων που ελέγχουν την απόπτωση. Η πρώτη αφορά τον κατακερματισμό του DNA επί αποπτώσεως – ήτοι το TUNEL, και η δεύτερη αφορά τις αλλαγές που επισυμβαίνουν στην κυτταρική μεμβράνη και αφορά την περίπτωση της Annexin-V. Τα αποτελέσματα, όπως προέκυψαν έδειξαν ότι παρουσία της Imatinib παρατηρείται μια επαγωγή της απόπτωσης, στοιχείο σημαντικό για την παραπέρα πορεία του σκευάσματος ως αντιαγγειογενετικό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη σχετική εικόνα.

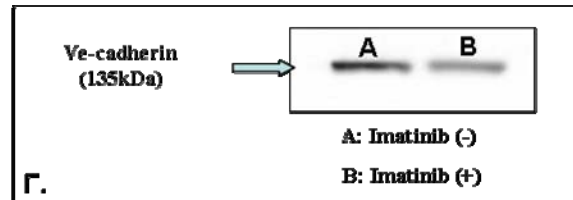
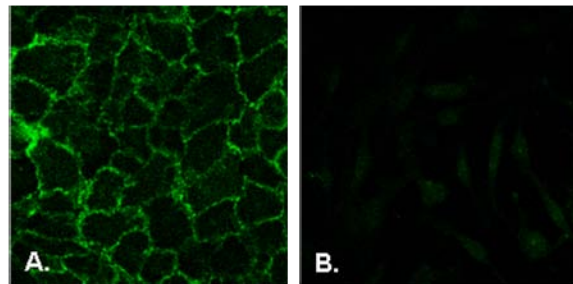
*Εικόνα ΣΤ6α:* Δοκιμασίες ελέγχου απόπτωσης μετά από 3ήμερη επίδραση Imatinib σε κύτταρα EA.hy 926. Είναι σαφές ότι η Imatinib επάγει απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



### *B. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της Imatinib ελαττώνουν την έκφραση της VE-cadherin.*

Η ίδια η αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών μονοστρωμάτων υπό την επίδραση της Imatinib καθώς και η υποκείμενη αλλαγή στην μορφολογία των ενδοθηλίων, τα οποία φαίνεται ότι χάνουν την συνοχή τους, οδήγησε στην υπόθεση ότι είναι πιθανή η ελάττωση έκφρασης στενών μεσοκυττάρων συνδέσεων. Δεδομένης της γνώσης ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν VE-Cadherin ως την κύρια πρωτεΐνη μεσοκυττάριας σύνδεσης, η ερευνητική προσπάθεια περιορίστηκε στη μελέτη της VE-cadherin. Πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού κατέδειξε ότι η Imatinib ελαττώνει την έκφραση της VE-cadherin. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και με την ανίχνευση της VE-cadherin εφαρμόζοντας ανοσοαποτύπωση κατά Western.

**Εικόνα ΣΤ6β:** Η επίδραση 10  $\mu$ M Imatinib επί 2 ημέρες έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της έκφρασης της VE-cadherin. Παρουσιάζονται μικροφωτογραφίες ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926 παρούσης (A) και απούσης (B) της Imatinib. Το ίδιο αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και με ηπιστοτική ανίχνευση της VE-cadherin – Western Blot (Γ).



---

**ΣΧΟΛΙΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ  
ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ & ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

---

---

## Σχόλια - Συζήτηση

---

### **A. Η μέθοδος εκτίμησης της μικροαγγειακής πυκνότητας με τη χρήση του CD105 αποτελεί ένα ευαίσθητο και αξιόπιστο τρόπο προσέγγισης της αγγειογένεσης**

Κατά την παρούσα μελέτη διενεργήθη ανοσοϊστοχημική μελέτη για την ανίχνευση διαφορών έκφρασης ενδοθηλιακών μορίων μεταξύ ομάδας ιστών φυσιολογικού μαστού και ομάδας ιστών καρκίνου του μαστού. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με τυχαίο τρόπο προκειμένου να εξασφαλιστεί η αποφυγή συστηματικού λάθους, το οποίο θα αφορούσε ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ασθενών όπως ηλικία, φύλο, κλινικό στάδιο κτλ. Άλλωστε τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά δεν αναλύθηκαν γιατί τουλάχιστον σε αυτό το επίπεδο της μελέτης αυτό ήταν πέραν του ερευνητικού σκοπού. Το μέγεθος του δείγματος κάθε ομάδας μελέτης ακολούθησε το βασικό στατιστικό κανόνα (όπου ο πληθυσμός οφείλει να είναι ίσος ή μεγαλύτερος των 30 περιστατικών) προκειμένου να γίνει ασφαλής αναγωγή στον πληθυσμό αναφοράς. Η επιλογή του θετικού αποτελέσματος ακολούθησε επίσης το γενικό κανόνα (θετικό είναι το αποτέλεσμα για  $p < 0,05$ ). Οι δοκιμασίες επίσης που χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν στην ομάδα των μη παραμετρικών δοκιμασιών, δεδομένου του γεγονότος ότι τα μεγέθη που αναλύθηκαν αντιμετωπίζονται κατά κοινή παραδοχή ως μη παραμετρικά. Ακόμη και εάν για μερικά μεγέθη συνεχόμενων τιμών υπήρξε θετική δοκιμασία κανονικότητας, για λόγους ασφάλειας συμπερασμάτων αποφεύχθηκαν οι παραμετρικές δοκιμασίες.

Τα μεγέθη που αναλύθηκαν ήταν είτε κατηγοριοποιημένες μεταβλητές (συνήθως αντιμετωπιζόμενες ως *θετικές* ή *αρνητικές*) ή συνεχόμενες. Οι δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν ακολούθησαν τους γενικούς στατιστικούς κανόνες και περιορισμούς. Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τη χρήση ανάλογου λογισμικού.

Η ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης έγινε χρησιμοποιώντας μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδο, την χρήση του προσοφθάλμιου φακού Chalkey, κατά την οποία ένα οπτικό πεδίο υφίσταται δειγματοληψία με τυχαιοποιημένο τρόπο. Είναι εύλογο ότι όσο περισσότερα είναι τα θετικά στοιχεία εντός του πεδίου, τόσο υψηλότερη θα είναι και η τιμή Chalkey. Η μέθοδος εφαρμόστηκε όπως

προβλέπουν οι σχετικές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομάδας Μελέτης της Αγγειογένεσης (Vermeulen PB et al, 2002). Συγκεκριμένα επιλέχθηκε με συμφωνία δυο παρατηρητών ένα σημείο αγγειογενετικής δραστηριότητας (Hot Spot) και μετρήθηκαν τα θετικά χρωσμένα αγγεία. Οι δύο παρατηρητές εξασφάλισαν την αποφυγή συστηματικού σφάλματος κατά την επιλογή του σημείου μελέτης και του χαρακτηρισμού ενός αγγείου ως θετικού.

Η μικροαγγειακή πυκνότητα προκύπτει απευθείας από την τιμή των θετικών αγγείων του προς μελέτη πεδίου. Δεδομένου του γεγονότος ότι επρόκειτο για ιστολογικές τομές (κατά τις οποίες τα αγγεία διατάσσονται κατά τυχαίο τρόπο) ως αγγείο εκλαμβάνεται κάθε ενδοθηλιακό κύτταρο θετικό στην επιλεγμένη χρώση.

Η μελέτη της αγγειογένεσης έγινε αρχικά με την χρώση του CD31 το οποίο ως γνωστόν είναι ένας πανενδοθηλιακός δείκτης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απέδειξαν μια αυξημένη αγγειογένεση στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού (πάντα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές της βιβλιογραφίας. Η επιλογή του CD31 ως δείκτη ποσοτικοποίησης της αγγειογένεσης, έγινε αφενός διότι είναι αποδεκτή και αφετέρου για να συγκριθεί η μέθοδος ως εφαρμογή με τα διεθνή δεδομένα, κατά την εκπαίδευση των παρατηρητών.

Αφού ολοκληρώθηκε η μελέτη με τον παραπάνω δείκτη, ακολούθησε η χρήση ενός άλλου ενδοθηλιακού δείκτη, του CD105. Η μέχρι σήμερα γνώση της ενδοθηλιακής βιολογίας θεωρεί το CD105 ως υποδοχέα που σχετίζεται με ενδοθήλια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, ήτοι ενδοθήλια που δέχονται μηνύματα πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης σε χώρους που υστερούν μεταβολικά (Duff SE et al, 2003). Το νεοπλασματικό περιβάλλον εξ'ορισμού είναι ένας τέτοιος χώρος, καθώς ο ανεξέλεγκτος ρυθμός πολλαπλασιασμού απαιτεί συνεχή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών που η διάχυση δεν επιτρέπει. Η ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση ότι και άλλοι ενδοθηλιακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση της αγγειογένεσης. Επιπλέον η ευαισθησία του CD105 στην αναγνώριση των ενδοθηλιακών κυττάρων που εμπλέκονται σε αγγειογένεση είναι σαφώς μεγαλύτερη. Αυτό αποδεικνύεται από τη σχεδόν μηδενική μέση τιμή της μικροαγγειακής πυκνότητας του δείγματος των φυσιολογικών ιστών μαστού, όταν εκτιμάται βάσει του CD105. Αντιθέτως η αντίστοιχη τιμή μικροαγγειακής

πυκνότητας βάσει του CD31 είναι αρκούντως μεγαλύτερη. Μια παρατήρηση που εξάγεται επίσης από τη σύγκριση των τιμών μικροαγγειακής πυκνότητας μεταξύ των ομάδων χρώσεως για CD105 και CD31, είναι η σταθερά μικρότερη τιμή μικροαγγειακής πυκνότητας που λαμβάνει κάθε περιστατικό όταν η μικροαγγειακή πυκνότητα υπολογίζεται βάσει του CD105 (η σύγκριση είναι ασφαλής γιατί οι τομές χρώσεις CD31 και CD105 ήταν διαδοχικές). Το φαινόμενο αυτό εξηγείται καθώς το CD31 είναι πανδείκτης, ανιχνεύοντας κάθε ενδοθηλιακό κύτταρο, ενώ το CD105 εντοπίζει μόνο τα ενεργά εμπλεκόμενα σε αγγειογένεση ενδοθήλια.

Περαιτέρω ανάλυση της χρώσης του CD105 έδειξε διαφορά στην ένταση χρώσης μεταξύ των ομάδων μελέτης. Το εύρημα αυτό, αν και στατιστικά σημαντικό, πάντα θα στηρίζεται σε υποκειμενική παρατήρηση και θα προκύπτει με ημιποσοτική μέθοδο. Ως εκ τούτου αναφέρεται μεν, αλλά δεν προτείνεται ως τρόπος εκτίμησης της αγγειογένεσης.

Η δοκιμασίες συσχέτισης τέλος απέδειξαν ότι το CD31 και το CD105 σχετίζονται θετικά.

Το συμπέρασμα που εξάγεται από τα παραπάνω είναι ότι το CD105 μπορεί να χρησιμοποιείται με ασφάλεια ως δείκτης ποσοτικοποίησης της αγγειογένεσης, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο σε μελέτες έκφρασης λοιπών μορίων με την αγγειογένεση. Παρά ταύτα δέον είναι το συμπέρασμα αυτό να επαληθευθεί με μεγαλύτερα δείγματα περιστατικών και σε διαφορετικούς ιστούς προκειμένου να αποτελέσει γενική παραδοχή.

Τα ευρήματα πάντως αυτής της μελέτης στο συγκεκριμένο θέμα δεν είναι μοναδικά στο χώρο, καθώς και άλλοι έχουν μελετήσει την έκφραση του CD105 σε νεοπλασία (Kumar S et al, 1999 / Bodey B et al 1998) και φλεγμονή (Middleton J et al, 2005). Αποτελούν όμως μια συστηματική σύγκριση των μεθόδων εκτίμησης της αγγειογένεσης, γεγονός που δεν έχει πραγματοποιηθεί εκτενώς μέχρι σήμερα. Προηγούμενες σχετικές μελέτες αρκέστηκαν μόνο σε στατιστική συσχέτιση των μεθόδων (Charpin C et al, 2004 / Dales JP et al, 2004), χωρίς να προχωρήσουν σε εκτίμηση ευαισθησίας ή σε κατά ζεύγος εκτίμηση των τιμών των δειγμάτων. Αυτές τις σημαντικές λεπτομέρειες κάλυψε η παρούσα μελέτη.

## **B. Η έκφραση των αγγειογενετικών υποδοχέων σε νεοπλασματικό περιβάλλον καρκίνου του μαστού.**

Τα συμπεράσματα που εξάγονται σχετικά με τη διαφοροποίηση έκφρασης των αγγειογενετικών υποδοχέων είναι σημαντικά καθώς από αυτά δύναται να σχεδιαστεί στο μέλλον μοριακή αντι-αγγειογενετική παρέμβαση.

Είναι δεδομένο ότι οι υποδοχείς του VEGF αναμένονται να εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αφού είναι οι βασικοί μεσολαβητές του αγγειογενετικού σήματος (Schneider et al, 2005). Παραταύτα πιθανή μεταβολή του επιπέδου έκφρασης τους θα αποτελούσε στόχο παρέμβασης με ήδη γνωστούς τρόπους όπως η χορήγηση αντι-VEGFR αντισωμάτων (Zhang W et al, 2002). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ιστούς μαστού ασχέτως ύπαρξης κακοήθειας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν πάντα VEGFR-1/Flt-1 και κατά περίπτωση VEGFR-2/Flk-1. Η διαφορά επιπέδου έκφρασης μεταξύ των δυο ομάδων (φυσιολογικών ιστών και ιστών καρκινώματος μαστού) δεν είναι στατιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με σχετικές αναφορές που περιγράφουν υποκατηγορίες καρκίνων του μαστού που εκφράζουν τον VEGFR-2 (Nakorouliou et al, 2002). Εντούτοις δεν αναφέρεται μέχρι σήμερα σύγκριση της έκφρασης των υποδοχέων του VEGF ανάμεσα σε φυσιολογικό μαστό και σε καρκίνωμα του μαστού.

Οι υποδοχείς του PDGF ως αγγειογενετικοί υποδοχείς αναλύθηκαν επίσης σε ότι αφορά ενδοθηλιακή εντόπιση. Μέχρι σήμερα όλες σχεδόν οι μελέτες επικεντρώνονται στους υποδοχείς PDGF που εκφράζονται στα κύτταρα του καρκινώματος (Carvalho I et al, 2005 / Palman C et al 1992). Ελάχιστες είναι οι αναφορές σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού ενώ μόνο μια αναφορά ασχολείται με το στρώμα των καρκινωμάτων (Bhardwaj B et al 1996). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη συμφωνούν με τη θέση της αύξησης της έκφρασης των PDGFRβ στα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν αυτά αναπτύσσονται σε νεοπλασματικό περιβάλλον και την αντιδιαστέλλουν με το φυσιολογικό ιστό παρέχοντας ένα ικανοποιητικό δείγμα περιστατικών, ολοκληρώνοντας και αποδεικνύοντας τη σχέση καρκίνου του μαστού και έκφραση ενδοθηλιακού PDGFRβ.

Στα πλαίσια του αγγειογενετικού μηνύματος εντάσσεται και η ανίχνευση της κυκλοζυγενάσης-2. Ο ρόλος της στο καρκίνωμα του μαστού είναι ακόμη υπό διερεύνηση (Singh B et al, 2002). Προηγούμενες μελέτες την έχουν συσχετίσει



με κλινικό στάδιο και επιβίωση (Costa C et al, 2002 / Denket C et al, 2004), αποδεικνύοντας ότι η ίδια μπορεί να λειτουργήσει ως προγνωστικός δείκτης. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν την έκφραση της Cox-2 με την μικροαγγειακή πυκνότητα σε καρκινώματα του μαστού (Davies G et al, 2003). Καμία όμως μέχρι στιγμής μελέτη δεν αναφέρει τι συμβαίνει σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού, και σαφώς δεν περιγράφεται η ενδοθηλιακή έκφραση της Cox-2. Θα μπορούσε και ο φυσιολογικός μαστός να εκφράζει Cox-2 ως τρόπο συντήρησης της φυσιολογικής αγγειογένεσης. Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η Cox-2 επάγεται από το νεοπλασματικό περιβάλλον. Δικαιολογείται λοιπόν με αυτόν τον τρόπο η λογική παρέμβασης με αναστολείς της Cox-2 ως αντι-αγγειογενετική θεραπεία (Fife RS et al, 2004).

#### **Γ. Τα μόρια προσκόλλησης και η έκφραση τους σε φυσιολογικό μαστό και σε καρκίνωμα του μαστού.**

Τα μόρια προσκόλλησης είναι μια κατηγορία μορίων που έχουν μελετηθεί αρκετά στο παρελθόν, καθώς εμπλέκονται στη φλεγμονή. Στην περίπτωση των νεοπλασιών η έκφραση τους μελετήθηκε εκτενώς σε ιστούς καρκινωμάτων με αντιφατικά αποτελέσματα (Ali S et al, 2002 / Kostler WJ et al, 2001 / Simiantonaki N et al, 2002 / O'Hanlon DM et al, 2002). Η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης ποικίλει αναλόγως της προέλευσης της κακοήθειας και της σειράς των ασθενών. Αποτέλεσμα αυτής της ποικιλότητας είναι η επιφύλαξη με την οποία αντιμετωπίζονται τα μόρια προσκόλλησης στην καρκινογένεση και την αγγειογένεση.

Παραταύτα, η σχέση καρκίνου και φλεγμονής επιβάλλει μια πιο κριτική αντιμετώπιση του ζητήματος. Ο πρωτοπαθής όγκος δύναται να πυροδοτήσει φλεγμονή και χημειοτακτισμό κυτταρικών στοιχείων είτε για να ενισχύσει το αγγειογενετικό του μήνυμα με κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα, είτε ως αποτέλεσμα της αντίδρασης του «ξενιστού» ασθενούς. Στην πρώτη περίπτωση η φλεγμονή ευοδώνει τη μετάσταση, εν αντιθέσει με τη δεύτερη όπου η μετάσταση εμποδίζεται. Και οι δύο πιθανότητες έχουν υποστηριχτεί στο παρελθόν με σημαντικές αποδείξεις. Τα μακροφάγα που διηθούν τους όγκους αναφέρονται να διαδραματίζουν παρόμοιο διττό ρόλο. Στον καρκίνο του μαστού λοιπόν όπως και σε άλλους αντίστοιχους, απαιτήθηκε μια αποσαφήνιση του ρόλου των μορίων προσκόλλησης και κατ'επέκτασιν της

φλεγμονής. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος ανοσοκαταστολής με την ελάττωση της έκφρασης του VCAM-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του νεοπλάσματος. Το αποτέλεσμα είναι ελαττωμένη φλεγμονώδης διήθηση και συνεπώς μια ευκολότερη διεργασία μετάστασης. Προς αυτό το συμπέρασμα συνηγορεί και προηγούμενη μελέτη κατά την οποία καταδεικνύεται ότι η αργή εξέλιξη του μυελοειδούς καρκινώματος του μαστού σε αντιδιαστολή με το πορογενές καρκίνωμα (το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη), οφείλεται σε αυξημένη κυτταρική διήθηση από λεμφοκύτταρα (Bouma-ter Steege JC et al, 2004). Φαίνεται λοιπόν ότι στο καρκίνωμα του μαστού η αγγειογένεση συντηρείται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, ακόμη και χωρίς υποβοήθηση από κύτταρα φλεγμονής (βλ. Εισαγωγή), επιβεβαιώνοντας τη θέση ότι η άποψη περί της υποβοηθούμενης αγγειογένεσης δεν ισχύει σε όλους τους καρκίνους. Η παρατήρηση της ελάττωσης της έκφρασης του VCAM-1, έρχεται επίσης σε φαινομενική αντιδιαστολή με αναφορές που αναφέρουν αυξημένη συγκέντρωση του διαλυτού κλάσματος sVCAM-1 (Byrne GJ et al, 2000 και άλλες). Οι μελέτες που ασχολούνται με το sVCAM-1 δεν λαμβάνουν υπόψη την πηγή παραγωγής του. Εικάζουν ότι το sVCAM-1 προέρχεται από το σημείο της νεοπλασματικής ανάπτυξης, και δε λαμβάνουν υπόψη την πιθανότητα η αύξηση αυτή να είναι δευτερογενές αποτέλεσμα των κυτταροκινών που εκκρίνονται από το καρκινικό κύτταρο ή τα στρωματικά στοιχεία του όγκου, επί ενδοθηλίων άλλων των νεόπλαστων τριχοειδών. Στο καρκίνωμα του μαστού μια λογική εξήγηση θα ήταν η αρχική έκκριση χημειοτακτικών παραγόντων η οποία δεν ευαισθητοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα του νεοπλάσματος αλλά κάποια άλλα γειτονικά ή μη, τα οποία εκφράζουν VCAM-1 και κατ'επέκταση και sVCAM-1. Η εξήγηση για την διαφοροποίηση του νεόπλαστου ενδοθηλίου στο καρκίνωμα του μαστού μπορεί να προέρχεται από το ίδιο το καρκινικό κύτταρο (το οποίο μπορεί να εκκρίνει ή όχι κάτι) με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αναμενόμενη αύξηση του VCAM-1, ή από το στρωματικό μικροπεριβάλλον που μπορεί να παρεμποδίζει με κάποιο τρόπο την έκφραση του VCAM-1.

Η έκφραση των λοιπών μορίων προσκόλλησης που μελετήθηκαν, δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

#### **Δ. Οι συσχετίσεις των μορίων της μελέτης αποκάλυψαν μια πιθανή εμπλοκή του ICAM-1 στην αγγειογένεση.**

Οι συσχετίσεις αγγειογένεσης έλαβαν χώρα λαμβάνοντας υπόψη και τις δύο τιμές μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτές προέκυψαν από τις μετρήσεις για CD105 και CD31. Δεδομένης της θετικής συσχέτισης των δύο μεταβλητών, κάθε παράγοντας που αναλύθηκε ως προς την τιμή μικροαγγειακής πυκνότητας θεωρήθηκε ότι είχε θετική σχέση εφόσον μια τουλάχιστον μέθοδος εκτίμησης απέδιδε θετική σχέση. Τα αποτελέσματα απέβησαν θετικά για τους παράγοντες PDGFRβ, Cox-2 και ICAM-1, αποδεικνύοντας μια άρρηκτη σχέση μεταξύ των παραγόντων αυτών της αγγειογένεσης και της νεοπλασίας. Άξια λόγου είναι επίσης η παρατήρηση ότι αν και το VCAM-1 ελαττώνεται στον καρκίνο του μαστού, το ICAM-1 είναι αυτό που αυξάνεται σε περίπτωση υψηλής αγγειογένεσης στον μαστό εν γένει. Το γεγονός ότι κατά τα αποτελέσματά μας, το ICAM-1 δεν εκφράζεται εκτενώς και σημαντικά στον καρκίνο του μαστού ίσως είναι θέμα που απαιτεί διεύρυνση του δείγματος, καθώς παρατηρείται μεν αύξηση της έκφρασης του ICAM-1, πλην όμως μη στατιστικά σημαντική. Προς αυτή την κατεύθυνση συνηγορούν και πρόσφατες μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι η μεταστατικότητα του καρκίνου του μαστού σχετίζεται με την έκφραση του ICAM-1 (Rosette C et al, 2005 / Kammerer S et al, 2004). Με βάση και αυτή την παρατήρηση περί μετάστασης και με αποσαφηνισμένη την θετική σχέση μετάστασης και αγγειογένεσης, είναι αναμενόμενη και η συμμετοχή του ICAM-1 στην εξάπλωση του καρκίνου του μαστού.

#### **Ε. Το επίπεδο ενδοθηλιακής έκφρασης του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> είναι το αποτέλεσμα επίδρασης του αγγειογενετικού μηνύματος στα ενδοθήλια**

Η μελέτη του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21<sup>WAF1/Cip1</sup> στο φαινόμενο της αγγειογένεσης, στηρίχτηκε στη θεωρία του αγγειογενετικού διακόπτη. Κατά τη θεωρία αυτή, η οποία περιγράφεται στην «Εισαγωγή», το αγγειογενετικό αποτέλεσμα είναι ο συνδυασμός δράσης πολλών ευοδωτικών και ανασταλτικών παραγόντων. Το αποτέλεσμα όπως προκύπτει είναι ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, φαινόμενο που ρυθμίζεται από κάθε παράγοντα που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο εν γένει. Μια από τις πιο βασικές πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου είναι και η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1/Cip1</sup> η οποία και μελετήθηκε.

Στην παρούσα μελέτη το ρόλο του νεοπλασματικού περιβάλλοντος, τουλάχιστον σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας, έπαιξε το TCM από την κυτταρική σειρά MDA-MB 468 που είναι σειρά προερχόμενη από περιστατικό καρκίνου του μαστού. Η χρήση του TCM στηρίχτηκε στη λογική ότι οποιοσδήποτε και εάν είναι ο παράγοντας που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα, αυτός θα βρίσκεται στο TCM, προσομοιάζοντας τον αγγειογενετικό διακόπτη (Vrekoussis et al, 2005). Η δράση του TCM επί του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού αποδεικνύεται σε σχετικό πείραμα όπου ο πληθυσμός των κυττάρων EA.hy 926 που καλλιεργούνται σε TCM είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον πληθυσμό μάρτυρα, που αφορά κύτταρα EA.hy 926, ίδιας αρχικής συγκέντρωσης, τα οποία καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS. Η επιλογή του μάρτυρα να καλλιεργείται σε περιβάλλον χωρίς FBS, καθώς και του TCM να μην περιέχει FBS, οφείλεται στο γεγονός ότι το FBS περιέχει πολλούς αυξητικούς παράγοντες και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, γεγονός που θα εμπόδιζε την παρατήρηση της διαφοράς ανάμεσα στις ομάδες μελέτης.

Η μελέτη σε κυτταρικό επίπεδο έδειξε ότι παρουσία TCM παρατηρείται μια ελάττωση των επιπέδων έκφρασης του  $p21^{WAF1/Cip1}$ , ένα φαινόμενο που δείχτηκε ότι οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση. Η ελάττωση του  $p21^{WAF1/Cip1}$  οδηγεί σε μια σειρά από παρατηρήσεις δεδομένου του πολλαπλού ρόλου που παίζει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη στον κυτταρικό κύκλο.

Η πρωτεΐνη  $p21^{WAF1/Cip1}$  φαίνεται ότι δρα τόσο ως αναστολέας του κυτταρικού κύκλου (Niculescu 3rd AB et al, 1998), όσο και ως μόριο-προστάτης από την κυτταρική απόπτωση (Liu S et al, 2003). Είναι μια πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση ποικίλει μέσα στο κύτταρο τόσο ποσοτικά όσο και χωροταξικά (Coqueret O, 2003). Αν και παραδοσιακά η  $p21^{WAF1/Cip1}$  ανιχνεύεται στον πυρήνα, είναι πλέον αποδεκτή η ανίχνευση της και στο κυτταρόπλασμα διαδραματίζοντας εκεί σημαντικό επίσης ρόλο. Στον καρκίνο του μαστού, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως νεόπλασμα αναφοράς σε αυτή την μελέτη, μόλις πρόσφατα αναφέρεται κυτταροπλασματική εντόπιση του  $p21^{WAF1/Cip1}$  (Wintersa ZE et al, 2001). Κατά την παρούσα μελέτη η έκφραση της  $p21^{WAF1/Cip1}$  ανιχνεύθηκε απουσία του TCM. Αυτό αποδόθηκε αρχικά στην δημιουργία περιβάλλοντος φτωχού σε αυξητικούς παράγοντες (περιβάλλον χωρίς FBS, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας), ένα φαινόμενο που σαφώς έχει αναφερθεί στο παρελθόν (Ozaki K and Hanazawa S, 2001). Η πρωτεΐνη  $p21^{WAF1/Cip1}$

ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Έτσι η συνολική εικόνα που σχηματίζεται είναι ότι σε περιβάλλον στέρησης αυξητικών παραγόντων το κύτταρο εκφράζει πυρηνική p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προκειμένου να αναστείλει τον κυτταρικό κύκλο, και κυτταροπλασματική p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προκειμένου να προστατευθεί από την επικείμενη απόπτωση (Asada M et al, 1999). Αντιθέτως σε νεοπλασματικό περιβάλλον (TCM) ο όγκος τροφοδοτεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αυξητικούς παράγοντες, πυροδοτώντας τον πολλαπλασιασμό τους. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται εμμέσως και από προηγούμενη αναφορά κατά την οποία ο παράγοντας VEGF – σημαντικός παράγοντας του νεοπλασματικού περιβάλλοντος – προκαλεί ελάττωση της έκφρασης του αναστολέα p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Watanabe Y et al, 1997). Τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν βάση για μελλοντική έρευνα κατά την οποία θα πρέπει να διευκρινιστεί ο μηχανισμός της μεταγραφικής ρύθμισης.

Σε επίπεδο ιστολογικής μελέτης τα αποτελέσματα συμφωνούν με διαφορετικό όμως τρόπο. Η πρωτεΐνη p21<sup>WAF1/Cip1</sup> στο παρελθόν έχει μελετηθεί ποικιλοτρόπως και σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων (Leivonen M et al, 2001 / Milde-Langosch K et al, 2001 / McClelland RA et al, 1999). Διάφορα κλινικά στοιχεία όπως η λεμφαδενική εντόπιση και η επιβίωση έχουν συσχετιστεί είτε θετικά, είτε αρνητικά (Wakasugi E et al, 1997 / Schondorf T et al, ). Εντούτοις οι μέχρι τώρα μελέτες εστιάζονται μόνο στο ίδιο το νεοπλασματικό κύτταρο. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αναλύει την έκφραση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> στα ενδοθηλιακά κύτταρα και δη σε νεόπλαστα τριχοειδή καρκινώματος. Η συμφωνία με το εύρημα των κυτταροκαλλιιεργειών πηγάζει από τη στατιστική παρατήρηση ότι σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού το p21<sup>WAF1/Cip1</sup> εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι σε καρκινώματα μαστού. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε είναι επαρκές για την εξαγωγή επαληθευτικών συμπερασμάτων, λόγω κυρίως της ιδιαίτερα μικρής αναλογίας θετικών/αρνητικών περιστατικών καρκίνου του μαστού (1 θετικό/43 αρνητικά περιστατικά).

Η συσχέτιση της έκτασης της αγγειογένεσης με την έκφραση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προέκυψε μετά από συσχέτιση του αρχικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη άλλων αγγειογενετικών παραγόντων και του δείγματος μελέτης του p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Η επιλογή του τελικού δείγματος προς συσχέτιση έγινε με απόρριψη κάθε περιστατικού που δεν είχε επεξεργαστεί είτε

με χρώση αντι- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> είτε με χρώση αντι-CD31 ή αντι-CD105. Η μέθοδος συγχώνευσης των δύο βάσεων δεδομένων είναι απολύτως θεμιτή και τα αποτελέσματα ασφαλή, δεδομένου του γεγονότος ότι και οι δύο προς μελέτη ομάδες είχαν πληθυσμούς ίσους ή μεγαλύτερους των 30 δειγμάτων. Τα τελικά αποτελέσματα αυτής της συσχέτισης είναι κατ'ουσίαν η απόδειξη της εξάρτησης της αγγειογένεσης από την παρουσία/απουσία του p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Η σχέση αυτή αποτέλεσε και το σημείο μοριακής παρέμβασης με την κατασκευή και χορήγηση της υβριδικής πρωτεΐνης TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

### **ΣΤ. Η πρωτεΐνη TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> αποτελεί πρωτότυπη μέθοδο μοριακής αναστολής της αγγειογένεσης των όγκων in vitro**

Η τεχνολογία διαμεταγωγής πρωτεϊνών με τη χρήση του ολιγοπεπτιδίου TAT, έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για τη διαμεταγωγή πρωτεϊνών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Harada H et al, 2002 / Dolgilevich S et al, 2002). Κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ουρία σε υψηλή συγκέντρωση (8M) προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση από τα σωμάτια εγκλεισμού που προκύπτουν κατά την σύνθεση της πρωτεΐνης από τα βακτήρια (Yang Y et al, 2002). Η χρήση αποδιατακτικών μέσων δεν είναι περιορισμός για τον καθαρισμό της TAT-πρωτεΐνης (Schwarze SR et al, 1999) καθώς επαναδιατάσσεται με αφενός με την αφαίρεση της ουρίας από το διάλυμα (με διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης) και αφετέρου με τη χρήση των τσαπερονών όταν πλέον εισέλθει στο κύτταρο (Schwarze SR et al, 2000). Η εμπειρία από την παραγωγή της TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> ώθησε στο συμπέρασμα ότι σε πειράματα μικρής κλίμακας όπως το πείραμα που περιγράφεται με εξαγωγή TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> από 500 ml καλλιέργειας η χρήση ουρίας ως αποδιατακτικού μέσου λειτουργεί χωρίς πρόβλημα. Αντιθέτως σε παραγωγή TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> σε μεγάλη κλίμακα, όπως είναι παραγωγή από 5 lt καλλιέργειας, η χρήση ουρίας δημιουργεί προβλήματα καθώς κατά την αφαίρεση της ουρίας η TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> συσσωματώνεται μέσω υδρόφοβων δεσμών με διαδικασία αντιστρέψιμη μεν σε αποδιατακτικές συνθήκες (επαναδιάλυση σε ουρία), μη αντιστρέψιμη όμως σε υδατικό περιβάλλον.

Στην παρούσα διατριβή η TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> παρήχθη και απομονώθηκε επιτυχώς. Η επίδραση της TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> στον ενδοθηλιακό κύκλο ήταν σαφής και στατιστικά σημαντική. Διαφαίνεται ότι η χορήγηση της στα

ενδοθήλια που αναπτύσσονται σε νεοπλασματικό περιβάλλον είναι ικανή να ακυρώσει το αγγειογενετικό μήνυμα που αυτό μεταφέρει.

Η κλινική εφαρμογή της TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, εάν και πρόιμη ως σκέψη, είναι πολλά υποσχόμενη. Η ενδοφλέβια χορήγηση πρωτεϊνών TAT έχει ήδη επιτευχθεί σε πειραματόζωα και έχει αποδειχτεί ότι επιτυγχάνονται ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς του σώματος, ακόμη και πέραν του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Schwarze SR et al, 1999). Η χορήγηση της TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> αφορά κυρίως τοπικοπεριοχικές προσεγγίσεις (θεραπείες τύπου Stop-flow) με τη λογική της απευθείας αναστολής ανάπτυξης του νεόπλαστου δικτύου των όγκων. Η συστηματική χορήγηση TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup> απαιτεί ισχυρά πειράματα σε πειραματόζωα και λίαν αυστηρές κλινικές μελέτες, καθώς οποιαδήποτε χορήγηση της p21<sup>WAF1/Cip1</sup> σε ιστούς με υψηλό ρυθμό ανανέωσης (π.χ. εντερικός βλεννογόνος, όρχις, μυελός των οστών) θα ήταν καταστροφική τόσο στην αρχιτεκτονική, όσο και στη λειτουργία τους.

Ένα θέμα προς σκέψη είναι επίσης η ίδια η λογική της συστηματικής θεραπείας με TAT- p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Η χορήγηση της από τη μια αναστέλλει την αγγειογένεση, από την άλλη κάνει τα ήδη οργανωμένα νεόπλαστα τριχοειδή χημειοάντοχα μέσω μηχανισμών προστασίας από την απόπτωση (Gartel AL and Tyner AL, 2002). Μια ιδανική κατάσταση, βάσει αυτής της παρατήρησης, είναι η χορήγηση της μετά από την εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου με στόχο την ελάττωση της επίπτωσης τοπικών υποτροπών. Προς την ίδια κατεύθυνση είναι και η παρατήρηση ότι ενδοθήλια που δεν εκφράζουν p21<sup>WAF1/Cip1</sup> αναφέρονται ως ακτινοάντοχα (Kim HS et al, 2004). Η ενδοκυττάρια αποκατάσταση των επιπέδων του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> μπορεί να καταστήσει την ακτινοθεραπεία μια επαρκή αντι-αγγειογενετική παρέμβαση, μεγιστοποιώντας την αποτελεσματικότητα της στην πρόληψη της τοπικής υποτροπής. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού τέτοιου είδους προσέγγιση μπορεί να αποκτήσει μεγαλύτερη σημασία εάν η αύξηση της αποτελεσματικότητας της ακτινοθεραπείας οδηγήσει σε ελάττωση του ιστού πέριξ του όγκου που πρέπει να εκταμεί. Η μείωση του εύρους των ογκεκτομών με ασφάλεια θα μπορούσε να βελτιώσει τελικά πέραν του κλινικού και το αισθητικό αποτέλεσμα.

**Z. Τελικά το p21<sup>WAF1/Cip1</sup> μπορεί να αποτελέσει στόχο παρέμβασης στο μέλλον;**

Η διττή δράση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προκαλεί επιφυλάξεις, σχετικά με την παρέμβαση στο επίπεδο αναστολής ή ευόδωσης των αναστολέων CDK. Το πρόβλημα που προκύπτει – τουλάχιστον με την παρούσα γνώση – είναι το γεγονός ότι σε ευρύτερη βάση (πέραν από τον έλεγχο της αγγειογένεσης) η αναστολή ή αποκατάσταση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ της ογκογόνου και της ογκοκατασταλτικής δράσης του γονιδίου. Άλλωστε ακόμη δεν είναι σαφές εάν οι δύο αυτές δράσεις του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> αφορούν διαφορετικές περιοχές του γονιδίου και κατ'επέκτασιν της πρωτεΐνης (Roninson IB, 2002). Ως εκ τούτου απαιτείται πειραματισμός προκειμένου να βρεθεί τρόπος παρέμβασης υπέρ της μιας ή της άλλης δράσης, αναλόγως της περίπτωσης. Υπό αυτό το πρίσμα, σε ταχέως εξελισσόμενα νεοπλάσματα πιθανώς να απαιτείται μια ευόδωση του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προκειμένου να ελαττωθεί ο ρυθμός αύξησης που σαφώς περιορίζει το προσδόκιμο επιβίωσης. Τα βραδέως εξελισσόμενα νεοπλάσματα, ιδίως σε περιοχές που είναι δύσκολη η χειρουργική εξαίρεση, ίσως πάλι να απαιτούν μια αναστολή έκφρασης του p21<sup>WAF1/Cip1</sup> προκειμένου να γίνουν πιο χημειοευαίσθητα.

Το γεγονός παρέμβασης στον κυτταρικό κύκλο είναι σαφώς πολύπλοκο καθώς είναι βέβαιο ότι και άλλοι αναστολείς CDK (βλ. Εισαγωγή) μπορούν να εμπλέκονται στην αγγειογένεση και την ογκογένεση. Πιθανώς να απαιτείται μια ταυτόχρονη παρέμβαση σε περισσότερους του ενός αναστολείς.

Εναλλακτικά, προτείνεται η παρέμβαση στα διάφορα μονοπάτια αύξησης στα οποία το p21<sup>WAF1/Cip1</sup> συμμετέχει (βλ. Εισαγωγή). Το μονοπάτι του NFκB, είναι ένα τέτοιο παράδειγμα. Αναστολή του μέσω μη ειδικών σκευασμάτων όπως το ακετυλοσαλυκυλικό νάτριο, προφυλάσσει από καρκινογένεση (Kopp E et al, 1994 / Roninson IB, 2002)

## **Η. Η Imatinib ως μέσο αλλαγής της διαπερατότητας του ενδοθηλιακού φραγμού**

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω, η αγγειογένεση μπορεί να διαχωριστεί σε δύο στάδια: την πρώιμη και την όψιμη. Κατά την πρώιμη αγγειογένεση – η οποία προσομοιάζεται από κύτταρα EA.hy 926 τα οποία δεν καλύπτουν το σύνολο της καλλιεργητικής επιφάνειας – παρατηρείται έντονος ενδοθηλιακός πολλαπλασιασμός, μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στη θέση αγγειογένεσης και οργάνωση σε πρώιμα τριχοειδή (Bergers G et al,



2003). Τα τριχοειδή αυτά αποτελούνται μόνο από το μονόστιβο ενδοθήλιο. Στην όψιμη φάση της αγγειογένεσης τα τριχοειδή αυτά οργανώνονται σε αγγεία με την εκ των έξω επένδυση τους από περικύτταρα τα οποία σταθεροποιούν την αγγειακή δομή (Benjamin L et al, 1998). Στην προκειμένη περίπτωση το ενδοθήλιο αυτών των αγγειακών δομών προσομοιάζεται από μονοστρώματα κυττάρων EA.hy 926 τα οποία καλύπτουν πλήρως την καλλιεργητική επιφάνεια πάνω στην οποία αναπτύσσονται.

Στην περίπτωση επίδρασης της imatinib, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας καλλιεργητικά μέσα που άλλοτε περιείχαν και άλλοτε όχι, ορό εμβρύου βοός (FBS). Τα πρώτα πειράματα απόκρισης δόσης (dose-response) και χρονικής απόκρισης (time response) έδειξαν ότι η Imatinib μπορεί να δράσει επί των ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο παρουσία όσο και απουσία FBS. Ειδικότερα στην περίπτωση καλλιέργειας σε περιβάλλον απουσίας FBS η απαιτούμενη συγκέντρωση της εν λόγω ουσίας προκειμένου να αναστείλει την ανάπτυξη των ενδοθηλίων είναι της τάξης των 5  $\mu\text{M}$ . Όμως δραστική μείωση του αρχικού πληθυσμού παρατηρείται σε συγκεντρώσεις από 10  $\mu\text{M}$  και πάνω. Τα αποτελέσματα επί των ενδοθηλιακών μονοστρωμάτων παρατηρήθηκαν και σε περιβάλλον παρουσίας FBS. Στην προκειμένη περίπτωση όμως απαιτήθηκαν τόσο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όσο και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκειμένου να επιτευχθούν οι ίδιες αλλαγές στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όπως αποδείχτηκε από τα αποτελέσματα του σχετικού πειράματος, 10  $\mu\text{M}$  Imatinib σε περιβάλλον απουσίας FBS επιφέρουν παρόμοιες αλλαγές στα ενδοθηλιακά κύτταρα με συγκέντρωση 30  $\mu\text{M}$  Imatinib παρουσία FBS. Το φαινόμενο αυτό δύναται να εξηγηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους: α) Η έλλειψη ορού στην κυτταρική καλλιέργεια μπορεί να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα της σειράς EA.hy 926 στην κυτταροτοξική δράση της Imatinib, φαινόμενο που έχει αναφερθεί ως αποτέλεσμα όταν στην εν λόγω σειρά επιδρά τεστοστερόνη (Ling S et al, 2002). Εάν επρόκειτο όμως για το φαινόμενο αυτό, θα αναμένονταν παρουσία FBS η Imatinib να μην παρουσίαζε καμία δράση επί του ενδοθηλίου. β) Αναφέρεται ότι η Imatinib παρουσιάζει υψηλή χημική συγγένεια για την αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού (Peng B et al, 2005). Ως εκ τούτου το δεσμευμένο κλάσμα της Imatinib, το οποίο αναμένεται να είναι ανενεργό αφορά τη μεγαλύτερη από την ποσότητα που χορηγείται. Είναι πιθανό λοιπόν η Imatinib να είναι εμφανίζει υψηλή συγγένεια με την βόειο αλβουμίνη του FBS, δεδομένης της μεγάλης

ομολογίας της με την ανθρώπινη αλβουμίνη. Υπό το πρίσμα αυτής της παρατήρησης είναι λογική η χορήγηση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων Imatinib προκειμένου να υπάρχει ικανό ελεύθερο κλάσμα της ουσίας, το οποίο θα δράσει.

γ) Στην περίπτωση απουσίας του FBS είναι πολύ πιθανό η Imatinib να αναστέλλει και άλλες τυροσινικές κινάσες οι οποίες δεν είναι ακόμη γνωστές ως στόχος της εν λόγω ουσίας. Έχει ήδη αναφερθεί ότι σε συνθήκες απουσίας FBS, κύτταρα καρκινικών σειρών παρουσιάζουν ενδογενή δραστηριότητα τυροσινικών κινασών (Keese M et al, 2005). Είναι πολύ πιθανό οι τυροσινικές κινάσες αυτής της κατηγορίας να απαιτούν μικρότερες συγκεντρώσεις Imatinib προκειμένου να ανασταλούν. Η υπόθεση αυτή μαζί με τη δεύτερη που αναφέρεται αμέσως παραπάνω, είναι οι δύο πιο πιθανές να συμβαίνουν είτε μαζί είτε η κάθε μία χωριστά.

Τα πειράματα που διενεργήθηκαν με τη χορήγηση Imatinib στην παρούσα διατριβή, απουσία του FBS, θεωρούνται ότι λαμβάνουν χώρα σε περιβάλλον ανεξάρτητο του άξονα PDGF/PDGFR. Το γεγονός αυτό στηρίζεται αφενός στην απουσία PDGF στον ορό καλλιέργειας, και αφετέρου στην απουσία έκφρασης των υποδοχέων του PDGF, όπως αυτό παρουσιάστηκε στο σχετικό πείραμα. Η υπόθεση (γ) που αναφέρθηκε παραπάνω με βάση αυτή τη λεπτομέρεια συμπληρώνεται και επεξηγεί περαιτέρω την ανάγκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων Imatinib σε περιβάλλον καλλιέργειας με FBS. Παρουσία ορού στην καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποιείται και ο άξονας PDGF/PDGFR οπότε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προκειμένου να ανασταλεί απαιτεί αναστολή των λοιπών «αγνώστων» τυροσινικών κινασών καθώς και του γνωστού άξονα PDGF/PDGFR.

Με δεδομένο λοιπόν τον πιθανό πολλαπλό ρόλο που διαδραματίζει η Imatinib στην κυτταρική λειτουργία, η εξαγωγή συμπερασμάτων και η αναγωγή τους απευθείας στον άνθρωπο είναι μάλλον παρακινδυνευμένη. Εντούτοις πρώιμα συμπεράσματα αποτελούν ενδείξεις για περαιτέρω μελέτη τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε επίπεδο πειραματοζώων. Στα πλαίσια αυτής της διαπίστωσης, φαίνεται ότι η Imatinib σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά δεν μπορεί να καταστρέψει το ήδη συσταθέν αγγειακό δίκτυο. Αυτό κλινικά σημαίνει ότι μπορεί να αναστείλει την αγγειογενετική διαδικασία σε επίπεδο δευτεροπαθών εντοπίσεων και να χορηγηθεί ως πρόληψη μετά την εκτομή του πρωτοπαθούς

όγκου. Το αγγειακό όμως δίκτυο του πρωτοπαθούς όγκου – ο οποίος αρκετές φορές διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο – αναμένεται να παραμείνει σταθερό και η κυτταρική μάζα του όγκου αμείωτη, επιβάλλοντας αν μη τι άλλο χειρουργική αντιμετώπιση. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναμένονται να καταστρέψουν και το υπάρχον δίκτυο αυξάνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα πειράματα χρονικής απόκρισης επίσης δίνουν μια εικόνα παρατεταμένης δράσης προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η αναστολή ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού.

Οι συγκεντρώσεις Imatinib που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτής της διατριβής αποδείχτηκε ότι βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές. Η Imatinib αναφέρεται να δρα επί κυττάρων λευχαιμίας (όπως η κυτταρική σειρά K-562) σε συγκεντρώσεις από 0,1  $\mu\text{M}$  έως 7  $\mu\text{M}$  (Zhang P et al, 2003 / Fang G et al, 2000). Στα επιθηλιακά όμως κύτταρα περιγράφονται συγκεντρώσεις σημαντικά μεγαλύτερες της τάξεως των 10  $\mu\text{M}$  έως 40  $\mu\text{M}$  (Zhou L et al, 2003). Τα ενδοθήλια παρόντος του ορού καλλιέργειας φαίνεται ότι συμπεριφέρονται ως επιθηλιακά κύτταρα. Από τον ορό καλλιέργειας φαίνεται να πλησιάζουν τις πειραματικές συγκεντρώσεις που δρουν σε λευχαιμικά κύτταρα. Παραταύτα οι συγκεντρώσεις αυτές είναι αρκετά μεγαλύτερες από αυτές που αναφέρονται στην ανθρώπινη αιματική κυκλοφορία (Peng B et al, 2005). Υπό αυτή την έννοια οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτής της διατριβής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μόνο στην περίπτωση τοπικοπεριοχικής θεραπείας, ήτοι σε ενδοφλέβια χορήγηση με τεχνικές διακοπής κυκλοφορίας (stop-flow). Οι τεχνικές αυτές εξ'ορισμού επιτρέπουν την χορήγηση δόσεων μεγαλύτερης τάξης χωρίς τα συστηματικά προβλήματα των ανεπιθύμητων ενεργειών.

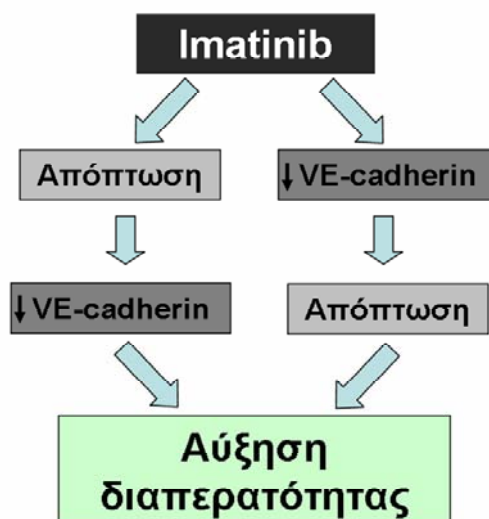
Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν μια ιδιαίτερη επίδραση της Imatinib στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Φάνηκε ότι η Imatinib αλλάζει το σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων από πολυγωνικό σε ατρακτοειδές, ενώ ταυτόχρονα επηρεάστηκε και η μεσοκυττάρια συνοχή. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο πρώτο συμπέρασμα ότι όντως η Imatinib πρέπει να επιδρά στην ενδοθηλιακή διαπερατότητα την οποία πρέπει να αυξάνει δραστικά. Το σχετικό πείραμα έδειξε μια σημαντική αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών μονοστρωμάτων παρουσία της Imatinib. Αυτό πέραν από ερευνητικός στόχος της παρούσας διατριβής, αποκτά και ιδιαίτερη κλινική σημασία. Πιθανή απόδειξη in

νίνο μιας τέτοιας αλλαγής στη διαπερατότητα των αγγείων μπορεί να καταστεί σημαντική στο σχεδιασμό αντινεοπλασματικών σχημάτων. Μέχρι σήμερα ερευνητικές προσπάθειες και κλινικές μελέτες σκοπεύουν στην αύξηση της διενδοθηλιακής διαπερατότητας προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη απόδοση των χορηγούμενων κυτταροστατικών φαρμάκων στον όγκο. Ως γνωστό ο αγγειακός φραγμός δρα ως φυσικό εμπόδιο στην διάχυση του φαρμάκου στην νεοπλασματική μάζα, προκαλώντας πρακτικά μια δράση των χορηγούμενων σχημάτων μόνο περιαγγειακά. Το φαινόμενο αυτό αντιμετωπίστηκε με την αύξηση της χορηγούμενης δόσης με στόχο τη δημιουργία μιας κλίσης συγκέντρωσης μεταξύ αγγείων και εξαγγειακού χώρου/νεοπλάσματος. Πλην όμως αυξημένες δόσεις συνεπάγονται σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες πολλές φορές είναι επικίνδυνες για τη ζωή των ασθενών. Η περιοχική χημειοθεραπεία βελτίωσε αυτή την κατάσταση, καθώς μεγάλες δόσεις δρουν σε κλειστό κύκλωμα κυκλοφορίας και μετά αιμοκαθαίρονται. Ακόμη όμως και σήμερα τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν προβλήματα στεγανότητας με αποτέλεσμα την ατυχή πιθανότητα διαφυγής κυτταροστατικών φαρμάκων στην συστηματική κυκλοφορία και την αντιμετώπιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Προσφάτως υπήρξε η ιδέα συγχορήγησης ουσιών-παραγόντων αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη κατανομή του κυτταροστατικού σχήματος με όσο το δυνατό μικρότερη χορηγούμενη δόση. Προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιήθηκαν γνωστοί παράγοντες με γενικευμένη δράση χαλάρωσης των μεσοκυττάρων δεσμών των ενδοθηλίων. Αναφέρονται προσπάθειες συγχορήγησης – και σχεδιασμού θεραπείας νεοπλασμάτων – με τη χορήγηση του Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α – TNFα ) καθώς και της βραδυκινίνης. Οι ουσίες αυτές όμως έχουν ένα μικρό θεραπευτικό εύρος συγκεντρώσεων δεδομένης της σχεδόν θανατηφόρου συστηματικής αντίδρασης σε περίπτωση υπερδοσολογίας ή διαφυγής. Ως γνωστόν τόσο ο TNFα όσο και η βραδυκινίνη προκαλούν εικόνα σηπτικού σοκ με τον κίνδυνο αποβίωσης λόγω μη αναστρέψιμου πνευμονικού οιδήματος. Η Imatinib φαίνεται να υπόσχεται παρόμοια δράση – αν και απαιτείται παρατεταμένος χρόνος δράσης – χωρίς τους κινδύνους των παραπάνω παρεμβάσεων. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα μελέτης συνδυασμού κλασσικών-συμβατικών αντινεοπλασματικών σχημάτων με την Imatinib ή ακόμη η

συγχορήγηση TNFα ή βραδυκινίνης και της Imatinib με την συγκέντρωση των πρώτων δύο σαφώς πιο ελαττωμένη σε λιγότερο επικίνδυνα επίπεδα.

Η αυξημένη διαπερατότητα σε συνδυασμό με τα ευρήματα της μορφολογίας οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι μεσοκυττάρειες συνδέσεις των ενδοθηλίων θα πρέπει να απουσιάζουν. Προς αυτή την κατεύθυνση αποδείχτηκε ότι η VE-cadherin ελαττώνεται υπο την επίδραση της Imatinib. Το εύρημα αυτό αποδείχτηκε με δύο μεθόδους ανοσοανίχνευσης και φάνηκε ότι θα μπορούσε να συμβαίνει και στις δύο φάσεις της αγγειογένεσης (όπως αυτές αντιπροσωπεύονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καλλιέργεια), αφού τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση της Imatinib, δεν μπορούν να οργανωθούν σε μονόστρωμα, ενώ τα ήδη οργανωμένα μονοστρώματα αποδιοργανώνονται. Μέχρι σήμερα είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ελάττωση της VE-cadherin από την Imatinib, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μελλοντική μελέτη όχι μόνο της σύνθεσης της VE-cadherin αλλά και των λοιπών παραγόντων που την περιστοιχίζουν και τη σταθεροποιούν π.χ κατενίνες.

Η απόδειξη της ενδοθηλιακής απόπτωσης είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται με τη χρήση της ενδοθηλιακής σειράς EA.hy 926. Μέχρι σήμερα η μελέτη της απόπτωσης ως αποτέλεσμα επαγωγής από την Imatinib έχει μελετηθεί σε μοντέλα πειραματοζώων ή σε κυτταρικές σειρές νεοπλασμάτων σε περιβάλλον PDGF (Hwang RF et al, 2003 / Uehara H et al, 2003). Η αιτιολογία της απόπτωσης αναφέρεται να εξαρτάται από τη συμβολή διαφόρων μονοπατιών όπως την ελάττωση του BCL-x (Oetzel C et al, 2000) ή του BCL-x<sub>L</sub> (Fang G et al, 2000), τον άξονα TNF-TRAIL (Nimmanapalli R et al, 2001) και την αυξημένη δραστηριότητα πρωτεασών σερίνης (Okada M et al, 2004). Η απόπτωση στα πειράματα αυτής της διατριβής επισυμβαίνει και σε περιβάλλον απουσίας PDGF,

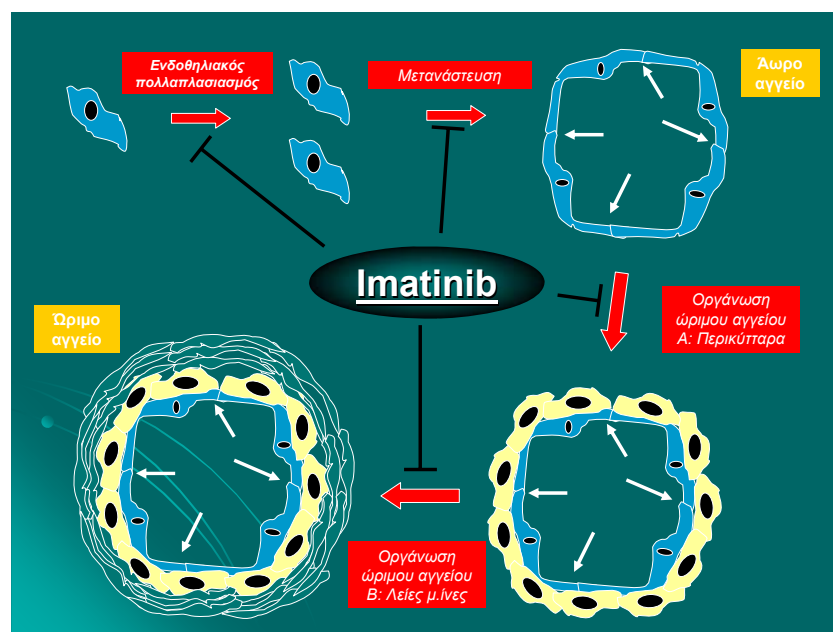


**Εικόνα Η1 :** Παρουσίαση των πιθανών τρόπων με τους οποίους η Imatinib αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα.

στοιχείο το οποίο περιγράφεται πρώτη φορά.

Η απόπτωση αποδείχτηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους, ανιχνεύοντας αλλαγές στο πυρηνικό DNA και στην κυτταρική μεμβράνη. Σημαντικό σημείο, άξιο σχολιασμού, είναι η σχέση της ελάττωσης της VE-cadherin με την απόπτωση. Αναφέρεται ότι η έκφραση της VE-cadherin προστατεύει το ενδοθηλιακό κύτταρο από την απόπτωση (Carmeliet P et al, 1999). Στην προκειμένη περίπτωση γεννάται το ερώτημα κατά πόσον η ελάττωση της VE-cadherin (ως αποτέλεσμα της δράσης της Imatinib) ευθύνεται για την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή εάν η απόπτωση λαμβάνει χώρα μέσω άλλου ανεξάρτητου μηχανισμού και οδηγεί σε δεύτερο χρόνο στην ελάττωση της VE-cadherin και στην αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας. Η απάντηση αυτή παραπέμπει πλέον σε θεμελιώδη ερωτήματα της ενδοθηλιακής φυσιολογίας και αποτελεί σημείο που απαιτεί περαιτέρω μελέτη προκειμένου να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός της αποπτωτικής δράσης της Imatinib επί των ενδοθηλίων.

**Εικόνα Η2:** Σύνοψη όλων των πιθανών λειτουργιών που αναστέλλει η Imatinib. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις εντοπισμού της VE-cadherin η οποία δεν εκφράζεται υπό την επίδραση της Imatinib.



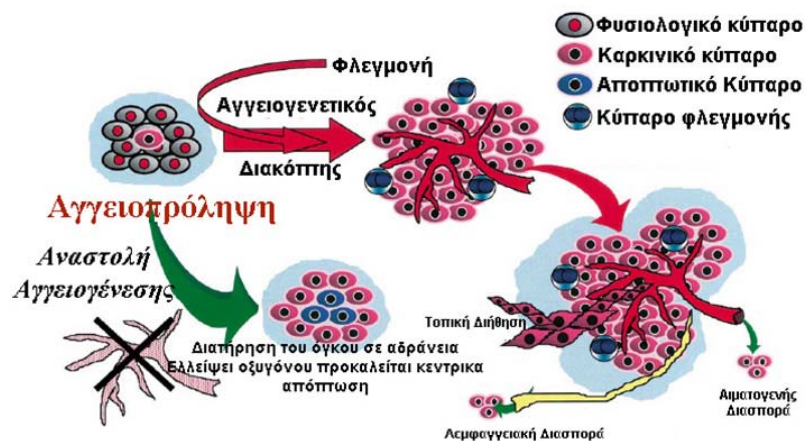
Η αναστολή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων υπο τη δράση της Imatinib αποκάλυψε άλλο ένα πιθανό αντιαγγειογενετικό ρόλο της εν λόγω ουσίας. Προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη δείξει ότι η Imatinib, παρεμβαλλόμενη στην σηματοδότηση του PDGF, αναστέλλει τη περιαγγειακή μετανάστευση των λείων μυικών ινών και έτσι εμποδίζει την οργάνωση νέων αγγείων (Dudley A et al, 2003). Προς την ίδια κατεύθυνση αναφέρεται ότι η

Imatinib επιφέρει και αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των περικυττάρων, εμποδίζοντας την εκ των έξω επένδυση και συνεπώς στεγανοποίηση των πρώιμων μονόστιβων ενδοθηλιακών αγγειακών αυλών (Bergers G et al, 2003). Τα στοιχεία αυτά συνδυαζόμενα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν υπέρ μιας πολλαπλής δράσης της Imatinib τόσο στην πρώιμη όσο και στην όψιμη αγγειογένεση.

### Θ. Προσπάθειες μοριακής παρέμβασης στο μηχανισμό της αγγειογένεσης: παρόν και μέλλον.

Η κατανόηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης καθώς και η επιτυχής χρήση αντι-αγγειογενετικών ουσιών σε πειραματόζωα, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αντιστοιχών κλινικών μελετών. Μέχρι σήμερα πιστεύεται ότι η αντι-αγγειογενετική

θεραπεία δύναται να προσφέρει σημαντικά, δεδομένου του ευρύτερου αντινεοπλασματικού της φάσματος, της ανυπαρξίας ανάπτυξης αντοχής και της ελαττωμένης επίπτω-



**Εικόνα Θ1:** Η θεωρία της αγγειοπρόληψης περιλαμβάνει την αναστολή της αγγειογένεσης και παρεμπόδιση της φλεγμονής προκειμένου ο όγκος να παραμείνει αδρανής και τα κύτταρα του να αποπέσουν (Bissachi D et al, 2003).

σης ανεπιθύμητων ενεργειών. Ο στόχος αυτής της προσέγγισης είναι πέραν των ιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων και κυτταρικά στοιχεία που συμμετέχουν στη διαδικασία, όπως τα λευκά αιμοσφαίρια και οι ινοβλάστες της περιοχής που με τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν, ενισχύουν το αγγειογενετικό μήνυμα (Bisacchi D et al, 2003). Πλεονέκτημα, επίσης, της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας είναι το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ευκολότερα προσπελάσιμα σε σχέση με τον ίδιο τον προς θεραπεία όγκο, δεδομένης της υψηλής ενδο-νεοπλασματικής πίεσης και της ανώμαλης εν γένει αγγείωσης, η οποία δεν επιτρέπει στα αντινεοπλασματικά φάρμακα να προσπελάσουν το σύνολο του όγκου (Alessi P et al, 2004). Καταστροφή του ενδοθηλιακού φραγμού,

υπόσχεται μεγαλύτερη περιαγγειακή διάχυση των αντινεοπλασματικών φαρμάκων και συνεπώς μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

Ο αντικειμενικός σκοπός της αγγειογενετικής θεραπείας είναι διαφορετικός της μέχρι σήμερα λογικής. Η αντιαγγειογενετική παρέμβαση δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη σταθεροποίηση των πρωτοπαθών όγκων και όχι στην εξάλειψή τους. Στο θέμα της εξάλειψης υπερτερεί ακόμη η κλασσική χημειο- και ακτινοθεραπεία (Bisacchi D et al, 2003). Εύλογη είναι λοιπόν η υπόθεση ότι το κλινικό αποτέλεσμα θα είναι καλύτερο σε συνδυασμό των δύο θεραπειών. Προς αυτή την κατεύθυνση απαιτούνται περαιτέρω μοριακές, κυτταρικές και κλινικές μελέτες.

Κατά την παρούσα φάση ήδη βρίσκονται σε κλινική δοκιμή διάφορα αντι-αγγειογενετικά σκευάσματα με διαφορετικούς μοριακούς στόχους (Arbiser JL, 2004 / Sato Y, 2003). Αυτά τα σκευάσματα αν και πολλά υποσχόμενα, στερούνται πλήρους εκλεκτικότητας και εν δυνάμει αναστέλλουν και την αγγειογένεση επί υγιών ιστών (Sato Y, 2003) και ως εκ τούτου απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στον σχεδιασμό και τη χορήγηση των σχημάτων που αυτά τα σκευάσματα συμμετέχουν.

Το μέλλον της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας εξαρτάται από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι η γνώση που αποκτάται επί του πεδίου. Η κατανόηση της αγγειογένεσης, η αναγνώριση νέων υποδοχέων και η αποσαφήνιση της πορείας των ενδοκυττάρων σημάτων, αυξάνουν τα σημεία που αποτελούν δυνητικούς παρεμβατικούς στόχους. Ο δεύτερος παράγοντας είναι η δυνατότητα κλινικής εφαρμογής των μοριακών ανακαλύψεων και ο σχεδιασμός σχημάτων ικανών να εξασφαλίσουν σημαντική επιβίωση μέσω αναστολής της αγγειογένεσης στα σημεία δευτεροπαθούς εμφύτευσης. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η αγγειογένεση των όγκων απαιτεί ταυτόχρονη αναστολή τουλάχιστον σε δυο σημεία για να εξασφαλιστεί η προστασία από την εξέλιξη της νόσου (Sato Y, 2003). Ταυτόχρονα η συγχρόνηση κλασσικών σχημάτων είναι επίσης μια ομάδα μελετών που φαίνεται να ικανοποιεί περισσότερο την ανάγκη θεραπείας του πρωτοπαθούς όγκου. Στην ποικιλότητα των κλινικών εφαρμογών προστίθεται και ο τρόπος χορήγησης της θεραπείας (συστηματικός ή περιοχικός). Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι η αντι-αγγειογενετική θεραπεία διανύει μια πρόιμη-διερευνητική φάση, με ένα μέλλον που θα αποδειχθεί σημαντικό μέσα από μελέτη.



---

## Τα τελικά συμπεράσματα και η σημασία των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης

---

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι μια ξεχωριστή βιολογική οντότητα που συναντάται σε κάθε είδος ιστού, φυσιολογικού ή παθολογικού. Είναι λοιπόν επόμενο να αλληλεπιδρούν τόσο με παρεγχυματικά όσο και με μεσεγχυματικά στοιχεία και να παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη βιολογική ταυτότητα. Στους φυσιολογικούς ιστούς τα ενδοθήλια φαίνεται ότι βρίσκονται «εν υπνώσει». Αντιθέτως, στην περίπτωση του καρκίνου και εν προκειμένω του καρκίνου του μαστού ο οποίος τελικά μελετήθηκε τα ενδοθήλια συμμετέχουν ενεργά στην αγγειογενετική διαδικασία. Η συμμετοχή τους αυτή στην αγγειογένεση τα οδηγεί στην αλλαγή της έκφρασης διαφόρων αγγειακών δεικτών που κατουσιάζουν και κατ'επέκταση χαρακτηρίζουν και το νεόπλασμα με το οποίο συμβιώνουν και αναπτύσσονται.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη είναι μια προσέγγιση ανεύρεσης της ιδιαίτερης μοριακής ταυτότητας των ενδοθηλίων του καρκίνου του μαστού, με στόχο αφενός την ευκολότερη αναγνώριση της περιοχής που εδράζεται το νεόπλασμα, αφετέρου την καλύτερη οριοθέτηση της. Είναι σαφές ότι ενδοθήλια που εκφράζουν τον υποδοχέα PDGFR-β, το μόριο Cox-2, το μόριο CD105 πιθανώς το μόριο ICAM-1 αλλά όχι το μόριο VCAM-1, συμμετέχουν σαφώς στην αγγειογένεση του καρκίνου του μαστού, η οποία και οριοθετεί το νεόπλασμα.

Επιπλέον τα παραπάνω μόρια δεν αποτελούν μόνο δείκτες αναγνώρισης, αλλά και πιθανούς μελλοντικούς στόχους μοριακής θεραπείας. Κι αυτό συμβαίνει διότι πλην του VCAM-1 τα υπόλοιπα μόρια συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων (PDGF, TGFβ) και δύνανται να αποδειχθούν στο μέλλον κλινικής σημασίας με την κατάλληλη μοριακή παρέμβαση.

Εκτός αυτού, η παραπάνω μελέτη προσέφερε και τεχνική βελτίωση στην εκτίμηση της αγγειογένεσης σε ιστολογικές τομές καρκίνου μαστού. Η μέτρηση των CD105 θετικών ενδοθηλίων φαίνεται ότι είναι πιο αξιόπιστη ως μέτρηση αγγειογένεσης σε όγκους αφού συμπεριλαμβάνει μόνο τα ενδοθήλια των νεοπλασμάτων και όχι τα ενδοθήλια εκτός αυτών. Αντιθέτως η χρήση του CD31

ως ενδοθηλιακού δείκτη δημιουργεί πρόβλημα στην διάκριση των ενδοθηλίων γιατί λειτουργεί ως πανδείκτης.

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου του ενδοθηλιακού κυττάρου με τον προσδιορισμό του μορίου p21<sup>Waf1/Cip1</sup> έδωσε ένα νέο τρόπο θεώρησης της αγγειογενετικής διαδικασίας. Είναι η πρώτη φορά μέχρι σήμερα που περιγράφηκε αυτή η ενδοκυττάρια αλλαγή του p21<sup>Waf1/Cip1</sup> τόσο σε κυτταρικό-*in vitro* όσο και σε ιστικό-*in vivo* επίπεδο. Η σημασία του ευρήματος έγκειται στο γεγονός ότι ο εντοπισμός του p21<sup>Waf1/Cip1</sup> σε θέση κλειδί για τον έλεγχο της αγγειογένεσης απαλλάσσει την ερευνητική σκέψη από την ανάγκη ειδικής αναστολής κάθε αγγειογενετικού παράγοντα ξεχωριστά, ο οποίος εμφανίζει και συνέργεια ή αθροιστική δράση με τους υπόλοιπους. Αυτό είναι σημαντικό στην νεοπλασματική αγγειογένεση, όπου τα περισσότερα νεοπλάσματα εκφράζουν πολλούς ταυτόχρονα αγγειογενετικούς παράγοντες όπως VEGF, bFGF, aFGF, PDGF-A, PDGF-B, Ang-1, Ang-2 και άλλους (βλ Εισαγωγή). Όποιος και αν είναι ο αγγειογενετικός επαγωγέας υποχρεωτικά θα οδηγήσει σε ελάττωση το μόριο p21<sup>Waf1/Cip1</sup>.

Επιπλέον η επιτυχής προσπάθεια κατασκευής της υβριδικής πρωτεΐνης TAT-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> είναι η πρώτη προσπάθεια *in vitro* μοριακής αναστολής του παραπάνω φαινομένου. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και η τεχνολογία της κατασκευής TAT υβριδικών πρωτεϊνών δημοσιεύτηκε το 1998, μέχρι σήμερα κανένας από ότι είναι δυνατό να προκύψει από βιβλιογραφική έρευνα, δεν έχει κατασκευάσει την παραπάνω πρωτεΐνη για να ελέγξει τον κυτταρικό κύκλο και δη τον ενδοθηλιακό κυτταρικό κύκλο. Το αποτέλεσμα της πλήρους αναστροφής του αγγειογενετικού μηνύματος είναι πολλά υποσχόμενο. Για αυτό και η έρευνα με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη επεκτάθηκε (τμήμα που δεν περιλαμβάνεται στους στόχους της παρούσας διατριβής) και σε προσπάθεια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων και επιπλέον σχεδιάστηκαν και πρωτόκολλα χορήγησης τόσο της TAT-p21 όσο και αντίστοιχων αδενοϊών σε *in vivo* καρκινικά μοντέλα σε πειραματόζωα με απώτερο στόχο την αναστολή της καρκινικής ανάπτυξης και την παράταση της επιβίωσης τους.

Επίσης η αλλαγή της ενδοθηλιακής διαπερατότητας ήταν και είναι μια πάγια απαίτηση εκείνων που ασχολούνται με την τοπική ή την τοπικοπεριοχική θεραπεία. Η τοπική χημειοθεραπεία από μόνη της παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την συστηματική χορήγηση κυτταροστατικών κυρίως γιατί υψηλές δόσεις κυτταροστατικών φαρμάκων δύνανται να χρησιμοποιηθούν χωρίς την έκταση των συστηματικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Πάγιο εμπόδιο αποτελούσε πάντα ο ενδοθηλιακός φραγμός που συγκρατεί μεγάλη ποσότητα των χορηγούμενων φαρμάκων στον ενδοαγγειακό χώρο. Η Imatinib όπως απέδειξαν τα πειράματά της μελέτης έχει την δυνατότητα να αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα μέσω ελάττωσης της έκφρασης της VE-Cadherin, ενώ δύναται να οδηγήσει τα ενδοθήλια σε απόπτωση. Άξιο λόγου είναι το γεγονός ότι ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί ποιός μηχανισμός από τους δύο (η ελάττωση της VE-Cadherin ή η απόπτωση) προηγείται και ποιός έπεται. Μέχρι σήμερα όμως αναφέρεται μόνο η VE-cadherin προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από απόπτωση. Όποιος από τους δύο και αν είναι ο μηχανισμός, το βέβαιο είναι ότι η ιματινίμη αυξάνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα *in vitro*. Η συγχορήγηση της Μεσυλικής Ιματινίμης με τα σχήματα τοπικής χημειοθεραπείας είναι πολύ πιθανό να καταργήσει αυτό το μηχανικό εμπόδιο μεγιστοποιώντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα των συμβατικών σκευασμάτων. Παρά το ενθαρρυντικά *in vitro* αποτελέσματα απαιτείται και μελλοντικός πειραματικός σχεδιασμός σε πειραματόζωα για την επιβεβαίωση των κυτταρικών ευρημάτων και την ασφαλή πρόταση συγχορήγησης της Imatinib σε θεραπεία καρκίνου του μαστού.

---

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

1. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):548-53.
2. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2964-73.
3. Agrez MV. Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg*. 1996 Dec;66(12):791-8.
4. Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 4;1654(1):39-49.
5. Alevriadou BR. CAMs and Rho small GTPases: gatekeepers for leukocyte transendothelial migration. Focus on "VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Aug;285(2):C250-2
6. Ali S, Kaur J, Patel KD. Intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and regulated on activation normal T cell expressed and secreted are expressed by human breast carcinoma cells and support eosinophil adhesion and activation. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):313-21.
7. Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):8517-23.
8. Arbiser JL. Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Semin Cancer Biol*. 2004 Apr;14(2):81-91.
9. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 1995 Aug 1;92(3):450-6.
10. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol*. 2000 Jan 1;217(1):42-53.
11. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J*. 18: 1223-1234, 1999.
12. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221-8.
13. Asano Y, Ichioka S, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T. Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased blood flow. *Med Biol Eng Comput*. 2005 Jan;43(1):126-30.
14. Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND and Kim KW: Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 19(40):4621-31, 2000.
15. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):584-94.
16. Bar-Eli M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology*. 1999;67(1):12-8.
17. Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem*. 1997 Apr 18;272(16):10382-8
18. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol*. 1994;125:917-28.
19. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol*. 1994 May;125(4):917-28.
20. Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J*. 1997 Apr;11(5):365-73
21. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):638-42.
22. Benjamin L, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125:1591-8.

- 23 . Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998 May;125(9):1591-8.
- 24 . Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003; 111:1287-95.
- 25 . Bhardwaj B, Klassen J, Cossette N, Sterns E, Tuck A, Deeley R, Sengupta S, Elliott B. Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1996 Apr;2(4):773-82.
- 26 . Birdsall HH, Lane C, Ramser MN, Anderson DC. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of mononuclear leukocyte adherence. *J Immunol*. 1992 May 1;148(9):2717-23.
- 27 . Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev*. 2003;27(3):229-38
- 28 . Bischoff J, Brasel C, Kraling B, Vranovska K. E-selectin is upregulated in proliferating endothelial cells in vitro. *Microcirculation*. 1997 Jun;4(2):279-87.
- 29 . Blaschuk OW, Rowlands TM. Cadherins as modulators of angiogenesis and the structural integrity of blood vessels. *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19(1-2):1-5.
- 30 . Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res*. 1998 Sep-Oct;18(5A):3621-8.
- 31 . Bouma-ter Steege JC, Baeten CI, Thijssen VL, Satijn SA, Verhoeven IC, Hillen HF, Wagstaff J, Griffioen AW. Angiogenic profile of breast carcinoma determines leukocyte infiltration. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7171-8.
- 32 . Bourdeau A, Faughnan ME, Letarte M. Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Oct;10(7):279-85.
- 33 . Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992 Feb;114(2):521-32.
- 34 . Bussolino F, Colotta F, Bocchietto E, Guglielmetti A, Mantovani A. Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells. *Int J Clin Lab Res*. 1993;23(1):8-12
- 35 . Byrne GJ, Ghellal A, Iddon J, Blann AD, Venizelos V, Kumar S, Howell A, Bundred NJ. Serum soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 16;92(16):1329-36.
- 36 . Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
- 37 . Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999 23;98:147-57
- 38 . Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999 Jul 23;98(2):147-57.
- 39 . Carnero A, Hannon GJ. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;227:43-55.
- 40 . Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):R788-95.
- 41 . Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):886-93.
- 42 . Chan BM, Elices MJ, Murphy E, Hemler ME. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 4 beta 7 on the human B cell line JY. *J Biol Chem*. 1992 Apr 25;267(12):8366-70.
- 43 . Chang WT, Kang JJ, Lee KY, Wei K, Anderson E, Gotmare S, Ross JA, Rosen GD. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis. A role for the p53 pathway. *J Biol Chem*. 2001 Jan 19;276(3):2221-7.

- 44 . Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14608-13.
- 45 . Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Djemli A, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P. Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 1;10(17):5815-9
- 46 . Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19027-30.
- 47 . Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 1995 Mar 23;374(6520):386-8.
- 48 . Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*. 1999 Mar 15;18(6):1571-83.
- 49 . Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Feb;13(1):75-85
- 50 . Cheng N, Brantley DM, Liu H, Lin Q, Enriquez M, Gale N, Yancopoulos G, Cerretti DP, Daniel TO, Chen J. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Res*. 2002 Nov;1(1):2-11.
- 51 . Chiu JJ, Lee PL, Chen CN, Lee CI, Chang SF, Chen LJ, Lien SC, Ko YC, Usami S, Chien S. Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jan;24(1):73-9.
- 52 . Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, Cotten M, Christofori G. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2000 Dec 15;60(24):7163-9.
- 53 . Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989 Nov;84(5):1470-8. Coqueret O: New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13(2): 65-70, 2003.
- 55 . Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 17;96(17):9815-20.
- 56 . Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Jun;55(6):429-34.
- 57 . Dales JP, Garcia S, Andrac L, Carpentier S, Ramuz O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol*. 2004 May;24(5):1197-204
- 58 . Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jul;9(7):2651-6.
- 59 . Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1161-9.
- 60 . Delavaine L, La Thangue NB. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*. 1999 Sep 23;18(39):5381-92
- 61 . Denkert C, Winzer KJ, Hauptmann S. Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2004 Feb;4(6):428-33.
- 62 . Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1990 Dec;111(6 Pt 2):3129-39.
- 63 . Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett*. 2000 Jul 21;477(3):258-62.
- 64 . Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*. 2003 Sep;47(3):149-61

- 65 . Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engstrom A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3403-11.
- 66 . Dolgilevich S, Zaidi N, Song J, Abe E, Moonga BS and Sun L: Transduction of TAT fusion proteins into osteoclasts and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 299(3): 505-9, 2002.
- 67 . Dormond O, Bezzi M, Mariotti A, Ruegg C. Prostaglandin E2 promotes integrin alpha Vbeta 3-dependent endothelial cell adhesion, rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):45838-46.
- 68 . Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1041-7.
- 69 . Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 31;1471(1):M43-56.
- 70 . Dudley A, Gilbert RE, Thomas D et al. STI-571 inhibits in vitro angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:135–42.
- 71 . Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):984-92.
- 72 . Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., Kumar, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 17, 984–992 (2003)
- 73 . Edwards CP, Champe M, Gonzalez T, Wessinger ME, Spencer SA, Presta LG, Berman PW, Bodary SC. Identification of amino acids in the CD11a I-domain important for binding of the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) *J Biol Chem*. 1995 May 26;270(21):12635-40.
- 74 . el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
- 75 . Elvert G, Lanz S, Kappel A, Flamme I. mRNA cloning and expression studies of the quail homologue of HIF-2alpha. *Mech Dev*. 1999 Sep;87(1-2):193-7
- 76 . Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*. 1998 Jul;111 ( Pt 13):1853-65.
- 77 . Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983 Jun;33(2):389-96.
- 78 . Fang G, Naekyung Kim C, Perkins CL, et al. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl–positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 2000; 96:2246-53.
- 79 . Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999 Jul;77(7):527-43.
- 80 . Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. 1999 Sep;56(3):794-814. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:1-30. Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J*. 2000 Apr;6 Suppl 2:S134-41.
- 83 . Fife RS, Stott B, Carr RE. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cancer cells in vitro. *Cancer Biol Ther*. 2004 Feb;3(2):228-32.
- 84 . Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989 May 4;339(6219):58-61.
- 85 . Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8
- 86 . Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):66-70. Fotedar R, Brickner H, Saadatmandi N, Rousselle T, Diederich L, Munshi A, Jung B, Reed JC, Fotedar A. Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene*. 1999 Jun 17;18(24):3652-8.
- 88 . Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 1998 Sep 18;94(6):715-25
- 89 . Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2818-23.
- 90 . Gartel AL and Tyner AL: The role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther J*: 639–649, 2002.



- 91 . Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002 Jun;1(8):639-49.
- 92 . George D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin Oncol.* 2001; 28:5 Suppl 17:27-33.
- 93 . Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30336-43. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* 1972 Aug 1;136(2):261-76.
- 95 . Gospodarowicz D, Abraham JA, and Schilling J. Isolation and characterization of a vascular cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7311–7315, 1989.
- 96 . Gougos A, Letarte M. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol.* 1988 Sep 15;141(6):1934-40.
- 97 . Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol.* 1988 Sep 15;141(6):1925-33.
- 98 . Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1743-53.
- 99 . Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature.* 1994 Feb 10;367(6463):532-8.
- 100 . Greco A, Roccato E, Miranda C, Cleris L, Formelli F, Pierotti MA. Growth-inhibitory effect of STI571 on cells transformed by the COL1A1/PDGFB rearrangement, *Int. J. Cancer* 2001;92:354–360.
- 101 . Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):29197-209.
- 102 . Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):345-57.
- 103 . Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6):1144-55.
- 104 . Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- 105 . Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- 106 . Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494):257-61.
- 107 . Harada H, Hiraoka M and Kizaka-Kondoh S: Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 62(7): 2013-8, 2002.
- 108 . Hart PJ, Deep S, Taylor AB, Shu Z, Hinck CS, Hinck AP. Crystal structure of the human TbetaR2 ectodomain--TGF-beta3 complex. *Nat Struct Biol.* 2002 Mar;9(3):203-8.
- 109 . Healy AM, Herman IM. Density-dependent accumulation of basic fibroblast growth factor in the subendothelial matrix. *Eur J Cell Biol.* 1992 Oct;59(1):56-67.
- 110 . Healy AM, Herman IM. Preparation of fluorescent basic fibroblast growth factor: localization in living retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res.* 1992 Nov;55(5):663-9.
- 111 . Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Ziegler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood.* 2000;96:925-32.
- 112 . Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316.
- 113 . Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999 Jun;126(14):3047-55.
- 114 . Hession C, Moy P, Tizard R, Chisholm P, Williams C, Wysk M, Burkly L, Miyake K, Kincade P, Lobb R. Cloning of murine and rat vascular cell adhesion molecule-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Feb 28;183(1):163-9.
- 115 . Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyj S, Lobb R, Osborn L. Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):6682-5.

- 116 . Hingorani R, Bi B, Dao T, Bae Y, Matsuzawa A, Crispe IN. CD95/Fas signaling in T lymphocytes induces the cell cycle control protein p21<sup>cip-1</sup>/WAF-1, which promotes apoptosis. *J Immunol.* 2000 Apr 15;164(8):4032-6.
- 117 . Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, Johnson HM, Subramaniam PS. IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J Interferon Cytokine Res.*(1999)Dec;19(12):1351-61.
- 118 . Hockel M, Sasse J, Wissler JH. Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes, and "tube formation" but not proliferation of capillary endothelial cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1987 Oct;133(1):1-13.
- 119 . Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 1999 Sep 20;18(38):5356-62.
- 120 . Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995 Feb;1(2):149-53.
- 121 . Hordijk PL, Anthony E, Mul FP, Rientsma R, Oomen LC, Roos D. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 ( Pt 12):1915-23.
- 122 . Hsu SL, Chen MC, Chou YH, Hwang GY, Yin SC. Induction of p21(CIP1/Waf1) and activation of p34(cdc2) involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp Cell Res.* 1999 Apr 10;248(1):87-96.
- 123 . Huang MJ, Osborn L, Svahn J, Schiffer SB, Eliseo L, Zhou LJ, Rhynhart K, Benjamin CD, Freedman AS. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 by follicular dendritic cells. *Leuk Lymphoma.* 1995 Jul;18(3-4):259-64.
- 124 . Huang Z, Bao SD. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2004 Feb 15;10(4):463-70.
- 125 . Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:6534-44.
- 126 . Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):918-21.
- 127 . Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673-87.
- 128 . Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, Besancon F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene.* 2000 Jan 6;19(1):61-8.
- 129 . Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):345-57.
- 130 . Kammerer S, Roth RB, Reneland R, Marnellos G, Hoyal CR, Markward NJ, Ebner F, Kiechle M, Schwarz-Boeger U, Griffiths LR, Ulbrich C, Chrobok K, Forster G, Praetorius GM, Meyer P, Rehbock J, Cantor CR, Nelson MR, Braun A. Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):8906-10.
- 131 . Kang KH, Kim WH, Choi KH. p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;253(2):403-12.
- 132 . Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):240-6.
- 133 . Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Feb 29;351(1336):127-34.
- 134 . Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* 1999 Nov;126(21):4895-902.
- 135 . Keese M, Magdeburg RJ, Herzog T et al. Imaging epidermal growth factor receptor in human colorectal cancer cells and human tissues. *J Biol Chem* 2005; 280:27826-31.
- 136 . Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):15099-103.
- 137 . Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7788-95.
- 138 . Kim HS, Cho HJ, Cho HJ, Park SJ, Park KW, Chae IH, Oh BH, Park YB and Lee MM: The essential role of p21 in radiation-induced cell cycle arrest of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 37(4):871-80, 2004.

- 139 . Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841-4.
- 140 . Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem*. 2002 Aug 2;277(31):27872-9.
- 141 . Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res*. 2000 Oct 1;60(19):5410-3.
- 142 . Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):189-97.
- 143 . Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, Yasui W, Mukaida N, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer*. 1999 Oct;81(4):647-53.
- 144 . Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol*. 1998 Apr 23;8(9):529-32.
- 145 . Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest*. 1992 Nov;67(5):596-607.
- 146 . Kondo S, Barna BP, Kondo Y, Tanaka Y, Casey G, Liu J, Morimura T, Kaakaji R, Peterson JW, Werbel B, Barnett GH. WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene*. 1996 Sep 19;13(6):1279-85.
- 147 . Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994 Aug 12;265(5174):956-9.
- 148 . Kostler WJ, Tomek S, Brodowicz T, Budinsky AC, Flamm M, Hejna M, Krainer M, Wiltshcke C, Zielinski CC. Soluble ICAM-1 in breast cancer: clinical significance and biological implications. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Nov;50(9):483-90.
- 149 . Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis*. 1999 May;17(3):183-92.
- 150 . Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res*. 1997 Sep 1;57(17):3852-9.
- 151 . Kumar P, Amin MA, Harlow LA, Polverini PJ, Koch AE. Src and phosphatidylinositol 3-kinase mediate soluble E-selectin-induced angiogenesis. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3960-8.
- 152 . Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):856-61.
- 153 . Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci*. 2002 Nov 22;72(1):23-34.
- 154 . Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod*. 2005 Aug;73(2):374-81.
- 155 . Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, Lopez LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabeu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*. 1996 Jun;133(5):1109-21.
- 156 . Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Oct;12(5):634-40.
- 157 . Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K and Haglund C: p27 expression correlates with short-term, but not with long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 67(1):15-22, 2001.
- 158 . Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.
- 159 . Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2000 Jan;14(1):55-64.
- 160 . Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999 May 28;284 (5419):1534-7.
- 161 . Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene*. 2003 Mar 13;22(10):1501-10.

- 162 . Li WW, Fan J, Hochhauser D, Bertino JR. Overexpression of p21waf1 leads to increased inhibition of E2F-1 phosphorylation and sensitivity to anticancer drugs in retinoblastoma-negative human sarcoma cells. *Cancer Res.* 1997 Jun 1;57(11):2193-9
- 163 . Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000 May;2(5):302-9
- 164 . Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene.* 1999 May 20;18(20):3166-72.
- 165 . Lincet H, Poulain L, Remy JS, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, Staedel C. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000 Dec 8;161(1):17-26.
- 166 . Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997 Jul 11;277(5323):242-5.
- 167 . Ling S, Dai A, Williams MRI, Myles K, Dilley RJ, Komesaroff PA, Sudhir A. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells. *Endocrinology* 2002; 143:1119-1125.
- 168 . Liu S, Bishop WR and Liu M: Differential effects of cell cycle regulatory protein p21<sup>WAF1/Cip1</sup> on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 6: 183–195, 2003.
- 169 . Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 2003 Aug;6(4):183-95.
- 170 . Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11205-10.
- 171 . Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1194-201.
- 172 . Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):670-7.
- 173 . Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997 Jul 4;277(5322):55-60.
- 174 . Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3658-61.
- 175 . Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):337-76.
- 176 . Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1) - deficient mice. *Cancer Res.* 2001 Aug 15;61(16):6234-8.
- 177 . Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1306-11.
- 178 . McClelland RA, Gee JM, O'Sullivan L, Barnes DM, Robertson JF, Ellis IO and Nicholson RI: p21(WAF1) expression and endocrine response in breast cancer. *J Pathol* 188(2):126-32, 1999.
- 179 . McGary EC, Weber K, Mills L et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3584-91.
- 180 . Meng H, Marchese MJ, Garlick JA, Jelaska A, Korn JH, Gailit J, Clark RA, Gruber BL. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol.* 1995 Dec;105(6):789-96.
- 181 . Merwin JR, Newman W, Beall LD, Tucker A, Madri J. Vascular cells respond differentially to transforming growth factors beta 1 and beta 2 in vitro. *Am J Pathol.* 1991 Jan;138(1):37-51.
- 182 . Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999 Jan 15;18(2):363-74.

- 183 . Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, Anract P, Cantagrel A, Cattan P, Reimund JM, Aguilar L, Amalric F, Girard JP A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol.* 2005 Jul;206(3):260-8.
- 184 . Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* 1999 Nov 18;402(6759):309-13.
- 185 . Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B and Loning T: Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 67(1):61-70, 2001.
- 186 . Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A, Strawn LM. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.* 1996 Apr 1;56(7):1615-20.
- 187 . Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(6):2260-8.
- 188 . Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* 2003 Mar;94(3):230-4.
- 189 . Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, and Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7297-7301, 1986.
- 190 . Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 2002 Mar;160(3):985-1000.
- 191 . Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7192-7.
- 192 . Myoken Y, Kan M, Sato GH, McKeenan WL, Sato JD. Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites. *Exp Cell Res.* 1990 Dec;191(2):299-304.
- 193 . Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira-Smith OM, Smith JR. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO J.* 1995 Feb 1;14(3):555-63.
- 194 . Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H, Louvrou A Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol.* 2002 Sep;33(9):863-70.
- 195 . Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Feb;4(1):3-8.
- 196 . Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1023-9.
- 197 . Niculescu 3rd, AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C and Reed SI: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* 18: 629-643, 1998.
- 198 . Nimmanapalli R, Porosnicu M, Nguyen D, et al. Cotreatment with STI-571 enhances Tumor Necrosis Factor a-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or Apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells *Clin Cancer Res* 2001; 7:350-7.
- 199 . Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res.* 1994 Mar;211(1):90-8.
- 200 . Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* 2000 Nov;113 ( Pt 22):3897-905.
- 201 . Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):570-3.
- 202 . O'Dwyer ME, Druker BJ. STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Lancet Oncol.* 2000;1:207-11.
- 203 . Oetzel C, Jonuleit T, Gotz A, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148 (ST1 571) induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells by down-regulating BCL-X. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1958-68.

- 204 . Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2626-31.
- 205 . O'Hanlon DM, Fitzsimons H, Lynch J, Tormey S, Malone C, Given HF. Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2002 Nov;38(17):2252-7.
- 206 . Okada M, Adachi S, Imai T et al. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood* 2004; 103:2299-307.
- 207 . Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT. Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol*. 2002 Apr;167(4):1836-43.
- 208 . Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2576-81.
- 209 . Ozaki K and Hanazawa S: Porphyromonas gingivalis fimbriae inhibit caspase-3 mediated apoptosis of monocytic THP-1 cells under growth factor deprivation via extracellular signal-regulated kinase-dependent expression of p21<sup>CIP1/WAF1</sup>. *Infect. Immun*. 69: 4944-4950, 2001.
- 210 . Ozawa S, Shinohara H, Kanayama HO, Bruns CJ, Bucana CD, Ellis LM, Davis DW, Fidler IJ. Suppression of angiogenesis and therapy of human colon cancer liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. *Neoplasia*. 2001 Mar-Apr;3(2):154-64.
- 211 . Palman C, Bowen-Pope DF, Brooks JJ. Platelet-derived growth factor receptor (beta-subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest*. 1992 Jan;66(1):108-15.
- 212 . Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 May;282(5):C947-70.
- 213 . Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet*. 2005; 44:879-94
- 214 . Pines J. Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ*. 1991 Jun;2(6):305-10.
- 215 . Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1997 Mar 14;272(11):7151-8.
- 216 . Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):165-97.
- 217 . Prabhu NS, Somasundaram K, Tian H, Enders GH, Satyamoorthy K, Herlyn M, El-Deiry WS. The administration schedule of cyclin-dependent kinase inhibitor gene therapy and etoposide chemotherapy is a major determinant of cytotoxicity. *Int J Oncol*. 1999 Aug;15(2):209-16.
- 218 . R.Kurzrock,H.M.Kantarjian,B.J.Druker,M.Talpaz, Philadelphia chromosome-positive leukemias : from basic mechanisms to molecular therapeutics, *Ann.Int.Med*. 138 (2003)819-830
- 219 . Rahman A, Bando M, Kefer J, Anwar KN, Malik AB. Protein kinase C-activated oxidant generation in endothelial cells signals intercellular adhesion molecule-1 gene transcription. *Mol Pharmacol*. 1999 Mar;55(3):575-83.
- 220 . Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*. 1995 Aug 1;9(15):1831-45.
- 221 . Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*. 1999 Dec;66(6):876-88.
- 222 . Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2005 May;26(5):943-50.
- 223 . Ruegg C, Dormond O, Mariotti A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 4;1654(1):51-67.
- 224 . Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):43799-808
- 225 . Sasamura H, Takahashi A, Miyao N, Yanase M, Masumori N, Kitamura H, Itoh N, Tsukamoto T. Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2002 Mar 4;86(5):768-73.
- 226 . Sato Y. Molecular diagnosis of tumor angiogenesis and anti-angiogenic cancer therapy. *Int J Clin Oncol*. 2003 Aug;8(4):200-6.
- 227 . Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):785-91.

- 228 . Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 10;23(8):1782-90.
- 229 . Schondorf T, Gohring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rutzel S, Rein DT, Ulrich U, Fechteler R, Bersch A, Mallmann P and Valter MM: High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of primary breast cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis. *Pathobiology* 71(4): 217-22
- 230 . Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A and Dowdy SF: In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285(5433): 1569-72, 1999.
- 231 . Schwarze SR, Hruska KA and Dowdy SF: Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* 10(7):290-5, 2000.
- 232 . Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13612-7.
- 233 . Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.
- 234 . Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6. Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA. Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene*. 1994 Dec;9(12):3407-15.
- 236 . Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12
- 237 . Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995 May 15;9(10):1149-63.
- 238 . Shibata MA, Yoshidome K, Shibata E, Jorcyk CL, Green JE. Suppression of mammary carcinoma growth in vitro and in vivo by inducible expression of the Cdk inhibitor p21. *Cancer Gene Ther*. 2001 Jan;8(1):23-35.
- 239 . Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1994 May;51(2):209-20.
- 240 . Simiantonaki N, Jayasinghe C, Kirkpatrick CJ. Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in vitro. *Exp Mol Pathol*. 2002 Aug;73(1):46-53.
- 241 . Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res*. 2002 Nov;108(1):173-9.
- 242 . Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res*. 1999 Oct;5(10):2726-34.
- 243 . Slish JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8529-33.
- 244 . Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):735-45.
- 245 . Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev*. 1994 Aug 15;8(16):1888-96.
- 246 . Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA, Kauffman HF. Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. *Eur Respir J*. 1999 Oct;14(4):759-66.
- 247 . Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J*. 1998 Apr;11(4):949-57.
- 248 . Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*. 1995 Jul 1;92(1):11-4.
- 249 . Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1171-80.
- 250 . Tei K, Kawakami-Kimura N, Taguchi O, Kumamoto K, Higashiyama S, Taniguchi N, Toda K, Kawata R, Hisa Y, Kannagi R. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by

- cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6289-96.
- 251 . Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, and Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101:2330-2334, 1985.
  - 252 . Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1:434-440, 1987.
  - 253 . Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1999 Dec 24;286(5449):2511-4.
  - 254 . Tsao YP, Huang SJ, Chang JL, Hsieh JT, Pong RC, Chen SL. Adenovirus-mediated p21(WAF1/SDI1/CIP1) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4983-90.
  - 255 . Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB J.* 2002 Sep;16(11):1361-70.
  - 256 . Uehara H, Kim SJ, Karashima T et al. Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:458-70.
  - 257 . Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992 Dec;153(3):557-62.
  - 258 . van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996 Jan;74(1):13-33
  - 259 . van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J. Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology.* 1995 Nov;22(5):1538-46.
  - 260 . Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999 Jun;9(3):211-20
  - 261 . Verdegaal EM, Beekhuizen H, Blokland I, van Furth R. Increased adhesion of human monocytes to IL-4-stimulated human venous endothelial cells via CD11/CD18, and very late antigen-4 (VLA-4)/vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-dependent mechanisms. *Clin Exp Immunol.* 1993 Aug;93(2):292-8.
  - 262 . Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol.* 2004 Jan;202(1):5-13.
  - 263 . Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002 Aug;38(12):1564-79
  - 264 . Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med.* 1998 Sep 21;188(6):1039-46.
  - 265 . Volpert OV, Pili R, Sikder HA, Nelius T, Zaichuk T, Morris C, Shiflett CB, Devlin MK, Conant K, Alani RM. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell.* 2002 Dec;2(6):473-83.
  - 266 . Vrekoussis T, Stathopoulos EN, Kafousi M, Darivianaki A, Zoras O. Establishment of a new co-culture model using negatively-charged slides. *In Vivo.* 2004 Jul-Aug;18(4):471-6.
  - 267 . Vrekoussis T, Stathopoulos EN, Kafousi M, Saridaki Z, Sanidas E, Zoras O. Endothelial p21(WAF1/Cip1) cell cycle inhibitor is down-regulated in breast cancer. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):2743-8.
  - 268 . Wakasugi E, Kobayashi T, Tamaki Y, Ito Y, Miyashiro I, Komoike Y, Takeda T, Shin E, Takatsuka Y, Kikkawa N, Monden T and Monden M: p21 (Waf1/Cip1) and p53 expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 107(6): 684-91, 1997.
  - 269 . Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994 Oct 28;269(43):26988-95.
  - 270 . Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS. A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol.* 1995 Mar 1;5(3):275-82.
  - 271 . Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, Ajioka I and Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/ VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* 14: 2025-2032, 1997.



- 272 . Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999 Dec 20;18(55):7908-16.
- 273 . Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1589-94.
- 274 . Wintersa ZE, Hunt NC, Bradburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL and Norburya CJ: Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21WAF1/CIP1 in breast cancer: association with prognosis. *Eur J Cancer* 37: 2405–2412, 2001.
- 275 . Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw*. 2004 Apr-Jun;15(2):91-8.
- 276 . Worthylake RA, Burr ridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Oct;13(5):569-77.
- 277 . Wu QD, Wang JH, Condr on C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Apr;280(4):C814-22.
- 278 . Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):701-4.
- 279 . Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*. 1992 Oct 30;71(3):505-14.
- 280 . Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
- 281 . Yang F, von Knethen A, Brune B. Modulation of nitric oxide-evoked apoptosis by the p53-downstream target p21(WAF1/CIP1). *J Leukoc Biol*. 2000 Dec;68(6):916-22.
- 282 . Yang Y, Ballatori N and Smith HC; Apolipoprotein B mRNA editing and reduction in synthesis and secretion of the atherogenic risk factor Apolipoprotein B100 can be effectively targeted through TAT-mediated protein transduction. *Mol Pharm* 61(2): 269-276, 2002.
- 283 . Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1957-63.
- 284 . Zetter BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*. 1993 Aug;4(4):219-29
- 285 . Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW, Hartle DK. Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis*. 2002 Apr;161(2):381-6.
- 286 . Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*. 1994 Aug 1;8(15):1750-8.
- 287 . Zhang H, Hannon GJ, Casso D, Beach D. p21 is a component of active cell cycle kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:21-9.
- 288 . Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell*. 1993 Sep;4(9):897-906.
- 289 . Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Mol Cancer* 2003; 2:1.
- 290 . Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE. A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis*. 2002;5(1-2):35-44.
- 291 . Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*. 1999 Feb 4;18(5):1131-8.
- 292 . Zhou L, An N, Haydon RC et al Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the b-catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003; 193:163-70.

---

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

---

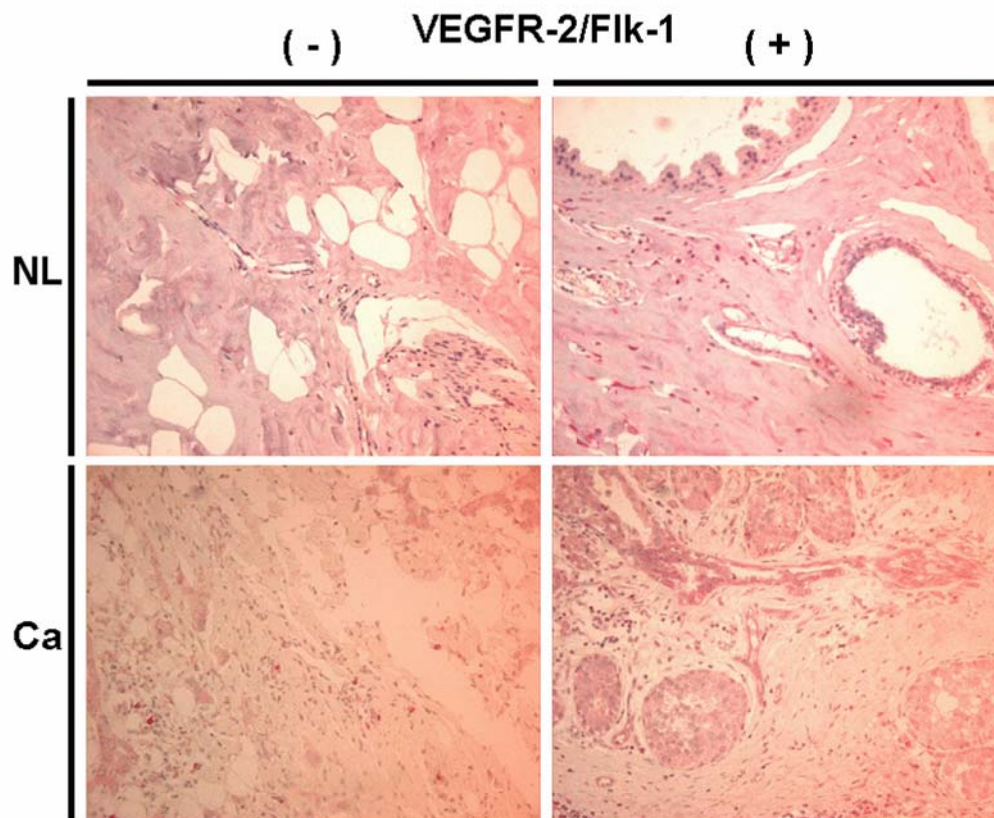
**Παράρτημα Α:** Α1. Πίνακας με τους κωδικούς αριθμούς των περιστατικών και τη συσχέτιση τους με τον αύξοντα αριθμό που χρησιμοποιήθηκε στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων

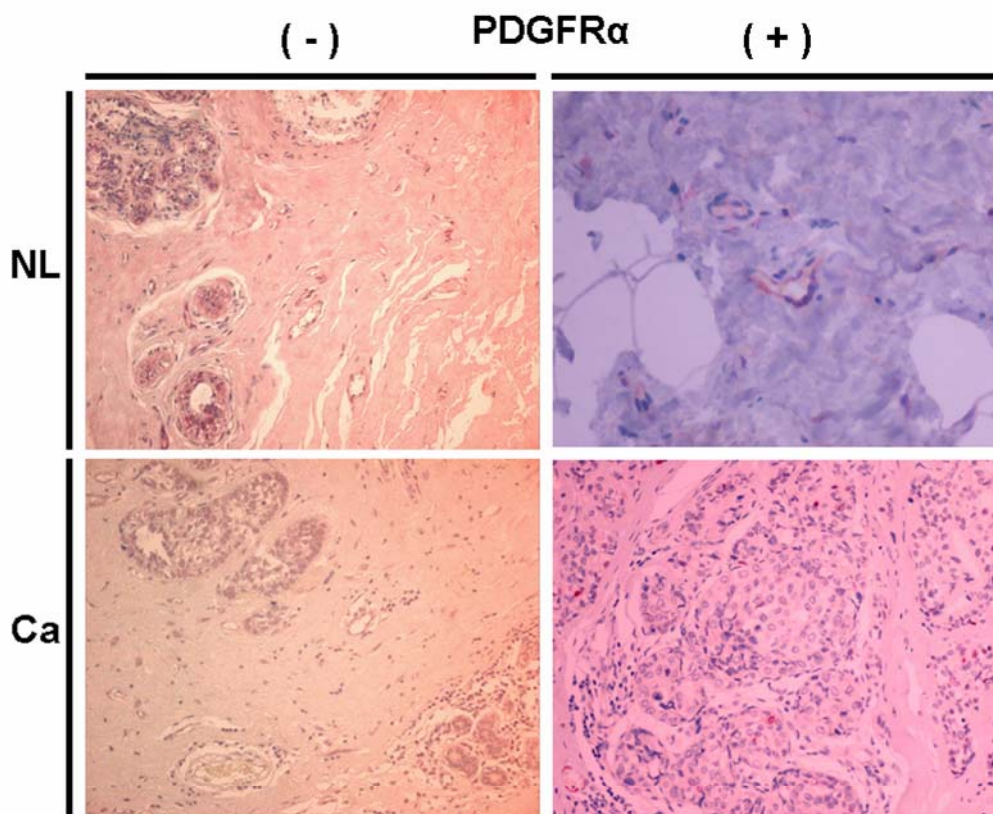
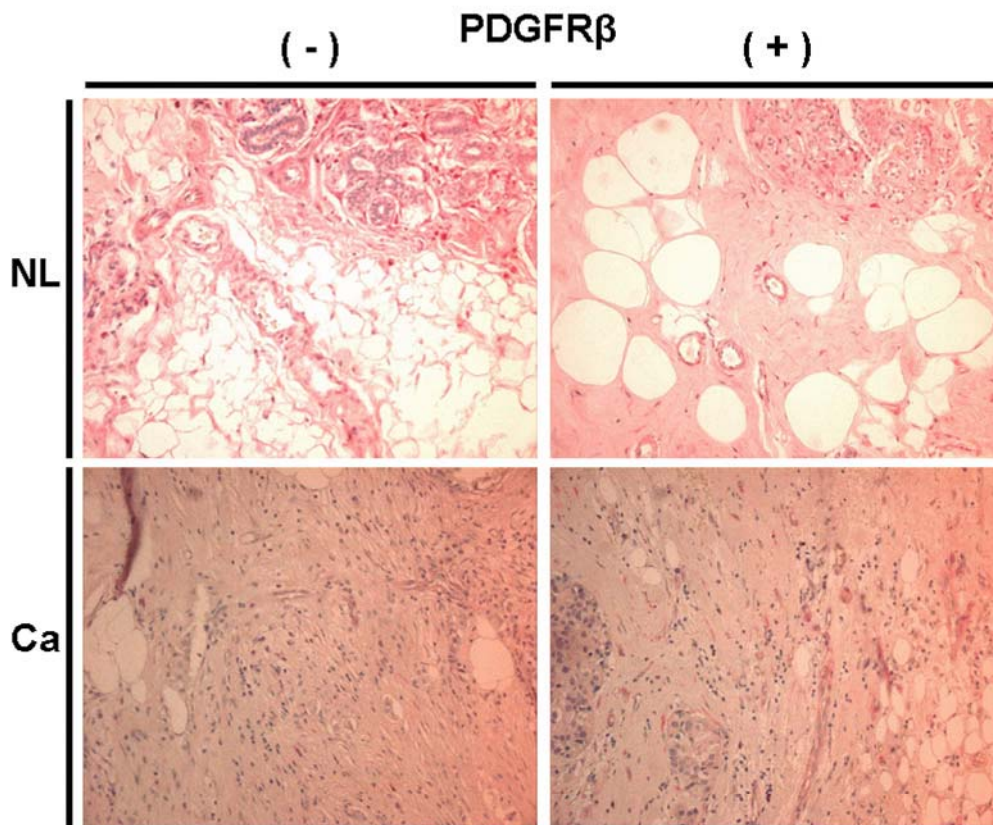
A/A	Κωδικός				A/A	Κωδικός	
1	67866	NL	A	A	1	76899	Ca
2	80853	NL	A	A	2	65559	Ca
3	49422	NL	A	A	3	31696	Ca
4	79732	NL	A	A	4	78459	Ca
5	53304	NL	A	A	5	65338	Ca
6	60225	NL	A	A	6	69732	Ca
7	56256	NL	A	A	7	30790	Ca
8	49320	NL	A	A	8	71316	Ca
9	52736	NL	A	A	9	77154	Ca
10	50411	NL	A	A	10	29993	Ca
11	53654	NL	A	A	11	64954	Ca
12	62255	NL	A	A	12	65006	Ca
13	76274	NL	A	A	13	60644	Ca
14	68640	NL	A	A	14	67663	Ca
15	60234	NL	A	A	15	67340	Ca
16	62121	NL	A	A	16	76434	Ca
17	61922	NL	A	A	17	71888	Ca
18	73849	NL	A	A	18	32239	Ca
19	69858	NL	A	A	19	75295	Ca
20	70078	NL	A	A	20	65009	Ca
21	71091	NL	A	A	21	69518	Ca
22	68766	NL	A	A	22	30643	Ca
23	77136	NL	A	A	23	67113	Ca
24	79230	NL	A	A	24	32809	Ca
25	76583	NL	A	A	25	62326	Ca
26	76683	NL	A	A	26	33084	Ca
27	72910	NL	A	A	27	60988	Ca
28	60650	NL	A	A	28	58598	Ca
29	64956	NL	A	A	29	77305	Ca
30	80881	NL	A	A	30	74611	Ca
31	79763	NL	B	A	31	74467	Ca
32	79722	NL	B	A	32	73385	Ca
33	74612	NL	B	A	33	32784	Ca
34	28978	NL	B	B	34	75651	Ca
35	17616	NL	B	B	35	75924	Ca
36	15779	NL	B	B	36	77206	Ca
37	53897	NL	B	B	37	33060	Ca
38	80094	NL	B	B	38	32576	Ca
39	53092	NL	B	B	39	75995	Ca
40	62328	NL	B	B	40	75159	Ca
41	74524	NL	B	B	41	79087	Ca
42	49018	NL	B	B	42	72443	Ca
43	71167	NL	B	B	43	78164	Ca
				B	44	65739	Ca

NL: Φυσιολογικός ιστός, Ca: Καρκίνος μαστού, A: αφορά τις ομάδες μελέτης πλην του p21, A&B: αφορά το p21

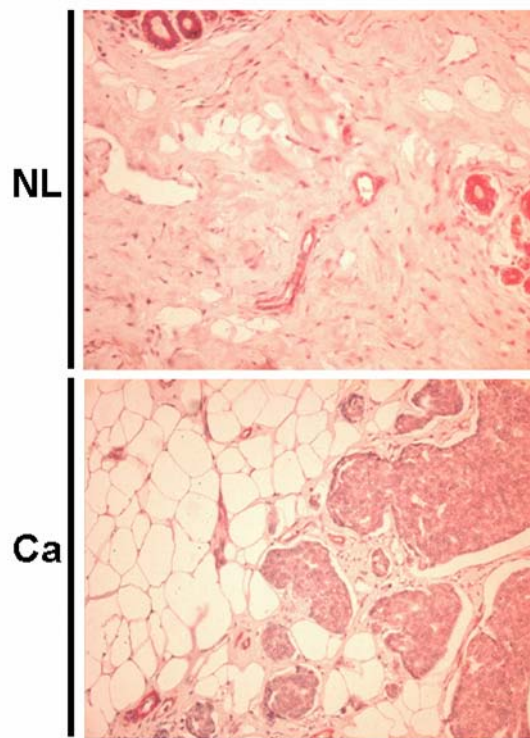
**Παράρτημα Β:** Μικροφωτογραφίες από αντιπροσωπευτικά ιστολογικά δείγματα, όπως αυτά περιγράφηκαν στα «Αποτελέσματα». Πρόκειται για ιστολογικές τομές περιστατικών φυσιολογικών μαστών και περιστατικών καρκίνου του μαστού που υπεβλήθησαν σε ανοσοϊστοχημική αντίχνευση για τα μόρια που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη. Αναφέρεται το είδος του ιστού (NL: Φυσιολογικός μαστός, Ca: Καρκίνος του μαστού) και εάν το περιστατικό κρίνεται θετικό (+) ή αρνητικό (-) για την εν λόγω χρώση.

**B1. Αγγειογενετικοί υποδοχείς**



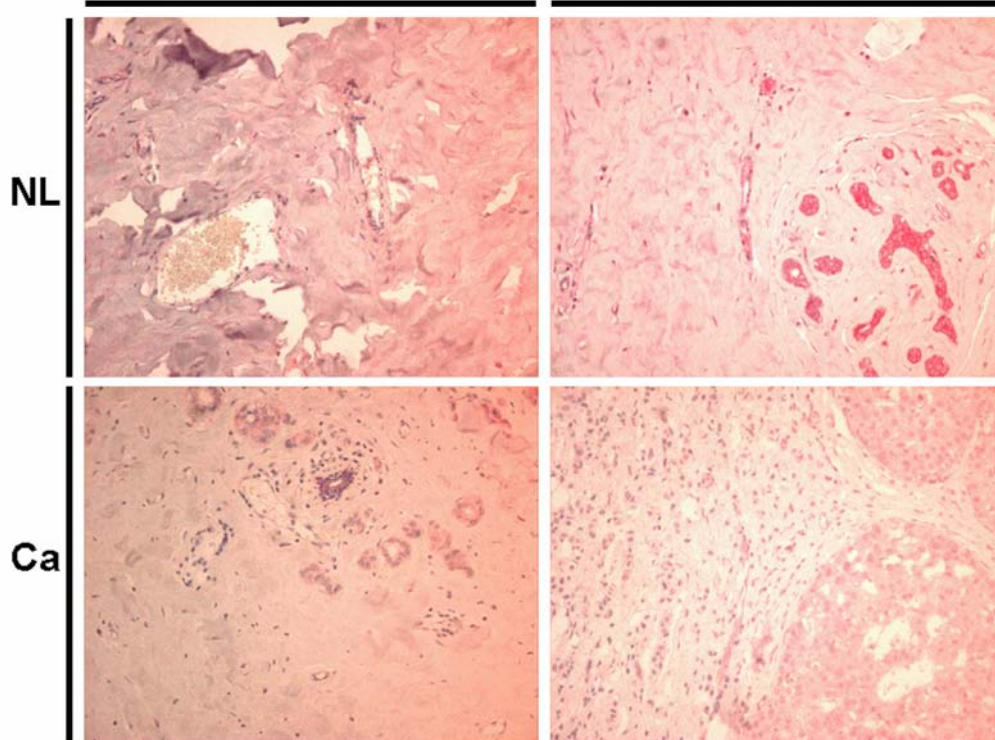


**VEGFR-1/Flt-1  
(+)**

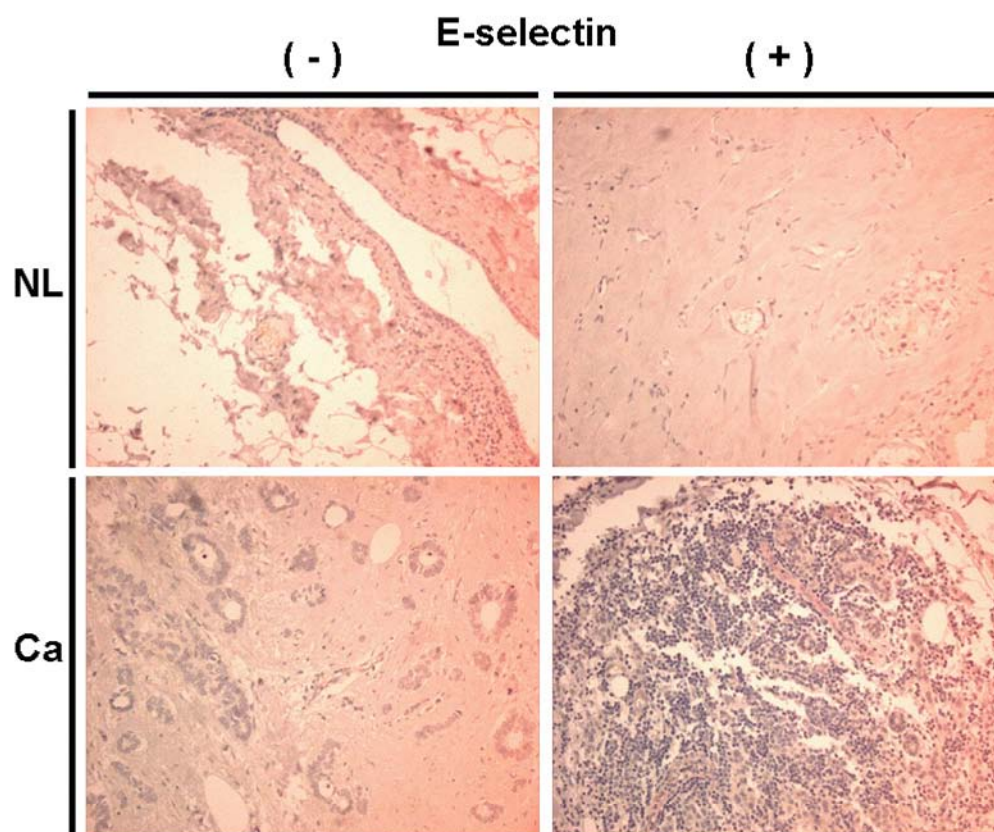
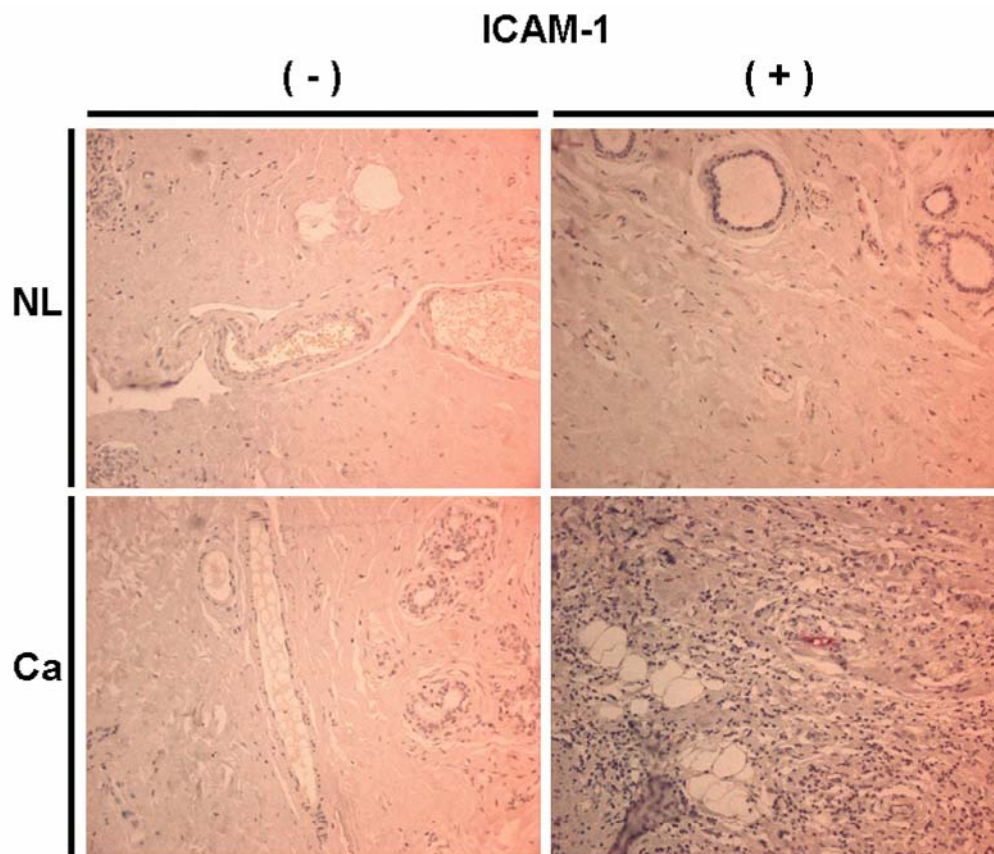


**B2.**

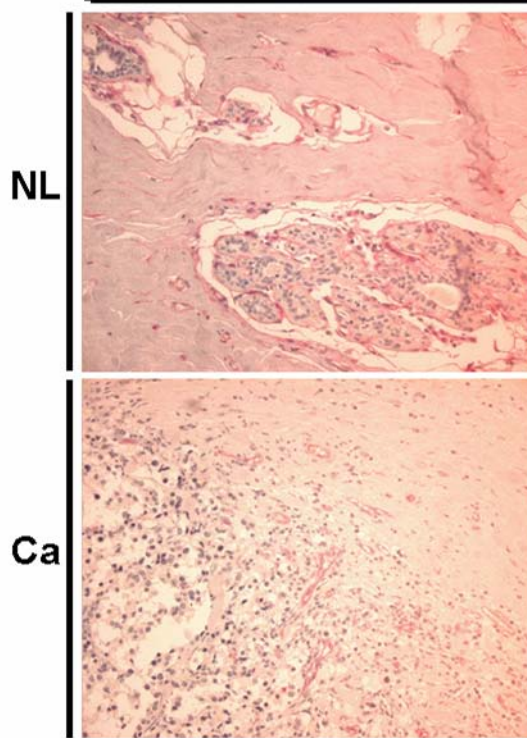
**Cyclooxygenase-2  
(Cox-2)**  
(-) (+)



### B3. Μόρια προσκόλλησης

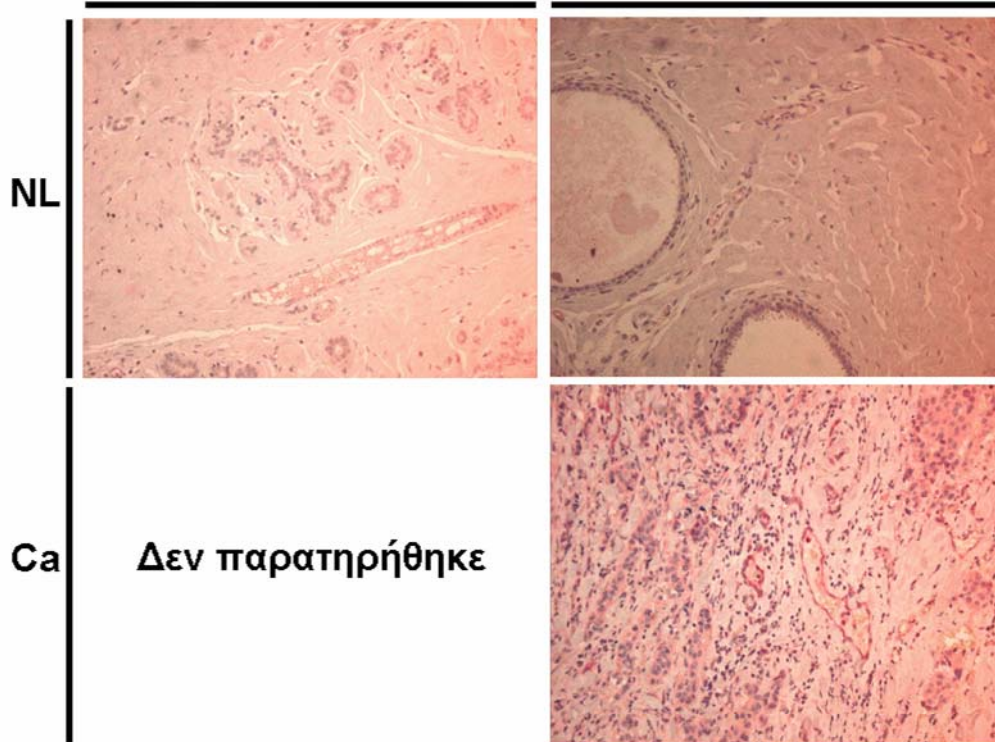


**VCAM-1/CD106  
(+)**



**B4.**

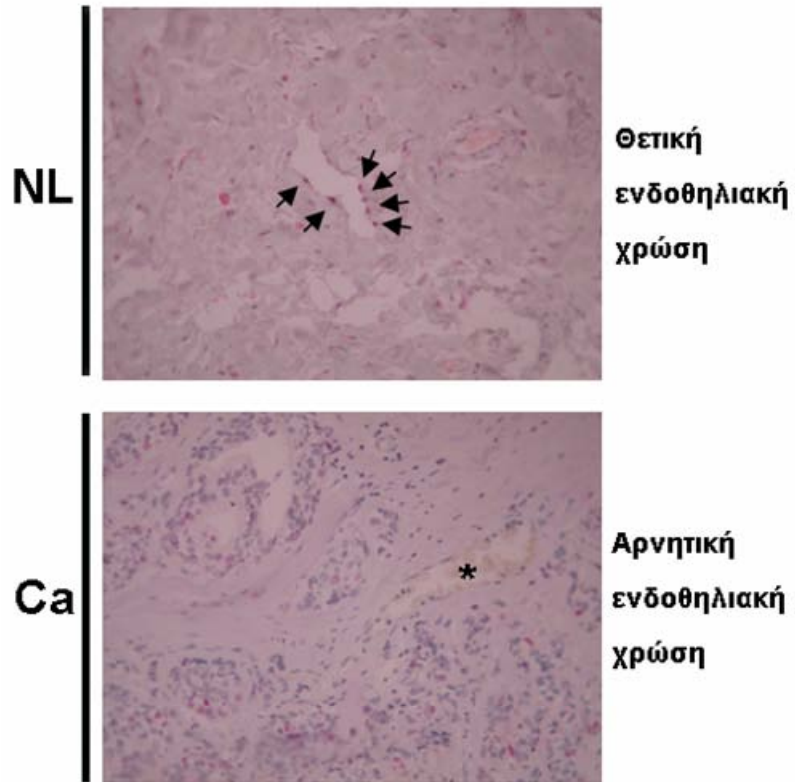
**(-) CD105/Endoglin (+)**





B5.

**p21<sup>WAF1/Cip1</sup>**



---

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

---