

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000199866





A
197

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Α. Παυλίδης

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΟ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ
ΕΣΤΙΑΣ (ΚΑΠΕ): Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Κ. ΚΑΡΑΒΑΣΙΛΗ
ΙΑΤΡΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2, περί της νομικής κατοχύρωσης του Ιατρικού Τμήματος)."



Ημερομηνία αίτησης: 27/04/2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 27/06/2000

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Επιβλέπων

Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Παθολογίας Ογκολογίας

Μέλη

Βασιλική Μαλάμου - Μήτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Θεόδωρος Φώτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 28/08/2000

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 28/09/2005

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική,	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
Μπουραντάς Κωνσταντίνος,	Καθηγητής Παθολογίας/Αιματολογίας, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
Παυλίδης Νικόλαος,	Καθηγητής Παθολογίας/Ογκολογίας, επιβλέπων, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
Φώτσης Θεόδωρος,	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
Γεωργίου Ιωάννης,	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής & Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής - Γυναικολογίας, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
Μπάη Μαρία,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
Μπριασούλης Ευάγγελος,	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Η Διδακτορική Διατριβή εγκρίθηκε με το βαθμό : «ΑΡΙΣΤΑ»



Η Γραμματέας της Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να εκφράσω ένα ειλικρινές ευχαριστώ σε όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να φέρω σε πέρας αυτή την εργασία και ιδιαίτερα:

Στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής,

Τον Καθηγητή Παθολογίας Ογκολογίας Νικόλαο Παυλίδη, εκλεκτό μου δάσκαλο, για την πολύτιμη επιστημονική του καθοδήγηση, καθώς και για τις επιστημονικές δυνατότητες που μου προσφέρει από τα φοιτητικά μου χρόνια,

Την Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομίας Βασιλική Μαλάμου – Μήτση για την επιλογή και την ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού και την αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των παραγόντων της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης,

Τον Καθηγητή της Βιολογικής Χημείας Θεόδωρο Φώτση για τις παρατηρήσεις του επί των μηχανισμών της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης,

Στον Επίκουρο Καθηγητή Ογκολογίας Ευάγγελο Μπριασούλη, πολύτιμο φίλο και εκλεκτό συνεργάτη, που με πατρική στοργή με υποστηρίζει όλα αυτά τα χρόνια σε επιστημονικό αλλά και προσωπικό και οικογενειακό επίπεδο,

Στους εκλεκτούς συνεργάτες,

Ελένη Τσάνου, Ιατρό Κυτταρολόγο για τη σημαντικότερη βοήθειά της και τις πολυάριθμες ώρες που αφιέρωσε στην εκτίμηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων,

Ελένη Κίτσου, Ιατρό Παθολογοανατόμο για τη βοήθειά της στην ανεύρεση πολύτιμου υλικού,

Στέλλα Στεφανάκη, Ιατρό Παθολογοανατόμο, για την προσφορά βιοπτικού υλικού,

Χαράλαμπο Καλόφωνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας Ογκολογίας για το βιοπτικό υλικό ασθενών του Νοσοκομείου Ρίου, Πατρών,

Γεώργιο Φούντζηλα, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας Ογκολογίας για το βιοπτικό υλικό ασθενών του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης,

Άντα Χριστοδούλου και Μιχάλη Αλεξίου για την επιμέλεια του υλικού και την πολύτιμη βοήθειά τους κατά το τεχνικό μέρος της μελέτης,

Στο φιλόλογο Γιάννη Παππά για τη γλωσσική επιμέλεια του κειμένου,

Στη Νατάσα, για την υπομονή και την κατανόηση που έδειξε κατά τις πολυάριθμες ώρες ενασχόλησής μου με το συγκεκριμένο θέμα.



ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Με σεβασμό στους γονείς μου

Με αγάπη στη Νατάσα, την Ειρήνη και τον Κωνσταντίνο

Με υπόσχεση στους ασθενείς μας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα κακοήθη νεοπλάσματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας αποτελούν μια ανομοιογενή ομάδα νεοπλασιών με κοινά χαρακτηριστικά την πρώιμη εκδήλωση μεταστατικής νόσου και την αδυναμία διάγνωσης της πρωτοπαθούς εστίας κατά τον χρόνο της αρχικής διερεύνησης. Το σύνολο αυτών των νεοπλασιών κωδικοποιείται στην ιατρική ορολογία ως "Καρκίνος/Καρκίνωμα Άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας" ή ΚΑΠΕ. Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν μεταξύ των νεοπλασιών ένα κλινικό μοντέλο απόλυτου μεταστατικού δυναμικού. Παρά την πρόοδο και εξέλιξη των διαγνωστικών τεχνικών, η πρωτοπαθής εστία παραμένει αδιευκρίνιστη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Παράλληλα η έλλειψη της σε βάθος κατανόησης του παθογενετικού μηχανισμού, έχει οδηγήσει τα αποτελέσματα της χημειοθεραπείας σε αδιέξοδο και έχει ενισχύσει την άποψη για σχεδιασμό πιο ορθολογικών θεραπειών, μέσα από τα πλαίσια αναγνώρισης στοιχείων της μοριακής ταυτότητας αυτών των όγκων.

Στα πλαίσια της πολύχρονης ερευνητικής δραστηριότητας της Ογκολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων πάνω στη συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα και με την παρότρυνση και την επιστημονική καθοδήγηση του Διευθυντή της Ογκολογικής Κλινικής, Καθηγητή κ. Ν. Παυλίδη, μου ανατέθηκε ως θέμα διδακτορικής διατριβής η διερεύνηση δύο κύριων μηχανισμών της μετάστασης: της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης στα ΚΑΠΕ.

Βασικός στόχος της μελέτης είναι η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης κύριων μορίων που ρυθμίζουν την πρωτεόλυση και την αγγειογένεση και οι πιθανές συσχετίσεις με προγνωστικούς παράγοντες της νόσου. Αυτή η έρευνα ελπίζεται ότι θα μπορούσε να συμβάλει στη θεραπευτική των ασθενών με ΚΑΠΕ με την αναγνώριση μοριακών παραγόντων δυνήτικης θεραπευτικής στόχευσης.



Στο ειδικό μέρος της μελέτης οι παράγοντες της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης αναλύονται ξεχωριστά. Η διάκριση αυτή διατηρείται και στο κεφάλαιο της συζήτησης και εξυπηρετεί την βαθύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Επειδή όμως οι δύο διαδικασίες αν και διακριτές, έχουν συζευγμένο ρόλο στη μεταστατική διεργασία, στο κεφάλαιο της συζήτησης γίνεται ιδιαίτερος λόγος για τη διασύνδεσή τους. Τέλος γίνεται προσπάθεια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της μελέτης σε κλινικό επίπεδο και διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών στόχων μελλοντικής εφαρμογής.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΣ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ..	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ	24
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΕ.....	27
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΠΕ.....	32
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	35
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ	36
ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ	36
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	36
ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	37
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	37
ΠΡΟΗΓΜΕΝΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	38
ΚΑΠΕ: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ	38
ΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	39
ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	39
ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	39
Η ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ.....	42
Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΩΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	
ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ	47
Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ	
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	47
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	47
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ	48
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	50
Ο ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF.....	53



ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF ΣΤΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	56
Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	59
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ.....	61
Η ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ -1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ.....	62
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ	63
Η ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ-1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ...	63
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ-1 ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ IN VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ.....	66
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ-1 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ.	69
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ.....	73
Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ.	76
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ.....	77
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	80
Ο ΠΟΛΛΑΠΛΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΟΓΚΩΝ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ. .	83
Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	85
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	87
ΥΛΙΚΟ.....	89
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	92
ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ.....	92
ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	94
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	95
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ	96
ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	96
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	97
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ.....	98
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	98
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ MMP-2, MMP-9 ΚΑΙ TIMP-1.....	98
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-2.	99
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-9	100
ΙΣΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ-1	101



ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ MMP-2, MMP-9 ΚΑΙ TIMP-1 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.....	102
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ: CD 34, VEGF ΚΑΙ TSP-1.	106
VEGF	106
ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ.....	107
ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ-1.....	108
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ: CD 34, VEGF ΚΑΙ TSP-1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.....	109
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	113
A: ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	113
B: ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ	117
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	120
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ	121
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	124
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	129
SUMMARY IN ENGLISH.....	132
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	136



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΣ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεταστατικό καρκίνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελεί κατά προσέγγιση το 3-5% του συνόλου των καρκίνων(1). Το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει ετερογενή ομάδα μεταστατικών όγκων για τους οποίους η πρωτοπαθής εστία της νεοπλασίας δεν μπορεί να αναγνωρισθεί μετά από λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, ενδελεχή κλινική εξέταση και εκτενή διαγνωστική προσέγγιση. Η πρωτοπαθής εστία μπορεί είτε να έχει ένα βραδύ ρυθμό αύξησης είτε ενδεχομένως να έχει υποστρέψει, ώστε να γίνεται σπάνια αντιληπτή κατά τη διάρκεια της κλινικής παρακολούθησης και εξέλιξης της νόσου (2;3). Κατά το παρελθόν διάφοροι όροι έχουν χρησιμοποιηθεί ως συνώνυμα του ΚΑΠΕ όπως: ο άγνωστος πρωτοπαθής όγκος, το καρκίνωμα ή το αδενοκαρκίνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, οι μεταστάσεις άγνωστης προέλευσης, οι μεταστάσεις από τους άγνωστους πρωτοπαθείς όγκους και ο όγκος άγνωστης ή μη αναγνωρισμένης προέλευσης. Τα τελευταία χρόνια, ο ευρύτερα αποδεκτός όρος είναι καρκίνος άγνωστης "πρωτοπαθούς εστίας". Στις αρχές της δεκαετίας του '70, μερικοί ερευνητές υποστήριξαν ότι η διάγνωση του ΚΑΠΕ θα μπορούσε να δοθεί μόνο εάν ο αρχικός όγκος δεν βρεθεί στην νεκροψία(4). Σήμερα, η διάγνωση ΚΑΠΕ αποδίδεται σε ασθενείς που παρουσιάζονται με ιστολογικά-επιβεβαιωμένο μεταστατικό καρκίνο στον οποίο λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, πλήρης φυσική εξέταση συμπεριλαμβανομένης της πνευλικής και πρωκτικής εξέτασης, της γενικής εξέτασης αίματος, βιοχημικών εξετάσεων ρουτίνας, της γενικής



ούρων, της εξέτασης κοπράνων για λανθάνουσα αιμορραγία, της ιστοπαθολογικής επανεξέτασης του βιοπτικού υλικού με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας, της ακτινογραφίας θώρακος, της υπολογιστικής τομογραφίας (ΥΤ) της κοιλίας και της πυέλου και, σε ορισμένες περιπτώσεις, της μαστογραφίας αποτυγχάνει να προσδιορίσει την αρχική εστία(5;6).

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) απεικονίζεται ο διαγνωστικός αλγόριθμος που χρησιμοποιείται στην κλινική προσέγγιση του ασθενή με ΚΑΠΕ(7)

Πίνακας 1: ΚΑΠΕ: εργαστηριακή διαγνωστική προσέγγιση(7)

Βασικές διαγνωστικές εξετάσεις	
Ιστοπαθολογία	Ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού με χρήση ανοσοϊστοχημείας
Εργαστηριακές εξετάσεις	Γενική αίματος, βιοχημικός έλεγχος ρουτίνας, γενική ούρων και Mayer κοπράνων για ανακάλυψη λανθάνουσας απώλειας αίματος
Απεικονιστικές εξετάσεις	Ακτινογραφία θώρακα, αξονική τομογραφία κοιλίας-πυέλου
Επιλεκτικές εξετάσεις	
Απεικονιστικές εξετάσεις	Αξονική τομογραφία κρανίου-τραχήλου για λεμφαδενική νόσο στον τράχηλο. Μαστογραφία για μεταστάσεις σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
Ενδοσκοπήσεις	ΩΡΛ πανενδοσκόπηση, βρογχοσκόπηση, ενδοσκόπηση ανωτέρου και κατώτερου πεπτικού, επί κλινικών ενδείξεων
Ειδικές εξετάσεις	
PET scan	Στην υποομάδα των μεταστάσεων κεφαλής - τραχήλου
Ηλεκτρονική μικροσκόπηση	Στη διαφορική διάγνωση νευροενδοκρινικών όγκων χαμηλής διαφοροποίησης



Παρά τις πρόσφατες προόδους τόσο στη μοριακή ανοσοϊστοχημεία όσο και στις απεικονιστικές τεχνικές, η αντιμετώπιση αυτών των ασθενών εξακολουθεί να παραμένει δίλημμα για τους κλινικούς ογκολόγους. Με βάση το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών με ΚΑΠΕ είναι σχετικά ανθεκτικοί στη συστηματική θεραπεία και έχουν βραχεία επιβίωση, ορισμένες κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες που καθορίζονται είτε από τα κλινικά είτε από τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα έχει διαπιστωθεί ότι ανταποκρίνονται στη θεραπεία και έχουν μια σχετικά καλύτερη πρόγνωση.

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας ταξινομούνται σε τέσσερις υποομάδες σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απλής μικροσκόπησης: (α) αδenoκαρκινώματα καλής ή μέτριας διαφοροποίησης, (β) χαμηλής διαφοροποίησης αδenoκαρκινώματα, ή αδιαφοροποίητα καρκινώματα, (γ) καρκινώματα πλακώδους επιθηλίου και (δ) αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα. Περίπου οι μισοί (50%) από τους ασθενείς θα διαγνωσθούν με μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα, 30% με αδιαφοροποίητα ή χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, 15% με καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων και το υπόλοιπο 5% θα έχει κάποιο αδιαφοροποίητο νεόπλασμα(8;9). Με τις σύγχρονες τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας οι περισσότεροι από τους όγκους της τελευταίας ομάδας μπορούν σήμερα να ταυτοποιηθούν καλύτερα. Στους όγκους αυτούς συμπεριλαμβάνονται χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, νευροενδοκρινικοί όγκοι, λεμφώματα, όγκοι από γεννητικά κύτταρα, μελανώματα, σαρκώματα και εμβρυϊκές κακοήθειες. Στην παιδική ηλικία, οι εμβρυϊκές κακοήθειες αποτελούν την πλειοψηφία των σπάνιων περιπτώσεων γενικευμένης μεταστατικής νόσου χωρίς να έχει προσδιοριστεί ο πρωτοπαθής όγκος(10). Στον πίνακα 2 απεικονίζονται οι συχνότεροι ιστολογικοί τύποι του ΚΑΠΕ(7).

Στοιχεία από επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν ότι το ΚΑΠΕ αποτελεί το 2,3-4,2% όλων των ανθρώπινων νεοπλασιών(11). Αναφορικά με τη γενική επίπτωση των συμπαγών όγκων στις Ηνωμένες Πολιτείες, το



ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει περίπου 40.000 από τις 950.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου ετησίως. Η ετήσια επίπτωση υπολογίζεται σε 7-12 περιπτώσεις ανά πληθυσμό 100.000 ετησίως στις ΗΠΑ και 18-19 περιπτώσεις ανά πληθυσμό 100.000 ετησίως στην Αυστραλία(12). Στις Κάτω Χώρες, σχεδόν 2.500 νέοι ασθενείς διαγιγνώσκονται ετησίως με ποσοστό επίπτωσης 6,7% για τους άνδρες και 5,3% για τις γυναίκες(11). Το ΚΑΠΕ επομένως αντιπροσωπεύει το έβδομο με όγδοο συχνότερο είδος καρκίνου και την τέταρτη κατά σειρά πιο συχνή αιτία του θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα. Η διάμεση ηλικία κατά την εμφάνιση είναι περίπου τα 60 έτη με μια οριακά υψηλότερη συχνότητα στους άνδρες. Αντίθετα στην παιδική ηλικία, το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει λιγότερο από 1% των διαγνωσθέντων συμπαγών όγκων(11).

Πίνακας 2. Ιστολογική ταξινόμηση του ΚΑΠΕ(7)

Ιστολογικός τύπος	Ποσοστό (%)
Αδενοκαρκίνωμα υψηλής και μέσης διαφοροποίησης	50
Φτωχής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητα	30
Πλακώδη καρκινώματα	15
Αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα	5

ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Το κλινικό σύνδρομο ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει μια μοναδική βιολογική οντότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από την κλινική εκδήλωση μεταστάσεων προτού η αρχική εστία γίνει αρκετά μεγάλη ώστε να



μπορεί να προσδιοριστεί. Η φυσική ιστορία αυτών των ασθενών διαφέρει αρκετά από εκείνη των ασθενών με γνωστούς πρωτοπαθείς όγκους. Η πρόωμη διασπορά, η κλινική απουσία πρωτοπαθούς εστίας, το απρόβλεπτο μεταστατικό δυναμικό και η επιθετικότητα αποτελούν τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά αυτών των όγκων. Η πρόωμη διασπορά αντανακλάται στην έλλειψη των συμπτωμάτων που σχετίζονται με έναν αρχικό όγκο. Το απρόβλεπτο μεταστατικό δυναμικό αναφέρεται στις διαφορές εντόπισης μεταστατικών εστιών μεταξύ των γνωστών και άγνωστων πρωτοπαθών όγκων. Χαρακτηριστικά, ο καρκίνος του παγκρέατος που εκδηλώνεται ως ΚΑΠΕ έχει τετραπλάσια συχνότητα εμφάνισης οστικών μεταστάσεων ενώ ο καρκίνος του προστάτη που εκδηλώνεται ως ΚΑΠΕ εμφανίζει πιο συχνά μεταστάσεις στο ήπαρ και τον πνεύμονα παρά στα οστά. Παρόμοια απρόβλεπτο μεταστατικό μοντέλο φαίνεται να έχουν και οι σπλαχνικές μεταστάσεις(13). Φαίνεται ότι αυτές οι νεοπλασίες δεν ακολουθούν την κλασική τύπου 1 ανάπτυξη ξεκινώντας από μια προκαρκινωμάτωση κατάσταση αλλά είναι κακοήθειες από την αρχή της νόσου(14).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου καθώς και τα ευρήματα σχετίζονται με τις εντοπίσεις και την έκταση της μεταστατικής νόσου. Σε περιπτώσεις γενικευμένης και πολυσυστηματικής νόσου από αδενοκαρκίνωμα, προεξάρχουν τα γενικά συμπτώματα (~80%) όπως καταβολή και απώλεια βάρους, ενώ συνήθη ευρήματα αποτελούν η διόγκωση λεμφαδένων, η ηπατομεγαλία, ο ασκίτης και τα δερματικά οζίδια. Η καρκινωμάτωση περιτοναίου εκδηλώνεται με συμπτωματολογία ασκίτη, ενώ η ομάδα του επιδερμοειδούς καρκινώματος τραχηλικών λεμφαδένων συνήθως στερείται συστηματικών εκδηλώσεων(1). Η πρόγνωση των ασθενών με ΚΑΠΕ και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις οστικής, ηπατικής, ή πολυσυστηματικής εντόπισης είναι πτωχή, με διάμεση επιβίωση που στις διάφορες μελέτες κυμαίνεται από 3 έως 7 μήνες(15-17) ασθενών. Η επιβίωση διαφέρει στους διάφορους υπό-τύπους αλλά γενικά, στις περισσότερες μελέτες μικρός αριθμός ασθενών επιβιώνει ως



πέντε χρόνια(6;18). Προγνωστικοί παράγοντες που έχουν αναγνωρισθεί στο ΚΑΠΕ είναι ο ιστολογικός τύπος, τα όργανα κυρίας μεταστατικής εντόπισης, το φορτίο της νόσου και η κατάσταση φυσικής ικανότητας του ασθενούς (PS)(19-21).

Πίνακας 3: Υπο-ομάδες ΚΑΠΕ(7).

Περιοχή εντόπισης	Ιστολογικός τύπος
Κατεξοχήν ηπατικές μεταστάσεις ή/και μεταστάσεις σε άλλα όργανα	Αδενοκαρκίνωμα
Λεμφαδένες Λεμφαδενική νόσος μέσης κατανομής (μεσοθωρακικοί -οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες) Μασχαλαιοί Τραχηλικοί Βουβωνικοί	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα η χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα Αδενοκαρκίνωμα μέσης ή χαμηλής διαφοροποίησης Πλακώδες καρκίνωμα Αδιαφοροποίητο ή πλακώδες καρκίνωμα
Περιτοναϊκή κοιλότητα Αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου Κακώθης ασκίτης	Ορώδες ή θηλώδες αδενοκαρκίνωμα Βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα με ή χωρίς την παρουσία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου
Πνεύμονες Πνευμονικές μεταστάσεις Πλευριτική συλλογή	Αδενοκαρκίνωμα Αδενοκαρκίνωμα
Οστά	Αδενοκαρκίνωμα
Εγκεφαλικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα ή πλακώδες καρκίνωμα
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με στοιχεία νευροενδοκρινικής προέλευσης
Κακώθης μελάνωμα	Αδιαφοροποίητο νεόπλασμα με μελανωματικά χαρακτηριστικά



ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΕ.

Οι υπο-ομάδες του ΚΑΠΕ απεικονίζονται συνοπτικά στον πίνακα 3 και περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

Κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσος.

Ασθενείς με κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσο αποτελούν το 25% περίπου του συνόλου των διαγνώσεων ΚΑΠΕ. Πιο συχνοί ιστολογικοί τύποι είναι τα αδenoκαρκινώματα. Η πρόγνωση αυτής της υποομάδας είναι πολύ πτωχή με διάμεση επιβίωση 3-7 μήνες. Ασθενείς με νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης ηπατικές μεταστάσεις άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και σχετικά μακρύτερη επιβίωση (1;20;22).

Μεταστατικό ΚΑΠΕ λεμφαδενικής εντόπισης

Λεμφαδενική νόσος μέσης γραμμής

Στη υποομάδα αυτή των ασθενών η νόσος εκδηλώνεται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες κατανομής μέσης γραμμής (μεσοθωρακικοί-οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες) και παραπέμπει σε εξωγοναδικούς όγκους. Η υπο-ομάδα αυτή αναφέρθηκε αρχικά το 1979 (23) και τα χαρακτηριστικά της περιγράφηκαν στη συνέχεια λεπτομερειακά από τους Gresco και συν. (24). Εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες διάμεσης ηλικίας κάτω των 50 ετών με λεμφαδενικές εντοπίσεις ή/και πνευμονικές μεταστάσεις. Ιστοπαθολογικά ταξινομούνται ως αδιαφοροποίητα καρκινώματα ή πτωχής διαφοροποίησης αδenoκαρκινώματα (1;24). Οι όγκοι αυτοί, αν και είναι ταχέως εξελισσόμενοι, ανταποκρίνονται εντυπωσιακά στη χημειοθεραπεία και ικανό ποσοστό ασθενών (15%) κερδίζει μακροχρόνια επιβίωση. Από τον ορολογικό έλεγχο η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη (β- HCG) ή η άλφα-εμβρυϊκή σφαιρίνη (AFP) είναι δυνατόν να βρεθούν αυξημένες σε μερικούς ασθενείς. Λίγοι ασθενείς έχουν όλα τα στοιχεία αυτού του συνδρόμου.



Μεμονωμένη λεμφαδενική μετάσταση μασχάλης σε γυναίκες

Η υπο-ομάδα αυτή χαρακτηρίζει γυναίκες διάμεσης ηλικίας 52 ετών. Αν και η κλινική συνδρομή ανάγει την διαφοροδιαγνωστική σκέψη σε καρκίνο μαστού, σε μικρό μόνο ποσοστό των γυναικών αυτών (0,3%) διαγιγνώσκετε στη συνέχεια πρωτοπαθής καρκίνος μαστού. Ιστολογικά πρόκειται συνήθως για αδενοκαρκίνωμα με θετικότητα σε υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης στο 20-30% των περιπτώσεων (25). Η μαστογραφία και το υπερηχογράφημα του μαστού συστήνονται για τη διαγνωστική διερεύνηση αυτών των ασθενών ΚΑΠΕ αλλά αποτελούν απεικονιστικές μεθόδους με πτωχή ευαισθησία για τη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών (26). Η εξέταση μαγνητικού συντονισμού του μαστού (MRI) ενδεχόμενα πλεονεκτεί στην διαγνωστική ικανότητα προσδιορισμού της αρχικής εντόπισης σε μερικούς από αυτούς τους ασθενείς(27;28). Οι ασθενείς αυτοί αντιμετωπίζονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες για τον καρκίνο του μαστού σταδίου III με ικανοποιητικό ποσοστό επιβίωσης στην 5-ετία (29). Άνδρες ασθενείς της ίδιας ομάδας έχουν χειρότερη πρόγνωση(30).

Λεμφαδενικές μεταστάσεις τραχήλου.

Λεμφαδενικές τραχηλικές μεταστάσεις από το κλινικά μη ανιχνεύσιμο αρχικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων αποτελούν το 1-2% των κακοηθειών της περιοχής της κεφαλής-τραχήλου. Με την τοπικοπεριοχική θεραπεία, αυτοί οι ασθενείς μπορούν να επιτύχουν μια ιδιαίτερα μακρά επιβίωση(31). Οι ασθενείς με υπερκλείδια λεμφαδενοπάθεια ιστολογικά έχουν είτε πλακώδη είτε αδιαφοροποίητα καρκινώματα και παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση. Η τομογραφία εκπομπή ποζιτρονίων (PET) είναι χρήσιμη στην δυνατότητα εντοπισμού ενός αρχικού όγκου στην περιοχή της κεφαλής-τραχήλου(3;32).



Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση.

Ασθενείς με μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση αποτελούν μια λιγότερο συχνή υποομάδα, με πιο κοινή ιστολογία αυτή του αδιαφοροποίητου καρκινώματος. Επίσης μπορούν να διαγνωσθούν πλακώδη καρκινώματα ή μικτοί αδеноπλακώδεις όγκοι. Η κλινική εξέταση της ορθοπρωκτικής περιοχής, λεπτομερής γυναικολογική εξέταση και πιθανώς κυστεοσκόπηση είναι απαραίτητες διαγνωστικές εξετάσεις για αυτούς τους ασθενείς. Τα λεμφώματα και τα μεταστατικά ή αμελανωτικά μελανώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας πρέπει επίσης να αποκλειστούν(33;34).

Το μεταστατικό ΚΑΠΕ περιτοναϊκής κοιλότητας.

Συνήθως πρόκειται για γυναίκες ασθενείς με διάμεση ηλικία τα 60 έτη, οι οποίες παρουσιάζονται με ασκίτη και περιτοναϊκές μάζες χωρίς να διαπιστώνεται πρωτοπαθής όγκος στις ωθήκες. Αυτό το σύνδρομο έχει ονομασθεί επίσης πολυεστιακό εξωωθηκικό ορώδες καρκίνωμα ή περιτοναϊκό ορώδες θηλώδες καρκίνωμα". Σήμερα πλέον αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα και ονομάζεται πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα περιτοναίου(35).

Η διάγνωση απαιτεί ερευνητική λαπαροτομία ή λαπαροσκόπηση. Οι βιοψίες από τις περιτοναϊκές εμφυτεύσεις ταξινομούνται ιστολογικά ως ορώδες θηλώδες αδenoκαρκίνωμα, με ή χωρίς ψαμμώδη σωμάτια. Τα επίπεδα του αντιγόνου Ca 125 στον ορό είναι συνήθως αυξημένα. Τα ποσοστά απάντησης στη χημειοθεραπεία και η επιβίωση είναι παρόμοια με αυτά καρκίνου των ωθηκών σταδίου III κατά FIGO. Στη διαφορική διάγνωση περιλαμβάνονται το μεσοθηλίωμα του περιτοναίου, το ψευδομύξωμα του περιτοναίου και ο κακοήθης ασκίτης που αναπτύσσεται από όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα ή άλλων οργάνων(36;37).



Μη ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα περιτοναίου

Μερικοί ασθενείς διαγιγνώσκονται με μη ορώδεις-θηλώδεις όγκους κοιλίας, και μπορεί να απαντηθούν και στα δύο φύλα. Στις περιπτώσεις που πρόκειται για βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα με παρουσία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, πρέπει να διερευνάται η πιθανότητα προέλευσης από το γαστρεντερικό. Οι όγκοι σε αυτούς τους ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία όπως τα ορώδη θηλώδη αδενοκαρκινώματα και η πρόγνωση είναι πολύ πτωχή(38).

Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες.

Παρεγχυματικές πνευμονικές μεταστάσεις.

Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζονται με πολλαπλές αμφοτερόπλευρες πνευμονικές μεταστάσεις και την ιστολογική διάγνωση του αδενοκαρκινώματος οποιουδήποτε βαθμού διαφοροποίησης. Η πρόγνωση είναι πτωχή για τους περισσότερους ασθενείς. Οι νέοι άνδρες ασθενείς με πιθανό εξωγοναδικό όγκο πρέπει να διακριθούν προσεκτικά από αυτήν την ομάδα ασθενών(1;20) .

Μεμονωμένη κακοήθης πλευριτική συλλογή.

Σε μικρή ομάδα ασθενών μπορεί η κακοήθης πλευρική συλλογή να αποτελεί τη μόνη διαπιστούμενη μεταστατική εστία. Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο κύριος ιστολογικός τύπος, ενώ οι πρωτοπαθείς εστίες από τον πνεύμονα, το μαστό, ή την ωοθήκη οφείλουν να αποκλειστούν. Το μεσοθηλίωμα πρέπει επίσης να συμπεριληφθεί στη διαφορική διάγνωση. Η πρόγνωση και αυτού του υποσυνόλου είναι επίσης πτωχή(1;20).

Μεταστατικό ΚΑΠΕ οστών

Μικρό ποσοστό ασθενών με ΚΑΠΕ προσέρχονται με συμπτώματα από τις οστικές μεταστάσεις οι οποίες συνήθως είναι πολλαπλές. Το αδενοκαρκίνωμα είναι η συχνότερη ιστολογική διάγνωση. Ο καρκίνος



του προστάτη και ο καρκίνος του μαστού πρέπει να αποκλεισθούν σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς αντίστοιχα (1;39;40).

Το μεταστατικό ΚΑΠΕ Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ).

Στο 15% του συνόλου των ασθενών που παρουσιάζονται με μεταστάσεις ΚΝΣ δεν θα προσδιορισθεί σαφής πρωτοπαθής εντόπιση παρά την ενδελεχή έρευνα. Στους ασθενείς αυτούς η νευρολογική σημειολογία προεξάρχει των συμπτωμάτων. Ιστολογικά κυριαρχούν τα μεταστατικά αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη καρκινώματα. Οι ασθενείς με μονήρη μεταστατική εστία έχουν καλύτερη επιβίωση εφόσον αυτή είναι δυνητικά εξαιρεσιμη (41-44).

Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες.

Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών. Τρεις διαφορετικές κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες νευροενδοκρινών όγκων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει τα χαμηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικά καρκινώματα (π.χ. μεταστατικά καλής διαφοροποίησης καρκινώματα) που προσβάλλουν συνήθως το ήπαρ και μερικές φορές συνδέονται με συμπτώματα από την έκκριση των αγγειοδραστικών πεπτιδίων. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει το αναπλαστικό καρκίνωμα από μικρού μεγέθους κύτταρα, με μια ιστολογική εμφάνιση και μια κλινική συμπεριφορά που είναι παρόμοια με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ή το εξωπνευμονικό μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Η τρίτη υποομάδα αντιπροσωπεύει τα χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες που ανοσοϊστοχημικά προσδιορίζεται από την έκφραση της χρωμογρανίνης, της συναπτοφυσίνης και άλλων νευροενδοκρινικών δεικτών. Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς



μπορούν να παρουσιάζουν κλινική εικόνα που προσομοιάζει με εκείνη του εξωγοναδικού συνδρόμου (45;46).

Κακόηθες μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας.

Η διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύσει το 2-6% των περιπτώσεων μελανώματος. Το 10-15% από αυτές τις περιπτώσεις είναι αμελανωτικά μελανώματα (47). Παρά την έκφραση διαφορετικών απόψεων στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η κλινική πορεία των ασθενών με μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας είναι παρόμοια με αυτήν των ασθενών με το αρχικό δερματικό μελάνωμα, όταν συγκρίνονται για το ίδιο κλινικό στάδιο της νόσου (48;49).

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΠΕ

Παρά την ιστολογική τους ετερογένεια οι όγκοι αυτοί εκδηλώνουν παρόμοια επιθετική κλινική συμπεριφορά. Αυτό το ασυνήθιστο μοντέλο της ανάπτυξης μας κάνει να πιστεύουμε ότι το ΚΑΠΕ αναπτύσσεται ακολουθώντας μια μοναδική αλληλουχία μοριακών και βιοχημικών γεγονότων. Μέχρι σήμερα, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την βιολογία του ΚΑΠΕ δεν έχουν διαλευκανθεί και οι περιορισμένες πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία είναι συγκεχυμένες και ασαφείς. Μια σειρά από καρυοτυπικές ανωμαλίες που αρχικά ανιχνεύθηκαν σε υλικό ασθενών με ΚΑΠΕ περιλαμβάνουν τη απάλειψη μέρους ή ολόκληρου του τμήματος του χρωμοσώματος 1p, τη χρωμοσωμική αντιμετάθεση, την ισοχρωμία 1q και γονιδιακή ενίσχυση. Παρόμοιες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις έχουν παρ' όλα αυτά περιγραφεί και σε άλλες κακοήθειες. (9). Διάφορες επίσης μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν την επιθετικότητα του ΚΑΠΕ με την έκφραση του p53, αλλά τα αποτελέσματά τους είναι αντιφατικά. Στη μελέτη των Bar-Eli



και συν. η συχνότητα των μεταλλάξεων του p53 ήταν μόνο 26% στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν(50). Αντίθετα, υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 σε ποσοστό 53% παρατηρήθηκε σε μελέτη των Βriasoulis και συν. Στην ίδια μελέτη, η υπερέκφραση του bcl2 ανιχνεύθηκε στο 40%, ενώ καθεμία από τις ογκοπρωτεΐνες δεν συνδέθηκε με οποιαδήποτε κλινικοπαθολογοανατομική παράμετρο(51). Από την ίδια ομάδα διαπιστώθηκε υπερέκφραση των ογκογονιωματικών c-myc , Ras και HER2 σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά σε περιπτώσεις ΚΑΠΕ.(52) . Αντίθετα σύμφωνα με τους Hainsworth και συν. η HER2 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 11% σε περιπτώσεις ΚΑΠΕ χαμηλής διαφοροποίησης(53). Αναφορικά με την νεοαγγειογένεση η μικροαγγειακή πυκνότητα βρέθηκε αρχικά ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στο μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα ήπατος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας(54). Μια πιο πρόσφατη όμως μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα δεν κατάφερε να αποδείξει την προγνωστική αξία του VEGF και της ΜΠ σε παρόμοια ομάδα ασθενών(35).



Πίνακας 4. Υποομάδες ΚΑΠΕ ευνοϊκής και δυσμενούς πρόγνωσης (7)

Υποομάδες ευνοϊκής πρόγνωσης	Υποομάδες δυσμενούς πρόγνωσης
Φτωχής διαφοροποίησης καρκινώματα μέσης κατανομής	Μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα ήπατος ή και σε άλλα όργανα
Αδενοκαρκίνωμα περιτοναϊκής κοιλότητας σε γυναίκες	Κακοήθης ασκίτης (αδενοκαρκίνωμα)
Αδενοκαρκίνωμα μασχάλης σε γυναίκες	Πολλαπλές εγκεφαλικές μεταστάσεις αδενοκαρκινώματα ή πλακώδη καρκινώματα
Πλακώδες καρκίνωμα τραχηλικών λεμφαδένων	Πολλαπλές πνευμονικές η υπεζωκοτικές μεταστάσεις (αδενοκαρκινώματα)
Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενοπάθεια	Πολλαπλές οστικές μεταστάσεις (αδενοκαρκινώματα)
Φτωχής διαφοροποίησης νευροενδοκρινικά καρκινώματα	
Οστικές μεταστάσεις σε άνδρες και αυξημένη τιμή PSA	
Ασθενείς με μονήρη, σχετική μικρή, δυνητικά εξαιρεσιμη εστία	

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Στην κλινική πρακτική, η διαγνωστική έρευνα σε περιπτώσεις ΚΑΠΕ στρέφεται κατά συνήθεια στην αναζήτηση λανθάνουσας πρωτοπαθούς εστίας για την κατά το δυνατό πιο "εξειδικευμένη" θεραπευτική αντιμετώπιση. Έχει όμως αποδειχθεί ότι εκτεταμένος διαγνωστικός έλεγχος επιβαρύνει αναπαισιολόγητα τον άρρωστο με ΚΑΠΕ αυξάνοντας το διαγνωστικό κόστος χωρίς ουσιαστικό διαγνωστικό ή θεραπευτικό όφελος (55;56). Μια ορθολογική διαγνωστική προσέγγιση εστιάζει κατά κύριο λόγο στην αναζήτηση των διακριτών υπο-ομάδων, στις οποίες η χορήγηση χημειοθεραπείας μπορεί να προσφέρει μακροχρόνια ύφεση ή ακόμη και ίαση(5;57). Σε αυτό το πλαίσιο η λελογισμένη χρήση απεικονιστικών και ενδοσκοπικών εξετάσεων σε συνδυασμό με εξειδικευμένα ανοσοϊστοχημεία και σε ορισμένες περιπτώσεις, μοριακές και κυτταρογενετικές μέθοδοι μπορούν να συμβάλουν ουσιαστικά στη διάγνωση(58). Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ταυτοποιηθούν οι υπο-ομάδες ΚΑΠΕ περισσότερο ευνοϊκής πρόγνωσης και να αποφευχθούν εσφαλμένες ιστοπαθολογοανατομικές διαγνώσεις(59;60).

Συνοπτικά, ο βασικός έλεγχος για τεκμηρίωση διάγνωσης ΚΑΠΕ θα πρέπει να περιλαμβάνει ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού με ανοσοϊστοχημεία, βασικές αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις, μικροσκοπική εξέταση ούρων, εξέταση κοπράνων για ανίχνευση αίματος και - από τις απεικονιστικές εξετάσεις - ακτινογραφία θώρακος και αξονική υπολογιστική τομογραφία κοιλίας και πυέλου. Για ορισμένες υπο-ομάδες συνιστάται ειδικός έλεγχος όπως: ΩΡΛ πανένδοσκόπηση και αξονική τομογραφία σπλαχνικού κρανίου -τραχήλου σε περιπτώσεις τραχηλικής λεμφαδενικής νόσου από επιδερμοειδές καρκίνωμα(61) και μαστογραφία σε περιπτώσεις γυναικών με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα σε μασχαλιαίους λεμφαδένες, αν και η ευαισθησία αυτής της εξέτασης στο πλαίσιο του ΚΑΠΕ αμφισβητείται(62).



ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η φυσική εξέταση πρέπει να είναι ενδελεχής και να μην παραλείπεται η ψηλάφηση του θυρεοειδή αδένος και η δακτυλική εξέταση του ορθού. Στις γυναίκες οι μαστοί και η πύελος και στους άνδρες ο προστάτης αδένος θα πρέπει να περιλαμβάνονται την αρχική φυσική εξέταση.

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ

Ο έλεγχος διαλυτών καρκινικών δεικτών στον ορό των ασθενών με ΚΑΠΕ έχει περιορισμένη κλινική σημασία αναφορικά με τη διάγνωση της πρωτοπαθούς εστίας αλλά και την πρόγνωση της νόσου. Σε παλαιότερη μελέτη των Pavidis και συν, αξιολογήθηκε η ορολογική έκφραση των έξι χρησιμοποιούμενων στην κλινική πράξη καρκινικών δεικτών (CEA, CA15-3, CA 19-9, CA 125, β-HCG και AFP) και διαπιστώθηκε πολλαπλή μη ειδική έκφραση στην πλειονότητα των ασθενών: 70% από τους ασθενείς είχαν άνω των τριών δεικτών με παθολογικά αυξημένες τιμές, ενώ δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους (63). Παρά την απουσία κλινικής σημασίας των καρκινικών δεικτών ορού σε ασθενείς με διαγνωσμένο ΚΑΠΕ, συνιστάται να γίνεται εκτίμηση των τιμών στον ορό του PSA και της β-HCG σε άνδρες προκειμένου να αποκλεισθεί η άτυπη κλινική εκδήλωση εξωγοναδικού όγκου και καρκίνου προστάτη (64).

ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Ο συμβατικός ακτινολογικός έλεγχος παρουσιάζει περιορισμένη διαγνωστική αξία στο πλαίσιο του συνδρόμου ΚΑΠΕ. Η απλή ακτινογραφία θώρακος αποτελεί προϋπόθεση για τη διάγνωση αλλά έχει μικρή μόνο συμβολή στη διαφορική διάγνωση μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς ενδοθωρακικής νεοπλασματικής νόσου (65). Βασικό απεικονιστικό εργαλείο στην διαγνωστική



προσέγγιση του ΚΑΠΕ αποτελεί η αξονική υπολογιστική τομογραφία (5;66) Νεότερες απεικονιστικές τεχνικές, όπως το PET-CT scan υποστηρίζεται ότι μπορεί επηρεάσουν τη θεραπευτική παρέμβαση σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με ΚΑΠΕ. (5;67-74)

ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ενδοσκοπικός έλεγχος σε περιπτώσεις ασθενών με ΚΑΠΕ θα πρέπει να είναι καθοδηγούμενος από τη συμπτωματολογία ή τη σημειολογία της νόσου. (5;7)

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Η ιστοπαθολογική ανασκόπηση αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο στην περίπτωση μεταστατικού καρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Γι αυτό, σε περίπτωση ανεπαρκούς ή ακαταλλήλου βιοπτικού υλικού η επανάληψη της βιοψίας κρίνεται προτιμότερη από κάθε άλλη διαγνωστική πράξη. Εξ ορισμού, η συμβατική απλή μικροσκόπηση με τις χρώσεις ρουτίνας δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει την πρωτοπαθή εστία της νεοπλασίας στα ΚΑΠΕ (60) και πολύ περισσότερο, αδυνατεί να προσδιορίσει ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά πρόβλεψης πιθανής ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (75).

Βασική συμβολή της ανοσοϊστοχημείας αφορά στη διαφορική διάγνωση των ΚΑΠΕ από άλλης ιστογενετικής προέλευσης νεοπλάσματα (59). Επίσης συγκεκριμένα πρότυπα συνδυασμένης έκφρασης των κυτταροκερατινών CK7 και CK20 έχει δειχθεί ότι έχουν ικανή ευαισθησία κατάδειξης της λανθάνουσας πρωτοπαθούς εστίας. [CK20+/CK7+ για παγκρεατικό καρκίνο, CK20+/CK7- για κολο-ορθικό καρκίνο CK20-/CK7+ για καρκίνο πνεύμονα και μαστού] (76;77).



ΠΡΟΗΓΜΕΝΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση μπορεί να συνεισφέρει διαγνωστικά στο 15% των αδιαφοροποίητων νεοπλασμάτων άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τις συμβατικές παθολογοανατομικές τεχνικές, προσφέροντας διαγνωστική ακρίβεια στο 30% των περιπτώσεων(78).

Μοριακές και κυτταρογενετικές μελέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση όγκων για τους οποίους έχουν αναγνωρισθεί ειδικοί μοριακοί και κυτταρογενετικοί δείκτες και οι οποίοι μπορεί να εκδηλωθούν κλινικά ως αδιαφοροποίητα ΚΑΠΕ. Τέτοιοι δείκτες είναι η αντιμετάθεση t(11,22) στους στρογγυλο-μικροκυτταρικούς όγκους Ewing/PNET(79) και η ισοχρωμοσωμία i(12p) στους όγκους από γενετικά κύτταρα(80). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της τεχνικής του *in situ* υβριδισμού για την ανίχνευση της ισοχρωμίας i(12p) στην περίπτωση εξωγοναδικών όγκων από γεννητικά κύτταρα που εκδηλώνονται κλινικά σαν μεταστατικά καρκινώματα πτωχής διαφοροποίησης και δεν εκφράζουν αυξημένα επίπεδα των ειδικών ορολογικών καρκινικών δεικτών των γοναδικών όγκων AFP και β-HCG(81).

ΚΑΠΕ: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ

Το ΚΑΠΕ είχε ανέκαθεν ταυτισθεί με δυσμενή πρόγνωση και κάθε θεραπευτική προσπάθεια κρινόταν απογοητευτική(4). Σήμερα έχει αναγνωρισθεί ότι υπό τον όρο ΚΑΠΕ συμπεριλαμβάνονται υπο-ομάδες διαφορετικής πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και ως εκ τούτου η θεραπευτική τακτική θα πρέπει να προσαρμόζεται κατά περίπτωση(7). Η θεραπεία μπορεί να είναι περιοχική ή συστηματική, να έχει θεραπευτικό ή ανακουφιστικό στόχο ή τέλος να είναι απλά υποστηρικτική



ΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στα ΚΑΠΕ πρακτικές τοπικής η περιοχικής αντιμετώπισης με ακτινοθεραπεία ή χειρουργική, περιορίζονται στις περιπτώσεις εντοπισμένης λεμφαδενικής νόσου που εστιάζεται είτε στην περιοχή του τραχήλου σε στάδιο N2 και μικρότερο, είτε στη μασχάλη σε γυναίκες ασθενείς(82). Σε περιπτώσεις τραχηλικής νόσου υψηλότερων σταδίων (N3), συνδυασμένη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία σισπλατίνας προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα ανταπόκρισης και επιβίωσης (82;83).

ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Δοκιμαστική ορμονοθεραπεία επιχειρείται στις περιπτώσεις ηλικιωμένων ανδρών με ΚΑΠΕ με υψηλή τιμή PSA στον ορό ή θετική χρώση στο βιοψτικό δείγμα ή με οστεοβλαστικές οστικές μεταστάσεις(84;85). Η χορήγηση ταμοξιφαίνης ενδείκνυται σε περιπτώσεις γυναικών με αδενοκαρκίνωμα το οποίο εκφράζει θετικότητα για οιστρογονικούς υποδοχείς και κυρίως σε περιπτώσεις με εντόπιση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες, σε συνδυασμό με τοπική θεραπεία(86;87) .

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Με εξαίρεση τις κλινικές υπο-ομάδες λιγότερο δυσμενούς πρόγνωσης οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί τις τελευταίες δυο δεκαετίες ως ιδιαίτερα χημειοευαίσθητες, κανένα χημειοθεραπευτικό σχήμα δεν έχει αποδεχθεί δραστικό για την μεγάλη ομάδα των ασθενών με ηπατικές, οστικές ή πολύ-οργανικές μεταστάσεις από ΚΑΠΕ(16;57). Οι μέχρι τώρα κλινικές μελέτες που αφορούσαν ποικίλους εμπειρικούς χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς κατέληξαν σε απογοητευτικά αποτελέσματα(88;89).

Κλινικές υπο-ομάδες λιγότερο δυσμενούς πρόγνωσης μετά από συστηματική χημειοθεραπεία αποτελούν ασθενείς με νόσο μέσης γραμμής (χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με ανατομική εντόπιση



σε οπισθοπεριτοναϊκούς και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες) και γυναίκες με περιτοναϊκή καρκινωμάτωση. Και στις δυο αυτές υποομάδες ασθενών η νεοπλασματική νόσος παρουσιάζει ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με βάση την πλατίνα (37;90).

Στην διεθνή ιατρική βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που να υποστηρίζουν την υπεροχή ενός φαρμάκου ή συνδυασμού χημειοθεραπευτικών παραγόντων στην ομάδα των ασθενών με σπλαχνική/πολυσυστηματική μεταστατική εντόπιση. Στις περισσότερες μελέτες το ποσοστό ανταπόκρισης είναι κάτω του 25% και η διάμεση επιβίωση των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία κυμαίνεται από 5,5 έως 11 μήνες(91-94). Το πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε αυτούς τους ασθενείς δεν φαίνεται να αναστρέφεται ούτε με την χορήγηση χημειοθεραπείας υψηλών δόσεων(95;96).

Στον πίνακα 5 αναφέρονται οι προτεινόμενες θεραπευτικές στρατηγικές σύμφωνα με τις κλινικές υποομάδες ΚΑΠΕ.

Η εμπειρική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία φαίνεται ότι έχει φθάσει σε φάση "πλατώ" ως προς την κλινική δραστικότητα στην ομάδα ασθενών με σπλαχνική ή πολυσυστηματική εντόπιση ΚΑΠΕ. Ο δρόμος για περαιτέρω βελτίωση της θεραπείας περνά από τη γνώση της μοριακής βιολογίας αυτών των όγκων, την μεταφραστική έρευνα και την εισαγωγή σε θεραπευτική δοκιμασία βιολογικών παραγόντων με ειδικότητα στόχων(97). Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται και η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Στην κλινική πράξη, σε θεραπεία εκτός πρωτοκόλλου, οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να αντιμετωπίζονται κατά την κρίση του θεράποντος ογκολόγου ή με σχήμα ήπιας τοξικότητας ή και με μόνη συμπτωματική αγωγή.



Πίνακας 5: Θεραπευτική αντιμετώπιση(7).

Υπο-τύπος ΚΑΠΕ	Προτεινόμενη θεραπεία
Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα με κατεξοχήν λεμφαδενική εντόπιση	Συνδυασμός πλατίνας ± ταξάνης
Περιτοναϊκή καρκινωμάτωση γυναικών	Παρόμοια με καρκίνο ωθήκης FIGO III: χημειοθεραπεία πλατίνας ± ταξάνης
Μεμονωμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις μασχάλης σε γυναίκες	Όπως σε γυναίκες με καρκίνο μαστού και παρόμοια συμμετοχή λεμφαδένων
Πλακώδες καρκίνωμα τραχηλικών λεμφαδένων	Ακτινοθεραπεία για νόσο σταδίου N1-N2. Εισαγωγική χημειοθεραπεία πλατίνας για νόσο N3
Ηπατικές/οστικές ή πολυσυστηματικές μεταστάσεις από αδenoκαρκίνωμα.	Συμμετοχή σε πρωτόκολλα θεραπευτικών δοκιμασιών ή χημειοθεραπεία ήπιας τοξικότητας. Μόνο συμπτωματική αγωγή είναι αποδεκτή



Η ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ

Ως μετάσταση χαρακτηρίζεται η διαδικασία μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων από το σημείο στο οποίο αναπτύχθηκαν αρχικά (πρωτοπαθής εστία) και η εγκατάσταση και ανάπτυξή τους σε μια απομακρυσμένη περιοχή του οργανισμού. Ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται ελεγχόμενα σε συγκεκριμένες ανατομικές θέσεις, τα καρκινικά κύτταρα, όταν το καρκίνωμα γίνει διηθητικό, μπορούν και ξεφεύγουν από τις αρχικές θέσεις και μεταναστεύουν μέσω της αιματικής και της λεμφικής οδού σε απομακρυσμένες θέσεις που ορίζονται από εξειδικευμένη αντίδραση του καρκινικού κυττάρου με το υπόστρωμα του ξενιστή οργάνου (98).

Πρώτες κλινικές ερευνητικές αναφορές σχετικά με την ειδικότητα της καρκινικής μετάστασης ανάγονται στα τέλη του 19^{ου} αιώνα όταν ο χειρουργός Stephan Paget υιοθέτησε τη θεωρία σπόρου-εδάφους (seed and soil theory) την οποία είχε πρωτοδιατυπώσει μερικά χρόνια πριν ο Γερμανός Fucks (99). Η διαδικασία της μετάστασης αρχίζει από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των όγκων και το μεταστατικό δυναμικό διαφέρει από όγκο σε όγκο αλλά και μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων. Εκτός από το μεταστατικό φαινόμενο καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης παίζει και το μικροπεριβάλλον της περιοχής που θα εγκατασταθούν τα μεταστατικά κύτταρα.

Στα πλαίσια μελέτης και κατανόησης της μεταστατικής διαδικασίας έχουν διακριθεί τα παρακάτω βήματα(100):

- 1) Επιθηλιακο-μεσεγγυματικός μετασχηματισμός των κυττάρων των όγκων και προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων
- 2) Αποχωρισμός από τον πρωτοπαθή όγκο, συσσώρευση, τοπική διήθηση και έξοδος των καρκινικών κυττάρων στο ενδοκυττάριο χώρο



- 3) αγγειογένεση και παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία
- 4) στάση και προσκόλληση στο αγγειακό τοίχωμα
- 5) εξαγγείωση, πολλαπλασιασμός και αύξηση των καρκινικών κυττάρων στην απομακρυσμένη εστία.

Ο μετασχηματισμός των καρκινικών κυττάρων είναι το καθοριστικό βήμα για την τοπική διήθηση και την έναρξη της μεταστατικής διαδικασίας(101). Τα καρκινικά κύτταρα που υφίστανται επιθηλιο-μεσεγχυματικό μετασχηματισμό υφίστανται παροδικές αλλαγές στη δομή τους με αποτέλεσμα να χάνουν την πολικότητά τους και την επαφή τους με τα γειτονικά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό προσδίδονται κινητικές ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα που αποσπώνται στη συνέχεια από τον πρωτοπαθή όγκο και κινούνται προς τον ενδοκυττάριο χώρο(102). Η πιο σπουδαία ίσως αλλαγή που υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα κατά τη φάση του επιθηλιο-μεσεγχυματικό μετασχηματισμού είναι η απώλεια της έκφρασης της E-cadherin. Ο ρόλος της E-cadherin αφορά στη δημιουργία σταθερών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων, χαρακτηριστικό του επιθηλιακού φαινοτύπου. Η απώλεια της λειτουργίας αυτής κάνει τις συνδέσεις πιο χαλαρές και τα κύτταρα πιο ευκίνητα πλέον μπορούν να αποσπασθούν από τον πρωτοπαθή όγκο(103). Στο κακόηθες μελάνωμα για παράδειγμα, η απώλεια της έκφρασης της E-Cadherin συνδέεται με την κάθετη φάσης ανάπτυξης(104).

Κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν εξειδικευμένες ιδιότητες απαραίτητες να τους αποδώσουν τις μεταστατικές ικανότητες. Αυτοκρινείς και παρακρινείς παράγοντες ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και την κινητοποίηση των καρκινικών κυττάρων. Έτσι οι όγκοι αποκτούν σχετική αυτονομία και είναι σε θέση να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν κάτω από τις αντίξοες συνθήκες της υποξίας και των τοξικών μεταβολιτών του μικροπεριβάλλοντος(105).



Κατά το μετασχηματισμό των καρκινικών κύτταρων, τα κύτταρα έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και ενισχύονται οι μεταστατικές τους ικανότητες μέσω των μορίων προσκόλλησης (106). Επίσης μέσω των προσκολλητικών μορίων τα καρκινικά κύτταρα προσεγγίζουν και προσκολλώνται στις βασικές μεμβράνες(107). Αντιπροσωπευτικά προσκολλητικά μόρια είναι:

- ❖ η λαμινίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη αποκλειστικά της βασικής μεμβράνης με ικανότητα σύνδεσης με μια πλειάδα μεμβρανικών παραγόντων(108),
- ❖ οι ιντεγκρίνες (Integrins), οικογένεια διμερών μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών με ικανότητα σύνδεσης με διάφορα μόρια του εξωκυττάριου χώρου (ινονεκτίνη, λαμινίνη, θρομβοσποντίνη, κολλαγόνο τύπου I και παράγοντας von Willebrand). Οι ιντεγκρίνες μέσω φωσφορυλίωσης ρυθμίζουν τη μεταγωγή σημάτων πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων. Η σύνδεση των ιντεγκρινών με τις MMPs ευοδώνει τη λύση της θεμέλιας ουσίας και έχει σχετισθεί με αυξημένη επιθετικότητα των όγκων (109).

Οι μετασχηματισμένοι νεοπλασματικοί κλώνοι θα πρέπει να διαχωριστούν από τον αρχικό όγκο και να διηθήσουν τοπικά τη θεμέλια ουσία. Ο διαχωρισμός και η τοπική διήθηση είναι αποτέλεσμα δύο διαδικασιών: της διάσπασης της θεμέλιας ουσίας και της κινητικότητας των νεοπλασματικών κυττάρων. Στη λειτουργία αυτή βασικό ρόλο παίζει η δημιουργία ψευδοποδίων, μεμβρανικών προεκβολών των καρκινικών κυττάρων, που είναι ικανά να μεταδίδουν σήματα κίνησης και ηρωτεόλυσης μέσω των παραπάνω μορίων(110).

Η διήθηση των αγγείων από τα καρκινικά κύτταρα επιτρέπει τελικά τη διέλευσή τους στη συστηματική κυκλοφορία. Για την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία απαραίτητες λειτουργίες είναι η αγγειογένεση, η λεμφαγγειογένεση, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των παραγόντων του στρώματος, η



προσκόλληση και η μεμβρανική διάσπαση(111). Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων γίνεται μέσω των τριχοειδών και των λεμφαγγείων. Επίσης τα νεοπλασματικά κύτταρα διέρχονται ευκολότερα των νεοαγγείων λόγω της ελαττωματικής τους κατασκευής (ελλείμματα μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, ελλείμματα συνοχής ή ακόμη και απουσία της βασικής στοιβάδας)(112).¹

Τα κυκλοφορούντα νεοπλασματικά κύτταρα θεωρητικά είναι ακίνδυνα και δεν αναπτύσσονται μέσα στο σχετικά αφιλόξενο ενδαγγειακό περιβάλλον(113). Ένας όμως αριθμός των κυττάρων από αυτά τελικά επιβιώνει, προσκολλάται στη βασική μεμβράνη των αγγείων, τη διηθεί, εξαγγειώνεται και εγκαθίσταται στην απομακρυσμένη εστία (114). Χαρακτηριστικά, σε πειραματική μελέτη, κατά την οποία μελανωματικά κύτταρα ενέθηκαν στο ήπαρ ποντικών, ενώ 83% ανιχνεύθηκε στη συστηματική κυκλοφορία μόνο 2% οργανώθηκε σε μικρομεταστατικές δομές και 0,02% επιβίωσε και δημιούργησε μακρομεταστάσεις (115).

Τα καρκινικά κύτταρα εντός των αγγείων στρατολογούν λεμφοκύτταρα και αιμοπετάλια και δημιουργούνται νεοπλασματικά έμβολα που σε ορισμένες περιπτώσεις αποφράσσουν τον αυλό των τριχοειδών δημιουργώντας θρόμβους ινικής. Τα νεοπλασματικά κύτταρα σε σχηματισμούς εμβόλων είναι πιο σταθεροποιημένα και αλληλεπιδρούν με τη βασική μεμβράνη των αγγείων με σκοπό την εξαγγείωσή τους(116).

Η στάση και η προσκόλληση μπορούν να εκδηλωθούν σε πολλές θέσεις, και περιλαμβάνουν περιοχές ενδοθηλιακού τραυματισμού και επούλωσης, απ' όπου και μπορούν να εξέλθουν. Επίσης, η στάση των καρκινικών κυττάρων είναι πιο εφικτή σε αγγειακές δομές με πιο μικρό εύρος αυλού (πχ τριχοειδή). Χαρακτηριστικό παράδειγμα παγίδευσης αποτελούν τα πνευμονικά τριχοειδή(117). Τέλος, τοπογραφικά η αιματική κυκλοφορία μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά των

¹ Το κεφάλαιο της αγγειογένεσης συζητείται αναλυτικά παρακάτω και μάλιστα πριν το κεφάλαιο της πρωτεόλυσης, γιατί η αγγειογένεση είναι θεωρητικά μια διαδικασία που προηγείται χρονικά της πρωτεόλυσης.



καρκινικών κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συχνή εμφάνιση ηπατικών μεταστάσεων από όγκους του γαστρεντερικού. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια επιλεκτικότητα μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των οργάνων αλλά και των συγκεκριμένων θέσεων εντός του οργάνου που θα φιλοξενήσουν τα καρκινικά κύτταρα που ρυθμίζεται από χημειοτακτικούς παράγοντες(118;119).

Τα καρκινικά κύτταρα, όταν εγκατασταθούν στην απομακρυσμένη εστία, μπορούν είτε να καταστραφούν από ανοσολογικούς και μη ανοσολογικούς μηχανισμούς, είτε να παραμείνουν σε ληθαργική-αδρανή κατάσταση για μακρό χρονικό διάστημα, όπου θα επαναενεργοποιηθούν αργότερα μέσα από κατάλληλα ερεθίσματα (πχ ανοσοκαταστολή), είτε να συνεχίσουν την ανάπτυξη τους(120). Οι τοπικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος της περιοχής που υποδέχεται τη μετάσταση, κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθορίζουν σε υψηλό βαθμό την περαιτέρω ανάπτυξη των καρκινικών μεταστάσεων(121).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος αποτελεί το μελάνωμα το οποίο μπορεί να παραμένει σε ληθαργική κατάσταση για χρόνια πριν εκδηλωθούν κλινικά οι μεταστάσεις. Έχει δειχθεί ότι τα μελανωματικά κύτταρα μπορούν να επιβιώνουν επί μακρόν είτε ως μεμονωμένα χωρίς να υφίστανται τις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης, είτε με τη μορφή μικρομεταστάσεων διατηρώντας μια σταθερή σχέση πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, χωρίς να έχουν την ανάγκη αγγείωσης (122;123).



Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΩΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αγγειογένεση αντιπροσωπεύει ένα ουσιαστικό βήμα στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των κακοηθών όγκων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι υπάρχουν δύο στάδια ανάπτυξης των όγκων σχετικά με το αγγειακό δυναμικό τους (εικόνα 1). Κατά τη διάρκεια του αρχικού, ανάγγειου σταδίου της αύξησης των όγκων (μάζα όγκων < 0,5 χιλ.), η διατροφή και οι ανάγκες σε οξυγόνο μπορούν να επιτευχθούν μέσω της διάχυσης. Όταν όμως η μάζα των όγκων γίνεται μεγαλύτερη από 0,5 χιλ., η διατροφή μέσω της διάχυσης πλέον δεν είναι επαρκής και ο σχηματισμός νεοαγγειακών σχηματισμών είναι απαραίτητος για την περαιτέρω αύξησή τους (αγγειακό στάδιο). Έτσι, ο όγκος παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση έως ότου μπορεί να επάγει την αύξηση αγγείων από τα κοντινά προϋπάρχοντα τριχοειδή αγγεία, μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση(124). Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι σύνθετη και περιλαμβάνει διάφορα βήματα του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, της οργάνωσης σε τρισδιάστατες δομές, και της αλληλεπίδρασης με άλλες δομές προκειμένου να διαμορφωθεί νέο αγγειακό δίκτυο.



Εικόνα 1: Νεοαγγειογένεση και αύξηση του όγκου: από το άνευ αγγείων στο αγγειοβριθές στάδιο. Folkman J. Angiogenesis In cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; 1(1):27-31.(125)



ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗΣ

Με την πρόοδο της διαδικασίας της αγγειογένεσης των όγκων, νέα τριχοειδή αγγεία εισβάλλουν και περιβάλλουν στον όγκο, παρέχοντάς του τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ταχεία ανάπτυξή του(126). Τα κύτταρα των όγκων μπορούν έπειτα να μεταναστεύσουν από τον όγκο προς την κυκλοφορία, γεγονός που δυνητικά οδηγεί στη μετάσταση.

Έξι διακριτά στάδια χαρακτηρίζουν την αγγειογένεση των όγκων(124).

Αυτά είναι:

1. αλλαγή στην ισορροπία μεταξύ των αγγειογενών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων
2. αλλαγή στη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων
3. απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων
4. μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμός των τριχοειδικών δομών



5. αναπαραγωγή των ενδοθηλιακών κυττάρων

6. διαφοροποίηση των παραπάνω σχηματισμών σε νεοαγγεία

Η απελευθέρωση των πρωτεολυτικών ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του αγγειακού τοιχώματος, καθώς επίσης και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας(127). Σαν συνέχεια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν μέσω των κανονικών αγγείων, αλλά και των νεοσχηματισμένων σωληνωδών μορφών.

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα ενδοθηλιακά κύτταρα, το αγγειακό τοίχωμα, και τη βασική μεμβράνη μεταξύ των αγγείων ενός όγκου και των κανονικών αγγείων(128). Πολλά ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων βρίσκονται σε φάση μίτωσης και έχουν χάσει διάφορα δομικά χαρακτηριστικά που βρίσκονται στα κανονικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα πρόσφατα διαμορφωμένα αγγεία των όγκων είναι πιο λεπτή από αυτή των κανονικών αγγείων. Επιπλέον, τα αγγεία των όγκων έχουν διάκενα και αυξημένη διαπερατότητα, και συνήθως δεν παρατηρείται η ωρίμανση των φυσιολογικών τριχοειδικών δομών. Επιπλέον, τα νεοαγγεία στερούνται των μυϊκών και νευρικών συστατικών των φυσιολογικών αγγείων, τα οποία είναι αρμόδια για τις συστολικές και διαστολικές απαντήσεις στα αγγειακά ερεθίσματα καθώς και την υποστήριξη από περικύτταρα (124;129).

Εκτός από τις δομικές υπάρχουν και ορισμένες φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ του ενδοθηλίου του αγγείου του όγκου και του κανονικού ενδοθηλίου. Μόρια όπως οι υποδοχείς του VEGF, οι ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5, γλυκοπρωτεΐνες, προσκολλητικά μόρια και πρωτεάσες λειτουργούν και ρυθμίζονται διαφορετικά σε κάθε περίπτωση (130;131). Ορισμένες από τις διαφορές των φαινοτύπων των ενδοθηλιακών κυττάρων στους φυσιολογικούς και στους κακοήθεις ιστούς είναι πλέον γνωστές και περιλαμβάνουν μια σημαντική αύξηση της έκφρασης των ιντεγκρινών ανβ3 και ανβ5 (132;133). Έχει δειχθεί



ότι η ιντεγκρίνη ανβ3 εκφράζεται κατά προτίμηση από αγγεία των όγκων αλλά όχι από κανονικό αγγεία σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο (134). Άλλοι δείκτες που εκφράζονται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα περιλαμβάνουν τα προσκολλητικά μόρια όπως την E-Selectin (135), την ενδογλίνη(136), γλυκοπρωτεΐνες όπως το προστατικό ειδικό μεμβρανικό αντιγόνο (PSA) (137), την ινονεκτίνη (138) και διάφορες πρωτεάσες (139). Πολλά από αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά των ενδοθηλίων των όγκων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Οι όγκοι εκφράζουν ταυτόχρονα προαγγειογενετικούς και αντιαγγειογενετικούς παράγοντες (πίνακας 6). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η διαδικασία της αγγειογένεσης ρυθμίζεται και ελέγχεται μέσω διατήρησης της ισορροπίας αυτών των παραγόντων, ενώ στην περίπτωση της κακοήθειας διαταράσσεται προς όφελος της ενίσχυσης της αγγειογένεσης.

Η αγγειογένεση μπορεί να προκύψει από την έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων από τα κύτταρα των όγκων ως απάντηση σε ορισμένα ερεθίσματα. Το καλύτερα μελετημένο εξωτερικό ερέθισμα είναι η ιστική υποξία (140;141). Η υποξία αυξάνει την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) καθώς επίσης και άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες (142-144).



Πίνακας 6. Αγγειογενετικοί παράγοντες

Αυξητικοί παράγοντες	αγγειοτροπίνη
	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF
	G-CSF
	Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων
	PDGF
	PD-ECGF
	TNF- α
	VEGF
	FGF
Πρωτεάσες	Ζελατινάσες
	UPA
Ογκογονίδια	Ras
	c-myc
Κυτταροκίνες	Ιντερλευκίνες 1,6,8
Ενδογενείς ρυθμιστές	Ιντεργκρίνες
	Αγγειοποιητίνη-1
	Ενδοθηλίνη
	Ερυθροποιητίνη
	Υποξία
	Νιτρικό οξύ
	Ενεργοποιητής παράγων των αιμοπεταλίων
	Προσταγλανδίνη E
	Θρομβοποιητίνη
	Θρομβοσποντίνη

Η αγγειογένεση αποτελεί ουσιαστική βιολογική διαδικασία για την αύξηση των περισσότερων όγκων τόσο κατά το αρχικό τους στάδιο, αλλά και κατά το στάδιο της ανάπτυξης των μεταστάσεων σε απομακρυσμένες περιοχές του οργανισμού. Η διαδικασία της αγγειογένεσης περιλαμβάνει τη στρατολόγηση γειτονικά ώριμων αγγειακών σχηματισμών για να αρχίσουν με κάποιο ερέθισμα τα νέα τριχοειδή αγγεία να αυξάνονται και να διεισδύουν στη συνέχεια προς τη μάζα του όγκου(145). Επιπλέον, τόσο η φυσιολογική όσο και η παθολογική αγγειογένεση περιλαμβάνει τη στρατολόγηση



ενδοθηλιακών κυττάρων που υπάρχουν στο μυελό των οστών για να προωθηθεί η διαδικασία σχηματισμού των νεοαγγείων (146).

Τόσο η φυσιολογική αγγειογένεση όσο και η νεοαγγειογένεση των όγκων ρυθμίζεται από ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος, μερικοί από τους οποίους, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), έχουν μεγάλη ειδικότητα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ άλλοι, όπως ο βασικός παράγοντας αύξησης ινοβλαστών (bFGF) και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), έχουν ένα πολύ ευρύτερο πεδίο δράσης(147-149). Οι ενεργοποιητές μπορούν να παραχθούν είτε από τους ίδιους τους όγκους, είτε από τους περιβάλλοντες ιστούς με τη συμμετοχή μακροφάγων και ινοβλαστών (145;150). Η πλειοψηφία των παραγόντων αυτών ασκούν τη δράση τους μέσω υποδοχέων της επιφάνειας των κυττάρων, για τους οποίους χρησιμεύουν ως συνδέτες, οδηγώντας τελικά στην έκκριση επιπλέον αγγειοτρόπων παραγόντων. Άλλα ερεθίσματα για την αγγειογένεση πέραν της ιστικής υποξίας είναι η υπογλυκαιμία, και η μηχανική πίεση (150). Στην περίπτωση των μεταλλοπρωτεϊνών, η ευόδωση της αγγειογένεσης ενισχύεται με την πρωτεόλυση με τη διάσπαση των συστατικών της βασικής μεμβράνης και ακολούθως την διαδοχική απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (151;152). Οι όγκοι μπορούν να παραμείνουν αδρανείς για χρόνια, πριν μεταπέσουν στον αγγειογενή φαινότυπο. Αυτή η μετατροπή, γνωστή ως αγγειογενετικός μετασχηματισμός (angiogenic switch), θεωρείται ότι προκύπτει από μια διαταραχή στην ισορροπία των μεταξύ ανασταλτικών και διεγερτικών παραγόντων προς όφελος της αγγειογενετικής διέγερσης (151;153).

Πολλοί από τους ίδιους τύπους γενετικών αλλαγών που κρύβονται κάτω από τον κακοήγη μετασχηματισμό, όπως η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και η απώλεια των ανασταλτικών των όγκων γονιδίων (tumor suppressor genes), είναι επίσης σε θέση να θέσουν σε λειτουργία τον αγγειογενετικό μετασχηματισμό (154). Μόλις ξεκινήσει η διαδικασία, η αγγειογένεση όχι μόνο επιτρέπει την αύξηση του αρχικού



όγκου, αλλά τα δημιουργούμενα νεοαγγεία προσφέρουν επίσης άλλη μια διαδρομή για τη μετάσταση, από όπου τα μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν και να μεταναστεύσουν προς την κυκλοφορία. Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι, εάν τα κύτταρα βρίσκονται ήδη σε φάση μετασχηματισμού, η αγγειογένεση μπορεί να αρχίσει με μια μάζα όγκων αποτελούμενης μόνο από 100-300 κύτταρα (155). Η σύνδεση μεταξύ της αγγειογένεσης και της μετάστασης σε κλινικό επίπεδο έχει μελετηθεί με βάση τη συσχέτιση της μικροαγγειακής πυκνότητας (ΜΠ) με την κλινική έκβαση του αρχικού όγκου. Οι Weidner και συν. χρησιμοποίησαν αντισώματα κατά του παράγοντα VIII για να χαρακτηρίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεοαγγείων σε ανθρώπινους όγκους καρκίνου του μαστού και έδειξαν ότι η ΜΠ αποτελεί έναν αρνητικό προγνωστικό παράγοντα(156). Η μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας έχει επεκταθεί σε ποικιλία όγκων και έχει πλέον καθιερωθεί ο συσχετισμός της αγγειογένεσης με τη μεταστατικότητα των όγκων (157-159).

Ο ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF

Ο παράγων VEGF, ή VEGF-A, ή αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας, όπως επίσης ονομάζεται, ανήκει στην οικογένεια του PDGF. Μέλη της ίδιας οικογένειας είναι ο VEGF-B, ο VEGF-C, ο VEGF-D ο VEGF-E και ο placenta growth factor (PlGF) -1 και 2. Ο VEGF-A είναι ο κύριος υπεύθυνος παράγοντας της παθολογικής αγγειογένεσης και για λόγους ευκολίας στη βιβλιογραφία έχει επικρατήσει να αναφέρεται απλά ως VEGF. Όλοι οι παράγοντες παρουσιάζουν ποικίλους βαθμούς συγγένειας με τον VEGF(160).

Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του VEGF-A οδηγεί στο σχηματισμό τεσσάρων ισομορφών με 121, 165, 189, και 206 αμινοξέα, και άλλες λιγότερο συχνές παραλλαγές σύνδεσης(161). Η ισομορφή VEGF 165 που θεωρείται η κύρια δομική μορφή, είναι μια ομοδιμερική



γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 45-kD, που βρίσκεται τόσο σε διαλυτή ελεύθερη μορφή όσο και συνδεδεμένη με τη θεμέλια ουσία και είναι μιτογόνο(162). Οι ισομορφές VEGF 189 και 206 έχουν υψηλή συγγένεια με την ηπαρίνη και παραμένουν διαχωρισμένες από τη βασική μεμβράνη(163).

Η ισομορφή VEGF 121 είναι όξινη, δεν δεσμεύεται με την ηπαρίνη και εκκρίνεται από το κυτταρόπλασμα(164). Οι ισομορφές που είναι διαχωρισμένες από την θεμέλια ουσία μπορούν να απελευθερωθούν με ενζυματική αντίδραση είτε με τη δράση της ηπαρινάσης είτε μέσω σχάσης από την πλασμίνη και διάχυση του τμήματος που φέρει το όνομα VEGF 110(165). Η δράση της ισομορφής VEGF 165 περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση διαφόρων πρωτεασών, συμπεριλαμβανομένης και αυτής που οδηγεί στην παραγωγή της πλασμίνης και με την επακόλουθη απελευθέρωση των συνδεδεμένων με την πλασμίνη VEGF ισομορφών παρέχεται ένας επιπλέον μηχανισμός ενίσχυσης(166). Επίσης έχει δειχθεί ότι οι διάφορες ισομορφές παίζουν διαφορετικό ρόλο στην αγγειογένεση στις διάφορες ανατομικές περιοχές του οργανισμού (167).

Εκτός από την αγγειογένεση των όγκων ο VEGF-A παίζει ρόλο και στις διεργασίες της φυσιολογικής αγγειογένεσης, όπως είναι η επούλωση των τραυμάτων, η ωοθηλακιορρηξία, η έμμηνος ρύση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η εγκυμοσύνη. Επίσης ο VEGF-A έχει βρεθεί ότι συμμετέχει και σε μη νεοπλασματικές παθολογικές καταστάσεις (αρθρίτιδες, ψωρίαση, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια(168;169).

Για τους παράγοντες VEGF-B and PlGF δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα σαφής ρόλος τους τόσο στην φυσιολογική τους λειτουργία όσο και στην παθολογική ή την αγγειογένεση των όγκων(170). Οι παράγοντες VEGF-C and VEGF-D παίζουν ρόλο κατά τη διάρκεια τόσο της εμβρυϊκής όσο και της μεταεμβρυϊκής λεμφαγγειογένεσης, αλλά ο ρόλος τους στην νεοπλασματική αγγειογένεση παραμένει μέχρι σήμερα ασαφής(171).



Τέλος ο παράγοντας VEGF-E φαίνεται ότι μάλλον αποτελεί πρωτεϊνικό προϊόν του παρβοϊού Orf(172).

Οι δράσεις των VEGF πραγματοποιούνται μέσω της σύνδεσής τους με υποδοχείς που έχουν λειτουργία τυροσινικής κινάσης, τους VEGFR1 και VEGFR2. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων επάγει φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τους καταρράκτες μεταγωγής σήμανσης (173). Πιο πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί και τρίτος υποδοχέας, ο VEGFR 3, ο οποίος κατά κύριο λόγο σχετίζεται με τη λεμφαγγειογένεση(174).

Τα μέλη της οικογένειας του VEGF παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού συνδετική ικανότητα με τους δυο υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ο VEGFR2 εκφράζεται σχεδόν από το σύνολο των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ οι VEGFR1 και VEGFR3 εκφράζονται εκλεκτικά από ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε κανονικές αγγειακές δομές(160). Όλες οι ισομορφές του VEGF-A συνδέονται με τον VEGFR1 και με τον VEGFR2 με υψηλή συγγένεια(175). Οι περισσότερες από τις λειτουργίες του VEGF-A στην επαγωγή της αγγειογένεσης πραγματοποιούνται μέσω της σύνδεσής του με τον VEGFR2(176). Επίσης έχει βρεθεί ότι ο VEGFR2 από μόνος του αποτελεί δυνητικό ενεργοποιητή της αγγειογένεσης(177). Αντίθετα η σύνδεση του VEGF-A με τον VEGFR1 μπορεί να έχει τόσο θετική όσο και αρνητική δράση στην αγγειογένεση(178;179). Η ένταση του σήματος που παράγεται από τη σύνδεση του VEGF-A με τον VEGFR2 είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από ότι με τον VEGFR1(175).

Η γονιδιακή έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από έναν πλήθος ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων, του νιτρικού οξέος (NO) και ποικίλων αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας των ίνοβλαστών-4, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο μετατρεπτικός



αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης-1 (IGF-1) (180;181).

Σε συμφωνία με το ρόλο του στην αγγειογένεση των όγκων, η έκφραση του VEGF βρέθηκε ότι ευοδώνεται από γενετικά γεγονότα που οδηγούν στην κακοήθη εξαλλαγή, συμπεριλαμβανομένων την απώλεια των κατασταλτικών των όγκων γονιδίων όπως το p53 και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως των *ras*, *v-src* και *HER2* (182;183).

Επιπλέον, η έκφραση του VEGF είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην μερική πίεση του οξυγόνου των ιστών και ενεργοποιείται πιο γρήγορα από την ιστική υποξία που χαρακτηρίζει τους περισσότερους όγκους(184).

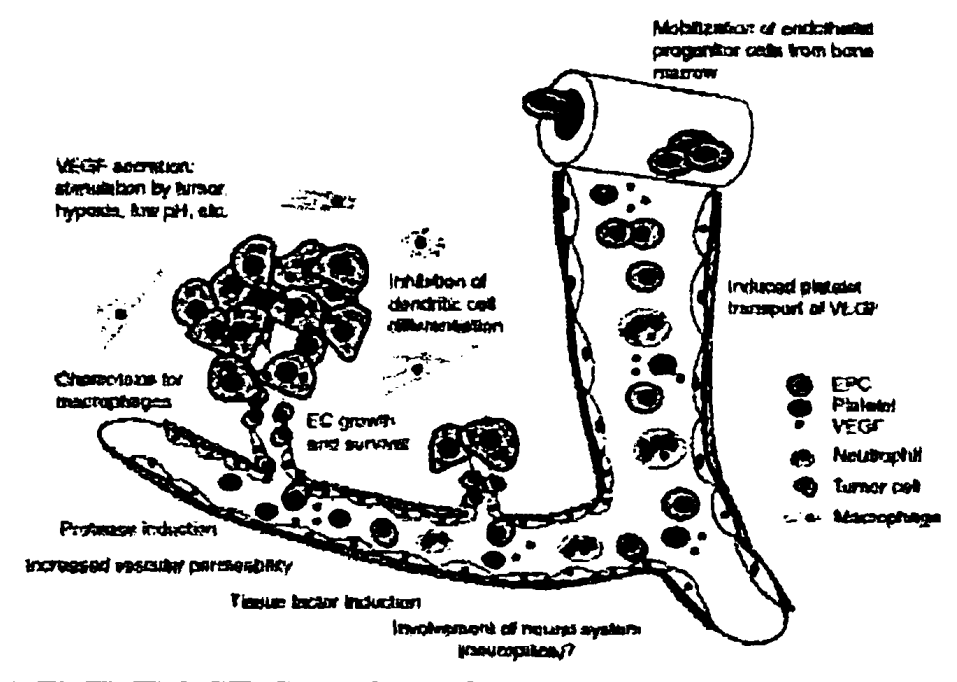
Χαρακτηριστικό είναι ότι σε πολλές μελέτες η μέγιστη έκφραση VEGF mRNA βρέθηκε στις νεκρωτικές (και πιθανώς υποξικές) περιοχές (185) (28). Όπως με τον VEGF, η ιστική υποξία οδηγεί επίσης στη υπερενεργοποίηση των γονιδίων των υποδοχέων του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, η ίδια η σύνδεση του VEGF με τους υποδοχείς του προκαλεί αυξανόμενη έκφραση των γονιδίων των VEGFR που οδηγεί στην περαιτέρω ενίσχυση της σηματοδότησης του VEGF (186).

ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF ΣΤΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ο VEGF διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής αγγειογένεσης (εικόνα 2). Χαρακτηριστικά, η απαλοιφή ενός μόνο αλληλόμορφου γονιδίου του είναι ικανή να οδηγήσει στο θάνατο του εμβρύου(187).



Εικόνα 2: Οι πολλαπλές λειτουργίες του VEGF κατά την αγγειογένεση.
Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; 1(1):27-31.(125).



Βασική δράση του VEGF είναι η μιτογόνος. Ο VEGF έχει ισχυρή μιτογόνο δράση στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ πλην μερικών εξαιρέσεων δεν είναι μιτογόνος για τους άλλους τύπους κυττάρων (166) .

Ο VEGF συμβάλλει στην έκκριση και την ενεργοποίηση των ενζύμων που δρουν στην διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Δρώντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGF προκαλεί την έκφραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και του ανασταλτικού παράγοντά του (188), την έκφραση του υποδοχέα της ουροκινάσης (189) και την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών κολλαγενάσης και ζελατινάσης-A που διασπούν

την θεμέλια ουσία ενώ φαίνεται να μειώνει παράλληλα τα επίπεδα των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών 1 και 2(190-192).

Ο VEGF ενεργεί επίσης ως παράγοντας επιβίωσης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της παρεμπόδισης της απόπτωσης (193). Αυτή η δράση επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-A1, της ρύθμισης της phosphatidylinositol 3-κινάσης/της Akt, της επαγωγής της φωσφορυλίωσης των εστιακών κινασών προσκόλλησης και της διέγερσης της παραγωγής νιτρικού οξέος και προσταγλανδίνης 12 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα(194;195).

Ο VEGF αποτελεί ουσιαστικό επίσης παράγοντα για την κινητοποίηση από το μυελό των οστών πρόδρομων μορφών ενδοθηλιακών κυττάρων με σκοπό την προώθηση της νεοαγγειογένεσης (196). Εκτός από την προώθηση της διαίρεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο VEGF παίζει σημαντικό επίσης ρόλο στη μετανάστευσή τους (197).

Άλλες δράσεις του VEGF είναι η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας (198), η αναστολή της διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων (199), η επαγωγή της μεταφοράς εξόζης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (200), η επαγωγή του ιστικού παράγοντα (201), και η επαγωγή της μετανάστευσης των μονοκυττάρων (202). Εξ αιτίας του ποσού του VEGF που παράγουν οι όγκοι, δημιουργείται ένα θετικό σύστημα πληροφοριών ανατροφοδότησης, όπου η προσκληθείσα προώθηση της αγγειογένεσης από τον VEGF οδηγεί σε επιτάχυνση της ανάπτυξης των όγκων η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξανόμενη έκκριση του VEGF. Αυτός ο τύπος ενίσχυσης μπορεί να μεγιστοποιηθεί μέσω της ταυτόχρονης επαγωγής από τον VEGF της έκφρασης των υποδοχέων του και της διαθεσιμότητάς τους στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (203). Επιπλέον, η αγγειογένεση των όγκων απαιτεί την κινητοποίηση από το μυελό των οστών πρόδρομων μορφών των ενδοθηλιακών κυττάρων, μια διαδικασία που εξαρτάται επίσης από τον



VEGF και που μπορεί να κατασταλεί απόλυτα εάν ανασταλεί η μεταγωγή του σήματος στο επίπεδο των υποδοχέων του (146).

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ VEGF ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Η έκφραση του VEGF βρίσκεται αυξημένη στην πλειοψηφία των κακοηθειών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Ο κατάλογος είναι εκτενής και περιλαμβάνει αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους όπως τον κολοορθικό καρκίνο, τον καρκίνο του ήπατος του πνεύμονα, του θυρεοειδή, του μαστού, του νεφρού, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, των ωοθηκών, του ενδομητρίου καθώς επίσης και τα σαρκώματα και τους όγκους του ΚΝΣ (166;204-213).

Η συσχέτιση της έκφρασης του VEGF στους διάφορους τύπους καρκίνου δεν είναι απόλυτη και ποικίλει στις διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέος εντέρου υπάρχουν μελέτες σε μεγάλες σειρές ασθενών, όπου οι μισοί από τους ασθενείς παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων του VEGF (212), ενώ σε άλλες μελέτες υπερέκφραση του διαπιστώθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων (212).

Ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση ότι σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών τα επίπεδα του VEGF μειώνονται με την χειρουργική αφαίρεση των πρωτοπαθών εστιών και τείνουν να αυξηθούν εκ νέου στην υποτροπή των όγκων(214).

Διάφοροι παράγοντες δρώντας συνεργικά μπορούν να συμβάλουν στην πρόοδο της νόσου στις περιπτώσεις αυξημένης έκφρασης του VEGF. Φαίνεται ότι ο VEGF, εκτός της κύρια αγγειογενετικής του δράσης ενεργεί και ως παράγοντας επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης των αντιαποπτωτικών παραγόντων Bcl-2 (215) και επιβιοτίνης (survivin) (216). Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός



της αναστολής της απόπτωσης είναι η αναστολή της διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων που προκαλείται από τον ίδιο τον VEGF (217). Σε γαστρικά καρκινώματα έχει παρατηρηθεί ότι η απουσία δενδριτικών κυττάρων στην περιοχή του όγκου σχετίζεται με την έκφραση του VEGF, γεγονός που κάνει τους ερευνητές να πιστεύουν ότι ο VEGF σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση των ασθενών όχι μόνο επάγοντας την αγγειογένεση αλλά και πιθανώς αποτελώντας αιτία μειωμένης ανοσοεπιτήρησης του όγκου από τον οργανισμό (218).

Το γεγονός ότι ο VEGF αποτελεί ουσιαστικό παράγοντα για την αγγειογένεση από τα πολύ πρώιμα στάδια των όγκων από τα μετασχηματισμένα νεοπλασματικά κύτταρα, υποδηλώνει παράλληλα ότι αυτός ο παράγοντας αύξησης αποτελεί επιπλέον και υποκινητή της μετάστασης (218). Κατά συνέπεια, η έκφραση του VEGF στον αρχικό όγκο έχει συσχετιστεί σε πολλές μελέτες με μεγαλύτερο κίνδυνο για υποτροπή και επομένως δυσμενή πρόγνωση σε ποικίλους ανθρώπινους καρκίνους όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος, ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος των ωοθηκών (150). Από άλλες παρατηρήσεις προκύπτει ότι αυξημένα επίπεδα VEGF σχετίζονται με την παρουσία νεοπλασματικών συλλογών και θεωρείται ότι ο VEGF, ενισχύοντας τη διαπερατότητα, ενισχύει και τη διάχυση των νεοπλασματικών κυττάρων (219).

Τα αυξημένα επίπεδα VEGF έχουν επίσης συσχετισθεί με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία ή την ενδοκρινική θεραπεία στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού (220). Επιπρόσθετα, η έκφραση του VEGF φάνηκε να έχει προβλεπτική αξία όσον αφορά στην ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία, στην χημειοθεραπεία και στην ορμονική θεραπεία, καθώς επίσης και στην πιθανότητα της υποτροπής σε ποικίλους καρκίνους (214;219).



ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ

Η ποσοτική εκτίμηση της αγγειογένεσης έχει επικρατήσει να γίνεται με τη χρήση της μικροαγγειακής πυκνότητας (ΜΠ). Πλήθος μελετών κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν καταγράψει την αξία της χρήσης της ΜΠ ως προγνωστικό δείκτη για ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών. Ήδη από το 1974, οι Brem και συν. διέβλεψαν την ανάγκη να καθοριστεί μια μέθοδος ποσοτικής εκτίμησης της αγγειογένεσης των όγκων και πρότειναν ένα βαθμονομημένο σύστημα για τους ανθρώπινους όγκους εγκεφάλου, βασιζόμενοι στην ανάλυση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των ενδοθηλιακών κυττάρων που αντανακλούσαν στη μέτρηση της πυκνότητας των νεοαγγείων(221). Στη συνέχεια με την ανάπτυξη και την εφαρμογή συγκεκριμένων αντισωμάτων για την ανίχνευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μελέτες εκτίμησης της αγγειοβρίθειας των όγκων επιτάθηκαν(222;223).

Στις αρχές της δεκαετίας του '90, ο Weidner και συν. έδειξαν ότι η μέτρηση της ΜΠ σε επιλεγμένες περιοχές υψηλής νεοαγγείωσης (hotspots) αποτελούσε έναν προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη (224;225). Με αυτήν τη δυνατότητα η μέτρηση της ΜΠ βοηθά στην αξιολόγηση της συσχέτισης με το στάδιο της νόσου, την πιθανότητα μετάστασης, της υποτροπής ή της επιβίωσης, αλλά και το σχεδιασμό των θεραπευτικών στρατηγικών (226;227).

Σε συνέχεια των πρώτων μελετών εκατοντάδες άλλες διερεύνησαν την προγνωστική αξία της μικροαγγειακής πυκνότητας στον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του εντέρου του προστάτη, και εν γένει σε στους συμπαγείς όγκους (228). Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες παραθέτουν θετικές συσχετίσεις μεταξύ της μικροαγγειακής πυκνότητας και της υποτροπής των όγκων, αν και μερικοί δημοσιεύουν αρνητικές ή ακόμη και απουσία συσχετίσεων (228). Μερικές από τις αποκλίσεις μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι



λεπτομέρειες της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ΜΠ μπορούν να επηρεάσουν την αξία της ως προγνωστικό δείκτη. Παραδείγματος χάριν, η επιλογή του αντισώματος (π.χ., CD34, CD31, παράγοντας Von Willebrand, ή CD105) που χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει ενδοθηλιακά κύτταρα των μικροαγγείων των όγκων έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τα αποτελέσματα της μελέτης(229-231).

Το ίδιο συμβαίνει αναφορικά με το εάν η ΜΠ αξιολογείται στην περιφέρεια ή το κέντρο του όγκου(232). Παρά τα τεχνικά ζητήματα, η ΜΠ εκτιμάται και αξιολογείται με τη μέθοδο της ποσοτικής μέτρησης των νεοαγγείων στις περιοχές που εμφανίζουν πιο έντονη νεοαγγείωση (hotspots), όπως περιγράφηκε από τους Weidner και συν. είναι ένας πολύτιμος προγνωστικός δείκτης για ένα ευρύ φάσμα όγκων (233).

Σήμερα η βιβλιογραφία συνεχίζει να εμπλουτίζεται με μελέτες που δείχνουν το σαφή ρόλο της ΜΠ ως προγνωστικό παράγοντα σε διάφορους συμπαγείς όγκους καθώς και τη θετική συσχέτισή της με τον παράγοντα VEGF(234-236).

Η ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ -1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ.

Η ρύθμιση της αγγειογένεσης γίνεται σε κυτταρικό επίπεδο από ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης, οι οποίοι είναι μόρια που επίσης ενεργοποιούνται από αγγειογενετικά ερεθίσματα (237). Από τους πιο ισχυρούς αλλά και πιο μελετημένους ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης είναι η οικογένεια της θρομβοσποντίνης.



ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ

Η οικογένεια της θρομβοσποντίνης (TSP) αποτελείται από πέντε πρωτεΐνες που βρίσκονται στη θεμέλια ουσία από τους εμβρυϊκούς ιστούς μέχρι τους ιστούς των ενηλίκων. Η οικογένεια των TSP αποτελείται από δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα αποτελείται από δύο τριμερείς πρωτεΐνες, τις TSP-1 και 2, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τρεις πενταμερείς πρωτεΐνες. Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών αυτών κυμαίνεται από 420 έως 520 kD (238;239).

Η ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ-1 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ

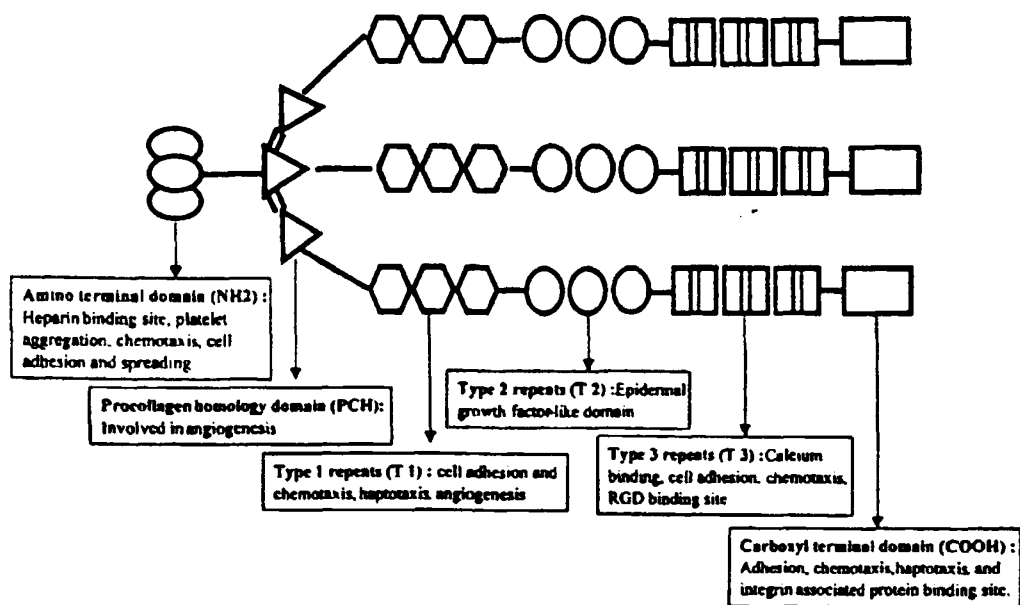
Η θρομβοσποντίνη-1 (TSP-1) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της θεμέλιας ουσίας που αρχικό απομονώθηκε τη δεκαετία του '70 σαν μια πρωτεΐνη ευαίσθητη στη θρομβίνη με μοριακό βάρος 190 kD (240). Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα τριμερές μοριακού βάρους 420 kD το οποίο απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια του σχηματισμού ενός αιμοστατικού θρόμβου. Επιπλέον, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, οι ινοβλάστες, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (SMC), τα κύτταρα όγκων, και τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν επίσης TSP-1 αλλά και η λειτουργία τους επηρεάζεται από την TSP-1(241).

Η TSP-1 αποτελείται από τρία όμοια πολυπεπτίδια που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς κοντά στο αμινο-τελικό άκρο (εικόνα 3). Κάθε πολυπεπτίδιο αποτελείται από έξι διαφορετικές περιοχές: την αμινο-τελική περιοχή η οποία προσομοιάζει με το προκολλαγόνο, τρεις τύπους επαναλήψεων αμινοξέων, τις τύπου-1 με ομολογία ανάλογη με των στοιχείων του συμπληρώματος όπως η προπερδίνη, τις τύπου-2 επαναλήψεις με ακολουθίες παρόμοιες με τον επιδερμικό αυξητικό



παράγοντα, και τις τύπου-3 επαναλήψεις με ακολουθίες παρόμοιες με τις δεσμευτικές θέσεις του ασβεστίου σε μοτίβα καλμοδουλίνης και η καρβοξυ-τελική περιοχή. Η TSP-1 μέσω των διαφορετικών περιοχών, εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες (242).

Εικόνα 3: Θρομβοσποντίνη-1, Δομικές περιοχές. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(6):961-968 (242).



Η TSP-1 αποτελεί βασικό συστατικό των άλφα κοκκίων των αιμοπεταλίων. Αναλογικά, αποτελεί το 3% της συνολικής πρωτεΐνης των αιμοπεταλίων και το 25% της συνολικής πρωτεΐνης που εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια. Στο πλάσμα υγιών ατόμων ανιχνεύεται σε επίπεδα που κυμαίνονται από 50-250 ng/ml (243). Η TSP-1 έχει βρεθεί επίσης ότι αποτελεί συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας κατά τη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης των ιστών και κατά τη διάρκεια οξέων ή υποξέων διεργασιών(244). Η TSP-1 απαντά επίσης στον περιωληνώδη συνδετικό ιστό των νεφρικών σωληναρίων, στη βασική μεμβράνη του κοκκιώδους επιθηλίου του δέρματος και του πνεύμονα, στις επιδερμο-δερματικές συνδέσεις, στα μικρά αγγεία του δέρματος, στα διάμεσα διαστήματα μεταξύ των λείων μυϊκών κυττάρων, και στις αθηρωματικές περιοχές των μεγάλων αγγείων(244).

Η TSP-1, όπως και οι άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, συνδέονται σε άλλες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας καθώς και σε υποδοχείς της επιφανείας των κυττάρων, όπως οι πρωτεογλυκάνες, οι ιντεγκρινικοί ($\alpha 3\beta 1$ και $\alpha 5\beta 3$) και οι μη ιντεγκρινικοί υποδοχείς (245;246). Μέσω των αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς ιντεγκρίνης η TSP-1 ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά σήματα σχετικά με την προσκόλληση κυττάρων, την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, των μεσαγγειακών κυττάρων, και των ινοβλαστών μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών όπως η PI3k και η εστιακή προσκολλητική κινάση (focal adhesion kinase FAK) (247).

Επιπλέον, η TSP-1 αλληλεπιδρά με τις δομικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι πρωτεΐνες του κολλαγόνου, η ινονεκτίνη και οι λαμινίνες (248). Με τις αλληλεπιδράσεις αυτές η TSP-1 έχει την ικανότητα να παρουσιάζεται στην επιφάνεια των κυττάρων όπου και πραγματοποιούνται και ενισχύονται οι διεργασίες μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και των υποδοχέων τους (248).



Αυτή η δυνατότητα της TSP-1 να αλληλεπιδρά με τις διάφορες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας καθώς και με υποδοχείς της επιφανείας των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζονται αντιφατικές μελέτες αναφορικά με την λειτουργία της (238). Έχει υποστηριχθεί ότι η TSP-1 είναι σε θέση να δεσμεύσει μια εντυπωσιακά μεγάλη σειρά πρωτεϊνών και να διαμορφώσει πολλές από τις διαφορετικές λειτουργίες τους που οφείλονται στη δευτεροταγή δομή τους (238). Ουσιαστικά, η ιδιαιτερότητα της δράσης της TSP-1 υπαγορεύεται από τους υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των πέριξ κυττάρων, παρά από αυτή κάθε αυτή τη δραστηριότητά της. Η TSP-1 κατέχει κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και της θεμέλιας ουσίας και μεταξύ κυττάρων - κυττάρων, επηρεάζοντας τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση, τη βιολογία των όγκων, την επούλωση των τραυμάτων, και τα αγγειακά νοσήματα (249).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ-1 ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΙΝ VIVO ΜΕΛΕΤΕΣ.

Η TSP-1, λόγω της πολυσύνθετης φύσης της, παρουσιάζει αμφισήμαντο ρόλο στην αγγειογένεση, προ-αγγειογενετικό και αντι-αγγειογενετικό. Η δράση της TSP-1 στην συνοψίζεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ), της προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της απόπτωσης και του σχηματισμού των τριχοειδικών δομών (249). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η TSP-1 σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες είναι ενεργοποιητής της αγγειογένεσης. Σε πειραματικές συνθήκες η TSP-1, παρουσία της ινικής και του κολλαγόνου, προκάλεσε αύξηση της μικροαγγειακής πυκνότητας(250). Σε άλλη in vivo μελέτη η TSP-1 προήγαγε τον σχηματισμό νεο-αγγείων σε συνδυασμό με τον



παράγοντα αύξησης ινοβλαστών (FGF) και τις λιποπολυσακχαριδικές ενδοτοξίνες των βακτηριδίων σε κερατοειδείς χιτώνες αρουραίων (251).

Αντίθετα με τα παραπάνω οι Taraboletti και συν. έδειξαν ότι η TSP-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πνευμονικών τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από τον FGF (252).

Επιπρόσθετα, οι Bagavanpouss συν., έδειξαν ότι η TSP-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων φλοιού των επινεφριδίων βοοειδών που επάγεται από τον FGF (253).

Σημαντικό βήμα στην αγγειογενετική διεργασία είναι η προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Διάφοροι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι η TSP-1 αυξάνει την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι Morandi και συν. έδειξαν ότι η προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων φλεβιδίων (HUVEC) αυξήθηκε όταν οι καλλιέργειες επωάστηκαν με TSP-1 (254). Όταν οι καλλιέργειες επωάστηκαν με ινονεκτίνη και TSP-1 η αύξηση της προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν παρόμοια με αυτή των καλλιεργειών που επωάστηκαν μόνο με TSP-1. Η εξωγενής προσθήκη διαλυτής TSP-1 σε ήδη επωασμένες με ινονεκτίνη και TSP-1 καλλιέργειες, οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη προσκόλληση των κυττάρων HUVEC. Οι Lawler και συν. έδειξαν επίσης ότι η προσκόλληση των κυττάρων HUVEC σε καλλιέργειες επωασμένες με TSP-1 θα μπορούσε να ανασταλεί με την προσθήκη ενός πεπτιδίου που περιέχει την ακολουθία RGD, μια δεσμευτική περιοχή για τις θέσεις επαναλήψεων τύπου 3 της TSP-1(255).

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ένα πεπτίδιο που δεσμεύεται στο αμινοτελικό άκρο της TSP-1, η fucoidan αναστέλλει μερικώς την προσκόλληση των κυττάρων LE-JJ και BAEC που προκαλείται από την TSP-1, καθορίζοντας έτσι το ρόλο της αμινο-τελικής περιοχής της TSP-1 στην προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων(252). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μελέτη των Lahan και συν. έδειξε ότι η προσκόλληση των



BAEC αναστέλλεται σε κυτταροκαλλιέργειες επωασμένες τόσο με TSP-1 όσο και με ινονεκτίνη και TSP-1 (256).

Αντιφατικές είναι και οι απόψεις που έχουν υποστηριχθεί σχετικά με το ρόλο της TSP-1 στη χυμοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων, μια μορφή μετανάστευσης κυττάρων που σχετίζεται με την αγγειογένεση. Οι Tarabozetti και συν. έδειξαν ότι η χυμοταξία των κυττάρων LE-JJ και BAEC που προκαλείται από την TSP-1 είχε δόσοεξερτώμενη σχέση (252). Η εφαρμογή ηπαρίνης, fucoidan, ή ενός αντισώματος που δεσμεύεται στην αμινοτελική περιοχή της TSP-1 ανέστειλε τη χυμοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα, οι Dameron και συν. έδειξαν ότι οι ινοβλάστες, που εξέκριναν χαμηλή ποσότητα TSP-1, προήγαγαν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα στην ίδια μελέτη, κυτταρικές καλλιέργειες ινοβλαστών παρήγαγαν υψηλά ποσά TSP-1 προκαλώντας αναστολή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η αναστολή ήταν αναστρέψιμη με εφαρμογή αντισωμάτων κατά της TSP-1(257).

Στη διαδικασία της αγγειογένεσης ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό σωληνωδών σχηματισμών που περιέχουν βασική στοιβάδα κατά τη διαμόρφωση των αρχικών τριχοειδικών αγγείων. Υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η διαμόρφωση των τριχοειδικών σχηματισμών ρυθμίζεται από την TSP-1. Έχει βρεθεί ότι καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων που φέρουν τριχοειδικούς σχηματισμούς περιέχουν μικρότερα ποσά TSP-1 από εκείνους που στερούνται τριχοειδικών σχηματισμών (258). Αναφέρεται επίσης ότι τα επίπεδα TSP-1 mRNA ήταν μειωμένα στις κυτταρικές καλλιέργειες που είχαν τριχοειδικούς σχηματισμούς, οι δε σχηματισμοί αυτοί αυξήθηκαν περαιτέρω κατά 30-50% όταν στις καλλιέργειες των EK προστέθηκαν αντισώματα κατά TSP-1. Μελέτη των Iguela- Arispe και συν. έδειξε παρόμοια στοιχεία (259).



Σε συμφωνία με αυτές τις παρατηρήσεις, οι Canfield και Schor έδειξαν ότι η εφαρμογή εξωγενούς TSP-1 παρεμπόδιζε τον πρόωρο σχηματισμό τριχοειδών (260). Αυτή η ανασταλτική δράση ήταν αντιστρεπτή με την εφαρμογή μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της TSP-1. Οι DiPietro και συν. επίσης έδειξαν ότι σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων μολυσμένες με antisense (παρανοηματική) TSP-1 παρατηρήθηκε αυξημένος σχηματισμός τριχοειδών (261). Από τα παραπάνω στοιχεία συνάγεται ότι η TSP-1 έχει ανασταλτική δράση στο σχηματισμό των τριχοειδών κατά την διαδικασία της αγγειογένεσης.

Η TSP-1 εμποδίζει την αγγειογένεση και μέσω ενίσχυσης του μηχανισμού της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενισχύεται μέσω της αλληλεπίδρασης της TSP-1/CD36 (θέση υποδοχέα στην τύπου 1 δομική περιοχή) με το μηχανισμό της μετάδοσης σήματος της p38 κινάσης και μέσω της ενεργοποίησης της προσόμοιας με την κασπάση-3 πρωτεάσης (Caspase-3-like protease), το ενδοθηλιακό κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση(262;263).

Οι παραπάνω μελέτες υποστηρίζουν ότι η TSP-1 να έχει αγγειογενετικές αλλά και αντιαγγειογενετικές ιδιότητες. Η όποια ανομοιογένεια και αντιφατικότητα που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με τη δράση της TSP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οφείλεται πιθανώς στη διαφορετική προέλευση και το είδος των ενδοθηλιακών κυττάρων, στις διαφορετικές θέσεις σύνδεσης της TSP-1 καθώς και στις διαφορές των πειραματικών μοντέλων (240).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗΣ-1 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ.

Η TSP-1 συμμετέχοντας στην προσκόλληση των κυττάρων και την διήθηση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συμπεριφοράς της



νεοπλασίας αναφορικά με την πρόοδο αλλά και την αναστολή της εξέλιξης των όγκων. Αυτοί οι αντίθετοι ρόλοι οφείλονται στη δράση των διάφορων δομικών περιοχών της TSP-1, του τοπικού μικροπεριβάλλοντος, και του τύπου των κυττάρων των όγκων. Τα επίπεδα της TSP-1 στο αίμα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνονται στους ασθενείς με ορισμένους τύπους καρκίνους (264). Συγκεκριμένα, υψηλά επίπεδα TSP-1 παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο του γαστρεντερικού, του μαστού και του πνεύμονα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (249). Ασθενείς με προχωρημένου σταδίου γυναικολογικό και κολοορθικό καρκίνο είχαν υψηλότερα επίπεδα TSP-1 σε σύγκριση με ασθενείς πιο πρώιμων σταδίων(265). Σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο υψηλότερα επίπεδα TSP-1 σχετίσθηκαν με στοιχεία επιθετικότητας της νόσου όπως είναι η διήθηση φλεβιδίων(266). Η στρωματική έκφραση της TSP-1 σε ορισμένους όγκους βρέθηκε να έχει διαφορετική κλινική σημασία. Χαμηλή στρωματική έκφραση της TSP-1 σχετίσθηκε με μειωμένη επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και με προχωρημένη νόσο σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (267-270). Επίσης, υψηλό στρωματικά επίπεδα TSP-1 σχετίσθηκαν με αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς με κακώθες μεσοθηλίωμα του πνεύμονα αλλά και νόσο προχωρημένου σταδίου σε ασθενείς με καρκίνο οισοφάγου και χοληφόρων(271). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η TSP-1 θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με συγκεκριμένους τύπους καρκίνων (πίνακας 7).



Πίνακας 7: Στρωματική έκφραση της TSP-1 σε διαφόρους όγκους

Συγγραφέας	Τύπος καρκίνου	Συσχέτιση
Grossfeld και συν.(272)	Ουρ. κύστη	Χαμηλά επίπεδα σχετίσθηκαν με μικρότερο διάστημα υποτροπής και επιβίωση.
Mehta και συν.(273)	προστάτης	Χαμηλά επίπεδα σχετίσθηκαν με προχωρημένη νόσο.
Oshida και συν.(274)	οισοφάγος	Χαμηλά επίπεδα σχετίσθηκαν με προχωρημένη νόσο.
Ohtani και συν.(275)	Χολ κύστη	Υψηλά επίπεδα παρατηρήθηκαν σε προχωρημένη νόσο.

Οι Zabrenetzky και συν. ανέφεραν ότι οι ιδιαίτερα μεταστατικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, του μελανώματος και του βρογχογενούς καρκίνου του πνεύμονα εξέφραζαν χαμηλότερα επίπεδα TSP-1 από τις λιγότερο μεταστατικές αντίστοιχές τους(276). Όμοια, κυτταρικές σειρές από μεταστατικό αιμαγγείωμα και δερματικό πλακώδες καρκίνωμα, όταν υπερέκφραζαν TSP-1, έχαναν τη μεταστατική τους δυνατότητα (277;278). Επιπλέον, οι Volpert και συν. έδειξαν ότι η χορήγηση TSP-1, που προέρχεται από κυτταρικές σειρές ινοσαρκώματος, ανέστειλε την πρόοδο του μεταστατικού μελανώματος στα ποντίκια(279). Ενδιαφέρουσα είναι και η κλινική παρατήρηση των Crawford και συν. Οι οποίοι αναφέρουν ότι μετά από τη χειρουργική εξαίρεση κακοήθους σαρκώματος που εξέφραζε TSP-1 σε ένα παιδί, υπήρξε έξαρση της μεταστατικής νόσου, γεγονός που αποδόθηκε ενδεχομένως στην απώλεια της ανασταλτικής δράσης της TSP-1 στη μεταστατική ανάπτυξη των όγκων (280). Τα ανωτέρω στοιχεία υποστηρίζουν συνολικά ότι η υπερέκφραση TSP-1 από τα κύτταρα ορισμένων όγκων δρα ανασταλτικά στην αύξησή τους.



Πίνακας 8: Ενδείξεις αναστολής της εξέλιξης των όγκων από την TSP-1.

Συγγραφέας	Πρωτοπαθής όγκος	Υπερέκφραση TSP-1
Zabrenetzky και συν.(276)	Μαστός	Μείωση ανάπτυξης του όγκου
	Μελάνωμα	Μείωση ανάπτυξης του όγκου
	Βρογχογενής καρκίνος	Μείωση ανάπτυξης του όγκου
Sheibani και συν.(277)	Αιμαγγείωμα	Μείωση ανάπτυξης του όγκου
Streit και συν.(278)	Πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος	Μείωση ανάπτυξης του όγκου
Weinstat-Saslow και συν.(281)	Μαστός	Μείωση ανάπτυξης του όγκου

Πίνακας 9: Ενδείξεις ευόδωσης της ανάπτυξης των όγκων από την TSP-1.

Συγγραφέας	Πρωτοπαθής όγκος	Δράση της TSP-1
Yabkowitz και συν.(282)	ΜΚΠ ²	Αύξηση της χυμοταξίας των καρκινικών κυττάρων
Wang και συν.(283)	Μαστός	Αύξηση της διήθησης του κολλαγόνου από τα καρκινικά κύτταρα
Wang και συν.(284)	ΜΚ ΣΚ ³	Αύξηση της διήθησης του κολλαγόνου από τα καρκινικά κύτταρα
Wang και συν.(285)	Μαστός	Αύξηση της προσκόλλησης των καρκινικών κυττάρων Αντι-TSP αντισώματα αναστέλλουν την αύξηση του όγκου
Albo και συν.(286)	πάγκρεας	Αύξηση της διήθησης του κολλαγόνου από τα καρκινικά κύτταρα

² ΜΚΠ: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα³ ΜΚ ΣΚ: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα στοματικής κοιλότητας

Οι Yabkowitz και συν. έδειξαν ότι η TSP-1 αυξάνει τη μετανάστευση των κυττάρων μιας ιδιαίτερα μεταστατικής καρκινικής κυτταρικής σειράς πλακώδους επιθηλίου (282). Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, εφαρμογή αντισωμάτων έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της TSP-1 ανέστειλε την προκαλούμενη από τη TSP-1 μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Οι Wang και συν. επίσης παρατήρησαν ότι κύτταρα καρκίνου μαστού και από πλακώδη καρκινώματα διασπούσαν το κολλαγόνο, όταν εκτίθονταν σε TSP-1(283;284). Η διήθηση από τους δύο αυτούς όγκους μπορούσε να ανασταλεί με την εφαρμογή αντισωμάτων κατά της TSP-1 ή των υποδοχέων τους. Επιπλέον, οι Wang και συν. έδειξαν ότι η προκαλούμενη από την TSP-1 προσκόλληση των κυττάρων καρκίνου του μαστού μπορούσε να ανασταλεί με αντισώματα κατά υποδοχέων της TSP-1(285).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι υπάρχουν αντιφατικά βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με το ρόλο της TSP-1 στη βιολογία όγκων. Η καρκινογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την αύξηση, την προσκόλληση, και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Η TSP-1 έχει διαφορετική δράση σε κάθε μια από αυτές τις διαδικασίες ανάλογα με τον τύπο όγκων που οδηγεί στην πρόοδο του καρκίνου σε μερικές περιπτώσεις και την αναστολή του σε άλλες περιπτώσεις.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ

Μετά από τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό, αλληλεπιδράσεις του όγκου με τους υγιείς ιστούς προωθούν μοριακές και κυτταρικές διαδικασίες που είναι απαραίτητες για τη μετάσταση (287). Οι διαδικασίες αυτές είναι παρόμοιες για τους περισσότερους όγκους, ακολουθούν συγκείμενη διαδοχή γεγονότων και περιλαμβάνουν: (288)



1. τη σύνδεση των καρκινικών κυττάρων μεταξύ τους ως και τον πολλαπλασιασμό τους που υποστηρίζεται αρχικά από τις θρεπτικές ουσίες από περιβάλλον
2. την νεοαγγειογένεση που είναι απαραίτητη για την περαιτέρω αύξηση όγκων
3. τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης και την επακόλουθη είσοδο των κακοηθών κυττάρων στο υποκείμενο στρώμα
4. την είσοδό τους στα αγγεία ή τη λεμφική κυκλοφορία
5. την επιβίωση τους και τη μεταφορά τους μέσα στην συστηματική κυκλοφορία
6. την έξοδό τους από τα αγγεία και την εγκατάστασή τους σε απομακρυσμένες περιοχές
7. και την αύξησή τους μέσα στο νέο περιβάλλον

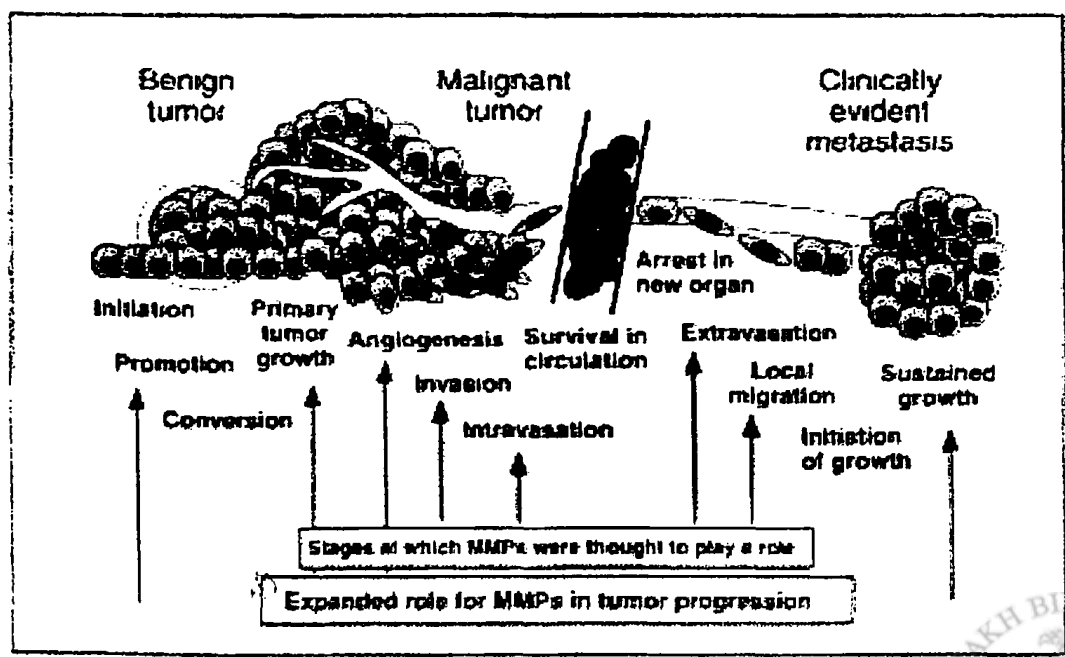
Μέχρι σήμερα σημαντική έρευνα έχει γίνει με κατεύθυνση την περιγραφή αυτού του καταρράκτη των γεγονότων και τον καθορισμό των γενετικών αλλαγών τόσο σε γονιδιακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο που προκαλούν τις παρατηρούμενες φαινοτυπικές αλλαγές.

Διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν συσχετισθεί με το μεταστατικό φαινότυπο των όγκων. Μεταξύ αυτών καθοριστικό ρόλο παίζουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (Matrix Metalloproteinases). Οι MMP συνδέονται λειτουργικά με τη διάσπαση της εξωκυττάριας μεμβράνης (EM) συμπεριλαμβανομένης της βασικής μεμβράνης. Η εξειδικευμένη αυτή θεμέλια ουσία αποτελείται από το κολλαγόνο τύπου IV, τη λαμινίνη, την ενακτίνη, πρωτεογλυκάνες και γλυκοσαμινογλυκάνες(289). Η παρουσία της βασικής μεμβράνης χρησιμεύει ως φραγμός μεταξύ των διαμερισμάτων ενός ιστού. Η διάσπαση της ακεραιότητας των βασικών μεμβρανών, είναι



χαρακτηριστικό γνώρισμα της διήθησης των όγκων που τους επιτρέπει να αναπτυχθούν τόσο τοπικά όσο και απομακρυσμένα (290;291). Κατά την αρχική θεώρηση του ρόλου των MMP έχει υποστηριχθεί ότι μέσω της διάσπασης αυτού του φυσικού φραγμού, βοηθούσαν την είσοδο και την έξοδο των καρκινικών κυττάρων στην και από τη συστηματική κυκλοφορία και στη συνέχεια την ανάπτυξή τους τοπικά αλλά και σε απομακρυσμένες περιοχές του οργανισμού. Εντούτοις, όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι οι MMP έχουν έναν πιο διευρυμένο και γενικότερο ρόλο στη μεταστατική διαδικασία, δεδομένου ότι είναι σημαντικά μόρια για τη δημιουργία και τη συντήρηση του μικροπεριβάλλοντος που διευκολύνει την αύξηση και την αγγειογένεση των διαφόρων όγκων στις πρωτοπαθείς και τις μεταστατικές εστίες(292) (εικόνα 4).

Εικόνα 4: Ο ρόλος των μεταλλοπρωτεϊνών στην αύξηση των όγκων: κυτταρικές αλλαγές που εμφανίζονται κατά την νεοπλασματική εκτροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου. Οι MMP συμβάλλουν στη διάσπαση της θεμέλιας ουσίας που απαιτείται, ώστε τα νεοπλασματικά κύτταρα να διηθούν, να εισέρχονται στην κυκλοφορία, να εξαγγειώνονται και να μεθίστανται. Επίσης οι MMP παίζουν ρόλο στην αύξηση των όγκων, στην αγγειογένεση και στη ανάπτυξη στις μεταστατικές θέσεις. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18(5):1135-1149. (287).



Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ.

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες (MMP) αποτελούν μια σχετικά μεγάλη και συνεχώς διευρυνόμενη οικογένεια πρωτεϊνών. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 20 ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των MMP. Αυτά τα ένζυμα φέρουν μια περιγραφική ονομασία (π.χ. διάμεση κολλαγενάση) που απορρέει από την ιδιαίτερη λειτουργία τους και έναν αριθμό MMP (Πίνακας 10). Αν και το σύστημα αριθμησης αναγνωρίζει μέχρι σήμερα και τη MMP- 24, η ονοματολογία δεν απεικονίζει ακριβώς τον πραγματικό αριθμό των ενζύμων, επειδή οι MMP-4, MMP-5 και MMP-6 προκύπτουν ως αποτέλεσμα διπλασιασμού (287).

Μια εναλλακτική μέθοδος ταξινόμησης αυτών των ενζύμων βασίζεται στη δομή τους. Όλες οι MMP έχουν παρόμοια δομική μορφή, με μια περιοχή για την έκκρισή τους, μια περιοχή για τη διατήρησή τους σε λανθάνουσα-ανενεργό κατάσταση, και μια ενεργό καταλυτική περιοχή που περιέχει την θέση σύνδεσής του με τον ψευδάργυρο (293).

Η πλειοψηφία των MMP φέρει πρόσθετες περιοχές, όπως π.χ. αιμοπηκτικής και όμοιας προς την ινονεκτίνη περιοχές (fibronectin like domains). Αυτές οι πρόσθετες περιοχές είναι σημαντικές στην αναγνώριση των κατάλληλων υποστρωμάτων δράσης και στη σύνδεση με τους ανασταλτικούς παράγοντες. Μια υποομάδα των MMP της κατηγορίας του μεμβρανικού τύπου (MT-MMP), φέρει επίσης και μια διαμεμβρανική περιοχή (294). Αντίθετα από τα άλλα μέλη της οικογένειας των MMP, οι MT-MMP δεν εκκρίνονται αλλά αντίθετα παραμένουν συνδεδεμένες στην επιφάνεια των κυττάρων. Αν και ο ρόλος των MT-MMP δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί, ωστόσο υπάρχουν ισχυρά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι μια από τις λειτουργίες τους είναι ο εντοπισμός και η ενεργοποίηση των εκκρινόμενων MMP ιδιαίτερα της ζελατινάσης A (MMP-2) (295) και της κολλαγενάσης- 3 (295).



ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ

Η δράση των MMP ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση των MMP ανταποκρίνονται μεταγραφικά σε ευρεία ποικιλία ρυθμιστικών παραγόντων: των ογκογονιδίων, των αυξητικών παραγόντων, των κυτταροκινών και των ορμονών (296). Οι MMP εκκρίνονται και είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη με τη μορφή ανενεργών ζυμογόνων που απαιτούν την πρωτεολυτική επεξεργασία για να απελευθερώσουν την καταλυτικά ενεργό ενζυμική τους μορφή (295). Αυτή η λειτουργία μπορεί να επιτευχθεί από άλλο μέλος της οικογένειας των MMP (π.χ., η στρομυελισίνη-1 μπορεί να ενεργοποιήσει την προκολλαγενάση) ή από άλλες πρωτεάσεις (π.χ., η πλασμίνη ενεργοποιεί την προστρομελυσίνη) (297).

Ένας άλλος μηχανισμός ελέγχου της δράσης των MMP είναι η αναστολή της ενζυμικής τους δραστηριότητας. Αυτό επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση με έναν από τους φυσιολογικούς ανασταλτικούς παράγοντες των MMP: της κυκλοφορούσας α-2- μακροσφαιρίνης (που είναι ένας γενικός αναστολέας των πρωτεασών) ή των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP). Το επακόλουθο σύμπλεγμα MMP-αναστολέα είναι ανενεργό και ανίκανο να διασπάσει το υπόστρωμα. Υπάρχουν τέσσερα γνωστά μέλη της οικογένειας των TIMP. Όσο αναφορά τους TIMP δεν υπάρχει ειδικός αναστολέας για κάθε MMP, αλλά όλες οι MMP μπορούν να ανασταλούν από διαφορετικούς πρωτεϊνικούς αναστολείς (298).



Πίνακας 10: Ταξινόμηση των Μεταλλοπρωτεϊνών και υπόστρωμα δράσης τους.

Οικογένεια MMP	Ένζυμο	Αριθμός	Υπόστρωμα δράσης
Κολλαγενάσες			
	Διάμεση κολλαγενάση	MMP-1	Ινώδες Κολλαγόνο τύπου I, II, III
	Ουδετεροφιλική κολλαγενάση	MMP-8	
	Κολλαγενάση-3	MMP-13	
	Χεπορυσ κολλαγενάση	MMP-18	
Ζελατινάσες			
	Ζελατινάση Α	MMP-2	Μη ινώδες κολλαγόνο, τύπου IV, V
	Ζελατινάση Β	MMP-9	
Στρομελυσίνες			
	Στρομελυσίνη-1	MMP-3	Πρωτεογλυκάνες, λαμινίνη, ινονεκτίνη, μη ινώδες κολλαγόνο
	Στρομελυσίνη-2	MMP-10	
	Ματριλυσίνη	MMP-7	
	Στρομελυσίνη-3	MMP-11	Αναστολείς πρωτεασών σερίνης
Ελαστάση	Μεταλλοελαστάση	MMP-12	Ελαστίνη, μη ινώδες κολλαγόνο
Μεμβρανικές			
MT-1 MMP		MMP-14	Προζελατινάση Α και αδιευκρίνιστο
MT-2 MMP		MMP-15	
MT-3 MMP		MMP-16	
MT-4 MMP		MMP-17	
MT-5 MMP		MMP-21	
Αταξινόμητες			
	Εναμελυσίνη	MMP-20	αδιευκρίνιστο
		MMP-19	
		MMP-23	
		MMP-24	

Η ανάγκη της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των MMP και η δυνατότητα της αναστολής τους από τους TIMP δείχνουν ότι η ανίχνευση της υπερέκφρασης των MMP δεν είναι πάντα ενδεικτική ουσιαστικά αυξημένης ενζυμικής δραστηριότητας. Αποτελεί συχνά χαρακτηριστικό γνώρισμα της κακοήθους νόσου η αύξηση των επιπέδων των MMP να συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των επιπέδων των TIMP(288) που ενδεχόμενα αντανακλά σε μια προσπάθεια του οργανισμού να ελέγξει την αυξανόμενη πρωτεολυτική δράση. Παράλληλα όμως οι TIMPs είναι μόρια με πολλαπλές λειτουργίες. Παραδείγματος χάριν, έχειδειχθεί ότι για να ενεργοποιηθεί η ζελατινάση A από την MT-1 MMP είναι απαραίτητη η σύνδεσή της με τον TIMP-2 (299). Η διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων ενός όγκου in vivo φαίνεται επομένως να επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες που διαμορφώνουν τα επίπεδα, την ενεργοποίηση, και την αναστολή των πρωτεολυτικών ενζύμων.

Εκτός από την οικογένεια των MMP έχει αναγνωρισθεί η ύπαρξη μιας δεύτερης οικογένειας πρωτεϊνών με δραστηριότητα ανάλογη των MMP. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι γνωστές ως ADAMs και είναι ένα σύμπλοκο του προσκολλητικού μορίου ντισιντεγκρίνης A με μία MMP (300). Όπως προκύπτει και από την ονομασία οι πρωτεΐνες αυτές όχι μόνο περιέχουν περιοχές ενζυμικής δράσης αλλά και μια περιοχή της ντισιντεγκρίνης που συμμετέχει σε διαδικασίες προσκόλλησης και τήξης. Αν και τα ADAMs αποτελούν τα ίδια μια μεγάλη οικογένεια που αριθμεί περίπου 30 μέλη μόνο τα 16 από αυτά θεωρούνται ότι έχουν λειτουργική δράση MMP. Από τους ενδογενείς αναστολείς των MMP, μόνο ο TIMP-3 μπορεί αποτελεσματικά να αναστείλει τις ADAM πρωτεάσες (300).



ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Ιστορικά ο ρόλος των MMP στον καρκίνο χαρακτηρίστηκε από τους Liotta και συν. στις αρχές της δεκαετίας του '80, όταν προσδιόρισαν το ρόλο της πρωτεόλυσης ως ένα από τα τρία ουσιαστικά βήματα της διήθησης των όγκων και ανακάλυψαν ότι η τύπου IV κολλαγενάση εμπλέκεται στη διήθηση και τη μετάσταση του κακοήθους μελανώματος (301). Αν και αρχικά υπήρχε η θεώρηση ότι η προέλευση των MMP οφειλόταν αποκλειστικά και μόνο στα κύτταρα των όγκων, στη συνέχεια όλο και αυξανόμενα στοιχεία υποστήριζαν ότι τα στρωματικά κύτταρα των ξενιστών επάγουν την έκφραση των MMP ως αποτέλεσμα της απάντησής τους στα κύτταρα του όγκου (302).

Η θεώρηση της στρωματικής έκφρασης των MMP ήλθε στο προσκήνιο από τον προσδιορισμό της στρομυελυσίνης-3 ως την πρώτη στρωματική MMP που συνδέθηκε με τον καρκίνο του μαστού (303). Επακόλουθη ανάλυση της έκφρασης των MMP με μέθοδο *in situ* υβριδισμού αποκάλυψε ότι η έκφραση MMP από τα στρωματικά κύτταρα είναι γενικότερο φαινόμενο σε σχέση με την έκφρασή τους από τα καρκινικά κύτταρα. Πολλές MMP παράγονται στα κύτταρα του συνδετικού ιστού, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών και των κυττάρων φλεγμονής, ως απάντηση του οργανισμού στον όγκο (304-306). Υπάρχουν όμως μερικές αξιοσημείωτες εξαιρέσεις σε αυτό το πρότυπο έκφρασης. Παραδείγματος χάριν, η ματρυλυσίνη εκφράζεται συνήθως από το επιθηλιακό στοιχείο των αδενοκαρκινωμάτων, και πολλές στρωματικές MMP εκφράζονται στο νεοπλασματικό επιθήλιο των όγκων που έχουν υποστεί έναν επιθηλιομεσεγγυματικό μετασχηματισμό. Στην περίπτωση της ζελατινάσης A, υπάρχουν στοιχεία ότι το mRNA παράγεται κυρίως από τα στρωματικά κύτταρα, αλλά η πρωτεΐνη εκκρίνεται και συνδέεται στο διηθητικό τμήμα των όγκων (292). Γενικά, υπάρχει συσχέτιση του σταδίου της ανάπτυξης των όγκων και του επιπέδου έκφρασης των MMP(307). Στα μελανώματα, η έκφραση της ζελατινάσης B συνδέεται



με τη μετατροπή από την οριζόντια φάση αύξησης στην κάθετη φάση αύξησης και την επακόλουθη μετάσταση (308;309), ενώ η αυξανόμενη έκφραση της ζελατινάσης A έχει σχετισθεί με πιο υψηλό βαθμό κακοήθειας (310). Επίσης, η ζελατινάση-A εκφράζεται ευρέως σε καρκινώματα μαστού και η αναλογία των ενεργοποιημένων προς τα συνολικά επίπεδα ζελατινάσης-A αυξάνονται σε προχωρημένη μεταστατική νόσο(311).

Καθώς εξελίσσεται η διαδικασία ανάπτυξης των όγκων εκτός από την αύξηση των επιπέδων μιας μεμονωμένης MMP αυξάνει και η ποικιλία των MMP. Χαρακτηριστικά, τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου εκφράζουν τη ματρυλυσίνη, τη στρωμελυσίνη-1, τη ζελατινάση A και τη διάμεση κολλαγενάση, αλλά η ματρυλυσίνη είναι η μόνη ΜΠ που ανιχνεύεται σε μεγάλα ποσοστά σε καλοήθεις πολύποδες του παχέος εντέρου (312). Έτσι, σαν γενικότερη θεώρηση, υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της επιθετικότητας των διαφόρων όγκων και της έκφρασης υψηλών επιπέδων πολλαπλών μελών της οικογένειας των MMP.

Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που προτείνουν ότι η έκφραση των MMP ή των TIMP μπορεί να έχει διαγνωστική ή και προγνωστική αξία σε διάφορους συμπαγείς όγκους. Παραδείγματος χάριν, η υπερέκφραση της στρωμελυσίνης-3 στον καρκίνο του μαστού έχει συσχετισθεί μόνο με την κακοήθη νόσο, και δεν εκφράζεται σε φυσιολογικό μαζικό ιστό ή στα καλοήθη ινοαδενώματα (313;314). Επίσης η έκφραση των MMP-2 και 9 στον καρκίνο του μαστού έχει συσχετισθεί με το βαθμό κακοήθειας, τις μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες και μικρότερη επιβίωση των ασθενών(311;315).

Σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη η ιστική έκφραση της ενεργοποιημένης ζελατινάσης A σχετίσθηκε με τη βαθμονόμηση κατά Gleason, και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις(316). Επίσης, τα επίπεδα



ζελατινάσης A στον ορό βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα σε άτομα με προστατικό καρκίνο απ' ό,τι με καλοήγη προστατική υπερπλασία. Παρόμοια τα επίπεδα της TIMP-1 βρέθηκε ότι σχετίζονται με τον προστατικό καρκίνο αλλά όχι με την καλοήγη προστατική υπερπλασία ή το φυσιολογικό προστατικό ιστό (317).

Υπερέκφραση πολλαπλών μελών MMP ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημικά σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (318;319). Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η ανοσοϊστοχημική έκφραση της διάμεσης κολλαγενάσης διαπιστώθηκε ότι αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα, ανεξάρτητο του σταδίου κατά Dukes. Επίσης η έκφραση των ζελατινών A και B στον όγκο βρέθηκε να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς αυτούς (312;320;321). Αλλά και στον καρκίνο των ωθηκών ανάλογες συσχετίσεις με το στάδιο της νόσου, την υποτροπή και την επιβίωση βρέθηκαν αναφορικά με την έκφραση των MMP-2 και 9 (322;323).

Εκτός από τους συμπαγείς όγκους, έκφραση διαφόρων μελών της οικογένειας των MMP έχει παρατηρηθεί και στις αιματολογικές κακοήθειες. Η έκφραση της MMP-2 και 9 από τα μυελωματικά κύτταρα αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα (324). Επιπλέον η έκφραση της MMP-2 και του TIMP-1 σχετίστηκε με φτωχότερη επιβίωση σε ασθενείς με μη Hodgkin λεμφώματα (325).

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι σημαντικές, όχι μόνο επειδή συνδέουν την έκφραση των MMP με την πρόοδο και την επιθετικότητα των κακοηθών νεοπλασιών, αλλά επειδή παρέχουν σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη εξέλιξη θεραπευτικών δυνατοτήτων συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας στην αναστολή της δράσης των MMP.



**Ο ΠΟΛΥΠΛΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΟΓΚΩΝ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ
ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΖΩΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ.**

Η αυξανόμενη έκφραση των MMP στους προχωρημένους όγκους και η ικανότητα αυτών των ενζύμων να διασπάσουν την εξωκυττάρια ουσία αντανακλούν στο ρόλο τους στη διαδικασία της μετάστασης των όγκων. Η υπόθεση αυτή έχει τεκμηριωθεί σε πρώιμες μελέτες που χρησιμοποίησαν τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) σε πειραματικά πρότυπα μεταστάσεων(292). Παραδείγματος χάριν, η θεραπεία ποντικών με τον ανασυνδυσασμένο TIMP-1 οδήγησε σε μια σημαντική μείωση του αριθμού των πνευμονικών όζων που είχαν δημιουργηθεί μετά από ενδοφλέβια έγχυση των B16-F10 μελανωματικών κυττάρων (326).

Σε άλλα πειραματικά μοντέλα βρέθηκε ότι η ζελατινάση A, η ζελατινάση B και η μεμβρανικού τύπου 1 MMP ενισχύουν τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να δημιουργήσουν πνευμονικές μεταστάσεις μετά από ενδοφλέβια έγχυση καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης, ινοσαρκώματος, και καρκίνου πνεύμονα, σε αρουραίους αντίστοιχα (327-329). Επίσης η ζελατινάση A, η ζελατινάση B και η ματρυλυσίνη συμβάλουν στη μετάσταση καρκινικών κυττάρων από τις πρωτοπαθείς τους εστίες σε αντίστοιχα όργανα- στόχους σε ορθοτοπικά μοντέλα ουροδόχου κύστης, ινοσαρκώματος και καρκίνου του παχέος εντέρου αντίστοιχα (327;330;331).

Επειδή στα πειραματικά μοντέλα η δημιουργία των μεταστάσεων εξαρτάται από την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων από τη συστηματική κυκλοφορία, έγινε παραδεκτό ότι οι MMP έπρεπε να διασπούν την βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων για να επιτρέψουν στα κύτταρα των όγκων να διεισδύσουν στο πνευμονικό παρέγχυμα. Μελανώματικά κύτταρα της σειράς B16-F10 που μολύνθηκαν με TIMP-1 προκάλεσαν αύξηση σε σημαντικά λιγότερους



μεταστατικούς όζους από ότι οι ομάδες ελέγχου (332), αλλά ήταν εξίσου αποτελεσματικά όσον αφορά την έξοδο τους από την αιματική κυκλοφορία στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσών(333).

Εντούτοις, η δυνατότητα των εξαγειωθέντων καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν ορατές μεταστάσεις άλλαζε σημαντικά από την παρουσία ή μη του TIMP-1. Σήμερα θεωρείται ότι πρωταρχική δράση των MMP είναι η αλλαγή του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη και η αύξηση των καρκινικών κυττάρων σε μια έκτοπη εστία, σε αντιδιαστολή με παλαιότερη άποψη που υποστήριζε ότι οι MMP έχουν συγκεκριμένο ρόλο στην διαδικασία εξόδου των καρκινικών κυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος στο εξωαγγειακό χώρο. Κατά ενδιαφέροντα τρόπο, η δυνατότητα εξόδου από την κυκλοφορία του αίματος φαίνεται να είναι μια ικανότητα και των φυσιολογικών κυττάρων και δεν εξαρτάται μόνο από την κακοήγη μετατροπή. Ως παράδειγμα φυσιολογικοί εμβρυϊκοί ινοβλάστες έχουν παρατηρηθεί ότι εξαγγειώνονται εξίσου αποτελεσματικά (334).

Ο ρόλος των MMP στην διήθηση των καρκινικών κυττάρων και την είσοδό τους στη συστηματική κυκλοφορία, φαίνεται να τεκμηριώνεται καλύτερα. Έχει αποδειχθεί σε *in vitro* μελέτες ότι οι TIMP αναστέλλουν την διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στη βασική μεμβράνη αμνίου ή σε Matrigel (292). Όσον αφορά το ρόλο συγκεκριμένων MMP, η ματρυλυσίνη φάνηκε να ευοδώνει τη διήθηση προστατικών κυττάρων της καρκινικής σειράς DU145 στο διάφραγμα ποντικών (335). Πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα νεότερο *in vivo* μοντέλο μελέτης της εισόδου των καρκινικών κυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία (336). Χρησιμοποιώντας τη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσών, κύτταρα ικανά να διέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένες εστίες μελετήθηκαν ποσοτικά. Η είσοδος στην κυκλοφορία του αίματος ανθρώπινων επιδερμοειδών καρκινικών κυττάρων φάνηκε να εξαρτάται από τη δραστηριότητα των MMP και να συνδέεται με την παραγωγή ζελατινάσης Β, καθώς επίσης



και να απαιτεί την ενεργοποίηση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Κατά συνέπεια αν και η εξαγγείωση είναι μια φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, η δυνατότητα των κυττάρων των όγκων να διέρχονται την επιθηλιακή βασική μεμβράνη, να μεταναστεύουν διαμέσου των συνδετικών ιστών, και να εισέρχονται στο αγγειακό δίκτυο φαίνεται να εξαρτάται από την συνεργασία των πρωτεασών που διασπούν τη θεμέλια ουσία, συμπεριλαμβανομένων των MMP.

Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η διαδικασία της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων συνδέεται στενά με την αγγειογένεση των όγκων, και οι MMP εμπλέκονται επίσης και στις διεργασίες της αγγειογένεσης. Με βάση πρόσφατη μελέτη σε ποντικούς οι MMP ζελατινάση A και B συνδέθηκαν στενά με τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Παρατηρήθηκε ελάττωση της αγγειογένεσης όταν μελανωματικά κύτταρα της σειράς B16-BL6 εμφυτεύτηκαν σε ποντικούς που στερούνται ζελατινάση A σε σχέση με μάρτυρες ποντικούς άγριου τύπου (337). Επίσης ποντικοί αρνητικοί στην έκφραση της ζελατινάσης A παρουσίασαν ατέλειες στην αύξηση των μακρών οστών, γεγονός που αποδόθηκε σε αναστολή της αγγειογένεσης (338). Ειδικότερες δράσεις άλλων MMP στην αγγειογένεση δεν έχουν μελετηθεί άμεσα *in vivo*, έτσι δεν είναι σαφές πόσες από τις MMP μπορούν να συμβάλουν στη νεοαγγειογένεση των όγκων. Αυτό ενδεχομένως αποτελεί ένα σημαντικό κεφάλαιο για μελλοντική έρευνα, δεδομένου ότι οι κλινικές μελέτες με τους φυσικούς και συνθετικούς αναστολείς των MMP έχουν αποδείξει τη σημασία των MMP στην αγγειογενετική διαδικασία (339).

Μια από τις αρχικές δράσεις των MMP στην ανάπτυξη των όγκων φαίνεται να αφορά τη δυνατότητά τους να δημιουργήσουν ένα περιβάλλον που να ευοδώνει την αύξησή τους. Όπως φάνηκε προηγουμένως, η επίδραση των TIMP στην ανάπτυξη των



απομακρυσμένων μεταστάσεων αφορούσε τη δυνατότητά τους να εμποδίσουν τη συνεχή αύξηση των καρκινικών κυττάρων όγκων στις έκτοπες εστίες (333). Η δράση της στρομελυσίνης-3 στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού παραμένει όταν οι ΜΠ εκφράζονται από τα στρωματικά κύτταρα σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα όγκων. Όταν MCF-7 κύτταρα αναμίχθηκαν με τους ινοβλάστες ποντικών άγριου-τύπου ή ποντικών αρνητικών στη στρομελυσίνη-3, τα κύτταρα που εξέφραζαν στρομελυσίνη-3 έδειξαν υψηλότερη ογκογενετική δραστηριότητα (340). Έτσι οι MMP φαίνεται να είναι σε θέση να αλλάζουν το εξωκυττάριο περιβάλλον με τρόπο που να ευοδώνει την εγκατάσταση και την αύξηση των καρκινικών κυττάρων.

Πολλαπλές πειραματικές και κλινικές παρατηρήσεις συγκλίνουν στην διαπίστωση ότι η πρωτεόλυση και η αγγειογένεση αποτελούν δύο στενά συνδεδεμένες διεργασίες και ως ένα βαθμό διέπονται-από κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της έκφρασης διαφόρων αγγειογενετικών και πρωτεολυτικών παραγόντων σε καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, μιας ιδιαίτερης κλινικής οντότητας που από μόνη της αποτελεί πρότυπο μοντέλο μετάστασης των όγκων στον άνθρωπο.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Επιλέχθηκε αρχαιακό βιοπτικό υλικό διαφυλαγμένο σε κύβους παραφίνης από 81 περιπτώσεις ασθενών με διάγνωση καρκίνου άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας προκειμένου να εφαρμοσθεί ανοσοϊστοχημεία για παράγοντες πρωτεόλυσης και αγγειογένεσης. Το μεγαλύτερο μέρος του υλικού προήλθε από τα Παθολογοανατομικά εργαστήρια του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και του Γενικού Νοσοκομείου (Γ. Χατζηκώστα) Ιωαννίνων. Το υπόλοιπο υλικό συλλέχθηκε από τα Παθολογοανατομικά εργαστήρια του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ρίου και του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης.

Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί και αντιμετωπίσθηκαν θεραπευτικά με κοινά θεραπευτικά πρωτόκολλα στο χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 1998 έως τον Δεκέμβριο του 2003 στα Ογκολογικά Τμήματα των Πανεπιστημιακών Νοσοκομείων Ιωαννίνων, Πατρών και ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης είχαν ιστολογικά τεκμηριωμένο μεταστατικό καρκίνωμα του οποίου η πρωτοπαθής εστία δεν έγινε δυνατό να διαγνωσθεί κατά την αρχική διαγνωστική διερεύνηση. Ο έλεγχος ήταν σύμφωνος με την κλασσική αποδοχή του ορισμού της διάγνωσης των ΚΑΠΕ(1) και περιελάμβανε:

- ✦ λεπτομερές ιατρικό ιστορικό και ενδελεχή φυσική εξέταση, συμπεριλαμβανομένης της δακτυλικής εξέτασης του προστάτη και της εξέτασης των όρχεων στους άνδρες και την εξέταση των μαστών και την αμφίχειρη γυναικολογική εξέταση στις γυναίκες.
- ✦ ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού και εκτεταμένη χρήση ανοσοϊστοχημείας.



- ✦ Βασικό αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, γενική εξέταση ούρων και Mayer κοπράνων για ανίχνευση τυχόν λανθάνουσας αιμορραγίας.
- ✦ απεικονιστικό έλεγχο με ακτινογραφία θώρακα, αξονική υπολογιστική τομογραφία (CT scan), άνω κοιλίας και πυέλου και επί ενδείξεων θώρακος.
- ✦ ενδοσκοπικός έλεγχο σε ορισμένες περιπτώσεις βάσει κλινικών και εργαστηριακών ενδείξεων.
- ✦ ερευνητική λαπαροτομία σε περιπτώσεις γυναικών με καρκινωμάτωση του περιτοναίου

Στον πίνακα 11 απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών καθώς και η κλινικοπαθολογική ταξινόμηση των όγκων. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε κλινικοπαθολογικές υποομάδες δυσμενούς και λιγότερο δυσμενούς πρόγνωσης ανάλογα με τα παθολογοανατομικά και κλινικά χαρακτηριστικά¹ (πίνακας 12).

¹ Βλέπε γενικό μέρος ΚΑΠΕ



Πίνακας 11: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Χαρακτηριστικά	No	(%)
Ασθενείς	81	
Φύλο		
Άνδρες	39	48
Γυναίκες	42	52
Ηλικία (έτη)		
Διάμεση	66	
Διακύμανση	37-84	
Κατάσταση φυσικής ικανότητας (PS)		
Διάμεση	2	
Διακύμανση	0-3	
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκινώματα	62	77
Καλής και μέσης διαφοροποίησης	27	43
Πτωχής διαφοροποίησης	35	57
Αδιαφοροποίητα καρκινώματα	15	18
Με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες	5	33
Άλλα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα	11	67
Πλακώδη καρκινώματα	4	5
Μεταστατικές εντοπίσεις		
Ηπατικές ή/και πολλαπλές σπλαχνικές εντοπίσεις	17	21
Λεμφαδενική νόσος	23	29
Μεσοθωράκιο - οπισθοπεριτόναιο	17	74
Μασχαλιαία χώρα	2	9
Τραχηλική χώρα	4	17
Περιτοναϊκή κοιλότητα	19	23
Αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου σε γυναίκες	14	74
Κακοήθης ασκίτης και άλλες εστίες	5	26
Πνευμονικές μεταστάσεις	5	6
Οστικές μεταστάσεις	5	6
Εγκεφαλικές μεταστάσεις	4	5
Πολλαπλές μεταστατικές εστίες	4	5



Πίνακας 12: Κατηγοριοποίηση ασθενών της μελέτης κατά κλινικούς υπότυπους, θεραπεία και έκβαση νόσου.

	No	(%)
Υπότυποι ΚΑΠΕ		
Σχετικά ευνοϊκής πρόγνωσης	50	62
Δυσμενούς πρόγνωσης	31	38
Θεραπευτικοί χειρισμοί		
Χημειοθεραπεία	64	78
Ακτινοθεραπεία	4	6
Διάμεση επιβίωση (μήνες)		
Όλοι οι ασθενείς	10.5	
Σχετικά ευνοϊκής πρόγνωσης	11.5	
Δυσμενούς πρόγνωσης	8.5	

ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ

Για τη μελέτη των παραγόντων που εμπλέκονται στις πρωτεολυτικές διεργασίες επιλέξαμε να μελετήσουμε αντιπροσωπευτικά από τη μεγάλη οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών, τις ζελατινάσες Α και Β, ή αλλιώς τις MMP-2 και 9. Η επιλογή αυτή έγινε με γνώμονα ότι τα δύο αυτά μόρια έχουν ευρέως μελετηθεί στους περισσότερους συμπαγείς όγκους και η έκφρασή τους έχει τεκμηριωμένα συνδεθεί με προχωρημένο κλινικό στάδιο νόσου, αυξημένη πιθανότητα μεταστάσεων και υποτροπής και φτωχότερη επιβίωση. Επίσης επιλέξαμε να μελετήσουμε και έναν αντιπροσωπευτικό αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών, τον TIMP-1, που λειτουργεί σαν γενικός ενδογενής αναστολέας της οικογένειας των MMP.



Η μελέτη των MMP-2, MMP-9 και TIMP-1, έγινε σε ιστικό βιοπτικό υλικό παραφίνης σε 75 από τις 81 συνολικά περιπτώσεις, λόγω εξάντλησης του υλικού σε έξι περιπτώσεις. Το υλικό είχε ληφθεί προ της χορήγησης χημειοθεραπείας στο σύνολο των περιπτώσεων, είχε σταθεροποιηθεί σε φορμαλδεΰδη και διατηρήθηκε σε κύβους παραφίνης.

Χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 5 mm. Οι παράγοντες της πρωτεόλυσης μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Στον πίνακα 13 αναφέρονται οι κωδικοί των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, οι αραιώσεις και οι χρόνοι επώασης.

Πίνακας 13. Αντισώματα¹ που χρησιμοποιήθηκαν, αραιώσεις και οι χρόνοι επώασης για τους παράγοντες της πρωτεόλυσης MMP-2 κ 9 και TIMP-1.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Αραίωση	Χρόνος επώασης
MNCL-MMP-2-507	Novocastra	1/3000	Ολονύκτια
NCL-MMP-9	Novocastra	1/2000	Ολονύκτια
NCL-TIMP-1	Novocastra	1/30	Ολονύκτια

¹ μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών.



ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Για τη μελέτη της αγγειογένεσης επιλέξαμε να μελετήσουμε τον κατεχοχόνην υποκινητή της αγγειογένεσης, τον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF). Η ποσοτική εκτίμηση της αγγειογένεσης έγινε με τη μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας (ΜΠ) με εφαρμογή αντισώματος έναντι του αντιγόνου CD34 που εκφράζεται και χαρακτηρίζει το αγγειακό ενδοθήλιο. Παράλληλα επιλέξαμε να μελετήσουμε έναν αντιπροσωπευτικό παράγοντα των ενδογενών αναστολέων της αγγειογένεσης από την οικογένεια της θρομβοσποντίνης (TSP), τη TSP-1.

Η μελέτη των VEGF, CD 34 και TSP-1 έγινε στο σύνολο των 81 περιπτώσεων. Το βιοπτικό υλικό είχε ληφθεί προ της χορήγησης χημειοθεραπείας στο σύνολο των περιπτώσεων, είχε σταθεροποιηθεί με φορμαλδεΰδη και διατηρήθηκε σε κύβους παραφίνης. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πάχους 5 mm. Οι παράγοντες της αγγειογένεσης μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο η οποία περιγράφεται επίσης αναλυτικά παρακάτω. Στον πίνακα 14 αναγράφονται οι κωδικοί των ειδικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, οι αραιώσεις και οι χρόνοι επώασης.



Πίνακας 14: Αντισώματα¹ που χρησιμοποιήθηκαν, οι αραιώσεις και οι χρόνοι επώασης για τους παράγοντες της αγγειογένεσης VEGF, CD 34 και TSP-1.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Αραίωση	Χρόνος επώασης
CD34 code M 7165	Dako	1/50	Ολονύκτια
VEGF Ab-3 (clone Jh121) ²	Neomarkers	1/50	Ολονύκτια
Thrombospondin (Code Mob 315)	DBS	1/50	Ολονύκτια

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η μέθοδος για την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας τόσο για τους παράγοντες της πρωτεόλυσης όσο και της αγγειογένεσης που ακολουθήθηκε ήταν κοινή για όλα τα μελετηθέντα αντισώματα και περιγράφεται συνοπτικά παρακάτω:

Τοποθετούμε τα πλακίδια από την προηγούμενη μέρα στον κλίβανο στους 60°C και την επόμενη ημέρα γίνεται αποπαραφίνωση.

Τοποθετούμε στη συνέχεια τα πλακίδια σε κουβέτα με ξυλόλη στους 60°C δύο φορές από 10 λεπτά την κάθε φορά και ακολούθως τα εμβαπτιζουμε σε οινόπνευμα 100°, 100°, 96° και 96° διαδοχικά και στη συνέχεια ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό 4 φορές. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε φούρνο μικροκυμάτων 2 φορές διαδοχικά από 15 λεπτά την κάθε φορά σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως (citrate buffer) για ανάδειξη των αντιγονικών θέσεων και τα τοποθετούμε σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί εφαρμογή διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 3% σε μεθυλική αλκοόλη για 30 λεπτά με σκοπό τη δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης και ξεπλένουμε ξανά τα πλακίδια 4 φορές με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (trisaline buffer) για 10 λεπτά και εφαρμόζουμε το κυρίως αντίσωμα. Ακολουθεί

¹ μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών.

² το αντίσωμα έχει ειδικότητα >90% για τον VEGF A



ολονύκτια επώαση του αντισώματος για όλες τις περιπτώσεις. Τοποθετούμε τα πλακίδια εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS για δέκα λεπτά και ακολούθως ξεπλένουμε. Εφαρμόζουμε το envision kit της DAKO για αντίδραση υπεροξειδάσης για 30 λεπτά και ακολουθεί πάλι εφαρμογή ρυθμιστικού διαλύματος TBS για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια εφαρμόζουμε το χρωμογόνο DAB για 3 λεπτά και ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό δις. Εφαρμόζουμε διάλυμα αιματοξυλίνης συγκέντρωσης 10% για δύο λεπτά και ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό βρύσης. Στη συνέχεια ακολουθούμε την ανωτέρω διαδικασία με την ξυλόλη σε ανιόντα οίνοπνεύματος και τέλος επικαλύπτουμε με την καλυπτρίδα.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Για την εκτίμηση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 συνυπολογίσθηκε ο βαθμός της χρωστικής έντασης (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση) και το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων που εμφάνιζαν κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα (0: αρνητική χρώση, 1: <25%, 2: 26-50% και 3: >50%). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση χαρακτηρίζονταν από το άθροισμα των βαθμών έντασης και ποσοστιαίας έκφρασης. Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης ο διαχωρισμός υψηλής και χαμηλής έκφρασης έγινε με όριο (cut off point) τη διάμεση τιμή της ανοσοϊστοχημικής βαθμονόμησης. Η χαμηλή έκφραση αφορούσε τιμές μικρότερες της διάμεσης ενώ η υψηλή έκφραση αφορούσε τιμές ίσες ή μεγαλύτερες της διάμεσης τιμής. Παράλληλα εκτιμήθηκε και η στρωματική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης αλλά δεν ελήφθη υπόψη στη στατιστική ανάλυση.



ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Με τη μικρότερη μεγέθυνση του μικροσκοπίου εντοπίσθηκαν στην επιφάνεια του όγκου οι περιοχές με υψηλή νεοαγγείωση. Ως μέγεθος μικροαγγειακής πυκνότητας (ΜΠ) ανά περίπτωση ορίσθηκε η μέση τιμή των παρατηρούμενων μικροαγγείων στις τρεις πιο αγγειοβριθείς περιοχές (hot spots)(224). Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης ο διαχωρισμός υψηλής και χαμηλής ΜΠ έγινε με όριο (cut off point) τη διάμεση τιμή ΜΠ στο σύνολο των μελετηθέντων περιστατικών. Τιμές του μικρότερες της διάμεσης χαρακτήριζαν τη ΜΠ ως χαμηλή, ενώ τιμές μεγαλύτερες της διάμεσης χαρακτήριζαν τη ΜΠ ως υψηλή.

Για την εκτίμηση του VEGF ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος όπως και στην περίπτωση των παραγόντων πρωτεόλυσης: συνυπολογίσθηκε η χρωστική έντασης (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση και το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων που εμφάνιζαν κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα (0, 1: <25%, 2: 26-50% και 3: >50%). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση χαρακτηρίζονταν από το άθροισμα των βαθμών έντασης και ποσοστιαίας έκφρασης. Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης ο διαχωρισμός υψηλής και χαμηλής έκφρασης έγινε με όριο (cut off point) τη διάμεση τιμή της ανοσοϊστοχημικής βαθμονόμησης. Η χαμηλή έκφραση αφορούσε τιμές μικρότερες της διάμεσης ενώ η υψηλή έκφραση αφορούσε τιμές ίσες ή μεγαλύτερες της διάμεσης τιμής.

Η εκτίμηση της TSP-1 έγινε με βάση τη χρωστική ένταση της στρωματικής έκφρασης (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση).



ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης αναλύθηκε τόσο μεταξύ των επιμέρους παραγόντων, όσο και ως προς διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που έχουν προγνωστική σημασία στα ΚΑΠΕ (ηλικία, ιστολογική διαφοροποίηση, κλινικές υποομάδες, ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία).

Χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ακριβούς πιθανότητας του Fisher, ανάλυση παλινδρόμησης (logistic regression analysis), t-test δύο δειγμάτων για έλεγχο της διαφοροποίησης των τιμών μεταξύ των διαφόρων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, το διάγραμμα Kaplan-Meier για την εκτίμηση της επιβίωσης και η δοκιμασία log-rank για σύγκριση της καμπύλης επιβίωσης ανάμεσα σε ομάδες ασθενών με διαφορετικές τιμές των αγγειογενετικών και πρωτεολυτικών παραγόντων.

Για τη στατιστική ανάλυση και τα γραφικά χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά υπολογιστικά προγράμματα Graphpad Instat version 3.05 and Prism version 4 (Graphpad Software, Inc, San Diego, CA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ MMP-2, MMP-9 ΚΑΙ TIMP-1.

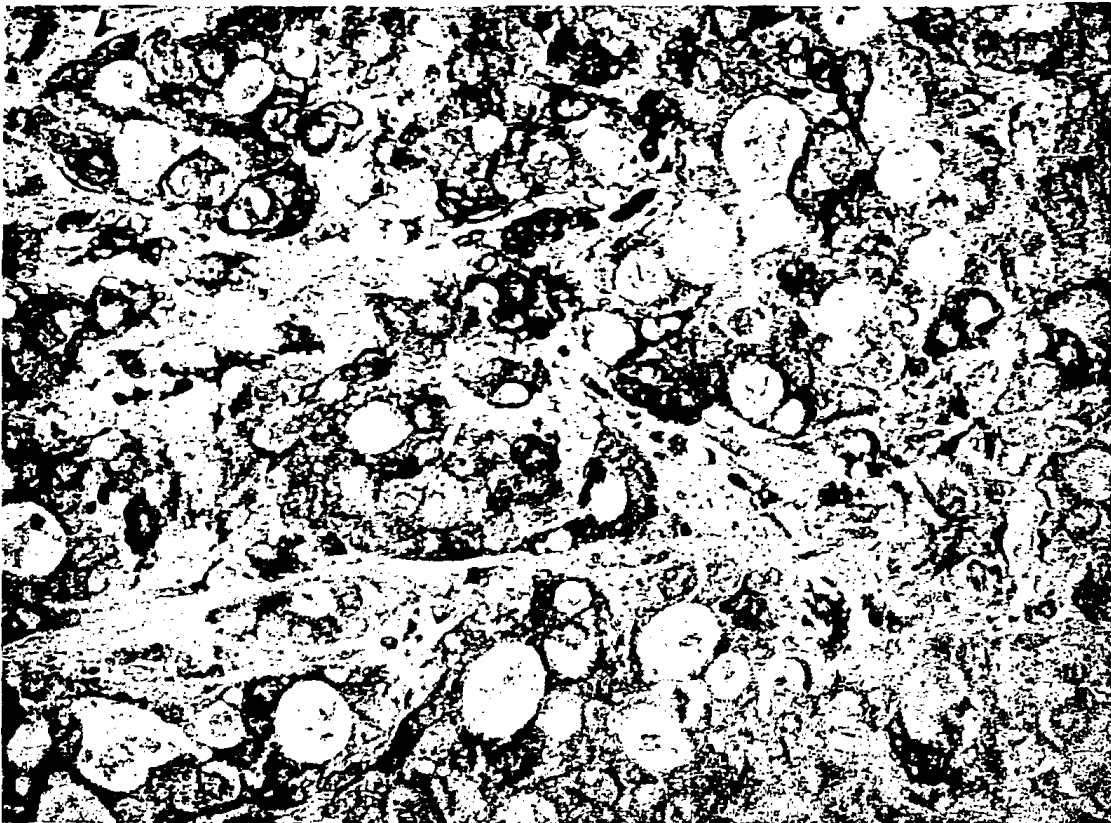
Εβδομήντα πέντε περιπτώσεις ΚΑΠΕ αξιολογήθηκαν ως προς την έκφραση των MMP-2, MMP-9 και TIMP-1. Η χρώση ήταν εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων και παρουσίαζε μικρή μόνο ενδοκυτταρική ανομοιογένεια. Σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων παρατηρήθηκε επιπλέον και στρωματική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης.



ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-2.

Η MMP-2 βρέθηκε θετική στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων σε 52 περιπτώσεις (ποσοστό 69%). Η διάμεση τιμή ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ήταν 4 (με διακύμανση από 0-6). Στο υπόλοιπο 31% η ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-1 χαρακτηρίσθηκε ως αρνητική. Στις μισές σχεδόν περιπτώσεις (49%) η έκφραση της MMP-2 χαρακτηρίσθηκε ισχυρή ενώ στο 20% ασθενής και ενδιάμεση (Πίνακας 14). Ασθενής στρωματική έκφραση της MMP-2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό μικρότερο των 30% των θετικών περιπτώσεων.

Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-2 απεικονίζεται στην εικόνα 5.

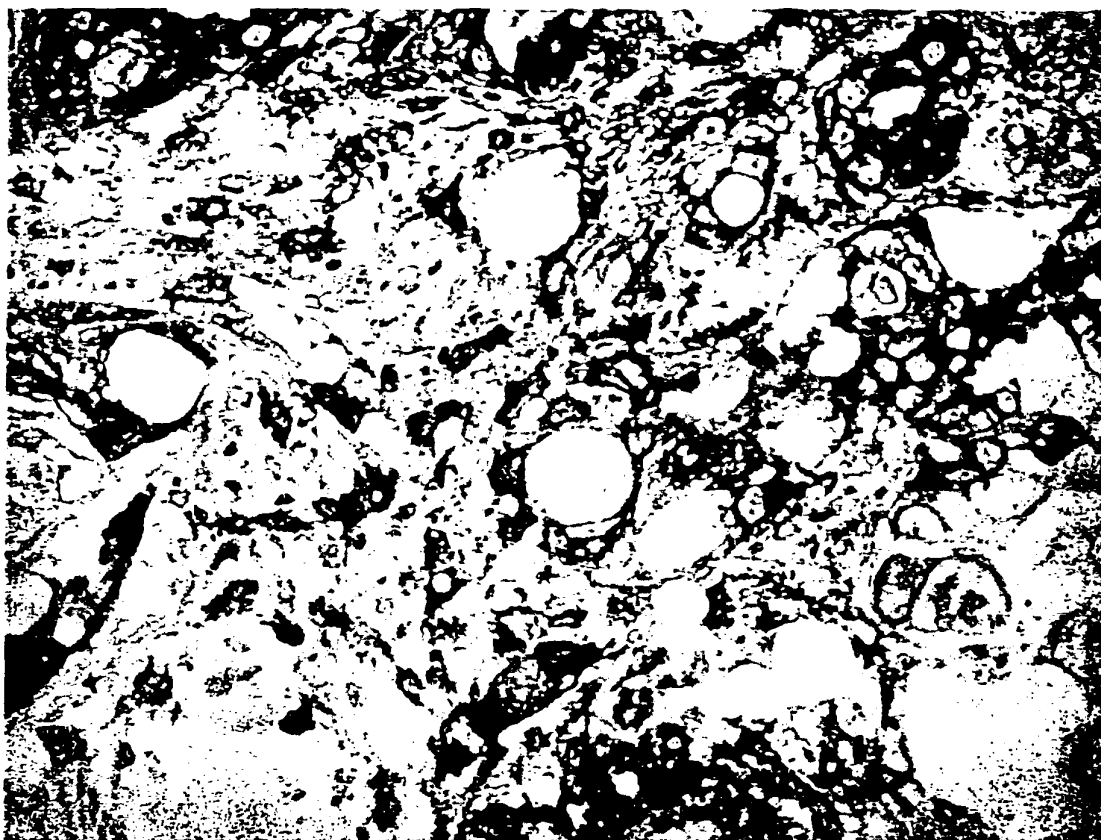


Εικόνα 5. Ισχυρή έως ενδιάμεση κυτταροπλασματική χρώση της MMP2 που εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. (μεγέθυνση x400)



ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ-9

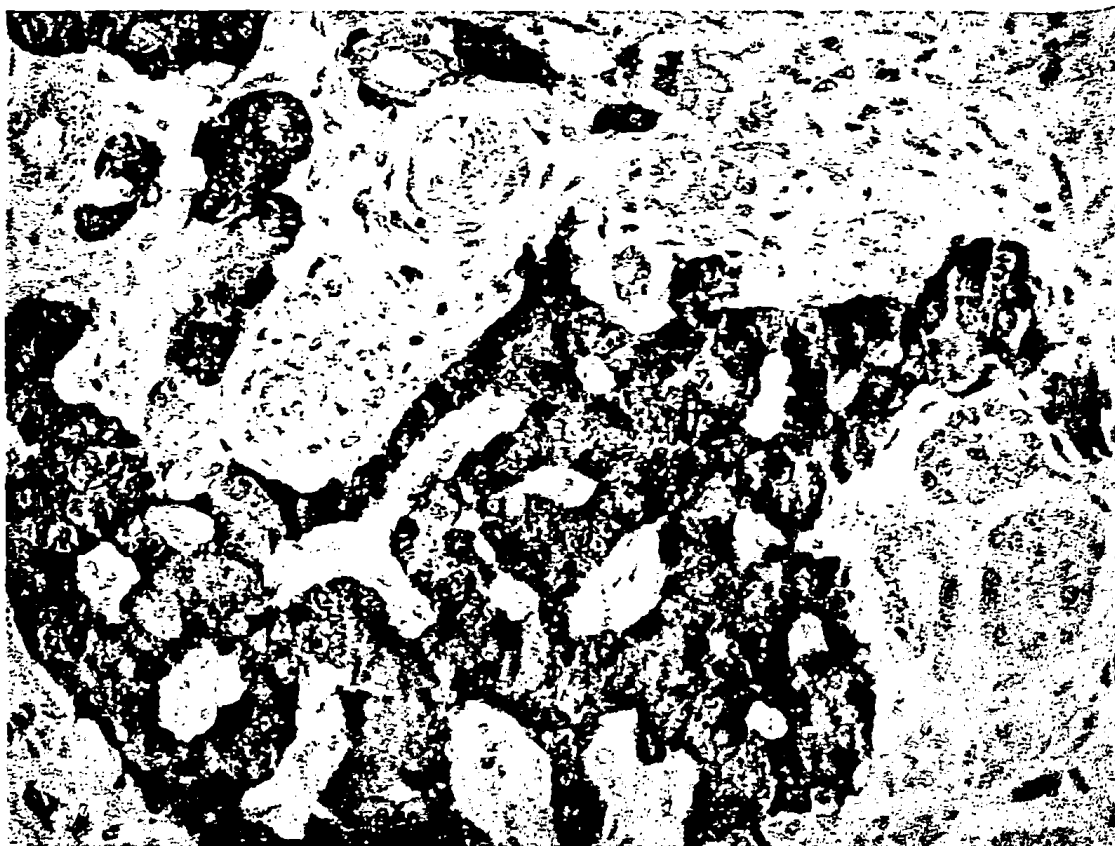
Η MMP-9 βρέθηκε θετική στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων στις μισές σχεδόν περιπτώσεις (ποσοστό 49%), ενώ στις υπόλοιπες δεν παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση (ποσοστό 51%). Έτσι λοιπόν η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 0 (με διακύμανση από 0-5). Ισχυρή έκφραση της MMP-9 παρατηρήθηκε στο 36% των περιπτώσεων, ενώ στο υπόλοιπο 13% η έκφραση ήταν ασθενής και ενδιάμεση (Πίνακας 14). Ασθενής στρωματική έκφραση της MMP-9 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <25% των θετικών περιπτώσεων. Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-9 απεικονίζεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6. Διάχυτη κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα κατά της MMP9 σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. (μεγέθυνση x200)

ΙΣΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ-1

Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του TIMP-1 παρατηρήθηκε σε 60 περιπτώσεις (ποσοστό 79%), ενώ στο υπόλοιπο 21% η χρώση ήταν αρνητική. Η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 3 (με διακύμανση 0-6). Στο 44% των περιπτώσεων η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν ισχυρή ενώ στο 35% ασθενής και ενδιάμεση (πίνακας 15). Ασθενής στρωματική έκφραση του TIMP-1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <40% των θετικών περιπτώσεων. Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του TIMP-1 απεικονίζεται στην εικόνα 7.



Εικόνα 7. Διάχυτη ετερογενής έκφραση της TIMP-1 σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Διακρίνεται η παρουσία χαρακτηριστικής κυτταροπλασματικής έκφρασης των καρκινικών κυττάρων και η παρουσία ασθενούς χρώσης των στρωματικών κυττάρων. (μεγέθυνση x400)



Πίνακας 15. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2, MMP-9 και TIMP-1.

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1
Ανοσοϊστοχημικό άθροισμα			
Διάμεση τιμή	4	0	3
Διακύμανση	0-6	0-5	0-6
Χαρακτηρισμός της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (%)			
Αρνητική	31	51	21
Ασθενής και ενδιάμεση	20	13	35
Ισχυρή	49	36	44

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ MMP-2, MMP-9 ΚΑΙ TIMP-1 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.

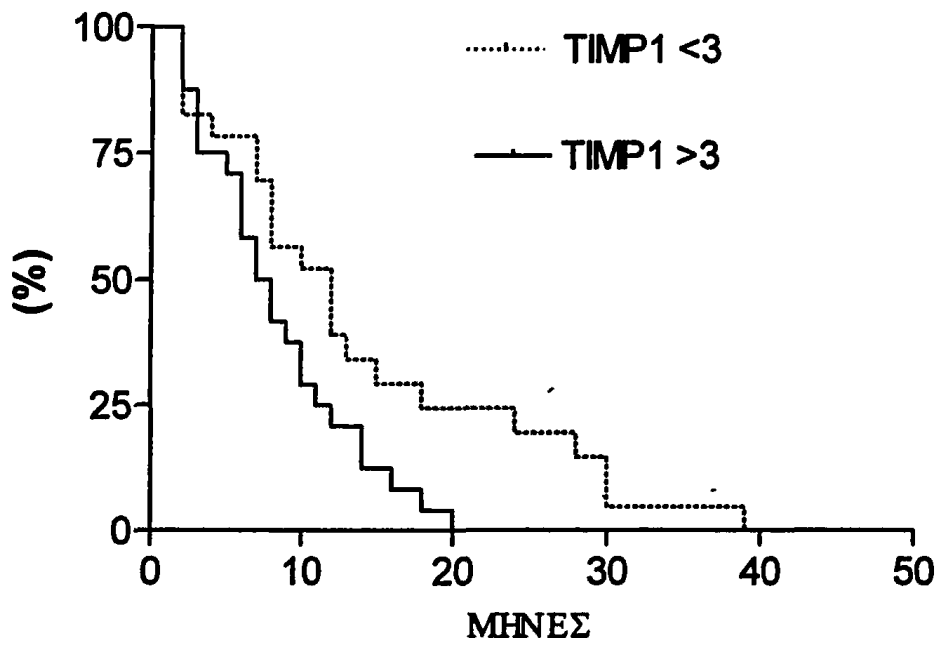
MMP-2 και MMP-9

Δεν παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των MMP και της ιστολογικής διαφοροποίησης, των κλινικών υποτύπων ΚΑΠΕ, της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και της επιβίωσης. Επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης των MMP με τον αναστολέα TIMP-1. (Πίνακας 16)

TIMP-1

Χαμηλή έκφραση του TIMP-1 βρέθηκε στατιστικά σημαντική στις περιπτώσεις ΚΑΠΕ σχετικά ευνοϊκότερων υποτύπων ($p = 0.005$, Fisher's Exact Test). Επίσης, υψηλότερα επίπεδα TIMP-1 σχετίσθηκαν με δυσμενέστερη πρόγνωση (7.5 έναντι 12 μήνες επιβίωση, $p=0.016$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του TIMP-1 με την έκφραση των MMP ή τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. (Πίνακας 16, εικόνα 8)



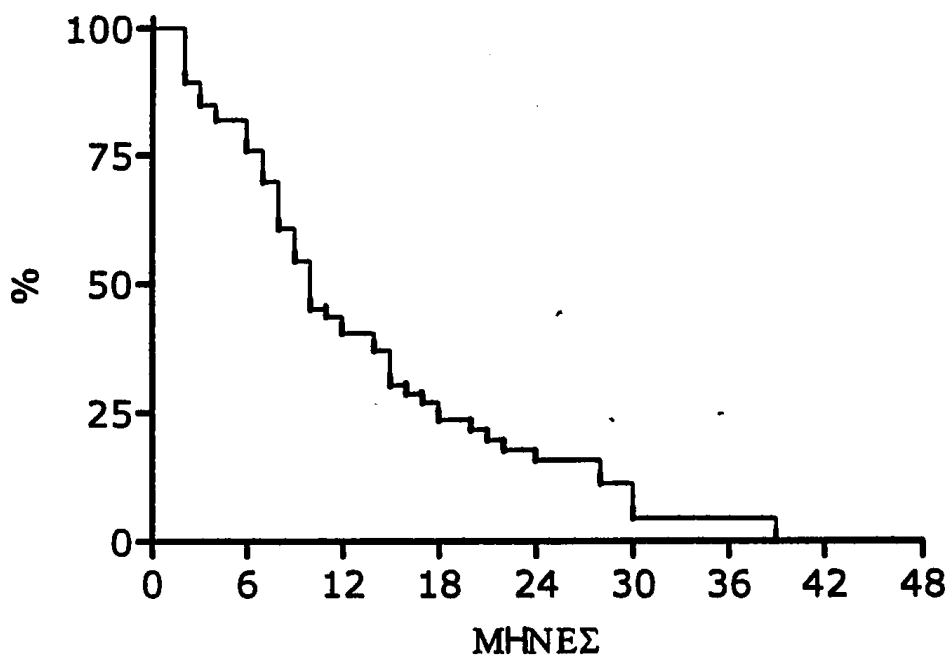


Εικόνα 8. Επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ αναφορικά με την έκφραση του TIMP-1.

Πίνακας 16. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Παράμετρος	MMP-2 (%)			MMP-9 (%)			TIMP-1 (%)		
	Χαμηλή (<4)	Υψηλή (≥4)	P value	Αρνητική	Θετική	P value	Χαμηλή (<3)	Υψηλή (≥3)	P value
Ηλικία									
< 65	21	29		20	40		35	27	
> 65	32	18	ns	15	25	ns	22	16	ns
Ιστολογική διαφοροποίηση									
Καλής και μέσης διαφοροποίησης	32	34		23	19		12	20	
Πτωχής διαφοροποίησης / αδιαφοροποίητα	18	16	ns	33	25	ns	32	36	ns
Κλινικές υποομάδες									
Ευνοϊκές	24	26		36	16		43	15	
Μη ευνοϊκές	29	21	ns	26	22	ns	16	26	0.005
Θεραπευτικό αποτέλεσμα									
Ανταποκριθέντες	37	21		11	39		22	28	
Μη ανταποκριθέντες	31	11	ns	4	46	ns	25	25	ns
Επιβίωση (μήνες)	11	9	ns	11.8	11.2	ns	12	7.5	0.016

Εικόνα 9. Επιβίωση του συνόλου των ασθενών με ΚΑΠΕ της μελέτης.

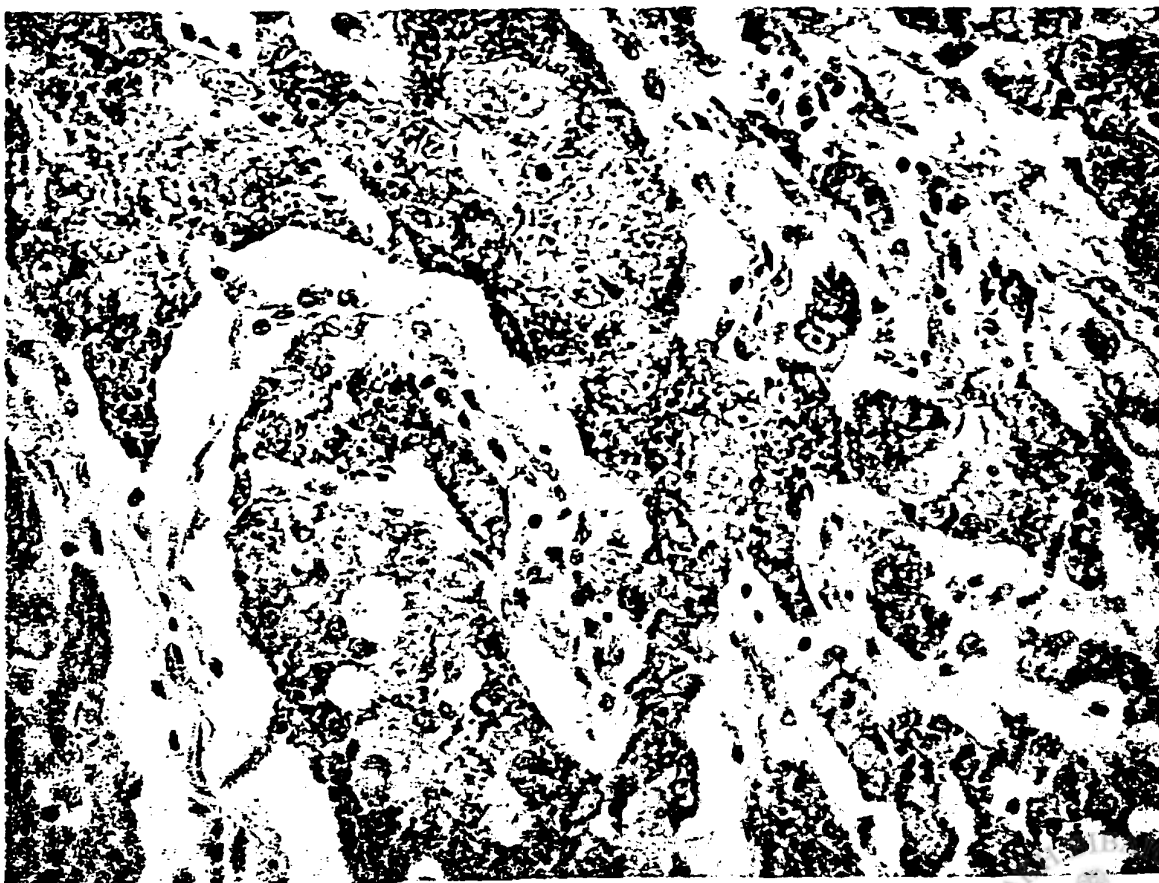


ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ: CD 34, VEGF ΚΑΙ TSP-1.

Και οι 81 περιπτώσεις αξιολογήθηκαν ως προς την έκφραση του VEGF, του CD34 και της TSP-1. Η ανοσοϊστοχημική χρώση του VEGF αφορούσε το κυτταρόπλασμα, του CD34 το ενδοθήλιο των νεοαγγείων και της TSP-1 τα στρωματικά κύτταρα (μακροφάγα και ινοβλάστες).

VEGF

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων σε όλες τις μελετηθέντες περιπτώσεις. Η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 5 (διακύμανση 3-6). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση ήταν ισχυρή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (83%) και ενδιάμεση στο υπόλοιπο 17%. Δεν υπήρξαν αρνητικές περιπτώσεις. (Πίνακας 17) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του VEGF απεικονίζεται στην εικόνα 10.

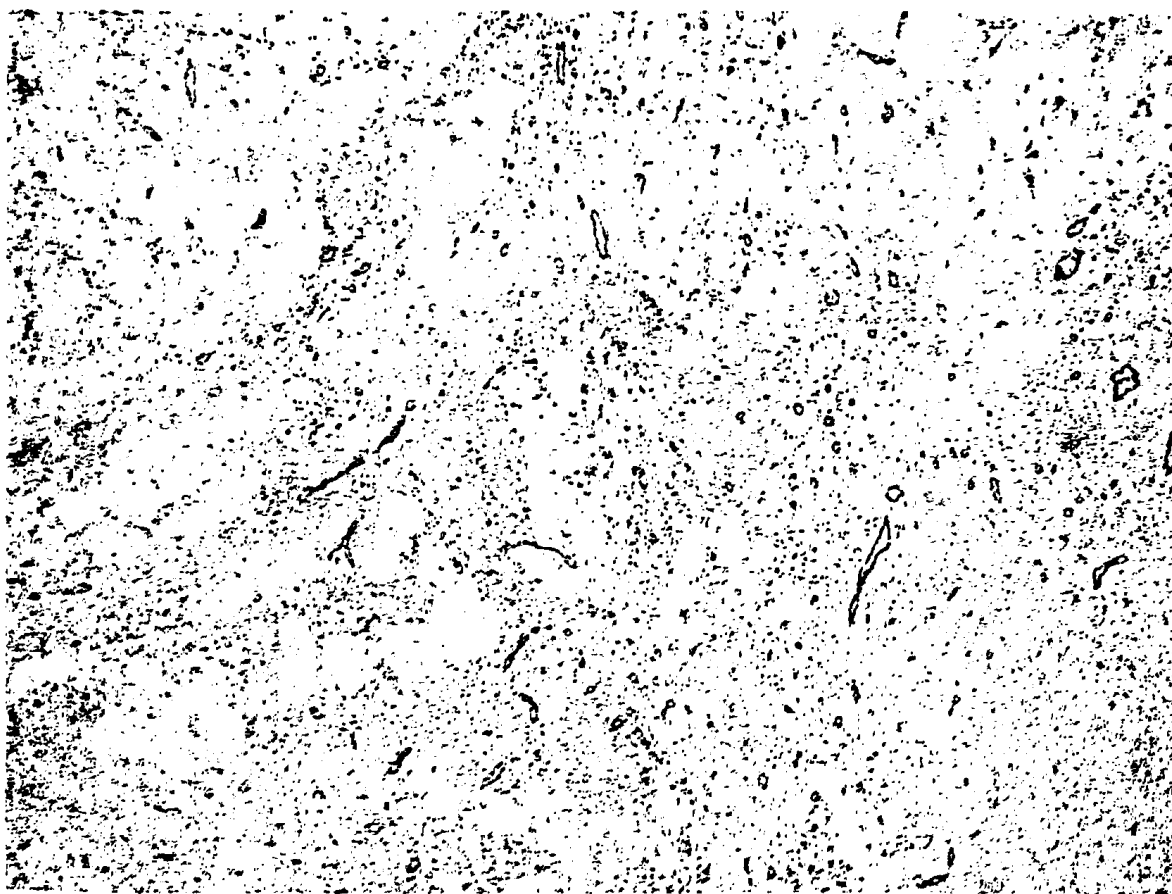


Εικόνα 10. Ισχυρή κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον VEGF σε χαμηλής διαφοροποίησης

αδενοκαρκίνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Επισημαίνεται το χαρακτηριστικό κοκκιώδες πρότυπο της χρώσης και η κατά τόπους ασθενής αντίδραση των στρωματικών κυττάρων. (μεγέθυνση x400)

ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD34 αντιγόνου παρατηρήθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή των παρατηρούμενων νεοαγγείων στις περιοχές της υψηλότερης νεοαγγείωσης ήταν 59 μικροαγγεία/ mm² (διάμεση τιμή 16-300 mm²). (Πίνακας 17) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του CD34 απεικονίζεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11. Περίπτωση χαμηλής διαφοροποίησης ΚΑΠΕ που παρουσιάζει υψηλή πυκνότητα νεοπλασματικών νεοαγγείων χαρακτηριζόμενα με το αντιγόνο CD34 (μεγέθυνση x200).

ΘΡΟΜΒΟΣΠΟΝΤΙΝΗ-1

Η TSP-1 ανιχνεύθηκε κατά αποκλειστικότητα στα στρωματικά κύτταρα στις εγγύς του νεοπλάσματος περιοχές. Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση παρατηρήθηκε σε 65 περιπτώσεις (ποσοστό 80%). Στο 20% των περιπτώσεων η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης χαρακτηρίστηκε ισχυρή και στο 60% ασθενής και ενδιάμεση (πίνακας 17). Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της TSP-1 απεικονίζεται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12. Διάχυτη ισχυρή ανοσοαντιδραστικότητα της εξωκυττάριας ουσίας στην TSP 1, πλησίον νεοπλασματικής περιοχής (μεγέθυνση x400).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ: CD 34, VEGF ΚΑΙ TSP-1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.

Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της ΜΠ με τον VEGF (Spearman $r = 0.36$, $p = 0.0016$) και αρνητική συσχέτιση με τη TSP-1 (Spearman $r = -0.3426$, $p = 0.003$) (εικόνες 13 και 14)

Υψηλότερη νεοαγγείωση παρατηρήθηκε σε περιστατικά λιγότερο ευνοϊκής πρόγνωσης (70 έναντι 46 μικροαγγεία/ mm², $p=0.034$). Εντούτοις δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με την επιβίωση. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της μικροαγγειακής πυκνότητας με την ιστολογική διαφοροποίηση, την ηλικία και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Όμοια για τον VEGF και τη TSP-1 δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που αναλύθηκαν. (Πίνακας 18)

Πίνακας 17. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της αγγειογένεσης: CD 34, VEGF και TSP-1.

	VEGF	TSP-1	ΜΠ (CD34)
Ανοσοϊστοχημικό άθροισμα			
Διάμεση τιμή	5	2	59 μικροαγγεία/ mm ²
(διακύμανση)	2-6	0-3	16-300
Χαρακτηρισμός ανοσοϊστοχημικής έκφρασης			
Αρνητική	0	20	
Ασθενής	0	30	
Ενδιάμεση	17	30	
Ισχυρή	83	20	



Πίνακας 18. Ανοοιστοχημική έκφραση των παραγόντων της αγγειογένεσης CD34 (ΜΠ), VEGF, and TSP-1 και συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Παράμετρος	MVD (counts)		VEGF (%)		TSP-1 (%)		P value
	Διήμεση τιμή CD 34	P value	Χαμηλό (<4)	υψηλό (≥3)	Χαμηλή (<2)	Υψηλή (≥2)	
Ηλικία							
< 65	62		20	80	35	27	
> 65	58	ns	15	85	22	16	ns
Ιστολογική διαφοροποίηση							
Υψηλή και μέση διαφοροποίησης	55		3	28	12	20	
Πτωχής διαφοροποίησης/ αδιαφοροποίητα	59	ns	14	55	32	36	ns
Κλινικές υποομάδες							
Σχετικά ευνοϊκής πρόγνωσης	46		6	46	28	23	
Δυσμενούς πρόγνωσης	70	0.034	11	37	22	27	ns
Θεραπευτικό αποτέλεσμα							
Ανταποκριθέντες	58		11	39	22	28	
Μη ανταποκριθέντες	59	ns	4	46	25	25	ns

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



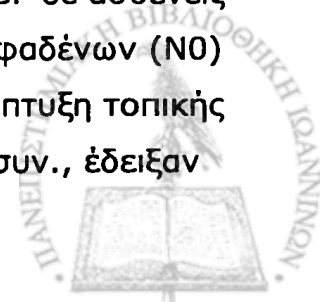
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A: ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η μέχρι σήμερα έρευνα για τη διερεύνηση της βιολογικής ταυτότητας των μεταστατικών καρκίνων άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας παραμένει περιορισμένη. Μελέτη ενός αριθμού ογκοπρωτεϊνών κεντρικής βιολογικής σημασίας καθώς και ρυθμιστών της απόπτωσης απέτυχε να δώσει οποιαδήποτε κλινική συσχέτιση (51-53). Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε και να καταγράψουμε την έκφραση της αγγειογένεσης στα ΚΑΠΕ εστιάζοντας στην αξιολόγηση της ΜΠ σαν μέτρο ποσοτικής εκτίμησης της νεοαγγειογένεσης και της ιστικής έκφρασης δύο αντιπροσωπευτικών μορίων που περιλαμβάνονται στην διαδικασία της αγγειογένεσης: τον σημαντικότερο επαγωγό της αγγειογένεσης VEGF (A) και τον ενδογενή αντιαγγειογενετικό παράγοντα (TSP-1) .

Συνολικά, διαπιστώσαμε ότι στα ΚΑΠΕ υπάρχει μια υψηλή αγγειογενετική δραστηριότητα που προφανώς συσχετίζεται με την έκφραση του VEGF. Ο VEGF βρέθηκε να εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων στο σύνολο των μελετηθέντων περιπτώσεων ενώ σε ποσοστό 83% παρατηρήθηκε ιδιαίτερα ισχυρή υπερέκφρασή του. Το γεγονός αυτό λογικά συσχετίζεται ως ένα βαθμό με το υψηλό μεταστατικό δυναμικό αυτού του νεοπλασματικού συνδρόμου.

Εντούτοις δεν μπορέσαμε να καταδείξουμε οποιαδήποτε συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ηλικία, ιστολογική διαφοροποίηση, κλινικές υποομάδες, ανταπόκριση στη θεραπεία και επιβίωση), γεγονός που αποδόθηκε στην απόλυτη έκφραση του VEGF. Υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία πλήθος μελετών σε μεγάλες σειρές ασθενών που δείχνουν την προγνωστική αξία VEGF σε διάφορες κακοήθειες, αλλά και αρνητικές μελέτες που απέτυχαν να καθιερώσουν το ρόλο του VEGF ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα . Για παράδειγμα οι Linderholm και συν έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση του VEGF σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού χωρίς διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων (N0) αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα τόσο για την ανάπτυξη τοπικής υποτροπής όσο και επιβίωσης.(341) Επίσης και οι Dales και συν., έδειξαν



ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα του VEGF-1 αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για τις ασθενείς με καρκίνο του μαστού N0.(342) Από την άλλη πλευρά υπάρχουν μελέτες που δεν μπόρεσαν να τεκμηριώσουν προγνωστική σημασία του VEGF στον καρκίνο του μαστού.(343;344)

Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα οι Yuan και συν. έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα VEGF mRNA σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα ήταν ενδεικτικά αυξημένου μεταστατικού δυναμικού(345) και η μελέτη των Minami και συν έδειξε ότι ο VEGF αποτελούσε αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σταδίου I (346). Αντίθετα η μελέτη των Decaussin και συν. απέτυχε να δείξει προγνωστική αξία τόσο του VEGF όσο και των υποδοχέων του VEGFR 1 και 2 σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα(347).

Αναφορικά με τον κολοορθικό καρκίνο η αυξημένη έκφραση των επιπέδων του mRNA της ισομορφής VEGF 189 διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με το στάδιο M κατά την αρχική διάγνωση, την ανάπτυξη ηπατικών μεταστάσεων, και με δυσμενέστερη πρόγνωση(348). Επίσης αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό βρέθηκαν ότι συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση (349). Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό αλλά και στον ιστό βρέθηκε ότι αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του στομάχου και παράλληλα σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο νόσου και αυξημένη πιθανότητα μεταστάσεων (350-355). Παράλληλα, η μελέτη των Cascinu και συν έδειξε ότι υπάρχει διαφορά στην έκφραση του VEGF μεταξύ ηπατικών και ενδοκοιλιακών μεταστάσεων από καρκίνο του παχέος εντέρου με υπεροχή των πρώτων (356).

Η υψηλή ιστική έκφραση του VEGF σε επιθηλιακά καρκινώματα των ωοθηκών έχει συσχετισθεί με πιο πτωχή επιβίωση (357;358). Εντονότερη ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF παρατηρήθηκε σε περιτοναϊκές μεταστάσεις από καρκινώματα των ωοθηκών παρά στους πρωτοπαθείς όγκους (359). Παράλληλα αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών έχουν σχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα μετάστασης και βραχύτερη επιβίωση (360;361).



Η ποσοτική εκτίμηση της αγγειογένεσης έγινε με βάση την αξιολόγηση των χαρακτηρισμένων μέσω του CD34 αντιγόνου ενδοθηλιακών κυττάρων των νεοαγγείων. Στη μελέτη μας, η διάμεση τιμή των παρατηρηθέντων νεοαγγείων ήταν 69/mm² με διακύμανση από 22-300. Αυτή η διακύμανση στην ΜΠ οφείλεται προφανώς και στην ετερογένεια του υλικού.

Παρατηρήθηκε στατιστικά υψηλότερη νεοαγγείωση σε περιστατικά ΚΑΠΕ λιγότερο ευνοϊκής πρόγνωσης. Δεν κατέστη όμως δυνατό να επιβεβαιωθεί προγνωστική αξία της ΜΠ στο σύνολο των περιπτώσεων ΚΑΠΕ της μελέτης.

Σε σχετική μελέτη από τον Hillen και συν., έγινε προσπάθεια σύγκρισης της ΜΠ (εκτιμούμενης με τον παράγοντα Willebrand (vWF) και με το CD34) σε 39 περιπτώσεις μεταστατικών αδενοκαρκινωμάτων ήπατος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας και 30 μεταστατικών αδενοκαρκινωμάτων ήπατος από καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού. Αν και δεν διαπιστώθηκε διαφορά ως προς την νεοαγγείωση μεταξύ των μεταστάσεων από γνωστές και άγνωστες πρωτοπαθείς εστίες η ΜΠ βρέθηκε σημαντικά πιο αυξημένη στους πρωτοπαθείς όγκους σε σχέση με τις μεταστάσεις τους(54). Επίσης στη μελέτη των Rowe και συν., η ΜΠ εκτιμούμενη με το CD31 αντιγόνο σε καρκινώματα του μαστού, βρέθηκε πιο αυξημένη στους πρωτοπαθείς όγκους παρά στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (362), όπως και σε μια μικρότερη μελέτη η ΜΠ εκτιμήθηκε σε 35 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (363). Η αυξημένη ΜΠ στον πρωτοπαθή όγκο βρέθηκε να σχετίζεται με αυξημένο στάδιο και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταστάσεων καρκίνου των ωοθηκών και καρκίνου κεφαλής-τραχήλου. (364-367)

Η ΜΠ στην πρώτη μελέτη του Hillen και συν βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ όσον αφορά την επιβίωση (οι ασθενείς με χαμηλότερη ΜΠ είχαν καλύτερη επιβίωση), αλλά η απόλυτη διαφορά στην μέση επιβίωση ήταν μόλις 35 ημέρες(54). Από την ίδια ομάδα όμως σε πρόσφατη μελέτη σε αδενοκαρκινώματα ήπατος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας η έκφραση του VEGF και της ΜΠ δεν βρέθηκε να έχουν προγνωστική σημασία.(35)



Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του VEGF και της ΜΠ, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με συμπεράσματα διαφόρων δημοσιευμένων μελετών. Οι Strohmeyer και συν έδειξαν ότι η έκφραση του VEGF σε καρκινώματα προστάτη σχετίζεται με τη ΜΠ (εκτιμούμενη με τον παράγοντα VIII) και την επιβίωση (368). Ανάλογες συσχετίσεις βρέθηκαν στον καρκίνο του μαστού (369), των ωοθηκών (370), του πνεύμονα (371) και του παχέος εντέρου.(372)

Αντίθετα στην περίπτωση των ΚΑΠΕ αποτύχαμε να καταδείξουμε οποιουσδήποτε σημαντικούς συσχετισμούς της αγγειογενετικής δραστηριότητας αναφορικά με την κλινική έκβαση που οφειλόταν πιθανώς, στην σχεδόν απόλυτη υπερέκφραση του VEGF και της υψηλής τιμής νεοαγγείωσης στις μελετηθέντες περιπτώσεις αλλά και στην ετερογένεια του υλικού.

Επίσης δείξαμε ότι η TSP-1 στη δική μας σειρά ήταν απύσαστο στο 20% των περιπτώσεων και χαμηλή στις μισές από τις περιπτώσεις. Η έκφραση της TSP-1 βρέθηκε να σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη ΜΠ, όπως έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες.(373;374)

Ο ρόλος της TSP-1 στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και στην ανάπτυξη μεταστάσεων παραμένει αντιφατικός. In vitro μελέτες προτείνουν ότι η TSP-1 μπορεί να προωθήσει την προσκόλληση και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης του ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου και του υποδοχέα του (375), της ενεργοποίησης του TGF-beta1(376) και της ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 (377;378). Από την άλλη πλευρά η TSP-1 έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών από μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα μέσω ενεργοποίησης της $\alpha_3\beta_1$ ιντεγκρίνης.(379)

Σε κλινικές μελέτες η υπερέκφραση της TSP-1 έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων και δυσμενούς έκβασης νόσου σε πλειάδα όγκων: πλακώδους καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας (380), καρκίνου του παγκρέατος (381), σε επιθηλιακά καρκινώματα των ωοθηκών (382), χολλαγιοκαρκινώματα (383), καρκινώματα του



οισοφάγου (384), ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (385), κακοήθη μελανώματα (386) και καρκινώματα στομάχου.(387)

Άλλες πάλι μελέτες δείχνουν ότι η TSP-1 εμποδίζει την πρόοδο και την ανάπτυξη των όγκων και μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης χαμηλότερης επιθετικότητας και ευνοϊκότερης πρόγνωσης σε σειρά συμπαγών όγκων: ουροδόχου κύστης (388), παχέος εντέρου (389-391), τραχήλου της μήτρας (392), καρκίνου του μαστού (393) και καρκίνου του παγκρέατος.(394)

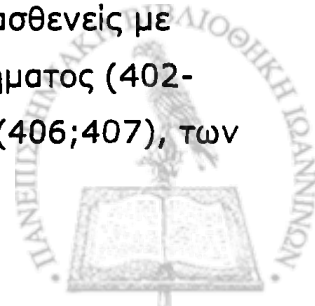
Τέλος υπάρχουν μελέτες που δεν κατάφεραν να δείξουν κάποια προγνωστική αξία της στρωματικής έκφρασης της TSP-1 σε καρκίνο του μαστού (395-397), του προστάτη (398) και του ενδομητρίου (399).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η χαμηλή γενικά έκφραση της TSP-1 σε συνδυασμό με την ανάστροφη συσχέτισή της με τη ΜΠ απεικονίζει την καταστολή του αντιαγγειογενετικού μηχανισμού στις μεταστάσεις ΚΑΠΕ, γεγονός που συσχετίζεται λογικά με επιθετικότητα αυτών των όγκων.

B: ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εκτιμήσαμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση των τριών αντιπροσωπευτικών μορίων που παίζουν κεντρικό ρόλο στις διεργασίες της μετάστασης: των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 από την ευρεία οικογένεια των ΜΠΣ και του ιστικού αναστολέα των MMP-1 (TIMP-1).

Αυξημένη έκφραση MMP-2 και 9 έχει βρεθεί σε πολυάριθμους τύπους συμπαγών όγκων.(288;400;401) Το επίπεδο έκφρασής τους έχει συσχετιστεί με την επιθετικότητα των όγκων και φτωχότερη επιβίωση σε πολλούς συμπαγείς όγκους. Η υπερέκφραση των MMP 2 και 9 σχετίσθηκε με προχωρημένο στάδιο νόσου και φτωχότερη επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο του νεφρού και του ανωτέρου ουροποιητικού συστήματος (402-404), του καρκίνου του παχέος εντέρου (405), του μαστού (406;407), των



ωοθηκών (408;409), του ενδομητρίου (410), του παγκρέατος (411), σε πλακώδη καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας (412) και σε υποτροπιάζοντα καρκίνο ουροθηλίου (413).

Επίσης αυξημένα επίπεδα MMP 2 και 9 σχετίστηκαν με υψηλότερο ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, προχωρημένο κλινικό στάδιο, χαμηλότερη επιβίωση σε γαστρικό καρκίνο (414;415) και αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα(416;417) και αυξημένο ποσοστό υποτροπής σε κολοορθικά καρκινώματα(288;321).

Γενικά, η έκφραση των διάφορων μελών της οικογένειας των MMP σχετίζεται με το προχωρημένο κλινικό στάδιο διαφόρων καρκίνων, και το επίπεδο υπερέκφρασης σχετίζεται με την κλινική επιθετικότητα και την ανάπτυξη των μεταστάσεων(418).

Στη μελέτη μας βρέθηκε σχετικά διαφορετικού βαθμού έκφραση των MMP 2 και 9 σε μεταστάσεις από ΚΑΠΕ. Η MMP-2 βρέθηκε να εκφράζεται στα δύο τρίτα των μελετημένων περιπτώσεων και η MMP-9 στις μισές από αυτές. Εντούτοις δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση στην έκφραση κάθε μιας από τις MMP με την επιβίωση, η οποία στα ΚΑΠΕ είναι ούτως ή άλλως χαμηλή.

Η συνέκφραση των διάφορων μελών της οικογένειας των MMP με τους αναστολείς τους φαίνεται ότι αποτελεί γενικό γνώρισμα ποικίλων καρκίνων: επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (419), καρκίνο του παχέος εντέρου (420), του μαστού (421;422), του παχέος εντέρου. (423;424)

Στην μελέτη, σημαντική συνέκφραση των MMP-2 και 9 με τον TIMP-1 παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό των μελετηθέντων περιπτώσεων ΚΑΠΕ, αλλά δεν παρατηρήθηκε καμιά συσχέτιση μεταξύ των MMP με τον TIMP-1. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Aljada και συν. επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση των MMP-2 και 9 με τον TIMP-1 σε σειρά 160 περιπτώσεων μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (425). Αυτό ενδεχομένως εξηγείται από το γεγονός ότι ο TIMP-1 ως μη ειδικός αναστολέας, αναστέλλει τη δράση πολλαπλών μελών της οικογένειας των MMP (292).

Επιπλέον υπάρχουν ισχυρά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι TIMP έχουν πολυδύναμη δράση, με ιδιότητες όχι μόνο αναστολής αλλά

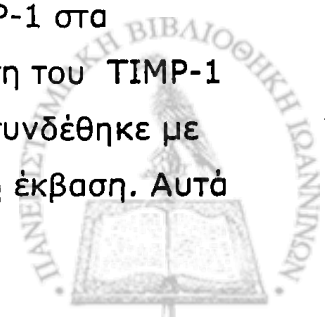


και ευόδωσης της μεταστατικής διεργασίας (287). Σε μια σειρά μελετών διάφοροι συμπαγείς όγκοι εκφράζουν υψηλά επίπεδα TIMP-1 με δυσμενή προγνωστική σημασία: ο καρκίνος του πνεύμονα (426;427), του παχέος εντέρου (428) και του νεφρού(429). Υπερέκφραση του TIMP-1 έχει επίσης συνδεθεί με εμφάνιση μεταστάσεων και επομένως χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (430) και καρκίνο του μαστού (431-433).

Η συνέκφραση παραγόντων της πρωτεόλυσης στις μεταστάσεις δεν έχει μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα σε κλινικό επίπεδο. Σε μια μικρή μελέτη των Arnold και συν., μελετήθηκε συγκριτικά η έκφραση της MMP-9 και του TIMP-1 σε εγκεφαλικές μεταστάσεις σε σχέση με τους πρωτοπαθείς όγκους (434). Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε υπερέκφραση της MMP-9 και χαμηλή έκφραση του TIMP-1, τόσο στους πρωτοπαθείς όγκους όσο και στις αντίστοιχες εγκεφαλικές τους μεταστάσεις, χωρίς ουσιαστική διαφορά στην έκφρασή τους. Σε μια άλλη μελέτη οι Lhotak και συν. έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση μιας ευρείας σειράς MMP και των αναστολέων τους σε οστικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού σε σχέση με φυσιολογικές οστικές δομές (435).

Στη μελέτη μας ο TIMP-1 εκφράστηκε στην πλειοψηφία των μελετηθέντων περιπτώσεων ΚΑΠΕ και περίπου στους μισές από αυτές η έκφραση θεωρήθηκε ισχυρή. Σημαντικά υψηλότερη έκφραση TIMP-1 παρατηρήθηκε στις λιγότερο ευνοϊκές περιπτώσεις ΚΑΠΕ. Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, η υψηλότερη έκφραση TIMP-1 σχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση υποδηλώνοντας προγνωστικό ρόλο αυτής της πρωτεΐνης στα ΚΑΠΕ. Αν και η διαφορά στην επιβίωση παρόλη τη στατιστική της σημαντικότητα δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, εντούτοις θεωρείται αξιοσημείωτη στους όγκους αυτούς, στους οποίους η διάμεση επιβίωση των ασθενών δεν ξεπερνά τους 10 μήνες.

Γενικά, στο υλικό της μελέτης μας διαπιστώθηκε διαφόρου βαθμού έκφραση των MMP-2 και MMP9 και ευρεία έκφραση του TIMP-1 στα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Η υπερέκφραση του TIMP-1 βρέθηκε να αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα και συνδέθηκε με τις λιγότερο ευνοϊκές υποομάδες ΚΑΠΕ και χειρότερη κλινική έκβαση. Αυτά



τα συμπεράσματα θα μπορούσαν εν μέρει να συσχετισθούν με την επιθετικότητα αυτών των μεταστατικών όγκων. Αυτό το στοιχείο συμβάλλει εν μέρει στην κατανόηση της μεταστατικής επιθετικότητας αυτών των όγκων.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.

Η σχέση της αγγειογένεσης με την πρωτεόλυση έχει τεκμηριωθεί σε διάφορες *in vivo* και *in vitro* μελέτες (436;437). Παρόλα αυτά η ταυτόχρονη μελέτη της έκφρασης διαφόρων παραγόντων της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης σε ιστικό επίπεδο είναι περιορισμένη. Στη μελέτη των Slaton και συν. σε μια μικρή σειρά ασθενών με καρκίνο νεφρού, παρατηρήθηκε παράλληλη έκφραση των VEGF, και MMP-2 και 9, αλλά μεταξύ τους συσχέτιση δεν αναφέρεται (438). Επίπρόσθετα σε μεγαλύτερη μελέτη των Zhang και συν., σε περιπτώσεις καρκίνου του νεφρού, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ΜΠ και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των MMP-2 και MMP-9 (439). Σε επίπεδο διαλυτών παραγόντων η μελέτη των Manenti και συν σε ορό ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών απέτυχε να δείξει συσχέτιση των επιπέδων στον ορό του VEGF με τις MMP-2 και 9 και τους TIMP-1 και 2 (440).

Στη δική μας μελέτη δεν βρέθηκε επίσης συσχέτιση της έκφρασης των παραγόντων της αγγειογένεσης με τους παράγοντες της πρωτεόλυσης, πιθανώς λόγω της απόλυτης έκφρασης του VEGF στο υλικό μας.

Συμπεραίνεται ότι περαιτέρω μεταφραστική έρευνα που να στοχεύει στην ανακάλυψη συγκεκριμένων βιολογικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων των ΚΑΠΕ θα μπορούσε να διαλευκάνει την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών αυτής της ιδιαίτερης ομάδας όγκων. Επιπλέον, αξίζει να ενεργοποιηθεί η κλινική έρευνα στοχευόμενων βιολογικών θεραπειών έναντι συγκεκριμένων πρωτεολυτικών και αγγειογενετικών παραγόντων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ που ούτως ή άλλως στερούνται ισχυρών θεραπευτικών επιλογών.



ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ

Η χρήση της χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση των νεοπλασματικών νόσων αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στη θεραπευτική προσέγγιση των νοσημάτων αυτών. Δυστυχώς, πλην των εξαιρέσεων των χημειοευαίσθητων όγκων, η χημειοθεραπεία παρά την ανάπτυξη και την κλινική εφαρμογή νεώτερων φαρμάκων ελάχιστα επηρέασε την αλλαγή της φυσικής τους ιστορίας.

Τα τελευταία χρόνια μια νέα γενιά φαρμάκων εξελίσσονται και αρχίζουν να μπαίνουν σε εφαρμογή στην κλινική πράξη: οι λεγόμενες στοχευόμενες θεραπείες που στρέφονται απευθείας σε λειτουργικά μόρια του καρκινικού κυττάρου είτε των υποστηρικτικών του κυττάρων.

Πολλοί παράγοντες που στρέφονται έναντι θετικών και αρνητικών ρυθμιστών της αγγειογένεσης έχουν δοκιμασθεί, με προεξάρχοντα τον VEGF. Το Bevacizumab (Avastin; Genentech, South San Francisco, CA), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο στοχεύει όλες τις ισομορφές του VEGF-A, και αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων σε ζωικά μοντέλα (441).

Μια μελέτη φάσης II μονοθεραπείας του Bevacizumab σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού μετά από θεραπεία με ταξάνες και ανθρακυκλίνες έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, με 17% ποσοστό ανταπόκρισης ή στασιμότητας νόσου (442). Επίσης, η χορήγηση του Bevacizumab αξιολογήθηκε σε τυχαίοποιημένες φάσης II μελέτες σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Στον προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα η προσθήκη του Bevacizumab στον κλασσικό συνδυασμό καρβοπλατίνης (AUC: 6) και πακλιταξέλης (200 mg/m²) κάθε τρεις εβδομάδες δοκιμάσθηκε σε δύο δοσολογικά επίπεδα. Αν και παρατηρήθηκε διαφορά ως προς την ανταπόκριση υπέρ του τριπλού σχήματος, εντούτοις δεν φάνηκε διαφορά ως προς τη συνολική επιβίωση (443).

Στο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου το Bevacizumab προστέθηκε στο συνδυασμό φθοριοουρακίλης-λευκοβορίνης και ελέγχθηκε

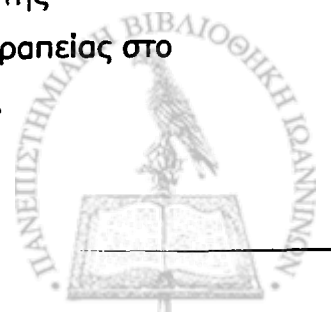


η δραστηριότητά του σε δύο δοσολογικά επίπεδα. Η προσθήκη του bevacizumab στη χημειοθεραπεία και στα δύο δοσολογικά επίπεδα φάνηκε να έχει όφελος, τόσο στην ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, όσο και στο διάστημα ελεύθερο νόσου και την επιβίωση (444).

Όσον αφορά στην ανάπτυξη στοχευόμενων θεραπειών εναντίον των πρωτεολυτικών μηχανισμών, η μαριμαστάτη και η πρινομαστάτη είναι δύο αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών που έχουν δοκιμασθεί σε κλινικές μελέτες αλλά με περιορισμένα μέχρι στιγμής αποτελέσματα.

Η Μαριμαστάτη (BB-2516) είναι ένας συνθετικός πεπτιδομιμητικός αναστολέας των MMP με μικρό μοριακό βάρος (331.4 da) που μπορεί να προκαλέσει αναστολή μέχρι 50% της ενζυμικής δράσης των MMP-1, 2, 3 και 9, αλλά και άλλων MMP σε μικρότερο ποσοστό. Στην πρόσφατα δημοσιευμένη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, η μαριμαστάτη δοκιμάστηκε έναντι του εικονικού φαρμάκου σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που προηγουμένως είχαν ανταποκριθεί ή είχαν σταθερή νόσο σε πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία. Στη μελέτη αυτή δεν διαπιστώθηκε όφελος της μαριμαστάτης όσον αφορά στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (445).

Η πρινομαστάτη είναι ένας νέος ανθρώπινος ανασυνδυασμένος αναστολέας των MMP που εμφανίζει αναστολή της δράσης της ζελατινάσης A, της στρωμελυσίνης-1 και της κολλαγενάσης (446). Σε προκλινικές μελέτες έδειξε μείωση του ποσοστού της αύξησης των πρωτοπαθών όγκων και του αριθμού και του μεγέθους των απομακρυσμένων μεταστάσεων σε ζωικά μοντέλα όγκων (447). Επιπλέον, όταν η πρινομαστάτη χορηγήθηκε σε συνδυασμό με κυτταροτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε αυτά τα πρότυπα, η νεοπλασματική δράση ενισχύθηκε χωρίς αύξηση της σχετιζόμενης με τη χημειοθεραπεία τοξικότητας (448). Στη μόνη μέχρι τώρα δημοσιευμένη μελέτη φάσης III σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της συγχορήγησης της πρινομαστάτης στο συνδυασμό σισπλατίνης - γεμισιταμπίνης. Από τα αποτελέσματα της μελέτης η προσθήκη της πρινομαστάτης δεν φάνηκε να αυξάνει το όφελος της χημειοθεραπείας στο προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (449).



Επίσης, άλλος ένας συνθετικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών, η Μπατιμαστάτη (MDA-MB-231) έχει αναπτυχθεί, αλλά μέχρι τώρα έχει μελετηθεί μόνο σε καρκινικές σειρές και πειραματικά ζωικά μοντέλα, όπου έδειξε αναστολή της διηθητικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων (450-452).

Έως σήμερα η χημειοθεραπεία στην αντιμετώπιση ασθενών με ΚΑΠΕ, πλην των εξαιρέσεων των χημειοευαίσθητων υποομάδων, δεν κατάφερε να βελτιώσει την πρόγνωση αυτών των ασθενών, η οποία εξακολουθεί να παραμένει δυσμενής (7). Διάφοροι πλατινούχοι συνδυασμοί έχουν δοκιμασθεί στην κλινική πράξη από ερευνητικές ομάδες που επί χρόνια ασχολούνται με τη μελέτη της ιδιαίτερης αυτής νοσολογικής οντότητας, αλλά η διάμεση επιβίωση δυστυχώς δεν έγινε δυνατό να ξεπερνά τους 12 μήνες (18;453). Η παντελής απουσία δεδομένων γύρω από την εφαρμογή - στοχευόμενων θεραπειών στο ΚΑΠΕ, αφενός μεν οφείλεται στην μέχρι τώρα έλλειψη συγκεκριμένων μοριακών στόχων, αφετέρου δε οδηγεί τη θεραπευτική σκέψη προς την κατεύθυνση αυτή.

Συνοπτικά, στα ΚΑΠΕ διαπιστώσαμε γενική υπερέκφραση του VEGF γεγονός που οδηγεί στην σκέψη ότι το θα μπορούσε το μόριο αυτό να αποτελέσει δυνητικό θεραπευτικό στόχο για κλινική αξιολόγηση. Επίσης δείξαμε την έκφραση σε διαφορετικό βαθμό των ζελατινών και του ιστικού αναστολέα των MMP 1 που επίσης θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικό θεραπευτικό στόχο στους ασθενούς αυτούς εφόσον αναπτυχθούν ειδικά δραστικά φάρμακα.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα νεοπλασιών, οι οποίες εκδηλώνονται με μεταστάσεις ήδη κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν ένα μοντέλο απόλυτου μεταστατικού φαινοτύπου και αποτελούν ένα καλό μοντέλο μελέτης της μετάστασης των όγκων.
2. Από τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε ότι υπάρχει μια σημαντικού βαθμού υπερέκφραση των πρωτεολυτικών παραγόντων στα ΚΑΠΕ. Αυτό το γεγονός μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι η διαδικασία της πρωτεόλυσης είναι ενεργοποιημένη ευοδώνοντας την περαιτέρω διηθητική ανάπτυξη αυτών των όγκων.
3. Δείξαμε επίσης ότι η αγγειογένεση είναι εξίσου ενεργοποιημένη σε μεταστάσεις ΚΑΠΕ και παράλληλα υπάρχει μια σχετική καταστολή των ενδογενών αντιαγγειογενετικών μηχανισμών. Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας εις όφελος της αγγειογένεσης ενισχύει τη δράση της πρωτεόλυσης και επάγει τη μετάσταση.
4. Η διαπίστωση της υπερενεργοποίησης των δύο μηχανισμών στις μεταστάσεις ΚΑΠΕ συμβάλει στη περαιτέρω κατανόηση της μεταστατικής φύσης της νόσου και εξηγεί εν μέρει την επιθετικότητά της.
5. Αν και οι συσχετίσεις με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ήταν φτωχές, εντούτοις η σχεδόν απόλυτη υπερέκφραση του VEGF και η προγνωστική σημασία της έκφρασης του TIMP-1 θα μπορούσαν να αποτελέσουν κίνητρο για περαιτέρω έρευνα με σχεδιασμό ορθολογιστικών θεραπειών στόχευσης έναντι των παραγόντων αυτών.
6. Η συνέχιση της έρευνας με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη μεταστατική διεργασία στα ΚΑΠΕ κρίνεται απαραίτητη. Η σε βάθος γνώση της βιολογικής ταυτότητας του ΚΑΠΕ θα βοηθήσει κλινικά στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων με την ελπίδα να προσδώσουν σημαντικό



όφελος επιβίωσης εκεί που η χημειοθεραπεία έχει μέχρι σήμερα αποτύχει.



ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Τα κακοήθη νεοπλάσματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας αποτελούν μια ανομοιογενή ομάδα νεοπλασιών με κοινά χαρακτηριστικά την πρώιμη εκδήλωση μεταστατικής νόσου και την αδυναμία διάγνωσης της πρωτοπαθούς εστίας κατά τον χρόνο της αρχικής διερεύνησης. Το σύνολο αυτών των νεοπλασιών κωδικοποιείται στην ιατρική ορολογία ως "Καρκίνος/Καρκίνωμα Άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας" ή ΚΑΠΕ. Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν μεταξύ των νεοπλασιών ένα κλινικό μοντέλο απόλυτου μεταστατικού δυναμικού, και χαρακτηρίζονται στην πλειονότητά τους και ανεξάρτητα από τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά, από ταυτόχρονη ενεργοποίηση-υπερέκφραση πολλαπλών ογκογονιδίων, αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και σημαντικού βαθμού διαταραχή του αποπτωτικού μηχανισμού του κυττάρου.

Η μέχρι σήμερα έρευνα σε μοριακό επίπεδο, δυστυχώς δεν έχει καταφέρει να εξηγήσει σε βάθος τους παθογενετικούς μηχανισμούς που διέπουν αυτή την ιδιαίτερη νοσολογική οντότητα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην μεγάλη ετερογένεια των όγκων αυτών που πιθανώς σε να βαθμό εμποδίζει την ανακάλυψη προς το παρόν τουλάχιστον της βιολογικής τους ταυτότητας.

Με δεδομένο το γεγονός ότι αυτοί οι όγκοι αποτελούν ένα καλό μεταστατικό πρότυπο, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης, δύο καθοριστικών βημάτων της μεταστατικής διεργασίας, με διακριτούς αλλά και συζευγμένους ρόλους. Η μελέτη συγκεκριμένων παραγόντων που ρυθμίζουν την αγγειογένεση και την πρωτεόλυση πιθανώς αποτελέσουν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους προς την κατεύθυνση της βελτίωσης της θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών αυτών που εκ προοιμίου θεωρείται δυσμενής.

Η παρούσα μελέτη διακρίνεται σε δύο ενότητες: Στο πρώτη ενότητα αναλύεται η ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2 και 9 και του ιστικού τους αναστολέα TIMP-1 σε 75 περιπτώσεις ΚΑΠΕ. Στη δεύτερη ενότητα αναλύεται η ανοσοϊστοχημική έκφραση των



αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, ΜΠ και TSP-1 σε 81 περιπτώσεις ΚΑΠΕ. Και στις δύο ενότητες, εκτός από την μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των ανωτέρω παραγόντων έκφρασης, έγινε προσπάθεια συσχέτισμού της έκφρασής τους με ήδη γνωστές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που θεωρούνται προγνωστικοί παράγοντες του ΚΑΠΕ.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της έκφρασης των παραγόντων της πρωτεόλυσης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η έκφραση και των τριών παραγόντων χαρακτηρίστηκε ως ισχυρή. Αναφορικά με τις συσχετίσεις με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες η έκφραση του TIMP-1 βρέθηκε πιο υψηλή στις δυσμενούς πρόγνωσης υποομάδες ΚΑΠΕ. Επίσης η υψηλότερη έκφραση του TIMP-1 βρέθηκε να αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς της μελέτης. Η έκφραση των -2 και MMP-9 δεν βρέθηκε να σχετίζεται με κανέναν προγνωστικό παράγοντα.

Στη δεύτερη ενότητα διαπιστώθηκε ότι ο VEGF εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις ΚΑΠΕ και υπερεκφράζεται στη μεγαλύτερη πλειοψηφία αυτών. Επίσης παρατηρήθηκε υψηλή τιμή ΜΠ η οποία σχετίζεται γραμμικά με την έκφραση του VEGF. Αντίθετα η TSP-1 αν και βρέθηκε να εκφράζεται στο 80% των περιπτώσεων, εντούτοις μόλις στο 20% των περιπτώσεων η έκφρασή της χαρακτηρίστηκε ως ισχυρή. Επίσης παρατηρήθηκε αντίστροφη γραμμική συσχέτιση της TSP-1 με τη ΜΠ. Όσο αναφορά τις συσχετίσεις με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες, μόνο η ΜΠ βρέθηκε πιο χαμηλή στις ευνοϊκότερες υποομάδες ΚΑΠΕ. Επίσης δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των παραγόντων της αγγειογένεσης με την ούτως ή άλλως πτωχή επιβίωση των ασθενών. Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της μεταξύ τους έκφρασης των παραγόντων της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης.

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε ότι τόσο οι παράγοντες της πρωτεόλυσης όσο και της αγγειογένεσης εκφράζονται σε ποικίλο και υψηλό βαθμό στα ΚΑΠΕ, γεγονός που καταδεικνύει την ενεργότητα αυτών των δύο μηχανισμών και εν μέρει προσθέτει αξιόλογες πληροφορίες στην προσπάθεια ερμηνείας της βιολογικής βάσης αυτής της



ξεχωριστής κλινικής οντότητας. Σε μια εποχή που η κλασική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία στο ΚΑΠΕ βρίσκεται σε φάση στασιμότητας κρινόμενη με τις καμπύλες επιβίωσης των ασθενών και η εν γένει θεώρηση της αντιμετώπισης τα ογκολογικών ασθενών περνά μέσα από μοντέρνες θεραπείες μοριακής στόχευσης, οι παράγοντες της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης που υπερεκφράζονται στο ΚΑΠΕ μπορούν δυνητικά να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους στην προσπάθεια επιμήκυνσης της επιβίωσης των ασθενών αυτών.



Summary in English

Au: Vasilios Karavasilis

Title: On the role of proteolysis and angiogenesis in the metastatic process of Cancer of Unknown Primary.

Cancer of unknown primary (CUP) is a unique clinical entity that accounts for an approximately 3% of human cancers. Patients with CUP present with metastases for which the site of origin cannot be identified at initial workup. Early dissemination, unpredictability of metastatic pattern and aggressiveness constitute fundamental characteristics of these tumours. Although clinical characteristics of CUP have been well defined, little is known about the underlying biology.

Angiogenesis and proteolysis are two essential key functions during metastatic cascade. Angiogenesis, the formation of new vessels, is essential for tumor growth and the development of metastases. It evolves through a complex multifactor process that involves interaction of pro-angiogenic and anti-angiogenic signals from tumor, endothelial and stromal cells. The angiogenic activity is reflected in the development of novel microvessels in tumor tissue and is quantified by the intratumoral microvessel density (MVD). Among several molecules implicated, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Thrombospondin-1 (TSP-1) appear to be most relevant. Much evidence indicates that VEGF is a key activator of angiogenesis and TSP-1 a primary endogenous inhibitor of angiogenesis.

To invade the surrounding tissue and metastasize, tumor cells need to secrete enzymes that break down the components of the surrounding extracellular matrix (ECM). Such molecules include the matrix metalloproteinases (MMP), a family of neutral metalloenzymes able to degrade different components of the ECM and help the formation of new blood vessels. Data exists supporting a link between MMP and metastatic tumor growth and angiogenesis. In opposition to MMP, tissue inhibitors of

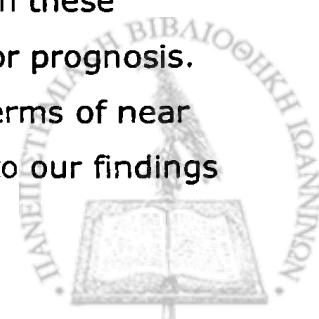


matrix metalloproteinases (TIMP) have been found to play a vague bi-functional, inhibitory and growth promoting role in metastasis.

This thesis study aimed to elucidate some basic aspects of the underlying mechanisms of CUP tumors metastasizing ability in terms of proteolysis and angiogenesis. We studied by immunohistochemistry the tissue expression of major MMPs (MMP-2 and MMP-9) and TIMP-1 in 75 CUP cases, as well as VEGF, MVD and TSP-1 in 81 CUP cases and investigated for clinical relevance.

Regarding proteolysis molecules immunohistochemical expression, MMP-2 was found expressed in 69%, MMP-9 in 49% and TIMP-1 in 79% in the cytoplasm of tumor cells of studied cases. Expression was characterized high in the majority of positive cases. TIMP-1 was found statistically lower in favorable CUP subsets compared to unfavorable ones. Higher TIMP-1 was associated with a shorter survival. Otherwise no association was detected between MMP-2 and MMP-9 and tumor differentiation, response to treatment, clinical subgroups and survival.

Regarding angiogenesis molecules immunohistochemical expression, positive staining of tumor cells for VEGF was observed in all cases (strong in 83% of them and within the most prominent vascular areas of the tumors the recorded mean MVD count was 59 microvessels/mm²). Stromal TSP-1 staining was detected in 80% of the cases, but in only 20% of them characterized strong. A positive association was observed between VEGF expression and MVD and a negative association between TSP-1 expression and MVD. MVD was found statistically higher in unfavourable CUP subsets compared to favorable ones. Otherwise no association was detected between VEGF and TSP-1 and tumor differentiation, response to treatment, clinical subgroups and survival. In conclusion, we found that MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 are widely expressed in CUP indicating an essential role of proteolysis in these tumors. TIMP-1 may be considered a possible marker of poor prognosis. We also showed that CUP are highly angiogenic tumors in terms of near absolute overexpression of VEGF and high MVD. According to our findings



we can assume that both angiogenesis and proteolysis are activated in these metastatic tumors and we consider that this data can help to build up our knowledge on the understanding of the biology of these tumors and can be used to help direct evolving targeted therapeutics in cancer.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΚΑΠΕ	Καρκίνος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας
ΑΤ	Αξονική τομογραφία
ΡS	Performance status
EBV	Epstein Bar virus
MVD	Microvessel density
ΜΠ	Μικροαγγειακή πυκνότητα
VEGF	Vascular endothelial growth factor
PDGF	Platelet derived growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TGF-b	Tumor growth factor-b
IL	Interleukin
IGF-1	Insulin growth factor-1
TSP	Thrombospondin
TSP-1	Thrombospondin -1
MMP	Matrix metalloproteinases
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TBS	Trisaline buffer

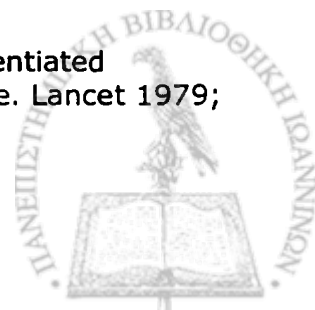


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary Origin. *Oncologist* 1997; 2(3):142-152.
- (2) Barista I, Celik I, Gullu I, Hayran M, Akova M. Integrating the time factor into the definition of metastasis of unknown origin. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(1):51.
- (3) Califano J, Westra WH, Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L et al. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):599-604.
- (4) Holmes FF, Fouts TL. Metastatic cancer of unknown primary site. *Cancer* 1970; 26(4):816-820.
- (5) Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. Diagnostic strategies for unknown primary cancer. *Cancer* 2004; 100(9):1776-1785.
- (6) Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenzi R, Hess KR, Raber MN. Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin. *J Clin Oncol* 1995; 13(8):2094-2103.
- (7) Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39(14):1990-2005.
- (8) Pavlidis N. Cancer of unknown primary: biological and clinical characteristics. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 3:iii11-iii18.
- (9) van de Wouw AJ, Jansen RL, Speel EJ, Hillen HF. The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review. *Ann Oncol* 2003; 14(2):191-196.
- (10) Kuttesch JF, Jr., Parham DM, Kaste SC, Rao BN, Douglass EC, Pratt CB. Embryonal malignancies of unknown primary origin in children. *Cancer* 1995; 75(1):115-121.
- (11) Levi F, Te VC, Erier G, Randimbison L, La Vecchia C. Epidemiology of unknown primary tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38(13):1810-1812.



- (12) Muir C. Cancer of unknown primary site. *Cancer* 1995; 75(1 Suppl):353-356.
- (13) Nystrom JS, Weiner JM, Heffelfinger-Juttner J, Irwin LE, Bateman JR, Wolf RM. Metastatic and histologic presentations in unknown primary cancer. *Semin Oncol* 1977; 4(1):53-58.
- (14) Bell CW, Pathak S, Frost P. Unknown primary tumors: establishment of cell lines, identification of chromosomal abnormalities, and implications for a second type of tumor progression. *Cancer Res* 1989; 49(15):4311-4315.
- (15) Raber MN, Faintuch J, Abbruzzese JL, Sumrall C, Frost P. Continuous infusion 5-fluorouracil, etoposide and cis-diamminedichloroplatinum in patients with metastatic carcinoma of unknown primary origin. *Ann Oncol* 1991; 2(7):519-520.
- (16) Pavlidis N, Kosmidis P, Skarlos D, Briassoulis E, Beer M, Theoharis D et al. Subsets of tumors responsive to cisplatin or carboplatin combinations in patients with carcinoma of unknown primary site. A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Ann Oncol* 1992; 3(8):631-634.
- (17) Greco FA, Erland JB, Morrissey LH, Burris HA, III, Hermann RC, Steis R et al. Carcinoma of unknown primary site: phase II trials with docetaxel plus cisplatin or carboplatin. *Ann Oncol* 2000; 11(2):211-215.
- (18) Briassoulis E, Kalofonos H, Bafaloukos D, Samantas E, Fountzilas G, Xiros N et al. Carboplatin plus paclitaxel in unknown primary carcinoma: a phase II Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2000; 18(17):3101-3107.
- (19) Lortholary A, Abadie-Lacourtoisie S, Guerin O, Mege M, Rauglaudre GD, Gamelin E. [Cancers of unknown origin: 311 cases]. *Bull Cancer* 2001; 88(6):619-627.
- (20) Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, Raber MN, Lenzi R, Frost P. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol* 1994; 12(6):1272-1280.
- (21) van der GA, Verweij J, Planting AS, Hop WC, Stoter G. Simple prognostic model to predict survival in patients with undifferentiated carcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 1995; 13(7):1720-1725.
- (22) Ayoub JP, Hess KR, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL. Unknown primary tumors metastatic to liver. *J Clin Oncol* 1998; 16(6):2105-2112.
- (23) Fox RM, Woods RL, Tattersall MH, McGovern VJ. Undifferentiated carcinoma in young men: the atypical teratoma syndrome. *Lancet* 1979; 1(8130):1316-1318.



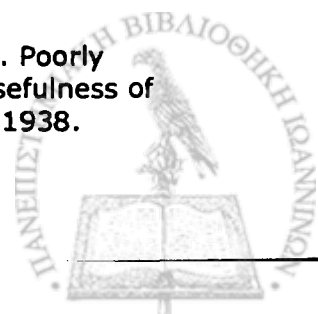
- (24) Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth JD. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104(4):547-553.
- (25) Jackson B, Scott-Conner C, Moulder J. Axillary metastasis from occult breast carcinoma: diagnosis and management. *Am Surg* 1995; 61(5):431-434.
- (26) Leibman AJ, Kossoff MB. Mammography in women with axillary lymphadenopathy and normal breasts on physical examination: value in detecting occult breast carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159(3):493-495.
- (27) Schorn C, Fischer U, Luftner-Nagel S, Westerhof JP, Grabbe E. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol* 1999; 9(3):470-473.
- (28) Tilanus-Linthorst MM, Obdeijn AI, Bontenbal M, Oudkerk M. MRI in patients with axillary metastases of occult breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44(2):179-182.
- (29) Ellerbroek N, Holmes F, Singletary E, Evans H, Oswald M, McNeese M. Treatment of patients with isolated axillary nodal metastases from an occult primary carcinoma consistent with breast origin. *Cancer* 1990; 66(7):1461-1467.
- (30) Matsuoka K, Ohsumi S, Takashima S, Saeki T, Aogi K, Mandai K. Occult breast carcinoma presenting with axillary lymph node metastases: follow-up of eleven patients. *Breast Cancer* 2003; 10(4):330-334.
- (31) Koivunen P, Laranne J, Virtaniemi J, Back L, Makitie A, Pulkkinen J et al. Cervical metastasis of unknown origin: a series of 72 patients. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5):569-574.
- (32) Jereczek-Fossa BA, Jassem J, Orecchia R. Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(2):153-164.
- (33) Zaren HA, Copeland EM, III. Inguinal node metastases. *Cancer* 1978; 41(3):919-923.
- (34) Guarischi A, Keane TJ, Elhakim T. Metastatic inguinal nodes from an unknown primary neoplasm. A review of 56 cases. *Cancer* 1987; 59(3):572-577.
- (35) van de Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, Hillen HF. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res* 2004; 24(1):297-301.



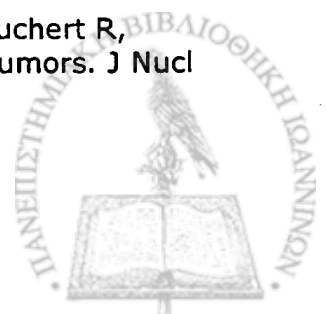
- (36) Zang RY, Zhang ZY, Cai SM, Tang MQ, Chen J, Li ZT. Epithelial ovarian cancer presenting initially with extraabdominal or intrahepatic metastases: a preliminary report of 25 cases and literature review. *Am J Clin Oncol* 2000; 23(4):416-419.
- (37) Strnad CM, Grosh WW, Baxter J, Burnett LS, Jones HW, III, Greco FA et al. Peritoneal carcinomatosis of unknown primary site in women. A distinctive subset of adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 1989; 111(3):213-217.
- (38) Ringenberg QS, Doll DC, Loy TS, Yarbrow JW. Malignant ascites of unknown origin. *Cancer* 1989; 64(3):753-755.
- (39) Katagiri H, Takahashi M, Inagaki J, Sugiura H, Ito S, Iwata H. Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: a retrospective study. *Cancer* 1999; 86(3):533-537.
- (40) Gentile PS, Carloss HW, Huang TY, Yam LT, Lam WK. Disseminated prostatic carcinoma simulating primary lung cancer. Indications for immunodiagnostic studies. *Cancer* 1988; 62(4):711-715.
- (41) Maesawa S, Kondziolka D, Thompson TP, Flickinger JC, Dade L. Brain metastases in patients with no known primary tumor. *Cancer* 2000; 89(5):1095-1101.
- (42) Nguyen LN, Maor MH, Oswald MJ. Brain metastases as the only manifestation of an undetected primary tumor. *Cancer* 1998; 83(10):2181-2184.
- (43) Maillefert JF, Tavernier C, Tebib J. Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: A retrospective study. *Cancer* 2000; 88(7):1759-1761.
- (44) Le Chevalier T, Smith FP, Caille P, Constans JP, Rouesse JG. Sites of primary malignancies in patients presenting with cerebral metastases. A review of 120 cases. *Cancer* 1985; 56(4):880-882.
- (45) Garrow GC, Greco FA, Hainsworth JD. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20(3):287-291.
- (46) Hainsworth JD, Johnson DH, Greco FA. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary site. A newly recognized clinicopathologic entity. *Ann Intern Med* 1988; 109(5):364-371.
- (47) Laveau F, Picot MC, Dereure O, Guilhou JJ, Guillot B. [Metastatic melanoma of unknown primary site]. *Ann Dermatol Venereol* 2001; 128(8-9):893-898.



- (48) Schlagenhauff B, Stroebel W, Ellwanger U, Meier F, Zimmermann C, Breuninger H et al. Metastatic melanoma of unknown primary origin shows prognostic similarities to regional metastatic melanoma: recommendations for initial staging examinations. *Cancer* 1997; 80(1):60-65.
- (49) Anbari KK, Schuchter LM, Bucky LP, Mick R, Synnestvedt M, Guerry D et al. Melanoma of unknown primary site: presentation, treatment, and prognosis--a single institution study. University of Pennsylvania Pigmented Lesion Study Group. *Cancer* 1997; 79(9):1816-1821.
- (50) Bar-Eli M, Abbruzzese JL, Lee-Jackson D, Frost P. p53 gene mutation spectrum in human unknown primary tumors. *Anticancer Res* 1993; 13(5A):1619-1623.
- (51) Briassoulis E, Tsokos M, Fountzilas G, Bafaloukos D, Kosmidis P, Samantas E et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications. A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998; 18(3B):1907-1914.
- (52) Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, Fountzilas G, Agnantis N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995; 15(6B):2563-2567.
- (53) Hainsworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of Her-2 in patients with poorly differentiated carcinoma or poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000; 18(3):632-635.
- (54) Hillen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74(1):81-85.
- (55) Stewart JF, Tattersall MH, Woods RL, Fox RM. Unknown primary adenocarcinoma: incidence of overinvestigation and natural history. *Br Med J* 1979; 1(6177):1530-1533.
- (56) Levine MN, Drummond MF, Labelle RJ. Cost-effectiveness in the diagnosis and treatment of carcinoma of unknown primary origin. *CMAJ* 1985; 133(10):977-987.
- (57) Hainsworth JD, Greco FA. Treatment of patients with cancer of an unknown primary site. *N Engl J Med* 1993; 329(4):257-263.
- (58) Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE, Bosl GJ, Mazumdar M, Chaganti RS. Molecular and cytogenetic studies in the diagnosis of patients with poorly differentiated carcinomas of unknown primary site. *J Clin Oncol* 1995; 13(1):274-282.
- (59) Hainsworth JD, Wright EP, Johnson DH, Davis BW, Greco FA. Poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: clinical usefulness of immunoperoxidase staining. *J Clin Oncol* 1991; 9(11):1931-1938.



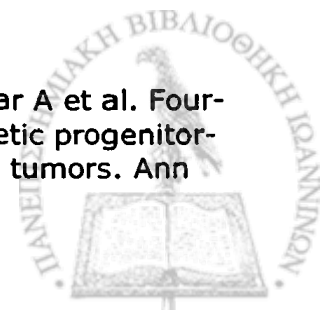
- (60) Mackay B, Ordonez NG. Pathological evaluation of neoplasms with unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20(3):206-228.
- (61) Lefebvre JL, Coche-Dequeant B, Van JT, Buisset E, Adenis A. Cervical lymph nodes from an unknown primary tumor in 190 patients. *Am J Surg* 1990; 160(4):443-446.
- (62) Kole AC, Nieweg OE, Pruim J, Hoekstra HJ, Koops HS, Roodenburg JL et al. Detection of unknown occult primary tumors using positron emission tomography. *Cancer* 1998; 82(6):1160-1166.
- (63) Pavlidis N, Kalef-Ezra J, Briassoulis E, Skarlos D, Kosmidis P, Saferiadis K et al. Evaluation of six tumor markers in patients with carcinoma of unknown primary. *Med Pediatr Oncol* 1994; 22(3):162-167.
- (64) Gamble AR, Bell JA, Ronan JE, Pearson D, Ellis IO. Use of tumour marker immunoreactivity to identify primary site of metastatic cancer. *BMJ* 1993; 306(6873):295-298.
- (65) Nystrom JS, Weiner JM, Wolf RM, Bateman JR, Viola MV. Identifying the primary site in metastatic cancer of unknown origin. Inadequacy of roentgenographic procedures. *JAMA* 1979; 241(4):381-383.
- (66) Karsell PR, Sheedy PF, O'Connell MJ. Computed tomography in search of cancer of unknown origin. *JAMA* 1982; 248(3):340-343.
- (67) Mantaka P, Baum RP, Hertel A, Adams S, Niessen A, Sengupta S et al. PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) in patients with cancer of unknown primary (CUP): influence on patients' diagnostic and therapeutic management. *Cancer Biother Radiopharm* 2003; 18(1):47-58.
- (68) Rusthoven KE, Koshy M, Paulino AC. The role of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor. *Cancer* 2004; 101(11):2641-2649.
- (69) Regelink G, Brouwer J, de Bree R, Pruim J, van der Laan BF, Vaalburg W et al. Detection of unknown primary tumours and distant metastases in patients with cervical metastases: value of FDG-PET versus conventional modalities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29(8):1024-1030.
- (70) Stoeckli SJ, Mosna-Firlejczyk K, Goerres GW. Lymph node metastasis of squamous cell carcinoma from an unknown primary: impact of positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(3):411-416.
- (71) Bohuslavizki KH, Klutmann S, Kroger S, Sonnemann U, Buchert R, Werner JA et al. FDG PET detection of unknown primary tumors. *J Nucl Med* 2000; 41(5):816-822.



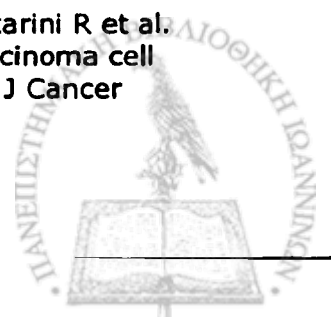
- (72) Delgado-Bolton RC, Fernandez-Perez C, Gonzalez-Mate A, Carreras JL. Meta-analysis of the performance of 18F-FDG PET in primary tumor detection in unknown primary tumors. *J Nucl Med* 2003; 44(8):1301-1314.
- (73) Rades D, Kuhnel G, Wildfang I, Borner AR, Schmoll HJ, Knapp W. Localised disease in cancer of unknown primary (CUP): the value of positron emission tomography (PET) for individual therapeutic management. *Ann Oncol* 2001; 12(11):1605-1609.
- (74) Joshi U, van der Hoeven JJ, Comans EF, Herder GJ, Teule GJ, Hoekstra OS. In search of an unknown primary tumour presenting with extracervical metastases: the diagnostic performance of FDG-PET. *Br J Radiol* 2004; 77(924):1000-1006.
- (75) Hainsworth JD, Wright EP, Gray GF, Jr., Greco FA. Poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: correlation of light microscopic findings with response to cisplatin-based combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 1987; 5(8):1275-1280.
- (76) Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38(6):758-763.
- (77) Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10(1):77-82.
- (78) Dvorak AM, Monahan RA. Metastatic adenocarcinoma of unknown primary site: diagnostic electron microscopy to determine the site of tumor origin. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106(1):21-24.
- (79) Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM et al. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994; 331(5):294-299.
- (80) Bosl GJ, Iason DH, Rodriguez E, Motzer RJ, Reuter VE, Chaganti RS. Clinical relevance of the i(12p) marker chromosome in germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(5):349-355.
- (81) Hainsworth JD, Greco FA. Poorly differentiated carcinoma and germ cell tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5(6):1223-1231.
- (82) Friesland S, Lind MG, Lundgren J, Munck-Wikland E, Fernberg JO. Outcome of ipsilateral treatment for patients with metastases to neck nodes of unknown origin. *Acta Oncol* 2001; 40(1):24-28.
- (83) Koivunen P, Laranne J, Virtaniemi J, Back L, Makitie A, Pulkkinen J et al. Cervical metastasis of unknown origin: a series of 72 patients. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5):569-574.



- (84) Harper CL, Lofts FJ, Otter M, Mansi JL. Prostate-specific antigen (PSA) immunohistochemistry in the presence of a normal serum PSA as an aid to diagnosis of adenocarcinoma of unknown primary site. *Br J Hosp Med* 1996; 55(6):367-368.
- (85) Simon MA, Bartucci EJ. The search for the primary tumor in patients with skeletal metastases of unknown origin. *Cancer* 1986; 58(5):1088-1095.
- (86) Yu H, Yang MT, Rong TH, Long H, Ou W. [Clinical analysis of seven patients with occult breast cancer and literature reviews]. *Ai Zheng* 2002; 21(5):541-543.
- (87) Brill KL, Brenin DR. Occult breast cancer and axillary mass. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2(2):149-155.
- (88) Greco FA, Burris HA, III, Litchy S, Barton JH, Bradof JE, Richards P et al. Gemcitabine, carboplatin, and paclitaxel for patients with carcinoma of unknown primary site: a Minnie Pearl Cancer Research Network study. *J Clin Oncol* 2002; 20(6):1651-1656.
- (89) Culine S, Lortholary A, Voigt JJ, Bugat R, Theodore C, Priou F et al. Cisplatin in combination with either gemcitabine or irinotecan in carcinomas of unknown primary site: results of a randomized phase II study--trial for the French Study Group on Carcinomas of Unknown Primary (GEFCAPI 01). *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3479-3482.
- (90) Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth JD. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104(4):547-553.
- (91) Piga A, Nortilli R, Cetto GL, Cardarelli N, Fedeli SL, Fiorentini G et al. Carboplatin, doxorubicin and etoposide in the treatment of tumours of unknown primary site. *Br J Cancer* 2004; 90(10):1898-1904.
- (92) Falkson CI, Cohen GL. Mitomycin C, epirubicin and cisplatin versus mitomycin C alone as therapy for carcinoma of unknown primary origin. *Oncology* 1998; 55(2):116-121.
- (93) Warner E, Goel R, Chang J, Chow W, Verma S, Dancey J et al. A multicentre phase II study of carboplatin and prolonged oral etoposide in the treatment of cancer of unknown primary site (CUPS). *Br J Cancer* 1998; 77(12):2376-2380.
- (94) Farrugia DC, Norman AR, Nicolson MC, Gore M, Bolodeoku EO, Webb A et al. Unknown primary carcinoma: randomised studies are needed to identify optimal treatments and their benefits. *Eur J Cancer* 1996; 32A(13):2256-2261.
- (95) Culine S, Fabbro M, Assens C, Ychou M, Romieu G, Kramar A et al. Four-step high-dose sequential chemotherapy with hematopoietic progenitor-cell support as induction treatment for patients with solid tumors. *Ann Oncol* 1997; 8(10):951-956.



- (96) Culline S, Fabbro M, Ychou M, Romieu G, Cupissol D, Pujol H. Chemotherapy in carcinomas of unknown primary site: a high-dose intensity policy. *Ann Oncol* 1999; 10(5):569-575.
- (97) Mintzer DM, Warhol M, Martin AM, Greene G. Cancer of unknown primary: changing approaches. A multidisciplinary case presentation from the Joan Karnell cancer center of pennsylvania hospital. *Oncologist* 2004; 9(3):330-338.
- (98) Nguyen TH. Mechanisms of metastasis. *Clin Dermatol* 2004; 22(3):209-216.
- (99) Paget S. The Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571-573. 23-3-1889.
- (100) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-458.
- (101) Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 2004; 14(17):R719-R721.
- (102) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-458.
- (103) Kremer M, Quintanilla-Martinez L, Fuchs M, Gamboa-Dominguez A, Haye S, Kalthoff H et al. Influence of tumor-associated E-cadherin mutations on tumorigenicity and metastasis. *Carcinogenesis* 2003; 24(12):1879-1886.
- (104) Zhang XD, Hersey P. Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology* 1999; 31(3):239-246.
- (105) Quaranta V, Giannelli G. Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori* 2003; 89(4):343-348.
- (106) Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 2004; 14(17):R719-R721.
- (107) Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1552(1):39-45.
- (108) Hunt G. The role of laminin in cancer invasion and metastasis. *Exp Cell Biol* 1989; 57(3):165-176.
- (109) Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R et al. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 2000; 87(3):336-342.



- (110) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51(18 Suppl):5054s-5059s.
- (111) Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr Mol Med* 2003; 3(7):659-671.
- (112) Parker B, Sukumar S. Distant metastasis in breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(1):14-21.
- (113) Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25(6):482-489.
- (114) Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153(3):865-873.
- (115) Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153(3):865-873.
- (116) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-458.
- (117) Morris VL, MacDonald IC, Koop S, Schmidt EE, Chambers AF, Groom AC. Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11(5):377-390.
- (118) Scherbarth S, Orr FW. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: effects of interleukin-1alpha on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res* 1997; 57(18):4105-4110.
- (119) Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2000; 60(9):2541-2546.
- (120) Levitsky HI. Augmentation of host immune responses to cancer: overcoming the barrier of tumor antigen-specific T-cell tolerance. *Cancer J* 2000; 6 Suppl 3:S281-S290.
- (121) Fidler IJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002; 70(9-10):498-505.

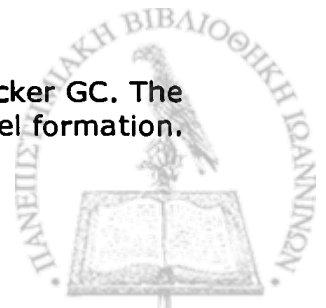


- (122) Naumov GN, MacDonald IC, Chambers AF, Groom AC. Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol* 2001; 11(4):271-276.
- (123) Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1(2):149-153.
- (124) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1):27-31.
- (125) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1:2-10.
- (126) Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3(7):643-651.
- (127) Boyd D. Invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(1):77-89.
- (128) Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med* 2004; 351(3):215-216.
- (129) McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1:3-10.
- (130) Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Fan F et al. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 2000; 5(4):323-328.
- (131) Weingartner K, Ben Sasson SA, Stewart R, Richie JP, Riedmiller H, Folkman J. Endothelial cell proliferation activity in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: an in vitro model for assessment. *J Urol* 1998; 159(2):465-470.
- (132) Stromblad S, Cheresh DA. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1996; 6(12):462-468.
- (133) Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY et al. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(11):2625-2634.
- (134) Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380(6572):364-366.
- (135) Bischoff J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1995; 5(2):69-74.
- (136) Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid



tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995; 1(12):1623-1634.

- (137) Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 1999; 59(13):3192-3198.
- (138) Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 1997; 15(12):1271-1275.
- (139) Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95(3):365-377.
- (140) Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1):38-47.
- (141) Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1):120-127.
- (142) Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der GP, van d, V, van der WE. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology* 2005; 46(1):31-36.
- (143) Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA et al. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278(45):44966-44974.
- (144) Chung J, Yoon S, Datta K, Bachelder RE, Mercurio AM. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on alpha6beta1 integrin in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64(14):4711-4716.
- (145) Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):505-515.
- (146) Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7(11):1194-1201.
- (147) Burbridge MF, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis* 2002; 5(3):215-226.



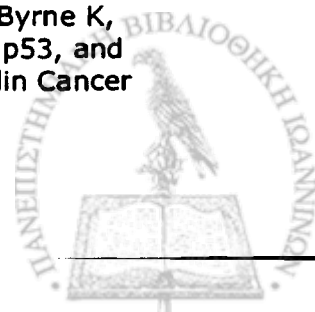
- (148) Tang DG, Conti CJ. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(1):109-117.
- (149) Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(10):960-970.
- (150) Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002; 9(2 Suppl):36-44.
- (151) Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2(10):737-744.
- (152) Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 2003; 63(17):5224-5229.
- (153) Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003; 200(2):183-194.
- (154) Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5(1):24-33.
- (155) Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K et al. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(2):143-147.
- (156) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1-8.
- (157) Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21(1B):689-695.
- (158) Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(6):838-845.
- (159) Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002; 86(10):1566-1577.



- (160) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4):581-611.
- (161) Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5(12):1806-1814.
- (162) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
- (163) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266(18):11947-11954.
- (164) Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20(21):4368-4380.
- (165) Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4(12):1317-1326.
- (166) Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1):4-25.
- (167) Guo P, Xu L, Pan S, Brekken RA, Yang ST, Whitaker GB et al. Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. *Cancer Res* 2001; 61(23):8569-8577.
- (168) Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 2003; 162(6):1881-1893.
- (169) Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176(5):1375-1379.
- (170) Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7(5):575-583.



- (171) McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ et al. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003; 198(6):863-868.
- (172) Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998; 273(47):31273-31282.
- (173) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4):581-611.
- (174) Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000; 156(5):1499-1504.
- (175) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 2004.
- (176) Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276(5):3222-3230.
- (177) Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60(18):5117-5124.
- (178) Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol* 2004; 164(5):1531-1535.
- (179) Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16986-16992.
- (180) Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):795-803.
- (181) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1):9-22.
- (182) Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O'Byrne K, Scott PA et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(12):3017-3024.



- (183) Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Barni S, Giordani P, Baldelli AM et al. Vascular endothelial growth factor and p53 expressions in liver and abdominal metastases from colon cancer. *Tumour Biol* 2003; 24(2):77-81.
- (184) Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(3):768-772.
- (185) Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, Magarelli DP, Horan AM, Evans SM. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 2001; 3(6):500-508.
- (186) Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP et al. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 6(5):485-495.
- (187) Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380(6573):439-442.
- (188) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol Pathol* 2000; 53(6):307-312.
- (189) Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003; 94(1):43-49.
- (190) Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 2003; 63(17):5224-5229.
- (191) Manenti L, Paganoni P, Floriani I, Landoni F, Torri V, Buda A et al. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; 39(13):1948-1956.
- (192) Burbridge MF, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis* 2002; 5(3):215-226.
- (193) Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1(10):1024-1028.



- (194) Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(6):C1375-C1386.
- (195) Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(6):C1358-C1366.
- (196) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18(14):3964-3972.
- (197) Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10(8):321-327.
- (198) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587):983-985.
- (199) Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2(10):1096-1103.
- (200) Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J Biol Chem* 1990; 265(30):18051-18054.
- (201) Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, Clauss M, De Martin R, Binder BR et al. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF-alpha signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB J* 2001; 15(1):230-242.
- (202) Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87(8):3336-3343.
- (203) Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29979-29985.
- (204) Boockock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(7):506-516.



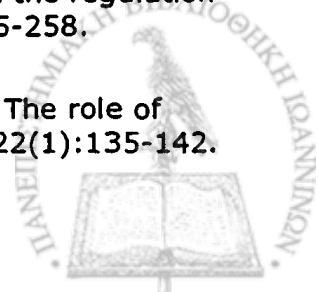
- (205) Giles FJ. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist* 2001; 6 Suppl 5:32-39.
- (206) Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(16):1237-1245.
- (207) Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 2001; 61(6):2736-2743.
- (208) Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61(5):2256-2260.
- (209) Na X, Wu G, Ryan CK, Schoen SR, di'Santagnese PA, Messing EM. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas. *J Urol* 2003; 170(2 Pt 1):588-592.
- (210) Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K et al. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncology* 2003; 64(3):266-274.
- (211) Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M et al. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62(23):7124-7129.
- (212) Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(6):998-1002.
- (213) Vaquero J, Zurita M, Morales C, Cincu R, Oya S. Expression of vascular permeability factor in glioblastoma specimens: correlation with tumor vascular endothelial surface and peritumoral edema. *J Neurooncol* 2000; 49(1):49-55.
- (214) Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):1207-1225.
- (215) Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 2002; 24(3):280-283.



- (216) Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(7):4349-4354.
- (217) Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92(11):4150-4166.
- (218) Salto H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78(12):1573-1577.
- (219) Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; 2(11):667-673.
- (220) Pegram MD, Reese DM. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002; 29(3 Suppl 11):29-37.
- (221) Brem SS, Cotran RS, Folkman MJ. Angiogenesis in brain tumors: a quantitative histologic study. *Surg Forum* 1974; 25(0):462-464.
- (222) Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 1998; 184(2):119-122.
- (223) Weidner N. Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. *J Pathol* 1999; 189(3):297-299.
- (224) Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(24):1875-1887.
- (225) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143(2):401-409.
- (226) Borre M, Offersen BV, Nerstrom B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer* 1998; 78(7):940-944.
- (227) de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology* 2000; 36(4):306-312.



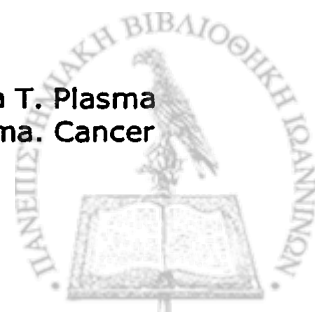
- (228) Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us.. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(12):883-893.
- (229) Yano T, Tanikawa S, Fujie T, Masutani M, Horie T. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36(5):601-609.
- (230) Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3410-3415.
- (231) de la TA, Katz AE, Bagiella E, Buttyan R, Sharir S, Olsson CA et al. Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy. A comparison of CD34 and CD31. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(4):555-562.
- (232) Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer* 2002; 86(10):1566-1577.
- (233) Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147(1):9-19.
- (234) Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18(1):143-152.
- (235) Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A et al. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer. *Cancer Lett* 2004; 208(2):227-234.
- (236) Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol* 2004; 19(1):37-42.
- (237) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 2004.
- (238) Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 1996; 10(10):1183-1191.
- (239) Sid B, Sartelè H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N et al. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49(3):245-258.
- (240) Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res* 2004; 122(1):135-142.



- (241) Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J* 1992; 6(14):3290-3299.
- (242) Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(6):961-968.
- (243) Booth WJ, Berndt MC. Thrombospondin in clinical disease states. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13(3):298-306.
- (244) Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(4):295-302.
- (245) Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 2001; 107(8):929-934.
- (246) Lymn JS, Patel MK, Clunn GF, Rao SJ, Gallagher KL, Hughes AD. Thrombospondin-1 differentially induces chemotaxis and DNA synthesis of human venous smooth muscle cells at the receptor-binding level. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 22):4353-4360.
- (247) Lymn JS, Rao SJ, Clunn GF, Gallagher KL, O'Neil C, Thompson NT et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and focal adhesion kinase are early signals in the growth factor-like responses to thrombospondin-1 seen in human vascular smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(9):2133-2140.
- (248) Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995; 130(3):503-506.
- (249) Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002; 6(1):1-12.
- (250) Nicosia RF, Tuszynski GP. Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol* 1994; 124(1-2):183-193.
- (251) BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, Aharonov O. Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(13):3601-3608.
- (252) Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990; 111(2):765-772.
- (253) Bagavandoss P, Kaytes P, Vogeli G, Wells PA, Wilks JW. Recombinant truncated thrombospondin-1 monomer modulates endothelial cell plasminogen activator inhibitor 1 accumulation and proliferation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192(2):325-332.



- (254) Morandi V, Fauvel-Lafeve F, Legrand C, Legrand YJ. Role of thrombospondin in the adhesion of human endothelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993; 29A(7):585-591.
- (255) Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* 1988; 107(6 Pt 1):2351-2361.
- (256) Lahav J. Thrombospondin inhibits adhesion of endothelial cells. *Exp Cell Res* 1988; 177(1):199-204.
- (257) Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265(5178):1582-1584.
- (258) Kanda S, Shono T, Tomasini-Johansson B, Klint P, Saito Y. Role of thrombospondin-1-derived peptide, 4N1K, in FGF-2-induced angiogenesis. *Exp Cell Res* 1999; 252(2):262-272.
- (259) Iruela-Arispe ML, Bornstein P, Sage H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(11):5026-5030.
- (260) Canfield AE, Schor AM. Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 2):797-809.
- (261) DiPietro LA, Nebgen DR, Polverini PJ. Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res* 1994; 31(3):178-185.
- (262) Volpert OV. Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19(1-2):87-92.
- (263) Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res* 2000; 37(3):209-218.
- (264) Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL, Capuzzi DM, Joseph RR, Katz J et al. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost* 1992; 67(6):607-611.
- (265) Nathan FE, Hernandez E, Dunton CJ, Treat J, Switalska HI, Joseph RR et al. Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 1994; 73(11):2853-2858.
- (266) Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP, Sakai T, Shirakusa T. Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 82(4):632-638.



- (267) Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3):219-227.
- (268) Mehta R, Kyshtoobayeva A, Kurosaki T, Small EJ, Kim H, Stroup R et al. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(1):81-88.
- (269) Oshiba G, Kijima H, Himeno S, Kenmochi T, Kise Y, Tanaka H et al. Stromal thrombospondin-1 expression is correlated with progression of esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19(5C):4375-4378.
- (270) Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M et al. Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15(3):453-457.
- (271) Ohta Y, Shridhar V, Kalemkerian GP, Bright RK, Watanabe Y, Pass HI. Thrombospondin-1 expression and clinical implications in malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 1999; 85(12):2570-2576.
- (272) Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3):219-227.
- (273) Mehta R, Kyshtoobayeva A, Kurosaki T, Small EJ, Kim H, Stroup R et al. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(1):81-88.
- (274) Oshiba G, Kijima H, Himeno S, Kenmochi T, Kise Y, Tanaka H et al. Stromal thrombospondin-1 expression is correlated with progression of esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19(5C):4375-4378.
- (275) Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M et al. Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15(3):453-457.
- (276) Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, Roberts DD. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1994; 59(2):191-195.
- (277) Sheibani N, Frazier WA. Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(15):6788-6792.



- (278) Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 155(2):441-452.
- (279) Volpert OV, Lawler J, Bouck NP. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11):6343-6348.
- (280) Crawford SE, Flores-Stadler EM, Huang L, Tan XD, Ranalli M, Mu Y et al. Rapid growth of cutaneous metastases after surgical resection of thrombospondin-secreting small blue round cell tumor of childhood. *Hum Pathol* 1998; 29(10):1039-1044.
- (281) Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54(24):6504-6511.
- (282) Yabkowitz R, Mansfield PJ, Dixit VM, Suchard SJ. Motility of human carcinoma cells in response to thrombospondin: relationship to metastatic potential and thrombospondin structural domains. *Cancer Res* 1993; 53(2):378-387.
- (283) Wang TN, Qian X, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Berger DH et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. *J Surg Res* 1996; 63(1):39-43.
- (284) Wang TN, Albo D, Tuszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloproteinase-9 production. *Surgery* 2002; 132(2):220-225.
- (285) Wang TN, Qian XH, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. *Am J Surg* 1995; 170(5):502-505.
- (286) Albo D, Berger DH, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res* 1998; 76(1):86-90.
- (287) Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18(5):1135-1149.
- (288) Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49(3):179-186.
- (289) Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 1990; 4(6):1577-1590.



- (290) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49(6):636-649.
- (291) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284(5751):67-68.
- (292) Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17):1260-1270.
- (293) Khokha R, Denhardt DT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis* 1989; 9(6):391-405.
- (294) Sato H, Okada Y, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):497-500.
- (295) Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003; 194(1):1-11.
- (296) Bashyam MD. Understanding cancer metastasis: an urgent need for using differential gene expression analysis. *Cancer* 2002; 94(6):1821-1829.
- (297) Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253(1-2):269-285.
- (298) Blavier L, Henriot P, Imren S, Declerck YA. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:108-119.
- (299) Polette M, Birembaut P. Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(11):1195-1202.
- (300) Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE et al. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol* 2004; 57(6):577-584.
- (301) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284(5751):67-68.
- (302) Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4):151-160.
- (303) Basset P, Wolf C, Rouyer N, Bellocq JP, Rio MC, Chambon P. Stromelysin-3 In stromal tissue as a control factor in breast cancer behavior. *Cancer* 1994; 74(3 Suppl):1045-1049.



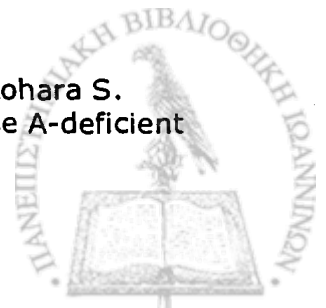
- (304) Aye MM, Ma C, Lin H, Bower KA, Wiggins RC, Luo J. Ethanol-induced in vitro invasion of breast cancer cells: the contribution of MMP-2 by fibroblasts. *Int J Cancer* 2004; 112(5):738-746.
- (305) Warner RL, Bhagavathula N, Nerusu KC, Lateef H, Younkin E, Johnson KJ et al. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. *Exp Mol Pathol* 2004; 76(3):189-195.
- (306) Hayashido Y, Urabe K, Yoshioka Y, Kitano H, Okamoto T, Matsuya T. Participation of fibroblasts in MMP-2 binding and activation on the surface of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2003; 22(3):657-662.
- (307) McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27(4):734-740.
- (308) Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer* 1999; 81(5):774-782.
- (309) Ye S, Dhillon S, Turner SJ, Bateman AC, Theaker JM, Pickering RM et al. Invasiveness of cutaneous malignant melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism. *Cancer Res* 2001; 61(4):1296-1298.
- (310) Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. [Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression]. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(3):154-159.
- (311) Brummer O, Athar S, Riethdorf L, Loning T, Herbst H. Matrix-metalloproteinases 1, 2, and 3 and their tissue inhibitors 1 and 2 in benign and malignant breast lesions: an in situ hybridization study. *Virchows Arch* 1999; 435(6):566-573.
- (312) Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 1(4):208-219.
- (313) Bartsch JE, Staren ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer. *J Surg Res* 2003; 110(2):383-392.
- (314) Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou I, Alexandrou P, Katsarou S, Athanassiadou P et al. Stromelysin-3 protein expression in invasive breast cancer: relation to proliferation, cell survival and patients' outcome. *Mod Pathol* 2002; 15(11):1154-1161.
- (315) Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89(7):1270-1275.



- (316) Stearns M, Stearns ME. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res* 1996; 8(2):69-75.
- (317) Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 1997; 74(2):220-223.
- (318) Pritchard SC, Nicolson MC, Lloret C, McKay JA, Ross VG, Kerr KM et al. Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their tissue inhibitors in stage II non-small cell lung cancer: implications for MMP inhibition therapy. *Oncol Rep* 2001; 8(2):421-424.
- (319) Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, Tannapfel A, Steinert M, Wittekind C. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumour Biol* 2002; 23(3):179-184.
- (320) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87(9):1215-1221.
- (321) Waas ET, Wobbes T, Lomme RM, DeGroot J, Ruers T, Hendriks T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Br J Surg* 2003; 90(12):1556-1564.
- (322) Hu XX, Li L, Li DR, Zhang W, Cheng XQ, Zhang JQ et al. [Expression of matrix metalloproteinases-9,2,7, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1,2,3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance]. *Ai Zheng* 2004; 23(10):1194-1198.
- (323) Maatta M, Santala M, Soini Y, Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in low malignant potential ovarian tumors. *Tumour Biol* 2004; 25(4):188-192.
- (324) Barille S, Akhoundi C, Collette M, Mellerin MP, Rapp MJ, Harousseau JL et al. Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells. *Blood* 1997; 90(4):1649-1655.
- (325) Kossakowska AE, Urbanski SJ, Janowska-Wieczorek A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors - expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2000; 39(5-6):485-493.
- (326) Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988; 48(19):5539-5545.



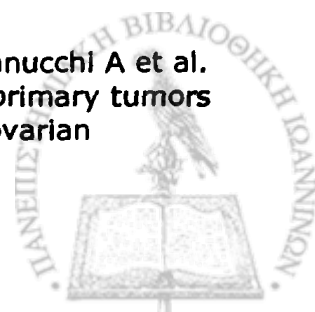
- (327) Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R. Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 63(5):680-687.
- (328) Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(10):4293-4297.
- (329) Tsunozuka Y, Kinoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A et al. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 1996; 56(24):5678-5683.
- (330) Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(10):4293-4297.
- (331) Hasegawa S, Koshikawa N, Momiyama N, Moriyama K, Ichikawa Y, Ishikawa T et al. Matrilysin-specific antisense oligonucleotide inhibits liver metastasis of human colon cancer cells in a nude mouse model. *Int J Cancer* 1998; 76(6):812-816.
- (332) Khokha R, Zimmer MJ, Wilson SM, Chambers AF. Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells suppresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10(6):365-370.
- (333) Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res* 1994; 54(17):4791-4797.
- (334) Koop S, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Khokha R, Grattan M et al. Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20):11080-11084.
- (335) Powell WC, Knox JD, Navre M, Grogan TM, Kittelson J, Nagle RB et al. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1993; 53(2):417-422.
- (336) Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 1998; 94(3):353-362.
- (337) Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998; 58(5):1048-1051.



- (338) Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93(3):411-422.
- (339) Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103(9):1237-1241.
- (340) Masson R, Lefebvre O, Noel A, Fahime ME, Chenard MP, Wendling C et al. In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol* 1998; 140(6):1535-1541.
- (341) Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer* 1999; 81(4):727-732.
- (342) Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Carpentier S, Djemli A et al. [Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Fik-1) in breast carcinoma]. *Ann Pathol* 2003; 23(4):297-305.
- (343) Nicolini A, Campani D, Miccoli P, Spinelli C, Carpi A, Menicagli M et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and other common tissue prognostic indicators in breast cancer: a case-control study. *Int J Biol Markers* 2004; 19(4):275-281.
- (344) Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K, Speiser P, Seifert M, Czerwenka K et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. *Int J Cancer* 1997; 74(4):455-458.
- (345) Yuan A, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT et al. Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2000; 89(6):475-483.
- (346) Minami K, Salto Y, Imamura H, Okamura A. Prognostic significance of p53, Ki-67, VEGF and Glut-1 in resected stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2002; 38(1):51-57.
- (347) Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Fik1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; 188(4):369-377.
- (348) Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(6):998-1002.



- (349) Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86(3):417-423.
- (350) Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Zbar A, Kouraklis G, Simopoulos C et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; 236(1):37-42.
- (351) Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; 90(1):206-215.
- (352) Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78(2):132-137.
- (353) Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Salrenji M, Motohashi H, Yanoma S et al. Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 153(1-2):7-12.
- (354) Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Syouji T et al. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 192(2):215-225.
- (355) Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; 39(2):184-191.
- (356) Cascinu S, Graziano F, Catalano V, Staccoli MP, Barni S, Giordani P et al. Differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression between liver and abdominal metastases from colon cancer. Implications for the treatment with VEGF inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18(8):651-655.
- (357) Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer* 1997; 76(9):1221-1227.
- (358) Hartenbach EM, Olson TA, Goswitz JJ, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and survival in human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Lett* 1997; 121(2):169-175.
- (359) Gadducci A, Viacava P, Cosio S, Cecchetti D, Fanelli G, Fanucchi A et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in primary tumors and peritoneal metastases from patients with advanced ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23(3C):3001-3008.



- (360) Gadducci A, Ferdeghini M, Fanucchi A, Annicchiarico C, Ciampi B, Prontera C et al. Serum preoperative vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer: relationship with prognostic variables and clinical outcome. *Anticancer Res* 1999; 19(2B):1401-1405.
- (361) Li L, Wang L, Zhang W, Tang B, Zhang J, Song H et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2004; 24(3b):1973-1979.
- (362) Rowe RW, Tomoda M, Strebel FR, Jenkins GN, Stephens LC, Bull JM. The natural progression of microvasculature in primary tumor and lymph node metastases in a breast carcinoma model: relationship between microvessel density, vascular endothelial growth factor expression, and metastatic invasion. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(4):408-414.
- (363) Arapandoni-Dadioti P, Giatromanolaki A, Trihia H, Harris AL, Koukourakis MI. Angiogenesis in ductal breast carcinoma. Comparison of microvessel density between primary tumour and lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999; 137(2):145-150.
- (364) Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial-growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21(1B):689-695.
- (365) Volm M, Koomagi R, Kaufmann M, Mattern J, Stammer G. Microvessel density, expression of proto-oncogenes, resistance-related proteins and incidence of metastases in primary ovarian carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14(3):209-214.
- (366) Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55(5):739-744.
- (367) Stone PJ, Goodheart MJ, Rose SL, Smith BJ, DeYoung BR, Buller RE. The influence of microvessel density on ovarian carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2003; 90(3):566-571.
- (368) Strohmeyer D, Strauss F, Rossing C, Roberts C, Kaufmann O, Bartsch G et al. Expression of bFGF, VEGF and c-met and their correlation with microvessel density and progression in prostate carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24(3a):1797-1804.
- (369) Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000; 60(11):2898-2905.
- (370) Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Baroni G, Taddei A et al. COX-2 status in relation to tumor microvessel density and VEGF



expression: analysis in ovarian carcinoma patients with low versus-high survival rates. *Oncol Rep* 2004; 11(2):309-313.

- (371) Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol* 2004; 19(1):37-42.
- (372) Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A et al. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer. *Cancer Lett* 2004; 208(2):227-234.
- (373) Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438(2):116-120.
- (374) Zhang J, Ito R, Oue N, Zhu X, Kitadai Y, Yoshida K et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6):563-568.
- (375) Albo D, Rothman VL, Roberts DD, Tuszynski GP. Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer* 2000; 83(3):298-306.
- (376) Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998; 93(7):1159-1170.
- (377) Hayashido Y, Nakashima M, Urabe K, Yoshioka H, Yoshioka Y, Hamana T et al. Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003; 12(4):447-452.
- (378) Qian X, Wang TN, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1997; 235(2):403-412.
- (379) Guo N, Templeton NS, Al Barazi H, Cashel JA, Sipes JM, Krutzsch HC et al. Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60(2):457-466.
- (380) Hayashido Y, Nakashima M, Urabe K, Yoshioka H, Yoshioka Y, Hamana T et al. Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003; 12(4):447-452.

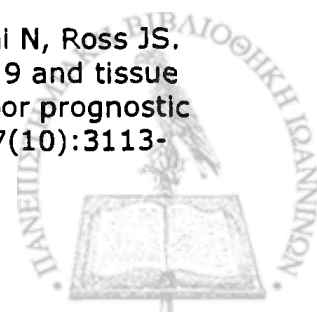


- (381) Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438(2):116-120.
- (382) Kodama J, Hashimoto I, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H et al. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in epithelial ovarian tumor. *Anticancer Res* 2001; 21(4B):2983-2987.
- (383) Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M et al. Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15(3):453-457.
- (384) Oshiba G, Kijima H, Himeno S, Kenmochi T, Kise Y, Tanaka H et al. Stromal thrombospondin-1 expression is correlated with progression of esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19(5C):4375-4378.
- (385) Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL et al. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 1):4150-4157.
- (386) Straume O, Akslen LA. Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis* 2003; 6(4):295-301.
- (387) Zhang J, Ito R, Oue N, Zhu X, Kitadal Y, Yoshida K et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6):563-568.
- (388) Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3):219-227.
- (389) Kaio E, Tanaka S, Oka S, Hiyama T, Kitadal Y, Haruma K et al. Clinical significance of thrombospondin-1 expression in relation to vascular endothelial growth factor and interleukin-10 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23(4):901-911.
- (390) Maeda K, Nishiguchi Y, Yashiro M, Yamada S, Onoda N, Sawada T et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in colorectal carcinoma. *Int J Mol Med* 2000; 5(4):373-378.
- (391) Miyanaga K, Kato Y, Nakamura T, Matsumura M, Amaya H, Horiuchi T et al. Expression and role of thrombospondin-1 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22(6C):3941-3948.
- (392) Kodama J, Hashimoto I, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H et al. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical



cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7(9):2826-2831.

- (393) Rice AJ, Steward MA, Quinn CM. Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol* 2002; 55(12):921-925.
- (394) Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Oida Y, Kashiwagi H, Ishii M et al. Thrombospondin-1 expression as a prognostic predictor of pancreatic ductal carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 21(6):1189-1195.
- (395) Bertin N, Clezardin P, Kubiak R, Frappart L. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res* 1997; 57(3):396-399.
- (396) Gasparini G, Toi M, Biganzoli E, Dittadi R, Fanelli M, Morabito A et al. Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin D, hormone receptors and prognosis. *Oncology* 2001; 60(1):72-80.
- (397) Linderholm B, Karlsson E, Klaar S, Lindahl T, Borg AL, Elmberger G et al. Thrombospondin-1 expression in relation to p53 status and VEGF expression in human breast cancers. *Eur J Cancer* 2004; 40(16):2417-2423.
- (398) Grossfeld GD, Carroll PR, Lindeman N, Meng M, Groshen S, Feng AC et al. Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology* 2002; 59(1):97-102.
- (399) Seki N, Kodama J, Hashimoto I, Hongo A, Yoshinouchi M, Kudo T. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal and neoplastic endometrial tissues: correlation with angiogenesis and prognosis. *Int J Oncol* 2001; 19(2):305-310.
- (400) Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol Res* 1993; 5(1):19-28.
- (401) Kossakowska AE, Huchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer* 1996; 73(11):1401-1408.
- (402) Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7(10):3113-3119.



- (403) Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8229-8234.
- (404) Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 2004; 63(3):602-608.
- (405) Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8229-8234.
- (406) Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; 2(4):252-257.
- (407) Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(1):75-85.
- (408) Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 2000; 17(4):673-681.
- (409) Schmalefeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8):2396-2404.
- (410) Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 2002; 94(5):1466-1475.
- (411) Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):1118-1127.
- (412) Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2):634-640.



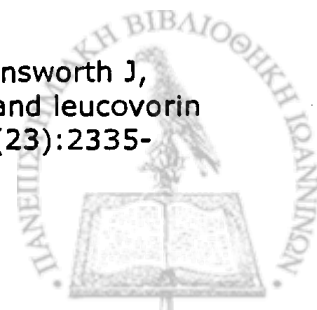
- (413) Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001; 165(5):1769-1772.
- (414) Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9):3581-3584.
- (415) Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74(3):413-417.
- (416) Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T et al. Influence of angiogenetic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 85(11):1706-1712.
- (417) Bodey B, Bodey B, Jr., Groger AM, Siegel SE, Kaiser HE. Invasion and metastasis: the expression and significance of matrix metalloproteinases in carcinomas of the lung. *In Vivo* 2001; 15(2):175-180.
- (418) Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res* 1997; 3(9):1623-1628.
- (419) Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 2000; 17(4):673-681.
- (420) Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, De Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A et al. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005; 13(1):115-120.
- (421) Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ. Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol* 2000; 53(2):99-106.
- (422) Baker EA, Stephenson TJ, Reed MW, Brown NJ. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol Pathol* 2002; 55(5):300-304.
- (423) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87(9):1215-1221.



- (424) Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001; 233(6):786-792.
- (425) Aljada IS, Ramnath N, Donohue K, Harvey S, Brooks JJ, Wiseman SM et al. Upregulation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein is associated with progression of human non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(16):3218-3229.
- (426) Aljada IS, Ramnath N, Donohue K, Harvey S, Brooks JJ, Wiseman SM et al. Upregulation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein is associated with progression of human non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(16):3218-3229.
- (427) Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T et al. Influence of angiogenic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 85(11):1706-1712.
- (428) Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* . 2004; 10(24):8229-8234.
- (429) Kallakury BV, Karikhalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7(10):3113-3119.
- (430) Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1(8):899-906.
- (431) Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res* 1997; 3(9):1623-1628.
- (432) Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG et al. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7):2289-2298.
- (433) Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Tsirmpa I, Alexandrou P et al. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol* 2002; 197(3):307-313.



- (434) Arnold SM, Young AB, Munn RK, Patchell RA, Nanayakkara N, Markesbery WR. Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12):4028-4033.
- (435) Lhotak S, Elavathil LJ, Vukmirovic-Popovic S, Duivenvoorden WC, Tozer RG, Singh G. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in clinical specimens of bone metastasis from breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18(6):463-470.
- (436) Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2002; 160(2):673-680.
- (437) Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(10):960-970.
- (438) Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, El Naggar AK, Swanson DA, Fidler IJ et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158(2):735-743.
- (439) Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002; 9(9):509-514.
- (440) Manenti L, Paganoni P, Floriani I, Landoni F, Torri V, Buda A et al. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; 39(13):1948-1956.
- (441) Bergsland E, Dickler MN. Maximizing the potential of bevacizumab in cancer treatment. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1:36-42.
- (442) Ramaswamy B, Shapiro CL. Phase II trial of bevacizumab in combination with docetaxel in women with advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 4(4):292-294.
- (443) Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(11):2184-2191.
- (444) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23):2335-2342.



- (445) Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, Gradishar WJ, Ingle JN, Zucker S et al. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196. *J Clin Oncol* 2004; 22(23):4631-4638.
- (446) Deryugina EI, Ratnikov BI, Strongin AY. Prinomastat, a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases, has a complex effect on migration of breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003; 104(5):533-541.
- (447) Ozerdem U, Mach-Hofacre B, Varki N, Folberg R, Mueller AJ, Ochabski R et al. The effect of prinomastat (AG3340), a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, on uveal melanoma rabbit model. *Curr Eye Res* 2002; 24(2):86-91.
- (448) Liu J, Tsao MS, Pagura M, Shalinsky DR, Khoka R, Fata J et al. Early combined treatment with carboplatin and the MMP inhibitor, prinomastat, prolongs survival and reduces systemic metastasis in an aggressive orthotopic lung cancer model. *Lung Cancer* 2003; 42(3):335-344.
- (449) Bissett D, O'byrne KJ, von Pawel J, Gatzemeier U, Price A, Nicolson M et al. Phase III Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(4):842-849.
- (450) Lee J, Weber M, Mejia S, Bone E, Watson P, Orr W. A matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, retards the development of osteolytic bone metastases by MDA-MB-231 human breast cancer cells in Balb C nu/nu mice. *Eur J Cancer* 2001; 37(1):106-113.
- (451) Lovdahl C, Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res* 2000; 37(5):345-354.
- (452) Watson SA, Morris TM, Parsons SL, Steele RJ, Brown PD. Therapeutic effect of the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, in a human colorectal cancer ascites model. *Br J Cancer* 1996; 74(9):1354-1358.
- (453) Hainsworth JD, Erland JB, Kalman LA, Schreeder MT, Greco FA. Carcinoma of unknown primary site: treatment with 1-hour paclitaxel, carboplatin, and extended-schedule etoposide. *J Clin Oncol* 1997; 15(6):2385-2393.

