

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος)

ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ Δ. ΣΟΥΦΛΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ
ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

Στην οικογένειά μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΣΟΥΦΛΑ
ΟΝΟΜΑ: ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ: Δημήτριος
ΗΜΕΡ.ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 17 /02/ 1976
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: ΑΘΗΝΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Ανακρέοντος 84, 157 71 Αθήνα,
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: ΑΓΑΜΗ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6972 091103, 2107799995
E MAIL: soufla@med.uoc.gr, gsoufla@hotmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ :

- 1993** Απόφοιτος του 6^{ου} Λυκείου Ζωγράφου με γενικό βαθμό Άριστα (19,4)
- 1994-1999** Πτυχιούχος του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό 8,35 «Λίαν καλώς». Διπλωματική εργασία: «Σύνθεση και φασματοσκοπική μελέτη Θειοσεμικαρβαζονών 2-φορμυλο-βενζοθειαζολίου με πιθανή αντινεοπλασματική δράση. Συσχετισμός δομής-βιολογικής δράσης». Βαθμός επίδοσης 10 (Άριστα)
- 1999-2001** Εκπόνηση Διατριβής Ειδίκευσης (Master) στον τομέα Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών με τίτλο: «Ανάπτυξη Νέων Συστημάτων ανίχνευσης ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων».
- 2001-2004** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης , Επιβλέπων Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος με θέμα: «Μελέτη του φαινομένου της αγγειογένεσης στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και του τραχήλου της μήτρας».

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

- 2003-2004** Υπότροφος του Ιδρύματος ΠΡΟΠΟΝΤΙΣ για την απόκτηση Διδακτορικού Διπλώματος στην Μοριακή Βιολογία

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ:

- 1999** Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών
- 2004** Μέλος της Ευρωπαϊκής Οργάνωσης Έρευνας κατά του καρκίνου (European association for Cancer Research).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- Σεπτ –Δεκέμβ 1998** Εργαστήριο του τμήματος έρευνας και ανάπτυξης της εταιρίας MEDICON HELLAS A.E.E., (πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ). Αντικείμενο: ανάπτυξη in vitro διαγνωστικών αντιδραστηρίων για βιοχημικούς αναλυτές.
- Φεβρ-Σεπτ 1999** Χημικός στο τμήμα Παραγωγής in vitro διαγνωστικών αντιδραστηρίων (βιοχημικών και αιματολογικών), με ταυτόχρονη απασχόληση στο τμήμα Διασφάλισης Ποιότητας στον τομέα των αιματολογικών, της εταιρίας MEDICON HELLAS A.E.E.
- Ιούν-Οκτ 2002** Φιλοξενούμενη ερευνήτρια στο “Roy Castle Center for Lung Cancer Research”, Genomic Instability Group, the University of Liverpool, England. Ερευνητική εργασία στη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA (DNA methylation project) γονιδίων ως αίτιο για την υποέκφρασή τους στον καρκίνο του πνεύμονα.
- Φεβρ-Σεπτ 2003** Εργάζομαι στο πρόγραμμα ΚΑ847 του Ειδικού Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο έργο «Ανίχνευση ιών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)».

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 1999-2001** Διδασκαλία σε φοιτητές του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών των εργαστηριακών ασκήσεων των μαθημάτων Ενόργανη Ανάλυση I και Ενόργανη Ανάλυση II και εκπαίδευσή τους στην εργαστηριακή πράξη.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ :

ΑΓΓΛΙΚΑ: Proficiency in English of Cambridge
Αγγλικής Χημικής Ορολογίας. Διδασκαλείο Ξένων Γλωσσών
Πανεπιστημίου Αθηνών. Βαθμός (10).

ΓΑΛΛΙΚΑ: Certificat de la langue Francaise.

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ : Λειτουργικό σύστημα MS DOS, windows, word , excel,
Power point, Corel, internet

ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

- 1997** 12^ο σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρίας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας με θέμα «Προγεννητικός έλεγχος για χρωμοσωματικές ανωμαλίες (σύνδρομο Down) κα.
- 2000** Επιμορφωτικό σεμινάριο Ελληνικής Βιοχημικής Εταιρίας και Μοριακής Βιολογίας με τίτλο: «Βασικές Αρχές Τεχνικών Μοριακής Διαγνωστικής»
- 2001** Επιμορφωτικό σεμινάριο Ένωσης Ελλήνων Χημικών
«Υγεία και ασφάλεια στην εργασία»

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 2001** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων “6th World Congress on Advances in Oncology” και “4th International Symposium on Molecular Medicine”, Οκτώβριος 2001, Χερσόνησος, Κρήτη.
- 2002** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων “7th World Congress on Advances in Oncology” και “5th International Symposium on Molecular Medicine”, Οκτώβριος 2002, Χερσόνησος, Κρήτη.
- 2003** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων “8th World Congress on Advances in Oncology” και “6th International Symposium on Molecular Medicine”, Οκτώβριος 2003, Χερσόνησος, Κρήτη.
- 2004** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων “9th World Congress on Advances in Oncology” και “7th International Symposium on Molecular Medicine”, Οκτώβριος 2004, Χερσόνησος, Κρήτη.

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:

1. Baritaki S, Pizos E, Zafiropoulos A, **Soufla G**, Gourvas V, Krambovitis E and Spandidos DA. Lack of association between Schizophrenia and Dopamine (DRD3) or Serotonin (HTR2) receptor gene mutant Variants in the Greek Population. European Journal of Human Genetics (2004) 12, 535-541.
2. **G. Soufla**, S. Sifakis, S. Baritaki, A. Zafiropoulos, E. Koumantakis and D.A. Spandidos. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. Cancer Letters 2004. In press.
3. **G. Soufla**, S. Baitaki, S. Sifakis, A. Zafiropoulos and D.A. Spandidos Transcriptional inactivation of p53, Bax, Bcl-2 and Mdm2 correlates with the malignant transformation of the uterine cervix. Int J Biol Markers 2004 (In Press)
4. **G. Soufla**, F. Porichis, G. Sourvinos and D.A. Spandidos. Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGF- β 1, 2, 3 and cognate receptors in breast tumorigenesis. Cancer Letters (accepted).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. **G. Soufla**, A. Zafiropoulos, S.Sifakis, E. Koumantakis and D.A. Spandidos. Cervical Intraepithelial lesions and Cervical Cancer; Evaluation of the mRNA expression profile of VEGF, FGF2, TGFB1,2,3 and TGFBR1,2,3 as a marker of malignant transformation. “8th World Congress on Advances in Oncology” and “6th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2003, Hersonissos, Crete.
2. Baritaki S, Pizos E, Zafiropoulos A, **Soufla G**, Gourvas V, Krambovitis E and Spandidos DA. Lack of association between Schizophrenia and Dopamine (DRD3) or Serotonin (HTR2) receptor gene mutant Variants in the Greek Population. “8th World Congress on Advances in Oncology” and “6th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2003, Hersonissos, Crete.
3. **Soufla G**, Sifakis S, Baritaki S, Zafiropoulos A, Koumantakis E, and Spandidos DA. Disruption of mRNA co-expression patterns of growth factors implicated in angiogenesis and malignant transformation of the uterine cervix. “The XVIIIth European Congress of Obstetrics and Gynaecology”, May 12-15 2004, Athens, Greece.

4. **Soufla G**, Baritaki S, Sifakis S, Zafiropoulos A, Koumantakis E, and Spandidos DA
Transcriptional inactivation of p53, Bax, Bcl-2 and Mdm2 correlates with the malignant transformation of the uterine cervix. “18th Meeting of the European Association for Cancer Research, 3-6 July 2004, Innsbruck, Austria.
5. **Soufla G**, Mammas I, Sifakis S, Zafiropoulos A, Koumantakis E, and Spandidos DA
Ras and angiogenesis: relationship between mRNA expression of H- and N-ras oncogenes and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human cervical neoplasia. “18th Meeting of the European Association for Cancer Research, 3-6 July 2004, Innsbruck, Austria.
6. **G. Soufla**, S. Baritaki, S. Sifakis, A. Zafiropoulos, and D.A Spandidos. Deregulation of *p53*, *Bax*, *Bcl-2* and *Mdm2* transcription in cervical carcinogenesis. “9th World Congress on Advances in Oncology” and “7th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2004, Hersonissos, Crete.
7. S. Panagiotakis, **G. Soufla**, S. Baritaki, A. Zafiropoulos, A. Passam, G. Sourvinos, I. Zagoreos, N.G. Stavrianeas and D.A. Spandidos. Herpesvirus detection in HIV-positive patients: correlation with clinical data. “9th World Congress on Advances in Oncology” and “7th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2004 Hersonissos, Crete.
8. **G. Soufla**, F. Porichis, G. Sourvinos and D.A Spandidos
Evaluation of VEGF, FGF2 and TGFB1 mRNA expression levels in breast cancer: Transcriptional inactivation of TGFB1 and FGF2 correlates with tumor progression. “9th World Congress on Advances in Oncology” and “7th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2004, Hersonissos, Crete.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίησή της, και κυρίως τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ.Α Σπαντίδο όχι μόνο για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε, αλλά και για το αμέριστο ενδιαφέρον του και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Του είμαι ακόμη ευγνώμων για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εργαστώ ερευνητικά στο Roy Castle International Center for Lung Cancer Research του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, ενώ δε θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω και τον ερευνητή Δρ. Τ. Λιλόγλου (Group Leader, Πανεπιστήμιο Λίβερπουλ) για τις εργαστηριακές γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής, Αν. Καθηγητή κ. Ι. Διαμαντή και κ. Λέκτορα κ. Χ. Τσατσάνη για τις πολύτιμες συμβουλές και προτροπές τους. Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητές κ. Ε. Κουμαντάκη και κ. Γ. Σαμώνη, Αν. Καθηγητή κ. Ο. Ζώρα, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο για την σημαντική βοήθειά του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμη θερμά τον Δρ. Σ. Σηφάκη για την υποστήριξή του, τις συμβουλές και την ουσιαστική συμβολή του στην επιτυχή περάτωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία τους και ιδιαίτερα τους: Σ. Μπαριτάκη, Ν. Σουλιτζή, Φ. Πορίχη, Π. Κανέλλου, Δ. Δοκιανάκη, Μ. Παπαδάκη, Α. Πάσσαμ, Σ. Παναγιωτάκη, Σ. Πανταζή, Κ. Δημοπούλου, Σ. Μυγιάκη, Ν. Κρίκα και Ρ. Μαρκάκη. Ευχαριστώ ακόμη τους υποψήφιους Διδάκτορες Μ. Νάκου, Α. Ραπτοπούλου, Ε. Παπαδημητράκη και Γ. Μπερτσιά και όλους τους φίλους μου για την υποστήριξή τους.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, τη μητέρα μου και την αδερφή μου, πρώτα από όλα για την αμέριστη αγάπη, βοήθεια και κατανόησή τους, αλλά και για την ηθική και πρακτική υποστήριξή τους για να κάνω το όνειρό μου για γνώση πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νεο-αγγειογένεση είναι μια σύνθετη και πολυσταδιακή διεργασία που οδηγεί στο σχηματισμό νέων αγγείων αίματος από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο των ιστών. Πρόσφατες πειραματικές και κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η νεο-αγγειογένεση είναι απαραίτητη στον καρκίνο για την εξέλιξη, τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση. Μάλιστα η ανάπτυξη του καρκινικού όγκου πέραν των 1-2mm στηρίζεται αποκλειστικά και μόνο στην νεο-αγγειογένεση, η οποία συνεισφέρει και στην μεταστατική διαδικασία. Ο μηχανισμός που ελέγχει το αγγειογενετικό δυναμικό σε έναν όγκο δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα. Πιστεύεται ότι είτε αυξάνεται υπέρμετρα η έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων είτε αναστέλλεται η παραγωγή των αγγειοκατασταλτικών, διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία. Ο συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών αλλαγών φαίνεται να επηρεάζει την έναρξη της διαδικασίας.

Ο ρόλος του φαινομένου της αγγειογένεσης έχει περιγραφεί σε όλους σχεδόν τους καρκίνους του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού και σε μικρότερο βαθμό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Υποστηρίζεται ότι αποτελεί ένα συνοδευτικό γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης και μπορεί να αποτελέσει ένδειξη και μέτρο του σταδίου της καρκινικής εξαλλαγής.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού που ελέγχει την επαγωγή της αγγειογενετικής δραστηριότητας στα κυριότερα νεοπλάσματα που προσβάλλουν τον γυναικείο πληθυσμό και να προσδιορίσουμε τυχόν ομοιότητες ή διαφορές στην αγγειογενετική διαδικασία που συνοδεύει την κακοήθη εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων σε αυτούς τους καρκίνους. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων του TGF-β RI, RII, RIII με τη μέθοδο της RT-PCR σε δείγματα ιστών με καρκίνο του μαστού καθώς και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς από τις ίδιες ασθενείς. Επίσης εξετάστηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των VEGF και TGF-β1 (western blot analysis) και συσχετίστηκαν με την έκφραση σε επίπεδο mRNA. Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής η μελέτη έκφρασης των παραπάνω αυξητικών παραγόντων επαναλήφθηκε σε δείγματα ιστών από ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και σε φυσιολογικό τράχηλο. Στόχος της μελέτης ήταν: α) να ταυτοποιηθεί το προφίλ έκφρασης των κυριότερων αγγειογενετικών παραγόντων που έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην αγγειογένεση, β) να διερευνηθεί η συσχέτισή του με τα κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων και κυρίως με την έκταση και βαρύτητα της κακοήθους βλάβης και γ) να ελεγχθεί η πιθανότητα χρήσης του μοριακού προτύπου έκφρασης των αυξητικών παραγόντων ως μοριακού δείκτη της αγγειογένεσης και του κινδύνου καρκινικής εκτροπής των επιθηλιακών κυττάρων στα γυναικεία νεοπλάσματα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης στον καρκίνο του μαστού έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του TGF-β3 και μείωση αυτών του bFGF στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς ($P=0.031$, 0.043 αντίστοιχα). Αύξηση παρατηρήθηκε και στο mRNA του VEGF αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τα επίπεδα πρωτεΐνης του VEGF βρέθηκαν αυξημένα σε καρκινικούς ιστούς ασθενών μετά την εμμηνόπαυση ($P=0.01$). Τα mRNA επίπεδα των TGF-β1, β3 βρέθηκαν να διαφέρουν ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων ($P=0.020$, 0.043 αντίστοιχα), ενώ διαπιστώθηκε ισχυρή ορμονική επίδραση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης στην mRNA έκφραση των περισσότερων υποκαταστατών και υποδοχέων του TGF-β. Τα επίπεδα πρωτεΐνης του TGF-β1 βρέθηκαν να συσχετίζονται αρνητικά με αυτά του mRNA ($P=0.016$) από την ανάλυση ζευγών δειγμάτων. Η μελέτη του προτύπου έκφρασης (συν-έκφραση των παραγόντων ανά δυο) αποκάλυψε

απορρύθμιση του προφίλ mRNA έκφρασης των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στον καρκίνο συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς.

Τα αποτελέσματα της μελέτης στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των VEGF, TGF-β1, TGF-β RI και μείωση αυτών του bFGF αυξανόμενης της επιθηλιακής βλάβης (normal, CIN, Cancer) ($P=0.015$, 0.001 , 0.008 , και 0.029 αντίστοιχα). Οι υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες (High-grade SIL) επέδειξαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA του VEGF συγκριτικά με τις χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (Low-grade SIL) ($P=0.039$), και αυξανόμενης της βαρύτητας της ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN I, II, III) ($P<0.0001$). Οι υποδοχείς TGF-β RI και TGF-β RIII επέδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση συν-έκφρασης μεταξύ τους σε επίπεδο mRNA καθώς και με τους υποκαταστάτες TGF-β2, β1 ($P<0.0001$, 0.005 , 0.002 αντίστοιχα) στα φυσιολογικά δείγματα τραχήλου, επιβεβαιώνοντας το γνωστό μηχανισμό μεταγωγής σήματος του TGF-β μέσω σχηματισμού του ετερο-τετραμερούς συμπλόκου-σηματοδότη. Εντούτοις, διαπιστώθηκε απορρύθμιση του προφίλ συν-έκφρασης του συνόλου των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκε, τόσο στις ενδοεπιθηλιακές βλάβες (CIN), όσο και στον καρκίνο του τραχήλου σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών ιστών. Περισσότερες και πιο ισχυρές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων, λιγότερες στις CIN βλάβες και ακόμα λιγότερες στον καρκίνο.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μας στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας διαπιστώσαμε ότι διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες φαίνεται να κυριαρχούν στην αγγειογενετική δραστηριότητα που συνοδεύει την κακοήγη εξαλλαγή σε κάθε τύπο καρκίνου. Η απορρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των VEGF, bFGF, TGF-β1, και του υποδοχέα TGF-β RI εμπλέκεται στη διαδικασία της καρκινικής εκτροπής στον τράχηλο της μήτρας, αλλά τα επίπεδα mRNA του bFGF και του TGF-β3 διαφέρουν σημαντικά στα καρκινικά και φυσιολογικά δείγματα του μαστού. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν, με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων απέδωσε επίσης διαφορετικά αποτελέσματα, ενισχύοντας την άποψη ότι ο μηχανισμός που ελέγχει την αγγειογένεση ρυθμίζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (context dependent). Η απορρύθμιση όμως του **προφίλ συν-έκφρασης** του **συνόλου** των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στον καρκίνο (και στις ενδοεπιθηλιακές βλάβες) σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς, είναι κοινό στοιχείο και στους δύο τύπους καρκίνων και προσδίδει επιπλέον αποδείξεις ότι η ανάπτυξη καρκίνου συνοδεύεται από διατάραξη της φυσιολογικής ισορροπίας επαγωγέων και καταστολέων της αγγειογένεσης. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής παρέχουν ενδείξεις για την πιθανή χρήση του προφίλ έκφρασης των αυξητικών παραγόντων ως μοριακού δείκτη της αγγειογένεσης και του κινδύνου καρκινικής εκτροπής των επιθηλιακών κυττάρων στα γυναικεία νεοπλάσματα.

ABSTRACT

Angiogenesis is a complex and multistep process leading to the formation of new blood vessels from the pre-existing vascular network. Recent experimental and clinical data have demonstrated that angiogenesis is essential for tumor development and metastasis. Tumor growth more than 1-2mm is solely dependent on angiogenesis. The mechanism that controls the angiogenic potential of a tumor remains unclear. It is believed that either up regulation of angiogenic growth factors, or down regulation of naturally occurring inhibitors, leads to the disruption of their net balance and initiates the angiogenic switch. Environmental and genetic changes seem to affect the angiogenic process as well.

The role of angiogenesis has been described in all human cancers including breast and cervical cancer. It is believed to play an accompanying role in carcinogenesis and it is suggested to comprise a marker of malignant transformation.

The purpose of the present study is to investigate the mechanism that controls the induction of the angiogenic process in the most frequent female cancers, as well as to determine similarities or differences in the procedure that accompanies the malignant conversion of normal breast and cervical epithelial cells. Therefore, we evaluated the mRNA expression of VEGF, bFGF, TGF- β 1, β 2, β 3 and the receptors TGF- β RI, RII, RIII by RT-PCR in breast cancer tissue samples and adjacent normal specimens. We also evaluated the protein levels of VEGF and TGF- β 1 (western blot analysis), and we examined the correlation with their mRNA expression levels. Furthermore, the mRNA expression profile of the same growth factors was investigated in tissue samples with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer and compared to that of normal cervical tissues. Our goals were: a) to determine the mRNA expression profile of the main growth factors implicated in angiogenesis, b) to examine the possible correlation of the mRNA expression profile with the clinical stage of the disease, or other clinicopathological features of the specimens, and c) to examine the possibility of using the mRNA expression profile of growth factors as a molecular marker of angiogenesis and malignant transformation of epithelial cells.

Our results show significant differences in TGF- β 1 and TGF- β 3 mRNA levels in breast cancer specimens of differing histology (ductal, lobular, other) ($P=0.020$ and $P=0.043$). VEGF mRNA was elevated in tumor specimens compared to controls but the increase was not statistically significant. VEGF protein in tumors was associated with patients' menopausal status. A strong hormonal influence of ER and PR on TGF- β mRNA expression was established. FGF2 transcript levels were substantially decreased in cancer compared to adjacent normal specimens ($P=0.031$). Western blot analysis revealed differences between VEGF and TGF β 1 mRNA and protein levels. A substantial negative correlation of TGF- β 1 protein and TGF- β 1 mRNA levels ($p=0.016$) was demonstrated by breast tissue-pair analysis. A disruption of mRNA co-expression patterns was observed in malignant breast tissues compared to controls.

VEGF, TGFB1, TGFBR1, and FGF2 transcript levels were significantly different in the normal, CIN and cancer specimen groups ($P=0.015$, 0.001, 0.008, and 0.029 respectively). Higher TGFBR1 mRNA levels were observed in parallel with increased severity of the lesion, whereas FGF2 exhibited lower transcript levels. A highly significant increase of VEGF mRNA expression was found upon cervical neoplastic transformation ($P<0.0001$). High-grade squamous intraepithelial lesions exhibited higher VEGF mRNA levels than low-grade lesions ($P=0.039$). TGFBR1 and TGFBR3 receptors demonstrated significant co-expressions with TGFB2 ($P<0.0001$), and TGFB1 ($P=0.005$ and $P=0.002$ respectively) in normal cervical specimens. However, a disruption of co-

expression patterns was observed in the groups of CIN and cancer cases, compared to normal tissues.

Our results in breast and cervical cancer indicate that different growth factors prevail in the angiogenic process accompanying the malignant transformation of epithelial cells in each type of cancer. The disruption of VEGF, bFGF, TGF- β 1, and TGF- β RI mRNA expression is implicated in cervical carcinogenesis, whereas only bFGF and TGF- β 3 mRNA expression was significantly different in the groups of cancer and adjacent normal breast tissues. Correlation of mRNA expression levels of the growth factors studied with clinicopathological features of the specimens, revealed differences in breast and cervical cancer suggesting that angiogenesis is context dependent. A common feature of both types of cancer however, is the disruption of mRNA co-expression patterns of all growth factors included in our evaluation, in cancer (and CIN lesions) compared to normal specimens. The latter provides additional evidence that tumor development is accompanied by the disruption of the net balance of angiogenic growth factors and naturally occurring inhibitors. Our findings suggest that the mRNA expression profile of growth factors could possibly be used as a molecular marker of angiogenesis and a marker of malignant conversion of normal epithelial cells in female cancers.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ABSTRACT	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xi

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Σελίδα

1. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗΣ

1.1 Ορισμός αγγειογένεσης	1
1.2 Αγγειογένεση και φυσιολογική εξέλιξη	1
1.3 Αγγειογένεση και μη νεοπλασματικές ασθένειες	2
1.4 Αγγειογένεση και καρκινική εξαλλαγή	2
1.5 Παράγοντες που επάγουν την έναρξη της νεο-αγγειογένεσης	3
1.6 Μηχανισμός δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων	5
1.7 Μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών αιμοφόρων αγγείων	9
1.8 Χαρακτηριστικές διαφορές «καρκινικών» και φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων	13
1.9 Μέθοδοι εκτίμησης-αποτίμησης της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο.	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή. Ποιοί είναι οι παράγοντες που συμμετέχουν στην αγγειογένεση	17
2.2 Επαγωγείς της αγγειογένεσης	18
2.3 Αναστολείς της αγγειογένεσης	20
2.4 Αντι-αγγειογενετικές θεραπείες	22
2.4.1 Εισαγωγή	22
2.4.2 Αυξητικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές στα πλαίσια αντι-αγγειογενετικής θεραπείας	22
2.4.3 Γονιδιακή αντι-αγγειογενετική θεραπεία	24
2.4.4 Πλεονεκτήματα και προβλήματα της αντιαγγειογενετικής θεραπείας. Μελλοντικοί στόχοι.	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

3.1	Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης (VEGF)	27
3.1.1	Δομή και οργάνωση του γονιδίου VEGF	27
3.1.2	Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του VEGF	29
3.1.3	Βιολογική δράση και λειτουργία του γονιδίου VEGF	31
3.1.4	Παράγοντες που επιδρούν στην έκφραση του VEGF	32
3.2	Βασικός ινοβλαστικός παράγοντας αύξησης (bFGF)	33
3.2.1	Δομή και οργάνωση των γονιδίων FGF	33
3.2.2	Κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργία των FGF	34
3.2.3	Δομή και κυτταρικός εντοπισμός του bFGF	36
3.2.4	Μηχανισμός μετάδοσης σήματος του bFGF	37
3.2.5	Βιολογική δράση του bFGF	39
3.3	Αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β και υποδοχείς του (TGF-β και TGF-β Receptors)	41
3.3.1	Δομή και οργάνωση του TGF-β	41
3.3.2	Μηχανισμός μετάδοσης σήματος του TGF-β. Υποδοχείς του TGF-β	43
3.3.3	Βιολογική δράση του TGF-β	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗ

4.1	Καρκίνος του μαστού	50
4.2	Παθοφυσιολογία και ιστολογική ταξινόμηση	50
4.3	Αγγειογένεση και καρκίνος του μαστού	53
4.4	Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗ

5.1	Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	58
5.2	Παθοφυσιολογία και ιστολογική ταξινόμηση	59
5.3	Αγγειογένεση και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	61
5.4	Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας	62

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

6.1.1 Συλλογή δειγμάτων Καρκίνου του μαστού	68
6.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων μαστού	68
6.1.3 Συλλογή δειγμάτων Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας	70
6.1.4 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων τραχήλου της μήτρας	71

6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από συμπαγείς ιστούς	72
6.2.2 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA	
6.2.3.1 Φασματοφωτομέτρηση RNA	72
6.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης	73
6.2.4 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).	
6.2.4.1 Αρχή μεθόδου	73
6.2.4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην PCR	74
6.2.5 Μέθοδος αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR)	75
6.2.6 Ημιποσοτική RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων	76
6.2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR και RT-PCR και χρώση με νιτρικό άργυρο	78
6.2.8 Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων	79

B. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.9 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς	80
6.2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	80
6.2.11 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών	81
6.2.12 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (western blot analysis)	81
6.2.13 Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων	82

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.13 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	82
---	----

6.3 ΥΛΙΚΑ

6.3.1 Διαλύματα	83
6.3.2 Υλικά και εταιρείες προέλευσης	84

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

7.1 Δείγματα που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης	86
7.2 Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα μαστού	86
7.2.1 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων	87
7.2.2 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα μαστού με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	90
7.2.3 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων (συν-έκφραση των γονιδίων ανά δύο) στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων	94
7.2.4 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF και TGF-β1 στα φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα μαστού	97
7.2.5 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα ζεύγη δειγμάτων (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή).	99
7.2.6 Μελέτη του προφίλ έκφρασης των γονιδίων (συν-έκφραση των γονιδίων ανά δύο) στα ζεύγη δειγμάτων.	99
7.2.7 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF και TGF-β1 στα ζεύγη δειγμάτων (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή).	102
7.2.8 Απόδοση του προφίλ έκφρασης των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων μαστού	104

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

- 7.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων μαστού. 106
- 7.4 Συζήτηση των αποτελεσμάτων συν-έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων μαστού (προφίλ έκφρασης). 110
- 7.5 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης των γονιδίων στα ζεύγη δειγμάτων μαστού (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή) 112

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.

- 8.1 Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα τραχήλου της μήτρας 113
- 8.2 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα τραχήλου της μήτρας 113
- 8.3 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα τραχήλου της μήτρας με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων 121
- 8.4 Μελέτη της συν-έκφρασης των γονιδίων κατά ζεύγη και απόδοση του προφίλ έκφρασης 123

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.

- 8.5 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης των γονιδίων στις διάφορες ομάδες δειγμάτων 129
- 8.6 Συζήτηση των αποτελεσμάτων συν-έκφρασης των γονιδίων. Προφίλ έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας 132

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ 136

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

1.1 Ορισμός αγγειογένεσης.

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων των θηλαστικών απαιτεί την επαρκή τροφοδότησή τους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων. Για να δέχονται τις αναγκαίες ποσότητες οξυγόνου για την επιβίωσή τους τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση λιγότερο από 100 έως 200μm από τα αιμόφορα αγγεία. Προκειμένου οι πολυκύτταροι οργανισμοί να υπερβούν αυτό το μέγεθος απαιτείται η συγκρότηση νέων αγγείων αίματος μέσω της αγγειογένεσης (1).

Νεο-αγγειογένεση ή αγγειογένεση (angiogenesis) είναι η σύνθετη διεργασία που οδηγεί στο σχηματισμό νέων αγγείων αίματος από το προϋπάρχον αγγειακό σύστημα των ιστών. Πρόσφατα, ο όρος επεκτάθηκε ώστε να υποδηλώνει την ανάπτυξη και την διαδικασία ανακατασκευής και διαμόρφωσης του αρχέγονου-πρόδρομου δικτύου προς ένα πολύπλοκο αγγειακό δίκτυο (2). Διαφοροποιείται από την διαδικασία *de novo* σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis) μέσω διαφοροποίησης των πρόδρομων κυττάρων αγγειοβλαστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία συναθροίζονται προς τον τελικό σχηματισμό των αγγείων. Η τελευταία διαδικασία *de novo* σύνθεσης αιμοφόρων αγγείων λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ηλικία. Στους ενήλικες η νεο-αγγειογένεση είναι υπεύθυνη για την διαφοροποίηση, ανάπτυξη και επέκταση του πρόδρομου δικτύου κατά την οποία λαμβάνει χώρα εκβλάστηση και διακλάδωση νέων αιμοφόρων αγγείων από τα προϋπάρχοντα τριχοειδή αγγεία (3).

1.2 Αγγειογένεση και φυσιολογική εξέλιξη

Αγγειογενετική δραστηριότητα στους ενήλικες παρατηρείται σε φυσιολογικά κύτταρα και είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των ιστών, την επούλωση τραυμάτων, και όπως έχει αποδειχθεί παίζει πρωτεύοντα ρόλο σε καταστάσεις φλεγμονής (3). Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσιολογικής αγγειογένεσης είναι αυτή που

λαμβάνει χώρα στους ιστούς του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται αυξομειώσεις των αγγειογενετικών παραγόντων κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, με σημαντική μείωση της αγγειογένεσης κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσης και αύξηση στα μέσα του κύκλου, η οποία ακολουθείται από σταδιακή μείωση μέχρι το τέλος του κύκλου. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις και τα λοιπά όργανα και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού η διαδικασία της αγγειογένεσης βρίσκεται σε λανθάνουσα αδράνεια.

Κατά την διεργασία του φυσιολογικού σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων είναι χαρακτηριστικό ότι λαμβάνει χώρα ταχύς σχηματισμός και ωρίμανση των αγγείων. Το νέο αγγειακό δίκτυο οργανώνεται με τάξη, έχει σαφή όρια και χαρακτηρίζεται από αυξημένη σταθερότητα. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία επέρχεται και πάλι αγγειογενετική αδράνεια στους ιστούς (3).

1.3 Αγγειογένεση και μη νεοπλασματικές ασθένειες.

Η υπερβολική ή ανεπαρκής ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων μπορεί να οδηγήσει σε μη νεοπλασματικές ασθένειες. Σε άλλου τύπου ασθένειες τα αγγεία δεν μεγαλώνουν αλλά παρουσιάζουν αναδιαμόρφωση, η οποία επηρεάζει τόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Οι κυριότερες αιτίες που μπορεί να οδηγήσουν σε τέτοιου είδους μη νεοπλασματικές ασθένειες είναι η φλεγμονή και η υποξία. Είναι πολύ συχνό για παράδειγμα κύτταρα σε περιοχές τραυμάτων και αθηρωματικές πλάκες να γίνονται υποξικά όταν βρίσκονται μακριά από αγγεία. Επίσης ανώμαλη κατανομή εξωκυττάριας ουσίας ή υπεραιμία παρεμποδίζει την μεταφορά οξυγόνου και προκαλεί υποξία σε παθήσεις όπως ο διαβήτης, το άσθμα και η ασθένεια Alzheimer. Υποξία μπορεί να πάθουν και πρόωρα νεογνά που έρχονται σε επαφή με υπερβολικό οξυγόνο.

1.4 Αγγειογένεση και καρκινική εξαλλαγή

Η παρατήρηση έντονης αγγειογενετικής δραστηριότητας γύρω από τους καρκινικούς όγκους έγινε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα (4). Ο διακεκριμένος ρόλος της νεο-αγγειογένεσης στη βιολογία του καρκίνου περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Folkman

το 1971, ο οποίος υποστήριξε το φαινόμενο της «αδράνειας του καρκίνου» απουσία του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων. Συγκεκριμένα, πρότεινε ότι η ανάπτυξη των όγκων και η μετάσταση στηρίζονται στην αγγειογενετική διαδικασία, την οποία υπέδειξε ως πρωταρχικό στόχο καταστολής για την αντιμετώπιση του καρκίνου (5). Το 1976 ο Gullino απέδειξε ότι τα προ-καρκινικά κύτταρα στους ιστούς αποκτούν αγγειογενετική ικανότητα κατά τη διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής τους και έδωσε την ώθηση για την ανάπτυξη στρατηγικών για την αντιμετώπιση της αγγειογένεσης ως μέσο πρόληψης της νόσου.

Πρόσφατες πειραματικές και κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η νεο-αγγειογένεση είναι απαραίτητη στον καρκίνο για την εξέλιξη, τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση. Μάλιστα η ανάπτυξη του καρκινικού όγκου πέραν των 1-2mm στηρίζεται αποκλειστικά και μόνο στην νεο-αγγειογένεση, η οποία συνεισφέρει και στην μεταστατική διαδικασία επιτρέποντας την απελευθέρωση των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία (7). Η αγγειογενετική δραστηριότητα σε έναν όγκο είναι το αθροιστικό αποτέλεσμα αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων. Αυτό απέδειξαν πολλές ανεξάρτητες μελέτες παρουσιάζοντας στοιχεία ότι ουσίες με αντι-αγγειογενετική δράση, ή ουσίες που καταστέλλουν τους ενδογενείς αγγειογονικούς παράγοντες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και τη μετάσταση των όγκων, ενισχύοντας παράλληλα την άποψη της πολυπλοκότητας των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την αγγειογένεση. Είναι γενικά αποδεκτή σήμερα η άποψη ότι το έναυσμα της αγγειογένεσης δίνεται από τη διατάραξη της δυναμικής ισορροπίας των προ-αγγειογενετικών μορίων και των αναστολέων της αγγειογένεσης σε βάρος των δεύτερων, με αποτέλεσμα την «αφύπνιση των όγκων».

1.5 Παράγοντες που επάγουν την έναρξη της νεο-αγγειογένεσης.

Μια ποικιλία παραγόντων (8, 9, 10) φαίνεται να προκαλούν την έναρξη της νεο-αγγειογένεσης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται:

α) Μεταβολική πίεση-υποξία:

Χαμηλό pO₂, χαμηλό pH, υπογλυκαιμία.

β) Μηχανική πίεση:

Για παράδειγμα πίεση που προκαλείται από κύτταρα που αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα αυξημένη μάζα ιστού. Η μηχανική αυτή πίεση οδηγεί σε σχηματισμό αγγείων μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού μεταγραφής των υπεύθυνων γονιδίων για την έναρξη της αγγειογένεσης.

γ) Ανοσοαπόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής:

Για παράδειγμα, ανοσο/φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία διηθούν τους ιστούς και συνεισφέρουν στην αγγειογενετική διαδικασία επάγοντας την επέκταση των όγκων μέσω παροχής παραγόντων ανάπτυξης, κυτοκινών και πρωτεασών προάγοντας τη μεταστατική διαδικασία (11).

δ) Γενετικές αλλοιώσεις-μεταλλάξεις:

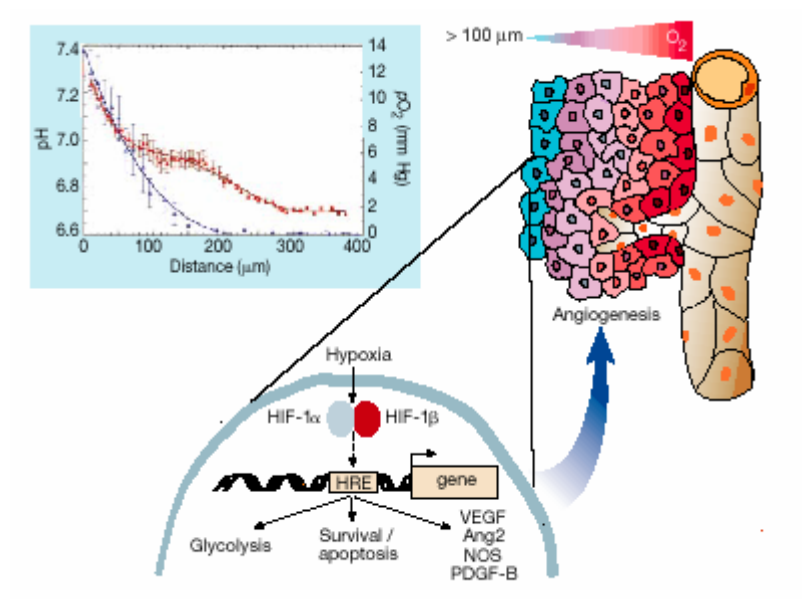
Πρόκειται για μεταλλάξεις που προκαλούν ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απαλοιφή ογκο-κατασταλτικών γονιδίων τα οποία ελέγχουν την παραγωγή μορίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης.

ε) Συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων:

Ο ακριβής μηχανισμός που λαμβάνει χώρα και περιλαμβάνει έναν, δύο ή και περισσότερους από τους παραπάνω παράγοντες σε κάθε περίπτωση δεν είναι ακόμα γνωστός.

στ) Διατάραξη της δυναμικής ισορροπίας των προ-αγγειογενετικών μορίων και των αναστολέων της αγγειογένεσης για άλλους λόγους:

Η αγγειογενετική δραστηριότητα σε όγκο επάγεται από την έκκριση ειδικών αυξητικών παραγόντων καθώς και αναστολέων της αγγειογένεσης που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ή ορισμένα κύτταρα του στρώματος όπως τα μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα. Η σχετική τους κατανομή συνήθως διαφέρει ανάλογα με το είδος του όγκου και του ιστού στον οποίο εντοπίζεται, καθώς επίσης και από το στάδιο της κακοήθους εξαλλαγής.



Εικόνα 1.1:

Ο ρόλος της υποξίας στην αγγειογένεση

Λόγω της ανώμαλης και ακανόνιστης οργάνωσης του καρκινικού αγγειακού δικτύου, ορισμένα κύτταρα του όγκου βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη από 100μm από τα αιμοφόρα αγγεία και γίνονται υποξικά. Η βαθμιαία μεταβολή του χρώματος από κόκκινο σε μπλέ στην εικόνα υποδηλώνει κύτταρα τα οποία γίνονται προοδευτικά όλο και πιο υποξικά. Από την ενεργοποίηση των HIF (hypoxia induced transcriptional factors) δηλαδή μεταγραφικών παραγόντων που διεγείρονται από την υποξία, επάγεται η αγγειογένεση καθώς αυξάνεται η μεταγραφή αυξητικών παραγόντων (πχ VEGF, PDGF-BB). Οι παράγοντες HIF επιδρούν επίσης στα μονοπάτια της απόπτωσης και κυτταρικής επιβίωσης. Η γραφική παράσταση δείχνει τη συσχέτιση της απόστασης των καρκινικών κυττάρων από τα πλησιέστερα αγγεία και το βαθμό υποξίας τους (μπλέ γραμμή), ή οξέωσής τους (κόκκινη γραμμή).

1.6 Μηχανισμός δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων.

- Μηχανισμός *de novo* σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis)

Πρόκειται για το μηχανισμό δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ηλικία και οδηγεί στη δημιουργία του πρόδρομου- αρχέγονου αγγειακού δικτύου. Αρχικά οι αιμαγγειοβλάστες, τα πρόδρομα μόρια των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων σχηματίζουν συσσωματώματα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό αυτών των συναθροίσεων διαφοροποιούνται προς το σχηματισμό των

πρόδρομων αιμοποιητικών κυτάρων, ενώ αυτά που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι αγγειοβλάστες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να μεταναστεύουν πριν από την *in situ* διαφοροποίησή τους και το σχηματισμό του πλέγματος. Παράγοντες που επιδρούν και επάγουν τη διαφοροποίηση των αγγειοβλαστών είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (vascular endothelial growth factor, VEGF), ο υποδοχέας τύπου 2 αυτού (VEGF Receptor 2), και ο βασικός ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης (basic fibroblast growth factor, bFGF).

Δυστυχώς γνωρίζουμε πολύ λίγα για το μηχανισμό που καθορίζει τη μοίρα των ενδοθηλιακών κυττάρων και ρυθμίζει τη φυσιολογική ή παθολογική ενσωμάτωσή τους σε φλέβες και αρτηρίες. Αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν βρεθεί στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα των ενηλίκων σε αντίθεση με την παλαιότερη αντίληψη ότι η υπαρχή τους συνδέεται μόνο με την εμβρυϊκή ηλικία. Οι παράγοντες VEGF, bFGF και insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (ινσουλινικός παράγοντας ανάπτυξης), έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν την διαφοροποίηση και την κινητικότητα των κυττάρων αυτών (2).

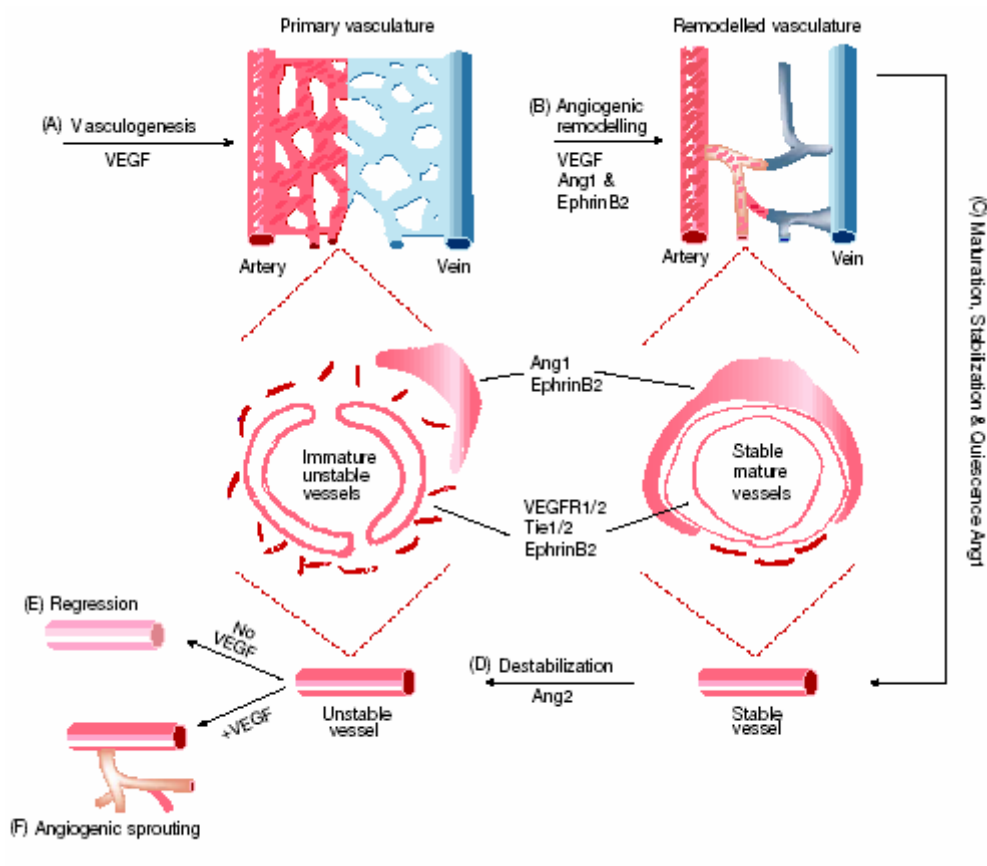
➤ Μηχανισμός φυσιολογικής αγγειογένεσης: επέκταση και διαμόρφωση των αγγείων

Η διαδικασία ξεκινά με αγγειοδιαστολή και αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων ως απόκριση στη δράση του VEGF. Η δράση του VEGF αντισταθμίζεται από αυτή της αγγειοποιητίνης 1 (Angiopoietin 1, Ang1), ενός φυσικού αναστολέα που συσφίγγει τα αγγεία και αποτρέπει τη διαρροή. Προκειμένου να μεταναστεύσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την επέκταση των αγγείων πρέπει να χαλαρώσουν οι δεσμοί μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, να αποκολληθούν τα λεία μυϊκά κύτταρα και να χαλαρώσει η εξωκυττάρια ουσία. Η διαδικασία περιλαμβάνει την έκκριση της αγγειοποιητίνης 2 (Ang 2), πρωτεασών του ινοδογόνου, μεταλλοπρωτεασών (matrix metalloproteinases, MMPs), και αναπτυξιακών παραγόντων (VEGF, bFGF, IGF-1). Ακολουθεί διαφοροποίηση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων με την επίδραση κυρίως του VEGF, των υποδοχέων του, και της Ang1, η οποία αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα των κυττάρων αυτών και σταθεροποιητή του νέου αγγειακού δικτύου. Στην επέκταση των αγγείων συμμετέχουν ειδικοί επαγωγείς και αναστολείς αυτής που βρίσκονται σε μια αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία. Παραδείγματα φυσικών αναστολέων αποτελούν η ενδοστατίνη

και η αγγειοστατίνη. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συναθροίζονται και σχηματίζουν αυλούς, η σύντηξη των οποίων επιτρέπει την αύξηση της διαμέτρου και του μήκους των αγγείων, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια των προαναφερθέντων αυξητικών παραγόντων καθώς και των ιντεγκρινών (integrines) (12). Μετά το σχηματισμό των νέων αγγείων τα ενδοθηλιακά κύτταρα αδρανοποιούνται και επιζούν για πολλά χρόνια. Οι γνώσεις μας για το μηχανισμό που καθοδηγεί το σχηματισμό του τρισδιάστατου πλέγματος των διακλαδιζόμενων αγγείων είναι πολύ περιορισμένες. Τα λεία μυϊκά κύτταρα που συνιστούν δομικά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων προέρχονται από την διαφοροποίηση ενδοθηλιακών, μεσενχυματικών κυττάρων, μακροφάγων και πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών. Αυτά συναθροίζονται, αναπτύσσονται και συνενώνονται με την επίδραση μεταξύ άλλων και των αυξητικών παραγόντων PDGF-BB, Tie-1 και 2.

➤ Αρτηριογένεση (arteriogenesis)

Ο μηχανισμός δημιουργίας των αρτηριών περιλαμβάνει την μετανάστευση και ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων μετά τη συνάθροιση τους. Τα κύτταρα αυτά επεκτείνονται και μεταναστεύουν κατά μήκος των ήδη σχηματισθέντων αγγείων τα οποία χρησιμοποιούν ως οδηγό κατεύθυνσης επιμήκυνσης. Στη συνέχεια τα μεγάλα θωρακικά αγγεία που σχηματίζονται υφίστανται σημαντικού βαθμού αναδιαμόρφωση (remodeling), η οποία τους επιτρέπει τη μεγέθυνση και επέκταση.



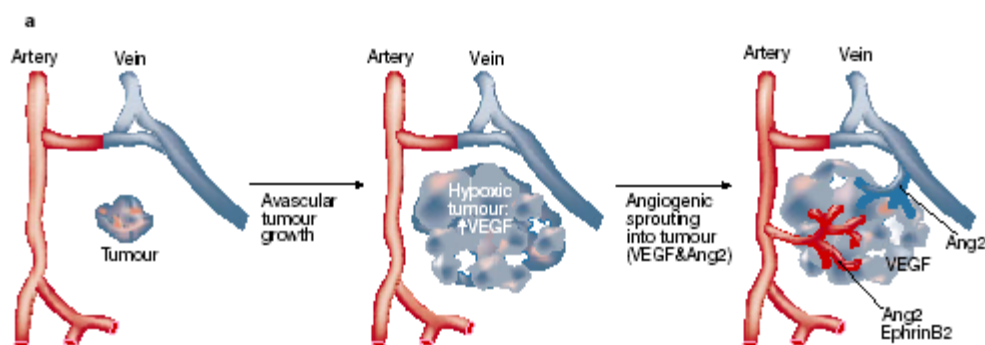
Εικόνα 1.2:

Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού νέων αγγείων αίματος.

Στην εικόνα παριστάνονται τα διάφορα στάδια που λαμβάνουν χώρα κατά τη δημιουργία νέων αγγείων αίματος και τα κυριότερα μόρια που συμμετέχουν στη διεργασία αυτή. Η διαδικασία περιλαμβάνει Α) τον *de novo* σχηματισμό αγγείων αίματος (vasculogenesis), Β) τη διαμόρφωση των αγγείων από το πρόδρομο δίκτυο (angiogenic remodeling) και τη σταθεροποίηση, ωρίμανση και επέκταση του αγγειογενετικού δικτύου (στάδια C, D, F). Η αρτηριογένεση αποτελεί μεγέθυνση και επέκταση του σχηματισθέντος δικτύου και λαμβάνει χώρα με παρόμοιο τρόπο με τα στάδια D και F.

1.7 Μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών αιμοφόρων αγγείων.

Η ανάπτυξη καρκινικών όγκων αποτελεί μια πολυσταδιακή και πολύπλοκη διαδικασία που ξεκινάει με την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο καρκίνος καθώς αναπτύσσεται απομακρύνεται από τα πλησιέστερα αιμοφόρα αγγεία με αποτέλεσμα να μη μπορεί να αναπτυχθεί πέραν ενός ορισμένου μεγέθους, λόγω στέρσης βασικών θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Τότε ο όγκος μπορεί να παραμείνει για πολλά χρόνια σε λανθάνουσα φάση, ή να εκμεταλλευτεί την διαδικασία της αγγειογένεσης και να σχηματίσει το δικό του αγγειακό δίκτυο που θα του επιτρέψει την επέκταση και μετάσταση σε παρακείμενους ιστούς ή όργανα (13).

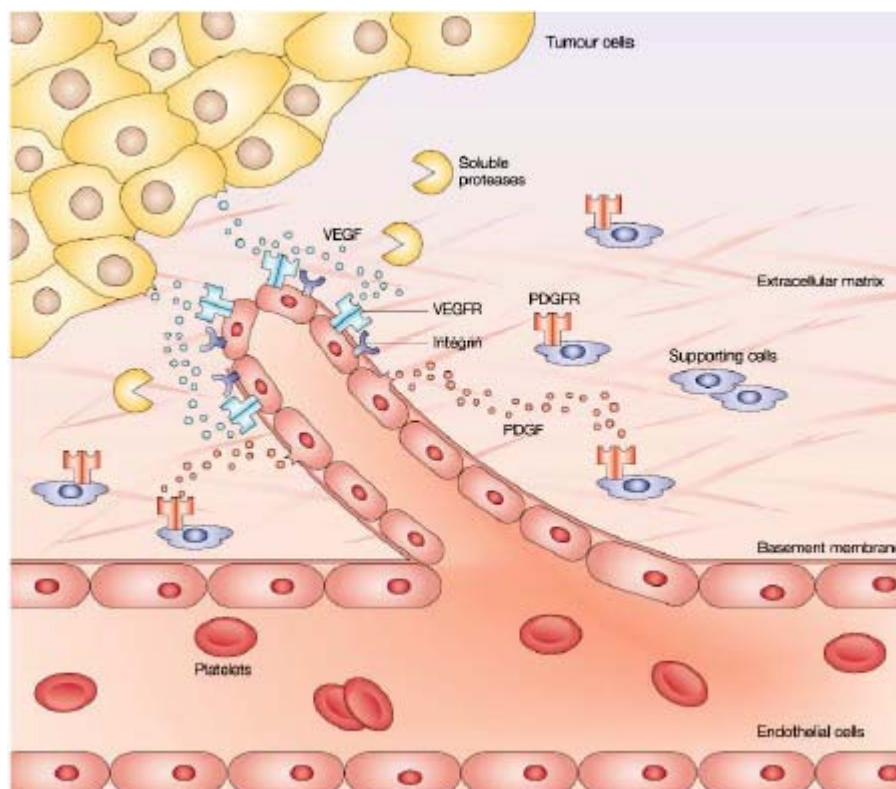


Εικόνα 1.3:

Σχηματική αναπαράσταση της μεγέθυνσης του καρκινικού όγκου και της εκμετάλλευσης του αγγειακού δικτύου του ιστού για την ανάπτυξη νέων αγγείων αίματος. Στο σχήμα αναγράφονται οι κυριότεροι αυξητικοί παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στην πολυσταδιακή διαδικασία σχηματισμού του καρκινικού αγγειακού δικτύου (VEGF, Ang2, EphrinB2).

Ο μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών αιμοφόρων αγγείων (13-15) περιλαμβάνει συνοπτικά τα παρακάτω βασικά στάδια τα οποία παριστάνονται σχηματικά στο σχήμα 1.4:

1. Αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων
Είναι το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα και πραγματοποιείται με την έκκριση από τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Η πλασμίνη που προκύπτει από το πλασμινογόνο αποδομεί πλήθος συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και τον πρωτεϊνικό πυρήνα των πρωτεογλυκανών. Η δράση των παραπάνω ουσιών επάγεται από την έκκριση πλήθους άλλων αυξητικών παραγόντων (κυρίως VEGF, bFGF, IGF1) και κυτοκινών από τα καρκινικά κύτταρα.
2. Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον περι-αγγειακό χώρο
Ταυτόχρονα υπό την επίδραση του VEGF τα αγγεία υφίστανται διαστολή, αύξηση διαπερατότητας μέχρι διαρροής, και αποσταθεροποίηση υπό την επίδραση του Ang2, που έχουν σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο.
3. Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και συνάθροιση προς αυλικούς σχηματισμούς
Η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγονται από την έκκριση κυρίως VEGF και Ang1. Η συνάθροιση των κυττάρων υποβοηθείται από ιντεγκρίνες.
4. Έλξη περιαγγειακών, λείων μυϊκών και άλλων υποστηρικτικών κυττάρων και σχηματισμός νέας βασικής μεμβράνης γύρω από τα νεο-σχηματισθέντα αγγεία.
Με τη βοήθεια του PDGF-BB, του TGF-β1 (transforming growth factor-β1), και της Ang1 προσελκύονται περιαγγειακά και λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν τη βασική μεμβράνη των νεο-σχηματισθέντων αγγείων.



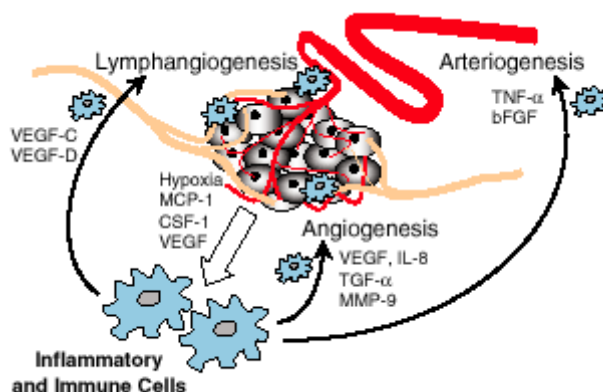
Σχήμα 1.4:

Απλοποιημένη εικόνα βασικών σταδίων του μηχανισμού δημιουργίας καρκινικών αιμοφόρων αγγείων.

Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο VEGF, οι οποίοι διαχέονται στα παρακείμενα κύτταρα και δεσμεύονται στους υποδοχείς ενδοθηλιακών κυττάρων προϋπάρχοντων αγγείων, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων (MMPs) που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη, ενώ τα ενεργοποιημένα κύτταρα μεταναστεύουν πλησιέστερα προς τους όγκους με τη βοήθεια των ιντεγκρινών. Σχηματίζεται νέα βασική μεμβράνη και εκκρίνεται PDGF-BB, ο οποίος έλκει υποστηρικτικά κύτταρα που σταθεροποιούν τα νέα αγγεία.

Ο παραπάνω μηχανισμός ο οποίος παρουσιάζεται σχηματικά και στο σχήμα 1.4 δεν είναι ο μοναδικός που συνεισφέρει στην δημιουργία καρκινικών αιμοφόρων αγγείων. Έχει βρεθεί ότι πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία, ή αποσπώνται από το αγγειακό τοίχωμα, ή ακόμα που μετακινούνται από τον μυελό των

οστών, συμμετέχουν στο σχηματισμό του αγγειακού δικτύου του καρκίνου (16, 17). Επίσης καρκινικά κύτταρα μπορεί να πολλαπλασιαστούν γύρω από προϋπάρχοντα αγγεία και να σχηματίσουν ένα περι-αγγειακό χιτώνα. (18).



Εικόνα 1.4

Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων στην αγγειογενετική διαδικασία.

Τα φλεγμονώδη κύτταρα επιστρατεύονται από τους όγκους και παίζουν υποστηρικτικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου διότι επάγουν την επέκτασή τους μέσω διέγερσης της νεο-αγγειογένεσης, της λεμφο-αγγειογένεσης και της μετάστασης.

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των ανοσο/φλεγμονωδών κυττάρων που διηθούν τους καρκινικούς όγκους, όπως τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ιδιότητα να επάγουν από μόνα τους την αγγειογενετική διαδικασία. Συγκεκριμένα, τα φλεγμονώδη κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν πληθώρα αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών στους οποίους περιλαμβάνονται ο VEGF, ο Ang1, ο bFGF, ο TGF- α , ο TGF- β 1, η IL-8 (ιντερλευκίνη 8), ο PDGF, ο TNF- α και πολλοί άλλοι, οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα εκκρίνονται και πλήθος πρωτεασών από τα φλεγμονώδη κύτταρα που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη, καθώς και ουσίες που προάγουν την λεμφο-αγγειογένεση. Εντούτοις, δεν πρέπει να παραλείψουμε ότι τα ίδια κύτταρα παράγουν και αναστολείς της αγγειογένεσης όπως η θρομβοσπονδίνη 1 (thrombospondin 1), οι ιντερφερόνες α και γ

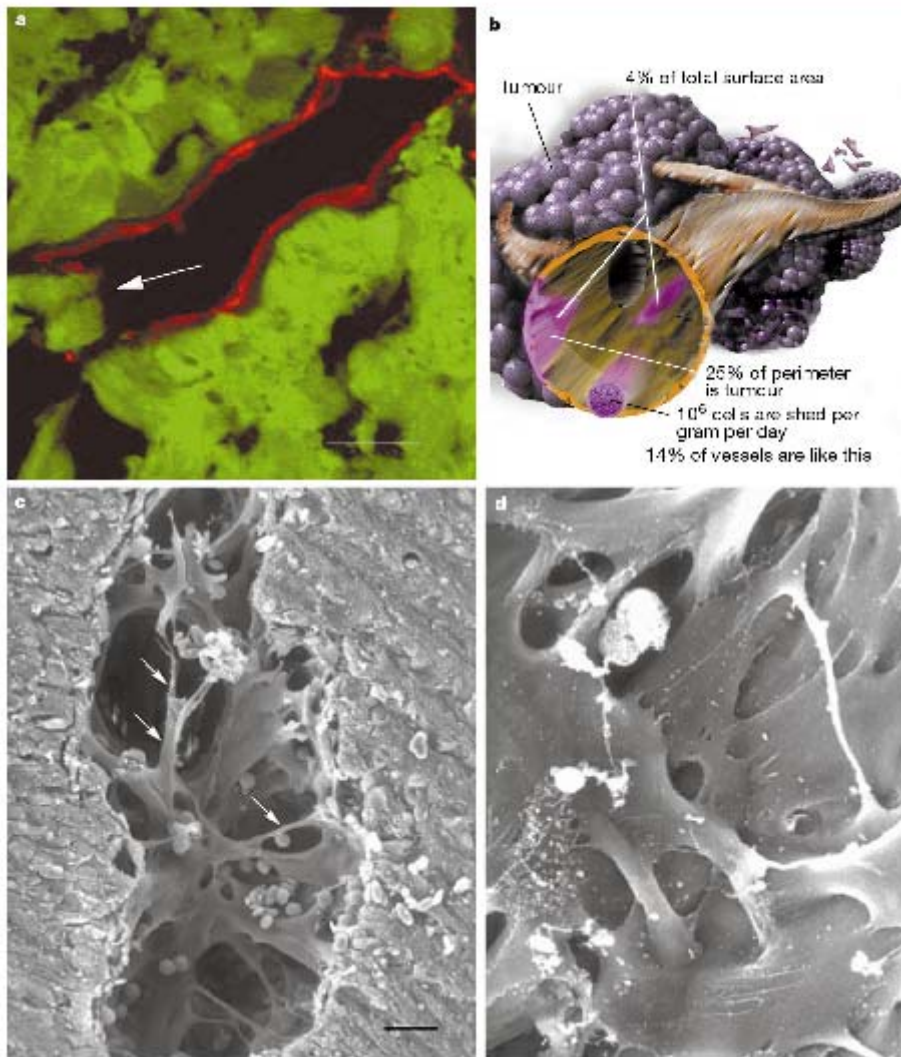
(Interferon-a, γ) κ.α. Ο μηχανισμός που ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα δεν είναι γνωστός. Παρόλα αυτά, η συνεισφορά των κυττάρων αυτών στη δημιουργία των καρκινικών αιμοφόρων αγγείων έχειδειχθεί από πολλές πειραματικές μελέτες (11, 19-22).

1.8 Χαρακτηριστικές διαφορές «καρκινικών» και φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων.

Η παθολογική νεο-αγγειογένεση διακρίνεται από τη φυσιολογική από την απώλεια της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης, με συνέπεια τα νέα αιμοφόρα αγγεία να φέρουν κάποια χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από αυτά που σχηματίζονται κατά την αντίστοιχη φυσιολογική διεργασία (23).

Συγκεκριμένα τα καρκινικά αιμοφόρα αγγεία διαφέρουν αρχιτεκτονικά από τα φυσιολογικά, παρουσιάζοντας ανώμαλο, ελικοειδές και διογκωμένο σχήμα, ενώ πολλές φορές δύνανται να παρουσιάζουν απότομα διακοπτόμενα τμήματα. Επίσης, δεν είναι οργανωμένα σε τριχοειδή αγγεία, φλεβίδια και μικρές αρτηρίες, αλλά παρουσιάζουν χαοτικά χαρακτηριστικά και των τριών κατηγοριών. Το καρκινικό αγγειακό δίκτυο παρουσιάζεται πολλές φορές αιμορραγικό, ενώ τα ίδια τα αγγεία εμφανίζονται να περιλαμβάνουν καρκινικά κύτταρα, ή πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα ενσωματωμένα στο αγγειακό τοίχωμα (3, 24, 25).

Επιπροσθέτως, τα καρκινικά αιμοφόρα αγγεία δεν επανέρχονται ποτέ σε «αδράνεια», συνεχώς εξαπλώνονται και η αγγειογενετική δραστηριότητα που λαμβάνει χώρα σε αρχόμενες *in situ* καρκινικές, ή καρκινικές καταστάσεις είναι αισθητά μεγαλύτερου βαθμού και έντασης σε σύγκριση με αυτή που λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τέλος η ροή αίματος μέσα από αυτά τα αγγεία είναι αργή και δυσχερής λόγω των ανωμαλιών που παρουσιάζουν μορφολογικά.



Εικόνα 1.4

Εικόνες χαοτικών και μωσαϊκών καρκινικών αγγείων.

α) Εικόνα καρκινικού κυττάρου στο εσωτερικό καρκινικού αγγείου (το οποίο χαρακτηρίζεται ως μωσαϊκό αγγείο) που βρίσκεται στο αγγειακό τοίχωμα καρκίνου του παχέως εντέρου. Ο πράσινος φθορισμός αντιστοιχεί σε καρκινικά κύτταρα, ενώ ο κόκκινος σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

β) Ποσοτικοποίηση μωσαϊκών αγγείων. Στον καρκίνο του παχέως εντέρου το 15% περίπου των καρκινικών αγγείων έχουν χαρακτήρα «μωσαϊκού» με τα καρκινικά κύτταρα να αποτελούν το 4% της συνολικής επιφάνειας του αγγείου. Τα μωσαϊκά αγγεία μεταφέρουν περίπου 10^6 κύτταρα ανά ημέρα.

γ), δ) εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της εσωτερικής επιφάνειας καρκινικού αγγείου που προέρχεται από όγκο μαστού σε ποντίκι και παρουσιάζει μορφολογικές ανωμαλίες: γ) τα βέλη δείχνουν ανώμαλα ενδοθηλιακά κύτταρα που διαιρούν τον αυλό του αγγείου, και δ) Πολυάριθμα ενδοκυτταρικά χάσματα μεγέθους 1-5 μm .

1.9 Μέθοδοι εκτίμησης-αποτίμησης της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο.

Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την αγγειογένεση, γίνεται φανερό ότι δεν είναι εύκολο να καθοριστεί μία και μόνο μέθοδος για την εκτίμηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο. Για αυτό έγινε προσπάθεια να εντοπιστούν ένας ή περισσότεροι δείκτες της αγγειογένεσης με σκοπό:

α) να αναγνωριστεί ένας αγγειογενετικός δείκτης που θα βοηθήσει στην ευχερέστερη ταξινόμηση των όγκων,

β) να βρεθεί ένας πιθανός ασφαλής προγνωστικός δείκτης της νόσου, δεδομένου ότι η αγγειογενετική δραστηριότητα εμφανίζει ετερογένεια ακόμα και μέσα στον ίδιο τον όγκο,

γ) να αναγνωριστούν οι ασθενείς που πιθανά να ωφεληθούν περισσότερο από μία αντι-αγγειογενετική θεραπεία, καθώς και

δ) να εντοπιστούν οι αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να αποτελέσουν μέσο παρακολούθησης της επιτυχίας της θεραπευτικής αγωγής.

Η κυριότερη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την αξιολόγηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας είναι η μέτρηση των μικροαγγείων εντός του όγκου (microvessel count, MCV), ή μέτρηση της αγγειακής πυκνότητας (microvessel density, MVD) με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων και πανενδοθηλιακών δεικτών ή αντισωμάτων που στοχεύουν σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά κόρον είναι οι εξής: factor VIII related antigen, anti-CD 31, anti-CD 34, anti-CD 36, anti-EN-4. Μειονεκτήματα των πανενδοθηλιακών δεικτών αποτελούν: η έλλειψη ειδικότητας ως προς το διαχωρισμό αγγείων αίματος ή λεμφικού συστήματος, η μη ειδική χρώση και άλλων κυτταρικών πληθυσμών (πλασματοκύτταρα) και η αδυναμία διάκρισης μεταξύ ενεργοποιημένου και αδρανούς ενδοθηλίου. Νέοι δείκτες πιο ειδικοί από τους προηγούμενους είναι οι: anti-EP, anti-CD 105, LM 609 (anti-integrin $\alpha\beta 3$). Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν σφάλματα λόγω υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση του ανοσοϊστοχημικού αποτελέσματος αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι α) του Chalkey με την οποία υπολογίζεται ο αριθμός των

σημείων ενός πλέγματος που διέρχονται από τα αγγεία, και β) το πολυπαραγοντικό σύστημα επεξεργασίας εικόνας με ηλεκτρονικό υπολογιστή που αξιολογεί την περιοχή αγγειοποίησης, τον αριθμό των μικροαγγείων, των περικυττάρων και την ένταση της χρώσης.

Ο αριθμός των μικροαγγείων εντός του όγκου (MVD ή MCV) έχει συσχετιστεί με διάφορες κλινικές παραμέτρους όπως το μέγεθος του όγκου και ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου, καθώς και με την πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών σε διάφορους τύπους καρκίνων. Καθώς όμως οι καρκινικοί όγκοι παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ακόμη και όταν πρόκειται για τον ίδιο ιστό, ο αριθμός MVD δεν μπορεί να αποτελέσει ενιαίο δείκτη για όλους τους όγκους και να αποτελέσει τη βάση για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και την πρόγνωση της νόσου. Άλλες μη επεμβατικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για την αποτίμηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας γύρω από τους όγκους αποτελούν ο υπέρηχος Doppler, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET) και η απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, MRI) (26).

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι, εκτός από αδυναμίες που οφείλονται σε τεχνικές δυσκολίες κατά την εφαρμογή τους, παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι δεν αποτελούν μέτρο της πραγματικής λειτουργίας των αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών γονιδίων που ρυθμίζουν την αγγειογενετική δραστηριότητα σε έναν όγκο. Ο αριθμός μικροαγγείων του όγκου προσπαθεί να περιγράψει το φαινόμενο της αγγειογένεσης εκ του αποτελέσματος, ενώ το ίδιο το βιοχημικό μονοπάτι μας είναι στην ουσία άγνωστο. Για αυτό τα τελευταία χρόνια γίνεται μια μεγάλη στροφή της ερευνητικής πράξης στην αξιολόγηση της έκφρασης των ίδιων των αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων στους διάφορους τύπους καρκίνου, με σκοπό να ελεγχθεί και να προσδιοριστεί η πιθανή τους χρήση ως μοριακοί δείκτες της αγγειογενετικής δραστηριότητας και της πρόγνωσης της νόσου του καρκίνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή. Ποιοι είναι οι παράγοντες που συμμετέχουν στην αγγειογένεση.

Η δημιουργία νέων αγγείων αίματος από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο των ιστών αποτελεί μια πολυσταδιακή, πολυπαραγοντική και πολύπλοκη διαδικασία η οποία διεγείρεται από ένα πλήθος αιτιών (υποξία, μηχανικό ή μεταβολικό στρές κ.α.). Η αγγειογενετική δραστηριότητα σε έναν ιστό σε μια δεδομένη χρονική στιγμή καθορίζεται από το αθροιστικό αποτέλεσμα αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων. Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την υπέρμετρη αύξηση των επαγωγέων της αγγειογένεσης, ή για την καταστολή των αναστολέων αυτής, ή και των δύο ταυτόχρονα, και έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της αγγειογενετικής διαδικασίας δεν είναι ακόμα γνωστός.

Η εικόνα περιπλέκεται ακόμα περισσότερο αν αναλογιστεί κανείς ότι η νεο-αγγειογένεση συνδέεται άμεσα και με άλλους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων και στη μετάσταση. Ορισμένα ογκογονίδια όπως το *proto-c-met* και τα *K, H-ras* καταστέλλουν την έκφραση φυσικών αναστολέων της διαδικασίας, όπως για παράδειγμα της θρομβοσπονδίνης (TSP-1) και προάγουν την αγγειογένεση και την ανάπτυξη των όγκων. Άλλα πάλι ογκογονίδια στα οποία περιλαμβάνονται τα *ras, myc, raf,* και *fos* επάγουν την έκφραση του VEGF με συνέπεια τη διέγερση του σχηματισμού νέων αγγείων. Σε αντίθεση ορισμένα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, όπως το wild-type *p53*, έχει βρεθεί ότι καταστέλλουν την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης της TSP-1. Τέλος κοινά μοριακά μονοπάτια φαίνεται να ακολουθούν η αγγειογένεση με την απόπτωση, καθώς γονίδια όπως το *B-Raf* εμπλέκονται και στις δύο διαδικασίες, ενώ ορισμένοι αναστολείς της αγγειογένεσης (αγγειοστατίνη, ενδοστατίνη και ιντερλευκίνη-12) έχει δειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση ενδοθηλιακών αλλά και καρκινικών κυττάρων (7, 27-30).

2.2 Επαγωγείς της αγγειογένεσης.

Η νεο-αγγειογένεση επάγεται από την έκκριση ειδικών αυξητικών παραγόντων που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ή ορισμένα κύτταρα του στρώματος όπως τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα και τους ινοβλάστες. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυτάρων, με πρωταρχικό ρόλο να ενεργοποιούν την κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες δρουν σε ορισμένα είδη κυττάρων μόνο, ενώ άλλοι δεν παρουσιάζουν κυτταρική εξειδίκευση. Μέχρι σήμερα έχει αναγνωριστεί πλήθος αγγειογονικών αυξητικών παραγόντων μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικοί είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας PD-ECGF (Platelet Derived – Endothelial Cell Growth Factor), οι αυξητικοί παράγοντες μεταμόρφωσης TGFs (basic and acidic Transforming Growth Factor), ο όξινος και βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας α, β -FGF (acidic and basic Fibroblast Growth Factor), ο TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), οι ιντερλευκίνες 8 και 6 IL-8, IL-6, η λεπτίνη (Leptin) και άλλοι (7).

Οι κυτοκίνες αποτελούν μια ξεχωριστή οικογένεια αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα αλλά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες, και έχουν την ικανότητα να διεγείρουν τη χυμική και την κυτταρική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ιντερλευκίνες είναι κυτοκίνες οι οποίες συνιστούν αυξητικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και ειδικότερα στην έλξη υποστηρικτικών μορίων που συνιστούν τη νέα βασική μεμβράνη των νέο-σχηματισθέντων αγγείων.

Στον πίνακα 2.1 που ακολουθεί περιλαμβάνονται οι πιο σημαντικοί αυξητικοί παράγοντες που συνιστούν επαγωγείς της αγγειογένεσης και η λειτουργία τους. Παράλληλα ολοένα και περισσότεροι επαγωγείς της αγγειογένεσης γίνονται γνωστοί τα τελευταία χρόνια όπως για παράδειγμα οι εφρίνες και οι υποδοχείς τους (Ephrines and Eph receptors) με χαρακτηριστικούς εκπροσώπους την εφρίνη A1, που παίζει ρόλο στην φλεγμονώδη αγγειογένεση που επάγεται από τον tumor necrosis factor α , και την εφρίνη B1 που προάγει τη συνάθροιση και συγκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων (31).

Πίνακας 2.1: Οι σημαντικότεροι αυξητικοί παράγοντες που συνιστούν επαγωγείς της αγγειογένεσης και η λειτουργία τους.

Επαγωγείς αγγειογένεσης	Λειτουργία
Vascular endothelial growth factor (VEGF) και μέλη της ίδιας οικογένειας	Επαγωγή πρόδρομου δικτύου, αγγειογένεσης, διαπερατότητας αγγείων, συγκόλλησης λευκοκυττάρων
VEGF Receptors, neuropilin 1 (NRP-1)	Ενοποίηση σημάτων αγγειογένεσης και επιβίωσης κυττάρων
Angiopoietin 1 and its receptor Tie2	Σταθεροποίηση αγγείων, αναστολή διαπερατότητας
PDGF-BB and receptors	Προσέλκυση λείων μυϊκών κυττάρων
TGF-β1, endoglin, TGF-β receptors	Επαγωγή δημιουργίας εξωκυττάρου υλικού
FGF, Hepatocyte Growth factor, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)	Επαγωγή αγγειογένεσης και αρτηριογένεσης
Integrins	Υποδοχείς πρωτεασών και μεταλλοπρωτεασών
VE-Cadherin, platelet-endothelial cell adhesion molecule: PECAM (CD31)	Μόρια συνένωσης ενδοθηλιακών κυττάρων
Ephrins	Ρύθμιση φλεβικής και αρτηριακής εξειδίκευσης
Plasminogen activators, Mettaloproteinases (MMPs)	Απελευθέρωση και ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων, αποικοδόμηση βασικής μεμβράνης, αναδιαμόρφωση εξωκυττάριας ουσίας
Proteinase inhibitors (PAI-1)	Σταθεροποίηση αγγείων
Nitric oxide synthase (NOS), COX-2	Επαγωγή αγγειογένεσης και αγγειοδιαστολής
AC 133	Ρύθμιση διαφοροποίησης αγγειοβλαστών
Chemokines	Πλειοτροπικός ρόλος
Inhibitors of differentiation (Id1/Id3)	Ρύθμιση πλαστικότητας ενδοθηλιακών κυττάρων

2.3 Αναστολείς της αγγειογένεσης.

Στους φυσιολογικούς ιστούς η αγγειογένεση βρίσκεται σε «νάρκη» λόγω της εξισορρόπησης των αυξητικών παραγόντων από τους ενδογενείς αναστολείς της διαδικασίας. Οι αναστολείς συνιστούν μόρια που εμπλέκονται σε ένα, ή και περισσότερα στάδια της αγγειογένεσης, και ασκούν τη βιολογική τους δράση στον αναπτυσσόμενο πληθυσμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ή σε μια ποικιλία κυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων. Η βιολογική λειτουργία των αναστολέων στηρίζεται είτε στον ανταγωνισμό της δράσης των αυξητικών παραγόντων, είτε στην αναστολή του σχηματισμού μικροσωληνιδίων, ή της ανάπτυξης και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ή της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης μέσω καταστολής των υπεύθυνων πρωτεολυτικών ενζύμων (13, 31). Με βάση το μηχανισμό δράσης τους οι αγγειοκατασταλτικοί παράγοντες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς της κινητικότητας, μετάστασης και συγκόλλησης των κυττάρων.
Παράδειγμα αποτελούν οι θρομβοσπονδίνες 1 και 2 (TSP-1, 2) και η ενδοστατίνη (endostatin).
2. Αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη
Παράδειγμα αποτελούν οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (MMPs inhibitors, η αντιθρομβίνη κα.
3. Ανταγωνιστές αγγειογενετικών παραγόντων
Παραδείγματα αποτελούν μόρια με άμεση αντι-αγγειογενετική δράση όπως οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων VEGF, και FGF: VEGF Receptors και FGF Receptors.
4. Αναστολείς ενδοκυτταρικής επικοινωνίας ενδοθηλιακών κυττάρων
Παράδειγμα αποτελεί η Αγγειοποιητίνη 2 (Angiopoietin 2), η οποία παρεμποδίζει τη σύνδεση της Angiopoietin 1 με τον υποδοχέα της Tie2, με συνέπεια την αναστολή δημιουργίας μικροσωληνιδιακών αγγείων από την Ang1. Παρόμοια δράση έχουν και οι αναστολείς ιντεγκρινών.

5. Κυτοκίνες με αντιαγγειογενετική δράση

(στην κατηγορία αυτή ανήκουν μόρια όπως η ιντερφερόνη-α και γ (Interferon-α, γ) και οι ιντερλευκίνες-8 και 12 (IL-8, IL-12))

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 30 αναστολείς της αγγειογένεσης. Στον πίνακα 2.2 που ακολουθεί αναφέρονται οι κυριότεροι αγγειοκατασταλτικοί παράγοντες και ο τρόπος λειτουργίας τους.

Πίνακας 2.2: Οι σημαντικότεροι παράγοντες που συνιστούν αναστολείς της αγγειογένεσης και η λειτουργία τους.

Αναστολείς αγγειογένεσης	Λειτουργία
VEGF Receptor-1, neurophilin 1 (NRP-1)	Δεξαμενή δέσμευσης VEGF, Platelet Induced Growth Factor (PIGF)
Angiopoietin-2 (Ang 2)	Ανταγωνίζεται την Ang 1
Angiostatin, plasminogen kringles	Καταστολή αγγειογένεσης
Endostatin (collagen XVIII fragment)	Αναστολή μετανάστευσης και επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων
Vasostatin, calreticulin	Αναστολή ενδοθηλιακής ανάπτυξης
Platelet factor-4, Prolactin (M 16K)	Αναστολή δέσμευσης VEGF και bFGF.
MMPs inhibitors and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs)	Καταστολή παθολογικής αγγειογένεσης
Meth-1, Meth-2	Αναστολείς που περιέχουν τμήματα MMPs, TMPs
IFN-α, β, γ, Inducible protein-10, IL-12, 18	Αναστολή ενδοθηλιακής μετανάστευσης, καταστολή bFGF
Osteopontin fragment	Παρεμπόδιση μετάδοσης σήματος ιντεγκρινών
VEGI (member of TNF family)	Ρύθμιση κυτταρικής ανάπτυξης
maspin	Αναστολέας πρωτεασών
Prothrombin-2, antithrombin III fragment	Αναστολή ενδοθηλιακής ανάπτυξης
Canstatin, proliferin related protein, restin	Άγνωστος μηχανισμός δράσης

2.4 Αντι-αγγειογενετικές θεραπείες.

2.4.1 Εισαγωγή

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός νέων αγγείων αίματος εμπλέκεται σε πλήθος παθολογικών διαδικασιών εκτός του καρκίνου, η αγγειογένεση αποτέλεσε από πολύ νωρίς αντικείμενο μελέτης ως θεραπευτική προσέγγιση για πλήθος ασθενειών όπως για παράδειγμα η διαβητική παθολογία του αμφιβληστροειδούς, η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα καθώς και καρδιοαγγειακές παθήσεις. Οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες που αναπτύχθηκαν βασίζονται στη χρήση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, οι οποίοι έχει δειχθεί σε προ-κλινικές μελέτες σε ζώα ότι αναστέλλουν την αγγειογένεση χωρίς να εμφανίζουν τοξικότητα. Έκτοτε, πλήθος αναστολέων της αγγειογένεσης αποτέλεσαν αντικείμενο κλινικών δοκιμών και ορισμένοι από αυτούς έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη θεραπεία κατά του καρκίνου (33-35).

Οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες που αναπτύχθηκαν στηρίχθηκαν στους παρακάτω μηχανισμούς:

1. Παρεμβολή στη δράση αγγειογενετικών παραγόντων μέσω παρεμπόδισης της σύνδεσής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς ή στο μηχανισμό μεταγωγής σήματος από αυτούς (signaling action).
2. Ενεργοποίηση μεταφοράς ενδογενών αναστολέων
3. Στόχευση ευθέως στο καρκινικό αγγειακό δίκτυο

2.4.2 Αυξητικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές δοκιμές στα πλαίσια αντιαγγειογενετικής θεραπείας.

Περισσότεροι από 75 παράγοντες που βρέθηκαν να καταστέλλουν την αγγειογενετική διαδικασία ή συνιστούν ενδογενείς αναστολές αυτής, αποτέλεσαν αντικείμενο κλινικών δοκιμών στα πλαίσια εύρεσης αντιαγγειογενετικής θεραπείας. Οι παράγοντες αυτοί χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση το μηχανισμό δράσης τους ως εξής:

α) Αναστολείς της κυτταρικής κινητικότητας, μετάστασης και συγκόλλησης:

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αναστολείς της δράσης των μεταλλοπρωτεασών όπως για παράδειγμα οι PEX, Batimastat (BB-94), AG-3340 κ.α., και μόρια-αναστολείς της κυτταρικής συγκόλλησης όπως για παράδειγμα το LM 609 το οποίο αποτελεί αναστολέα μιας ιντεγκρίνης.

β) Αναστολείς ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης όπως η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) και η ενδοστατίνη που έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα στον καρκίνο του μαστού και συνθετικά μόρια όπως το TNP-470 και η θαλιδομιδίνη (Thalidomide).

γ) Παράγοντες που παρεμποδίζουν αγγειογενετικούς παράγοντες

Αντισώματα έναντι του VEGF, υδατοδιαλυτοί υποδοχείς του VEGF και συνθετικά μόρια μικρού μοριακού βάρους που αποτελούν αναστολείς υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης όπως το SU 5416 έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε κλινικές δοκιμές σταδίου II.

δ) Μόρια με ποικίλη δράση

Αναστολείς των κυκλο-οξυγενασών 1 και 2 (COX-1, 2) που είναι μόρια που ελέγχουν πολλά κυτταρικά μονοπάτια ενώ παράλληλα ασκούν και ρυθμιστική δράση στην αγγειογένεση έχουν επίσης αποτελέσει αγγειογενετικά φάρμακα. Παράδειγμα αποτελούν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ασπιρίνη κ.α.

ε) Μόρια που στοχεύουν στο καρκινικό αγγειακό δίκτυο

Τέτοιο μόριο είναι το DT385 που στοχεύει σε ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον VEGF.

Στον πίνακα 2.3 που ακολουθεί περιγράφονται ορισμένα μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές στα πλαίσια αντιαγγειογενετικής θεραπείας και ο μηχανισμός δράσης τους.

Πίνακας 2.3: Αντιαγγειογενετική θεραπεία: Παράγοντες και μηχανισμός δράσης τους.

Παράγοντες αντιαγγειογενετικής θεραπείας	Μηχανισμός δράσης
<u>Αναστολείς ενδοθηλιακής διαμόρφωσης:</u> Batimastat, Neovastat, TIMP-1, 2, 3, PAI-1, uPA	Αναστολείς των MMPs και uPA. Μπλοκάρουν τη μετάσταση ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων
<u>Αναστολείς μορίων συγκόλλησης:</u> $\alpha_v\beta_3$, Benzodiazapine derivatives	Αναστολή ενδοθηλιακής συγκόλλησης και επαγωγή απόπτωσης
<u>Αναστολείς ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων:</u> Endostatin, angiostatin, IFN- α,γ , IL-12, TSP-1, thalidomide, linomide	Αναστολή ενδοθηλιακής διαφοροποίησης ανάπτυξης, μετανάστευσης, επαγωγή απόπτωσης.
<u>Αναστολείς διαμεσολαβητών και υποδοχέων τους:</u> IFN-a, PF-4, prolactin, suramin, bFGF Ab, antisense-bFGF, aspirin, VEGF Ab	Αναστολείς VEGF, FGF2, καταστολή ενδοθηλιακής ανάπτυξης.
<u>Αναστολείς ενδοκυτταρικών ενδοθηλιακών σημάτων:</u> Genistein, Ang-2, Lavendustin A	Αναστολείς τυροσινικών κινασών, Tie-2, ενδοθηλιακής μετανάστευσης και δαιφοροποίησης

2.4.3 Γονιδιακή αντι-αγγειογενετική θεραπεία.

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί την πλέον ελκυστική προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου. Τα προβλήματα που προέκυψαν μέχρι τώρα με τις θεραπείες αυτές που προχώρησαν σε κλινικές δοκιμές, αφορούν την ετερογένεια των καρκινικών κυτταρικών πλυθυσμών και την γενετική αστάθεια των καρκινικών κυττάρων-στόχων (32-35). Τα προβλήματα αυτά όμως δεν υφίστανται στην περίπτωση της αγγειογενετικής γονιδιακής

θεραπείας καθώς στόχο αποτελούν τα γενετικά σταθερά ενδοθηλιακά κύτταρα και επιτυγχάνεται καταστολή των όγκων ανεξάρτητα από την ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων. Πλεονέκτημα επίσης αποτελεί η βελτίωση των ικών φορέων, η οποία επιτρέπει την έκφραση των εισαγόμενων γονιδίων για μήνες ή χρόνια στον οργανισμό. Από τη μέχρι τώρα εφαρμογή της αγγειογενετικής γονιδιακής θεραπείας με την εισαγωγή του cDNA που κωδικοποιεί την αγγειοστατίνη (angiostatin) (36), το PF-4 (37), ή antisense VEGF (38) επετεύχθηκε αναστολή της ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και αναστολή της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης των όγκων *in vivo*.

2.4.4 Πλεονεκτήματα και προβλήματα της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας. Μελλοντικοί στόχοι.

Η αντιαγγειογενετική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής αντικαρκινικής θεραπείας διότι στοχεύει στα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ευρεία εφαρμογή. Πρώτον, τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε απραξία, ενώ τα καρκινικά είναι ενεργά, πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν ταχύτατα. Επίσης είναι γενετικά σταθερά και αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό-στόχο σε σύγκριση με τον ετερογενή πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων, και είναι εύκολα προσβάσιμα από τα φάρμακα. Επιπλέον το καρκινικό ενδοθήλιο υπερκεφράζει συγκεκριμένα μόρια τα οποία μπορούν να αποτελέσουν ιδανικούς στόχους από κατάλληλους αναστολείς χωρίς να επηρεάζονται φυσιολογικοί ιστοί. Τέλος ορισμένα αντιαγγειογενετικά φάρμακα παρουσιάζουν συνεργιστική δράση με ορισμένα κυτταροτοξικά φάρμακα και την ακτινοθεραπεία (26, 39).

Μειονέκτημα συνιστά το γεγονός ότι οι προ-κλινικές μελέτες που αφορούν αντιαγγειογενετικές θεραπείες πραγματοποιούνται σε υποδόριους όγκους που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από τους ανθρώπινους όγκους στους οποίους το όργανο-ξενιστής μπορεί να μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά του όγκου. Επίσης οι μελέτες αυτές έχουν ως στόχο τη συστολή και όχι την εκρίζωση του όγκου, ενώ έστω και λίγα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επαναδημιουργήσουν τον όγκο σε ικανό χρονικό διάστημα. Είναι πολύ πιθανό, εάν στοχεύσουμε σε ένα αγγειογενετικό μόριο, ο όγκος να χρησιμοποιήσει ένα εναλλακτικό μόριο που θα του επιτρέψει να συνεχίσει να

αναπτύσσεται, οπότε να πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ένα συνδυασμό αναστολέων, ή ακόμη ο όγκος να αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης σε αυτό το μόριο/συνδυασμό σε μακροχρόνια θεραπεία.

Συνεπώς όλα τα παραπάνω πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό νέων αντιαγγειογενετικών θεραπειών. Οι προκλινικές μελέτες πρέπει να προσανατολίζονται στην εξαφάνιση των καρκινικών κυττάρων και να διαρκούν τόσο χρονικό διάστημα ώστε να εξασφαλίζουν ότι δεν θα υπάρξει υποτροπή. Ταυτόχρονα είναι αναγκαίο να μελετηθούν σε βάθος χρόνου οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες των αγγειογενετικών φαρμάκων στους φυσιολογικούς ιστούς και στη διαδικασία της φυσιολογικής αγγειογένεσης, οι οποίες μέχρι τώρα μας είναι άγνωστες. Συμπερασματικά η αντι-αγγειογενετική θεραπεία συνιστά την πλέον υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου, η οποία αναμένεται να βελτιώσει την πρόγνωση και την ποιότητα ζωής των ασθενών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

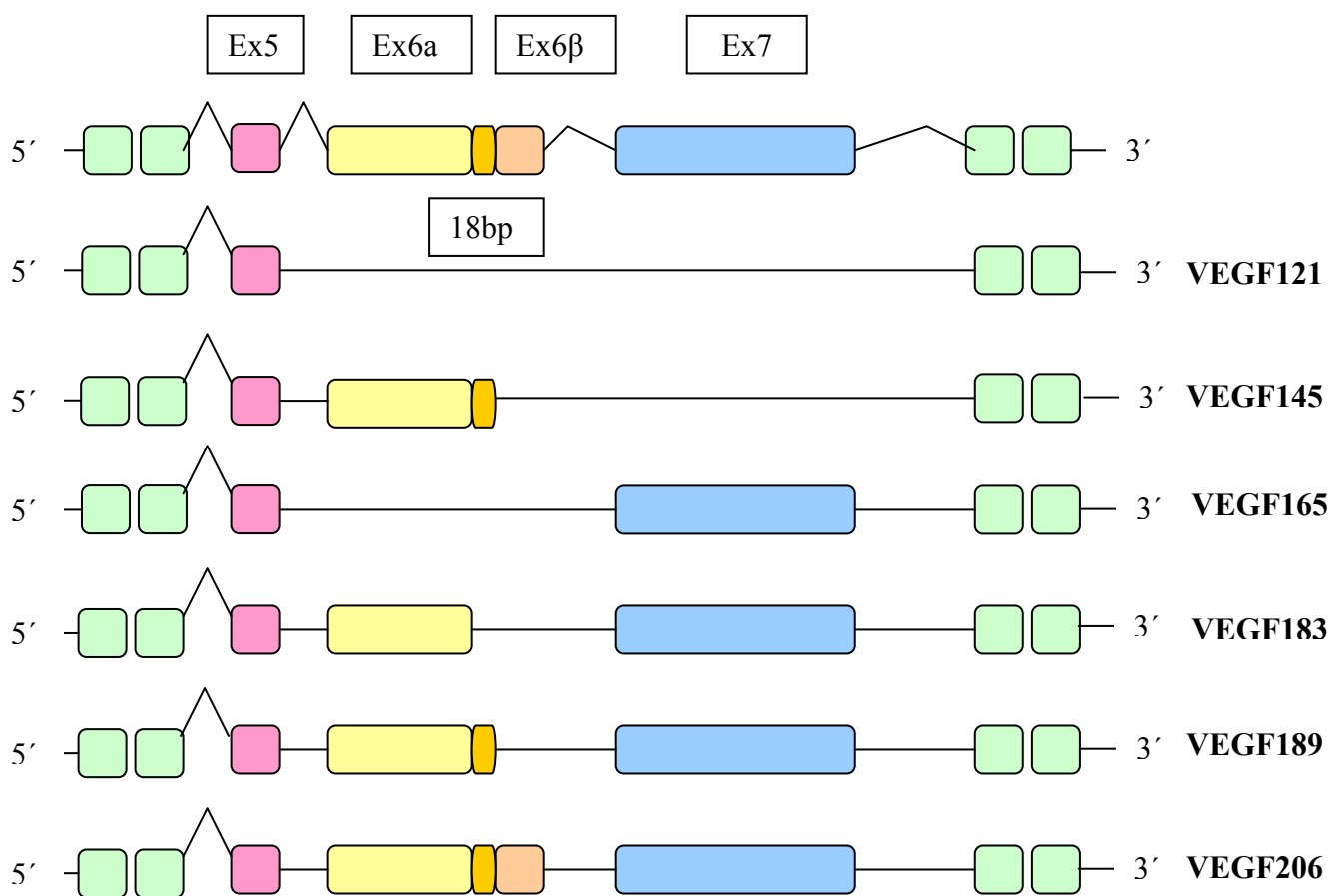
3.1 Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης (Vascular endothelial growth factor, VEGF)

3.1.1 Δομή και οργάνωση του VEGF

Το γονίδιο του ανθρώπινου αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, *veg*f) εδράζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 6, στη θέση 6p21.3. Ο VEGF χαρακτηρίστηκε αρχικά από την ικανότητά του να επάγει τη διαπερατότητα, τη διαρροή των αγγείων και την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, για αυτό και αρχικά ονομάστηκε αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας (vascular permeability factor).

Η οργάνωση του γονιδίου περιλαμβάνει 8 εξόνια στα οποία παρεμβάλλονται 7 εσόνια και η κωδικοποιούσα περιοχή αποτελείται από 14000 βάσεις. Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι ισομορφές που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων, το οποίο αποδίδει πέντε πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούνται από 121, 165, 189, 206, 145 και 183 αμινοξέα αντίστοιχα και τα οποία αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, και VEGF-E. Από το εναλλακτικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου προκύπτουν και τρία άλλα μέλη της οικογένειας οι πλακουντιακοί αυξητικοί παράγοντες: PlGFs-1,2,3 (Placental Growth Factors-1,2,3). Τα εξόνια 1-5 και 8 βρίσκονται σε όλες τις ισομορφές του VEGF και αυτό που τις διαχωρίζει είναι η παρουσία των πεπτιδίων που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6α, 6β και 7 του γονιδίου. Ο VEGF165 στερείται τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 6, ενώ ο VEGF121 στερείται αυτά που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6 και 7. Ο VEGF183 σχηματίζεται με έλλειψη μιας περιοχής 18 ζευγών βάσεων από το εξόνιο 6α. Στον VEGF189 και στο VEGF206 υπάρχει μια εισαγωγή 24 και 17 αμινοξέων εμπλουτισμένων σε βασικά κατάλοιπα αντίστοιχα. Ο VEGF145 περιλαμβάνει το εξόνιο

6α αλλά όχι το 7. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται σχηματικά το εναλλακτικό μάτισμα του VEGF mRNA που αποδίδει τις διαφορετικές ισομορφές του.



Εικόνα 3.1: Παριστάνεται σχηματικά το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του VEGF που αποδίδει τις έξι ισομορφές του.

Όλα τα μέλη της οικογένειας του VEGF εκκρίνονται ως ομοδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο 8 καταλοίπων κυστεΐνης. Η περιοχή δέσμευσης στους αντίστοιχους υποδοχείς σχηματίζεται από τη σύνδεση με δισουλφιδικές γέφυρες δύο μονομερών με αντιπαράλληλη φορά. Η σύνδεση με τους υποδοχείς γίνεται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και στους δύο πόλους του ομοδιμερούς, κατά τον ίδιο τρόπο.

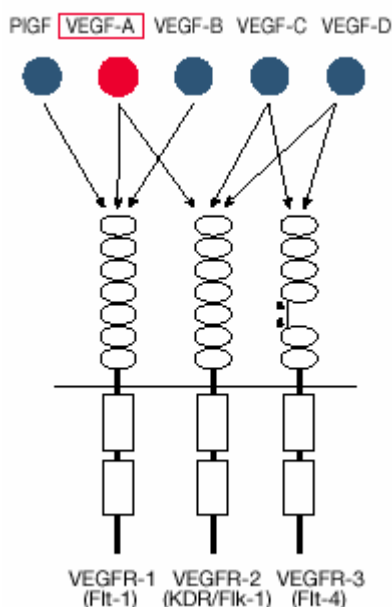
Οι πέντε ισομορφές του VEGF διαφέρουν ως προς τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Ο VEGF165 (B) αποτελεί την κύρια εκκρινόμενη ισομορφή τόσο από φυσιολογικά όσο και από καρκινικά κύτταρα, αλλά και οι VEGF121 και 189 απαντώνται συχνά στους ιστούς και τα κύτταρα που εκφράζουν τον VEGF. Ο VEGF145 είναι η κυριότερη ισομορφή που εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Ο VEGF206 αποτελεί γενικά σπάνια ισομορφή. Οι VEGF 165, 189 και 206 είναι βασικά πολυπεπτίδια με ικανότητα δέσμευσης ηπαρίνης, ενώ περιορίζονται και κατακρατούνται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο. Ο VEGF121 αποτελεί διαλυτό όξινο πολυπεπτίδιο που δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύει ηπαρίνη και διαχέεται ελεύθερα στον εξωκυττάριο χώρο. Με την επίδραση πρωτολυτικών ενζύμων οι μεγαλύτερες ισομορφές αποδίδουν ένα θραύσμα που περιέχει τα 110 πρώτα κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου του VEGF, το οποίο όμως παρουσιάζει 50-100 φορές μικρότερη δραστικότητα από τις άλλες ισομορφές του VEGF (40-42).

3.1.2 Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του VEGF.

Τα μέλη της οικογένειας του VEGF έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με μια ομάδα κυτταρικών επιφανειακών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί που εμπλέκονται στην έναρξη του καταρράκτη μετάδοσης σήματος, σε απόκριση της έκκρισης των VEGF πρωτεϊνών, αποτελούν μια στενά συνδεδεμένη οικογένεια υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης με 3 μέλη: α) VEGFR-1 (ή Flt-1), β) VEGFR-2 (ή Flk-1/KDR) και γ) VEGFR-3 (ή Flt-3). Οι VEGFR-1 και 2 εντοπίζονται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ ο VEGFR-3 στα λεμφικά κύτταρα. Επιπλέον υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς όπως οι νευροφιλίνες (neuropilins 1,2), οι ιντεγκρίνες κ.α. οι οποίες υποβοηθούν τη δέσμευση στους κυρίως υποδοχείς (43).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι VEGFR-1, 2 είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική ανάπτυξη του αρχέγονου αγγειακού δικτύου, ο ρόλος τους όμως στην ενδοθηλιακή ανάπτυξη και διαφοροποίηση φαίνεται να διαφέρει. Ο VEGFR-1 έλκει μονοκύτταρα και μακροφάγα στην περιοχή της αγγειογένεσης μέσω επαγωγής της διαφοροποίησης πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων. Η επίδρασή του στην αγγειογενετική διαδικασία φαίνεται να είναι κατασταλτική, ενώ ο VEGFR-2 φαίνεται να διαμεσολαβεί στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και ανάπτυξη των όγκων

από τον VEGF. Αυτό αποδεικνύουν πειράματα σε ποντίκια στα οποία έλλειψη του VEGFR2 οδηγούσε σε αποτυχία σχηματισμού αγγειακού δικτύου, ενώ έλλειψη του VEGFR-1 είχε σαν αποτέλεσμα την υπερπληθώρα ενδοθηλιακών κυττάρων που σχημάτιζαν ανώμαλο αγγειακό δίκτυο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μια υδατοδιαλυτή μορφή του VEGFR-1 είναι αυτή που προκαλεί αρνητική ρύθμιση στην αγγειογένεση δεσμεύοντας το VEGF-A, όπως επίσης και τα ομοδιμερή του υποδοχέα. Αντίθετα τα ετεροδιμερή που σχηματίζουν οι υποδοχείς VEGFR-1 και 2 φαίνεται να έχουν ισχυρότερα αποτελέσματα όσον αφορά τη βιολογική δράση του VEGF από τα ομοδιμερή του VEGFR-2 που θεωρούνται οι κατεξοχήν μεταγωγείς σήματος του VEGF (44, 45). Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του VEGFR-2 φαίνεται πάντως να είναι η διατήρηση της ισορροπίας επιβίωσης/απόπτωσης η οποία είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της αγγειακής ομοιόστασης. Ο VEGFR-3 λόγω της έκφρασής του κυρίως σε λεμφικά αγγειακά κύτταρα φαίνεται να είναι ουσιώδης στην δημιουργία του λεμφικού συστήματος μετά από σύνδεση με τον VEGF-C.



Εκόνα 3.2: Παριστάνεται σχηματικά ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ισομορφών του VEGF με τους υποδοχείς τους VEGFR-1, 2, 3.

3.1.3 Βιολογική δράση και λειτουργία του VEGF

Ο VEGF-A (42kDa) έχει μελετηθεί εκτενέστερα από όλες τις ισομορφές. Αποτελεί ειδικό ισχυρό μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αγγεία, φλέβες, ή αρτηρίες και δεν παρουσιάζει μιτογόνο δράση σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η βιολογική δράση του VEGF-A ή VEGF περιλαμβάνει τη ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων μέσω επαγωγής πόρων και θυρίδων στο ενδοθήλιο (43), που σηματοδοτεί την έναρξη της αγγειογενετικής διαδικασίας. Η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία εξαρτάται επίσης από τον VEGF. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη, να μεταναστεύουν και να σχηματίζουν αγγεία *in vitro*. Ο πολύπλευρος ρόλος του περιλαμβάνει ακόμη την έλξη-συλλογή πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από το μυελό των οστών και την επαγωγή της διαφοροποίησής τους, όπως επίσης και την αναστολή διαφοροποίησης δενδριτικών κυττάρων. Ακόμη ο VEGF επάγει την έκφραση αντι-αποπτοτικών πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός ότι τα λευκά κύτταρα του αίματος και τα αιμοπετάλια περιέχουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης του VEGF, την οποία εκκρίνουν όταν διεγείρονται, υποδεικνύει το ρόλο του στη φλεγμονή και πήξη του αίματος. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα αιμοπετάλια ασθενών με καρκίνο περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης VEGF από ότι υγιείς δότες. Ο VEGF έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πλήθος υγιών κυττάρων, αλλά υπερεκφράζεται σε καρκινικά ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού, του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος κ.α.

Ο VEGF-B μοιάζει πολύ με τον PlGF. Σχηματίζει ετεροδιμερή με τον VEGF-A και αποτελεί υποκαταστάτη του υποδοχέα VEGFR-1. Υφίσταται σε δύο ισομορφές με διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες: α) ο VEGF-B₁₆₇ έχει ικανότητα σύνδεσης με ηπαρίνη και κατακρατείται στις πρωτεογλυκάνες της περι-κυτταρικής ύλης, ενώ ο VEGF-B₁₈₆ έχει ένα υδροφοβικό καρβοξυ-τελικό άκρο και εκκρίνεται από τα κύτταρα. Και οι δύο μορφές του εκφράζονται ευρέως από τα κύτταρα αλλά είναι πιο συχνές στα κύτταρα της καρδιάς και των σκελετικών μυών. Σύνδεση του VEGF-B στον υποδοχέα VEGFR-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του

ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης, γεγονός που υποδηλώνει το ρόλο της ισομορφής αυτής στη ρύθμιση της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, τη συγκόλληση και μετανάστευση των κυττάρων.

Ο VEGF-C είναι ένα ομοδιμερές (21kDa) που συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-2 και 3 και προκαλεί τη φωσφορυλίωσή τους. Επάγει τη μετανάστευση και διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων προάγοντας ειδικά την λεμφο-αγγειογένεση και την αγγειακή διαπερατότητα μέσω του υποδοχέα VEGFR-2. Το mRNA του VEGF-C εκφράζεται, σε χαμηλά επίπεδα, στην καρδιά, στις ωθήκες και στο θυροειδή αδέννα.

Ο VEGF-D παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον VEGF-C και συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-2 και 3. Έχει δειχθεί ότι αποτελεί μιτογόνο παράγοντα των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και το εκφράζεται στον πνεύμονα, στους σκελετικούς μύες, στο παχύ και λεπτό έντερο.

3.1.4 Παράγοντες που επιδρούν στην έκφραση του VEGF.

Πλήθος μηχανισμών φαίνεται να επιδρούν στην έκφραση του VEGF, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η στέρηση γλυκόζης, το οξειδωτικό και μηχανικό στρές, όπως και μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκο-κατασταλτικά γονίδια. Έκθεση σε υποξικό περιβάλλον επάγει γρήγορα και αναστρέψιμα την έκφραση του VEGF μέσω αύξησης της μεταγραφής και σταθεροποίησης του mRNA του γονιδίου. Ο υποξικά επαγόμενος παράγοντας-1 (HIF-1, Hypoxia inducible transcription factor-1) είναι υπεύθυνος για την αύξηση της έκφρασης του VEGF σε αυτές τις περιπτώσεις. Η υπερέκφραση του VEGF λόγω υποξίας προσφέρει στους ιστούς έναν εναλλακτικό μηχανισμό για να αυξήσουν την οξυγόνωσή τους μέσω της ανάπτυξης αγγείων αίματος. Επιστροφή των ιστών σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου οδηγεί σε υποστρόφι των νεοσχηματισμένων αγγείων. Η μεταγραφή του mRNA του VEGF αυξάνεται επίσης από την έκκριση ενός πλήθους αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, όπως για παράδειγμα ο PDGF-BB, EGF (epidermal growth factor), ο TNF- α , ο TGF- β 1 και η ιντερλευκίνη-1 β .

3.2 Βασικός ινοβλαστικός παράγοντας αύξησης (basic Fibroblast growth factor, bFGF)

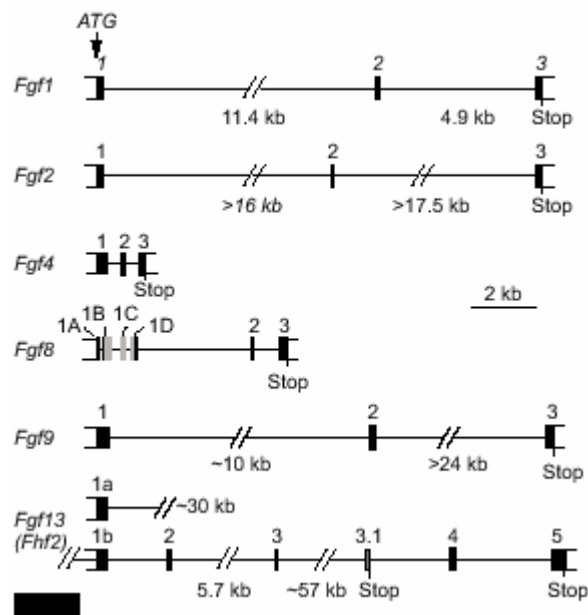
3.2.1 Δομή και οργάνωση των γονιδίων FGF.

Η οικογένεια των FGF πρωτεϊνών αποτελείται από τουλάχιστον 23 μέλη υποκαταστατών FGF και τέσσερις υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης. Οι χρωμοσωμικές θέσεις όλων των *fgf* γονιδίων είναι γνωστές εκτός από αυτή του *FGF16*. Αρκετά *fgf* γονίδια βρίσκονται κατά συστάδες στο γονιδίωμα, όπως τα *FGF3*, 4 και 19 που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11 στη θέση 11q13 και διαχωρίζονται από 40 και 10kb αντίστοιχα. Παρομοίως τα γονίδια *FGF6* και 23 βρίσκονται εντός μιας περιοχής 55kb στο χρωμόσωμα 12p13, ενώ τα *FGF17* και 20 βρίσκονται στο χρωμόσωμα 8p21-22. Το γονίδιο του ανθρώπινου βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (fibroblast growth factor, *fgf*) εδράζεται στο χρωμόσωμα 4, στη θέση q26-q27. Αυτές οι θέσεις στο γονιδίωμα υποδεικνύουν ότι η οικογένεια γονιδίων FGF έχει προκύψει τόσο από χρωμοσωμικό αναδιπλασιασμό, όσο και από μετάθεση κατά τη διαδικασία της εξέλιξης.

Η οργάνωση του γονιδίου περιλαμβάνει 3 εξόνια διαχωριζόμενα από 2 εσόνια. Το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου αυτού εξαπλώνεται σε μια περιοχή που κυμαίνεται από 5kb (*FGF3*, 4) μέχρι πάνω από 100kb (*FGF12*) (46, 47). Το εξόνιο 1 περιέχει τη μεθειονίνη έναρξης της μετάφρασης (AUG κωδικόνιο έναρξης), αλλά υπάρχουν 4 επιπλέον σημεία έναρξης μετάφρασης: 4 κωδικόνια CUG τα οποία εντοπίζονται πριν από το AUG (48-50).

Σε πολλές υπο-οικογένειες του *FGF* το εξόνιο 1 υποδιαιρείται σε τέσσερα υποεξόνια: 1A-1D, τα οποία υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα, όπως στον *FGF8*. Στα γονίδια αυτά χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης το ATG που βρίσκεται στο υποεξόνιο 1A. Άλλες υπο-οικογένειες (*FGF11-14*) έχουν εναλλακτικό αμινοτελικό άκρο που προκύπτει από τη χρήση εναλλακτικών 5'εξονίων.

Στην εικόνα 3.3 παριστάνεται σχηματικά η δομή των σημαντικότερων FGF γονιδίων.



Εικόνα 3.3:

Γονιδιακή δομή ορισμένων μελών της οικογένειας των FGF γονιδίων.

3.2.2 Κυτταρικός εντοπισμός και λειτουργία των FGF.

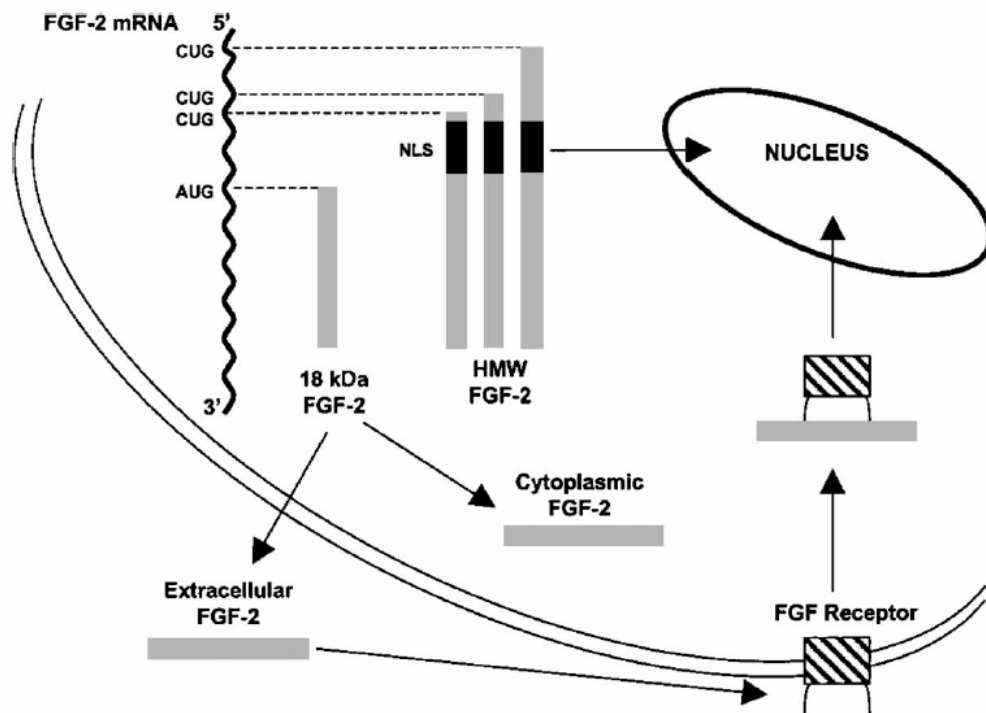
Το αμινο-τελικό άκρο των περισσότερων μελών της οικογένειας των FGF έχει ικανότητα μετάδοσης σήματος και οι μορφές αυτές εκκρίνονται από τα κύτταρα (FGFs 3-8, 10, 15, 17-19, 21-23). Οι FGFs 9, 16 και 20 στερούνται τέτοιου πεπτιδίου αλλά και πάλι εκκρίνονται από τα κύτταρα. Αντίθετα οι FGF1 και FGF2 στερούνται του πεπτιδίου αλλά δεν εκκρίνονται; βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και στον εξωκυττάριο χώρο. Οι FGF1 και FGF2 απελευθερώνονται από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή μέσω ενός εξωκυτταρικού μηχανισμού ανεξάρτητου του συμπλέγματος Golgie. Μια άλλη υπο-ομάδα των FGF (FGF 11-14) στερούνται αλληλουχίας-φορέα σήματος και παραμένουν εντός των κυττάρων (51-54). Οι FGF2 και 3 εντοπίζονται και στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά η βιολογική τους δράση εκεί μας είναι άγνωστη.

Ο ρόλος των FGF είναι πολύπλευρος και πολύ σημαντικός. Η πλειοψηφία των FGF εκφράζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και συνδέονται ειδικότερα με την

ανάπτυξη του σκελετικού και μυϊκού συστήματος στα θηλαστικά. Αποτελούν νευροτροπικούς κυτταρικούς παράγοντες τόσο του περιφερικού όσο και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ορισμένα μέλη της οικογένειας των γονιδίων αυτών είναι ισχυροί επαγωγείς της μεσοδερμικής διαφοροποίησης στα έμβρυα. Επίσης αποτελούν ρυθμιστές του βλενογόνου και της λειτουργίας των ωοθηκικών κυττάρων. Άλλα μέλη της οικογένειας των FGF συνιστούν μιτογόνους παράγοντες ευρέος φάσματος και επάγουν την κυτταρική κινητικότητα και διαφοροποίηση. Ορισμένοι FGF παράγοντες παρουσιάζουν ισχυρή αγγειογενετική δραστηριότητα και εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση των ιστών που απαιτείται κατά την επούλωση τραυμάτων (55).

3.2.3 Δομή και κυτταρικός εντοπισμός του bFGF.

Ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (basic fibroblast growth factor, bFGF) ή αλλιώς γνωστός ως FGF2 είναι το πρώτο αγγειογενετικό μόριο που αναγνωρίστηκε. Το γονίδιο του ανθρώπινου bFGF εδράζεται στο χρωμόσωμα 4, στη θέση q26-q27. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί πέντε ισομορφές του FGF2: μία μικρού μοριακού βάρους 18-kDa και τέσσερις υψηλού μοριακού βάρους (High molecular weight HMW FGF2) 22, 22,5, 24 και 34-kDa αντίστοιχα (48-50, 56-58). Η χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφή προκύπτει από την έναρξη της μετάφρασης στο κωδικόνιο AUG και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση της ισομορφής αυτής έξω από το κύτταρο γίνεται μέσω ενός ενεργειακά εξαρτώμενου μηχανισμού που δεν είναι πλήρως κατανοητός. Υπάρχουν κύτταρα τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού FGF2 χωρίς να τις εκκρίνουν στον εξωκυττάριο χώρο. Όταν όμως απελευθερωθεί ο 18-kDa FGF2 προσδένεται με τους αντίστοιχους επιφανειακούς υποδοχείς του που του επιτρέπουν την επανείσοδό του στο κύτταρο και τη μεταφορά του στον πυρήνα. Αντίθετα οι υψηλού μοριακού βάρους ισομορφές προκύπτουν από την έναρξη της μετάφρασης στα κωδικόνια CUG που βρίσκονται στο 5' άκρο του γονιδίου και προηγούνται του AUG. Οι HMW FGF2 ισομορφές περιέχουν στο αμινο-τελικό τους άκρο αλληλουχίες που τους επιτρέπουν τον εντοπισμό και την κατακράτησή τους στον πυρήνα του κυττάρου (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4:

Κυτταρική κυκλοφορία των bFGF ισομορφών: bFGF 18-kDa και HMW.

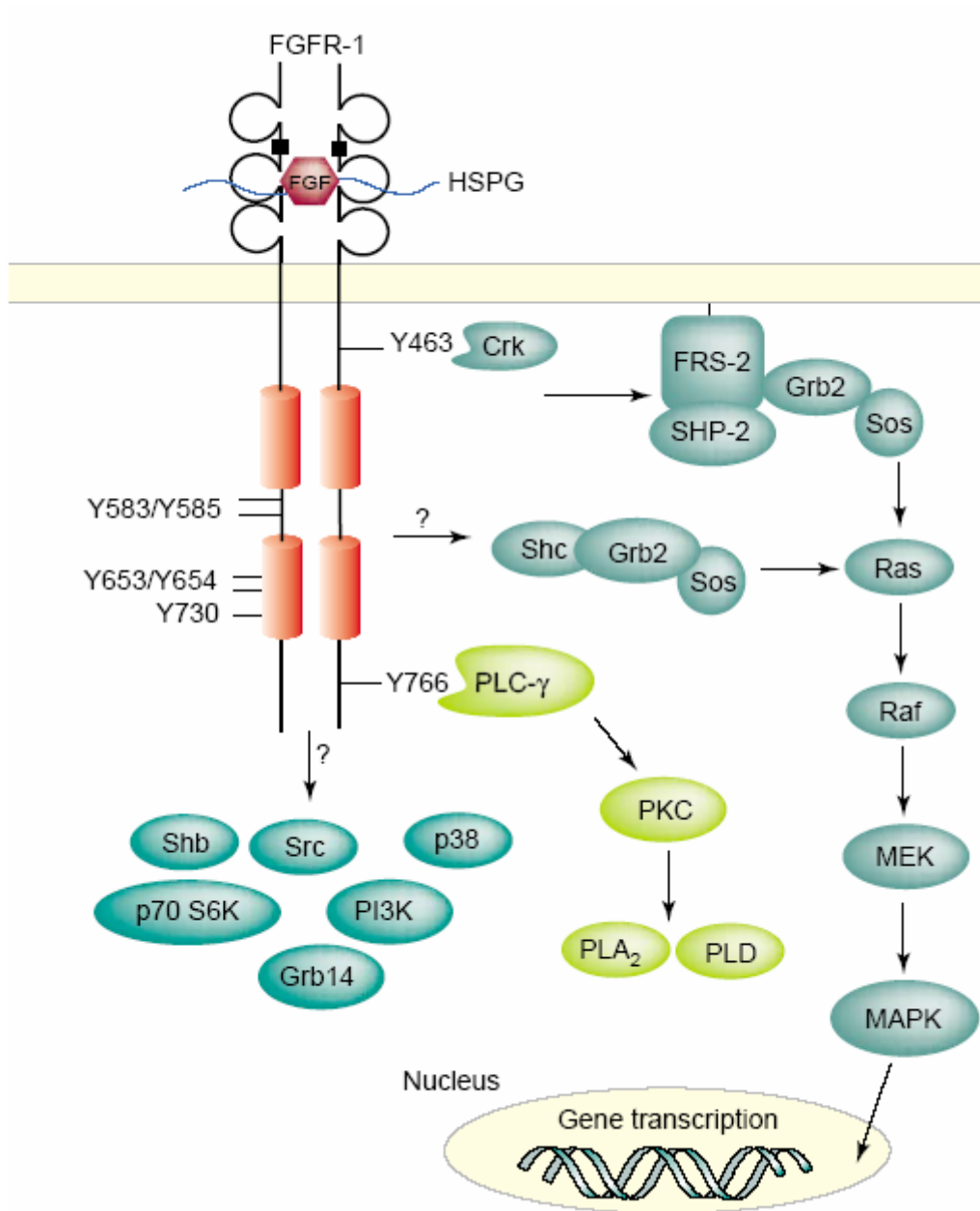
Η μετάφραση του bFGF mRNA οδηγεί στην παραγωγή πολλαπλών ισομορφών, διαμέσου του μηχανισμού πολλαπλών κωδικονίων έναρξης (alternative start codons). Στην εικόνα παριστάνονται σχηματικά οι θέσεις των κωδικονίων έναρξης στο mRNA του bFGF. Οι HMW bFGF ισομορφές περιέχουν μια αλληλουχία (NLS) που τους επιτρέπει τη μεταφορά στον πυρήνα. Αντίθετα η 18-kDa ισομορφή παραμένει στι κυτταρόπλασμα και μπορεί να μεταφερθεί εξωτερικά του κυττάρου όπου και προσδέεται με τον αντίστοιχο FGF υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη. Αμέσως μετά την πρόσδεση, το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ενδοκυτταρώνεται με έναν “υποδοχέα- εξαρτώμενο” μηχανισμό που του επιτρέπει τη μεταφορά στον πυρήνα. Οι πυρηνικές ισομορφές του bFGF (HMW)) και η κυτταροπλασματική τους ισομορφή (18-kDa bFGF) προκαλούν διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις από τα κύτταρα.

3.2.4 Μηχανισμός μετάδοσης σήματος του bFGF.

Ο bFGF, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των FGF, ασκούν τη βιολογική τους δράση μέσω σύνδεσης με τους αντίστοιχους υποδοχείς FGFRs (fibroblast growth factor receptors). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού πρόσδεσης στους υποδοχείς είναι η ισχυρή σύνδεση του bFGF με ηπαρίνη (heparine) ή θειϊκές ηπαρινούχες πρωτεογλυκάνες (heparin sulphate proteoglycan, HSPG), που αποτελούν μόρια που βρίσκονται σε αφθονία στην επιφάνεια των κυττάρων και στον εξωκυττάριο χώρο. Η αλληλεπίδραση του bFGF με τα μόρια αυτά έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία διμερών και υψηλότερου βαθμού ολιγομερών που σταθεροποιούν την πρωτεΐνη από θερμική και πρωτεολυτική αποδιάταξη, περιορίζουν τη διάχυσή της και ρυθμίζουν την απελευθέρωσή της στον εξωκυττάριο χώρο (46, 59). Η σύνδεση του bFGF με τις HSPG πρωτεογλυκάνες έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη τόσο για τη πρόσδεση με τον αντίστοιχο υποδοχέα FGFR όσο και για την ενεργοποίηση του συμπλόκου bFGF-FGFR και κατά συνέπεια την άσκηση της βιολογικής δράσης του bFGF.

Οι υποδοχείς των FGF κωδικοποιούνται από 4 γονίδια (*Fgfr-1* έως *Fgfr-4*) τα οποία αποδίδουν μετά από εναλλακτικό μάτισμα επτά πρωτεϊνικά μόρια με διαφορετική ικανότητα σύνδεσης με τους αντίστοιχους υποκαταστάτες και διαφορετική κατανομή στους ιστούς. Η δομή των υποδοχέων περιλαμβάνει ένα εξωτερικό τμήμα που αποτελείται από δύο, ή τρεις περιοχές τύπου ανοσοσφαιρίνης και ένα διαμεμβρανικό τμήμα που καταλήγει σε μια κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης. Η σύνδεση του συμπλέγματος ηπαρίνης-bFGF με τον υποδοχέα FGFR έχει σαν αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα (εικόνα 3.5), την ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης μέσω αυτοφωσφορυλίωσης και κατά συνέπεια του καταράκτη μετάδοσης σήματος του bFGF (60).

Στο ενδοθήλιο ο bFGF αλληλεπιδρά κυρίως με τον υποδοχέα FGFR1 που συνιστά τον κυρίαρχο υποδοχέα των FGF που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και με τον υποδοχέα FGFR2 που εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό από τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Έχει προτασθεί από πρόσφατες πειραματικές μελέτες ότι η ενεργοποίηση του FGFR1 υποδοχέα επάγει την κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, την παραγωγή πρωτεασών και την μορφοποίηση των αγγείων. Αντίθετα η ενεργοποίηση του FGFR2 υποδοχέα συνδέεται με ρύθμιση της κινητικότητας των κυττάρων.



Εικόνα 3.5:

Επισκόπηση της μετάδοσης σήματος του bFGF μέσω του υποδοχέα FGFR1.

Η σύνδεση του bFGF με τον υποδοχέα του έχει σαν αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης που αυτός περιέχει, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του καταρράκτη μεταγωγής ενδοκυτταρικών σημάτων του FGF (πχ ενεργοποίηση του μονοπατιού των Ras, της MAPK κινάσης κ.α.).

3.2.5 Βιολογική δράση του bFGF.

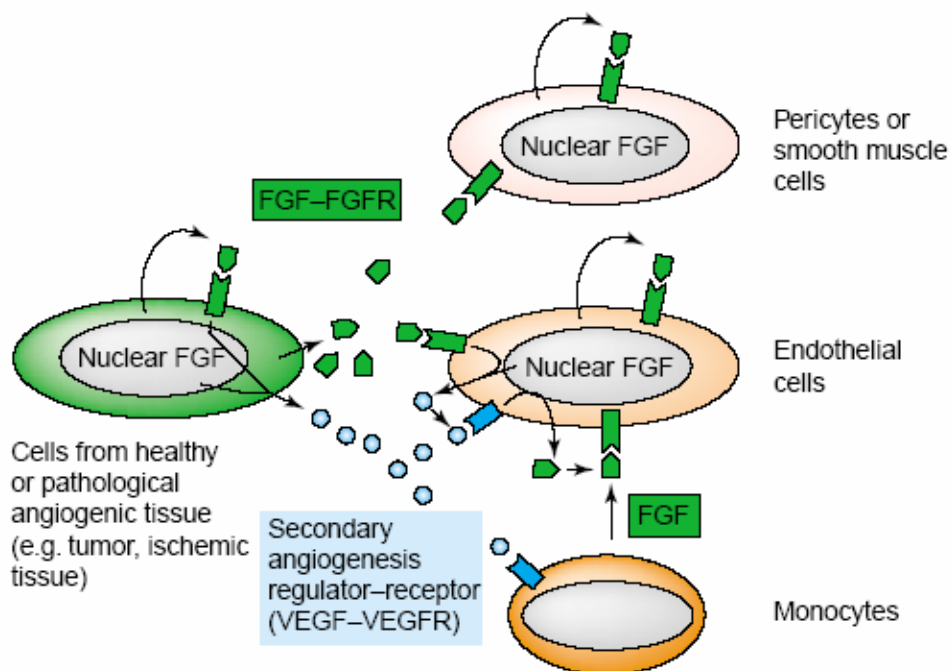
Ο bFGF ή FGF2 δρά αυτοκρινώς ή παρακρινώς και παίζει ρόλο-κλειδί στην ανάπτυξη και την αναδιαμόρφωση σχεδόν κάθε όργανου. Παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα ή τα μακροφάγα, ή απελευθερώνεται από τον εξωκυττάριο χώρο. Μια από τις κυριότερες δράσεις του αφορούν τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυικών κυττάρων (61, 62). Επάγει την έκφραση άλλων σημαντικών αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF και ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου (plasminogen activator) (63, 64), και αναστέλλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω Bcl-2 εξαρτώμενων και ανεξάρτητων μηχανισμών (65).

➤ Ο ρόλος του FGF2 στον καρκίνο

Ο ρόλος του FGF2 στην ανάπτυξη των όγκων είναι πολύπλοκος: μπορεί να δράσει ως ογκοπροωτήνη, να προάγει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, να τροποποιήσει το αγγειογενετικό τους προφίλ, ή να δράσει απευθείας στο αγγειακό στρώμα. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο FGF2 επιδρά στην ενεργοποίηση της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων περιλαμβάνει την υπερέκφρασή του, καθώς δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μεταλλάξεις στο γονίδιο που το κωδικοποιεί. Ο FGF2 εκκρίνεται είτε από τα καρκινικά κύτταρα, είτε από τα κύτταρα του στρώματος που περιβάλλουν τον όγκο και δρά επίσης σε αυτά αυτοκρινώς ή παρακρινώς. Υπάρχουν τρεις πιθανότητες: α) ο FGF2 να υπερεκφράζεται και να εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα, β) ο FGF2 να εκκρίνεται από τα στρωματικά κύτταρα ως απόκριση σήματος από κακοήθη κύτταρα και γ) ο FGF2 να εκκρίνεται από τα κύτταρα του όγκου ως απόκριση σήματος από μή-κακοήθη κύτταρα. Επειδή οι FGFR υποδοχείς εκφράζονται τόσο σε καρκινικά όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα, εξηγείται η αυτοκρινής δράση του FGF2 στα ίδια τα κύτταρα του όγκου και η παρακρινής στα κύτταρα του στρώματος στα οποία προάγει την αγγειογένεση.

Μια άλλη πιθανή αιτία της απορρύθμισης του μηχανισμού μετάδοσης σήματος από τον FGF2 στον καρκίνο αποτελεί η συσσώρευσή του λόγω αυξημένης κινητικότητας από τον εξωκυττάριο χώρο στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η απελευθέρωση του FGF2 από την εξωκυττάρια δεξαμενή μπορεί να λάβει χώρα με δύο πιθανούς μηχανισμούς: α) μέσω πρωτεολυτικής αποκοπής του από τα μόρια ηπαρίνης που το

σταθεροποιούν, ή β) μέσω αυξημένης σύνδεσης με την πρωτεΐνη-φορέα (πρωτεογλυκάνες) του FGF2 και πρόσδεσής του στους αντίστοιχους υποδοχείς FGFRs.



Εικόνα 3.6:

Κυτταρικές αλληλεπιδράσεις στην αγγειογένεση και ο ρόλος του FGF.

Ο FGF μπορεί να παραχθεί από τον αγγειογενετικό ιστό και στη συνέχεια να απελευθερωθεί και να διεγείρει ευθέως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα περιφερειακά κύτταρα. Τα αγγειογενετικά κύτταρα μπορούν επίσης, μέσω της αυτοκρινούς δράσης ή του πυρηνικού FGF, να απελευθερώσουν δευτερογενείς αγγειογενετικούς παράγοντες οι οποίοι δρουν στο αγγειακό δίκτυο. Μονοκύτταρα τα οποία προσελκύονται λόγω της έκκρισης VEGF από τα αγγειογενετικά κύτταρα, απελευθερώνουν τοπικά FGF. Ο αυτοκρινής ή πυρηνικός FGF μπορεί επίσης να δράσει στο επίπεδο των αγγειακών κυττάρων και είτε να προαχθεί η έκκρισή του από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, είτε να προάγει ο ίδιος την έκφραση δευτερογενών ρυθμιστικών μορίων όπως του VEGF. Όλα τα παραπάνω σενάρια εξαρτώνται από το κυτταρικό περιβάλλον και περιεχόμενο και μπορεί ορισμένες βιοχημικές πορείες να ευνοούνται κατά περίπτωση.

➤ **ρόλος του FGF2 στην αγγειογένεση**

Η αγγειογενετική δράση του FGF2 έγινε γνωστή από πολύ νωρίς (66). Υπερέκφραση του FGF2 έχει ισχυρή μιτογόνο δράση σε ινοβλάστες. Απενεργοποίηση του FGF2 έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αγγειογένεσης *in vitro* και *in vivo* (67). Η εμφύτευση αδενοϊών σε ποντίκια που προκαλούν την έκφραση FGF2, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή λειτουργικών αγγείων (68), ενώ η αποσιώπηση του γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης που λαμβάνει χώρα κατά την επούλωση τραυμάτων (69). Η έκφραση του FGF2 είναι απαραίτητη στο στάδιο της επιδιόρθωσης των ιστών κατά την επούλωση των τραυμάτων λόγω του ότι μεσολαβεί στην δέσμευση ενδοθηλιακών κυττάρων από εξωκυττάρια στοιχεία και ρυθμίζει την έκφραση επιφανειακών μορίων-συγκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες. Ο ρόλος του FGF2 στην επαγωγή του σχηματισμού νέων αγγείων αίματος έχει δειχθεί από πολλές μελέτες χορήγησης FGF2 πρωτεΐνης, ή DNA που κωδικοποιεί τον FGF2 σε περιπτώσεις ισχαιμικών ασθενειών τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, όπως η αθηρωμάτωση (70-72). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η 24-kDa μορφή του FGF2 προκαλεί καταστολή της ανάπτυξης των όγκων και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*, καθώς και ταυτόχρονη αναστολή της αγγειογένεσης κατά ανεξάρτητο τρόπο (73). Οι πιθανοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του FGF στην αγγειογένεση περιγράφονται στη εικόνα 3.5.

3.3 TGF-β και TGF-β Receptors

3.3.1 Δομή και οργάνωση του TGF-β.

Οι TGF-βs είναι μια οικογένεια πολυλειτουργικών ρυθμιστικών πολυπεπτιδίων που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η κυτταρική ανάπτυξη, η επούλωση τραυμάτων και η καρκινογένεση. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί πέντε ισομορφές του TGF-β που παρουσιάζουν μεταξύ τους ομολογία της τάξης του 64-82%, αλλά μόνο τρεις έχουν απομονωθεί από τα θηλαστικά: TGF-β1, β2, β3 (74). Οι χρωμοσωμικές θέσεις των ισομορφών TGF-β1, β2, β3 έχουν ως εξής: α) το γονίδιο του ανθρώπινου TGF-β1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 19,

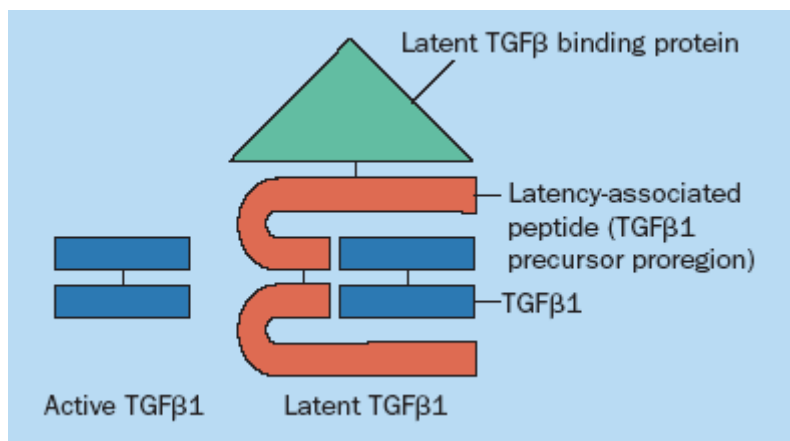
στη θέση q13.1-q13.2, β) το γονίδιο του ανθρώπινου TGF-β2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 1, στη θέση q41, και γ) το γονίδιο του ανθρώπινου TGF-β3 εδράζεται στο χρωμόσωμα 14, στη θέση q24-24.3. Το γονίδιο του TGF-β1, αποτελείται από 7 εξόνια διαχωριζόμενα από 6 εσόνια, και το αναγνωστικό του πλαίσιο εξαπλώνεται σε μια περιοχή 100kb.

Κάθε μια από τις τρεις ισομορφές του TGF-β που απαντώνται στα θηλαστικά, συνιστά ομοδιμερές πεπτίδιο 25-kDa που αποτελείται από δύο όμοιες πεπτιδικές αλυσίδες μήκους 112 αμινοξέων. Τα πεπτίδια περιέχουν μια συντηρημένη περιοχή εννέα καταλοίπων κυστεΐνης η οποία σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς-γέφυρες που συνδέουν τα μονομερή και τα σταθεροποιούν ως διμερή (σταθερή δευτεροταγής και τριτοταγής δομή).

Ο TGF-β αρχικά συντίθεται ως τμήμα ενός μεγαλύτερου πρόδρομου μορίου (pre-pro-TGF-β). Αναλυτικότερα ο TGF-β συνδέεται αρχικά ομοιοπολικά σε μια πρόδρομη περιοχή που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες μεταβλητού μεγέθους και ονομάζεται πεπτίδιο σχετιζόμενο με τη λανθάνουσα κατάσταση (latency associated peptide, LAP). Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης το ώριμο μόριο αποκόπτεται πρωτεολυτικά αλλά παραμένει μή ομοιοπολικά προσδεδεμένο. Σε αυτή τη λανθάνουσα κατάσταση, η πρόδρομη περιοχή (LAP) μπορεί να τυλιχτεί γύρω από το ώριμο TGF-β και να το καταστήσει λειτουργικά ανενεργό. Η δομή που σχηματίζεται ομονάζεται “μικρό λανθάνων σύμπλοκο”. Ο TGF-β εκκρίνεται σε μια βιολογικά ανενεργή μορφή στην οποία το “μικρό λανθάνων σύμπλοκο” συνδυάζεται με την λανθάνουσα πρωτεΐνη δέσμευσης TGF-β και σχηματίζει το “μεγάλο λανθάνων σύμπλοκο” (εικόνα 3.7). Σε αυτή τη μορφή ο TGF-β παραμένει προσδεδεμένος στην εξωκυττάρια ύλη μέχρι να ενεργοποιηθεί μέσω πρωτεολυτικής απόσπασής του από το “μεγάλο λανθάνων σύμπλοκο”. Ανάμεσα στα μόρια που προκαλούν ενεργοποίηση του TGF-β συγκαταλέγονται ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου, η θρομβοσπονδίνη-1, ορισμένες ιντεγκρίνες κ.α.

Οι τρεις ισομορφές TGF-β1, β2, β3 διαφέρουν ως προς την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς του TGF-β, ενώ η έκφρασή τους σε επίπεδο mRNA εξαρτάται από το είδος του ιστού. Συγκεκριμένα το mRNA του TGF-β1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά, στα αιμοποιητικά και στα κύτταρα του συνδετικού ιστού, το mRNA του TGF-β2 στα επιθηλιακά και νευρωνικά κύτταρα, και mRNA του TGF-β3 εκφράζεται κυρίως στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ο TGF-β1 και ο TGF-β3

εκφράζονται στα αρχικά στάδια της μορφογένεσης, ενώ ο TGF-β2 εκφράζεται αργότερα στα στάδια της ωρίμανσης και διαφοροποίησης του επιθηλίου (75).



Εικόνα 3.7:

Το σύμπλοκο του TGF-β1.

Η ώριμη TGF-β1 πρωτεΐνη είναι μη ομοιοπολικά προσδεσμένη στο πρόδρομο μόριο που ονομάζεται λανθάνων πεπτίδιο (latency associated peptide, LAP), το οποίο με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με την λανθάνουσα πρωτεΐνη δέσμησης TGF-β (Latent TGF-β binding protein) που ρυθμίζει την ενεργοποίηση και βιοδιαθεσιμότητα του TGF-β1.

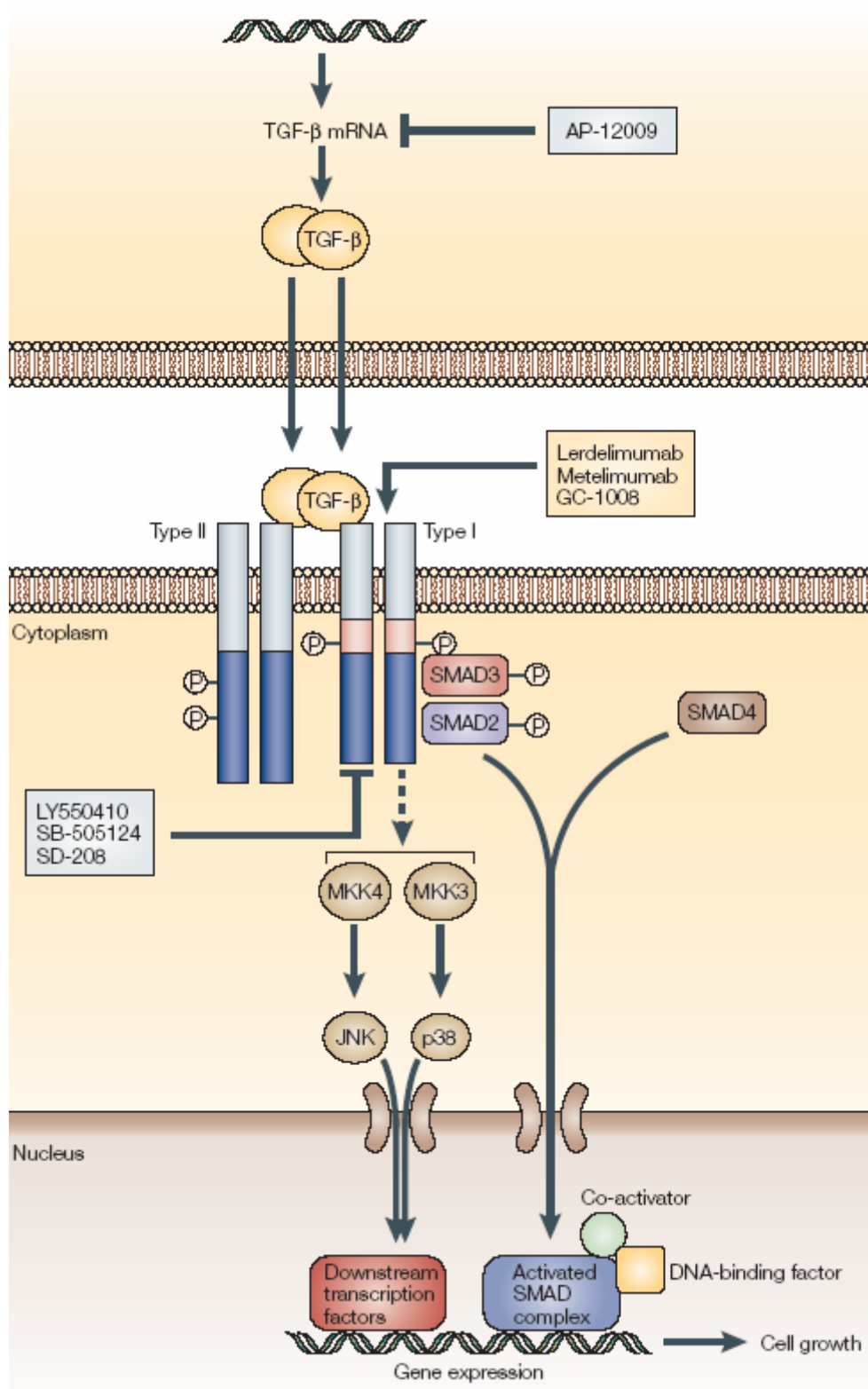
3.3.2 Μηχανισμός μετάδοσης σήματος του TGF-β. Υποδοχείς του TGF-β.

Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β ασκούν την δράση τους στην κυτταρική λειτουργία και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω της πρόσδεσής τους σε ειδικούς επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς, τους TGF-β receptors. Τρία είδη υποδοχέων του TGF-β έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής και πρόκειται για τον TGF-β RI (type I), τον TGF-β RII (type II) και τον TGF-β RIII (type III). Οι υποδοχείς TGF-β RI (type I) και TGF-β RII (type II) είναι διμερείς διαμεμβρανικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης που σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τα μέλη της οικογένειας του TGF-β. Η μετάδοση σήματος από τον TGF-β ενεργοποιείται από την δέσμευση και την επαφή των δύο υποδοχέων TGF-β RI και TGF-β RII από έναν υποκαταστάτη TGF-β1 ή -β2, ή -β3 (76, 77).

Είναι χαρακτηριστικό ότι ο TGF-β RII μπορεί να προσδεθεί σε έναν TGF-β υποκαταστάτη (το αντίθετο δεν είναι εφικτό), αλλά η μετάδοση σήματος δεν πραγματοποιείται χωρίς τη σύνδεση του TGF-β RI και το σχηματισμό του ετεροτετραμερούς συμπλόκου (78-81).

Ο υποδοχέας TGF-β RIII είναι μια μεμβρανική πρωτεογλυκάνη που ονομάζεται β-γλυκάνη (betaglycan) και στερείται δραστικότητα κινάσης, οπότε και ικανότητα μετάδοσης σήματος. Ο TGF-β RIII έχει μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης και με τρεις TGF-β υποκαταστάτες και διευκολύνει την πρόσβαση και την πρόσδεση των υποκαταστατών στους υποδοχείς TGF-β RI και TGF-β RII. Έτσι στην περίπτωση που η έκφραση ή η συγγένεια σύνδεσης του TGF-β RII είναι ελαττωματική, ή μειωμένη σε ένα σύστημα (για παράδειγμα όταν υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα), ο TGF-β RIII σχηματίζει το σύμπλοκο TGF-β RIII/TGF-β/ TGF-β RI και ρυθμίζει την πρόσβαση στους υποδοχείς μεταγωγής σήματος (82).

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί δημιουργίας του ετεροτετραμερούς συμπλόκου υποκαταστάτη-υποδοχέων του TGF-β. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, ο οποίος είναι και ο περισσότερο αποδεκτός σήμερα, αρχικά προσδένεται ο υποκαταστάτης στον υποδοχέα τύπου II και στη συνέχεια προσδένεται ο υποδοχέας τύπου I. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει τη συνεργασία των δύο υποδοχέων που δεσμεύονται ταυτόχρονα και με μεγάλη συγγένεια με τον υποκαταστάτη. Μόλις σχηματιστεί το σύμπλοκο ενεργοποιείται το βιοχημικό μονοπάτι των SMAD πεπτιδίων και στη συνέχεια της MAPK κινάσης με τελικό στόχο τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής (83-85). Στην εικόνα 3.8, παριστάνεται σχηματικά ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος του TGF-β: Μετά το σχηματισμό του συμπλόκου, ο TGF-β RII φωσφορυλιώνει τον TGF-β RI υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τα Smad2, 3 και προκαλεί την μεταγωγή σήματος του TGF-β με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 3.8:

Μηχανισμός μεταγωγής σήματος από τον TGF-β1 και σημεία θεραπευτικής παρέμβασης.

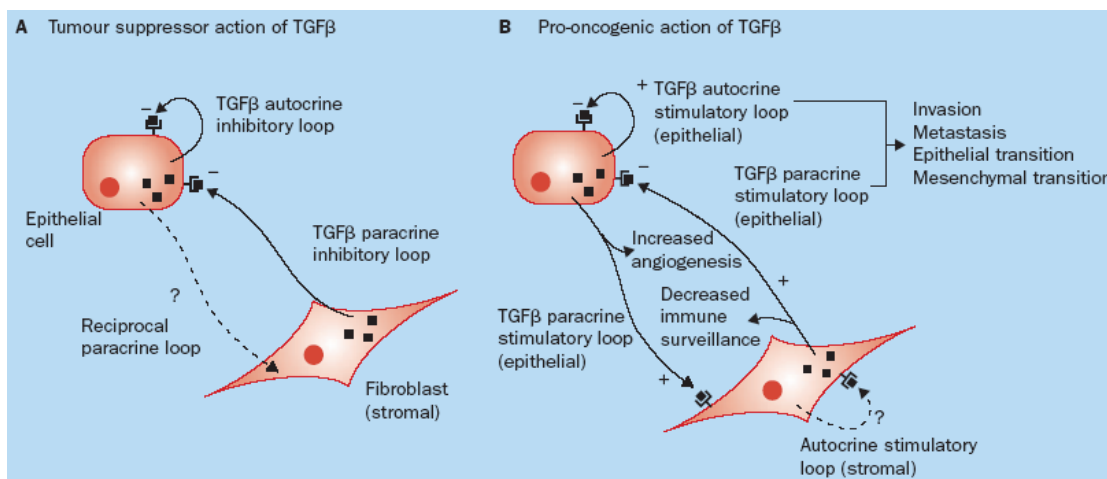
3.3.3 Βιολογική δράση του TGF-β.

Ο βιολογικός ρόλος του TGF-β είναι εξαιρετικά πολύπλοκος καθώς συμμετέχει στην ανάπτυξη, στην αγγειογένεση, στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τη συγκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων (82, 85, 86). Έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*, επάγοντας ταυτόχρονα την ίδια του την έκφραση (αυτοκρινής δράση) (87, 88). Μια άλλη ιδιότητα όμως του TGF-β είναι η αναστολή της φυσιολογικής λειτουργίας των T και B κυττάρων, η οποία οδηγεί σε ανοσοκαταστολή και συνεπώς ανάπτυξη των όγκων (89). Μεταβολές στην έκφραση πρωτεϊνών-κλειδιά που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο (όπως οι c-myc, p27^{kip1}), και επαγωγή της απόπτωσης συσχετίζονται με την έκφραση του TGF-β (90). Επίσης ο TGF-β προάγει το σχηματισμό του στρώματος και μειώνει τη διήθηση των όγκων παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο στα καρκινικά κύτταρα έναν εναλλακτικό μηχανισμό απόδρασης από την ανοσολογική απόκριση (91).

➤ Ο ρόλος του TGF-β στον καρκίνο.

Η λειτουργία του TGF-β στη βιολογία του καρκίνου είναι διπλή και περιλαμβάνει τις αντιδιαμετρικά αντίθετες δράσεις της καταστολής των όγκων και της επαγωγής της ανάπτυξής τους. Στους υγιείς ιστούς του ενήλικου και αναπτυσσόμενου οργανισμού ο TGF-β λειτουργεί ως ογκο-καταστολέας, σε συμφωνία με την υπόθεση της αρνητικής αυτοκρινούς δράσης κατά την οποία τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Στα προκαρκινικά και αρχόμενα καρκινικά στάδια, η ογκοκατασταλτική δράση του TGF-β διατηρείται. Σε κάποιο σημείο όμως της νεοπλασματικής διαδικασίας λαμβάνει χώρα απορρύθμιση της λειτουργίας του TGF-β με αποτέλεσμα τα επιθηλιακά κύτταρα να παρουσιάζουν μείωση ή απώλεια απόκρισης στην ογκο-κατασταλτική του δράση. Κατά την εξέλιξη των όγκων μετατοπίζεται η ισορροπία προς την κατεύθυνση της ογκογόνου δράσης του TGF-β. Στα πιο προχωρημένα στάδια κακοήθειας επάγει έμμεσα την ανάπτυξη των όγκων μέσω της διέγερσης της αγγειογένεσης, του σχηματισμού του στρώματος και της ανοσοκαταστολής (92, 93). Η ακριβής λοιπόν λειτουργία του TGF-β εξαρτάται από το στάδιο της νόσου, το μικροπεριβάλλον και τις σχετικές ποσότητες των

υποκαταστατών και υποδοχέων του. Μειωμένη έκφραση των υποδοχέων του TGF- β ευνοεί την ογκογόνο λειτουργία του (94, 95).



Εικόνα 3.9:

Αναπαράσταση της ογκοκατασταλτικής (A) και ογκογονικής (B) δράσης του TGF- β .

A. Στα αρχικά στάδια του καρκίνου ο TGF- β συμμετέχει σε αυτοκρινή και παρακρινή μονοπάτια αναστολής της ανάπτυξης των όγκων και οδηγεί σε καταστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και επαγωγή της απόπτωσης.

B. Σε προχωρημένα στάδια καρκίνου ο TGF- β προάγει την ανάπτυξη των όγκων μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών δράσης και οδηγεί σε αυξημένο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό, αυξημένη αγγειογένεση και μειωμένη ανοσοαπόκριση.

➤ **Ο ρόλος του TGF- β στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.**

Ο TGF- β προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης επιθηλιακών, ενδοθηλιακών και αιματοποιητικών κυττάρων μέσω της επίδρασής του στον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση διαμέσου της αναστολής της παραγωγής βασικών μορίων-ρυθμιστών του κύκλου, όπως είναι οι κυκλίνες A και E και οι πρωτεϊνικές κινάσες 2 και 4 που εξαρτώνται από αυτές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F από το προϊόν του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (Rb), και κατά τη συνέπεια την απώλεια της ικανότητάς τους να επάγουν την έκφραση απαραίτητων γονιδίων για τον κυτταρικό κύκλο (όπως το *c-myc*) (96).

➤ **Ο ρόλος του TGF-β στη μεταστατική διαδικασία.**

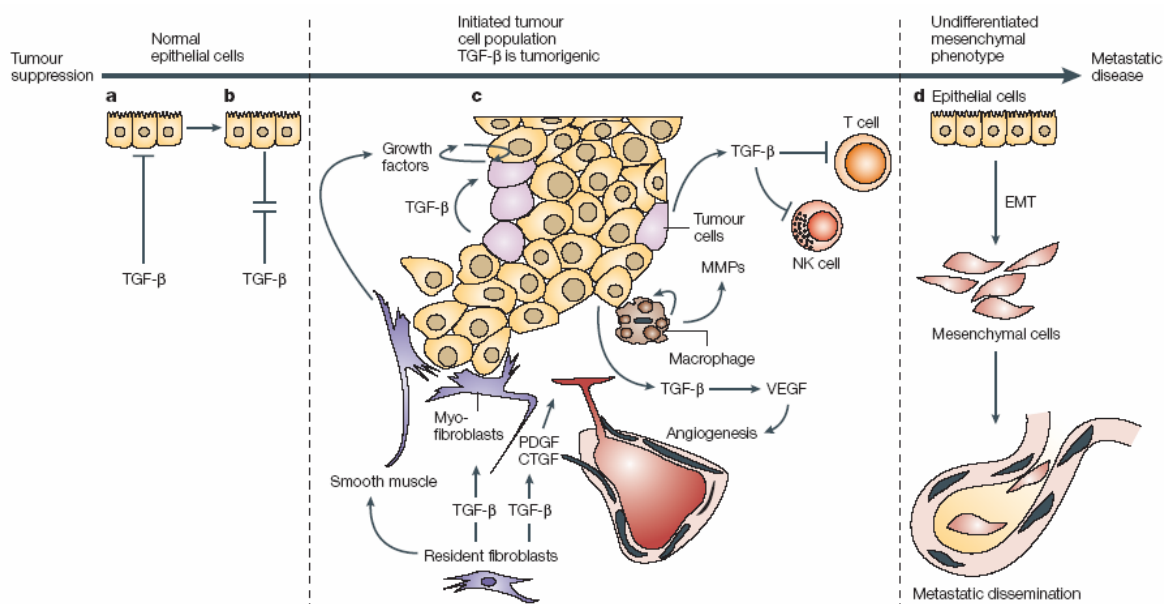
Ο TGF-β ρυθμίζει τη μετατροπή των αρχικών επιθηλιακών καρκινικών όγκων σε διηθητικούς και μεταστατικούς καρκίνους μέσω προώθησης της μετατροπής των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (97). Επίσης ο TGF-β αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους ρυθμιστές της παραγωγής εξωκυττάριας ύλης μέσω δύο μηχανισμών: α) διεγείρει τους ινοβλάστες και άλλα κύτταρα να παράγουν πρωτεΐνες του εξωκυττάριας χώρου, όπως κολλαγόνο και ιντεγκρίνες και β) μειώνει την παραγωγή ενζύμων που αποικοδομούν την εξωκυττάρια ύλη όπως κολλαγενάση και ηπαρινάση (98).

➤ **Ο ρόλος του TGF-β στην αγγειογένεση.**

Ο TGF-β επάγει άμεσα την αγγειογενετική διαδικασία *in vivo* (εικόνα 3.10). Αυτή η διέγερση μπορεί να παρεμποδιστεί με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του TGF-β. Σε ποντίκια, η απαλοιφή είτε του TGF-β1, είτε του υποδοχέα TGF-β RII έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού νέων αγγείων και την ελαττωματική και ανεπαρκή διαφοροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου (99, 100). Είναι χαρακτηριστικό ότι κατά την αγγειογενετική διαδικασία αυξάνεται σημαντικά η έκφραση της ενδογλίνης (endoglin), η οποία ανήκει στην κατηγορία των TGF-β RIII υποδοχέων του TGF-β, και χρησιμεύει στην υποβοήθηση σχηματισμού του συμπλόκου υποκαταστάτη-υποδοχέων και έναρξη του καταρράκτη μεταγωγής σήματος του TGF-β (101).

➤ **Ο ρόλος του TGF-β στην ανοσοκαταστολή.**

Ο TGF-β παράγεται από τα λευκοκύτταρα και προάγει τη διαφοροποίησή τους, ενώ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίησή τους. Η έλλειψη του TGF-β1 σε ποντίκια προκαλεί το θάνατό τους από φλεγμονοπάθειες, υποδεικνύοντας το βασικό ρόλο του TGF-β1 στην καταστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των φλεγμονωδών κυττάρων. Στον καρκίνο η έκκριση TGF-β από ορισμένα κύτταρα καταστέλλει τη δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν τον όγκο, παρέχοντας στον καρκίνο έναν εναλλακτικό τρόπο διαφυγής του ανοσοποιητικού μηχανισμού καταστολής του (102, 103).



Εικόνα 3.10:

Η επαγωγή της αγγειογενετικής διαδικασίας από τον TGF-β στο μικρο-περιβάλλον του καρκινικού όγκου.

Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (α) είναι ευαίσθητα σε αναστολή ανάπτυξης όγκου από τον TGF-β. Έναρξη της ογκογένεσης και ακολούθως απώλεια της ρύθμισης της ανάπτυξης από τον TGF-β (β), σε συνδυασμό με αύξηση της έκφρασης του TGF-β στο μικροπεριβάλλον του όγκου δημιουργεί τις συνθήκες στον TGF-β να δρά προ-ογκογονικά. Η ογκογόνος λειτουργία του TGF-β (c) περιλαμβάνει ανοσοκαταστολή και ενεργοποίηση του VEGF που οδηγεί στην έναρξη της αγγειογένεσης, διέγερση των αυξητικών παραγόντων PDGF και CTGF (connective tissue growth factor) στο στρώμα, καθώς και παραγωγή μεταλλοπρωτεασών (MMPs) που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ύλης και επιτρέπουν την διήθηση ιστών από τα καρκινικά κύτταρα. Ο TGF-β συμβάλλει στη μεταστατική διαδικασία (d) διαμέσου μετατροπής των επιθηλιακών σε μεσσεγγυματικά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

4.1 Ο Καρκίνος του μαστού.

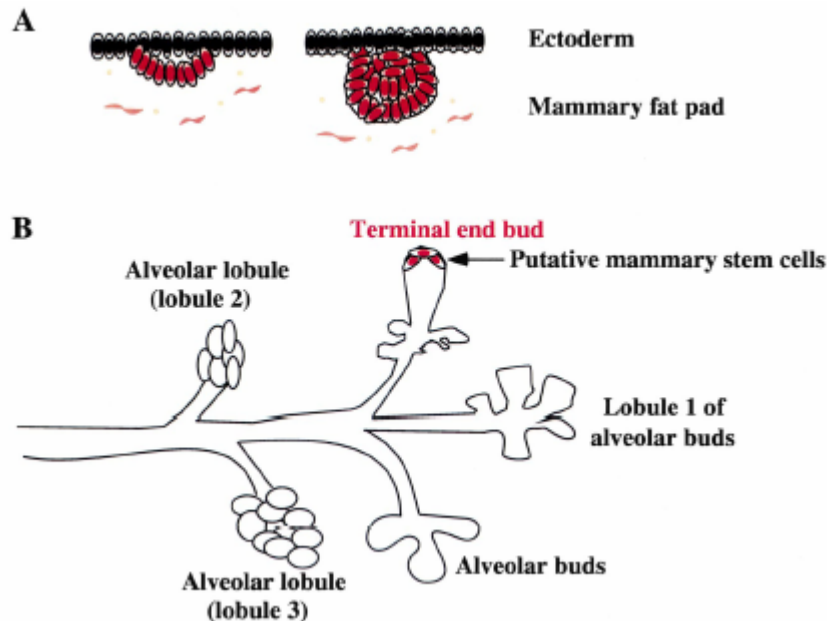
Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο τύπο κακοήθειας που προσβάλλει το γυναικείο πληθυσμό και την κυριότερη αιτία θανάτου στις γυναίκες 40-55 ετών. Το 1999 αναφέρθηκαν 314.000 θάνατοι από τη νόσο παγκοσμίως, και μόνο στην Αμερική διαγιγνώσκονται 180.000 νέα περιστατικά ετησίως. Αν και έχει επέλθει σημαντική πρόοδος στην διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού τα τελευταία χρόνια, εντούτοις υπολογίζεται ότι το ένα τέταρτο των ασθενών θα καταλήξουν λόγω της ασθένειας.

Η επίδραση των ορμονών πιστεύεται ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Όμως δεδομένου ότι εκδήλωση του καρκίνου απαιτεί μέχρι 30 χρόνια, θεωρείται ότι τα πρωταρχικά στάδια για τη δημιουργία κακοήθειας συμβαίνουν προεμμηνοπαυσιακά. Κυτταρογενετικές και μοριακές έρευνες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη καρκίνου του μαστού βασίζεται στη συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων, τόσο σε γονίδια που ενεργοποιούνται σε αντίστοιχα με ογκογόνο δράση (ογκογονίδια), όσο και σε αυτά που χρειάζονται απενεργοποίηση για την έναρξη και εξέλιξη της κακοήθειας (ογκοκατασταλτικά γονίδια).

4.2 Παθοφυσιολογία και ιστολογική ταξινόμηση

Ο σποραδικός καρκίνος του μαστού (μή κληρονομήσιμος) αποτελεί περισσότερο από το 90% των συνολικών περιπτώσεων αυτού του τύπου καρκίνου, και είναι μια πολύπλοκη και ετερογενής νόσος τόσο σε κλινικό όσο και σε μοριακό επίπεδο. Τα νεοπλάσματα του μαστού εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη βιολογική και κλινική τους συμπεριφορά. Ως σημεία έναρξης έχουν την εσωτερική επιθηλιακή

στοιβάδα των μαζικών αδένων ή τα αδενωματώδη λοβίδια (εικόνα 4.1). Διακρίνονται σε δύο τύπους: διηθητικών και μη διηθητικών, *in situ*, καρκινωμάτων.



Εικόνα 4.1:

Αναπαράσταση του μαστικού αδένα και του σχηματισμού του.

A) Αρχικά στάδια της ανάπτυξης του μαστικού αδένα. Τα χρωματισμένα μαύρα εκτοδερμικά κύτταρα σχηματίζουν το επίδερμα, ενώ τα κόκκινα τον κυρίως αδένα.

B) Απλοποιημένη όψη των μαστικών πόρων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Τα λοβίδια 1-3 (lobules) αναπαριστούν πύο εκτεταμένα διακλαδισμένες και διαφοροποιημένες δομές. (Alveolar lobule: Αδενωματώδη λοβίδια).

➤ **Ιστολογική ταξινόμηση καρκινωμάτων μαστού**

Ο διηθητικός αδενώδης καρκίνος του μαστού αποτελεί τον ευρέως εμφανιζόμενο ιστολογικό τύπο. Άλλοι ιστολογικοί τύποι είναι τα λοβιακά, μυελώδη, βλεννώδη, θηλωματώδη και σωληνώδη καρκινώματα, τα οποία αποτελούν το 1-10% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Πολύ σπάνιος είναι ο φλεγμονώδης τύπος καρκίνου του μαστού (105) που διαφέρει πολύ μορφολογικά από τους προηγούμενους. Από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους μη διηθητικούς καρκίνους μαστού είναι ο πορωγενής και ο

λοβιδιακός (106-108). Επίσης είναι δυνατόν να εμφανιστούν καλοήθειες υπερπλασίες του μαστού με χαρακτηριστικά των *in situ* καρκινωμάτων, οι οποίες ονομάζονται υπερπλαστικές ατυπίες (109). Στη συνέχεια περιγράφονται τα χαρακτηριστικά των συχνότερων ιστολογικών καρκινωμάτων μαστού.

1) Πορωγενές μη διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Ductal carcinoma in situ, DCIS)

Ονομάζεται το καρκίνωμα στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέσα στο σύστημα των πόρων-λοβίων και δε διηθούν τη βασική μεμβράνη. Αποτελεί πρόδρομη βλάβη του διηθητικού πορωγενούς καρκινώματος και η εμφάνισή του σε μια ασθενή αυξάνει τον κίνδυνο διηθητικού καρκίνου 8-10 φορές. Ταξινομείται σε δύο κατηγορίες: α) comedo DCIS: χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα, με παρουσία νεκρώσεων, πολλές μιτώσεις και υψηλά ποσοστά υποτροπής, και β) non comedo DCIS: καλής διαφοροποίησης, με σπάνιες μιτώσεις και καλύτερη πρόγνωση.

2) Λοβιακό μη διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Lobular carcinoma in situ, LCIS).

Συνήθως είναι πολυκεντρικό και δεν πρόκειται για πραγματικό καρκίνωμα αλλά δείκτη αυξημένου κινδύνου για την εμφάνιση διηθητικού καρκινώματος, τόσο πορωγενούς όσο και λοβιακού. Ο αυξημένος κίνδυνος αφορά και τους δύο μαστούς και όχι αυτόν στον οποίο τέθηκε η διάγνωση.

3) Πορωγενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Invasive ductal carcinoma)

Αποτελεί το συχνότερο ιστολογικό τύπο καρκινώματος (75%). Αντίθετα με το DCIS, δεν ακολουθεί την ανατομία των λοβίων πόρων αλλά δημιουργεί δομές, όπως ζώνες επιθηλιακών κυττάρων και οζιδίων που επεκτείνονται στο στρώμα.

4) Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Invasive lobular carcinoma)

Αποτελεί το 5-10% όλων των καρκινωμάτων μαστού. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από μικρά κύτταρα σε γραμμική διαρρύθμιση τύπου “Indian file” με τάση να αναπτύσσεται γύρω από τους πόρους και τους λοβούς.

➤ Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης

Με τον όρο διαφοροποίηση του νεοπλασματικού κυττάρου νοείται ο βαθμός ομοιότητάς του με το φυσιολογικό από το οποίο προέρχεται, μορφολογικά και λειτουργικά. Ο βαθμός αυτός είναι αντιστρόφως ανάλογος του ρυθμού πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Τα καλοήθη νεοπλάσματα είναι συνήθως καλά διαφοροποιημένα, ενώ τα κακοήθη παρουσιάζουν ευρύ φάσμα διαφοροποίησης, όπως επίσης αναπλασία (δομική και λειτουργική παλινδρόμηση των κυττάρων) και κυτταρική ατυπία (ποικιλομορφία μεγέθους και σχήματος των κυττάρων). Ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης σχετίζεται με το ποσοστό του όγκου που μοιάζει με σωληνώδεις σχηματισμούς. Έτσι όγκοι με καλή (Grade I), μέτρια (Grade II) και κακή (Grade III) διαφοροποίηση παρουσιάζουν σωληνώδεις σχηματισμούς σε ποσοστό: >75%, 10-75% και <10%.

4.3 Αγγειογένεση και καρκίνος του μαστού

Η αγγειογένεση συνιστά μια πολύπλοκη διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό νέων αγγείων αίματος από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο του ιστού. Είναι απαραίτητη στον καρκίνο για την εξέλιξη, τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση. Η υιοθέτηση του αγγειογενετικού φαινοτύπου έχειδειχθεί ότι αποτελεί πρώιμο στάδιο της πολυσταδιακής διαδικασίας της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού, και μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα πλήθους διεργασιών όπως υποξία, γενετικές αλλαγές, μηχανικό στρες κ.α. (34, 110). Από μελέτες *in vivo* μεταμόσχευσης ιστών μαστού στον κερατοειδή χιτώνα κουνελιού (rabbit corneal assay) διαπιστώθηκε ότι το 30% υπερπλαστικών ιστών του μαστού είναι αγγειογενετικοί έναντι μόνο 3% των φυσιολογικών ιστών (111). Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι σε ιστούς με καρκίνο του μαστού η αγγειογένεση ήταν αυξημένη σε διπλάσιο βαθμό από ότι στους ιστούς που προέρχονταν από μη νεοπλαστικά λοβία. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η έναρξη της αγγειογενετικής διαδικασίας στο μαστό λαμβάνει χώρα πριν από τις μορφολογικές αλλαγές που επιφέρει η δημιουργία και ανάπτυξη του καρκίνου.

Τόσο οι πρωτογενείς όσο και οι μεταστατικοί όγκοι του μαστού βασίζονται στην αγγειογένεση. Η σημασία της ως προγνωστικού δείκτη μελετήθηκε πρόσφατα σε

διάφορους τύπους ανθρώπινων νεοπλασμάτων, και διαπιστώθηκε ότι οι πρωτογενείς όγκοι του μαστού συγκαταλέγονται μεταξύ των κακοηθειών που επιδεικνύουν τη μεγαλύτερη αγγειογενετική δραστηριότητα (112, 113). Η αγγειογένεση στους όγκους του μαστού γίνεται φανερή αρχικά στα προ-μεταστατικά στάδια του υψηλού βαθμού πορωγούς καρκινώματος *in situ* (high-grade DCIS). Σε αυτή τη χρονική στιγμή σχηματίζεται ένα χαρακτηριστικό χείλος από μικροαγγεία γύρω από τους πόρους, τα οποία γεμίζουν με πολλαπλασιαζόμενα επιθηλιακά κύτταρα (114). Καθώς ο όγκος συνεχίζει να αναπτύσσεται, αυξάνει και ο βαθμός της νεο-αγγειογένεσης. Αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) ή/και αυξημένη παραγωγή μορίων που επάγουν το σχηματισμό νέων αγγείων, συσχετίζεται με κακή πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού (115, 116).

Η πρώτη αναφορά ότι η νεο-αγγειογένεση αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη του πρωτογούς καρκίνου του μαστού προήλθε από τον Weidner και τους συνεργάτες του (117), ο οποίος χρησιμοποίησε μια ημιποσοτική μέθοδο για την εκτίμηση της αγγειογενετικής ανάπτυξης (μέσω μέτρησης των μικροαγγείων του όγκου) βασιζόμενη σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από άλλους (118-120), αλλά σύντομα οι τεχνικές αντικαταστάθηκαν από πιο σύγχρονες και η έρευνα στράφηκε στην κατεύθυνση της μελέτης της έκφρασης των ίδιων των αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία σχηματισμού του καρκινικού αγγειακού δικτύου (121).

Ολοένα και αυξανόμενος όγκος ερευνητικών εργασιών επικεντρώνεται στην αναγνώριση των παραγόντων που επάγουν και συντηρούν την αγγειογένεση στο μικρο-περιβάλλον του καρκίνου με την ελπίδα να βρεθεί τρόπος να περιοριστεί η ανάπτυξη των όγκων και η μετάσταση. Πολύ σημαντικό στοιχείο που αποδεικνύει τη σημασία της αγγειογένεσης στον καρκίνο του μαστού, συνιστά η εκτενής και εντατική έρευνα που συντελείται από τους επιστήμονες στο πεδίο της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας με ενθαρρυντικά μέχρι τώρα αποτελέσματα.

4.4 Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού.

Πλήθος αυξητικών παραγόντων εμπλέκονται στη διαδικασία της νεο-αγγειογένεσης στον καρκίνο του μαστού. Μεταξύ των παραγόντων αυτών, των οποίων η έκφραση αποτέλεσε αντικείμενο πλείστων μελετών, συγκαταλέγονται ο VEGF, ο bFGF, ο TP, ο PD-ECGF, ο TGF-β και οι υποδοχείς του, ο HGF, ορισμένες μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) κ.α. Στη συνέχεια περιγράφονται τα πειραματικά ευρήματα των μελετών των σηματοδοτών αυξητικών παραγόντων στον καρκίνο του μαστού.

➤ VEGF

Ο VEGF αποτελεί ισχυρό μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων και κύριο ρυθμιστή της αγγειογενετικής δραστηριότητας. Συνιστά πρωτεύοντα μεσολαβητή της διαδικασίας σχηματισμού νέων αγγείων στον καρκίνο του μαστού (7, 26, 121, 122). Η παραγωγή και έκκρισή του είναι αξιοσημείωτα υψηλή στα καρκινικά, αλλά και στα στρωματικά κύτταρα του μαστού (123), όπως έχει δειχθεί από *in vivo* και *in vitro* μελέτες (124-126). Ο VEGF είναι επίσης απαραίτητος για την ογκογόνο ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού με αξιοσημείωτη ικανότητα διήθησης (127).

Οι ισομορφές του VEGF που έχουν δειχθεί ότι υπερεκφράζονται στο μαστό είναι οι VEGF121, 165 και 189 (128). Τα αυξημένα επίπεδα VEGF που έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού συσχετίζονται με αυξημένο μέγεθος και βαθμό διαφοροποίησης των όγκων (129). Αυξημένος παρουσιάζεται ο κίνδυνος υποτροπών και αντίστοιχα μειωμένος ο χρόνος επιβίωσης (είτε χωρίς υποτροπές, είτε συνολικός) ασθενών με αυξημένα επίπεδα VEGF (130). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο VEGF επιδρά και μειώνει το χρόνο επιβίωσης δεν είναι ξεκάθαρος. Η προγνωστική αξία του VEGF στα αρχικά στάδια του καρκίνου του μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς με τη βοήθεια κυρίως ανοσοϊστοχημικών τεχνικών με αντιφατικά αποτελέσματα (131, 132). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του VEGF, που αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της τεχνικής ELISA, βρέθηκε ότι συσχετίζονται ευθέως με αυξημένη πυκνότητα μικροαγγείων (MVD) κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης στο μαστό (133, 134). Επίσης αναφέρονται αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF σε ιστούς από καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς (134, 136).

Η προσπάθεια συσχετισμού της έκφρασης του VEGF είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης, είτε σε επίπεδο mRNA με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων απέδωσε στις περισσότερες περιπτώσεις θετική συσχέτιση με την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, αν και υπήρξαν μελέτες που έδειξαν το αντίθετο (42, 134, 137, 138). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ οιστρογόνων και VEGF αποσαφηνίστηκε πρόσφατα από την αναγώριση λειτουργικών στοιχείων απόκρισης σε οιστρογόνα (estrogen response elements) στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον VEGF (139). Το εύρημα αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν ευθέως τη μεταγραφή του VEGF σε κύτταρα και ιστούς. Άλλοι παράγοντες που έχει βρεθεί ότι επιδρούν στην έκφραση του VEGF είναι η υποξία, η έκφραση άλλων αυξητικών παραγόντων κ.α. (140-144).

Οι VEGF C και D που επάγουν και ρυθμίζουν την λεμφο-αγγειογένεση έχει δειχθεί ότι υπερεκφράζονται σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (145-150).

➤ **bFGF**

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR) βοήθησε στην ανίχνευση ενός αριθμού μελών της οικογένειας των FGF και των υποδοχέων τους σε φυσιολογικούς και σε καρκινικούς ιστούς προερχόμενους από μαστό (151). Αυτές οι μελέτες όμως δεν είναι αρκετές για αποδείξουν την αδιαμφισβήτητη εμπλοκή των FGF στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, αν και υποδεικνύουν ότι αυτά τα μόρια έχουν ενεργό συμμετοχή στην καρκινογένεση του μαστού. Ο FGF2 ή bFGF, ο οποίος παρουσιάζει αγγειογενετικές ιδιότητες, αποτελεί το πιο εκτεταμένα μελετημένο μέλος της οικογένειας. Δυστυχώς η πλειοψηφία των μελετών μέχρι τώρα πραγματοποιήθηκε σε πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων καρκίνου του μαστού, και τα αποτελέσματά τους είναι αντιφατικά. Είναι χαρακτηριστικό το ότι ορισμένες μελέτες δείχνουν στους καρκινικούς όγκους ή στον ορό των ασθενών, αυξημένα επίπεδα του bFGF σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα (152, 153), ενώ άλλες βρίσκουν χαμηλότερα επίπεδα (154-156), ή δε διαπιστώνουν να υπάρχει διαφορά (157). Ορισμένες μελέτες φανερώνουν συσχέτιση των υψηλών επιπέδων FGF2 με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών (152, 159). Τα επίπεδα έκφρασης του FGF2 δεν βρέθηκαν από τον Smith και τους συνεργάτες τους να συσχετίζονται με τον αριθμό μικροαγγείων του όγκου (152). Η ανοσοϊστοχημεία

φανέρωσε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της έκφρασης του FGF2 οφείλεται στα στρωματικά κύτταρα, και πολύ μικρή έως καθόλου οφείλεται στα καρκινικά κύτταρα (152, 159). Πρέπει να σημειωθεί ότι από όλες τις μελέτες που διεξήχθησαν, μόνο μία αξιολόγησε την έκφραση του bFGF σε επίπεδο mRNA μέχρι σήμερα (155).

➤ **TGF-β και υποδοχείς**

Ο TGF-β εμπλέκεται από πολλές απόψεις στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας λαμβάνοντας μέρος, μεταξύ άλλων, και στην αγγειογένεση μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών. Ο ρόλος του TGF-β στην καρκινογένεση του μαστού είναι ογκοκατασταλτικός στα πρώιμα στάδια της κακοήθους εξαλλαγής του μαστικού αδένου, και καθώς προχωράει ο καρκίνος σε υψηλότερο βαθμό κακοήθειας ο TGF-β αποκτά ογκογονικές ιδιότητες (74, 93, 160). Οι TGF-β υποκαταστάτες εκφράζονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του μαστικού αδένου και έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση σε όγκους επιθηλιακών κυττάρων του μαστού *in vitro* και *in vivo* (161, 162). Πολλές καρκινικές σειρές μαστού παρουσιάζουν απώλεια ή μείωση της απόκρισης στον TGF-β (163, 164), και μειωμένη έκφραση του TGF-β RII υποδοχέα στις πρώιμες προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού συσχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου (165). Συνεπώς η μειωμένη απόκριση στον TGF-β θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη κινδύνου δυνητικής κακοήθους εξαλλαγής μιας επιθηλιακής βλάβης. Μειωμένη έκφραση του TGF-β RII υποδοχέα στο πορωγενές καρκίνωμα *in situ* και στο διηθητικό καρκίνο του μαστού, συσχετίζεται με μεγάλο αριθμό μτώσεων και υψηλότερο κλινικό στάδιο και βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, τα οποία συμφωνούν με την ογκοκατασταλτική λειτουργία του TGF-β (166).

Στους προχωρημένου σταδίου καρκίνους του μαστού, τα επίπεδα του TGF-β αυξάνονται συστηματικά και τοπικά, ιδιαίτερα στα άκρα του διηθητικού καρκίνου και στις μεταστάσεις (167-171). Η αυξημένη έκφραση του TGF-β συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και τη μετάσταση υποδεικνύοντας ότι στα προχωρημένα στάδια ο TGF-β προωθεί την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (168, 169).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

5.1 Ο Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας συνιστά το 6% όλων των κακοηθειών στις γυναίκες και αποτελεί την τρίτη σε συχνότητα κακοήθεια, μετά τον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου. Παρουσιάζεται με υψηλότερη συχνότητα στις χώρες του τρίτου κόσμου, όπου η ενημέρωση είναι ανεπαρκής και η μέθοδοι πρόληψης δεν έχουν μπει στη συνείδηση και καθημερινή πράξη των γυναικών. Έχει υπολογιστεί ότι το 2% των γυναικών άνω των 40 ετών έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η μέση ηλικία των γυναικών που προσβάλλονται από διηθητικό καρκίνο είναι τα 45 έτη, ενώ η μέση ηλικία προσβολής από προ-διηθητικό καρκίνο είναι σημαντικά μικρότερη. Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών οφείλεται αφενός στη γενίκευση και καθιέρωση του τέστ Παπανικολάου ως μεθόδου ελέγχου του γενικού πληθυσμού, αλλά και στη σεξουαλική απελευθέρωση που επέτρεψε τη μόλυνση μεγάλου αριθμού ατόμων με ασθένειες και ιούς που συσχετίζονται με κακοήθειες (ιός HPV).

Στους προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας περιλαμβάνονται ογκογόνοι ιοί και μικροοργανισμοί όπως ο ιός του θηλώματος HPV (human papilloma virus) και τα χλαμύδια του τραχώματος (chlamydia trachomatis), καθώς και ιοί (όπως αυτός του έρπητα τύπου II) που προκαλούν φλεγμονές στον τράχηλο. Η χρόνια τραχηλίτιδα επίσης ενοχοποιείται ότι προδιαθέτει για την ανάπτυξη καρκίνου. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι σεξουαλικές συνήθειες των γυναικών, αφού μεγάλος αριθμός συντρόφων φαίνεται να σχετίζεται με την εξάπλωση της νόσου με βάση επιδημιολογικά στοιχεία (172, 173) .

5.2 Παθοφυσιολογία και ιστολογική ταξινόμηση.

➤ Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου της μήτρας (Cervical intraepithelial neoplasia, CIN).

Ο όρος CIN περιλαμβάνει όλες τις διαταραχές με τους όρους δυσπλασία και καρκίνωμα *in situ*. Η καθιέρωση του όρου CIN έγινε γιατί παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μια εξελικτική πορεία των δυσπλαστικών αλλοιώσεων προς καρκίνωμα *in situ*. Υπάρχουν τρεις τύποι CIN αλλοιώσεων με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

CIN I: Τα άνω 2/3 του πλακώδους επιθηλίου συνήθως παρουσιάζουν καλή διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι ανωμαλίες των πυρήνων είναι ελαφριάς μορφής και εντοπίζονται στα κύτταρα του ανώτερου 1/3 του επιθηλίου. Υπάρχουν μιτωτικές εικόνες αλλά είναι λίγες και εντοπίζονται στο κάτω 1/3 του επιθηλίου.

CIN II: Το άνω 1/2 του επιθηλίου είναι ώριμο και καλά διαφοροποιημένο, ενώ παρουσιάζει μερική ατυπία στους πυρήνες. Οι παθολογικοί πυρήνες είναι περισσότεροι. Παθολογικές μιτωτικές εικόνες παρατηρούνται στα κατώτερα 2/3 του επιθηλίου.

CIN III: Η ύπαρξη ωριμότητας στα κύτταρα εντοπίζεται στο άνω 1/3 επιθηλίου, ή απουσιάζει τελείως. Ανωμαλίες των πυρήνων και μιτωτικές εικόνες υπάρχουν σε όλο το πάχος του επιθηλίου.

Μια νεότερη ταξινόμηση των αλλοιώσεων του τραχήλου κατατάσει τις CIN I βλάβες στην κατηγορία των χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων (Low-grade squamous intraepithelial lesions, SIL), και τις CIN II και III στις υψηλού βαθμού αλλοιώσεις (High-grade SIL) (174).

Στην περίπτωση του καρκινώματος *in situ* πέραν της προσβολής ολόκληρου του επιθηλίου από τα δυσπλαστικά κύτταρα, υπάρχει και αλλοίωση στην πόλωση των κυττάρων, ενώ παρατηρούνται αυξημένες μιτωτικές εικόνες και πολυμορφισμός. Οι περισσότερες ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες αναπτύσσονται στη ζώνη μετατροπής ή μετάπτωσης του τραχηλικού επιθηλίου.

➤ **Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.**

Στο μεγαλύτερο ποσοστό (90%) ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας προέρχεται από το πλακώδες πολύστιβο επιθήλιο της έξω επιφάνειας της ενδοκολπικής μοίρας (επιθηλίωμα), σε 7% των περιπτώσεων είναι αδenoκαρκίνωμα και προέρχεται από τη μονοστιβάδα κυλινδρικού επιθηλίου του αυλού και τους αδένες του, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό καλύπτεται από μικτές μορφές.

Τα καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου (squamous cell carcinomas) χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) τα μεγαλοκυτταρικά μή κερατινοποιημένα καρκινώματα (large cell non-keratinising carcinomas) που απαντώνται σε ποσοστό 60%, β) τα μεγαλοκυτταρικά κερατινοποιημένα καρκινώματα (large cell keratinising carcinomas) τα οποία είναι λιγότερο διαφοροποιημένα και απαντώνται σε ποσοστό 35%, και γ) μικροκυτταρικά καρκινώματα (small cell tumors) που αποτελούν το 10-15% του συνόλου των περιπτώσεων. Το διηθητικό καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου διηθεί τον τράχηλο και επεκτείνεται μέσω λεμφογενών και αιματογενών μεταστάσεων. Με τη λεμφική οδό τα νεοπλασματικά κύτταρα μεταφέρονται στους επιχώριους λεμφαδένες (παραμήτριους, υπογαστρικούς κ.α.), ενώ με την αιματογενή διασπορά στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο, τα οστά, τα επινεφρίδια ή το πάγκρεας (175).

Τα αδenoκαρκινώματα διακρίνονται με βάση τον κυτταρικό τους τύπο σε: α) ενδοτραχηλικού τύπου (endocervical type), β) ενδομητριοειδή (endometrioid adenocarcinoma), γ) (clear cell carcinoma), δ) αδenoπλακώδη καρκινώματα (adenosquamous carcinoma), και αδιαφοροποίητου τύπου (undifferentiated type).

Σύμφωνα με την κλινική σταδιοποίηση των καρκινωμάτων από την Διεθνή Ομοσπονδία Μαιευτικής και Γυναικολογίας (FIGO, International Federation of Gynaecology and Obstetrics), τα καρκινώματα του τραχήλου είναι α) σταδίου μηδέν, όταν πρόκειται για καρκίνωμα *in situ*, β) σταδίου 1, όταν περιορίζονται στη μήτρα, γ) σταδίου 1A, όταν διαγιγνώσκονται μέσω μικροσκοπίας ως διηθητικά, δ) σταδίου 1B, όταν είναι ορατά με κλινική εξέταση και περιορίζονται στον τράχηλο, ε) σταδίου 2, όταν υπάρχει διήθηση της μήτρας (με επέκταση ή όχι στους παραμήτριους αδένες: 2B ή 2A), όχι όμως και της πυέλου, ή του κατωτέρου 1/3 τμήματος του κόλπου, στ) σταδίου 3, όταν υπάρχει διήθηση του κατώτερου 1/3 τμήματος του κόλπου (3A) ή στην πύελο (3B), και

ζ) σταδίου 4, όταν υπάρχει διήθηση του βλεννογόνου ή της κύστης (4A) ή μακρινές μεταστάσεις (4B).

5.3 Αγγειογένεση και καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.

Η αγγειογένεση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των κακοηθειών του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, αφού επιδρά στην εξέλιξη της νόσου και στην επιβίωση ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του ενδομητρίου ή των ωοθηκών (176-181). Ο Ishiwata και οι συνεργάτες του εδραίωσαν την αγγειογενετική ικανότητα των γυναικολογικών όγκων με την παρατήρηση ότι σχηματίζονται νέα αγγεία μετά από μεταμόσχευση των όγκων σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη (chorioallantoic membrane) (182). Οι πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν οδήγησαν στην άποψη ότι η νεο-αγγειογένεση είναι απαραίτητη κατά την εξέλιξη των *in situ* καρκινωμάτων (CIS) σε διηθητικά καρκινώματα (183). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες υπέδειξαν ότι η αγγειογένεση αυξάνεται παράλληλα με τα πρώτα στάδια της νεοπλασματικής διαδικασίας στον τράχηλο, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε ζωικά μοντέλα. Μάλιστα παρατηρείται επιπλέον αύξηση του αριθμού των μικροαγγείων στις υψηλού βαθμού προκαρκινικές νεοπλασίες και στον καρκίνο, με αντίστοιχες μορφολογικές αλλαγές και στα δύο μοντέλα (184). Πολύ σημαντικό είναι το εύρημα ότι οι CIN I αλλοιώσεις δεν διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά το βαθμό μικροαγγείων από τον φυσιολογικό τράχηλο, σε αντίθεση με τις CIN II και CIN III βλάβες, καθώς προβάλλει την πιθανότητα να μεταβάλλεται η αγγειογενετική ικανότητα των νεοπλαστικών κυττάρων κατά τη μετάβασή τους σε υψηλότερου βαθμού δυσπλασία. Άλλες μελέτες όμως παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (185, 186) καθώς συμπεραίνουν ότι μόνο το μικροδιηθητικό καρκίνωμα του τραχήλου είναι αγγειογενετικό και όχι το *in situ* καρκίνωμα (185). Μελέτες της προγνωστικής αξίας του βαθμού νεο-αγγείωσης των όγκων στο διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας απέδωσαν επίσης αντιφατικά αποτελέσματα (187-191). Οι περισσότερες όμως αξιολογήσεις τείνουν υπέρ της πιθανής χρήσης της αγγειογένεσης ως δείκτη της επιβίωσης των ασθενών.

5.4 Αυξητικοί παράγοντες στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η έκφραση των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της νεο-αγγειογένεσης στον καρκίνο του τραχήλου δεν έχει μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα. Μεταξύ των παραγόντων αυτών, το ενδιαφέρον έχουν συγκεντρώσει ο VEGF, ο PD-ECGF, ο EGF και σε μικρότερο βαθμό ο bFGF, ο TGF-β και οι υποδοχείς του. Στη συνέχεια περιγράφονται τα πειραματικά ευρήματα των ολιγάριθμων υπαρχόντων μελετών στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

➤ VEGF

Οι περισσότερες αναφορές (από τις λίγες συνολικά μελέτες που διερεύνησαν το ρόλο των αυξητικών παραγόντων στον τράχηλο της μήτρας) υπέδειξαν ισχυρή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων του VEGF, ο οποίος είναι δείκτης έντονης αγγειογενετικής δραστηριότητας, με υψηλού βαθμού επιθηλιακές αλλοιώσεις (High-grade SIL) και διηθητικό καρκίνο του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας (192-197). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης του VEGF που αξιολογήθηκαν με βάση ανοσοϊστοχημικές τεχνικές ή ανοσοενζυμικές μεθόδους, βρέθηκαν να συσχετίζονται με τοπική ανάπτυξη των όγκων, μετάσταση και κακή πρόγνωση (193-196). Εντούτοις άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης του VEGF δεν έχουν προγνωστική αξία (186). Επίσης η πρωτεΐνη VEGF βρέθηκε να εκφράζεται ισχυρότερα στα αδενοκαρκινώματα σε σύγκριση με τα καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας, γεγονός που προτείνει την διαφοροποίηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας ανάλογα με τον ιστολογικό κυτταρικό τύπο της κακοήθειας (177). Αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF έχουν αναφερθεί τόσο στις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (CIN), όσο και στο διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και έχουν συσχετιστεί με αυξημένο δείκτη μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD) (192, 198).

➤ **bFGF**

Μολονότι ο bFGF συγκαταλλάγεται μεταξύ των πρώτων μορίων που αναγνωρίστηκαν ως κύριοι ρυθμιστές της νεο-αγγειογένεσης κατά την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων και την ανάπτυξη όγκων, ο ρόλος του στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας δεν έχει διερευνηθεί ουσιαστικά και διεξοδικά. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μόνο δύο αναφορές που ασχολούνται με τα επίπεδα mRNA του bFGF σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς του τραχήλου της μήτρας (199, 200), ενώ δεν έχει διερευνηθεί καθόλου η έκφραση του bFGF στις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (CIN), οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν δυνητικά αρχόμενες καρκινικές καταστάσεις. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης του bFGF στους ιστούς που προέρχονταν πρώιμα στάδια καρκίνου και από φυσιολογικό τράχηλο, ενώ αυξημένα επίπεδα του bFGF βρέθηκαν σε καρκίνο προχωρημένου σταδίου μόνο από τον Fugimoto και τους συνεργάτες του. Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος και στις δύο μελέτες που προαναφέρθηκαν. Μέχρι της παρούσης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης του bFGF στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας δεν έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης.

➤ **TGF-β και υποδοχείς**

Εξαιτίας του διττού και πολύπλοκου ρόλου του στην ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας και ειδικότερα στην καρκινογένεση, ο TGF-β και συγκεκριμένα ο TGF-β1 αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν άλλοτε αυξημένα και άλλοτε μειωμένα επίπεδα του πλειοτροπικού αυτού παράγοντα κατά τη νεοπλασματική μεταμόρφωση του επιθηλίου του τραχήλου (201-203). Αξιολόγηση με τη μέθοδο RT-PCR έδειξε διακυμάνσεις των mRNA επιπέδων του TGF-β1 στους ιστούς που προέρχονταν από ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και φυσιολογικούς τραχήλους της μήτρας (204-206). Αυξημένα επίπεδα τόσο των TGF-β υποκαταστατών, όσο και των υποδοχέων τους έχουν αναφερθεί σε αδενοκαρκινώματα του τραχήλου (207), αλλά δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα η έκφρασή τους συνολικά, στα πλακώδη επιθηλιακά καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η νεο-αγγειογένεση είναι μια σύνθετη και πολυσταδιακή διεργασία που οδηγεί στο σχηματισμό νέων αγγείων αίματος από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο των ιστών. Ο μηχανισμός που ελέγχει το αγγειογονικό δυναμικό σε έναν όγκο δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα. Πιστεύεται ότι είτε αυξάνεται υπέρμετρα η έκφραση αγγειογονικών παραγόντων είτε αναστέλλεται η παραγωγή των αγγειοκατασταλτικών, διαταράσσοντας τη φυσιολογική ισορροπία. Ο μηχανισμός περιπλέκεται ακόμα περισσότερο αφού έχει αποδειχθεί ότι συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών αλλαγών επηρεάζουν την έναρξη της διαδικασίας. Παράδειγμα αποτελούν η υποξία, η φλεγμονή και ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια (ras, fos, HER2/neu, raf) τα οποία απορρυθμίζονται στον καρκίνο και έχουν άμεση σχέση με τον έλεγχο αγγειογονικών παραγόντων.

Ο ρόλος του φαινομένου της αγγειογένεσης έχει περιγραφεί σε όλους σχεδόν τους καρκίνους του ανθρώπου, συμπεριλαμβανόμενου του καρκίνου του μαστού και σε μικρότερο βαθμό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Υποστηρίζεται ότι αποτελεί ένα συνοδευτικό γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης και μπορεί να αποτελέσει ένδειξη και μέτρο του σταδίου της καρκινικής εξαλλαγής.

Σκοπός του πρώτου σκέλους της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων VEGF, bFGF, TGF- β 1, β 2, β 3 και των υποδοχέων του TGF- β RI, RII, RIII σε δείγματα ιστών που εξαιρέθηκαν κατά τη χειρουργική επέμβαση ασθενών με καρκίνο του μαστού, καθώς και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς από τις ίδιες ασθενείς. Στόχος της μελέτης ήταν να ταυτοποιηθεί το προφίλ έκφρασης των κυριότερων αγγειογενετικών παραγόντων που έχει δείχθει ότι εμπλέκονται στη διαδικασία του σχηματισμού νέων αγγείων, σε συνδυασμό με παράγοντες που δρουν κατασταλτικά στην αύξηση των όγκων και στην αγγειογένεση (TGF- β s και υποδοχείς) στον καρκίνο του μαστού. Με αυτόν τον τρόπο επιχειρήσαμε να καθορίσουμε τον αιτιολογικό παράγοντα της αυξημένης αγγειογονικής δραστηριότητας σε κάθε όγκο (αύξηση αγγειογονικών μορίων ή μείωση ογκοκατασταλτικών). Στη συνέχεια διερευνήθηκε η συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των όγκων, αλλά και η έκφραση κάθε παράγοντα μεμονωμένα, με τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων με στόχο:

- την ταξινόμηση των όγκων με βάση το αγγειογονικό δυναμικό
- τον προσδιορισμό/ταυτοποίηση των παραγόντων (ή του συνδυασμού αυτών) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανό δείκτη της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο (surrogate biomarker of angiogenic activity)
- τη συσχέτιση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων μεμονωμένα, αλλά και του προφίλ έκφρασης, με την έκταση και βαρύτητα της κακοήθους βλάβης, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή χρήση τους ως δείκτη για τον προσδιορισμό του κινδύνου αύξησης του μεγέθους του όγκου, ή εξέλιξης και επέκτασης των *in situ* καρκινωμάτων σε διηθητικό καρκίνο (προσδιορισμός πιθανών διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών στον καρκίνο του μαστού)
- την υπόδειξη των αυξητικών παραγόντων ή του συνδυασμού τους που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδεχόμενους δείκτες παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της εφαρμοζόμενης θεραπείας (μέσω παρακολούθησης της μεταβολής έκφρασης των αγγειογονικών παραγόντων)
- τον εντοπισμό-προσδιορισμό των αυξητικών παραγόντων-πιθανών στόχων αντι-αγγειογενετικής θεραπείας.

Επίσης προσδιορίστηκαν με την τεχνική western blot τα επίπεδα της πρωτεΐνης του VEGF και του TGF-β1 που παράγονται από τα κύτταρα των ίδιων καρκινικών και φυσιολογικών ιστών του μαστού που μελετήθηκαν προηγουμένως. Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια της έκφρασης της β-ακτίνης, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (internal control) και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν τόσο με τα κλινικά στοιχεία των δειγμάτων, όσο και με τα ευρήματα της έκφρασης των ίδιων αυξητικών παραγόντων σε επίπεδο mRNA. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί αν οι μεταβολές της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων που λαμβάνουν χώρα σε μεταγραφικό επίπεδο στην αγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού, συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση των παραγόμενων πρωτεϊνών, ή αν πραγματοποιείται μετα-μεταγραφική ρύθμιση των πρωτεϊνών και συνεπώς της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε αυτούς τους όγκους. Επίσης από τη συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί η πιθανότητα χρήσης της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτών ως δείκτη της δυναμικής εξέλιξης των όγκων προς υψηλότερο βαθμό κακοήθειας.

Σκοπός του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων του TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα ιστών από ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, που προέρχονται από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε επέμβαση ολικής υστερεκτομής για θεραπευτικούς λόγους. Επίσης μελετήθηκε η έκφραση των ίδιων παραγόντων σε δείγματα φυσιολογικών ιστών του τραχήλου της μήτρας που προέρχονταν από γυναίκες που χειρουργήθηκαν στον τράχηλο για ποικίλους άλλους θεραπευτικούς λόγους πλην της κακοήθειας.

Στόχος της μελέτης ήταν να ταυτοποιηθεί το προφίλ έκφρασης των κυριότερων αγγειογενετικών παραγόντων σε συνδυασμό με παράγοντες που δρουν κατασταλτικά στην αγγειογένεση, στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, και να συγκριθούν τα αποτελέσματα με τα ευρήματα της ίδιας μελέτης στον καρκίνο του μαστού. Με αυτόν τον τρόπο επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε το μηχανισμό που ελέγχει την επαγωγή της αγγειογενετικής δραστηριότητας στα κυριότερα νεοπλάσματα που προσβάλλουν τον γυναικείο πληθυσμό και να προσδιορίσουμε τυχόν ομοιότητες ή διαφορές στην αγγειογενετική διαδικασία που συνοδεύει την κακοήθη εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων σε αυτούς τους καρκίνους.

Και σε αυτή την περίπτωση διερευνήθηκε η συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των όγκων (αλλά και η έκφραση κάθε παράγοντα μεμονωμένα) με τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων με στόχο:

- την ταξινόμηση των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών και καρκινικών όγκων του τραχήλου της μήτρας με βάση το αγγειογονικό δυναμικό
- τον προσδιορισμό/ταυτοποίηση των παραγόντων (ή του συνδυασμού αυτών) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανό δείκτη της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε κάθε όγκο ή ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (surrogate biomarker of angiogenic activity)
- τη συσχέτιση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων μεμονωμένα, αλλά και του προφίλ έκφρασης, με την έκταση και βαρύτητα της ενδοεπιθηλιακής βλάβης ή κακοήθειας, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή χρήση τους ως δείκτη για τον προσδιορισμό του κινδύνου καρκινικής εκτροπής των επιθηλιακών δυσπλασιών σε *in situ* ή ακόμη και διηθητικό καρκίνο.
- Τον προσδιορισμό δεικτών δυνητικής αύξησης του μεγέθους του όγκου, ή εξέλιξης και επέκτασης των *in situ* καρκινωμάτων σε διηθητικό καρκίνο

- την υπόδειξη των αυξητικών παραγόντων ή του συνδυασμού τους που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ενδεχόμενους δείκτες παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της εφαρμοζόμενης θεραπείας (μέσω παρακολούθησης της μεταβολής έκφρασης των αγγειογονικών παραγόντων)
- τον εντοπισμό-προσδιορισμό των αυξητικών παραγόντων-πιθανών στόχων αντι-αγγειογενετικής θεραπείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

6.1.1 Συλλογή δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από μαστό οι οποίοι συλλέχθηκαν σε χρονικό διάστημα 2 περίπου ετών (2002-2004) από το διαγνωστικό και ερευνητικό κέντρο μαστού «Πρόληψις», στην Αθήνα. Τα δείγματα ιστών που μελετήθηκαν προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίες υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση χωρίς προηγουμένως να έχουν λάβει χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία. Επίσης μελετήθηκαν δείγματα που προέρχονταν από παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς από την κάθε ασθενή τα οποία κρίθηκαν ως φυσιολογικά-ελεύθερα κακοήθειας από παθολογοανατόμο. Τα δείγματα καρκίνου εξετάστηκαν επίσης παθολογοανατομικά για να καθοριστούν κλινικές παράμετροι όπως το στάδιο της νόσου, ο βαθμός κακοήθειας, η διήθηση λεμφαδένων. Επιπλέον έγινε λήψη οικογενειακού ιστορικού και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.

6.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων του μαστού.

Οι ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης στην παρούσα διατριβή ήταν ηλικίας 35-72 ετών με μέσο όρο ηλικίας τα (55,5±2,1) έτη. Οι μισές περίπου ασθενείς (52%, v=13) ήταν σε αναπαραγωγική περίοδο, ενώ οι υπόλοιπες είχαν ήδη μπει στην εμμηνόπαυση (48%, v=12).

Ο ιστολογικός τύπος των καρκινωμάτων του μαστού που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή αφορούσε, στην πλειοψηφία των δειγμάτων πορογενές διηθητικό καρκίνωμα (Invasive ductal carcinoma) σε ποσοστό 60% (n=15), λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Invasive lobular carcinoma) σε ποσοστό 4% (v=1), in situ ενδοπορικό/μικροπορικό και θηλώδες καρκίνωμα (in situ intraductal/microductal and nodular carcinoma) σε ποσοστό 8% (v=2), πολυκεντρικό διηθητικό καρκίνωμα

(multifocal infiltrating carcinoma) σε ποσοστό 4% (n=1), αδένωμα (adenoma) σε ποσοστό 4% (n=1) και τέλος μικτού ιστολογικού τύπου (mixed histological differentiation) σε ποσοστό 4% (n=1).

Μελέτη του ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης των διηθητικών καρκινωμάτων (n=21) έδειξε ότι μόνο το 5% των όγκων (n=1) ήταν καλής διαφοροποίησης (Grade I), το 29% (n=6) ήταν μέσης διαφοροποίησης (Grade II), ενώ την πλειοψηφία 67% (n=14) αποτελούσαν όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης (Grade III).

Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό %
<i>Ηλικία(έτη)</i>		
≤50	10	40
>50	15	60
<i>Εμμηνόπαυση</i>		
Προ-εμμηνόπαυσης	13	52
Μετά-εμμηνόπαυσης	12	48
<i>Ιστολογικός τύπος καρκινώματος</i>		
Πορογενές διηθητικό	15	60
Λοβιακό διηθητικό	1	4
Άλλοι τύποι	9	36
<i>Βαθμός διαφοροποίησης</i>		
Grade I	1	4
Grade II	6	24
Grade III	14	56
No grade	4	16
<i>Έκφραση υποδοχέων</i>		
ER+	15	60
ER-	9	36
άγνωστη	1	4
PR+	13	52
PR-	11	44
άγνωστη	1	4
HER2		
Θετική	12	48
Αρνητική	12	48
άγνωστη	1	4

Πίνακας 6.1: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER2 αξιολογήθηκαν ανοσοϊστοχημικά. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με βάση τα παρακάτω κριτήρια: α) μη ανιχνεύσιμη χρώση (-), β) ασθενής χρώση (+), <10% της κυτταρικής περιοχής ήταν θετική για τη σήμανση που μελετήθηκε, γ) μέτρια χρώση (++) , 10-50% της κυτταρικής περιοχής ήταν θετική για τη σήμανση που μελετήθηκε, δ) ισχυρή χρώση (+++), >50% της κυτταρικής περιοχής ήταν θετική για τη σήμανση που μελετήθηκε. Τα δείγματα που παρουσίασαν μέτρια ή ισχυρή χρώση για τον εκάστοτε προς μελέτη παράγοντα, θεωρήσαμε ότι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και αξιολογήθηκαν ως θετικά.

Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών τα οποία αποτέλεσαν τις κλινικές παραμέτρους με τις οποίες συσχετίστηκαν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Θεσμικής Δεοντολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

6.1.3 Συλλογή δειγμάτων Καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν επίσης ιστοί από τράχηλο της μήτρας οι οποίοι συλλέχθηκαν κατά τα έτη 2002-2003 από το Τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, ΠΑΓΝΗ, Κρήτη. Τα δείγματα ιστών που μελετήθηκαν προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ή ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις-βλάβες του τραχήλου της μήτρας (Cervical Intraepithelial lesions, CIN), οι οποίες υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση χωρίς προηγουμένως να έχουν λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, ή να έχουν υποβληθεί σε άλλου είδους χειρουργική επέμβαση στον τράχηλο. Επίσης μελετήθηκαν δείγματα ιστών που προέρχονταν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επέμβαση υστερεκτομής (transabdominal or transvaginal hysterectomy) για ποικίλους άλλους θεραπευτικούς λόγους, είχαν κριθεί ελεύθερα κακοήθειας από παθολογοανατόμο και αποτέλεσαν την ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες στην παρούσα μελέτη. Τα δείγματα καρκίνου και CIN αλλοιώσεων εξετάστηκαν επίσης παθολογοανατομικά για να καθοριστούν κλινικές παράμετροι όπως το στάδιο της νόσου, και ο βαθμός κακοήθειας.

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή θεσμικής δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και οι ασθενείς συνένεσαν, αφού προηγουμένως ενημερώθηκαν, για να πάρουν μέρος στη μελέτη.

6.1.4 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων τραχήλου της μήτρας.

Οι ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ήταν ηλικίας 32-82 ετών με μέσο όρο ηλικίας τα 52 έτη. Ένα ποσοστό 30% (n=13) των ασθενών ήταν σε αναπαραγωγική περίοδο, το 36% (n=16) βρίσκονταν γύρω από την εμμηνόπαυση, ενώ οι υπόλοιπες είχαν ήδη μπει στην εμμηνόπαυση (34%, n=15).

Ο ιστολογικός τύπος των καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας που μελετήθηκαν αφορούσε, στην πλειοψηφία των δειγμάτων ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma) (8 περιπτώσεις) και σε μία περίπτωση αδenoκαρκίνωμα (adenocarcinoma). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά FIGO (International Federation of Obstetrics and Gynecology), μία περίπτωση αφορούσε καρκίνο κλινικού σταδίου IA (12,5%), μία καρκίνο σταδίου IB (12,5%), τέσσερις ήταν σταδίου IIB (50%) και δύο ήταν κλινικού σταδίου III (25%).

Από την ιστολογική εξέταση των 14 δειγμάτων με ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, σύμφωνα με την Ιστολογική ταξινόμηση των αλλοιώσεων της Γυναικείας Γεννητικής Οδού από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO classification) (Poulsen, 1975) προέκυψαν 5 περιπτώσεις (36%) ενδοεπιθηλιακής βλάβης CIN I, 3 περιπτώσεις (21%) ενδοεπιθηλιακής βλάβης CIN II και 6 περιπτώσεις (43%) ενδοεπιθηλιακής βλάβης CIN III. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων τραχήλου της μήτρας με καρκίνο ή ενδοεπιθηλιακές βλάβες.

Πίνακας 6.2: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις.

	Μάρτυρες	CIN			Καρκίνος			
		I	II	III	Sqamous Cell Carcinoma	Adenocarcinoma		
Αριθμός ασθενών	21	5	3	6	IA	2	IB	1
					IIB	4		
					III	1		

6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από συμπαγείς ιστούς.

Η απομόνωση ολικού RNA από συμπαγείς ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Life Technologies Ltd., U.K.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η μέθοδος αποτελεί παραλλαγή αυτής που προτάθηκε το 1987 από τους Chomczynski and Sacchi και βασίζεται στη λύση των κυττάρων με χρήση θειοκυανικής γουανιδίνης και την απομάκρυνση των λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA με φαινόλη. Συνοπτικά, μετά την ομογενοποίηση τμήματος του ιστού στο διάλυμα Trizol, εκχυλίζεται το RNA με την προσθήκη 1/10 του όγκου χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια το ίζημα του RNA εκπλένεται με 75% αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Η επαναιώρηση του RNA πραγματοποιείται σε νερό που έχει υποστεί κατεργασία με DEPC (diethyl pyrocarbonate) σε συγκέντρωση 0,1% για την αδρανοποίηση των RNασών. Το DEPC αδρανοποιείται με αποστείρωση του διαλύματος. Ακολούθησε ενζυμική πέψη του εναπομείναντος DNA με Rnase free Dnase I.

6.2.2 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA.

6.2.3.1 Φασματοφωτομέτρηση RNA

Η καθαρότητα και συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε υπεριώδες φασματοφωτόμετρο (Hitachi Instruments Inc., U.S.A.) στα 260nm και 280 nm. Συγκεκριμένα η ποσότητα του RNA προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση στα 260 nm στηριζόμενοι στο ότι διάλυμα RNA 40μg/mL έχει απορρόφηση 1 a.u. (absorbance units). Ο λόγος των τιμών απορρόφησης που παρουσιάζει ένα διάλυμα RNA στα 260nm/280nm, αποτελεί μέτρο της καθαρότητας του και των προσμείξεων από DNA ή και πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν.

6.2.3.2 Ηλεκτροφόρηση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Προκειμένου να εξετάσουμε την ακεραιότητα του RNA, περίπου 5μg RNA επαναδιαλύονται σε 25μL απιονισμένου φορμαμιδίου 50% (v/v), 1x MOPS διάλυμα (0,02 M MOPS, 50mM οξικό νάτριο και 10μM EDTA , pH 8,0) και 16% φορμαλδεΐδη. Ακολουθεί αποδιάταξη των δειγμάτων στους 65°C για 25 λεπτά και ψύξη σε πάγο. Προστίθενται 2,5μL φόρτωσης (50% γλυκερόλη, 1mM EDTA και 0,25% κυανούν της βρωμοφαινόλης). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (σε 1x διάλυμα MOPS και 2,2M φορμαλδεΐδη). Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα ανακινείται σε απεσταγμένο νερό για μία ώρα για την απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης και βάφεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5ng/mL.

6.2.4 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).

6.2.4.1 Αρχή μεθόδου.

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis και τους συνεργάτες του και έφερε πραγματική επανάσταση στην μοριακή βιολογία με εφαρμογές από την μοριακή έρευνα στην κλινική πράξη. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει σε ελάχιστο χρόνο, που δεν υπερβαίνει τις 2-3 h, την ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μία σχετική αποδιάταξη.

Το υπόστρωμα DNA επώαζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την θερμοανθεκτική *Taq* DNA πολυμεράση που προέρχεται από θερμοφιλά βακτήρια, μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 min και ακολουθούν 30-40 κύκλοι 95°C (αποδιάταξη), 55-60°C (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C (πολυμερισμός), διάρκειας περίπου 30 sec το κάθε βήμα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N=n(1+e)^c$, όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, n η αρχική

ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης.

6.2.4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην PCR.

Οι κυριότεροι παράγοντες που συνεισφέρουν στην επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού όσον αφορά την ευαισθησία, την εξειδίκευση αλλά και την απόδοση, περιγράφονται στην συνέχεια:

1. Επιλογή κατάλληλων εκκινητών:

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Ο καλός σχεδιασμός για την επιλογή εκκινητών αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα για την επιτυχία της PCR. Στατιστικά, έχει βρεθεί ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20 bp, τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα και κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Προτιμούνται εκκινητές που α) έχουν περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη παρόμοια με το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί, β) δεν έχουν σημαντική δευτεροταγή δομή ούτε αλληλεπικάλυση ειδικά στο 3' άκρο, γ) δεν έχουν εκτάσεις από πολυουρίνες ή πολυουριμιδίνες και δ) το ζεύγος των εκκινητών δεν εμφανίζει συμπληρωματικότητα και δε σχηματίζει διμερή (primer dimmers) με αποτέλεσμα την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

2. Επιλογή θερμοκρασίας υβιδοποίησης εκκινητών (annealing temperature):

Η θερμοκρασία υβριτισμού ποικίλλει ανάλογα με το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC, και το είδος του υποστρώματος DNA. Ως ιδανική θερμοκρασία υβριτισμού T_m θεωρείται αυτή που το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριτισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR.

3. Επιλογή συγκέντρωσης δεσόξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg:

Τα ιόντα Mg^{2+} είναι μεταλλικός συμπαράγοντας της Taq πολυμεράσης και η μεν περίσσεια τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μη ειδικού προϊόντος λόγω αύξησης της ενεργότητας της πολυμεράσης, η δε έλλειψή της οδηγεί σε μειωμένη απόδοση προϊόντος. Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, συνήθως η κανονικοποίηση των συνθηκών

σε μία αντίδραση PCR, περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων Mg.

4. Αριθμός κύκλων:

Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-30 και προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την καλύτερη δυνατή απόδοση προϊόντος με το λιγότερο μη ειδικό προϊόν. Μετά από έναν αριθμό κύκλων η αντίδραση φτάνει σε μια στατική φάση (plateau) κατά την οποία νέα αύξηση του αριθμού των κύκλων δεν οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης.

Για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματίσει η αντίδραση, ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση. Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου [Siebert & Larrick, 1992]. Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγραφών της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σαν ο λόγος της ως προς την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στον συναγωνιστή.

5. Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων:

Αναστολείς μπορεί να υπάρχουν είτε στα βιολογικά δείγματα είτε στα χημικά αντιδραστήρια. Παράδειγμα αναστολέων είναι ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως το SDS. Ουσίες-ενισχυτές της αντίδρασης αποτελούν το φορμαμίδιο (5%), πολυαιθανογλυκόλη (PEG) (5-15%) κ.α.

6.2.5 Μέθοδος αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR).

Η μέθοδος αναφέρεται στην εφαρμογή του PCR όταν αρχικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται RNA (reverse transcription PCR: RT-PCR). Κατά την μέθοδο αυτή το RNA μετατρέπεται αρχικά σε cDNA το οποίο χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα για την

αντίδραση πολυμερισμού. Χρησιμοποιείται το ένζυμο Thermoscript II Rnase H-Reverse Transcriptase.

Τρία έως πέντε μg ολικού RNA υφίστανται αντίστροφη μεταγραφή σε όγκο 20 μl (200 mM Tris HCl; pH 8,4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, 10 mM dNTPs, 50 ng random hexamers και 200 U Thermoscript II Rnase H- Reverse Transcriptase) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το προϊόν της αντίδρασης στη συνέχεια υφίσταται πέψη με Rnase H (2 U/μl) έτσι ώστε να αποικοδομηθεί η ποσότητα του ολικού RNA που δεν μετατράπηκε σε cDNA. Το προϊόν της πέψης μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την ενίσχυση κωδικών αλληλουχιών γονιδίων με την χρήση της PCR.

6.2.6 Ημιποσοτική RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων.

Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν περιλαμβάνει την ενίσχυση μέσω της αντίδρασης PCR και ενός γονιδίου-μάρτυρα το οποίο χρησιμεύει ως εσωτερικό πρότυπο, εκτός από το γονίδιο-στόχο. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (και σε ορισμένες περιπτώσεις και η β-ακτίνη).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης PCR ξεχωριστά για κάθε ζεύγος εκκινητών (συγκέντρωση εκκινητών, ιόντων Mg²⁺, δεόξυριβονουκλεοτιδίων, αριθμός κύκλων της αντίδρασης). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μίγμα των cDNA όλων των δειγμάτων. Στη συνέχεια συνδυάστηκε η αντίδραση ενίσχυσης κάθε υπό μελέτη γονιδίου με αυτή για το εσωτερικό πρότυπο σε ένα μίγμα. Ακολούθησε νέα βελτιστοποίηση των συνθηκών με ρύθμιση της σχετικής αναλογίας των συγκεντρώσεων των εκκινητών γονιδίου και εσωτερικού μάρτυρα, ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει αμοιβαία καταστολή των αντιδράσεων (συγχρονισμός αντιδράσεων). Κατόπιν επιτελέστηκαν προκαταρκτικές αντιδράσεις PCR όπου το υπόστρωμα αραιωνόταν διαδοχικά (δημιουργία πρότυπης καμπύλης) έως το σημείο εκείνο όπου δεν υφίσταται πλέον η γραμμική σχέση ποσότητας υποστρώματος-ποσότητας προϊόντος PCR. Επίσης προσδιορίστηκε ο αριθμός των κύκλων της διπλής αντίδρασης, που διασφαλίζει ότι και οι δύο αντιδράσεις ενίσχυσης βρίσκονται σε εκθετική φάση επέκτασης. Με αυτόν τον τρόπο η ποσότητα των παραγόμενων

προϊόντων της PCR είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας του cDNA των δειγμάτων (template). Ο λόγος της έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου προς την έκφραση του εσωτερικού μάρτυρα, προσδιοριζόμενη από το λόγο της έντασης των αντίστοιχων ζωνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, αποτέλεσε τη βάση του ημιποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων και χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε προγραμματιζόμενο θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research Inc. U.S.A.). Οι συνθήκες αντίδρασης περιλάμβαναν αρχική αποδιάταξη του cDNA στους 94°C για 3 λεπτά, και ακολουθούσαν 30-35 κύκλοι με: αποδιάταξη στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών σε κατάλληλη κάθε φορά θερμοκρασία (Πίνακας 6.3) για 30-45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση του προϊόντος στους 72°C για 30-45 δευτερόλεπτα. Κατόπιν τα ημιτελή PCR προϊόντα επιμηκύνονταν με επώαση στους 72°C για 10 λεπτά και η αντίδραση τερματίστηκε με ψύξη στους 4 °C.

Πίνακας 6.3: Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες PCR αντιδράσεων.

Γονίδιο	Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<i>VEGF</i>	(F): GCAGAAGGAGGAGGGCAGAATC (R): ACACTCCAGGCCCTCGTCATT	62	197
<i>FGF2</i>	(F): GAAGAGCGACCCCTCACATCAAG, (R): CTGCCCAGTTCGTTTCAGTG	58	236
<i>TGFB1</i>	(F): ACCAACTATTGCTTCAGCTC (R): TTATGCTGGTTGTACAGG	55	198
<i>TGFB2</i>	(F): CTGTCCCTGCTGCACTTTTGT (R): TCTTCCGCCGTTGGTCTGTT	58	227
<i>TGFB3</i>	(F): CCTTTCAGCCCAATGGAGAT (R): ACACAGCAGTTCTCCTCCAA	57	241
<i>TGFBR1</i>	(F): TCGTCTGCATCTCACTCAT (R): GATAAATCTCTGCCTCACG	54	344
<i>TGFBR2</i>	(F): GCGGGAGCACCCCTGTGTC (R): CCCGAGAGCCTGTCCAGATGC	62	216
<i>TGFBR3</i>	(F): AATCTGGGCCATGATGCAG (R): ACTGCTGTTTTCCGAGGCT	57	287
<i>β-actin</i>	(F): AGCCTCGCCTTTGCCGA (R): CTGGTGCCTGGGGCG		175
<i>β2 microglobulin (B2M)</i>	(F): AGCGTACTCCAAAGATTCAGGTT (R): TACATGTCTCGATCCCCTTAACCTAT		297

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x ρυθμιστικό διάλυμα PCR αντίδρασης (50mM Tris.HCl, 50mM KCl, 10mM διθειοθρεϊτόλη, 0.5μM σπερμιδίνη), 2mM MgCl₂ , 200 μM εκάστοτε dNTP, και 0,65Units Platinum Taq DNA πολυμεράση (Life technologies Ltd, U.K.).

Πίνακας 6.4: Αναλογία εκκινητών υπό μελέτη γονιδίων προς γονίδια αναφοράς (β2M ή β-ακτίνη).

Γονίδια	Αναλογία εκκινητών (pmol γονιδίου/pmol β2M)	Κύκλοι PCR αντίδρασης
<i>VEGF</i>	9:1	33
<i>FGF2</i>	12:1	35
<i>TGFB1</i>	12:1,5	35
<i>TGFB2</i>	12:1,5	35
<i>TGFB3</i>	30:1,5	35
<i>TGFBR1</i>	20:1,5	35
<i>TGFBR2</i>	12:1	35
<i>TGFBR3</i>	10:10 *	35

*Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη.

6.2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR και RT-PCR και χρώση με νιτρικό άργυρο.

Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση αρχικά σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% (29:1 ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο). Η πήξη επιτυγχάνεται για την μεν αγαρόζη με την πτώση θερμοκρασίας αφού προηγηθεί βρασμός, ενώ για το ακρυλαμίδιο με την προσθήκη 50μl τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED) και 600μl υπερθειικού αμμωνίου 10% για 60mL διαλύματος ακρυλαμίδιου. Και στις δύο περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε υδατικό μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5x TBE (0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3). Το δείγμα DNA

ηλεκτροφορεύεται μετά από επαναιώρηση σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη.

➤ Χρώση με Βρωμιούχο αιθίδιο

Η χρώση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/mL κατά την παρασκευή του πηκτώματος. Οι ζώνες DNA γίνονται ορατές κατόπιν έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

➤ Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining).

Σε κάθε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται για την πολύ μεγάλη ευαισθησία της. Στα μειονεκτήματα της ταξινομείται η μη ειδική χρώση του δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι χρωματίζεται επίσης και το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και πρωτεΐνες, θέτοντας σαν προϋπόθεση για την εφαρμογή της την ύπαρξη ιδιαίτερα καθαρού και ειδικού DNA.

Αρχικά το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται σε διάλυμα που περιέχει 10% αιθανόλη και 0,5% οξικό οξύ για 10 min για μονιμοποίηση. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,1% (w/v) για 20 min σε ημίφως, πλύσιμο με νερό και προσθήκη κατόπιν του διαλύματος εμφάνισης που περιέχει 0,4 N NaOH και 0,15 (v/v) φορμαλδεΐδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 0,75% (w/v).

6.2.8 Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων.

Κάθε πήκτωμα σαρώθηκε σε έναν ψηφιακό σαρωτή εικόνας (Agfa Snap-Scan 1212 u. Gevaert N.V.Belgium). Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών (πυκνότητα ζώνης προϊόντος-πυκνότητα ζώνης υποβάθρου) χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ανάλυση ψηφιακής εικόνας (Scion image). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας του κάθε γονιδίου διαιρεμένο με αυτόν της β2-M, χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό καθορισμό των αποτελεσμάτων.

B. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.9 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς.

Η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Life Technologies Ltd., U.K.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Με τον τρόπο αυτό από το ίδιο τμήμα ιστού από το οποίο έγινε η απομόνωση του RNA, έγινε και η απομόνωση της πρωτεΐνης. Συνοπτικά, μετά την ομογενοποίηση τμήματος του ιστού στο διάλυμα Trizol, και την εκχύλιση του RNA με την προσθήκη χλωροφορμίου, προστίθεται στην οργανική φάση αιθανόλη και κατακρημνίζεται το DNA από τη μεσόφαση. Μετά την απομάκρυνση του ιζήματος του DNA κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες με προσθήκη ισοπροπυλικής αλκοόλης. Το ίζημα των πρωτεϊνών εκπλένεται με 95% αιθανόλη και απόλυτη αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Η επαναιώρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε 1% SDS και επώαση στους 50°C.

6.2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Η μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας των πρωτεϊνών κατά Bradford στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης διαλύματος της πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS στα 595nm με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής, γνωστής ως διάλυμα Bradford. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μg/μl, και από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (μg/μl). Υπολογίζεται η εξίσωση που διέπει την πρότυπη καμπύλη που είναι της μορφής: $y=ax+b$. Ακολουθεί φωτομέτρηση στο ίδιο μήκος κύματος των δειγμάτων πρωτεΐνης εις διπλούν και υπολογισμός της μέσης τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

6.2.11 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών.

Τα δείγματα πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SDS-PAGE (29:1 ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο). Χρησιμοποιήθηκαν 25 µg πρωτεΐνης κάθε δείγματος τα οποία αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης και αποδιάταχθηκαν με βρασμό στους 95°C για 5-10 λεπτά και ταχεία ψύξη σε πάγο. Το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης περιλαμβάνει μερκαπτοαιθανόλη και SDS ως αποδιατακτικούς παράγοντες των πρωτεϊνών, και κυανό της βρωμοφαινόλης ως χρωστική που κάνει ορατές τις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα: α) το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating or resolving gel) και β) το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) που εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή όλης της ποσότητας των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού.

6.2.12 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (western blot analysis).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη τύπου PVDF με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Η αρχή λειτουργίας της συσκευής είναι πολύ απλή: διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεταφέρονται οι πρωτεΐνες (αρνητικά φορτισμένες) από το πήκτωμα στη μεμβράνη.

Ακολουθεί δέσμευση των ελεύθερων πρωτεϊνών περιοχών της μεμβράνης (blocking), μέσω επώασης της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλατος (σε σκόνη) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1x. Κατόπιν η μεμβράνη εκπλένεται από την περίσσεια του διαλύματος blocking με διάλυμα TBS-T (Tris buffer saline, 1% Tween 20) 3 φορές, για διάστημα 10 λεπτών κάθε φορά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του πρώτου αντισώματος κατάλληλης αραίωσης (1:500 mouse anti-VEGF, 1:250 mouse anti-TGF-β1 και 1:10000 mouse anti-actin) σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% γάλα, και επώαση της μεμβράνης στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθούν εκπλύσεις του αντισώματος όπως και προηγουμένως, και προσθήκη του δεύτερου αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση (1:10000 anti-mouse), που είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση του ραπανιού) και επώαση της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η

μεμβράνη στη συνέχεια εκπλένεται όπως και προηγουμένως, και αφού έρθει σε επαφή για 1-3 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτίθεται σε φωτογραφικό φίλμ όπου αποτυπώνεται η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες.

6.2.13 Ψηφιακή επεξεργασία αποτελεσμάτων.

Κάθε φωτογραφικό φίλμ σαρώθηκε σε έναν ψηφιακό σαρωτή εικόνας (Agfa Snap-Scan 1212 u. Gevaert N.V.Belgium). Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών (πυκνότητα ζώνης προϊόντος-πυκνότητα ζώνης υποβάθρου) χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ανάλυση ψηφιακής εικόνας (Scion image, alpha imager). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας του κάθε πρωτεΐνης διαιρεμένο με αυτόν της β-ακτίνης, χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό καθορισμό των αποτελεσμάτων.

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.2.14 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές \pm SEM (standard error of the mean). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των στατιστικά σημαντικά διαφορών των τιμών έκφρασης mRNA ή πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών ομάδων δειγμάτων (φυσιολογικά-παθολογικά) ή κλινικών δεδομένων (στάδιο της νόσου, βαθμός διαφοροποίησης όγκου κ.α.), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal Wallis, Mann-Whitney), αφού διαπιστώθηκε ότι οι τιμές των μετρήσεων δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Η συσχέτιση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων ανά δύο (αξιολόγηση συνέκφρασης) πραγματοποιήθηκε με χρήση της δοκιμασίας Spearman (correlation). Τιμές πιθανοτήτων μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση υλοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SPSS 11.

6.3 ΥΛΙΚΑ

6.3.1. Διαλύματα

➤ *Διαλύματα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών.*

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών Trizol (Life Technologies Ltd., U.K.)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- dH₂O κατεργασμένο με DEPC
- 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS

➤ *Ηλεκτροφορητικά διαλύματα.*

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (0.5x TBE): 0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3
- Διάλυμα φόρτωσης DNA: 0.25% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη
- Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών 3x: 0.2 M Tris.HCl, 6% SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0,03 % κυανού της βρωμοφαινόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating or resolving gel buffer): 1.5 M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης πρωτεϊνών (stacking gel buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 10x: 0.25mM Tris base, 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8,3
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη (transfer buffer) 1x: 0.025mM Tris base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη , pH 8,3
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης TBS: Tris buffer saline
- Διάλυμα ECL χημειοφωταυγούς ανίχνευσης πρωτεϊνών (ChemiLucent Western blot detection system, Chemicon Int, Cat No 2600).

➤ **Διαλύματα χρώσης νιτρικού αργύρου.**

- Fixer (1Lt):
100ml EtOH (10% αιθανόλη), 50mL CH₃COOH (0,5% οξικό οξύ), 850mL dH₂O
- Διάλυμα Νιτρικού αργύρου: 1gr AgNO₃ σε 1Lt dH₂O [0,1% (w/v)]
- Διάλυμα εμφάνισης: 0,4 N NaOH και 0,15 (v/v) HCHO (φορμαλδεΰδη)
- Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης: NaCO₃ 0,75% (w/v).

6.3.2. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

➤ **Υλικά**

Αγαρόζη- Gibco BRL	MOPS-Sigma
Αιθανόλη- Merck	Οξικό οξύ-BDH
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)-BDH	Πρωτεΐνάση K- Gibco BRL
Ακρυλαμίδιο-BDH	SDS (Sodium dodecyl sulphate)-BDH
Ανθρακικό νάτριο-Sigma	TEMED-Sigma
Βορικό οξύ- BDH	Tris base-BDH
Βρωμιούχο αιθίδιο-BDH	Tween 20-Sigma
Γλυκερόλη- Gibco BRL	Υδροξείδιο του Νατρίου-Sigma
Διθειοθειτόλη-Sigma	Υδροχλωρικό οξύ-BDH
Δεσόξυριβονουκλεοτίδια- Gibco BRL	Υδροχλωρική γουανιδίνη-BDH
Ισοπροπανόλη-BDH	Φαινόλη-BDH
Κιτρικό νάτριο-BDH	Φορμαλδεΰδη-BDH
Κυανό της βρωμοφαινόλης-Sigma	Χλωριούχο νάτριο-Sigma
Μεθανόλη- BDH	Χλωροφόρμιο-Fluka

➤ **αντισώματα**

- mouse anti-humanVEGF (R&D systems, Inc) (mab 293)
- mouse anti-human TGF-β1 (R&D systems, Inc) (mab 240)
- mouse anti-human β-actin (Chemicon, International) (mab 2501)
- anti-mouse IgG-HRP (Sigma) (Cat No 0168)

➤ *Ένζυμα.*

- Platinum Taq DNA πολυμεράση (Life Technologies Ltd., U.K.)
- Thermoscript αντίστροφη μεταγραφάση (Life Technologies Ltd., U.K.)
- Rnase free Dnase I
- Rnase out

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

7.1 Δείγματα που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης.

Στα πλαίσια της μελέτης του προτύπου έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων του TGF-β RI, RII, RIII, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 25 ζεύγη δειγμάτων ιστού από μαστό. Κάθε ζεύγος αποτελούνταν από καρκίνο του μαστού και παρακείμενο φυσιολογικός ιστός από την ίδια ασθενή, ο οποίος εκτιμήθηκε παθολογοανατομικά ως φυσιολογικός-ελεύθερος κακοήθειας. Τα δείγματα ιστών που μελετήθηκαν προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίες υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση χωρίς προηγουμένως να έχουν λάβει χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία. [βλέπε Κεφάλαιο 6, συλλογή δειγμάτων].

7.2 Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα μαστού.

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στα δείγματα ιστών του μαστού, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ομαδοποιήσεις με δύο αντίστοιχα διαφορετικές στατιστικές αναλύσεις:

α) Η πρώτη ομαδοποίηση διαχώρισε τα δείγματα σε δύο ομάδες: τα φυσιολογικά (adjacent normal) και αυτά που έφεραν καρκινικές αλλοιώσεις (cancer). Στην περίπτωση αυτή η στατιστική ανάλυση είχε σαν στόχο τον προσδιορισμό των διαφορών των καρκινικών από τους φυσιολογικούς ιστούς, όσον αφορά την έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στην παρούσα διατριβή.

β) Η δεύτερη ανάλυση είχε ως κύριο χαρακτηριστικό τη μελέτη των ζευγών δειγμάτων από την κάθε ασθενή. Στην περίπτωση αυτή κάθε ζεύγος δείγματος χαρακτηρίστηκε από την αναλογία της mRNA έκφρασης κάθε γονιδίου προς το γονίδιο αναφοράς (β2M) στον καρκινικό ιστό, προς την αντίστοιχη έκφραση στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από την ίδια ασθενή. Δηλαδή για κάθε ζεύγος δείγματος, ο λόγος

[(VEGF/ β 2M) tumor/(VEGF/ β 2M) normal] χρησιμοποιήθηκε ως μέσο για τον προσδιορισμό του μοριακού προτύπου της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων σε κάθε όγκο. Από την ομαδοποίηση των ζευγών δειγμάτων με βάση κοινά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, επιχειρήσαμε να προσδιορίσουμε ομοιότητες ή διαφορές στα μοριακά πρότυπα των όγκων (πρότυπο έκφρασης των γονιδίων σε κάθε όγκο) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν μοριακούς δείκτες της αγγειογένεσης και κατ' επέκταση της καρκινογένεσης στο μαστό.

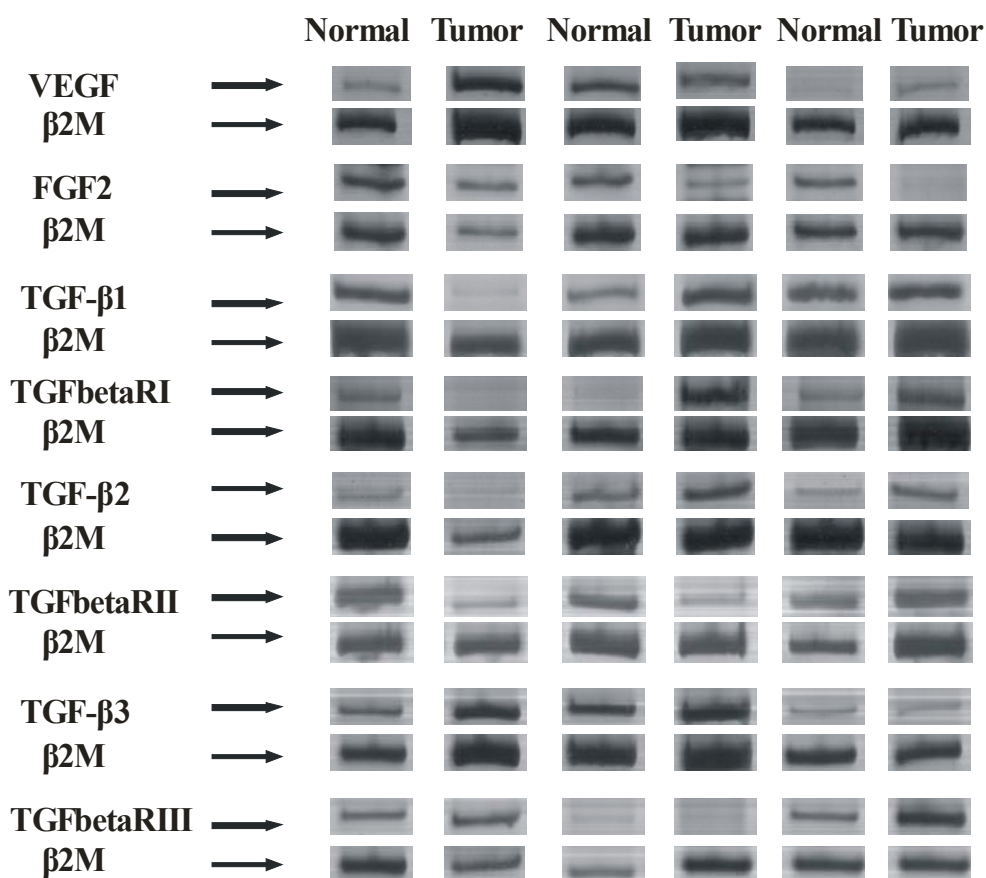
7.2.1 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων.

Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων bFGF και TGF- β 3 διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν σημαντικά στις ομάδες των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων του μαστού που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή ($P=0.031$ και 0.043 αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Η έκφραση των υπόλοιπων αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα. Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης και το σφάλμα της μέσης τιμής (mean \pm SEM) όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν σε κάθε κατηγορία δειγμάτων.

Πίνακας 7.1: Έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων στις ομάδες δειγμάτων: φυσιολογικά δείγματα και καρκίνος του μαστού.

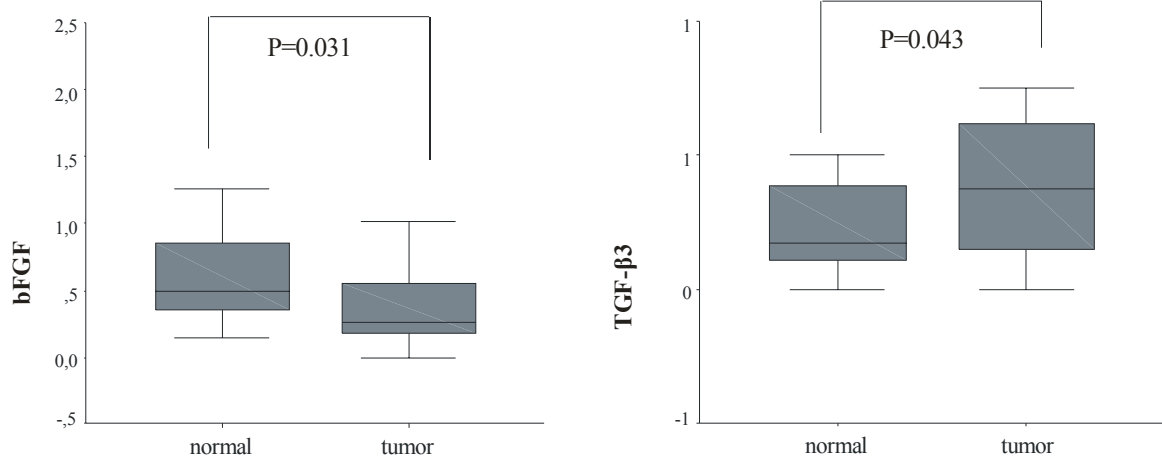
Growth factor	tumor	normal	<i>P</i> value
VEGF/ β 2M	0.34 +/- 0.03	0.30 +/- 0.04	NS
FGF2/ β 2M	0.45 +/- 0.02	0.62 +/- 0.09	0.031
TGF- β 1/ β 2M	0.28 +/- 0.02	0.25 +/- 0.02	NS
TGF- β 2/ β 2M	0.20 +/- 0.05	0.12 +/- 0.02	NS
TGF- β 3/ β 2M	0.63 +/- 0.22	0.32 +/- 0.12	0.043
TGF β RI/ β 2M	0.16 +/- 0.03	0.30 +/- 0.14	NS
TGF β RII/ β 2M	0.37 +/- 0.05	0.46 +/- 0.08	NS
TGF β RIII/ β -actin	1.47 +/- 0.69	2.94 +/- 0.84	NS

*Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney.**NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό)



Εικόνα 7.2: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα έκφρασης σε επίπεδο mRNA των VEGF, FGF2 (bFGF), TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII , RIII σε δείγματα ιστών με καρκίνο του μαστού και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από την ίδια ασθενή (normal, tumor).

Για κάθε δείγμα παρουσιάζεται και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς (β2M), καθώς ο λόγος της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου προς αυτή του γονιδίου αναφοράς αποτέλεσε τη βάση του ημιποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων και χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 7.3: Επίπεδα mRNA bFGF και TGF-β3 σε φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα μαστού.

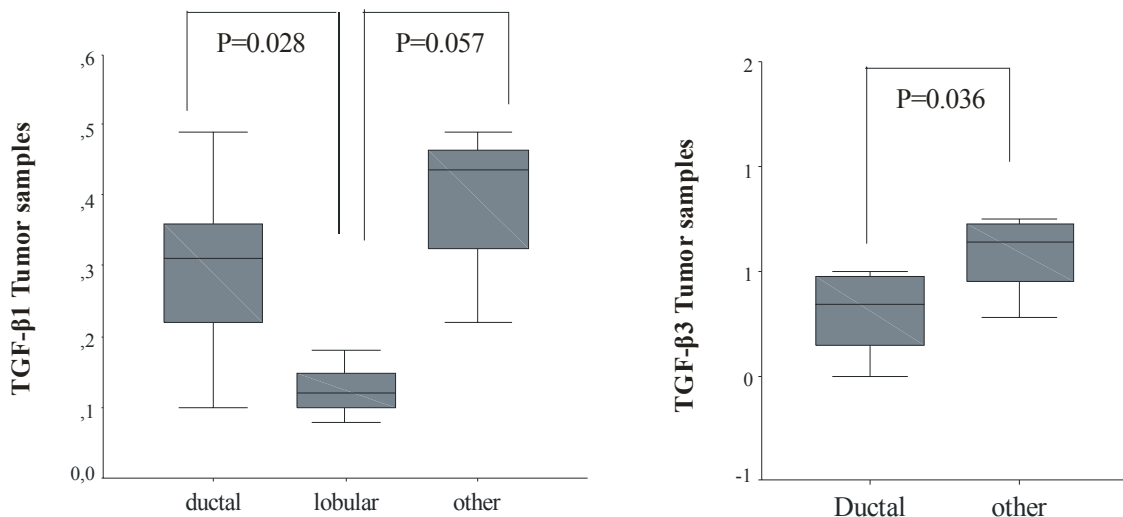
Οι σχετικές τιμές επιπέδων mRNA των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων ($P=0.031$ και 0.043 αντίστοιχα, Mann-Whitney test).

Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση των mRNA επιπέδων του TGF-β3 στα δείγματα ιστών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με την ομάδα δειγμάτων με τους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ μείωση διαπιστώθηκε στην ίδια περίπτωση όσον αφορά τα μεταγραφικά επίπεδα του FGF2. Στην εικόνα 7.3 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων, και φαίνονται οι μέσες τιμές και το σφάλμα της μέσης τιμής σε κάθε περίπτωση ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).

Τα επίπεδα mRNA του VEGF βρέθηκαν να είναι αυξημένα στον καρκίνο (0.34 ± 0.03) σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα (0.30 ± 0.04) αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Κατά παρόμοιο τρόπο παρατηρήσαμε υψηλότερα επίπεδα mRNA των υποκαταστατών TGF-β2 και β3 στον καρκίνο, ενώ χαμηλότερα επίπεδα επέδειξαν οι τρεις υποδοχείς TGF-β RI, RII, RIII σε σχέση με τους υγιείς ιστούς του μαστού. Και πάλι όμως οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 7.1).

7.2.2 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων των δειγμάτων μαστού με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα mRNA έκφρασης των υποκαταστατών TGF-β1 και β3 σε δείγματα ιστών *καρκίνου του μαστού* με διαφορετικό ιστολογικό τύπο (πορογενές, λοβιακό ή άλλου τύπου καρκίνωμα του μαστού) ($P = 0.020$ και 0.036 αντίστοιχα Kruskal - Wallis test). Στην εικόνα 7.4 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων, και φαίνονται οι μέσες τιμές και το σφάλμα της μέσης τιμής σε κάθε περίπτωση ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).



Εικόνα 7.4: Επίπεδα mRNA TGF-β1 και TGF-β3 στα καρκινικά δείγματα μαστού ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων.

Οι σχετικές τιμές έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων που χαρακτηρίζονταν από διαφορετικό ιστολογικό τύπο ($P=0.020$ Kruskal-Wallis και $P=0.036$ αντίστοιχα Mann-Whitney test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην mRNA έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων (ανά δύο), προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Mann-Whitney test και παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα.

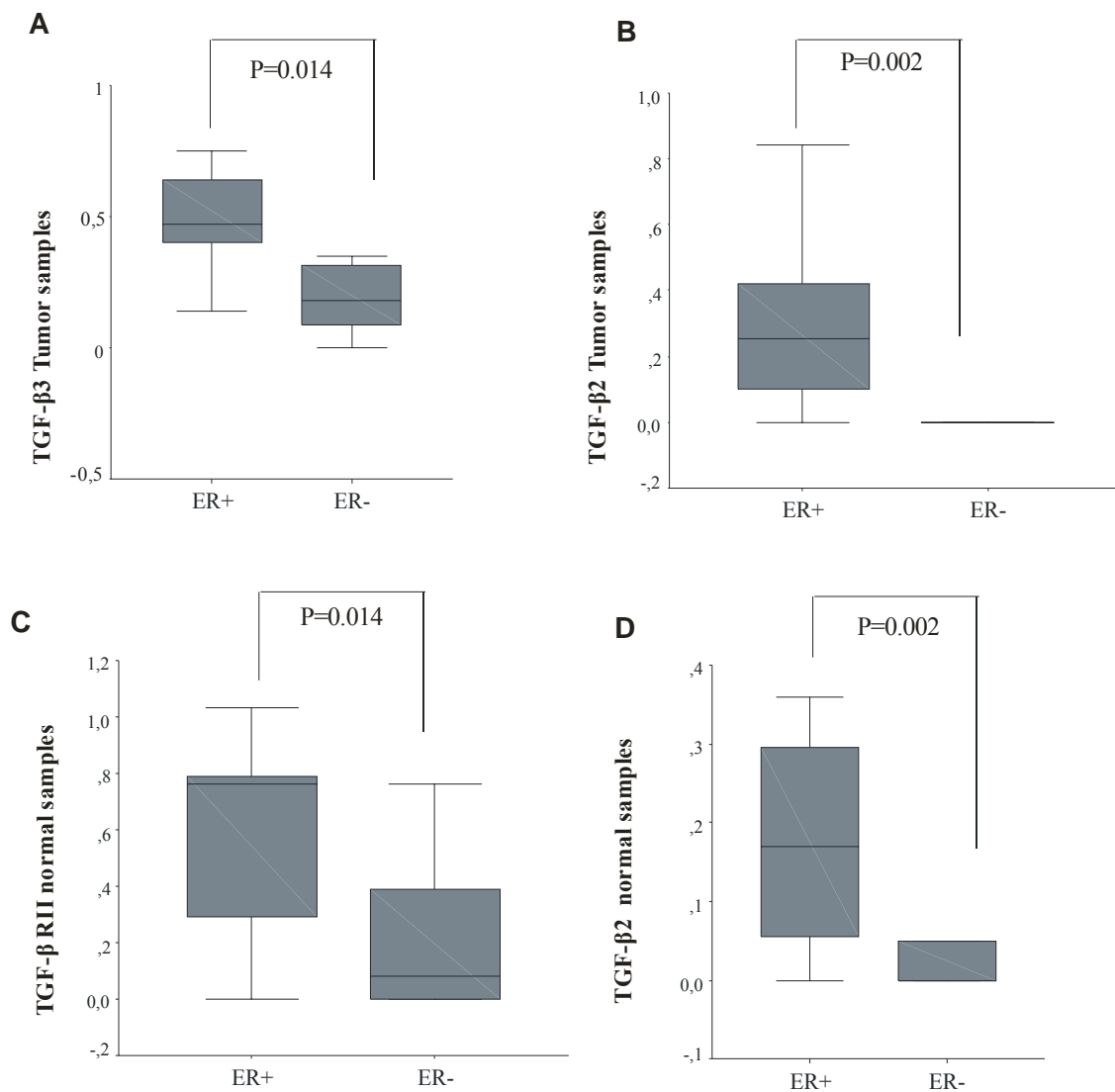
Συγκεκριμένα στο πορογενές καρκίνωμα του μαστού σημειώθηκαν σημαντικά υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα του TGF-β1 σε σχέση με τα λοβιακού τύπου καρκινώματα ($P = 0.028$, Mann-Whitney test), αλλά χαμηλότερα επίπεδα mRNA από τους άλλους ιστολογικούς τύπους καρκίνου. Οι χαμηλότερες τιμές mRNA του TGF-β1 παρατηρήθηκαν στα λοβιακού τύπου καρκινώματα. Αναφορικά με την έκφραση του TGF-β3, διαπιστώθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στα πορογενή καρκινώματα σε σύγκριση με όλους τους άλλους τύπους καρκινωμάτων ($P = 0.036$ Mann-Whitney test).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA των TGF-β2 και TGF-β3 υποκαταστατών βρέθηκαν στους ιστούς με *καρκίνο του μαστού* που προέρχονταν από ασθενείς με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER positive) ($P = 0.002$ και $P = 0.014$ αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Η έκφραση σε επίπεδο mRNA των TGF-β2 και TGF-β RII σε *φυσιολογικούς ιστούς* μαστού βρέθηκε επίσης να είναι σημαντικά υψηλότερη σε δείγματα ασθενών με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER positive) ($P = 0.002$ και $P = 0.014$ αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Στην εικόνα 7.5 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων.

Ιστοί *καρκίνου του μαστού* με θετικούς υποδοχείς προγεστερόνης (PR positive) βρέθηκαν να εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA των TGF-β2, TGF-β3 και TGF-βRIII από ότι οι όγκοι με αρνητικούς υποδοχείς (PR negative tumors) ($P = 0.004$, $P = 0.006$ και $P = 0.004$ αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε *φυσιολογικούς ιστούς* μαστού, όσον αφορά την έκφραση mRNA του TGF-β2 ($P = 0.031$ Mann-Whitney) (Πίνακας 7.2).

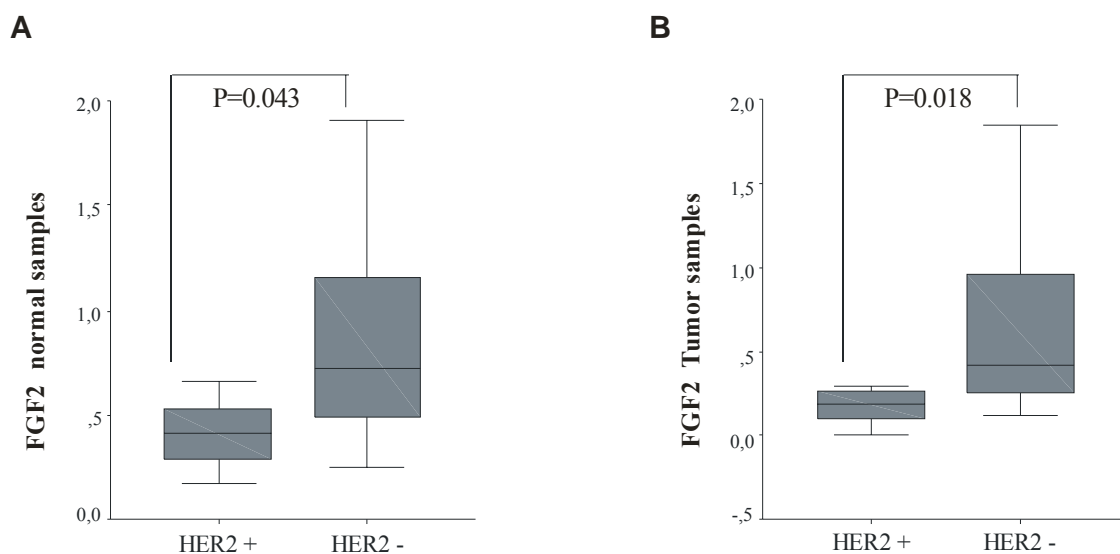
Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, τόσο οι υγιείς ιστοί μαστού όσο και οι καρκινικοί ιστοί που εκφράζουν το cerbB2 (HER2) βρέθηκαν να εκφράζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα mRNA του FGF2 από τους αντίστοιχους HER2-αρνητικούς ιστούς ($P = 0.018$ και 0.043 αντίστοιχα, Mann-Whitney). Στην εικόνα 7.6 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων.

Δε βρέθηκαν συσχετίσεις της mRNA έκφρασης οποιουδήποτε αυξητικού παράγοντα από αυτούς που μελετήσαμε στις ομάδες των φυσιολογικών, ή παθολογικών δειγμάτων μαστού με το κλινικό στάδιο των όγκων, την ηλικία των ασθενών ή την εμμηνόπαυση.



Εικόνα 7.5: Επίπεδα mRNA των TGF-β3 (A), TGF-β2 (B) σε καρκινικά δείγματα μαστού και TGF-β RII (C) και TGF-β2 (D) σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού με θετικούς ή αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER positive/negative).

Οι σχετικές τιμές mRNA έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων με θετικούς ή αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER positive/negative) ($P=0.014$, 0.002 , 0.014 και 0.002 αντίστοιχα, Mann-Whitney test).



Εικόνα 7.6: Επίπεδα mRNA του FGF2 σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού (A) και σε καρκινικά δείγματα (B) με θετική ή αρνητική έκφραση του HER2 (cerbB2).

Οι σχετικές τιμές mRNA έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων με θετική ή αρνητική έκφραση του HER2 (cerbB2). ($P=0.014$, 0.002 αντίστοιχα, Mann-Whitney).

Πίνακας 7.2: Στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης αυξητικών παραγόντων σε υγιή και καρκινικά δείγματα μαστού με θετικούς ή αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR).

Αυξητικοί παράγοντες	ER		P value	PR		P value
	positive	negative		positive	negative	
(TGFβ2/β2M)tumor	0.30+/-0.07	0.19+/-0.05	0.002	0.32+/-0.07	0.06+/-0.03	0.005
(TGFβ3/β2M) tumor	0.81+/-0.33	0.65+/-0.22	0.014	0.90+/-0.39	0.38+/-0.19	0.052
(TGFβRIII/β-actin) tumor	2.01+/-0.99	1.46+/-0.69	NS	2.62+/-1.24	0.31+/-0.11	0.026
(TGFβ2/β2M) normal	0.17+/-0.03	0.12+/-0.02	0.002	0.19+/-0.02	0.04+/-0.02	0.009
(TGFβRII/β2M) normal	0.59+/-0.09	0.44+/-0.07	0.014	0.56+/-0.11	0.31+/-0.10	NS

*Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney.**NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές έκφρασης και το σφάλμα της μέσης τιμής (mean±SEM).

7.2.3 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων (συν-έκφραση των γονιδίων ανά δύο) στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων.

Προκειμένου να μελετηθεί και να αξιολογηθεί το πρότυπο συν-έκφρασης ανά ζεύγος των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII στις ομάδες των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων μαστού, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία συσχέτισης Spearman. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Spearman παρουσιάζονται στους πίνακες 7.3 (A, B). Με έντονα αριθμητικά στοιχεία τονίζονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

➤ Ομάδα φυσιολογικών δειγμάτων

Στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων με τη βοήθεια της δοκιμασίας συσχέτισης Spearman (πίνακας 7.3, A) διαπιστώσαμε θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης του VEGF με κάθε έναν από τους αυξητικούς παράγοντες: FGF2, TGF-β1 και TGF-β2 ($P=0.018$, $P=0.029$ και $P=0.048$ αντίστοιχα). Επίσης το TGF-β1 mRNA βρέθηκε να συν-εκφράζεται με αυτό των υποκαταστατών TGF-β2, TGF-β3 και του υποδοχέα TGF-β RII ($P=0.032$, $P=0.037$ και $P=0.007$ αντίστοιχα). Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA βρέθηκε ακόμη μεταξύ του TGF-β2 και καθενός από τους TGF-β3 και TGF-βRII ($P=0.033$ και $P<0.001$). Τέλος τα μεταγραφικά επίπεδα των υποδοχέων TGF-β RII και TGF-β RIII παρουσίασαν θετική συσχέτιση ($P=0.026$) με αποτέλεσμα να παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση ή μείωση του mRNA του στους υγιείς ιστούς του μαστού.

➤ Ομάδα δειγμάτων καρκίνου του μαστού.

Στην ομάδα των καρκινικών δειγμάτων του μαστού διαπιστώθηκε μεταβολή του προτύπου έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα. (Πίνακας 7.3, B). Συγκεκριμένα η mRNA έκφραση του VEGF βρέθηκε να συσχετίζεται μόνο με αυτή του TGF-β2 ($P=0.017$). Τα επίπεδα έκφρασης του TGF-β1 επέδειξαν οριακά μη στατιστικά σημαντική συν-έκφραση με αυτά του υποδοχέα TGF-βRI ($P=0.052$), ενώ όλες οι προηγούμενες συσχετίσεις στους υγιείς ιστούς καταργήθηκαν. Ο TGF-β2 από την άλλη πλευρά βρέθηκε να συν-εκφράζεται με τον υποκαταστάτη TGF-β3, αλλά και με τον υποδοχέα TGF-β RII ($P=0.028$ και $P=0.011$). Ισχυρή θετική mRNA συν-έκφραση παρατηρήθηκε μεταξύ των TGF-β3 και TGF-βRIII ($P<0.0001$).

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα δοκιμασίας συσχέτισης Spearman.

A. Συντελεστής συσχέτισης ρ του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων μαστού.

		VEGF	FGF	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3	TGFβRI	TGFβRII	TGFβRIII	VEGF protein	TGF-β1 protein
VEGF	Spearman rho	1.000									
	Sig. (2-tailed)										
FGF	Spearman rho	0.068	1.000								
	Sig. (2-tailed)	0.747									
TGFβ1	Spearman rho	0.361	0.006	1.000							
	Sig. (2-tailed)	0.076	0.977								
TGFβ2	Spearman rho	0.481	0.371	0.131	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.017*	0.074	0.542							
TGFβ3	Spearman rho	0.289	-0.090	0.363	0.478	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.193	0.689	0.097	0.028*						
TGFβRI	Spearman rho	0.172	0.004	0.402	0.210	0.112	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.422	0.987	0.052	0.337	0.629					
TGFβRII	Spearman rho	0.006	0.277	0.274	0.259	0.411	0.105	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.980	0.213	0.218	0.258	0.080	0.651				
TGFβRIII	Spearman rho	0.158	0.133	0.109	0.702	0.606	0.225	0.529	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.623	0.681	0.737	0.011*	0.037*	0.482	0.077			
VEGF protein	Spearman rho	0.058	-0.363	0.434	0.431	0.396	0.479	0.419	0.571	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.851	0.223	0.138	0.162	0.203	0.098	0.228	0.180		
TGF-β1 protein	Spearman rho	-0.110	0.082	0.138	0.372	0.370	0.272	0.067	0.964	0.190	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.720	0.789	0.654	0.234	0.213	0.392	0.854	0.000**	0.651	

Με έντονα στοιχεία αναγράφονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

B. Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα *P* της συν-έκφρασης των γονιδίων ανά δύο στην ομάδα των δειγμάτων με καρκίνο του μαστού.

		VEGF	FGF	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3	TGFβRI	TGFβRII	TGFβRIII	VEGF protein	TGF-β1 protein
VEGF	Spearman rho	1.000									
	Sig. (2-tailed)										
FGF	Spearman rho	0.437	1.000								
	Sig. (2-tailed)	0.029*									
TGFβ1	Spearman rho	0.469	0.073	1.000							
	Sig. (2-tailed)	0.018*	0.728								
TGFβ2	Spearman rho	0.399	0.317	0.430	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.048*	0.122	0.032*							
TGFβ3	Spearman rho	0.296	-0.212	0.438	0.446	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.170	0.332	0.037*	0.033*						
TGFβRI	Spearman rho	0.147	0.162	-0.168	0.089	0.130	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.484	0.440	0.423	0.672	0.555					
TGFβRII	Spearman rho	0.341	0.298	0.546	0.747	0.327	0.027	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.111	0.167	0.007**	0.000**	0.148	0.901				
TGFβRIII	Spearman rho	-0.014	0.280	0.011	0.236	-0.084	-0.231	0.498	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.964	0.355	0.972	0.438	0.785	0.448	0.099			
VEGF protein	Spearman rho	0.074	0.126	-0.187	0.284	0.322	0.466	0.456	0.000	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.809	0.681	0.541	0.347	0.283	0.109	0.159	1.000		
TGF-β1 protein	Spearman rho	-0.061	-0.099	0.252	0.346	0.492	0.382	0.606	0.076	0.310	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.844	0.748	0.406	0.247	0.087	0.198	0.048*	0.847	0.456	

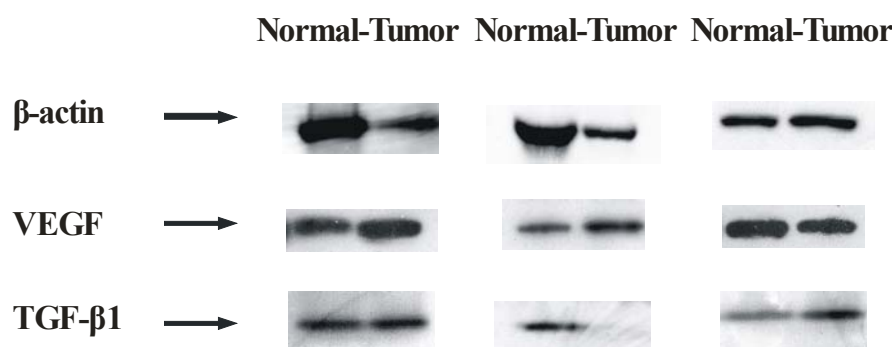
Με έντονα στοιχεία αναγράφονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

7.2.4 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF και TGF-β1 στα φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα μαστού.

Τα επίπεδα πρωτεΐνης των VEGF και TGF-β1 στους καρκινικούς και παρακείμενους υγιείς ιστούς του μαστού προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western (western blot). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της πρωτεϊνικής έκφρασης δειγμάτων μαστού παρουσιάζονται στην εικόνα 7.7.



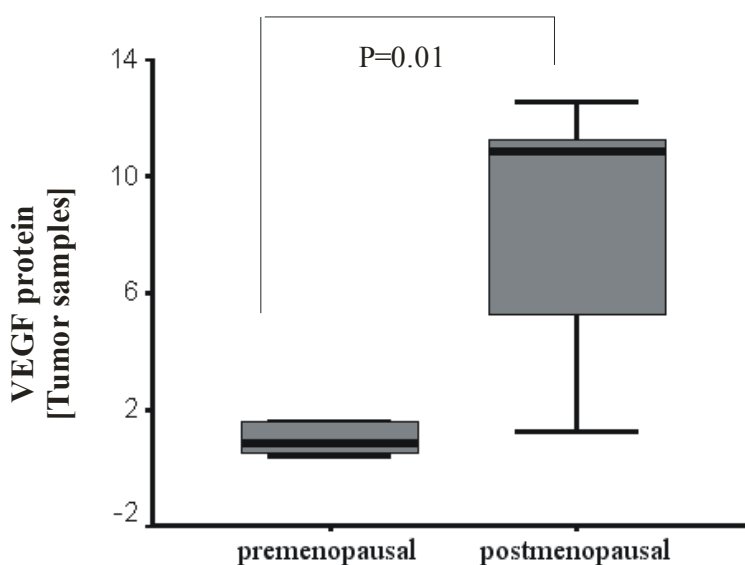
Εικόνα 7.7: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα έκφρασης της πρωτεΐνης των VEGF και TGF-β1 σε δείγματα ιστών με καρκίνο του μαστού και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από την ίδια ασθενή (normal, tumor).

Για κάθε δείγμα παρουσιάζεται και η έκφραση πρωτεΐνης του γονιδίου αναφοράς (β-ακτίνη), καθώς ο λόγος της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου προς αυτή του γονιδίου αναφοράς αποτέλεσε τη βάση του ημιποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης της πρωτεΐνης και χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας δε διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων πρωτεΐνης του VEGF ή του TGF-β1 με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως η ηλικία των ασθενών, ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός διαφοροποίησης των όγκων, και η έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER-2. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης του VEGF σε *καρκινικά δείγματα μαστού* ασθενών μετά την εμμηνόπαυση (P=0.01, Mann-Whitney test) (Εικόνα 7.8).

- Ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF και TGF-β1 με τα επίπεδα mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν, σε υγιείς και καρκινικούς ιστούς από μαστό.

Η ανάλυση συσχέτισης της πρωτεϊνικής έκφρασης των VEGF και TGF-β1 με την έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή: VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και TGF-β RI, RII, RIII επέδειξε θετική συσχέτιση της έκφρασης (συν-έκφραση) της πρωτεΐνης TGF-β1 με τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα TGF-β RII σε υγιείς ιστούς από μαστό ($P=0.048$). Στα δείγματα *καρκίνου του μαστού* παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση της έκφρασης (συν-έκφραση) της πρωτεΐνης TGF-β1 με τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα TGF-β RIII ($P<0.0001$, Mann-Whitney test) (Πίνακας 7.3, A, B).



Εικόνα 7.8: Επίπεδα πρωτεΐνης VEGF σε καρκινικούς ιστούς μαστού προ-εμμηνοπαυσιακών (premenopausal) και μετα-εμμηνοπαυσιακών (postmenopausal) ασθενών.

Οι σχετικές τιμές έκφρασης της πρωτεΐνης του VEGF προς αυτή της β-ακτίνης, ήταν σημαντικά αυξημένες στους καρκινικούς ιστούς από μαστό ασθενών μετά την εμμηνοπάυση ($P=0.01$, Mann-Whitney).

7.2.5 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα ζεύγη δειγμάτων (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή).

Στην περίπτωση αυτή κάθε ζεύγος δείγματος χαρακτηρίστηκε από την αναλογία της mRNA έκφρασης κάθε γονιδίου προς το γονίδιο αναφοράς ($\beta 2M$) στον καρκινικό ιστό, προς την αντίστοιχη έκφραση στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από την ίδια ασθενή. Δηλαδή για κάθε ζεύγος δείγματος, ο λόγος $[(VEGF/\beta 2M)_{\text{tumor}}/(VEGF/\beta 2M)_{\text{normal}}]$ χρησιμοποιήθηκε ως μέσο για τον προσδιορισμό του μοριακού προτύπου της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων σε κάθε όγκο που συσχετίστηκε με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων.

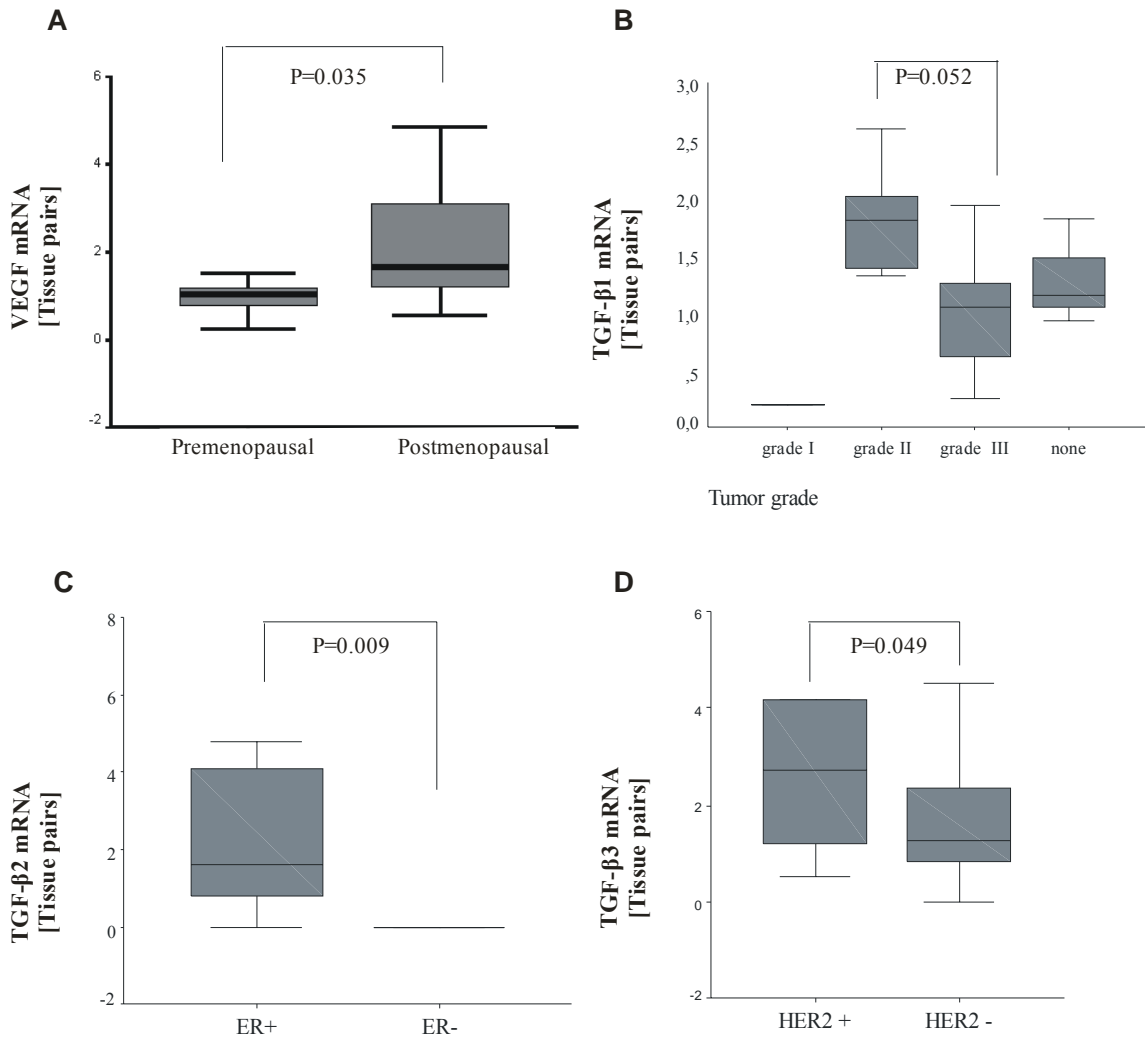
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων υπέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης του TGF- $\beta 1$ mRNA στα ζεύγη ιστών μαστού ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων ($P=0.046$, Kruskal-Wallis test). Συγκεκριμένα αυξημένη έκφραση του TGF- $\beta 1$ mRNA παρατηρήθηκε σε μέτριας διαφοροποίησης (grade II) σε σύγκριση με κακής διαφοροποίησης (grade III) καρκινώματα του μαστού ($P=0.052$, Mann-Whitney), αλλά η διαφορά στην έκφραση ήταν οριακά μη στατιστικά σημαντική.

Τα μεταγραφικά επίπεδα του VEGF βρέθηκαν να είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς που είχαν μπει στην εμμηνόπαυση σε σχέση με γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας ($P=0.035$, Mann-Whitney). Τα ζεύγη ιστών μαστού με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER positive) επέδειξαν επίσης υψηλότερα επίπεδα mRNA έκφρασης του TGF- $\beta 2$ ($P=0.009$, Mann-Whitney), ενώ τα μεταγραφικά επίπεδα του TGF- $\beta 3$ βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε ζεύγη ιστών με θετικούς υποδοχείς EGFR (HER-2) ($P=0.049$). Στην εικόνα 7.9 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων, και φαίνονται οι μέσες τιμές και το σφάλμα της μέσης τιμής σε κάθε περίπτωση ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).

7.2.6 Μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων (συν-έκφραση των γονιδίων ανά δύο) στα ζεύγη δειγμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας συσχέτισης του Spearman όσον αφορά τη συν-έκφραση του mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στα ζεύγη καρκινικών-υγιών ιστών του μαστού, διαπιστώθηκε μόνο

σημαντική θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης των VEGF και TGF- β 2 ($P=0.017$), ενώ οριακά μη στατιστικά σημαντική ήταν η συν-έκφραση που παρατηρήθηκε μεταξύ του TGF- β 2 και του TGF- β RII mRNA ($P=0.059$) (Πίνακας 7.4).



Εικόνα 7.9: Επίπεδα mRNA των VEGF (A), TGF- β 1 (B), TGF- β 2 (C) και TGF- β 3 (D) ζευγών καρκινικών και υγιών ιστών μαστού αναφορικά με την εμμηνόπαυση, το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων, τους υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και HER2 (cerbB2) αντίστοιχα.

Στατιστικά σημαντικές διαφορετικές στις παραπάνω ομάδες των δειγμάτων αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Mann-Whitney και αναγράφονται στο σχήμα. ($P=0.035$, 0.052 , 0.009 και 0.049 αντίστοιχα).

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα δοκιμασίας συσχέτισης Spearman. Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα *P* της συν-έκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στα ζεύγη φυσιολογικών-καρκινικών δειγμάτων μαστού.

		VEGF	FGF	TGFβ1	TGFβ2	TGFβ3	TGFβRI	TGFβRII	TGFβRIII	VEGF protein	TGF-β1 protein
VEGF	Spearman rho	1.000									
	Sig. (2-tailed)										
FGF	Spearman rho	0.280	1.000								
	Sig. (2-tailed)	0.175									
TGFβ1	Spearman rho	-0.025	-0.158	1.000							
	Sig. (2-tailed)	0.907	0.451								
TGFβ2	Spearman rho	0.482	-0.119	-0.123	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.017*	0.579	0.567							
TGFβ3	Spearman rho	0.241	-0.038	-0.017	0.216	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.280	0.865	0.940	0.346						
TGFβRI	Spearman rho	-0.013	-0.161	-0.145	0.124	0.031	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.951	0.453	0.499	0.572	0.894					
TGFβRII	Spearman rho	0.062	-0.173	0.198	0.430	-0.110	-0.013	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.789	0.454	0.390	0.059	0.665	0.958				
TGFβRIII	Spearman rho	-0.539	-0.358	0.115	-0.293	-0.248	0.232	0.486	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.108	0.310	0.751	0.444	0.489	0.519	0.154			
VEGF protein	Spearman rho	0.160	-0.162	-0.154	0.264	0.251	-0.521	0.323	-0.469	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.444	0.440	0.464	0.213	0.260	0.009**	0.153	0.172		
TGF-β1 protein	Spearman rho	-0.126	-0.016	-0.652	-0.322	0.047	-0.557	0.024	-0.036	0.465	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.681	0.957	0.016*	0.307	0.879	0.060	0.947	0.939	0.109	

Με έντονα στοιχεία αναγράφονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

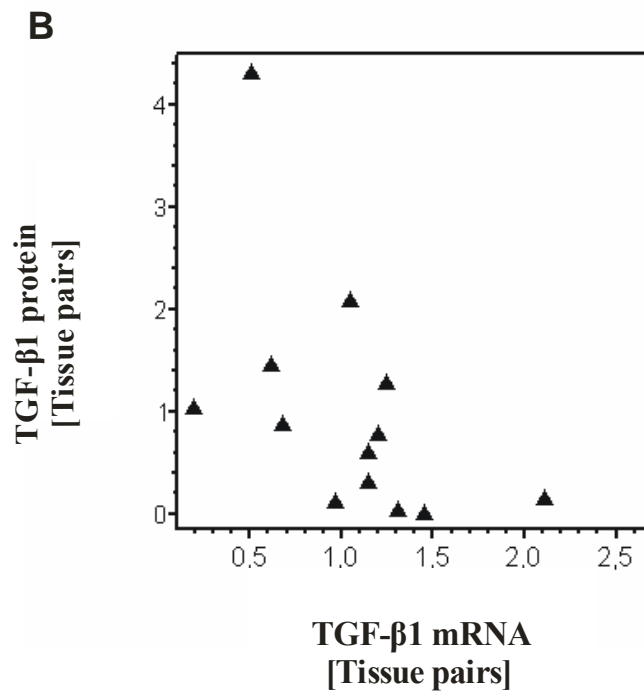
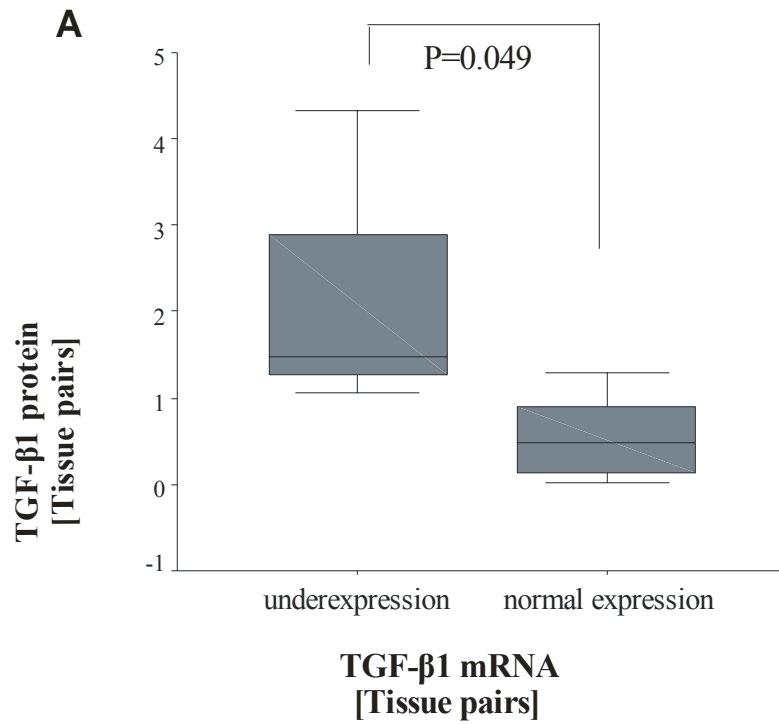
7.2.7 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF και TGF-β1 στα ζεύγη δειγμάτων (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή).

Η μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης των VEGF και TGF-β1 στα ζεύγη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά αναλογία με την ανάλυση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA. Κάθε ζεύγος δείγματος χαρακτηρίστηκε από την αναλογία της πρωτεϊνικής έκφρασης κάθε γονιδίου προς το γονίδιο αναφοράς (β-ακτίνη) στον καρκινικό ιστό, προς την αντίστοιχη έκφραση στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από την ίδια ασθενή. Δηλαδή για κάθε ζεύγος δείγματος, ο λόγος [(VEGF/β-ακτίνη) tumor/(VEGF/β-ακτίνη) normal] χρησιμοποιήθηκε ως μέσο για τον προσδιορισμό του προτύπου έκφρασης των πρωτεϊνών σε κάθε όγκο και συγκρίθηκε με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση των επιπέδων πρωτεΐνης του VEGF ή του TGF-β1 στα *ζεύγη δειγμάτων* με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων.

➤ *Ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF και TGF-β1 με τα επίπεδα mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν, σε ζεύγη δειγμάτων ιστών από μαστό.*

Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης του TGF-β1 ήταν σημαντικά αυξημένη στα ζεύγη δειγμάτων μαστού στα οποία το mRNA παρουσίαζε υποέκφραση, σε σύγκριση με δείγματα που παρουσίαζαν φυσιολογική έκφραση mRNA του TGF-β1 ($P=0.049$). Επιπλέον, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης και του mRNA του TGF-β1 στα ζεύγη δειγμάτων του μαστού ($P=0.016$) (εικόνα 7.10). Σημαντική αρνητική συσχέτιση σημειώθηκε και μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του VEGF και των mRNA επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα TGF-βRI ($P=0.009$), ενώ οριακά μη σημαντική ήταν η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του TGF-β1 και των mRNA επιπέδων του ίδιου υποδοχέα (TGF-βRI) ($P=0.060$).

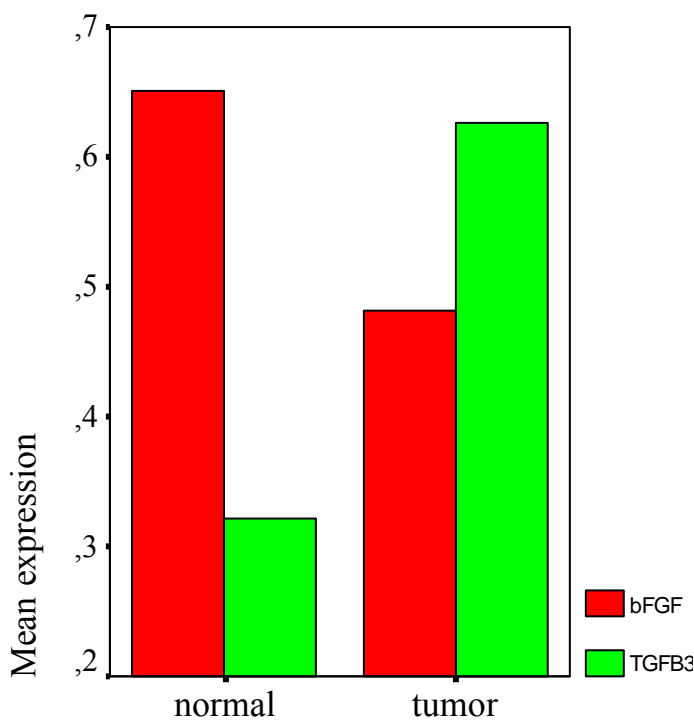


Εικόνα 7.10: (A). Έκφραση της πρωτεΐνης σε ζεύγη δειγμάτων μαστού με χαμηλά ή υψηλά επίπεδα mRNA του TGF-β1 (P=0.049, Mann-Whitney). (B). Συσχέτιση της έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA του TGF-β1 σε ζεύγη δειγμάτων μαστού.

7.2.8 Απόδοση του προτύπου έκφρασης των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων μαστού.

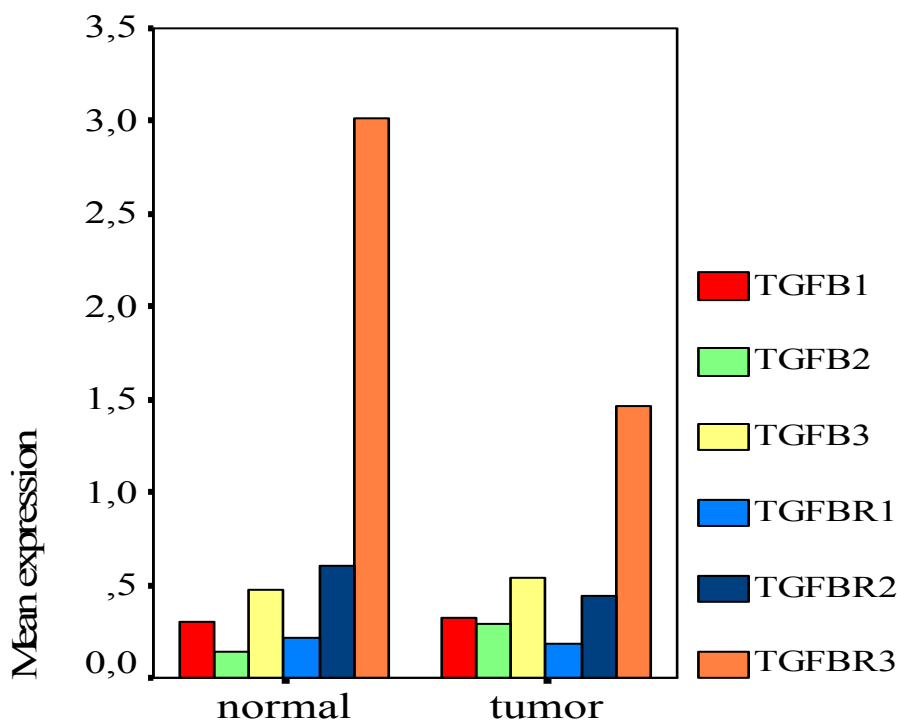
Στην εικόνα 7.11 που ακολουθεί παρουσιάζεται το πρότυπο έκφρασης των φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων μαστού, όσον αφορά τα γονίδια αυτά που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές mRNA έκφρασης στις παραπάνω τρεις κατηγορίες δειγμάτων (bFGF και TGF-β3).

Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: υγιείς ή καρκινικοί ιστοί μαστού. Παρατηρούμε λοιπόν πως μεταβάλλεται το πρότυπο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό ιστό σε καρκινικό.



Εικόνα 7.11: Μεταβολή του προτύπου mRNA έκφρασης των bFGF και TGF-β3 σε δείγματα καρκίνου, σε σύγκριση με το πρότυπο έκφρασης παρακείμενων φυσιολογικών ιστών μαστού.

Η Εικόνα 7.12 που ακολουθεί παρουσιάζει το πρότυπο έκφρασης των καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών μαστού, όσον αφορά την έκφραση mRNA των υποκαταστατών TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII στις παραπάνω κατηγορίες δειγμάτων. Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: φυσιολογικά ή καρκινικά δείγματα. Παρατηρούμε πως δε μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό το συνολικό πρότυπο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό μαστό σε καρκίνο του μαστού, εκτός από την έκφραση του TGF-β RIII που φαίνεται να αυξάνεται στον καρκίνο. Υποθέτουμε πως οι αλλαγές στο πρότυπο **συν-έκφρασης** των TGF-β και των υποδοχέων του που παρατηρήσαμε στην παρούσα μελέτη, αντικατοπτρίζει αντίστοιχες μεταβολές στη λειτουργικότητα του συμπλόκου μετάδοσης σήματος του TGF-β, οι οποίες είναι πιθανότητα υπεύθυνες για την πολύπλευρη βιολογική δράση του TGF-β κατά την διαδικασία της καρκινογένεσης του μαστού.



Εικόνα 7.12: Μεταβολή του προτύπου mRNA έκφρασης των TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα καρκίνου σε σύγκριση με το πρότυπο έκφρασης παρακείμενων φυσιολογικών ιστών μαστού.

Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: φυσιολογικά ή καρκίνος του μαστού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

7.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων του μαστού.

Η επαγωγή της αγγειογενετικής διαδικασίας έχει δειχθεί ότι αποτελεί πρώιμο στάδιο της πολυσταδιακής διαδικασίας της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού, και μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα πλήθους διεργασιών όπως υποξία, γενετικές αλλαγές, μηχανικό στρες κ.α. (34, 110, 208). Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη νέο-αγγειογένεση κυρίαρχη θέση κατέχουν ο VEGF και ο FGF2 οι οποίοι αναγνωρίζονται ως οι σημαντικότεροι επαγωγείς της διαδικασίας στους ανθρώπινους όγκους.

Πολλοί ερευνητές υπέδειξαν την ισχυρή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων του VEGF σε προχωρημένα στάδια καρκίνου του μαστού (114-120, 209). Η προγνωστική αξία του προσδιορισμού του VEGF με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, ή ανοσοπροσδιορισμούς τύπου ELISA σε αρχικά στάδια καρκίνου του μαστού έχει επίσης μελετηθεί με αντιφατικά αποτελέσματα (112, 113, 209-214). Αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) ή/και αυξημένη παραγωγή μορίων που επάγουν το σχηματισμό νέων αγγείων, συσχετίζεται με κακή πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού (115, 116). Από τη σύγκριση της έκφρασης της πρωτεΐνης ή του mRNA του VEGF με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων οι περισσότερες μελέτες συνηγορούν υπέρ συσχέτισης με τους υποδοχείς οιστρογόνων (215-220). Οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την έκφραση του VEGF με μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού και μάλιστα χωρίς υποτροπές (7).

Μεταξύ των μορίων που παρουσιάζουν αγγειογενετική δραστηριότητα είναι και ο bFGF που ο ρόλος του δεν έχει αποσαφηνιστεί στην καρκινογένεση του μαστού, αλλά έχει προταθεί η εμπλοκή του στη διαδικασία (221). Τα μέλη της οικογένειας του TGF- β τα οποία παρουσιάζουν πολυπλοκότητα δράσεων συσχετίζονται με ογκο-κατασταλτική δράση, αλλά και με προώθηση της ανάπτυξης των όγκων στον καρκίνο του μαστού. Έχει προταθεί ότι ο TGF- β δρα ως αυτοκρινής και ως παρακρινής ρυθμιστής της ανάπτυξης και εξέλιξης των όγκων του μαστού. Επιπλέον, ανεπάρκεια στην έκφραση του υποδοχέα TGF-

βRII συσχετίζεται με κακοήγη εξέλιξη κυττάρων του μαστού, αφού τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την ευαισθησία τους και δεν ανταποκρίνονται στην ογκο-κατασταλτική δράση του TGF-β (82, 222). Από την άλλη πλευρά μειωμένη έκφραση του υποδοχέα TGF-βRII σε *in situ* πορογενή καρκινώματα και διηθητικά καρκινώματα του μαστού συσχετίζεται με μεγάλο αριθμό μτώσεων, υψηλό βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και υψηλότερο κλινικό στάδιο, τα οποία συνηγορούν υπέρ του ογκο-κατασταλτικού ρόλου του TGF-β σε προχωρημένα στάδια καρκίνου (167).

Η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα κατά την νεο-αγγειογένεση εκτός από το ότι συμβάλλει στην κατανόηση των γενετικών μηχανισμών της καρκινογένεσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς με στόχο τον εντοπισμό των δυσπλασιών που ενδέχεται να εξελιχθούν σε κακοήγη νεοπλασία. Δεδομένου ότι οι γνώσεις μας είναι πολύ περιορισμένες, όσον αφορά τη συνδυασμένη έκφραση σε επίπεδο mRNA περισσότερων του ενός αυξητικού παράγοντα που εμπλέκεται στην νέο-αγγειογένεση, στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το πρότυπο έκφρασης των VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-βRI, RII, RIII σε δείγματα καρκίνου του μαστού και το συγκρίναμε με αυτό παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από μαστό.

Vascular Endothelial growth factor (VEGF)

Αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF έχουν αναφερθεί τόσο σε όγκους του μαστού συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς από μαστό (135, 136). Η αξιολόγηση των επιπέδων πρωτεΐνης του VEGF με ELISA έδειξε άμεση συσχέτιση με αυξημένο δείκτη μικρο-αγγειακής πυκνότητας (MVD) κατά την εξέλιξη όγκων του μαστού, υποδεικνύοντας ότι ο VEGF αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή της αγγειογενετικής διαδικασίας στην καρκινογένεση του μαστού (134, 136). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα που υποδεικνύουν αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF σε καρκινικούς ιστούς από μαστό, σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς όπου η έκφραση παραμένει σημαντικά χαμηλότερη. Διαπιστώσαμε επίσης σημαντικά αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης του VEGF στους **καρκινικούς όγκους** μαστού ασθενών που είχαν ήδη μπει στην εμμηνόπαυση, αλλά η mRNA έκφραση του VEGF στα ίδια δείγματα δεν έδειξε παρόμοια συσχέτιση. Εντούτοις, η **ανάλυση ζευγών δειγμάτων** (λόγος της

mRNA έκφρασης του VEGF κάθε όγκου προς την έκφραση του αντίστοιχου παρακείμενου φυσιολογικού ιστού) αποκάλυψε ότι τα επίπεδα mRNA του VEGF στις ασθενείς που είχαν μπει στην εμμηνόπαυση ήταν σημαντικά υψηλότερα, χωρίς να συμβαίνει το ίδιο για τα επίπεδα πρωτεΐνης του VEGF. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η έκφραση του VEGF σχετίζεται με την εμμηνόπαυση και είναι πιθανά ορμονικά ρυθμιζόμενη, αλλά ο υπεύθυνος μηχανισμός και τα βιοχημικά μονοπάτια που ελέγχουν την μετα-μεταγραφική του ρύθμιση παραμένουν άγνωστα.

Basic Fibroblast growth factor (bFGF ή FGF2)

Η πλειοψηφία των μελετών που ασχολούνται με τη μελέτη του ρόλου του FGF2 στην καρκινογένεση του μαστού αναφέρουν μείωση των επιπέδων mRNA του σε καρκινικούς όγκους συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς από μαστό (155-158). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε επίσης στατιστικώς σημαντικά μειωμένα mRNA επίπεδα του FGF2 στα δείγματα καρκίνου σε σχέση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Εντούτοις υπάρχουν αναφορές που παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα καθώς δείχνουν αυξημένα επίπεδα mRNA του FGF2 σε καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με υγιείς ιστούς του μαστού, ενώ άλλοι ερευνητές δε διαπιστώνουν διαφορές στην έκφραση του FGF2 μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων (153, 158, 223). Τα παραπάνω αντικρουόμενα ευρήματα δεν είναι ικανά να αποδείξουν την εμπλοκή του FGF2 στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, αλλά συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής του στην καρκινογένεση του μαστού, αν και ο ακριβής μηχανισμός που ελέγχει τη δράση του μας είναι ακόμη άγνωστος.

Εκτίμηση της έκφρασης του FGF2 με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους έδειξε συσχέτιση αυτής με φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικής προέλευσης και με συστατικά του στρώματος, ενώ μείωση ή απώλεια έκφρασης βρέθηκε τα καρκινικά κύτταρα (156, 223). Επιπλέον καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού βρέθηκαν να μην εκφράζουν FGF2 σε αντίθεση με κυτταρικές σειρές από φυσιολογικά κύτταρα μαστού. Μπορούμε συνεπώς να υποθέσουμε ότι ο FGF2 παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, ενώ η συμμετοχή του είναι μειωμένη στην διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων του μαστού. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της καρκινογένεσης στον τράχηλο της μήτρας όπου τα αποτελέσματά μας είναι παρόμοια και οδηγούν στα ίδια συμπεράσματα.

Transforming growth factor (TGF-β)

Ο TGF-β εμπλέκεται από πολλές απόψεις στην κυτταρική λειτουργία όπως για παράδειγμα στη διαδικασία της αγγειογένεσης, στην καταστολή των όγκων, στη κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, καθώς και στην τοπική ανοσοαπόκριση των κυττάρων. Έχει δείχθει σε προηγούμενες μελέτες ότι η απώλεια της ανασταλτικής επίδρασης του TGF-β στην ανάπτυξη των όγκων που παρατηρείται στον καρκίνο του μαστού, δεν οφείλεται σε απώλεια της έκφρασης των υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII (224), ούτε σε απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων στα εν λόγω γονίδια οι οποίες είναι εξαιρετικά σπάνιες στον καρκίνο του μαστού (74, 93, 160). Σε συμφωνία με προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, τα αποτελέσματά μας δείχνουν μειωμένη έκφραση σε επίπεδο mRNA του υποδοχέα TGF-βRII σε όγκους μαστού μέτριας και κακής διαφοροποίησης, αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης τα μεταγραφικά επίπεδα του υποδοχέα TGF-βRI βρέθηκαν να μη διαφέρουν σημαντικά σε όγκους με διαφορετικό βαθμό διαφοροποίησης, γεγονός που συμφωνεί με προγενέστερες μελέτες σε επίπεδο πρωτεΐνης του TGF-βRI. Συνεπώς υποθέτουμε ότι η μειωμένη απόκριση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στην ογκο-κατασταλτική επίδραση του TGF-β πιθανά δεν οφείλεται σε ελαττωματική έκφραση των υποδοχέων, αλλά η βλάβη μπορεί να βρίσκεται σε κάποιο μετέπειτα μονοπάτι του καταρράκτη μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται από τον TGF-β.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν αποδεικτικά στοιχεία ισχυρής ορμονικής επίδρασης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης (ER, PR) στην έκφραση του TGF-β σε επίπεδο mRNA. Ειδικότερα διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA των TGF-β2 και β3 υποκαταστατών σε **καρκινικούς ιστούς μαστού** με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε όσον αφορά την έκφραση σε επίπεδο mRNA του υποδοχέα TGF-β RIII σε **φυσιολογικούς ιστούς μαστού** (εικόνα 7.5). Αυτά τα δεδομένα σε συνδυασμό με τη σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των μεταγραφικών επιπέδων των TGF-β2, TGF-β3 και TGF-βRIII με την παρουσία υποδοχέων προγεστερόνης, ενισχύουν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών και συνηγορούν υπέρ της επικοινωνίας του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του TGF-β και των ορμονικών υποδοχέων, η οποία φαίνεται τελικά να ελέγχει τη διαδικασία της ανάπτυξης και διαφοροποίησης στην καρκινογένεση του μαστού (225). Δεδομένου ότι η απώλεια έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνου έχει συσχετισθεί με απώλεια της ογκο-

κατασταλτικής δράσης του TGF-β, η αποσαφήνιση του μηχανισμού που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του TGF-β με τους υποδοχείς ER, θα μπορούσε πιθανά να βοηθήσει στην επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου του μαστού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η έκφραση της πρωτεΐνης του TGF-β1 είναι μικρή σε υγιείς ιστούς από μαστό. Εντούτοις, στα αρχικά στάδια της κακοήθους εξαλλαγής όπου οι όγκοι του μαστού είναι καλής διαφοροποίησης (grade I) παρατηρείται αύξηση των επιπέδων mRNA του TGF-β1, η οποία μειώνεται σταδιακά καθώς αυξάνει ο βαθμός διαφοροποίησης των όγκων (grade II), και τελικά επιστρέφει σε φυσιολογικά (χαμηλά) επίπεδα σε προχωρημένα στάδια (grade III). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι αναμενόμενες ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης της ογκο-κατασταλτικής δράση του TGF-β σε απόκριση στην ανώμαλη κυτταρική διαφοροποίηση που παρατηρείται στα αρχικά στάδια του καρκίνου (1-3). Σε προχωρημένα στάδια καρκίνου όμως, η mRNA έκφραση του TGF-β1 πλησιάζει και πάλι βασικά επίπεδα, γεγονός που εξηγείται από την ανάγκη κατάργησης της ανοσο-κατασταλτικής δράσης του TGF-β (η οποία είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του TGF-β) και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (89). Συνεπώς τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την υπόθεση ότι ο TGF-β δρα ογκο-κατασταλτικά στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του επιθηλίου και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης του καρκίνου αλλάζει ρόλο και μετατρέπεται σε ογκογόνο παράγοντα.

7.4 Συζήτηση των αποτελεσμάτων συν-έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων του μαστού (πρότυπο έκφρασης).

Η ανάλυση της συν-έκφρασης σε επίπεδο mRNA όλων των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στις ομάδες των καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών μαστού. Περισσότερες συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων στην ομάδα των υγιών ιστών, οι οποίες ήταν και πιο ισχυρές συγκρινόμενες με τις άλλες ομάδες δειγμάτων.

Ομάδα υγιών ιστών μαστού

Στην ομάδα των υγιών ιστών μαστού παρατηρήσαμε θετική συσχέτιση της έκφρασης mRNA του VEGF με αυτή του FGF2, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο αφού είναι γνωστό ότι ο FGF2 δρα ως επαγωγέας του VEGF. Επιπλέον ο VEGF βρέθηκε να συν-εκφράζεται σε επίπεδο mRNA με κάθε έναν από τους υποκαταστάτες TGF-β1 και β2, γεγονός που εξηγείται από την ανάγκη εξισορρόπησης της αγγειογενετικής δράσης του VEGF με τη βοήθεια της ογκο-κατασταλτικής επίδρασης του TGF-β. Και οι τρεις υποκαταστάτες του TGF-β (TGF-β1, β2, β3) βρέθηκαν να συσχετίζονται μεταξύ τους όσον αφορά την mRNA έκφραση, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανότητα να συμμετέχουν εξ' ίσου και οι τρεις στο σχηματισμό του ετερο-τετραμερούς συμπλόκου-μεταγωγέα σήματος με τους υποδοχείς TGF-β RI και RII. Επιπροσθέτως, η συν-έκφραση του υποδοχέα TGF-β RII με κάθε έναν από τους TGF-β1 και β2 που παρατηρήθηκε επιβεβαιώνει τις γνώσεις μας για το μηχανισμό έναρξης του καταρράκτη μετάδοσης σήματος του TGF-β μέσω των υποδοχέων του.

Ομάδα ιστών με καρκίνο του μαστού

Στην ομάδα δειγμάτων με καρκίνο του μαστού το πρότυπο συν-έκφρασης των γονιδίων παρουσίασε σημαντικές διαφορές με αυτό των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών του. Τα επίπεδα mRNA του TGF-β RII έπαψαν να συσχετίζονται με αυτά των υποκαταστατών TGF-β1 και β2. Επιπλέον παρατηρήθηκε νέα ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα TGF-β RIII με τους υποκαταστάτες TGF-β2 και β3, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή ανάγκη για την παρουσία του υποδοχέα αυτού για την πρόσβαση και επαφή των TGF-β υποκαταστατών με τον υποδοχέα τύπου I και το σχηματισμό του συμπλόκου-σηματοδότη. Το τελευταίο συμπέρασμα ενισχύεται από το εύρημά μας ότι στα **δείγματα καρκίνου του μαστού** τα επίπεδα της πρωτεΐνης TGF-β1 παρουσίασαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα TGF-β RIII, ενώ **στα φυσιολογικά δείγματα** είχε παρατηρηθεί συσχέτιση με τον υποδοχέα TGF-β RII. Ο ουσιαστικός ρόλος του υποδοχέα τύπου III στην καρκινογένεση παρατηρήθηκε και στη μελέτη μας στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που περιγράφεται στο κεφάλαιο 8 της παρούσας διατριβής.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας συνιστούν ενδείξεις απορρύθμισης του προτύπου συν-έκφρασης των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στα δείγματα καρκίνου του μαστού.

7.5 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης των γονιδίων στα ζεύγη δειγμάτων μαστού (φυσιολογικός-καρκινικός ιστός από την ίδια ασθενή).

Η ανάλυση ζευγών δειγμάτων μαστού επέδειξε μειωμένη έκφραση του TGF-β1 mRNA αυξανόμενου του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο πρωτεΐνης. Διαπιστώθηκε όμως ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης του TGF-β1 ήταν αντιστρόφως ανάλογα των επιπέδων έκφρασης του mRNA του γονιδίου, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανότατα λαμβάνει χώρα μετα-μεταγραφική ρύθμιση του TGF-β1, όπως φανερώνουν και προηγούμενες *in vitro* μελέτες (74, 226).

Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων mRNA των VEGF και TGF-β2 που αποκάλυψε η μελέτη συν-έκφρασης (Spearman correlation), υποδεικνύει ότι τα επίπεδα mRNA του TGF-β αυξάνουν κατά την κακοήθη εξαλλαγή κυττάρων του μαστού. Εντούτοις, δεν είναι σαφές αν αυτό προκύπτει ως ανάγκη εξουδετέρωσης της ανάπτυξης των όγκων που επάγεται από τη δράση του VEGF ή είναι αποτέλεσμα της μετατροπής του TGF-β από ογκο-καταστολέα σε ογκογόνο παράγοντα. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι ο ρόλος του TGF-β στην καρκινογένεση είναι πολύπλοκος. Όπως αποδεικνύεται από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ενισχύεται η άποψη ότι ο μηχανισμός που ελέγχει και ρυθμίζει τους δύο αντίθετους ρόλους του TGF-β εξαρτάται από το στάδιο της κακοήθους εξαλλαγής καθώς επίσης από το «περιβάλλον» όπου δρα, και από τις σχετικές ποσότητες των υποκαταστατών και υποδοχέων που διαμεσολαβούν στη διαδικασία μεταγωγής σήματος.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν έμμεσες αποδείξεις ότι η απορρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των bFGF και TGF-β3 εμπλέκεται στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής του μαστού. Επιπροσθέτως η απορρύθμιση του προτύπου *συν-έκφρασης* του συνόλου των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στον καρκίνο συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, υποδηλώνει ότι λαμβάνει χώρα διατάραξη του μεταγραφικού προτύπου τους, ως συνοδευτικό φαινόμενο της διαδικασίας ανάπτυξης του καρκίνου. Το επόμενο βήμα θα ήταν να διερευνηθεί διεξοδικά η πιθανότητα να χρησιμοποιηθεί το αγγειογενετικό προφίλ των όγκων ως μοριακός δείκτης στην καρκινογένεση του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.

8.1 Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα τραχήλου της μήτρας.

Στα πλαίσια της μελέτης της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων του TGF-β RI, RII, RIII, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 44 δείγματα ιστού τραχήλου της μήτρας. Εξ' αυτών, τα 21 δείγματα (48%) αφορούσαν ιστούς φυσιολογικού τραχήλου της μήτρας, όπως διαπιστώθηκε μετά από εξέταση από παθολογοανατομική εξέταση, και προήλθαν από επεμβάσεις υστερεκτομής για θεραπευτικούς λόγους εξαιρουμένης της κακοήθειας. Οι περιπτώσεις ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών του τραχήλου (CIN) ήταν 14 (32%), αποτελούμενες από 5 αλλοιώσεις τύπου CIN I, 3 αλλοιώσεις CIN II και 6 βλάβες CIN III. Τα υπόλοιπα 9 δείγματα (20%) αφορούσαν 8 περιπτώσεις πλακώδους καρκινώματος (squamous cell carcinoma), και μια περίπτωση αδενοκαρκινώματος (adenocarcinoma) [βλέπε Κεφάλαιο 6, συλλογή δειγμάτων].

8.2 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα τραχήλου της μήτρας.

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στα δείγματα ιστών του τραχήλου της μήτρας, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές ομαδοποιήσεις με βάση το κλινικό στάδιο των ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων των δειγμάτων:

α) Η πρώτη ομαδοποίηση αφορούσε την γενικότερη κατάσταση του δείγματος και είχε σαν αποτέλεσμα το διαχωρισμό των δειγμάτων σε τρεις ομάδες: τα φυσιολογικά

(normal), αυτά που έφεραν αλλοιώσεις τύπου CIN (ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου), και τα δείγματα με καρκίνο του τραχήλου (cancer).

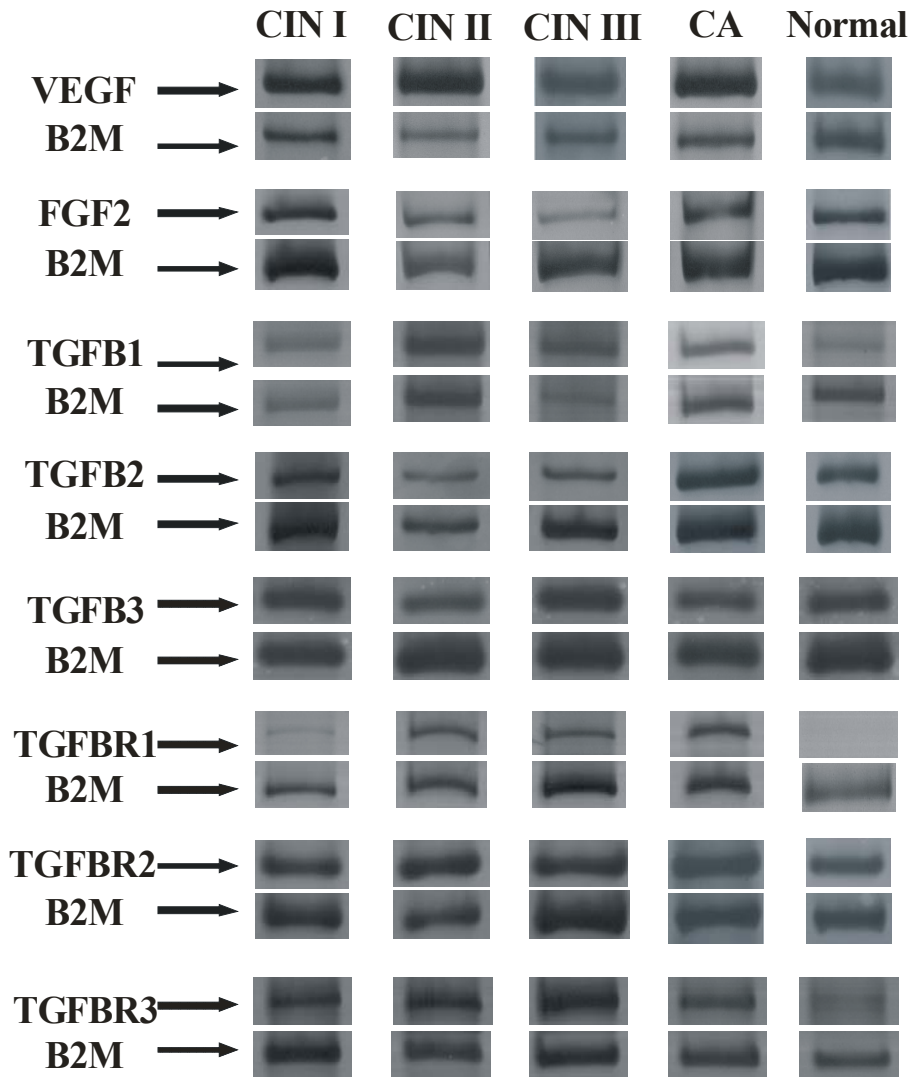
β) Η δεύτερη ομαδοποίηση στηριζόταν στο βαθμό (grade) της ενδοεπιθηλιακής βλάβης του τραχήλου και διαχώριζε το σύνολο των δειγμάτων σε τέσσερις ομάδες: i) τα φυσιολογικά δείγματα (normal), ii) τα δείγματα με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη (Low-grade squamous intraepithelial lesions, Low-grade SIL) στα οποία ανήκουν οι CIN I αλλοιώσεις, iii) τα δείγματα με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή βλάβη (High-grade squamous intraepithelial lesions, High-grade SIL) στα οποία ανήκουν οι CIN II και III αλλοιώσεις, και iv) τα δείγματα με καρκίνο του τραχήλου (cancer).

γ) Η τρίτη ομαδοποίηση ελάμβανε υπόψη τη σταδιακά αυξανόμενη βαρύτητα της ενδοεπιθηλιακής βλάβης του τραχήλου και είχε σαν αποτέλεσμα το διαχωρισμό των δειγμάτων σε πέντε κατηγορίες: i) τα φυσιολογικά δείγματα (normal), ii) τις αλλοιώσεις τύπου CIN I, iii) τις αλλοιώσεις τύπου CIN II, iv) τις αλλοιώσεις τύπου CIN III, και v) τα δείγματα με καρκίνο του τραχήλου (cancer).

Στην Εικόνα 8.1 παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των VEGF, bFGF, TGF- β 1, β 2, β 3 και των υποδοχέων TGF- β RI, RII, RIII σε κάθε μια από τις κατηγορίες δειγμάτων: φυσιολογικά δείγματα, CIN I, CIN II, CIN III και καρκινικά δείγματα. Για κάθε δείγμα παρουσιάζεται και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς (β 2M).

A) Αποτελέσματα σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών, CIN, και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας.

Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF- β 1 και του υποδοχέα του TGF- β RI, διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν σημαντικά στις ομάδες των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας που μελετήθηκαν ($P=0.015, 0.001, 0.008, 0.029$ αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Στην Εικόνα 8.2 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε αυτές τις κατηγορίες δειγμάτων, και φαίνονται οι μέσες τιμές και το σφάλμα της μέσης τιμής σε κάθε περίπτωση (mean \pm SEM).



Εικόνα 8.1: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα έκφρασης σε επίπεδο mRNA των VEGF, FGF2 (bFGF), TGF- β 1, β 2, β 3 και των υποδοχέων TGF- β RI, RII, RIII σε διάφορου βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (normal, CIN I, II, III, cancer).

Για κάθε δείγμα παρουσιάζεται και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς (β 2M), καθώς ο λόγος της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου προς αυτή του γονιδίου αναφοράς αποτέλεσε τη βάση του ημιποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων και χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

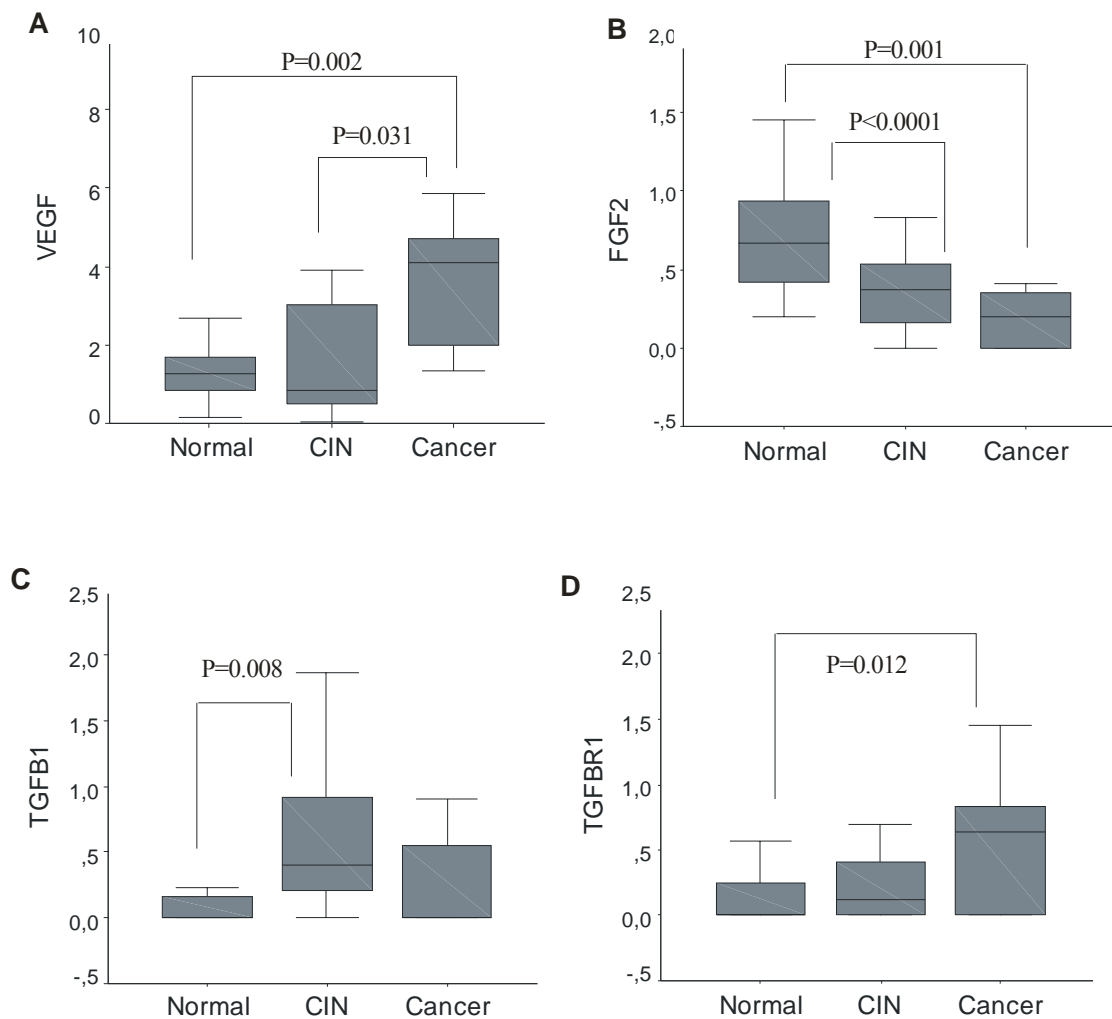
Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ολοένα αυξανόμενες τιμές της έκφρασης του υποδοχέα TGF-β RI με αύξηση του βαθμού της ενδοεπιθηλιακής βλάβης κατά τη μετάβαση από φυσιολογικά σε CIN και τελικά σε καρκινικά δείγματα. Αντίστοιχα για τον bFGF διαπιστώθηκε σταδιακή μείωση των επιπέδων mRNA έκφρασης με βαθμιαία αύξηση της επιθηλιακής αλλοίωσης (normal, CIN, cancer). Όσον αφορά τον VEGF οι τιμές έκφρασης του mRNA παρουσίασαν σημαντική αύξηση μόνο στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, ενώ στον TGF-β1 το ίδιο συνέβηκε μόνο στα CIN δείγματα.

Αναλυτικότερα, στατιστικά σημαντική αύξηση της mRNA έκφρασης στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά διαπιστώθηκε για τον VEGF και τον υποδοχέα TGF-β RI ($P=0.002$ και 0.012 αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του FGF2 βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερα στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ($P=0.001$, Mann-Whitney test).

Στατιστικώς σημαντική διαφορά στα δείγματα CIN σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, διαπιστώθηκε όσον αφορά στην mRNA έκφραση του FGF2 και του TGF-β1 ($P<0.0001$ και 0.008 αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Στην περίπτωση του FGF2 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης στις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ διαπιστώθηκε αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης του TGF-β1 στα ίδια δείγματα.

Οι ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου (CIN) εμφανίζονται ουσιαστικά διαφορετικές από τα καρκινικά δείγματα μόνο όσον αφορά στην mRNA έκφραση του VEGF η οποία παρουσιάστηκε σημαντικά αυξημένη στον καρκίνο ($P=0.031$, Mann-Whitney test).

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων TGF-β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RII, RIII στα φυσιολογικά, στα CIN ή στα καρκινικά δείγματα. Παρατηρήσαμε όμως σχετικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων σε σύγκριση με το VEGF σε όλες τις κατηγορίες δειγμάτων.



Εικόνα 8.2: Επίπεδα mRNA των VEGF (A), bFGF (B), TGF-β1 (C) και TGF-β RI (D) σε φυσιολογικά, CIN και καρκινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας.

Οι σχετικές τιμές έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων που χαρακτηρίζονταν από διαφορετική βαρύτητα ενδοεπιθηλιακής βλάβης (φυσιολογικά, CIN και καρκινικά δείγματα) ($P=0.015$, 0.001 , 0.008 , 0.029 αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην mRNA έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων (ανά δύο) για κάθε γονίδιο, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Mann-Whitney test και παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα.

B) Αποτελέσματα σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών, Low-grade SIL, High-grade SIL, και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας.

Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων VEGF, bFGF, και του TGF-β1 διαπιστώθηκε ότι διαφέρουν σημαντικά στις ομάδες των φυσιολογικών δειγμάτων, χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής βλάβης, υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακής βλάβης και καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ($P=0.001$, 0.002 , και 0.020 αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα TGF-β RI παρουσίασαν οριακά μη στατιστικά σημαντική διαφορά στις παραπάνω κατηγορίες δειγμάτων ($P=0.06$, Kruskal-Wallis). Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν στις παραπάνω κατηγορίες δειγμάτων.

Πίνακας 8.1: Έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων στις ομάδες δειγμάτων: φυσιολογικά δείγματα, Low-grade SIL (CIN I), High-grade SIL (CIN II, III), καρκίνος.

Γονίδια	Φυσιολογικά δείγματα	Low-grade SIL	High-grade SIL	Καρκίνος	<i>P</i> value*
VEGF/B2M	1.51±0.24	0.50±0.12	7.41±3.55	3.54±0.60	0,001
FGF2/ B2M	0.71±0.08	0.36±0.10	0.36±0.09	0.19±0.05	0,002
TGFB1/B2M	0.21±0.11	0.29±0.06	0.73±0.18	0.25±0.13	0,020
TGFB2/B2M	0.20±0.06	0.19±0.11	0.45±0.09	0.35±0.12	NS**
TGFB3/B2M	0.37±0.10	0.30±0.10	0.47±0.12	0.44±0.11	NS
TGFBR1/B2M	0.13±0.04	0.23±0.08	0.25±0.09	0.58±1.17	0,06
TGFBR2/B2M	1.17±0.34	0.89±0.18	1.07±0.13	1.49±0.48	NS
TGFBR3/βactin	0.93±0.58	0.73±0.22	0.56±0.14	1.33±1.04	NS

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται από τη μέση τιμή και το σφάλμα της μέσης τιμής έκφρασης των δειγμάτων σε κάθε κατηγορία (mean±SEM).

*Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis.

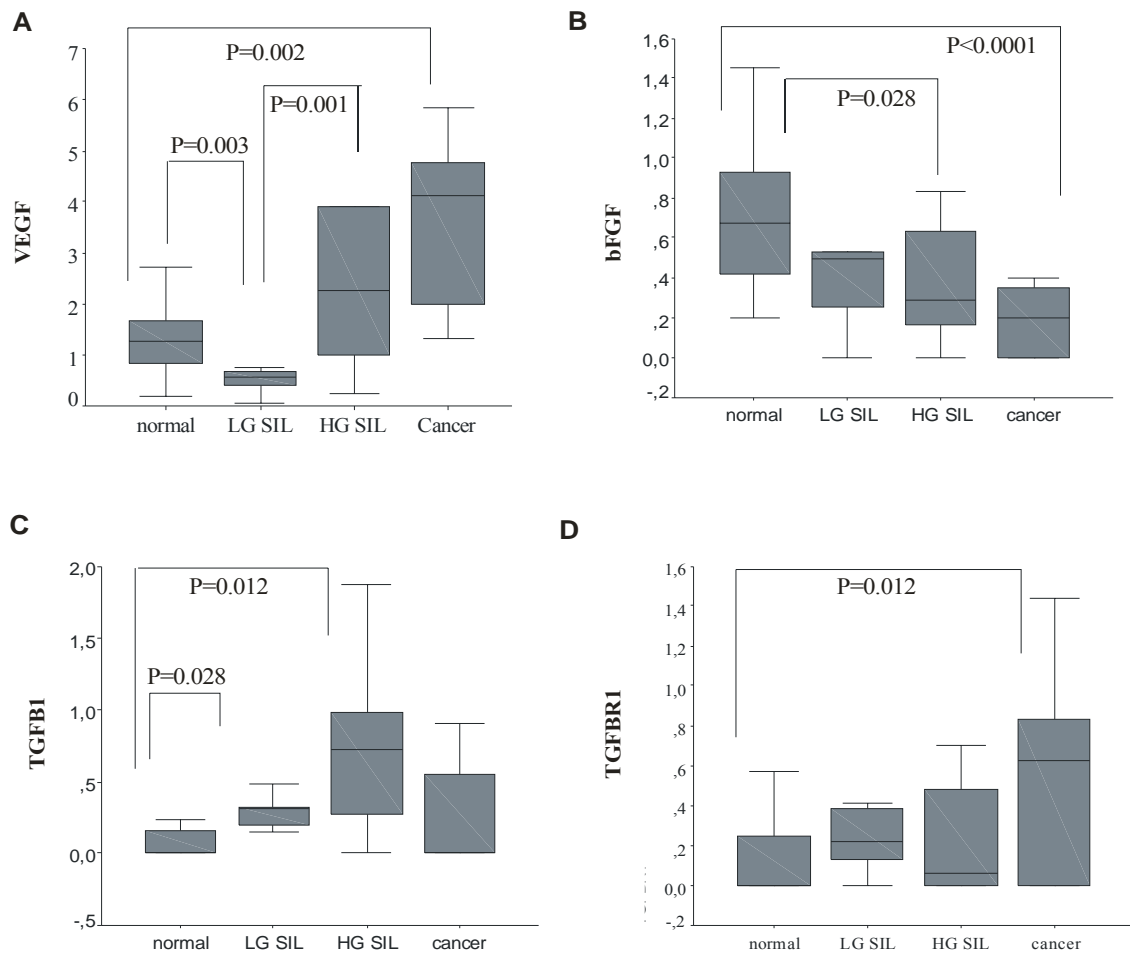
**NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό)

Αναλυτικότερα, διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF στις υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές βλάβες του τραχήλου (High-grade SIL) σε σύγκριση με τις χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις (Low-grade SIL) ($P=0.001$, 2-tailed Mann-Whitney test). Αντίθετα στην περίπτωση του bFGF παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του mRNA του γονιδίου τόσο στις υψηλού βαθμού επιθηλιακές αλλοιώσεις, όσο και στον καρκίνο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα ($P=0.028$ και $P<0.0001$ αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Τα υψηλότερα επίπεδα mRNA των TGF- β 1 και του υποδοχέα TGF- β RI παρατηρήθηκαν στις ομάδες των υψηλού βαθμού επιθηλιακών αλλοιώσεων (0.73 ± 0.18) και καρκίνου (0.58 ± 1.17) αντίστοιχα. Τα επίπεδα mRNA του TGF- β 1 στις High-grade και Low grade SIL βλάβες ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των φυσιολογικών δειγμάτων ($P=0.012$ και 0.028 αντίστοιχα, Mann-Whitney).

Είναι αξιοσημείωτο ότι όλοι οι TGF- β υποκαταστάτες (TGF- β 1, β 2, β 3) παρουσίασαν μέγιστες τιμές mRNA έκφρασης στην ομάδα των δειγμάτων με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (High-grade SIL), ενώ όλοι οι υποδοχείς του TGF- β (TGF- β RI, II, III) παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές mRNA έκφρασης στα δείγματα καρκίνου. Στην Εικόνα 8.3 παριστάνεται η έκφραση των VEGF, bFGF και TGF- β 1 στις προαναφερθείσες κατηγορίες δειγμάτων, και σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων ανά δύο (Mann-Whitney test).

Γ) Αποτελέσματα σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στις ομάδες φυσιολογικών, CIN I, CIN II, CIN III, και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας.

Η ομαδοποίηση των δειγμάτων τραχήλου της μήτρας που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή κατά σειρά αυξανόμενης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (normal, CIN I, CIN II, CIN III, cancer) αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα mRNA έκφρασης των VEGF, bFGF, TGF- β 1 και TGF- β RI στις παραπάνω ομάδες δειγμάτων ($P<0.0001$, $P=0.001$, 0.030 και 0.025 αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Τα υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα του VEGF παρατηρήθηκαν στις νεοπλασίες CIN III (10.78 ± 5.63) και ήταν παρόμοια με αυτά των καρκινικών δειγμάτων, αλλά σημαντικά υψηλότερα από αυτά που παρουσίασαν οι ενδοεπιθηλιακές βλάβες βαθμού CIN I και CIN II ($P=0.001$ και στις δύο περιπτώσεις, Mann-Whitney test).



Εικόνα 8.3: Επίπεδα mRNA των VEGF (A), bFGF (B), TGF-β1 (C) και TGF-β RI (D) σε φυσιολογικά, Low grade SIL, High-grade SIL, και καρκινικά δείγματα του τραχήλου της μήτρας.

Οι σχετικές τιμές έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων που χαρακτηρίζονταν από διαφορετικού βαθμού ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (φυσιολογικά, Low-grade SIL, High-grade SIL, και καρκινικά δείγματα) ($P=0.001$, 0.002 , και 0.020 , και οριακά μη στατιστικά σημαντικές $P=0.060$ αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην mRNA έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων (ανά δύο) για κάθε γονίδιο, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Mann-Whitney test και παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα.

Στατιστικά σημαντική αύξηση των mRNA επιπέδων του VEGF διαπιστώθηκε στα CIN III δείγματα συγκριτικά με τα φυσιολογικά δείγματα ($P=0.017$, Mann-Whitney test), αλλά μείωση παρατηρήθηκε στην αντίστοιχη περίπτωση των CIN I δειγμάτων ($P=0.017$, Mann-Whitney test).

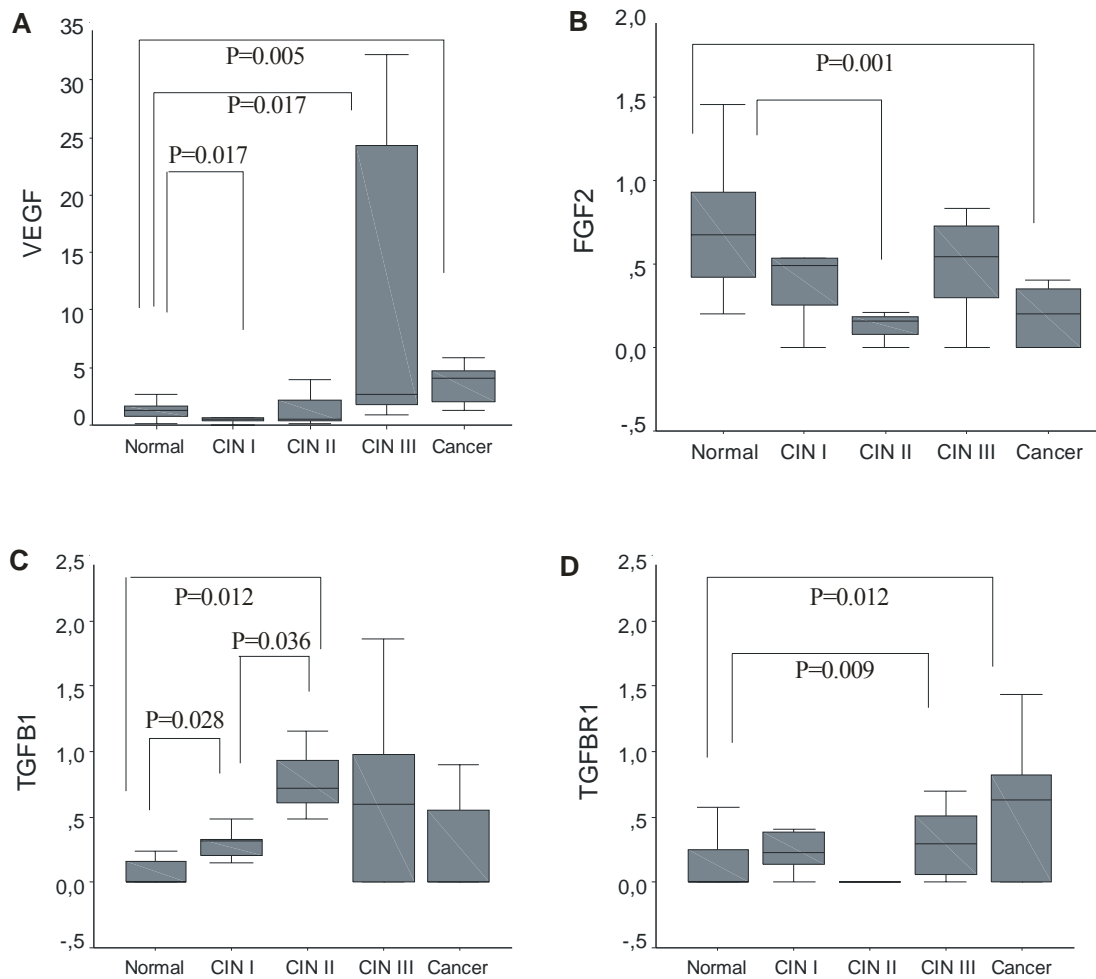
Η mRNA έκφραση του bFGF βρέθηκε να μειώνεται σταδιακά κατά τη μετάβαση από φυσιολογικά σε CIN I και CIN II δείγματα, ενώ τα CIN III δείγματα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές έκφρασης με τα φυσιολογικά. Στατιστικά σημαντικότερη μείωση των επιπέδων έκφρασης του FGF2 διαπιστώθηκε μόνο για τα καρκινικά και CIN II δείγματα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ($P=0.001$ και στις δύο περιπτώσεις, Mann-Whitney test).

Στην περίπτωση του TGF- β 1, αντίθετα με τον bFGF, διαπιστώσαμε σταδιακή αύξηση των επιπέδων mRNA κατά τη μετάβαση από φυσιολογικά σε CIN I και CIN II δείγματα, η οποία ήταν και στατιστικά σημαντική ($P=0.028$ και 0.036 αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Επίσης τα CIN II δείγματα βρέθηκαν εκφράζουν σημαντικότερα αυξημένα ποσά TGF- β 1 mRNA σε σχέση με τα φυσιολογικά ($P=0.012$, Mann-Whitney test). Τα CIN III δείγματα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές έκφρασης τόσο με τα φυσιολογικά όσο και με τα καρκινικά δείγματα.

Στην Εικόνα 8.4 παριστάνεται γραφικά με τη βοήθεια box-plots η έκφραση των VEGF, bFGF, TGF- β 1 και TGF- β RI στις προαναφερθείσες κατηγορίες δειγμάτων, και σημειώνονται ορισμένες στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων ανά δύο (Mann-Whitney test).

8.3 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα τραχήλου της μήτρας με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των VEGF, bFGF, TGF- β 1, β 2, β 3 και των υποδοχέων TGF- β RI, RII, RIII δε βρέθηκε να συσχετίζονται με την ηλικία των ασθενών. Επίσης δε διαπιστώθηκε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης οποιουδήποτε εκ των προαναφερθέντων γονιδίων στις ασθενείς αναπαραγωγικής ηλικίας συγκριτικά με αυτές που βρίσκονταν περί την εμμηνόπαυση, αλλά ούτε και με τις μετα-εμμηνόπαυσιες ασθενείς.



Εικόνα 8.4: Επίπεδα mRNA των VEGF (A), bFGF (B), TGF-β1 (C) και TGF-β RI (D) σε δείγματα με σταδιακά αυξανόμενη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση του τραχήλου της μήτρας (normal, CIN I, CIN II, CIN III, cancer).

Οι σχετικές τιμές έκφρασης των αυξητικών παραγόντων προς αυτή της β2-μικροσφαιρίνης, ήταν σημαντικά διαφορετικές στις ομάδες των δειγμάτων που χαρακτηρίζονταν από ολοένα αυξανόμενη βαρύτητα ενδοεπιθηλιακής βλάβης (φυσιολογικά, CIN I, CIN II, CIN III και καρκινικά δείγματα) ($P < 0.0001$, $P = 0.001$, 0.030 και 0.025 αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην mRNA έκφραση μεταξύ των ομάδων δειγμάτων (ανά δύο) για κάθε γονίδιο, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της δοκιμασίας Mann-Whitney test και παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα.

8.4 Μελέτη της συν-έκφρασης των γονιδίων κατά ζεύγη και απόδοση του προφίλ έκφρασης.

Προκειμένου να μελετηθεί και να αξιολογηθεί το πρότυπο συν-έκφρασης ανά ζεύγος των γονιδίων VEGF, bFGF, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII στις ομάδες των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών δειγμάτων του τραχήλου της μήτρας, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία συσχέτισης Spearman. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Spearman παρουσιάζονται στους Πίνακες 8.2 (Α, Β, Γ). Με έντονα αριθμητικά στοιχεία τονίζονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα δοκιμασίας συσχέτισης Spearman.

Α. Συντελεστής συσχέτισης ρ του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συσχέτισης της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων του τραχήλου της μήτρας.

		VEGF	FGF2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	-0.121	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.602							
TGFB1	Spearman's rho	0.003	-0.687	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.990	0.001**						
TGFB2	Spearman's rho	-0.066	-0.485	0.443	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.777	0.026*	0.044*					
TGFB3	Spearman's rho	0.127	-0.022	0.108	0.113	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.585	0.925	0.642	0.625				
TGFBR1	Spearman's rho	-0.070	-0.745	0.845	0.362	0.190	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.764	0.000**	0.000**	0.107	0.408			
TGFBR2	Spearman's rho	0.001	0.034	-0.225	0.121	-0.247	-0.399	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.998	0.882	0.327	0.602	0.280	0.073		
TGFBR3	Spearman's rho	-0.210	-0.383	0.458	0.748	0.066	0.514	0.000	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.361	0.087	0.037**	0.000**	0.776	0.017*	0.999	

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

➤ **Ομάδα φυσιολογικών δειγμάτων**

Στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων με τη βοήθεια της δοκιμασίας συσχέτισης Spearman (Πίνακας 8.2, Α) διαπιστώσαμε ισχυρή θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης του υποκαταστάτη TGF-β1 με κάθε έναν από τους υποδοχείς: TGF-β RI και TGF-β RIII ($P<0.0001$ και $P=0.037$ αντίστοιχα). Επίσης το TGF-β2 mRNA βρέθηκε να συσχετίζεται με αυτό των υποδοχέων TGF-β RI και TGF-β RIII ($P=0.044$ και $P<0.0001$ αντίστοιχα). Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA βρέθηκε ακόμη μεταξύ των δύο υποδοχέων TGF-β RI και TGF-β RIII ($P=0.037$). Ισχυρή αρνητική συσχέτιση της mRNA έκφρασης διαπιστώθηκε μεταξύ του bFGF (FGF2) και κάθε ένα από τα ακόλουθα γονίδια: TGF-β1, β2 και TGF-β RI ($P=0.001$, 0.026 και $P<0.0001$ αντίστοιχα). Αυτό σημαίνει ότι όταν η έκφραση του FGF2 αυξανόταν σε ένα δείγμα, σημειωνόταν μείωση της έκφρασης των TGF-β1, β2 και TGF-β RI και το αντίθετο.

B. Συντελεστής συσχέτισης rho του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συσχέτισης της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο στην ομάδα των CIN δειγμάτων.

		VEGF	FGF2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	0.427	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.128							
TGFB1	Spearman's rho	0.185	-0.022	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.527	0.940						
TGFB2	Spearman's rho	0.555	0.775	0.186	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.039*	0.001**	0.524					
TGFB3	Spearman's rho	0.298	0.102	0.696	0.300	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.301	0.728	0.006**	0.297				
TGFBR1	Spearman's rho	0.420	0.796	0.072	0.690	0.002	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.135	0.001**	0.807	0.006**	0.994			
TGFBR2	Spearman's rho	0.004	-0.314	-0.458	-0.051	-0.469	-0.329	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.988	0.274	0.099	0.863	0.091	0.251		
TGFBR3	Spearman's rho	0.209	-0.035	0.253	0.212	-0.113	0.308	0.033	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.474	0.904	0.383	0.466	0.702	0.284	0.911	

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

➤ **Ομάδα δειγμάτων ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών τραχήλου CIN**

Στην ομάδα των δειγμάτων με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN), το πρότυπο mRNA έκφρασης των αγγειογενετικών μορίων που μελετήθηκαν ήταν διαφορετικό από αυτό των φυσιολογικών δειγμάτων (Πίνακας 8.2, Β). Συγκεκριμένα η mRNA έκφραση του TGF-β1 δε βρέθηκε να συσχετίζεται με κάποιο υποδοχέα, όπως προηγουμένως, ενώ σημειώθηκε μια νέα ισχυρή συσχέτιση με τον TGF-β3 ($P=0.006$). Ο TGF-β2 από την άλλη πλευρά βρέθηκε να συν-εκφράζεται με τον υποδοχέα TGF-β RI, αλλά και με τον bFGF και τον VEGF ($P=0.006$, 0.001 και 0.039 αντίστοιχα). Μια θετική συσχέτιση έκφρασης που διατηρήθηκε είναι αυτή του FGF2 με τον TGF-β RI ($P=0.001$).

Γ. Συντελεστής συσχέτισης rho του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συσχέτισης της συνέκφρασης των γονιδίων ανά ζεύγος στην ομάδα των καρκινικών δειγμάτων.

		VEGF	BFGF	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	-0.468	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.204							
TGFB1	Spearman's rho	-0.174	0.685	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.654	0.042*						
TGFB2	Spearman's rho	-0.520	0.540	0.579	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.151	0.133	0.102					
TGFB3	Spearman's rho	-0.519	-0.342	-0.275	0.018	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.152	0.368	0.475	0.964				
TGFBR1	Spearman's rho	-0.406	0.831	0.248	0.462	-0.309	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.278	0.005**	0.520	0.210	0.418			
TGFBR2	Spearman's rho	0.441	-0.383	-0.169	0.114	-0.084	-0.248	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.235	0.309	0.664	0.771	0.829	0.520		
TGFBR3	Spearman's rho	-0.752	0.128	0.109	0.420	0.574	-0.051	0.076	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.019*	0.743	0.779	0.261	0.106	0.896	0.847	

* Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.05 (Δοκιμασία δύο άκρων).

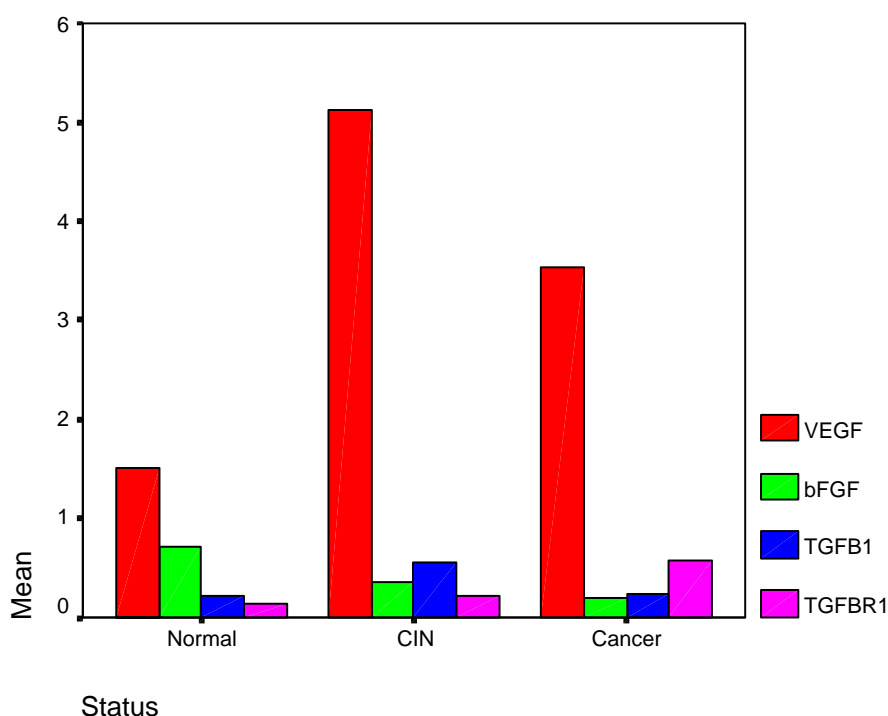
** Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0.01 (Δοκιμασία δύο άκρων).

➤ **Ομάδα δειγμάτων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας**

Στην ομάδα των καρκινικών δειγμάτων του τραχήλου που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε επιπλέον μεταβολή του προτύπου έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν, σε σύγκριση τόσο με τα CIN όσο και με τα φυσιολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα στα δείγματα καρκίνου βρέθηκε θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης του bFGF με καθένα από τα: TGF-β1 και TGF-β RI ($P=0.042$ και 0.005 αντίστοιχα), ενώ στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων είχε διαπιστωθεί αρνητική συσχέτιση. Επίσης προέκυψε μια νέα θετική συσχέτιση, αυτή της συνέκφρασης του VEGF με τον υποδοχέα TGF-β RIII ($P=0.019$), και καταργήθηκαν όλες οι προηγούμενες.

Απόδοση του προφίλ έκφρασης των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας.

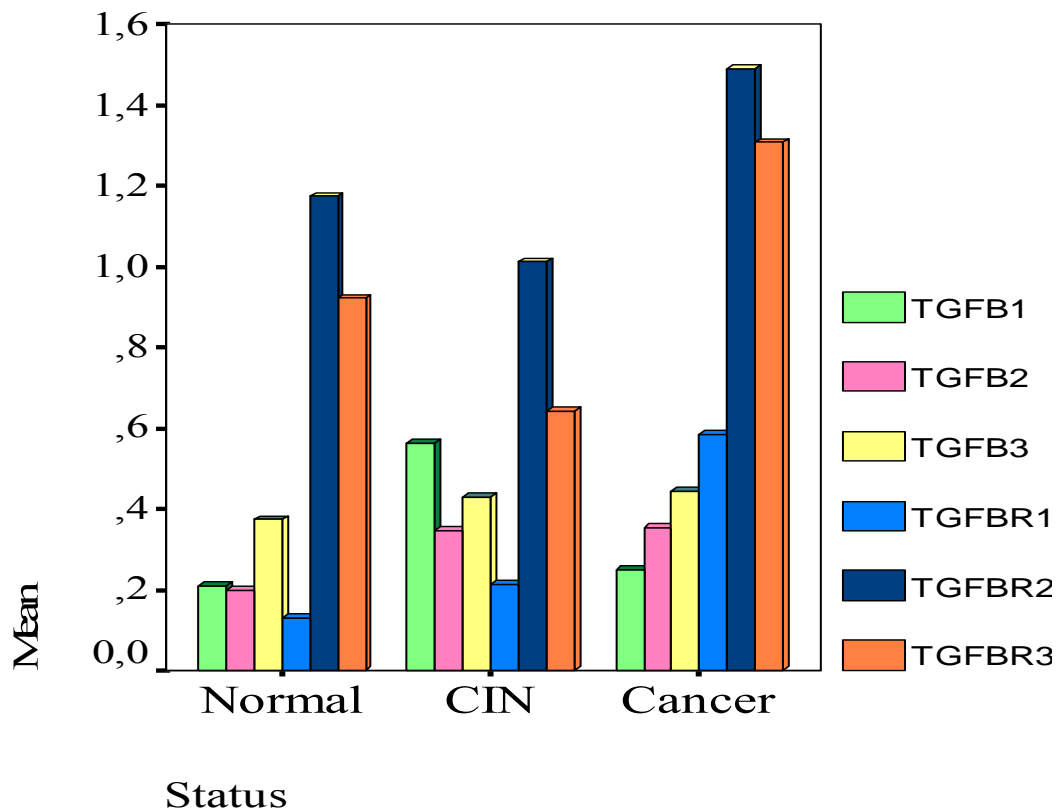
Στην Εικόνα 8.5 που ακολουθεί παρουσιάζεται το πρότυπο έκφρασης των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας, όσον αφορά τα γονίδια αυτά που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές mRNA έκφρασης στις παραπάνω τρεις κατηγορίες δειγμάτων (VEGF, bFGF, TGF-β1 και ο υποδοχέας TGF-β RI). Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: φυσιολογικά, CIN ή καρκίνου του τραχήλου. Παρατηρούμε λοιπόν πως μεταβάλλεται το συνολικό πρότυπο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό τράχηλο σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, αλλά και κατά τη αύξηση της βαρύτητας της ενδοεπιθηλιακής βλάβης και μετατροπή της CIN αλλοίωσης σε καρκίνο. Στο διάγραμμα δεσπόζει η κατακόρυφη αύξηση του VEGF στα CIN δείγματα και στον καρκίνο, αλλά είναι χαρακτηριστική και η αντιστροφή της κλιμακούμενης έκφρασης των bFGF, TGF-β1 και TGF-β RI στα δείγματα καρκίνου σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα.



Εικόνα 8.5: Μεταβολή του προτύπου mRNA έκφρασης των VEGF, bFGF, TGF-β1 και TGF-β RI σε δείγματα με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και σε δείγματα καρκίνου, σε σύγκριση με το προφίλ έκφρασης φυσιολογικών ιστών τραχήλου της μήτρας.

Στην Εικόνα 8.6 που ακολουθεί παρουσιάζεται το πρότυπο έκφρασης των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών δειγμάτων τραχήλου της μήτρας, όσον αφορά την mRNA έκφραση των υποκαταστατών TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII στις παραπάνω τρεις κατηγορίες δειγμάτων. Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: φυσιολογικά, CIN ή καρκίνος του τραχήλου.

Παρατηρούμε πως πάλι μεταβάλλεται το συνολικό πρότυπο έκφρασης των παραπάνω γονιδίων κατά τη μετάβαση από φυσιολογικό τράχηλο σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, αλλά και κατά τη αύξηση της βαρύτητας της ενδοεπιθηλιακής βλάβης και μετατροπή της CIN αλλοίωσης σε καρκίνο. Η μεταβολή του προτύπου έκφρασης του TGF-β και των υποδοχέων του, σε συνδυασμό με τις αλλαγές στο πρότυπο συν-έκφρασής τους που παρατηρήσαμε στην παρούσα μελέτη, αντικατοπτρίζει αντίστοιχες μεταβολές στη λειτουργικότητα του συμπλόκου μετάδοσης σήματος του TGF-β, οι οποίες είναι πιθανότητα συνυπεύθυνες για την πολύπλευρη βιολογική δράση του TGF-β κατά την διαδικασία της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας.



Εικόνα 8.6: Μεταβολή του προτύπου mRNA έκφρασης των TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII σε δείγματα με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και σε δείγματα καρκίνου, σε σύγκριση με το προφίλ έκφρασης φυσιολογικών ιστών τραχήλου της μήτρας.

Στο διάγραμμα, οι ράβδοι απεικονίζουν τη μέση τιμή της έκφρασης κάθε γονιδίου στην εκάστοτε ομάδα δειγμάτων: φυσιολογικά, CIN ή καρκίνος του τραχήλου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ.

8.5 Συζήτηση των αποτελεσμάτων έκφρασης των γονιδίων στις διάφορες ομάδες δειγμάτων.

Η επαγωγή της αγγειογενετικής διαδικασίας έχει δειχθεί σε κυτταρολογικό υλικό ή υλικό βιοψίας με νεοπλασία ή καρκίνο του επιθηλίου του γυναικείου γεννητικού συστήματος (182). Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη νέο-αγγειογένεση κυρίαρχη θέση κατέχουν ο VEGF και ο FGF2 οι οποίοι αναγνωρίζονται ως οι σημαντικότεροι επαγωγείς της διαδικασίας στους ανθρώπινους όγκους. Πολλοί ερευνητές υπέδειξαν την ισχυρή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων του VEGF καθώς και του δείκτη αγγείωσης του όγκου (MVD) – δεικτών που συνεπάγονται έντονη αγγειογενετική δραστηριότητα - με υψηλού βαθμού επιθηλιακές αλλοιώσεις (high-grade intraepithelial lesions) και διηθητικό καρκίνο (invasive carcinoma) του τραχήλου της μήτρας (183-188). Η προγνωστική αξία του προσδιορισμού του VEGF σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο του τραχήλου έχει επίσης δειχθεί (227). Άλλα μόρια που παρουσιάζουν αγγειογενετική δραστηριότητα είναι τα μέλη της οικογένειας του TGF- β τα οποία συσχετίζονται με ογκοκατασταλτική δράση, αλλά ο ρόλος τους δεν έχει αποσαφηνιστεί στην καρκινογένεση του τραχήλου.

Η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα κατά την νέο-αγγειογένεση εκτός από το ότι συμβάλλει στην κατανόηση των γενετικών μηχανισμών της καρκινογένεσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς με στόχο τον εντοπισμό των επιθηλιακών δυσπλασιών που ενδέχεται να εξελιχθούν σε κακοήγη νεοπλασία. Δεδομένου ότι οι γνώσεις μας είναι πολύ περιορισμένες όσον αφορά τη συνδυασμένη έκφραση σε επίπεδο mRNA περισσότερων του ενός αυξητικού παράγοντα που εμπλέκεται στην νέο-αγγειογένεση, στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το πρότυπο έκφρασης των VEGF, bFGF, TGF- β 1, β 2, β 3 και των υποδοχέων TGF- β R1, RII, RIII σε δείγματα ιστών με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και με καρκίνο και το συγκρίναμε με αυτό φυσιολογικών ιστών τραχήλου της μήτρας. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη προσπάθεια μελέτης συνδυασμένης mRNA έκφρασης σε δείγματα με CIN αλλοιώσεις.

Vascular Endothelial growth factor (VEGF)

Αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF έχουν αναφερθεί τόσο σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, όσο και σε διηθητικό καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας και έχουν συσχετισθεί με αυξημένη μικρο-αγγειακή πυκνότητα (MVD), υποδεικνύοντας τον ρόλο του VEGF στην καρκινογένεση του τραχήλου (192, 198). Σύμφωνα με τα ευρήματά μας στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε βαθμιαία αύξηση των επιπέδων mRNA του VEGF ανάλογα με τη βαρύτητα της βλάβης του τραχήλου: CIN αλλοίωση ή καρκίνος, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του VEGF βρέθηκαν στατιστικά να είναι σημαντικά αυξημένα στον καρκίνο σε σύγκριση με τις CIN βλάβες και το ίδιο συμβαίνει με τις High-grade SIL βλάβες έναντι των Low-grade SIL. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες ανοσοϊστοχημείας και *in situ* υβριδισμού (192-197) και υποδεικνύουν ότι η mRNA έκφραση του VEGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του βαθμού καρκινικής εκτροπής των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας τα μέγιστα επίπεδα mRNA του VEGF απαντώνται στις CIN III βλάβες (10.78 ± 5.63) τα οποία είναι παρόμοια με αυτά που παρουσιάζουν τα δείγματα καρκίνου, αλλά είναι σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των CIN I και II αλλοιώσεων. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές (198) και ενισχύουν την υπόθεση ότι οι CIN III βλάβες αποτελούν τις ουσιαστικές πρόδρομες κλινικές καταστάσεις του διηθητικού καρκίνου του τραχήλου, ενώ οι CIN I και II αλλοιώσεις αντιπροσωπεύουν μη επιθετικές παθολογικές καταστάσεις που στις περισσότερες περιπτώσεις υποστρέφουν και δεν εξελίσσονται σε καρκίνο.

Basic Fibroblast growth factor (bFGF ή FGF2)

Οι διαθέσιμες πληροφορίες όσον αφορά τη σημασία του FGF2 στην εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Συγκεκριμένα υπάρχουν μόνο δυο αναφορές σχετικά με τα επίπεδα mRNA του FGF2 σε δείγματα καρκίνου και φυσιολογικούς ιστούς τραχήλου, ενώ δεν υπάρχουν καθόλου μελέτες της έκφρασης του

bFGF σε ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (CIN) (152, 199). Και στις δύο παραπάνω μελέτες βρέθηκαν παρόμοια επίπεδα mRNA του bFGF στους φυσιολογικούς ιστούς και σε δείγματα καρκίνου του τραχήλου σε αρχικά στάδια. Σε προχωρημένα στάδια καρκίνου βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης FGF2 σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στη μελέτη του Fugimoto (1999). Και στις δύο παραπάνω εργασίες ο αριθμός των δειγμάτων ήταν πολύ μικρός, ενώ δεν έχει αξιολογηθεί καθόλου η ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε τα μεταγραφικά επίπεδα του FGF2 σε ιστούς με καρκίνο του τραχήλου, αλλά και με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) και διαπιστώσαμε μικρότερα επίπεδα FGF2 mRNA σε αυτές τις βλάβες σε σύγκριση με υγιείς ιστούς του τραχήλου. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με των προηγούμενων ερευνητών και περιπλέκουν την ήδη ασαφή εικόνα μας για το ρόλο του FGF2 στην καρκινογένεση του τραχήλου. Μπορούμε μόνο να υποθέσουμε ότι η μεταγραφική απενεργοποίηση του FGF2 μπορεί να μην αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της καρκίνου του τραχήλου. Μία άλλη πιθανότητα είναι εναλλακτικά βιοχημικά μονοπάτια να είναι υπεύθυνα για την καταστολή της έκφρασης του FGF2 σε επίπεδο mRNA στη διαδικασία της ανάπτυξης του καρκίνου στον τράχηλο. Δεν είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζονται αντιφατικά αποτελέσματα αναφορικά με τα επίπεδα του FGF2, καθώς το ίδιο συμβαίνει και στον καρκίνο του μαστού όπου αναφέρονται αυξημένα επίπεδα του παράγοντα αυτού σε καρκινικούς όγκους συγκριτικά με φυσιολογικούς ιστούς (153, 210), σε αντίθεση με άλλες μελέτες που δε βρίσκουν διαφορά στην έκφραση (158), και άλλες που αναφέρουν χαμηλότερα επίπεδα FGF2 (155-157). Συνεπώς η εμπλοκή του FGF2 στην ανάπτυξη της νόσου του καρκίνου δεν έχει μέχρι στιγμής εδραιωθεί. Απαιτούνται επιπλέον μελέτες και σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του bFGF στην κακοήγη εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας.

Transforming growth factor (TGF-β)

Ο TGF-β εμπλέκεται από πολλές απόψεις στην κυτταρική λειτουργία όπως για παράδειγμα στη διαδικασία της αγγειογένεσης, στην καταστολή των όγκων, στη κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, καθώς και στην τοπική ανοσοαπόκριση των κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ο TGF-β1 διατηρείται σε βασικά επίπεδα έκφρασης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Εντούτοις, στα αρχικά στάδια της κακοήθους

εξαλλαγής (CIN I, II) παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων mRNA του TGF-β1. Η αύξηση αυτή είναι αναμενόμενη ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης της ογκοκατασταλτικής δράσης του TGF-β σε απόκριση στην ανώμαλη κυτταρική διαφοροποίηση που παρατηρείται στα αρχικά στάδια του καρκίνου (1-3). Σε προχωρημένα στάδια νεοπλασίας όμως (CIN III) ή καρκίνου, η mRNA έκφραση του TGF-β1 πλησιάζει και πάλι βασικά επίπεδα, γεγονός που εξηγείται από την ανάγκη κατάργησης της ανοσοκατασταλτικής δράσης του TGF-β (η οποία είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του TGF-β) και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (89). Είναι χαρακτηριστικό ότι οι περισσότερες ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης TGF-β1 κατά τη νεοπλασματική μεταμόρφωση του επιθηλίου του τραχήλου, γεγονός που υποδεικνύει ότι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί είναι πιθανόν να ρυθμίζουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης του TGF-β1 σε αυτά τα συστήματα. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας η mRNA έκφραση του υποδοχέα TGF-β RI παραμένει σταθερή στην αρχή της νεοπλασματικής μεταμόρφωσης του τραχήλου (CIN I, II), και αυξάνεται σημαντικά σε προχωρημένα νεοπλασματικά στάδια (CIN III) και στον καρκίνο. Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να εξηγηθεί μεμονωμένα, αλλά πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο TGF-β RI συμμετέχει σε έναν πολύπλοκο μονοπάτι μετάδοσης σήματος που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με άλλους υποδοχείς και υποκαταστάτες για τη δημιουργία του συμπλόκου που ενεργοποιεί τον καταρράκτη μεταγωγής σήματος του TGF-β (74-78). Συνεπώς η μεταβολή στην έκφραση του TGF-β RI πρέπει να ιδωθεί υπό το πρίσμα της μεταβολής του προτύπου έκφρασης του συνόλου των υποκαταστατών και υποδοχέων του TGF-β που μετέχουν στο σύμπλοκο-σηματοδότη και θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Αναφορικά με την mRNA έκφραση των TGF-β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RII, RIII στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας, δε διαπιστώθηκε συσχέτιση με το κλινικό στάδιο της νόσου σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η κακοήθης εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου συνοδεύεται από μεταγραφική απορρύθμιση του TGF-β1 και του υποδοχέα TGF-β RI.

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου εμπλέκεται ο TGF-β στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση που συνοδεύουν την καρκινική εκτροπή των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου, φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών βιοχημικών πορειών που απαιτούν περισσότερη διερεύνηση.

8.6 Συζήτηση των αποτελεσμάτων συν-έκφρασης των γονιδίων. Προφίλ έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Η ανάλυση της συν-έκφρασης σε επίπεδο mRNA όλων των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στις ομάδες των φυσιολογικών, CIN και καρκινικών ιστών τραχήλου της μήτρας. Περισσότερες συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων στην ομάδα των υγιών ιστών του τραχήλου, οι οποίες ήταν και πιο ισχυρές συγκρινόμενες με τις άλλες ομάδες δειγμάτων. Λιγότερες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν στην ομάδα των CIN αλλοιώσεων και ακόμα λιγότερες στον καρκίνο.

Ομάδα υγιών ιστών τραχήλου

Στην ομάδα των υγιών ιστών τραχήλου παρατηρήσαμε θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης του TGF-β1 με κάθε έναν από τους TGF-β2, TGF-β RI και TGF-β RIII. Επίσης θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των υποδοχέων TGF-β RI και TGF-β RIII. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τις γνώσεις μας για το μηχανισμό έναρξης του καταρράκτη μετάδοσης σήματος του TGF-β μέσω των υποδοχέων του. Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ουσιαστικός ρόλος που φαίνεται να παίζει ο TGF-β RIII στην ενεργοποίηση του σήματος του TGF-β στην καρκινογένεση του τραχήλου. Η ισχυρή mRNA συν-έκφραση που διαπιστώθηκε μεταξύ του TGF-β RIII με τον υποδοχέα TGF-β RI υποδεικνύει το θεμελιώδη ρόλο του στο σχηματισμό του συμπλόκου, μέσω διευκόλυνσης της πρόσβασης και πρόσδεσης των υποκαταστατών στον υποδοχέα TGF-β RII. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε επίσης συν-έκφραση του mRNA των υποκαταστατών (ligands) TGF-1 και β2, γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι αυτοί είναι οι κυριότεροι υποκαταστάτες που λαμβάνουν μέρος στο σχηματισμό του ετερο-τετραμερούς συμπλόκου (και λιγότερο ο TGF-β3). Επιπλέον διαπιστώσαμε αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του FGF2 (μειώνεται κατά την εξέλιξη του καρκίνου), με αυτή καθενός εκ των TGF-β1, β2 και TGF-β RI στην ομάδα των υγιών ιστών του τραχήλου.

Ομάδα ιστών τραχήλου με ενδεπιθηλιακή βλάβη (CIN)

Στην ομάδα ιστών με CIN αλλοιώσεις, το πρότυπο mRNA συν-έκφρασης των αυξητικών παραγόντων είναι διαφορετικό σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς.

Καινούργιες συσχετίσεις παρατηρούνται, όπως η συν-έκφραση σε επίπεδο mRNA του TGF- β 2 με κάθε έναν από τους FGF2 και VEGF, ενώ άλλες καταργούνται, όπως αυτή του TGF- β 1 με κάθε έναν από τους υποδοχείς TGF- β RI και TGF- β RIII. Επιπλέον το mRNA του TGF- β 3 στα CIN δείγματα (αντί για τον TGF- β 2 που είχαμε παρατηρήσει στους υγιείς ιστούς), παρουσιάζει συν-έκφραση με αυτό του TGF- β 1. Από τη άλλη πλευρά η συν-έκφραση του TGF- β 2 με τον υποδοχέα TGF- β RI που είχαμε βρει στα φυσιολογικά δείγματα, διατηρείται και στην ομάδα των CIN αλλοιώσεων. Είναι πολύ ενδιαφέρον το εύρημα ότι η mRNA έκφραση του FGF2 που παρουσίαζε αρνητικές συσχετίσεις με άλλους αυξητικούς παράγοντες στην ομάδα των υγιών ιστών, στην ομάδα των CIN βλαβών παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τον TGF- β RI. Όλα τα παραπάνω συνιστούν απορρύθμιση του προφίλ συν-έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στις CIN βλάβες σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικών ιστών τραχήλου της μήτρας.

Ομάδα ιστών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Στην ομάδα δειγμάτων με καρκίνο του τραχήλου το mRNA του FGF2 παρουσιάζει συν-έκφραση με αυτό του TGF- β 1, όπως ακριβώς συνέβαινε και στις CIN αλλοιώσεις. Η mRNA έκφραση του VEGF παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με αυτή του TGF- β RIII. Όλες οι άλλες συσχετίσεις που είχαμε παρατηρήσει στις ομάδες των CIN αλλοιώσεων και των υγιών ιστών του τραχήλου απουσιάζουν στην ομάδα των δειγμάτων με καρκίνο.

Γενική συζήτηση-σχολιασμός.

Ο TGF- β εμπλέκεται από πολλές απόψεις στην κυτταρική λειτουργία. Δεδομένης της ογκο-κατασταλτικής του δράσης, είναι φανερό ότι παίζει θεμελιώδη ρόλο στην καρκινογένεση. Η απώλεια της λειτουργίας του TGF- β έχει συνδεθεί με ανάπτυξη όγκων και καρκινική εξέλιξη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι απώλεια ή μείωση της έκφρασης του TGF- β δεν συνιστά τη μοναδική αιτία ενός κακοήθους φαινοτύπου στον τράχηλο. Ο TGF- β μπορεί να εκφράζεται στις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (CIN) ή στον καρκίνο, και μάλιστα μπορεί ακόμη να υπερεκφράζεται στα αρχικά νεοπλασματικά στάδια (CIN I, II) (όπως φανερώνουν τα ευρήματα της παρούσας διατριβής), με στόχο να καταστείλει την έναρξη ή την επέκταση ενός όγκου, άλλοι όμως παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για την απώλεια της βιολογικής λειτουργίας και μετάδοσης σήματος από τον TGF- β . Η απορρύθμιση του προτύπου συν-

έκφρασης του TGF-β και των υποδοχέων του στις CIN αλλοιώσεις και στον καρκίνο σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς, η οποία επιδεικνύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποτελεί μια πιθανή εξήγηση του προ-καρκινικού και καρκινικού φαινοτύπου που παρουσιάζουν τα δείγματα αυτά. Παράλληλα αυτή η απορρύθμιση είναι δυνατό να ευθύνεται και για την απώλεια μετάδοσης σήματος από τον TGF-β και κατά συνέπεια την απώλεια της ογκο-κατασταλτικής του δράσης.

Η αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του FGF2 με τον TGF-β RI στους φυσιολογικούς ιστούς τραχήλου της μήτρας μετατρέπεται σε θετική στις CIN αλλοιώσεις και στον καρκίνο. Ο υποδοχέας τύπου I του TGF-β (TGF-β RI) φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός για τη μεταγωγή σήματος, καθώς αυτή αναστέλλεται όταν απουσιάζει η έκφρασή του. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι ο υποδοχέας TGF-β RII μπορεί να προσδεθεί σε έναν TGF-β υποκαταστάτη απουσία του TGF-β RI (όχι όμως και το αντίθετο), αλλά η μεταγωγή σήματος αναστέλλεται χωρίς την πρόσδεση του TGF-β RI στο σύμπλεγμα. Η συν-έκφραση του mRNA του FGF2 και του TGF-β RI που σημειώνεται στις CIN βλάβες και στον καρκίνο δεν προκαλεί έκπληξη. Ο FGF2 είναι γνωστό ότι επάγει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η υπερέκφραση του FGF2 στα προκαρκινικά και καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου είναι λογικό να συνοδεύεται από αντίστοιχη υπερέκφραση του TGF-β RI, έτσι ώστε να αντισταθμιστεί η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλεί ο FGF2 από την ογκο-κατασταλτική δράση του TGF-β. Από την άλλη πλευρά, όταν ο FGF2 υπο-εκφράζεται δεν υπάρχει ανάγκη για ογκο-καταστολή και σημειώνεται υπο-έκφραση και του TGF-β RI.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίδουν έμμεσες αποδείξεις ότι η απορρύθμιση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των VEGF, bFGF, TGF-β1, και του υποδοχέα TGF-β RI, εμπλέκεται στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής του τραχήλου της μήτρας και θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη καρκινικής εκτροπής. Επιπλέον η απορρύθμιση του προφίλ συν-έκφρασης του *συνόλου* των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στις CIN βλάβες και στον καρκίνο, σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς, προσδίδει επιπλέον αποδείξεις ότι η ανάπτυξη καρκίνου συνοδεύεται από διατάραξη της μεταγραφής των αυξητικών παραγόντων στον τράχηλο της μήτρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η επαγωγή της αγγειογένεσης έχει δείχθει ότι αποτελεί πρώιμο στάδιο της πολυσταδιακής διαδικασίας της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού. Αγγειογένεση έχει διαπιστωθεί ότι λαμβάνει χώρα και σε κυτταρολογικό υλικό ή υλικό βιοψίας με νεοπλασία ή καρκίνο του επιθηλίου του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την έκφραση σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων VEGF, FGF2, TGF-β1, β2, β3 και των υποδοχέων TGF-β RI, RII, RIII, με σκοπό να διερευνήσουμε το μηχανισμό που ελέγχει την επαγωγή της αγγειογενετικής δραστηριότητας στα κυριότερα νεοπλάσματα που προσβάλλουν τον γυναικείο πληθυσμό, και να προσδιορίσουμε τυχόν ομοιότητες ή διαφορές στην αγγειογενετική διαδικασία που συνοδεύει την κακοήθη εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων σε αυτούς τους καρκίνους.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στον καρκίνο του μαστού υποδεικνύουν ότι οι αυξητικοί παράγοντες που απορυθμίζονται, όσον αφορά την έκφραση mRNA, στον καρκίνο σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς είναι ο FGF2 και ο TGF-β3. Περισσότεροι αλλά και διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες διαπιστώθηκε ότι απορυθμίζονται κατά την καρκινική μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, συγκριτικά με τον καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα ο VEGF, ο FGF2, ο TGF-β1 και ο υποδοχέας TGF-β RI βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά στα παθολογικά σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα του τραχήλου, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες κυριαρχούν στην αγγειογενετική διαδικασία που συνοδεύει την καρκινογένεση στους δύο τύπους καρκίνου που μελετήσαμε.

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης mRNA των αυξητικών παραγόντων που μελετήθηκαν, με την έκταση και τη βαρύτητα της επιθηλιακής βλάβης απέδωσε διαφορετικά αποτελέσματα στον καρκίνο του μαστού (TGF-β1) σε σχέση με τον καρκίνο του τραχήλου (VEGF, FGF2, TGF-β1, TGF-β RI), υποδεικνύοντας διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες σε κάθε περίπτωση, ως πιθανούς μοριακούς δείκτες του βαθμού αλλοίωσης των επιθηλιακών κυττάρων. Και στις δύο περιπτώσεις καρκίνων δε διαπιστώθηκε συσχέτιση της έκφρασης mRNA των αυξητικών

παραγόντων με το κλινικό στάδιο των όγκων ώστε να μπορέσουμε να υποδείξουμε κάποιο παράγοντα ως πιθανό μοριακό δείκτη του βαθμού καρκινικής μεταμόρφωσης των επιθηλιακών κυττάρων.

Ισχυρή ορμονική επίδραση στην έκφραση mRNA του VEGF και των περισσότερων υποκαταστατών και υποδοχέων του TGF- β διαπιστώθηκε στον καρκίνο του μαστού, ενώ στον καρκίνο του τραχήλου δε βρέθηκε παρόμοια επίδραση, ενισχύοντας την άποψη ότι ο μηχανισμός που ελέγχει την αγγειογένεση ρυθμίζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (context dependent).

Υπήρξαν διαφορές στο πρότυπο έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων τόσο στους φυσιολογικούς, όσο και στους παθολογικούς ιστούς σε κάθε τύπο καρκίνου που μελετήσαμε. Η απορρύθμιση όμως του *προτύπου συν-έκφρασης του συνόλου* των αυξητικών παραγόντων που μελετήσαμε στον καρκίνο (και στις ενδοεπιθηλιακές βλάβες) σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς, είναι κοινό στοιχείο και στους δύο τύπους καρκίνων (μαστού και τραχήλου της μήτρας). Η διατάραξη του προτύπου συν-έκφρασης αποτελεί μια πιθανή εξήγηση του προ-καρκινικού και καρκινικού φαινοτύπου που παρουσιάζουν τα δείγματα που μελετήσαμε, και προσδίδει επιπλέον αποδείξεις ότι η ανάπτυξη καρκίνου συνοδεύεται από διατάραξη της φυσιολογικής ισορροπίας επαγωγέων και καταστολέων της αγγειογένεσης.

Συμπερασματικά, διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες φαίνεται να κυριαρχούν στην αγγειογενετική διαδικασία που εμπλέκεται στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και του τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να επιδρούν και να διαφοροποιούν την αγγειογενετική δραστηριότητα σε κάθε τύπο καρκίνου. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίδουν έμμεσες αποδείξεις ότι η απορρύθμιση του *προτύπου συν-έκφρασης* σε επίπεδο mRNA των αυξητικών παραγόντων θα μπορούσε πιθανά να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης της αγγειογένεσης και του κινδύνου καρκινικής εκτροπής των επιθηλιακών κυττάρων στα γυναικεία νεοπλάσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* (2000) 407: 249-57.
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* (2000) 6(3): 389-395.
3. Bergers G, Benjamin L. Tumorigenesis and the Angiogenic switch. *Nature Rev Cancer* (2002) 3: 401-410.
4. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* (1907) 2: 1236-1240.
5. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* (1992) 267: 10931-10934.
6. Gullino PM. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* (1978) 61:639-643.
7. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* (2001) 37: 97-114.
8. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* (2000) 21: 505-515.
9. Carmeliet P. Controlling the cellular brakes. *Nature* (1999) 401: 657-658.
10. Knowles HJ, Harris AL. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumorigenesis. *Breast cancer Res* (2001) 3: 318-322.
11. Yu JL, Rak JW. Inflammatory and Immune cells in tumor angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Research* (2003) 5: 83-88.
12. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews cancer* (2002) 2: 91-100.
13. Liekens S, et al. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* (2001) 61: 253-270.
14. Cristofanilli M, Charnsangavej C, Hortobagyi GH. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nature Rev Drug Discovery* (2002) 1: 415-426.
15. Sharma R, Harris AL, Dalglish AG, et al. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. *The Lancet Oncology* (2001) 2: 726-732.
16. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* (2000) 7: 451-457.
17. Rafii S. Circulating endothelial precursors, mystery, reality and promise. *J Clin Invest* (2000) 105: 17-19.
18. Yancopoulos GD, Samuel D, Gale GW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* (2000) 407: 242-248.
19. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA, et al. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* (1977) 269: 804-806.

20. Coussens LM et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelia angiogenesis. *Genes Dev* (1999) 13:1382-1397.
21. Sunderkotter C, Steinbrink K, et al. Macrophages and angiogenesis. *J Leuk Biol* (1994) 55: 410- 422.
22. Pepper MS. Role of the Matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001) 21:1104-1117.
23. Ruoslahti E. Specialization of tumor vasculature. *Nature reviews cancer* (2002) 2: 83-90.
24. Morikawa S et al. Abnormalities in pericytes on blood vessels. *Am J Pathol* (2002) 160: 985-1000.
25. Folberg R, Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* (2000) 156: 383-388.
26. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second International consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* (2002) 38: 1564-1579.
27. Longo R, Sarmiento R et al: Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* (2002) 2: 237-256.
28. Rak JW, Mitsuhashi Y, Sheehan C. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential mode of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* (2000) 60: 490-8.
29. Okada F, Rak JW, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: Mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95: 3609-14.
30. Van Meir EG, Poverini PJ, et al. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild-type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* (1994) 8: 171-6.
31. Sullivan DC, Bicknell R. New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer* (2003) 89:228-231.
32. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The Int J Biochem Cell Biol* (2001) 33: 357-369.
33. Rahman MA Toi M. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed Pharmacoth* (2003) 57: 463-470.
34. Morabito A, Sarmiento R, Bonginelli P, et al. Antiangiogenic strategies, compounds and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev in Oncology/Hematology* (2004) 49: 91-107.
35. Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* (2000) 34: 89-100.
36. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* (1998) 279: 377-380.

37. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* (1997) 3: 437-442.
38. Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, et al. Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* (1999) 59:895-900.
39. Kakeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs* (1997) 15: 39-48.
40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* (1996) 32A(14): 2413-2422.
41. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* (1999) 9:211-220.
42. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, et al. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2002) 8: 2253-2259.
43. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* (1995) 146: 1029-1039.
44. Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Pharm Exp Biol* (2003) 306:
45. Huang K, Andersson C, Roomans GM, et al. *Int J Biochem Cell Biol* (2001) 33: 315-324.
46. Ornitz DM, Itoh N. Protein family review: Fibroblast growth factors. *Genome Biology* (2001) 2(3): 3005.1-3005.12.
47. Shibata F, Baird RZ, Florkiewicz RZ. Functional characterization of the human fibroblast growth factor gene promoter. *Growth factors* (1991) 4: 277-287.
48. Florkiewicz RZ, Sommer A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1989) 86: 3978-3981.
49. Prats A, Kaghad M, Prats AC et al. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1989) 86: 1836-1840.
50. Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, et al. A new 34kd isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* (1999) 19: 505-514.
51. Smallwood PM, Munoz-sanjuan I, Tong P, et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93: 9850-9857.

52. Yamamoto S, Mikami T, Ohbayashi N, et al. Structure and expression of a novel isoform of mouse FGF homologous factor (FHF)-4. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1398: 38-41.
53. Munoz-Sanjuan I, Smallwood PM, Nathans J. Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem* (2000) 275: 2589-2597.
54. Wang Q, McEwen DG, Ornitz DM. Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14. *Mech Dev* (2000) 90: 283-287.
55. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* (2000) 7:165 –197.
56. Nugent MA, Iozzo RV. Molecules in focus: Fibroblast growth factor-2. *The Int J Biochem Cell Biol* (2000) 32: 115-120.
57. Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, Fantl V. Tyrosine Kinase signaling in breast cancer. Fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res* (2000) 2: 191-196.
58. Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* (2003) 314: 157-166.
59. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* (2000) 34: 185-194.
60. Coleman AB. Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2. *Drug Resist updates* (2003) 6: 85-94.
61. Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* (2002) 8: 483-488.
62. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* (2001) 4: 201-207.
63. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* (1998) 141: 1659-1673.
64. Montesano R, Vassali JD, Baird A, et al. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 83: 7297-7301.
65. Karsan A, Yee E, Poirier GG, et al. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2 dependent and independent mechanisms. *Am J Pathol* (1997) 151: 1775-1884.
66. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* (1992) 267: 10931–10934.
67. Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* (1991) 51: 6180-6184.

68. Ueno H, Li JJ, Masuda S, et al. Adenovirus-mediated expression of the secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1997) 17: 2453-2460.
69. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, et al. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95: 5672-5677.
70. Yamamoto M, Sakakibara Y, Nishimura K, et al. Improved therapeutic efficacy in cardiomyocyte transplantation for myocardial infarction with release system of basic fibroblast growth factor. *Artif Organs* (2003) 27: 181-184.
71. Horwath KA, Doukas J, Lu CY, et al. Myocardial functional recovery after fibroblast growth factor 2 gene therapy as assessed by echocardiography and magnetic resonance imaging. *Ann Thorac Surg* (2002) 74: 481-486.
72. Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, et al. Delivery of FGF2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flat ischemia. *Gene Ther* (2001) 8: 523-533.
73. Levin EG, Sikora L, Ding L, et al. Suppression of Tumor Growth and Angiogenesis *in Vivo* by a Truncated Form of 24-kd Fibroblast Growth Factor (FGF)-2. *Am J Pathol* (2004) 4: 1183-1190.
74. Benson JR. Role of transforming growth factor β in breast carcinogenesis. *The Lancet Oncol* (2004) 5: 229-239.
75. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *The New Engl J Med* (2000) 342: 1350-1358.
76. Massague J, Cheifetz S, Laiho M, et al. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* (1992) 12: 81-103.
77. Massague J, Attisano L, Wrana J. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* (1994) 4: 172-178.
78. Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* (1998) 67: 753-791.
79. Franzen P, Ten Dijke P, Ichijo H, et al. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF-beta type II receptor. *Cell* (1993) 75: 681-692.
80. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, et al. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* (1992) 68: 775-785.
81. Laiho M, Weiss MB, Massague J. Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-beta receptor types I and II in TGF-beta-resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction. *J Biol Chem* (1990) 265: 18518-18524.

82. Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, et al. Molecular mechanisms of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytok Growth Factor Rev* (2000) 11: 159-168.
83. Hata A, Shi Y, Massague J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* (1998) 4: 257-262.
84. Massague J, Wotton J. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *The EMBO J* (2000) 19: 1745-1754.
85. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer S. Development of TGF- β signaling inhibitors for cancer therapy. *Nature Rev Drug Discov* (2004) 3: 1011-1022.
86. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* (1994) 266: 1821-8.
87. Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, et al. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res* (1986) 46: 2068-71.
88. Bascom CC, Wolfshohl JR, Coffey RJ, et al. Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Mol Cell Biol* (1989) 9: 5508-15.
89. De Visser KE, Kast WM. Effects of TGF- β on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia* (1999) 13: 1188-1199.
90. Kim JW, Kim HS, Kim IK, et al. Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis through down-regulation of c-myc gene and overexpression of p27^{kip1} protein in cervical carcinoma. *Gyn Oncol* (1998) 69:230-236.
91. Hazelbag S, Gorter A, Kenter GG, et al. Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol* (2002) 33: 1193-1199.
92. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* (1998) 24: 111-119.
93. Tang B, Vu M, Booker T, et al. TGF- β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *The J Clin Invest* (2003) 112: 1116-1124.
94. Wakefield LM, Pick E, Bottinger E. TGF- β signaling in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2001) 6: 67-81.
95. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor- β in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100: 8621-8623.
96. Ravitz MJ, Wenner CE. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF- β . *Adv Cancer Res* (1997) 71:165- 207.
97. Thiery JP. Epithelial-Mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* (2002) 2:442-454.

98. Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, et al. Role of transforming growth factor-*b* 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* (1999) 17:607-14.
99. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, et al. Defective hematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-*b* 1 knock out mice. *Development* (1995) 121: 1845-54.
100. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-*b* receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* (1996) 179: 297-302.
101. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* (1995) 1: 1623-34.
102. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-*b* 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* (1992) 359: 693-9.
103. Norgaard P, Hougaard S, Poulsen HS, et al. Transforming growth factor *b* and cancer. *Cancer Treat Rev* (1995) 21: 367-403.
104. Σπαντίδος ΔΑ. Μοριακή Ογκολογία. Αρχές-Μοριακά και κλινικά στοιχεία. Εκδ. Λυχνία, Αθήνα 2000.
105. Giordano SH, Hortobaghi GN. Inflammatory breast cancer. Clinical progress and the main problems that must be addressed. *Breast Cancer Res* (2003) 5: 284- 288.
106. Polyak K. On the birth of breast cancer. Review. *Biochim Biophys Acta* (2001) 1552: 1-13.
107. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. *The New Engl J Med* (2004) 350: 1430-1441.
108. Pinder SE, Ellis IO. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease. Ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)-current definitions and classification. *Breast Cancer Res* (2003) 5: 254-257.
109. Devilee P, Schuurin E, et al. Recent developments in the molecular genetic understanding of breast cancer. *Crit Rev Oncog* (1994) 5(2-3): 247-70.
110. Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of microenvironment. *Breast Cancer Res* (2003) 5 (3): 140-146.
111. Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* (1978) 41: 239-244.
112. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (1992) 84: 1875-1887.

113. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* (1993) 55: 371–374.
114. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, et al. Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* (1997) 181: 207-212.
115. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* (1995) 13: 765-782.
116. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, et al. p53 and vascular endothelial growth factor expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* (2000) 89: 51-62.
117. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (1992) 84: 1875–87.
118. Hork ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* (1992) 340: 1120–1124.
119. Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* (1995) 36: 193–204.
120. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, et al. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* (2002) 55: 429–434.
121. Locopo N, Fanelli M, Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (1998) 52: 159-173.
122. Arciero C, Somiari SB, Shriver CD, et al. Functional relationship and gene ontology classification of breast cancer biomarkers. *The Int J Biol Markers* (2003) 18: 241-272.
123. Brown LF, Guidi AJ, Schmitt SJ, et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* (1999) 5: 1041-1056.
124. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* (1989) 246: 1306-1309.
125. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* (1997) 18: 4-25.
126. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Biol Chem* (1989) 264: 20017-20024.
127. Price DJ, Miralem T, Jiang S, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cell invasion and signaling in breast cancer. *Cell Growth Differ* (2001) 12: 129-135.

128. Yoghiji H, Gomez DE, Shibuya M. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* (1996) 56: 2013-1016.
129. Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, et al. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (1999) 53: 161-166.
130. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* (2000) 5: 37-44.
131. Ludovini V, Sidoni A, Pistola A, et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2003) 81: 159-68.
132. Howard EM, Lau SK, Lyles RH, et al. Correlation and expression of p53, HER-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), and e-cadherin in a high-risk breast-cancer population. *Int J Clin Oncol* (2004) 9: 154-60.
133. Toi M, Inada K, Suzuki H, et al. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* (1995) 36: 193-204.
134. Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, et al. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2003) 82: 147-54.
135. Scott PA, Smith K, Poulson R, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E. *Br J Cancer* (1998) 77: 2120-8.
136. Kim SW, Park SS, Ahn SJ, et al. Identification of angiogenesis in primary breast carcinoma according to the image analysis. *Breast Cancer Res Treat* (2002) 74: 121-9.
137. Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, et al. Tissue microarray study for classification of breast tumors. *Life Sci* (2003) 73: 3189-99.
138. Gomez-Esquer F, Agudo D, Martinez-Arribas F, et al. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer Res* (2004) 24: 1581-1585.
139. Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, et al. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the patient angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* (1985) 45: 1611-1620.
140. Scott RAE, Gleadle JM, Bicknell R, et al. Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* (1998) 75: 706-12.
141. Kumar R, Yarmand-Bagheri R. The role of HER-2 in angiogenesis. *Semin Oncol* (2001) 28: 27-32.

142. Donovan D, Harmey JH, Toomey D, et al. TGF beta-1 regulation of VEGF production by breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* (1997) 4: 621-627.
143. Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relation between matrix metalloprotease expression and tumor angiogenesis in human breast carcinoma. *Oncol Rep* (1998) 5: 673-677.
144. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, et al. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* (2002) 2: 311-315.
145. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 90: 977-981 (1999).
146. Salven P, Lymboussaki A, Heikkial P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Path* (1998) 153: 103-108.
147. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* (2001) 61: 1786-1790.
148. Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2001) 66: 159-164.
149. Plate K. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Med* (2001) 7: 151-152.
150. Hendrix MJ, Seflor EA, Kirschmann DA, et al. Molecular biology of breast cancer metastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. *Breast Cancer Res* (2000) 2: 417-422.
151. Penault-Liorca F, Bertucci F, Adelaide J, et al. Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer* (1995) 61: 170-176.
152. Smith K, Fox SB, Whitehouse R, et al. Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* (1999) 10: 707-13.
153. Relf M, LeJeune S, Scott PA, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* (1997) 57: 963-9.
154. Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, et al. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer* (1997) 76: 238-243.
155. Anandappa SY, Winstanley JH, Leinster S, et al. Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* (1994) 69: 772-6.

156. Luqmani YA, Graham M, Coombes MC. Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues. *Br J Cancer* (1992) 66: 273-80.
157. Yiangou C, Gomm JJ, Coope RC, et al. Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance. *Br J Cancer* (1997) 75: 28-33.
158. Colomer R, Aparicio J, Montero S, et al. Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br J Cancer* (1997) 76: 1215-20.
159. Linder C, Bystom P, Engel G, et al. Correlation between basic fibroblast growth factor immunostaining of stromal cells and stromelysin-3 mRNA expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer* (1998) 77: 941-945.
160. Wakefield LM, Yang YA, Dukhanina O. Transforming growth factor- β and breast cancer. Lessons learned from genetically altered mouse models. *Breast Cancer Res* (2000) 2: 100-106.
161. Hosobuchi M, Stamfler MR. Effects of transforming growth factor- β on growth of human mammary epithelial cells in culture. *In vitro Cell Dev Biol* (1989) 25: 705-713.
162. Daniel CW, Silberstein GB, Van Horn K, et al. TGF- β 1 induced inhibition of mouse mammary ductal growth: developmental specificity and characterization. *Dev Biol* (1989) 135: 20-30.
163. Teicher BA. Malignant cells, directors of the malignant process: Role of the transforming growth factor- β . *Cancer Metastasis Rev* (2003) 20: 133-143.
164. Reiss M, Barcellos-Hoff MH. Transforming growth factor- β in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* (1997) 45: 81-95.
165. Gobbi H, DuPont WD, Simpson JF, et al. Relationship between TGF- β type II receptor expression and breast cancer risk in women with epithelial hyperplasia lacking atypia. *J Natl Cancer Inst* (1999) 91: 2096-2101.
166. Koli KM, Arteaga CL. Complex role of tumor cell transforming growth factor (TGF)- β s on breast cancer progression. *J Mamm Gl Biol Neoplasia* (1996) 1: 373-380.
167. Gobbi H, et al. Loss of expression of transforming growth factor- β type II receptor correlates with high tumor grade in human breast in situ and invasive carcinomas. *Histopathology* (2000) 36: 168-177.
168. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor- β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* (1993) 143: 381-389.
169. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor- β 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* (1992) 28: 641-644.

170. Gorsch SM, Memoli VA, Stuckel TA, et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor- β 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* (1992) 52: 6949-6952.
171. Kong FM, et al. Elevated plasma transforming growth factor- β 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* (1995) 222: 155-162.
172. Reid BL. The causation of cervical cancer. *Clinics Ob-Gyn* (1985) 12: 1.
173. Rusell JM, Blair V, Hunter RD. Cervical carcinoma. *Br Med J* (1987) 295: 300.
174. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. *The New Engl J Med* (1996) 334: 1030-1038.
175. Sherbert GV, Patil D. Genetic abnormalities of cell proliferation, invasion and metastasis, with special reference to gynaecological cancers. *Anticancer Res* (2003) 23: 1357-1372.
176. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol* (1999) 72: 220-31.
177. Tokumo K, Kodama J, Seki N, et al. Different angiogenic pathways in human cervical cancers. *Gynecol Oncol* (1998) 68: 38-44.
178. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, et al. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* (1995) 86: 479-85.
179. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* (1997) 177: 541-7.
180. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, et al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* (1997) 16: 256-62.
181. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* (1995) 147: 33-41.
182. Ishiwata I, Ishiwata C, Soma M, et al. Tumor angiogenic activity of gynecologic tumor cell lines on the chorioallantoic membrane. *Gynecol Oncol* (1988) 29: 87-93.
183. Stafil A, Mattingly RF. Angiogenesis of cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* (1975) 126: 845-852.
184. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* (1994) 54: 800-4.
185. Leung KM, Chan WY, Hui PK. Invasive squamous cell carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia III of uterine cervix. *Am J Clin Pathol* (1994) 101: 508-513.

186. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in squamous cell carcinoma in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* (1995) 88: 927–933.
187. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* (1995) 56: 353–356.
188. Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* (1995) 14: 114–118.
189. Kainz C, Speiser P, Wanner C, et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix Stage IB to IIB. *Anticancer Res* (1995) 15: 1549–1551.
190. Schlenger K, Hockel M, Mitze M, Schaffner U, Weikel W, Knapstein PG, Lambert A: Tumor vascularity: A novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* (1995) 59:57–66.
191. Dellas A, Moch H, Schultheiss E, et al. Angiogenesis in cervical neoplasia: Microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* (1997) 67:27–33.
192. Guidi AG, Abu-Jawdeh G, Berse B, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* (1995) 87: 1237-45.
193. Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* (2000) 83: 620-5.
194. Lee IJ, Park KR, Lee KK, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2002) 54: 768-79.
195. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, et al. Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* (1999) 93: 761-5.
196. Cheng WF, Chen CA, Lee CN, et al. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* (2000) 96: 721-6.
197. Tjalma W, Weyler J, Weyn B, et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2000) 92: 251-7.
198. Obermair A, Bancher-Todesca D, Bilgi S, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* (1997) 89: 1212-7.
199. Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, et al. Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced uterine cervical cancers. *Cancer Lett* (1997) 111: 21-6.
200. El -Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, D.Jenkins. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive

- cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol* (2000) 192: 494-501.
201. Comerci JT, Runowicz CD, Flanders KC, De Victoria C, et al. Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix. *Cancer* (1996) 77: 1107-14.
 202. Xu XC, Mitchell MF, Silva E, et al. Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* (1999) 5: 1503-8.
 203. Tervahauta A, Syrjanen S, Yliskoski M, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in human papillomavirus (HPV)-associated lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* (1994) 54: 349-56.
 204. El -Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry. *J Pathol* (2000) 192: 494-501.
 205. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* (1998) 113: 183-9.
 206. Hazelbag S, Fleuren GJ, Baelde JJ, et al. Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* (2001) 83: 235-43.
 207. Farley J, Gray K, Nycum L, Prentice M, et al. Endocervical cancer is associated with an increase in the ligands and receptors for transforming growth factor-beta and a contrasting decrease in p27(Kip1). *Gynecol Oncol* (2000) 78: 113-22.
 208. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* (1995) 26: 86-91.
 209. Ludovini V, Sidoni A, Pistola L, et al. Evaluation of the prognostic role of vascular endothelial growth factor and microvessel density in stages I and II breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2003) 81: 159-68.
 210. Howard EM, Lau SK, Lyles RH, et al. Correlation and expression of p53, HER-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), and e-cadherin in a high-risk breast-cancer population. *Int J Clin Oncol* (2004) 9: 154-60.
 211. Coradini D, Boracchi P, Daidone MG, et al. Contribution of vascular endothelial growth factor to the Nottingham prognostic index in node negative breast cancer. *Br J Cancer* (2001) 85: 795-797.
 212. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henrikson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative Breast carcinoma. *J Clin Oncol* (1998) 16: 3121-3128.

213. Gasparini G, Toi M, Gion M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (1997) 89: 139-147.
214. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define High- and Low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* (1998) 16: 3129-3136.
215. Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, et al. Tissue microarray study for classification of breast tumors. *Life Sci* (2003) 73: 3189-99.
216. Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, Emdin S, et al. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2003) 82: 147-54.
217. Gomez-Esquer F, Agudo D, Martinez-Arribas F, et al. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer Res* (2004) 24: 1581-5.
218. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, et al. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2002) 8: 2253-9.
219. Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, Fantl V. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res* (2000) 2: 191-6.
220. Gobbi H, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β) and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl Cancer Inst* (1999) 91: 2096-2101.
221. Smith K, Fox SB, Whitehouse R, et al. Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* (1999) 10: 707-713.
222. Buck MB, Fritz P, Dippon J, et al. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* (2004) 15: 491-8.
223. Matsuda T, Yamamoto T, Muraguchi A, Saatcioglu F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. *J Biol Chem* (2001) 276: 42908-14.
224. Benson JR, Colletta AA. Transforming growth factor β -prospect for cancer prevention and treatment. *Clin Immunother* (1995) 4: 249-58.
225. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, et al. Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* (1987) 50: 417-28.
226. Kodama J, Seki N, Tokumo K, et al. Vascular endothelial growth Factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur Journal of Cancer* (1999) 35(3): 485-489.

227. Van Trappen PO, Ryan A, Carroll M, et al. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer. *Br J Cancer* (2002) 87: 537-44.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters xx (2004) 1–14

CANCER
Letterswww.elsevier.com/locate/canlet

VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix

Giannoula Soufla^a, Stavros Sifakis^b, Stavroula Baritaki^a, Alexandros Zafiropoulos^a,
Eugenios Koumantakis^b, Demetrios A. Spandidos^{a,*}

^aLaboratory of Virology, Medical School, University of Crete, P.O. Box 1527, Heraklion, 710 03 Crete, Greece

^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Received 17 May 2004; received in revised form 15 August 2004; accepted 20 August 2004

Abstract

Angiogenesis is a complex procedure induced by the secretion of numerous growth factors from endothelial cells. Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblastic growth factor (FGF2), transforming growth factor- β 1, 2, 3 (TGFB1, 2, 3), and transforming growth factor- β receptors (TGFBR1, 2, 3) mRNA expression pattern was evaluated in tissue samples with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer, compared to that of normal cervical tissues, and correlated to the clinical stage of the disease. Transcript levels of the above genes were assessed by RT-PCR analysis in a total of 44 cervical specimens. VEGF, TGFB1, TGFBR1, and FGF2 transcript levels were significantly different in the normal, CIN and cancer specimen groups ($P=0.015$, 0.001 , 0.008 , and 0.029 , respectively). Higher TGFBR1 mRNA levels were observed in parallel with increased severity of the lesion, whereas FGF2 exhibited lower transcript levels. A highly significant increase of VEGF mRNA expression was found upon cervical neoplastic transformation ($P<0.0001$). High-grade squamous intraepithelial lesions exhibited higher VEGF mRNA levels than low-grade lesions ($P=0.039$). TGFBR1 and TGFBR3 receptors demonstrated significant co-expressions with TGFB2 ($P<0.0001$), and TGFB1 ($P=0.005$ and 0.002 , respectively) in normal cervical specimens. However, a disruption of co-expression patterns was observed in the groups of CIN and cancer cases, compared to normal tissues. Our findings show that VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. The involvement of the examined markers in cervical carcinogenesis is furthermore supported by the observed disruption of their mRNA co-expression patterns.

© 2004 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Angiogenesis; mRNA Expression; RT-PCR; Cervical cancer; Cervical intraepithelial neoplasia

1. Introduction

Angiogenesis is an important event during the neoplastic process. This complex procedure, also known as neovascularization is essential for tissue development, wound healing and reproduction [1] and

* Corresponding author. Tel.: +30 28 10 394631; fax: +30 2810 394759.

E-mail address: spandidos@spandidos.gr (D.A. Spandidos).

is an indispensable requirement for tumor progression, invasiveness and metastasis [2]. Tumor cells as well as certain stromal cells such as macrophages, mast cells and fibroblasts are known to secrete a large number of growth factors that activate neovascularization. However, the balance between angiogenic enhancers and endogenous inhibitors adjusts the angiogenic switch [3–5].

Tumor angiogenesis has been described in almost all human cancer types comprising malignancies of the female genital tract [6–13]. Numerous growth factors and cytokines are involved in the angiogenic process that accompanies cervical carcinogenesis. Among these factors VEGF has a predominant role acting as an endothelial cell specific mitogen [3–5], stimulating cell proliferation and increasing vascular permeability. Elevated VEGF expression at advanced stages of the disease has been reported in various cancer types including breast, endometrial, ovarian, bladder, and lung cancer [14–21] and has also been associated with high-grade intraepithelial lesions and cervical cancer [22–27]. VEGF protein level has been found to be correlated with local tumor progression, metastasis and poor prognosis in the uterine cervix, based on immunohistochemical or enzyme immunoassay studies [23–26]. However, other reports provided evidence suggesting that VEGF does not have a prognostic value [27].

Basic Fibroblast Growth factor (FGF2) takes part in various steps of the neovascularization process by promoting angioblast differentiation, cell growth and invasion. Secretion of FGF2 has been described in both tumor and infiltrating inflammatory cells (macrophages). When secreted from tumor cells, FGF2 is responsible for basement membrane dissolution, migration and metastasis of malignant endothelial cells [3–5]. Its role has been described in highly metastatic prostate cells, uterine endometrial cancer, pancreatic and hepatocellular carcinoma [28–31]. Advanced primary cervical cancers have been demonstrated to express high FGF2 mRNA levels [32].

Transforming growth factor beta (TGFB) is a growth modulator involved in angiogenesis, cell proliferation, differentiation, adhesion and migration [33–37]. TGFB has been proved to substantially inhibit cell growth in normal epithelial cells and human keratinocytes *in vivo* and *in vitro* [38,39],

inducing in parallel its own mRNA expression (autocrine cell growth regulation). TGFB's growth inhibitory effects are attributed to its ability to arrest cells in the G1 phase of the cell cycle [37,39]. It has been shown to inhibit T and B cell function as well as secretion of immunostimulatory cytokines, leading to immune response deficiency and tumor growth. TGFB promotes, via a paracrine action, tumor stroma formation and decreases tumor infiltration providing tumor cells an alternative escape mechanism from the immune response [40]. Five isoforms of TGFB have been identified so far but only three (TGFB1, B2, B3) are expressed in mammalian cells. TGFB1 is the most well characterized isoform to date and along with TGFB3 exhibits stronger inhibitory effects than TGFB2. Reduced expression of TGFB or loss of response to its inhibitory effects has been linked to cell hyperproliferation and tumor progression. Cell function regulation by TGFB arises from his interaction with cell surface receptors (TGFB1, 2, 3) [33–36]. Immunohistochemical studies report either decreased or increased TGFB1 levels during the neoplastic transformation of cervical epithelium, [41–43], while RT-PCR analyses indicate variations in TGFB1 transcript levels among CIN and normal cervical specimens [44–46]. Elevated levels of TGFB ligands and receptors have been demonstrated in cervical adenocarcinomas [47].

Induction of the angiogenic switch in several cancer types has been mainly associated with VEGF and FGF2 upregulation, while TGFB has been recognized as a growth inhibitor [4,5]. However, the mRNA expression pattern of a panel/group of angiogenic growth factors and receptors has not been investigated in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer, and their role regarding the neovascularization process in cervical carcinogenesis is poorly understood. In order to investigate the significance of angiogenic markers in malignant transformation of the uterine cervix, we evaluated the combined mRNA expression of VEGF, FGF2, TGFB1, TGFB2, TGFB3 and TGFB1, TGFB2, TGFB3 in tissue samples with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Furthermore, we examined whether the mRNA expression profile of these genes is correlated with the clinical stage of the disease.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

A total of 44 individuals who underwent surgical treatment due to cervical disease or non-proliferate diseases of the female reproductive system at the Department of Obstetrics and Gynecology of University Hospital of Heraklion, Crete, from 2002 to 2003 were included in this study. Tissue specimens were obtained at the time of the surgical procedure. Half of the sample was snap frozen and stored at -80°C until required for RNA extraction. The other half was fixed in 10% formaldehyde solution for histopathological examination.

Histological cell types of the tumors and intra-epithelial lesions were assigned according to the WHO classification: nine patients had cervical carcinoma (eight squamous cell carcinoma, one adenocarcinoma), and 14 patients had CIN. Twenty-one individuals who underwent surgery (transabdominal or transvaginal hysterectomy) for a variety of therapeutic reasons had histologically normal cervix and consisted our control group. Thirteen women were in the reproductive period, 16 were perimenopausal and 15 were in menopause. Staging was reviewed based on International Federation of Obstetrics and Gynaecology (FIGO) staging system; amongst patients with squamous cell carcinoma two were IA, one IB, four IIB, and two were of stage III. In addition five specimens were CIN I, three CIN II, and six CIN III. Table 1 summarizes the patients' clinical characteristics. Age distribution of the patients was similar in the groups of normal, CIN and cancer cases. The mean age at the time of treatment was 52 years and the median age was 50 years (range, 32–82 years). Tissue biopsies had been previously received from all the patients with cancer to establish the diagnosis, but none of them had undergone any radiotherapeutic or chemotherapeutic treatment prior to radical hysterectomy and tissue biopsies for the present study. Patients with CIN had not received any previous treatment, neither surgical nor laser vaporization. Patients of the normal cervical tissue group had not undergone any surgical treatment of the cervix. Ethics Committee of the University of Crete approved the present study, and all participating patients gave written informed consent.

2.2. RNA extraction

Total RNA was extracted from each specimen using the Trizol reagent (Invitrogen Ltd, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 ml of reagent was added to each tissue specimen (50–100 mg of tissue), which was then homogenized using a power homogenizer and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube. Chloroform (200 μl) was added, and the tube was vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. RNA was precipitated with an equal volume of isopropanol, washed with 75% ethanol, and resuspended in DEPC treated water. RNA concentration and purity was determined on a UV spectrophotometer (Hitachi Instruments Inc., USA) by absorbance measurements. RNA integrity was examined by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

2.3. RT-PCR

Reverse transcription reactions for the preparation of first strand cDNA were conducted using the ThermoScript RT-PCR Kit (Invitrogen Ltd., UK) according to the manufacturer's protocol.

Transcribed products were subjected to PCR for the target of interest in a PTC-200 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA). 1 μl of cDNA was amplified in a total volume of 10 μl containing, 1 \times PCR reaction buffer, 2 mM MgCl_2 , 0.8 mM dNTPs, and 0.65 U Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Ltd., UK). The sequences of all primer pairs used are listed in Table 2. All primer pairs were designed to span at least one intron in order to avoid amplification of

Table 1
Clinical characteristics of the patients

	Controls	CIN			Cancer	
		I	II	III	Squamous cell carcinoma	Adenocarcinoma
Patients number	21	5	3	6	IA 2 IB 1 IIB 4 III 1	IB 1

Table 2

Oligonucleotide primer sequences, primer quantities and PCR cycling conditions of each primer pair with Beta 2-microglobulin as an internal control in each reaction

Primer set	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Primer quantities (pmol) [B2M]	Primer annealing temperature (°C)	Amplification cycles	Product size (bp)
VEGF	(F): GCAGAAGGAGGAGGGCA-GAATC (R): ACACTCCAGGCCCTCGTCATT	9 [1]	62	33	197
FGF2	(F): GAAGAGCGACCCTCACAT-CAAG, (R): CTGCCCAGTTCGTTTCAGTG	12 [1]	58	35	236
TGFB1	(F): ACCAACTATTGCTTCAGCTC (R): TTATGCTGGTTGTACAGG	12 [1,5]	55	35	198
TGFB2	(F): CTGTCCCTGCTGCACTTTTGT (R): TCTTCCGCCGGTTGGTCTGTT	12 [1,5]	58	35	227
TGFB3	(F): CCTTTCAGCCCAATGGAGAT (R): ACACAGCAGTTCTCCTCCAA	30 [1,5]	57	35	241
TGFBR1	(F): TCGTCTGCATCTCACTCAT (R): GATAAATCTCTGCCTCACG	20 [1,5]	54	35	344
TGFBR2	(F): GCGGGAGCACCCCTGTGTC (R): CCCGAGAGCCTGTCCA-GATGC	12 [1]	62	35	216
TGFBR3	(F): AATCTGGGCCATGATGCAG (R): ACTGCTGTTTCCGAGGCT	10 [10] ^a	57	35	287
β -actin	(F): AGCCTCGCCTTTGCCGA (R): CTGGTGCCTGGGGCG				175
β 2 microglobulin (B2M)	(F): AGCGTACTCCAAAGATT-CAGGTT (R): TACATGTCTCGATCCCACT-TAACTAT				297

^a Amplification of β -actin RNA was used as an internal control in this case.

contaminating genomic DNA along with cDNA. In the amplification reactions for each specific RNA primer set, RNA primers for β 2-microglobulin (B2M) were included as an internal control in all PCR reactions. The corresponding quantities of each specific primer set in the PCR reactions are summarized in Table 2.

PCR products were analysed on 8.5% polyacrylamide gels (acrylamide/bis-acrylamide 29:1 ratio) and silver stained. Gels were scanned on an Agfa SnapScan 1212u (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). Integrated density of the bands was used as quantitative parameter and was calculated by digital image analysis (Scion image). The intensity of β 2-microglobulin amplification was used as an internal standard. The ratio of the integrated density of each gene tested to that of β 2-microglobulin was used to quantify the results. Present analyses conducted on pathological samples may be a manifestation of

RNA profiles of endothelial and stromal components.

2.4. Statistical analysis

VEGF, FGF2, TGFB1, 2, 3 and TGFBR1, 2, 3 mRNA expression was compared between the groups of different clinical stages. Three different specimen groupings were applicable: one concerning general condition of the cervix (normal, CIN, cancer), another regarding the grade of cervical intraepithelial lesion [normal, low-grade squamous intraepithelial lesions (LG-SIL, corresponding to CIN I), high grade SIL (HG-SIL, corresponding to CIN II, III) and cancer], and finally one taking into consideration the gradual increased severity of neoplasias (normal tissue, CIN I, II, III, CA). Non-parametric procedures (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney test) were applied to the set of data for the evaluation of significant statistical

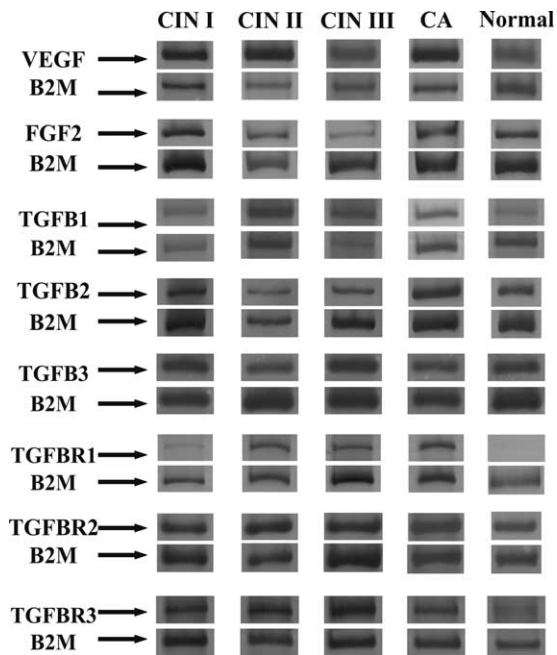


Fig. 1. Representative examples of VEGF, FGF2, TGFB1, 2, 3 and TGFBR1, 2, 3 expression in cervical tissue. Ratio: integrated density of the band of each gene divided by the integrated density of the internal standard band (β 2-microglobulin or β -actin).

differences. Age distribution was assessed similarly. Data is presented as the mean and standard error of the mean value (mean \pm SEM). The Spearman's rank correlation was used to evaluate the significance of the mRNA of the growth factor co-expression pair wise, in the groups of normal, CIN lesion and cancer tissues. Probability values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical calculations were performed using the SPSS software, version 11.

3. Results

We evaluated the mRNA expression profile of VEGF, FGF2, TGFB1, 2, 3 and TGFBR1, 2, 3 (Fig. 1) in a total of 44 cervical tissue specimens. Twenty-one specimens were normal cervical tissues from hysterectomies performed for non-malignant conditions (48%), 14 were CIN lesions (32%), eight were squamous cell carcinomas and one was an adenocarcinoma (20%). CIN lesions were of grade I (five cases), II (three cases), and III (six cases).

3.1. Transcript levels of growth factors and receptors

Our findings indicate that VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression is significantly related to the condition of the cervix (normal, CIN, cancer) ($P=0.015$, 0.001 , 0.008 and 0.029 , respectively, Kruskal–Wallis test) (Fig. 2A). Higher TGFBR1 mRNA levels were observed in parallel with increased severity of the lesion, whereas FGF2 exhibited lower transcript levels. Specifically VEGF and TGFBR1 mRNA expression in cancer specimens was significantly elevated compared to normal tissues ($P=0.002$, 0.02 , respectively, Mann–Whitney test), whereas FGF2 expression was considerably decreased ($P<0.001$). Significant difference in mRNA expression between CIN and normal specimens was observed only for FGF2 and TGFB1 ($P=0.012$ and 0.008 , respectively). No correlation was established between TGFB2, TGFBR2, TGFB3 or TGFBR3 mRNA expression with the grade of the intraepithelial lesion or cervix condition (normal, CIN, cancer), whereas we observed relatively lower expression levels of these genes compared to VEGF.

Transcript levels of VEGF, FGF2, and TGFB1 were significantly different in the groups of normal, LG-SIL, HG-SIL and cancer specimens. ($P=0.001$, 0.002 , and 0.020 , respectively, Kruskal–Wallis test) (Table 3). TGFBR1 transcript levels exhibited a marginal difference in the above groups ($P=0.06$). Pair wise analysis revealed higher mRNA expression levels of VEGF in HG-SIL than LG-SIL ($P=0.001$ 2-tailed Mann–Whitney test). FGF2 transcript levels in high-grade lesions (HG-SIL) and in cancer specimens were significantly lower than in normal tissues ($P=0.028$ and $P<0.0001$, respectively). The highest mRNA expression levels of TGFB1 and TGFBR1 were observed in high-grade intraepithelial lesions and cancer tissues respectively.

Grouping of cervical specimens in respect of increasing severity of neoplasias (normal tissue, CIN I, II, III, CA) revealed considerable differences in VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 transcript levels in the above groups ($P<0.0001$, $P=0.001$, 0.030 and 0.025 , respectively Kruskal–Wallis test) (Fig. 2B). The highest transcript levels of VEGF were observed in CIN III lesions (10.78 ± 5.63) and they were significantly elevated compared to CIN I and II specimens group ($P=0.001$ Mann–Whitney test), but

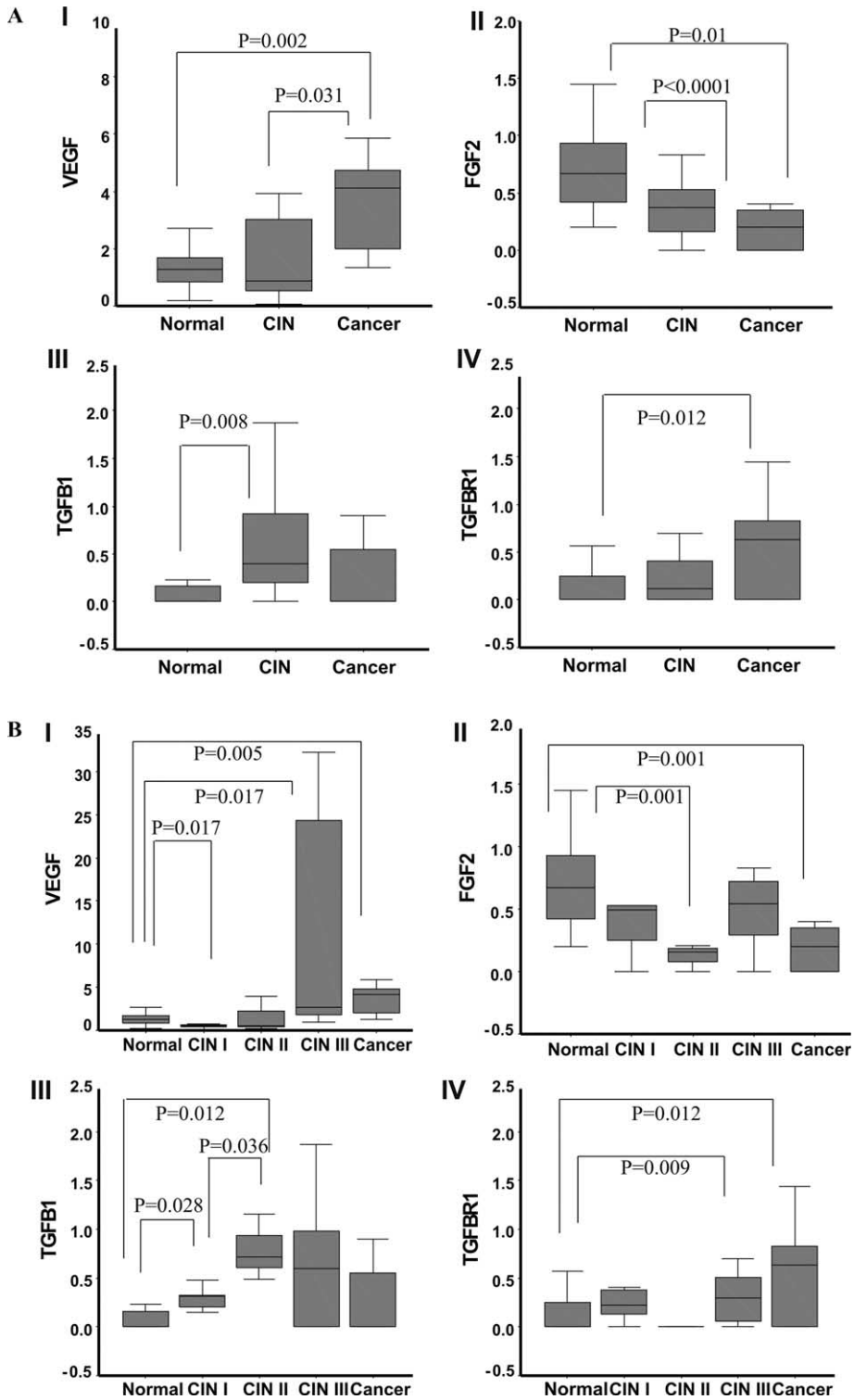


Table 3
mRNA expression in normal, low-grade SIL (CIN I), high-grade SIL(CIN II <III) and cervical cancer specimens

	Controls	Low-grade SIL	High-grade SIL	Cancer	<i>P</i> value ^a
VEGF/B2M	1.51 ± 0.24	0.50 ± 0.12	7.41 ± 3.55	3.54 ± 0.60	0.001
FGF2/ B2M	0.71 ± 0.08	0.36 ± 0.10	0.36 ± 0.09	0.19 ± 0.05	0.002
TGFB1/B2M	0.21 ± 0.11	0.29 ± 0.06	0.73 ± 0.18	0.25 ± 0.13	0.020
TGFB2/B2M	0.20 ± 0.06	0.19 ± 0.11	0.45 ± 0.09	0.35 ± 0.12	NS
TGFB3/B2M	0.37 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.47 ± 0.12	0.44 ± 0.11	NS
TGFBR1/B2M	0.13 ± 0.04	0.23 ± 0.08	0.25 ± 0.09	0.58 ± 1.17	0.06
TGFBR2/B2M	1.17 ± 0.34	0.89 ± 0.18	1.07 ± 0.13	1.49 ± 0.48	NS
TGFBR3/βactin	0.93 ± 0.58	0.73 ± 0.22	0.56 ± 0.14	1.33 ± 1.04	NS

Data are presented as Mean ± SEM (standard error of the mean).

^a Kruskal–Wallis test.

similar to those of cancer specimens. FGF2 mRNA expression decreased gradually in CIN I and CIN II lesions compared to normal tissues, whereas CIN III and controls demonstrated similar FGF2 transcript levels. Substantially lower FGF2 mRNA expression levels however, were observed in cervical cancer cases compared to controls ($P=0.012$, Mann–Whitney). On the contrary a significant gradual increase of TGFB1 mRNA expression was demonstrated in CIN I and CIN II lesions, while TGFB1 transcript levels did not differ in the groups of CIN III, cancer cases or controls. Similar TGFBR1 mRNA levels were also found in normal, CIN I and CIN II specimens, although cancer tissues expressed considerably elevated TGFBR1 mRNA levels compared to controls ($P=0.012$).

Our evaluation did not establish any correlation between the mRNA expression of the growth factors and receptors included in the study and patients' age or menopausal status.

3.2. mRNA co-expression analysis pair wise

Spearman correlations for evaluation of VEGF, FGF2, TGFB1, 2, 3 and TGFBR1, 2, 3 co-expression patterns in the groups of normal, CIN and cervical cancer tissue are demonstrated in Tables 4A–4C,

respectively). In normal cervical specimens, we observed strong mRNA co-expression between TGFB1 and the receptors TGFBR1 and TGFBR3 ($P<0.0001$ and $P=0.037$, respectively). TGFB2 mRNA expression was positively correlated with TGFB1 and TGFBR3 ($P=0.044$ and $P<0.0001$). Significant positive correlation ($P=0.037$) was also established between the mRNA of TGFBR1 and TGFBR3. Moreover our findings indicated a strong negative correlation in transcript levels of FGF2 and TGFB1 or TGFB2 ($P=0.001$ and 0.026), as well as the TGFBR1 receptor ($P<0.0001$).

In the group of Cervical Intraepithelial lesions, the mRNA angiogenic profile was different since TGFB1 mRNA expression was no longer correlated with any receptor, but was strongly co-expressed with TGFB3 ($P=0.006$). TGFB2 exhibited mRNA co-expression with TGFBR1, FGF2 and VEGF ($P=0.006$, 0.001 and 0.039 , respectively). TGFBR1 and FGF2 transcript levels were also co-expressed ($P=0.001$).

In the group of cancer specimens the co-expression pattern of the angiogenic factors included in our evaluation was altered comparing both to the normal and the CIN specimen groups. FGF2 mRNA was significantly co-expressed with TGFB1 ($P=0.042$), and TGFBR1 ($P=0.005$). A negative correlation was

Fig. 2. (A) mRNA levels of VEGF (I), FGF2 (II), TGFB1 (III) and TGFBR1 (IV) in normal, CIN and cancer specimens. Relative values of growth factors expression versus β2-microglobulin exhibited significant differences with respect to the severity of the cervical lesion (normal, CIN and cancer specimens) ($P=0.015$, 0.001 , 0.008 and 0.029 Kruskal–Wallis test). Significant differences assessed by Mann–Whitney subgroup analysis pair wise, are shown. (B) mRNA levels of VEGF (I), FGF2 (II), TGFB1 (III) and TGFBR1 (IV) upon malignant transformation of the uterine cervix (normal, CIN I, II, III, cancer). Relative values of growth factors expression versus β2-microglobulin exhibited significant differences with respect to the extent

Table 4A
Spearman correlation ρ and P values in the normal group of patients

		VEGF	FGF2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	-0.121	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.602							
TGFB1	Spearman's rho	0.003	-0.687	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.990	0.001 ^a						
TGFB2	Spearman's rho	-0.066	-0.485	0.443	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.777	0.026 ^b	0.044 ^b					
TGFB3	Spearman's rho	0.127	-0.022	0.108	0.113	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.585	0.925	0.642	0.625				
TGFBR1	Spearman's rho	-0.070	-0.745	0.845	0.362	0.190	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.764	0.000 ^a	0.000 ^a	0.107	0.408			
TGFBR2	Spearman's rho	0.001	0.034	-0.225	0.121	-0.247	-0.399	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.998	0.882	0.327	0.602	0.280	0.073		
TGFBR3	Spearman's rho	-0.210	-0.383	0.458	0.748	0.066	0.514	0.000	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.361	0.087	0.037 ^a	0.000 ^a	0.776	0.017 ^b	0.999	

^a Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

^b Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

observed between VEGF and TGFBR3 mRNA expression ($P=0.019$).

4. Discussion

The induction of the angiogenic process in cytological material derived from female patients

with gynaecologic epithelial neoplasia or cancer has been demonstrated. Among the growth factors implicated in neovascularization, VEGF and FGF have been recognized as the main inducers of the angiogenic switch in human cancers, while other molecules such as members of the TGFB family have been associated with tumor inhibition. Limited information is available on the combined mRNA

Table 4B
Spearman correlation ρ and P values in the CIN lesions group of patients

		VEGF	FGF2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	0.427	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.128							
TGFB1	Spearman's rho	0.185	-0.022	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.527	0.940						
TGFB2	Spearman's rho	0.555	0.775	0.186	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.039 ^a	0.001 ^b	0.524					
TGFB3	Spearman's rho	0.298	0.102	0.696	0.300	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.301	0.728	0.006 ^b	0.297				
TGFBR1	Spearman's rho	0.420	0.796	0.072	0.690	0.002	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.135	0.001 ^b	0.807	0.006 ^b	0.994			
TGFBR2	Spearman's rho	0.004	-0.314	-0.458	-0.051	-0.469	-0.329	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.988	0.274	0.099	0.863	0.091	0.251		
TGFBR3	Spearman's rho	0.209	-0.035	0.253	0.212	-0.113	0.308	0.033	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.474	0.904	0.383	0.466	0.702	0.284	0.911	

^a Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

^b Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Table 4C

Spearman correlation ρ and P values in the cancer group of patients

		VEGF	BFGF	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGFB3
VEGF	Spearman's rho	1.000							
	Sig. (2-tailed)								
FGF2	Spearman's rho	-0.468	1.000						
	Sig. (2-tailed)	0.204							
TGFB1	Spearman's rho	-0.174	0.685	1.000					
	Sig. (2-tailed)	0.654	0.042 ^a						
TGFB2	Spearman's rho	-0.520	0.540	0.579	1.000				
	Sig. (2-tailed)	0.151	0.133	0.102					
TGFB3	Spearman's rho	-0.519	-0.342	-0.275	0.018	1.000			
	Sig. (2-tailed)	0.152	0.368	0.475	0.964				
TGFB1	Spearman's rho	-0.406	0.831	0.248	0.462	-0.309	1.000		
	Sig. (2-tailed)	0.278	0.005 ^b	0.520	0.210	0.418			
TGFB2	Spearman's rho	0.441	-0.383	-0.169	0.114	-0.084	-0.248	1.000	
	Sig. (2-tailed)	0.235	0.309	0.664	0.771	0.829	0.520		
TGFB3	Spearman's rho	-0.752	0.128	0.109	0.420	0.574	-0.051	0.076	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.019 ^a	0.743	0.779	0.261	0.106	0.896	0.847	

^a Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).^b Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

expression levels of a variety of angiogenic growth factors in cervical cancer. Moreover their mRNA co-expression profile in CIN lesions has not yet been reported [48].

We evaluated the combined mRNA expression of VEGF, FGF2, TGFB1, 2, 3 and TGFB1, 2, 3 that are known to be secreted by premalignant and malignant epithelial cells, in tissue specimens with CIN and cervical cancer, as well as in normal cervical tissues. The mRNA expression levels obtained were associated with the clinical stage of the disease followed by assessment of the growth factor mRNA co-expression patterns pair wise.

4.1. Vascular endothelial growth factor

Increased VEGF mRNA levels have been reported in both intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the uterine cervix and have been associated with increased microvessel density, suggesting that VEGF is an important mediator of angiogenesis in CIN lesions and cervical cancer [22,49]. Our results demonstrate an increase of VEGF mRNA expression levels corresponding to the severity of the cervical lesion (CIN or cancer), while expression remained significantly lower in normal cervix. Interestingly, VEGF transcript levels in cancer specimens were

significantly higher compared to CIN lesions. Moreover, substantially higher expression levels of VEGF mRNA were observed in HG-SIL in comparison to LG-SIL. Our findings are consistent with previous immunohistochemical and in situ hybridization studies [22–27] and suggest that VEGF mRNA expression could possibly comprise an indicator of cervical malignant transformation degree. The highest VEGF mRNA levels were encountered in CIN III lesions (10.78 ± 5.63), being significantly elevated compared to CIN I and II specimens, and similar to those of cancer specimens. Our data, in accordance with previous reports [49], support the hypothesis that CIN III may be the actual clinically relevant precursors of invasive cervical cancer, whereas CIN I and II that express significantly less VEGF transcript levels may represent non-aggressive pathologic conditions that do not necessarily progress to cancer.

4.2. Basic fibroblast growth factor (FGF2)

Limited information is available on the significance of FGF2 in cervical disease progression. There are only two reports on FGF2 mRNA levels in cervical cancer and normal cervical tissue by Fujimoto et al. and Van Trappen et al. [32,48], while there are no reports of FGF2 expression in

Cervical Intraepithelial lesions. Both studies found similar levels of FGF2 mRNA in normal cervical tissue and early-stage cervical cancers. Higher FGF2 transcript levels were found in advanced stage cervical cancers compared to normal cervixes but the difference was statistically significant only in Fugimoto's evaluation [32]. Limited number of samples was used in both studies, while no immunohistochemical evaluations of FGF2 expression in cervical tissues have been established so far. We evaluated the FGF2 transcript levels in cervical cancer and in CIN lesions. Our results are indicative of lower FGF2 mRNA levels in CIN and cancer tissues compared to normal cervixes, suggesting that FGF2's role in cervical carcinogenesis is unclear. We can only speculate that FGF2 transcriptional activation may not be a requirement for the first steps of cervical neoplasia development, or even that other pathways may be responsible for the downregulation of its mRNA expression in these systems. This is not surprising since reports on other cancers such as breast cancer also show conflicting results regarding FGF2 levels, indicating increased FGF2 amounts in tumors compared to normal tissues [50,51], in contrast to others that found no difference [52] or lower levels [53–55], failing in this way to implicate its involvement in disease progression. More studies need to be conducted in larger sets of specimens in order to elucidate the exact mechanism by which FGF2 is involved in cervical malignant transformation.

4.3. Transforming growth factor beta

TGFB is involved in many aspects of cellular function by influencing angiogenesis as well as growth inhibition, cell differentiation, migration, and local immune response. According to our data, TGFB1 is kept at basal levels under normal conditions. However, in primary steps of neoplasia transformation (CIN I, II), a gradual intense TGFB1 mRNA expression may occur as indicated by our results. The observed increase was expected by the activation of the growth inhibitory mechanism of TGFB1, as a consequence of abnormal cellular differentiation [3–5]. In advanced stages of neoplasia (CIN III) or cancer, TGFB1 mRNA expression seems to approach normal levels, possibly explained by the need of inhibition of the immunosuppressive action of

TGFB1 overexpression, leading to an effective immune response [56]. Nevertheless most immunohistochemical studies report decreased TGFB1 levels during the neoplastic transformation of cervical epithelium indicating that post-transcriptional mechanisms might regulate TGFB1 protein levels in these systems. Our investigation also designates that TGFB1 mRNA expression remains constant at the onset of cervical neoplasia (CIN I, II), while in advanced intraepithelial lesions (CIN III) and cancer it is substantially increased. This fact cannot be interpreted without taking into consideration its participation in a complex signalling pathway that includes interactions with other receptors and ligands [3–5].

Regarding TGFB2 and 3 and their receptor mRNA expression levels, our evaluation did not provide evidence on their possible correlation with clinical stage. Thus our estimations support that among the TGFB family members, only TGFB1 and TGFB1R1 seem to be transcriptionally dysregulated in the multistep process of cervical tumorigenesis.

The exact mechanism by which TGFB is implicated in cell growth and differentiation in cervical carcinogenesis is the result of many different biochemical pathways that require further investigation.

4.4. mRNA co-expression analysis pair wise

Signaling transduction is activated by the binding and bringing together of the TGFB1R1 and TGFB2R2 by one of the TGFB ligands (B1, B2, B3). TGFB1R1 and TGFB2R2 are transmembrane kinases that form a heterotetrameric complex when brought together by a TGFB ligand. It has been demonstrated that TGFB2R2 can bind to a TGFB ligand in the absence of TGFB1R1 (but not the opposite) but signalling is inhibited without TGFB1R1 binding to the complex [35,57,58]. TGFB3R3 receptor is a membrane-anchored proteoglycan lacking a kinase activity thus cannot mediate signal transduction. TGFB3R3 binds to all three TGFB ligands (B1, B2, B3) and facilitates access to the signalling receptors. In case that TGFB2R2 expression or its binding affinity is either reduced or defective in a system, TGFB3R3 forms a TGFB3R3/TGFB/TGFB2R2 complex and expedites access to the signalling receptors. Loss or reduction of expression

of the signalling receptors is associated with reduced responsiveness to the TGF β tumor inhibitory effects [59–61].

mRNA co-expression analysis of all angiogenic factors and receptors included in this study in the groups of normal, CIN and cancer tissues, revealed considerable differences. More correlations between angiogenic factors were found in the group of normal tissues, and they were considerably stronger than those observed in the other two groups. Correlations became even fewer in the group of cancer tissues in comparison with the CIN lesion group of tissues.

In the normal specimen group we observed positive correlations between TGF β 1, TGF β 2, TGF β R1 and TGF β R3 mRNA expression. TGF β R1 and TGF β R3 were also significantly co-expressed. This is consistent with our knowledge of the mechanism, which initiates TGF β signal transduction through the surface receptors. Most interesting is the substantial role of TGF β R3 in signalling activation. Its significant positive correlation with TGF β R1 mRNA expression suggests that it is an essential requirement for the bringing together of the two signalling receptors in these systems by mediating TGF β ligands' access and binding to TGF β R2. TGF β 1 and TGF β 2 mRNA was found to be considerably co-expressed, which leads to the assumption that they might be the main TGF β ligands that take part in the heterotetrameric complex with the signalling receptors rather than TGF β 3. In addition our results demonstrate a strong negative correlation of FGF2 mRNA expression with that of TGF β 1, TGF β 2 and TGF β R1 in the normal group of tissues.

In the group of CIN lesions the mRNA co-expression profile is substantially altered. Novel mRNA co-expressions take place such as that of TGF β 2 with FGF2 and VEGF, while others are abolished such as that of TGF β 1 and the TGF β R1 and TGF β R3 receptors. Furthermore TGF β 3 mRNA (instead of TGF β 2) is significantly co-expressed with TGF β 1. On the other hand TGF β 2 transcript levels continue to be positively correlated with TGF β R1, as in the normal tissues group. Interestingly FGF2 mRNA expression, which exhibited negative correlations in the normal group of tissues, is positively correlated to TGF β R1. These findings suggest a disruption of the mRNA co-expression

profile of the angiogenic factors that we studied in this group of CIN lesions.

In the group of cancer specimens, FGF2 mRNA is significantly co-expressed with TGF β 1 and TGF β R1, similarly to the CIN specimens group, while VEGF mRNA expression is negatively correlated with that of TGF β R3. All other correlations observed in normal or CIN lesion tissues are absent in this case.

TGF β is involved in many aspects of cellular function. Given the growth inhibitory action of TGF β it is obvious that its role in the tumorigenic process is essential. Loss of TGF β function has been linked with tumor growth and cancer progression. Our results suggest that loss or reduced expression of TGF β is not the only probable cause of a malignant phenotype. TGF β may be expressed in CIN or cervical cancer tissue and it may even be overexpressed as indicated by our results in primary steps of neoplasia (CIN I, II) in order to suppress the initiation or expanding of a tumor but other factors may be responsible for loss of TGF β signalling. The disrupted co-expression pattern of TGF β and cognate receptors evidenced from the present data in CIN lesions and cervical cancer tissues compared to normal cervixes could possibly explain the premalignant and malignant phenotype respectively of these tissues by accounting for loss of TGF β signaling and eventually loss of its growth inhibitory action.

Interestingly, the observed negative correlation of FGF2 and TGF β R1 in normal cervical tissues becomes positive in CIN lesions and cancer specimens as well. The type I receptor of the TGF β Receptor family seems to be the most important, since TGF β signalling is inhibited without its presence. Specifically it has been demonstrated that TGF β R2 can bind to a TGF β ligand in the absence of TGF β R1 (but not the opposite) but signalling is inhibited without TGF β R1 binding to the complex. Therefore it is not surprising that FGF2 is positively co-expressed with TGF β R1 in CIN lesions and cervical cancer. FGF2 is known to stimulate cell proliferation and differentiation. Overexpression of FGF2 in premalignant and malignant cervical cells is accompanied by TGF β R1 overexpression so that FGF2's stimulating effects on proliferation will be counteracted by TGF β 's growth inhibitory effects. When FGF2 is underexpressed on the other hand,

there is no need for growth inhibition and TGFBR1 which seems to control TGF β signalling is also underexpressed.

In conclusion, our findings indicate that cervical malignant transformation is accompanied by many alterations in the co-expression profile of the referred genes. We can only speculate that corresponding alterations might take place in the mechanism and efficiency of TGF β signal transduction during cervical carcinogenesis.

Summarizing, our results give indirect evidence that the dysregulation of VEGF, FGF2, TGFBR1 and TGFBR1 mRNA expression may be involved in the malignant transformation process of the uterine cervix. Additionally, disruption of co-expression patterns of the factors included in this study, in the CIN and cancer specimen groups compared to controls, suggests a transcriptional dysregulation during cervical cancer development. Further studies are needed to elucidate the potential use of mRNA expression profiles of angiogenetic factors as progression indicators in cervical carcinogenesis.

References

- [1] J. Folkman, Y. Shing, *Angiogenesis*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931–10934.
- [2] J. Folkman, What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 4–6.
- [3] P. Carmeliet, R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, *Nature* 407 (2000) 249–257.
- [4] G. Gasparini, Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 37 (2001) 97–114.
- [5] G. Bergers, L.E. Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 401–410.
- [6] O. Abulafia, W.E. Triest, D.M. Sherer, *Angiogenesis in malignancies of the female genital tract*, *Gynecol. Oncol.* 72 (1999) 220–231.
- [7] K. Tokumo, J. Kodama, N. Seki, Y. Nakanishi, Y. Miyagi, S. Kamimura, et al., Different angiogenic pathways in human cervical cancers, *Gynecol. Oncol.* 68 (1998) 38–44.
- [8] K.K. Smith-McCune, N. Weidner, Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia, *Cancer Res.* 54 (1994) 800–804.
- [9] O. Abulafia, W.E. Triest, D.M. Sherer, C.C. Hansen, F. Ghezzi, *Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma*, *Obstet. Gynecol.* 86 (1995) 479–485.
- [10] I. Ishiwata, C. Ishiwata, M. Soma, I. Ono, T. Nakaguchi, H. Ishikawa, Tumor angiogenic activity of gynecologic tumor cell lines on the chorioallantoic membrane, *Gynecol. Oncol.* 29 (1988) 87–93.
- [11] O. Abulafia, W.E. Triest, D.M. Sherer, *Angiogenesis in primary and metastatic epithelial ovarian carcinoma*, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177 (1997) 541–547.
- [12] Y. Nakanishi, J. Kodama, M. Yoshinouchi, K. Tokumo, S. Kamimura, H. Okuda, et al., The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 16 (1997) 256–262.
- [13] H.C. Hollingsworth, E.C. Kohn, S.M. Steinberg, M.L. Rothenberg, M.J. Merino, *Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma*, *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 33–41.
- [14] L.F. Brown, B. Berse, R.W. Jackman, K. Tognazzi, A.J. Guidi, H.F. Dvorak, et al., Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer, *Hum. Pathol.* 26 (1995) 86–91.
- [15] C.A. Boocock, D.S. Charnock-Jones, A.M. Sharkey, J. McLaren, P.J. Barker, K.A. Wright, et al., Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 506–516.
- [16] G.M. Abu-Jawdeh, J.D. Faix, J. Niloff, K. Tognazzi, E. Manseau, H.F. Dvorak, et al., Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms, *Lab. Invest.* 74 (1996) 1105–1115.
- [17] L. Xu, K. Xie, N. Mukaida, K. Matsushima, I.J. Fidler, Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells, *Cancer Res.* 59 (1999) 5822–5829.
- [18] C.A. Chen, W.F. Cheng, C.N. Lee, T.M. Chen, C.C. Kung, F.J. Hsieh, et al., Serum vascular endothelial growth factor in epithelial ovarian neoplasms: correlation with patient survival, *Gynecol. Oncol.* 74 (1999) 235–240.
- [19] L.F. Brown, B. Berse, R.W. Jackman, K. Tognazzi, E.J. Manseau, H.F. Dvorak, et al., Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas, *Am. J. Pathol.* 143 (1993) 1255–1262.
- [20] P. Macchiarini, G. Fontanini, M.J. Hardin, F. Squartini, C.A. Angeletti, Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer, *Lancet* 340 (1992) 145–146.
- [21] A.J. Guidi, G. Abu-Jawdeh, K. Tognazzi, H.F. Dvorak, L.F. Brown, Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma, *Cancer* 78 (1996) 454–460.
- [22] A.J. Guidi, G. Abu-Jawdeh, B. Berse, R.W. Jackman, K. Tognazzi, H.F. Dvorak, et al., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1237–1245.
- [23] J.A. Lancaster, R.A. Cooper, J.P. Logue, S.E. Davidson, R.D. Hunter, C.M. West, *Vascular endothelial growth factor*

- (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 620–625.
- [24] I.J. Lee, K.R. Park, K.K. Lee, J.S. Song, K.G. Lee, J.Y. Lee, et al., Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 54 (2002) 768–779.
- [25] W.F. Cheng, C.A. Chen, C.N. Lee, T.M. Chen, F.J. Hsieh, C.Y. Hsieh, Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma, *Obstet. Gynecol.* 93 (1999) 761–765.
- [26] W.F. Cheng, C.A. Chen, C.N. Lee, L.H. Wei, F.J. Hsieh, C.Y. Hsieh, Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma, *Obstet. Gynecol.* 96 (2000) 721–726.
- [27] W. Tjalma, J. Weyler, B. Weyn, E. Van Marck, A. Van Daele, P. Van Dam, et al., The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92 (2000) 251–257.
- [28] T. Nakamoto, C.S. Chang, A.K. Li, G.W. Chodak, Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 52 (1992) 571–577.
- [29] L.I. Gold, B. Saxena, K.R. Mittal, M. Marmor, S. Goswami, L. Nactigal, et al., Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action, *Cancer Res.* 54 (1994) 2347–2358.
- [30] Y. Yamanaka, H. Friess, M. Buchler, H.G. Beger, E. Uchida, M. Onda, et al., Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage, *Cancer Res.* 53 (1993) 5289–5296.
- [31] Y. Motoo, N. Sawabu, Y. Nakanuma, Expression of epidermal growth factor and fibroblast growth factor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study, *Liver* 11 (1991) 272–277.
- [32] J. Fujimoto, S. Ichigo, M. Hori, R. Hirose, H. Sakaguchi, T. Tamaya, Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced uterine cervical cancers, *Cancer Lett.* 111 (1997) 21–26.
- [33] J. Massague, S. Cheifetz, M. Laiho, D.A. Ralph, F.M. Weis, A. Zentella, Transforming growth factor-beta, *Cancer Surv.* 12 (1992) 81–103.
- [34] J. Massague, L. Attisano, J.L. Wrana, The TGF-beta family and its composite receptors, *Trends Cell. Biol.* 4 (1994) 172–178.
- [35] J. Massague, TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 753–791.
- [36] A. Hata, Y. Shi, J. Massague, TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads, *Mol. Med. Today* 4 (1998) 257–262.
- [37] L.H. Hartwell, M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer, *Science* 266 (1994) 1821–1828.
- [38] G.D. Shipley, M.R. Pittelkow, J.J. Wille, R.E. Scott, H.L. Moses, Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium, *Cancer Res.* 46 (1986) 2068–2071.
- [39] C.C. Bascom, J.R. Wolfshohl, R.J. Coffey, L. Madisen, N.R. Webb, A.R. Purchio, et al., Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 5508–5515.
- [40] S. Hazelbag, A. Gorter, G.G. Kenter, L. van den Broek, G. Fleuren, Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer, *Hum. Pathol.* 33 (2002) 1193–1199.
- [41] J.T. Comerci, C.D. Runowicz, K.C. Flanders, C. De Victoria, A.L. Fields, A.S. Kadish, et al., Altered expression of transforming growth factor-beta 1 in cervical neoplasia as an early biomarker in carcinogenesis of the uterine cervix, *Cancer* 77 (1996) 1107–1114.
- [42] X.C. Xu, M.F. Mitchell, E. Silva, A. Jetten, R. Lotan, Decreased expression of retinoic acid receptors, transforming growth factor beta, involucrin, and cornifin in cervical intraepithelial neoplasia, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1503–1508.
- [43] A. Tervahauta, S. Syrjanen, M. Yliskoski, L.I. Gold, K. Syrjanen, Expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in human papillomavirus (HPV)-associated lesions of the uterine cervix, *Gynecol. Oncol.* 54 (1994) 349–356.
- [44] A.M. El-Sherif, R. Seth, P.J. Tighe, D. Jenkins, Decreased synthesis and expression of TGF-beta1, beta2, and beta3 in epithelium of HPV 16-positive cervical precancer: a study by microdissection, quantitative RT-PCR, and immunocytochemistry, *J. Pathol.* 192 (2000) 494–501.
- [45] S.L. Giannini, W. Al-Saleh, H. Piron, N. Jacobs, J. Doyen, J. Boniver, et al., Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression, *Clin. Exp. Immunol.* 113 (1998) 183–189.
- [46] S. Hazelbag, G.J. Fleuren, J.J. Baelde, E. Schuurung, G.G. Kenter, A. Gorter, Cytokine profile of cervical cancer cells, *Gynecol. Oncol.* 83 (2001) 235–243.
- [47] J. Farley, K. Gray, L. Nycum, M. Prentice, M.J. Birrer, S.B. Jakowlew, Endocervical cancer is associated with an increase in the ligands and receptors for transforming growth factor-beta and a contrasting decrease in p27(Kip1), *Gynecol. Oncol.* 78 (2000) 113–122.
- [48] P.O. Van Trappen, A. Ryan, M. Carroll, C. Lecoer, L. Goff, V.G. Gyselman, et al., A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer, *Br. J. Cancer* 87 (2002) 537–544.
- [49] A. Obermair, D. Bancher-Todesca, S. Bilgi, A. Kaider, P. Kohlberger, S. Mullauer-Ertl, et al., Correlation of vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in cervical intraepithelial neoplasia, *J. Natl Cancer Inst.* 89 (1997) 1212–1217.
- [50] M. Relf, S. LeJeune, P. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, et al., Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth

- factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis, *Cancer Res.* 57 (1997) 963–969.
- [51] K. Smith, S.B. Fox, R. Whitehouse, M. Taylor, M. Greenall, J. Clarke, et al., Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival, *Ann. Oncol.* 10 (1999) 707–713.
- [52] R. Colomer, J. Aparicio, S. Monero, C. Guzman, L. Larrodera, H. Cortes-Funes, Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma, *Br. J. Cancer* 76 (1997) 1215–1220.
- [53] S.Y. Anandappa, J.H.R. Whinstanley, S. Leinter, B. Green, P.S. Rudland, R. Barraclough, Comparative expression of fibroblast growth-factor messenger-RNAs in benign and malignant breast disease, *Br. J. Cancer* 69 (1994) 772–776.
- [54] Y. Luqmani, R. Graham, R.S. Coombes, Expression of basic fibroblast growth factor, FGFR1 and FGFR2 in normal and malignant human breast, and comparison with other normal tissues, *Br. J. Cancer* 66 (1992) 271–280.
- [55] C. Yiangou, J.J. Gomm, R.C. Coope, M. Law, Y.A. Luqmani, S. Shousha, et al., Fibroblast growth factor-2 in breast cancer occurrence and prognostic significance, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 28–33.
- [56] K.E. de Visser, W.M. Kast, Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy, *Leukemia* 13 (1999) 1188–1199.
- [57] P. Franzen, P. ten Dijke, H. Ichijo, H. Yamashita, P. Schulz, C.H. Heldin, et al., Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor, *Cell* 75 (1993) 681–692.
- [58] H.Y. Lin, X.F. Wang, E. Ng-Eaton, R.A. Weinberg, H.F. Lodish, Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase, *Cell* 68 (1992) 775–785.
- [59] M. Laiho, M.B. Weis, J. Massague, Concomitant loss of transforming growth factor (TGF)-beta receptor types I and II in TGF-beta-resistant cell mutants implicates both receptor types in signal transduction, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18518–18524.
- [60] T.Y. Chu, J.S. Lai, C.Y. Shen, H.S. Liu, C.F. Chao, Frequent aberration of the transforming growth factor-beta receptor II gene in cell lines but no apparent mutation in pre-invasive and invasive carcinomas of the uterine cervix, *Int. J. Cancer* 80 (1999) 506–510.
- [61] J.F. DeCoteau, P.I. Knaus, H. Yankelev, M.D. Reis, R. Lowsky, H.F. Lodish, et al., Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type I receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 5877–5881.