



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

‘ΠΕΡΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ
ΑΓΓΕΙΟΥΘΟΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ’

Γεώργιος Κ. Γεωργίου

Γενικός Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

‘ΠΕΡΙΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ
ΑΓΓΕΙΟΥΘΟΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ’

Γεώργιος Κ. Γεωργίου

Γενικός Χειρουργός

\

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Γεωργίου Γεώργιου: 23-1-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 628^α/12-2-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φατούρος Μιχαήλ Καθηγητής Χειρουργικής –Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών
Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπριασούλης Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-9-2008

«Περιεχειρητική κινητική αγγειορρυθμιστικών παραγόντων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 757^α/19-12-2013

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κάτσιος Χρήστος	Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φατούρος Μιχαήλ	ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ματσάγκας Μιλτιάδης	Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάτσης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-1-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Η Γραμματέας της Σχολής

Ανδρέας Φωτόπουλος

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



MARIA KAPITOPOYLOY

Στους γονείς μου, Ματίνα και Κώστα Γεωργίου

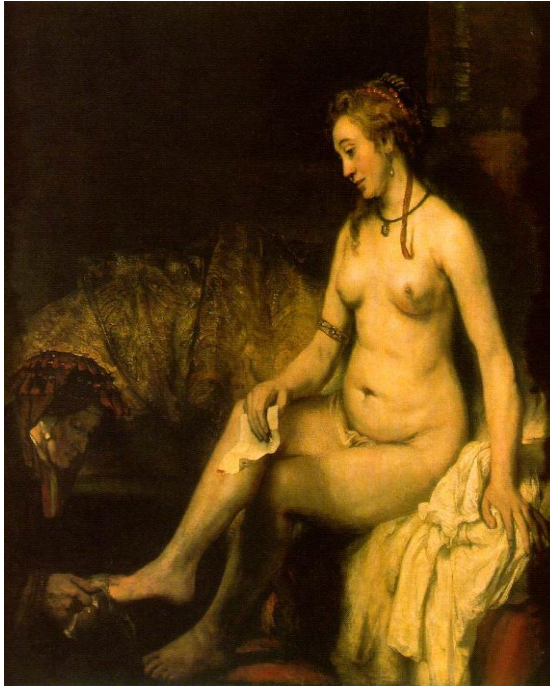
Στην αδελφή μου Ελένη

Στη Μαρία μου

Στη μνήμη του αγαπημένου μου δασκάλου Χαράλαμπου Μπάτση

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο βιβλίο του *'Bathsheba's breast; Women, cancer and history'* (The Johns Hopkins University Press, 2002) ο ιστορικός James S. Olson παραθέτει την ενδιαφέρουσα ιστορία του Ιταλού Χειρουργού T.C.Greco, ο οποίος στη διάρκεια ενός ταξιδιού του στο Άμστερνταμ το 1967, επισκέφθηκε το μουσείο Rijks, όπου και εντυπωσιάστηκε από έναν πίνακα του Rembrandt με τίτλο *'Bathsheba at her bath'*. Ο εν λόγω πίνακας, φιλοτεχνημένος το 1654, απεικονίζει μια νεαρή γυναίκα (και πιο συγκεκριμένα την Hendrickje Stoffels, ερωμένη του Rembrandt) την στιγμή που



παίρνει το μπάνιο της. Ο T.C.Greco, υιοθετώντας ταυτόχρονα μια καλλιτεχνική αλλά και χειρουργική ματιά πάνω στο έργο, διαπίστωσε μια σχετική διόγκωση και μια ασυμμετρία στον αριστερό μαστό της γυναίκας, εικόνα που στα δικά του μάτια ομοιάζε με την όψη «φλοιού πορτοκαλιού» που εμφανίζει το δέρμα σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Ερευνώντας περαιτέρω την υπόθεσή του, ανακάλυψε ότι η συγκεκριμένη γυναίκα απεβίωσε μετά την ολοκλήρωση του πίνακα ύστερα από μια περίοδο «μακράς ασθένειας». Ενθουσιασμένος από την ανακάλυψή του συμπεράνε ότι η γυναίκα αυτή

πράγματι έπασχε από καρκίνο του μαστού και μάλιστα δεν δίστασε να δημοσιεύσει τα συμπεράσματά του σε Ιταλικό ιατρικό περιοδικό (*Greco T. Rembrandt and breast cancer. Osp Ital Chir 1970;22(2):141-46*).

Παρόμοιες αναφορές σε περιπτώσεις γυναικών με καρκίνο του μαστού υπάρχουν κατά εκατοντάδες στην ιστορία, καθώς πρόκειται για μια ασθένεια γνωστή ήδη από την αρχαιότητα. Μάλιστα, υπήρχε από τότε η αντίληψη ότι η συγκεκριμένη κακοήθεια, όπως και γενικότερα ο καρκίνος, είναι συστηματική νόσος, στην οποία οι χειρουργικές θεραπείες δεν έχουν πολλά να προσφέρουν από ένα σημείο και μετά. Ο ίδιος ο Ιπποκράτης (γεννημένος γύρω στο 460 π.Χ.) πίστευε ότι η κακοήθεια αναπτύσσεται λόγω περίσσειας της «μέλαινας χολής». Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα μ.Χ. ο William S. Halsted εισήγαγε την ριζική μαστεκτομή, η οποία βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης των γυναικών που έπασχαν από την συγκεκριμένη κακοήθεια, χωρίς όμως να καταφέρει να τις θεραπεύσει πλήρως. Τον περασμένο αιώνα, η εισαγωγή της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας πρόσφεραν καλύτερο έλεγχο της νόσου. Εντούτοις, οι εκλυτικοί παράγοντες και οι μηχανισμοί που διέπουν τα διάφορα στάδια

καρκινογένεσης δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί σε ικανοποιητικό βαθμό, ώστε να προκύψουν νέες, ελπιδοφόρες θεραπείες.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον αναφορικά με την αγγειογένεση που παρατηρείται στους όγκους. Η διαδικασία δημιουργίας νεόπλαστων αγγείων έχει δειχθεί ότι αποτελεί θεμελιώδη διεργασία προκειμένου μια μάζα καρκινικών κυττάρων να αναπτυχθεί και να δώσει μεταστάσεις. Τα αποτελέσματα ερευνών πάνω στην αγγειογένεση έχουν προσφέρει πολύτιμα νέα δεδομένα στην κατανόηση του τρόπου που γεννάται και εξελίσσεται ένας κακοήθης όγκος και παράλληλα έχουν αλλάξει ριζικά την αντίληψή μας σχετικά με τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων. Σήμερα, μεγάλο μέρος της έρευνας δαπανάται για την κατανόηση των μηχανισμών της αγγειογένεσης, ο αποτελεσματικός έλεγχος της οποίας πιστεύεται ότι θα αποτελέσει σταθμό στην αντιμετώπιση των διαφόρων τύπων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του μαστού.

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποσκοπεί στην αποσαφήνιση σημαντικών θεμάτων που αφορούν στην αγγειογένεση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η πραγματοποίησή της αποτέλεσε για μένα άσκηση γνώσης και με σύστησε στον μαγευτικό κόσμο της έρευνας. Για τον λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων, κύριο Φατούρο Μιχάλη, που μου εμπιστεύθηκε τη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης και που στήριξε την προσπάθειά μου μέχρι την ολοκλήρωσή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθηγητή Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κύριο Μπριασούλη Ευάγγελο, για την σοφή και άοκνη καθοδήγησή του, χωρίς την οποία η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Θα ήταν παράλειψή μου, τέλος, αν δεν ευχαριστούσα τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κύριο Φώτση Θεόδωρο, για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ιωάννινα 2014

Γεώργιος Κ Γεωργίου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επιδημιολογικά δεδομένα.....9

Σταδιοποίηση.....9

Θεραπεία.....9

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή.....10

Ένα νέο μοντέλο ανάπτυξης των όγκων.....11

Πειραματικά δεδομένα.....13

Κλινικές παρατηρήσεις.....14

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ορισμοί.....15

Αγγειογένεση σε φυσιολογικές καταστάσεις.....16

Νέο-αγγειογένεση σε παθολογικές καταστάσεις.....17

Χειρουργικό τραύμα και νέο-αγγειογένεση.....17

Μηχανισμός νέο-αγγειογένεσης.....18

ΝΕΟ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Εισαγωγή.....20

Μηχανισμοί νέο-αγγειογένεσης στον καρκίνο.....22

Ο πιθανός ρόλος του χειρουργείου ως παράγοντας προαγωγής της αγγειογένεσης...24

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....29

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή ασθενών.....30

Στοιχεία επέμβασης.....	31
Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών.....	32
Συλλογή δειγμάτων αίματος.....	32
Μέτρηση επιπέδων κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων με ELISA.....	33
VEGF.....	34
IL-8.....	35
bFGF.....	37
Προσδιορισμός κυκλοφορούντων RNA μεταγράφων με τη μέθοδο RT-PCR.....	39
Προετοιμασία διαλυμάτων του PAXgene Blood RNA kit.....	39
Απομόνωση ολικού RNA.....	40
Ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου RNA.....	42
Ποιοτικός προσδιορισμός απομονωμένου RNA.....	43
Μετατροπή του απομονωμένου RNA σε cDNA.....	44
Ανάλυση των δειγμάτων με RT - PCR.....	45
Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	49
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ELISA.....	51
VEGF-A.....	51
IL-8.....	54
FGF-b.....	56
PCRarrays.....	58
Σύγκριση μεταξύ ασθενών με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου) και καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) προεγχειρητικά (PRO).....	58
Σύγκριση μεταξύ ασθενών με καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο και κατά την 3 ^η μετεγχειρητική ημέρα (PRO vs D3)	62
Σύγκριση ασθενών με καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) μεταξύ 3 ^{ης} και 7 ^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας (D3 vs D7).....	65

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εισαγωγή.....	67
Μέθοδος ELISA.....	68
VEGF-A.....	68
IL-8.....	73
bFGF.....	75
Μέθοδος RT-PCR.....	78
Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων μεταξύ ασθενών με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου) και καρκίνου μαστού (Ομάδα μελέτης) (PRO).....	78
Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Ομάδα μελέτης) πριν το χειρουργείο και κατά την 3 ^η μετεγχειρητική ημέρα (PRO έναντι D3).....	81
Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Ομάδα μελέτης) μεταξύ 3 ^{ης} και 7 ^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας (D3 έναντι D7).....	83
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	85
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	86
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	87
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ (ABSTRACT).....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο καρκίνος του μαστού (κωδικός νόσου C50 κατά τη διεθνή ταξινόμηση ICD-10 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας – WHO 2010) αποτελεί παγκοσμίως τον πρώτο σε συχνότητα εμφάνισης τύπο καρκίνου στον γυναικείο πληθυσμό [1], ενώ περίπου 1% όλων των παρατηρούμενων περιπτώσεων καρκίνου μαστού εμφανίζεται σε άνδρες [2, 3]. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής για τον Καρκίνο (National Cancer Institute, NCI) εκτιμάται ότι το 2013 στις Η.Π.Α. θα εμφανιστούν 232.340 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε γυναίκες και 2.240 σε άνδρες (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>), ενώ αναμένονται 39.620 θάνατοι γυναικών και 410 θάνατοι ανδρών από τη νόσο αυτή, καθιστώντας την τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο, με πρώτη αυτήν του πνεύμονα [2]. Σε ότι αφορά την Ελλάδα, δεν υπάρχουν επαρκή επιδημιολογικά δεδομένα λόγω έλλειψης συστηματικής καταγραφής. Παρ' όλα αυτά, υπολογίζεται ότι από καρκίνο του μαστού προσβάλλονται περίπου 6.000 γυναίκες ετησίως.

Σταδιοποίηση

Η κλασική σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού στηρίζεται στο μέγεθος του όγκου (T), την παρουσία ή όχι διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Επιπλέον, αξιολογούνται παράγοντες όπως ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου (πορογενές, λοβιακό κλπ), ο βαθμός ιστικής διαφοροποίησης (grade) καθώς και η έκφραση ή όχι οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών υποδοχέων (PR), αλλά και υποδοχέων για HER2 (Human Epidermal growth factor 2). Τα υπάρχοντα συστήματα ταξινόμησης προσφέρουν εκτιμήσεις σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών και προτείνουν την εφαρμογή συγκεκριμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Συνοπτικά, στα στάδια I έως III ($T_{1-4}N_{1-3}M_0$) κατατάσσονται ασθενείς με όγκους που περιορίζονται στον μαζικό αδένα και τους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ενώ το στάδιο IV ($T_{1-4}N_{1-3}M_1$) περιλαμβάνει περιπτώσεις προχωρημένης νόσου με απομακρυσμένες μεταστάσεις και δυσμενέστερη πρόγνωση [4].

Θεραπεία

Οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το κλινικό στάδιο της νόσου, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης του όγκου, το βιολογικό προφίλ του όγκου, η ηλικία της ασθενούς κ.α. Η χειρουργική εξαίρεση του καρκίνου αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της θεραπευτικής διαδικασίας, καθώς προσφέρει τη μοναδική δυνατότητα ίασης στα

αρχικά στάδια της νόσου, όταν δηλαδή αυτή περιορίζεται σε τοποπεριοχικό επίπεδο, ενώ η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία έχουν παρηγορητικό ρόλο σε περιπτώσεις προχωρημένης νόσου με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Συχνά, όμως, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται και επικουρικά στη χειρουργική αντιμετώπιση του μη μεταστατικού καρκίνου για καλύτερο έλεγχο της τοποπεριοχικής νόσου και επίτευξη μακροχρόνιας επιβίωσης.

Η χειρουργική θεραπεία στον διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού συνίσταται στην εξαίρεση όλου του μαζικού αδένου (τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή) ή μόνο του τμήματος αυτού που περιέχει τον όγκο (επεμβάσεις διατήρησης του μαστού), με την προϋπόθεση της μετεγχειρητικής ακτινοβολήσης του μαστού, ενώ σε κάθε περίπτωση συναφαιρούνται και οι επιχώριοι λεμφαδένες της μασχαλιαίας κοιλότητας. Όταν κατά την ιστολογική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος ανευρίσκονται επιπλέον και διηθημένοι λεμφαδένες, τότε χορηγείται επικουρική συστηματική χημειοθεραπεία (adjuvant therapy), η οποία καθορίζεται από την έκφραση οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων ή της ογκοπρωτεΐνης HER2. Η επιβίωση είναι αδρά συνυφασμένη με το στάδιο της νόσου και ποικίλει από 88% 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς με νόσο σταδίου I μέχρι 15% 5-ετή επιβίωση σε ασθενείς σταδίου IV.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟΥ ΣΤΗ ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή

Η κλινική παρατήρηση ότι η αφαίρεση ενός πρωτοπαθούς όγκου μπορεί να πυροδοτήσει υποτροπή της νόσου ή ακόμη και επανεμφάνισή της με πιο επιθετική μορφή δεν είναι και τόσο καινούργια. Από τα αρχαία κίβλας χρόνια είχε παρατηρηθεί ότι προσπάθεια εκρίζωσης ή καταστροφής όγκων του μαστού σχετιζόταν συχνά με πτωχά αποτελέσματα ως προς την επιβίωση των ασθενών [5, 6]. Μόνο μικροί όγκοι εξαιρούνταν, ενώ για τους μεγαλύτερους από αυτούς η εκτομή δε προτιμούταν, καθώς είχε δειχθεί ότι συντηρητικότερες μέθοδοι αντιμετώπισης σχετιζόνταν συγκριτικά με μακρότερη επιβίωση [7]. Όπως μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό, οι περιπτώσεις που αναφέρονται σε αυτές τις περιγραφές αντιστοιχούν σε κλινικά εμφανείς όγκους που πιθανότατα θα ήταν προχωρημένοι σε τοποπεριοχικό ή και συστηματικό επίπεδο, καθώς οι σύγχρονες απεικονιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε υποκλινικό στάδιο (απλή ή ψηφιακή μαστογραφία, υπερηχοτομογράφημα μαστών κ.α.) μετρούν μόλις μερικές δεκαετίες ύπαρξης και εφαρμογής.

Οι αντιλήψεις για τη μη εγχειρησιμότητα του καρκίνου του μαστού επικράτησαν για πολλούς αιώνες αργότερα, μέχρι και τον 19^ο αιώνα μ.Χ., οπότε και οι θεωρίες του Virchow για τον τρόπο ανάπτυξης των όγκων [8], σε συνδυασμό με

την ανάπτυξη της Αναισθησιολογίας και τη βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών, αναθέρμαναν το ενδιαφέρον για την χειρουργική εξαίρεσή τους [5, 9]. Έτσι, η ριζική μαστεκτομή κατά Halsted (εκτομή του μαζικού αδένα μαζί με τον μείζονα θωρακικό μυ και λεμφαδενικός καθαρισμός της σύστοιχης μασχαλιαίας κοιλότητας) αποτέλεσε τη θεραπεία εκλογής για τις επόμενες δεκαετίες, ενώ επιχειρήθηκαν και ακόμη επιθετικότερες χειρουργικές παρεμβάσεις [6]. Παρ' όλα αυτά, ποσοστό 30% των γυναικών με αρνητικούς λεμφαδένες τη στιγμή της μαστεκτομής και 75% με θετικούς λεμφαδένες παρουσίαζαν τοπικές ή απομακρυσμένες υποτροπές της νόσου [9], ενώ η συνολική 10-ετής επιβίωση των γυναικών κυμαινόταν περί το 25% [5]. Ακόμα και σήμερα, περίπου 20% των ασθενών με καρκίνο μαστού και αρνητικούς λεμφαδένες τη στιγμή της διάγνωσης θα αναπτύξει απομακρυσμένες μεταστάσεις μέσα στις επόμενες 2 δεκαετίες [10].

Τη δεκαετία του 1970-80 ο Fisher και συν. περιέγραψαν ένα νέο υποθετικό μοντέλο ανάπτυξης και εξάπλωσης του καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με αυτό, η διασπορά των καρκινικών κυττάρων ξεκινά ήδη από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του πρωτοπαθούς όγκου και γίνεται διαμέσου της συστηματικής κυκλοφορίας, ενώ η έκβαση της νόσου εξαρτάται από την βιολογικές συνιστώσες των αλληλεπιδράσεων του όγκου με τον ξενιστή [11]. Έτσι, κατά τη στιγμή της κλινικής διάγνωσης του πρωτοπαθούς όγκου είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν καρκινικά κύτταρα και σε άλλες μικροσκοπικές εστίες μακριά από το κλινικά προσβληθέν όργανο.

Τα επόμενα χρόνια, πειράματα που διεξάχθηκαν σε ζωϊκά μοντέλα από διάφορους ερευνητές και πάνω σε διαφορετικά είδη καρκίνων κατέδειξαν το γεγονός ότι η εκρίζωση μιας εστίας καρκινικών κυττάρων δεν αποτελεί απλά ένα γεγονός με τοπικές μόνο συνέπειες για το πάσχον όργανο, αλλά έχει πολύ πιο σημαντικές συνέπειες σε συστηματικό επίπεδο [9]. Για να εξηγηθούν πολλά από τα ευρήματα των πειραμάτων αυτών, υιοθετήθηκε η ιδέα της «καρκινικής ύπνωσης» ('tumor dormancy'), ενώ εγκαταλείφθηκε η αντίληψη ότι οι όγκοι αυξάνονται συνεχώς στο χρόνο κατά έναν γραμμικό τρόπο, όπως αρχικά είχε προταθεί [6, 12].

Ένα νέο μοντέλο ανάπτυξης των όγκων

Το παραδοσιακά αποδεκτό μοντέλο ανάπτυξης ενός κακοήθους όγκου προϋποθέτει τα εξής στάδια: εξαλλαγή – ανάπτυξη και διήθηση – μετάσταση. Η άποψη που επικρατούσε μέχρι και πριν από λίγα χρόνια ήταν ότι από τη στιγμή που ένα καρκινικό κύτταρο θα συσσωρευτεί μια σειρά γενετικών μεταλλάξεων που θα το καταστήσει καρκινικό, αρχίζει ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός του, με αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων με γεωμετρικό τρόπο, οδηγώντας σε συνεχιζόμενη αύξηση του μεγέθους του κακοήθους πρωτοπαθούς όγκου και στην εμφάνιση μεταστάσεων. Η βασική λογική που διέπει το μοντέλο αυτό είναι ότι από τη στιγμή που εμφανίζεται ένας καρκίνος, πρέπει συνεχώς να μεγαλώνει. Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγάλος στα αρχικά στάδια όπου υπάρχει

μικρός αριθμός κυττάρων, ενώ όσο αυξάνει ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται αντίστοιχα ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους. Επίσης, οι μικρότεροι όγκοι έχουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων σε φάση μίτωσης και άρα είναι πιο ευαίσθητοι στην χημειοθεραπεία [13].

Το μοντέλο αυτό της γεωμετρικής αύξησης του όγκου ('Compertzian growth kinetics') προσέφερε για πολλά χρόνια το πρότυπο ερμηνείας της φυσικής ιστορίας του καρκίνου του μαστού [14] και πάνω σε αυτό στηρίχθηκε η λογική της μετεγχειρητικής χορήγησης επικουρικής χημειοθεραπείας. Παρ' όλα αυτά, η αδυναμία του να εξηγήσει την πρώιμη εμφάνιση μεταστάσεων σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών μετά από εκτομή της πρωτοπαθούς εστίας [6, 12], αλλά και την εμφάνιση υποτροπής ή μεταστάσεων σε άλλες ομάδες ασθενών που εμφανίστηκαν εκτός των αναμενομένων χρονικών πλαισίων [15, 16], ώθησαν στην ανάπτυξη ενός νέου θεωρητικού μοντέλου για την ερμηνεία των φαινομένων αυτών [12].

Η ιδέα του καρκινικού κυττάρου σε «ύπνωση» είχε ήδη τεθεί από τον Hadfield το 1954 [17], αναφορικά με περιπτώσεις όγκων που έδιναν μεταστάσεις αρκετά χρόνια, ακόμα και δεκαετίες μετά την κλινική εμφάνιση της πρωτοπαθούς εστίας. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι παρέμεναν ζωντανά σε μικροσκοπικές συναθροίσεις, χωρίς όμως να πολλαπλασιάζονται και ν' αυξάνεται σε μέγεθος η καρκινική μάζα [18]. Μετά από χρόνια, κάποιο άγνωστο γεγονός ('triggering effect') πυροδοτούσε την έξοδό τους από αυτήν την κατάσταση ηρεμίας οπότε ο όγκος άρχιζε πάλι να αυξάνεται σε μέγεθος. Όλο αυτό το διάστημα τα καρκινικά κύτταρα δεν είχαν απολέσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, αλλά ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ήταν παρόμοιος με τον ρυθμό απόπτωσή τους, με αποτέλεσμα την μακροσκοπική στασιμότητα του όγκου ως προς το μέγεθός του [19].

Το πυροδοτικό γεγονός που ευθύνεται για την έξοδο από την μακροχρόνια αυτή κατάσταση ηρεμίας έχει συνδεθεί στενά με την ικανότητα του καρκίνου να σχηματίζει το δικό του αγγειακό δίκτυο, προωθώντας τη δημιουργία νεόπλαστων αγγείων, ένα φαινόμενο που καλείται αγγειογένεση [20]. Η αυξημένη αγγείωση των όγκων ήταν ένα φαινόμενο γνωστό ήδη από την εποχή του Virchow [21], ενώ ο όρος «αγγειογένεση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1935 [22]. Παρ' όλα αυτά, η σημασία του στην φυσική πορεία της εξέλιξης του καρκίνου δεν είχε λάβει ακόμη την δέουσα προσοχή, κάτι που άλλαξε από τη δεκαετία του 1970 και μετά, χάρη στις εργασίες του Judah Folkman και των συνεργατών του [20, 23]. Η απόκτηση του αγγειογενετικού φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα, ένα φαινόμενο που περιγράφεται στην ξενόγλωσση βιβλιογραφία ως 'angiogenic switch' [24], επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια από μια σειρά πειραματικών δεδομένων και κλινικών παρατηρήσεων (αναλύονται παρακάτω), οδηγώντας στην αναγνώρισή του ως σημείο-κλειδί στη διαδικασία της καρκινογένεσης αλλά και ως πιθανό στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπειών [25].

Σύμφωνα με το νέο αυτό μοντέλο θεώρησης, τα καρκινικά κύτταρα παραμένουν στους ιστούς είτε ως μεμονωμένα κύτταρα είτε ως μικροσκοπικές

συναθροίσεις, στερούμενα δυνατότητας ανάπτυξης αυτόνομου αγγειακού δικτύου (απουσία αγγειογενετικού φαινοτύπου) και περαιτέρω ανάπτυξης, διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης [19]. Ένας μικρός μόνο υποπληθυσμός αυτών των κυττάρων (4-10% επί του συνόλου) μπορεί να διαθέτει την αγγειογενετική ικανότητα [12, 26], αλλά και πάλι η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον (υπερίσχυση αναστολέων αγγειογένεσης έναντι προαγωγέων αγγειογένεσης) δεν επιτρέπει την υπερίσχυση και έκφρασή τους [27]. Σε αυτήν τη λανθάνουσα φάση της «ύπνωσης» ('tumor dormancy') μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, έως και δεκαετίες, μέχρι να αλλάξουν οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος (υπερίσχυση προαγωγέων αγγειογένεσης έναντι αναστολέων αυτής λόγω υποξίας, τραύματος κλπ) και να συμβεί η μεταστροφή στον αγγειογενετικό φαινότυπο ('angiogenic switch') [28, 29]. Μόλις τα καρκινικά κύτταρα αποκτήσουν αγγειογενετικό δυναμικό αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ρυθμούς γεωμετρικής προόδου ('Compertzian growth kinetics') και να προκαλούν την εμφάνιση κλινικά ανιχνεύσιμων όγκων. Συνολικά, όμως, η εξέλιξη του καρκίνου μάλλον ακολουθεί μια πορεία που διακρίνεται από εναλλασσόμενες περιόδους μακράς παύσης και ταχύτατης αύξησης και όχι ένα συνεχές γραμμικό μοντέλο ανάπτυξης στο χρόνο [29]. Το θεωρητικό αυτό μοντέλο αφορά στον τρόπο ανάπτυξης τόσο του πρωτοπαθούς όγκου όσο και των μεταστατικών εστιών [6].

Πειραματικά δεδομένα

Το 1976 ο Shimpson-Herren και συν. διεξήγαγαν πειράματα σε επίμυες με καρκίνο πνεύμονα τύπου Lewis, όπου δείχθηκε ότι η εξαίρεση του όγκου σε αρχικό στάδιο ήταν επωφελής για τους επίμυες με καρκίνο ως προς την ομάδα ελέγχου, ενώ αν αυτή διεξαγόταν σε χρονικά μεταγενέστερο στάδιο σχετιζόταν με χειρότερη πρόγνωση και μείωση της επιβίωσης, ακόμα και συγκρινόμενη με την ομάδα που έπασχε μεν από καρκίνο αλλά δεν δέχθηκε καμία θεραπευτική παρέμβαση [30]. Άλλοι ερευνητές μελέτησαν τις παραμέτρους ανάπτυξης όγκων σε επίμυες, μετά από διπλό ενοφθαλμισμό κυττάρων προερχόμενα από καρκίνο του μαστού και στα δύο άκρα τους. Βρέθηκε ότι η εξαίρεση του όγκου από το ένα μέλος του πειραματόζωου οδηγούσε άμεσα σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του όγκου στο άλλο μέλος [31]. Ακολούθησαν και άλλα πειράματα από διάφορους ερευνητές, όπου διαπιστώθηκε τελικά ότι η εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας ενός νεοπλάσματος δεν αποτελεί απλά ένα τοπικό φαινόμενο, αλλά μπορεί να έχει συνολικότερα σημαντικές επιδράσεις στην εξέλιξη της νόσου [32, 33].

Έτσι, έγινε αντιληπτό ότι η αφαίρεση μιας πρωτοπαθούς εστίας μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των μεταστάσεων, ενώ η όλη διαδικασία φαινόταν να συντονίζεται από κυκλοφορούντες αυξητικούς παράγοντες [23, 34]. Η διατήρηση της «καρκινικής ύπνωσης» σαν αποτέλεσμα της απουσίας αγγειογενετικού φαινοτύπου είχε ήδη αποδειχθεί από το 1972 μέσα από πειράματα ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων στην οπίσθια επιφάνεια του κερατοειδούς χιτώνα στον οφθαλμό κονίκλου

[35]. Τα καρκινικά κύτταρα διατηρούνταν σε σταθερές μικρές συναθροίσεις, μόλις όμως ανέπτυσαν αγγειακό δίκτυο άρχιζε ο πολλαπλασιασμός τους με εκθετικό ρυθμό.

Τα επόμενα χρόνια η υπόθεση της «καρκινικής ύπωσης» μελετήθηκε πειραματικά και επιβεβαιώθηκε [36], καθώς αναγνωρίστηκαν αντίστοιχα φαινόμενα σε ζωϊκά μοντέλα [37-39] αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [13]. Συγκεκριμένοι αυξητικοί παράγοντες αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν (VEGF, FGF, PlGF κ.α.), ενώ παράλληλα φάνηκε ότι αναστολή συγκεκριμένων παραγόντων που έχουν αποδεδειγμένη δράση ως προαγωγείς της αγγειογένεσης (π.χ. VEGF) ήταν ικανή να εμποδίσει την περαιτέρω αύξηση των όγκων, οι οποίοι και παρέμειναν σε υποκλινικό στάδιο [40-42], γεγονός που έδωσε ώθηση στην περαιτέρω έρευνα για ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων.

Κλινικές παρατηρήσεις

Η απευθείας μελέτη του αγγειογενετικού μηχανισμού στον άνθρωπο σε πραγματικές συνθήκες παρουσιάζει σαφέστατα πολλές περισσότερες δυσκολίες σε σχέση με τα πειραματικά μοντέλα του εργαστηρίου. Έτσι, πολλά από τα συμπεράσματα προέρχονται από έμμεσες παρατηρήσεις σε κλινικό επίπεδο. Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις ασθενών στη βιβλιογραφία όπου η χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου οδήγησε σε πρόωμη εμφάνιση μεταστάσεων, αλλά και άλλες, όπου ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο μαστού οι οποίες, παρ' όλο που αρνήθηκαν να υποβληθούν σε επέμβαση, τελικά επέζησαν για πολλά χρόνια [5, 9]. Παράλληλα, ο Meng και συν. διαπίστωσαν ότι ένα ποσοστό 59% των γυναικών μετά από μαστεκτομή για καρκίνο μαστού εμφάνιζαν στο αίμα τους κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ακόμα και 22 χρόνια μετά την αρχική επέμβαση, χωρίς όμως να παρουσιάζουν κλινικά ή απεικονιστικά σημεία υποτροπής της νόσου [43]. Τα κύτταρα αυτά, που έχουν χρόνο ημιζωής μερικών ωρών, θα έπρεπε μετά την εμφύτευσή τους να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται ώστε να σχηματίσουν μεταστατικές εστίες μετά από μήνες ή και χρόνια. Παρ' όλα αυτά, παρέμειναν σιωπηλά για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, διατηρώντας ένα σταθερό ισοζύγιο πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, χωρίς να αυξάνουν σε μέγεθος, παρέχοντας απλά πληθυσμούς κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Από την άλλη, υιοθετώντας το μοντέλο της συνεχούς ανάπτυξης του καρκίνου, θα περιμέναμε μεγάλοι όγκοι να σχετίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό με την παρουσία μεταστάσεων σε σχέση με τους μικρότερους, εφόσον έχουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία [6]. Αυτό ισχύει εν μέρει μόνο για τη διασπορά στους μασχालιαίους λεμφαδένες, αν και συχνά παρατηρούνται ασθενείς με μικρούς ή και κλινικά μη ανιχνεύσιμους όγκους που έχουν ήδη δώσει μεταστάσεις στη σύστοιχη μασχάλη, ενώ κάποιοι μεγάλοι όγκοι περιορίζονται μόνο εντός του μαζικού αδένου. Όσον αφορά τις απομακρυσμένες μεταστάσεις, αυτές είναι

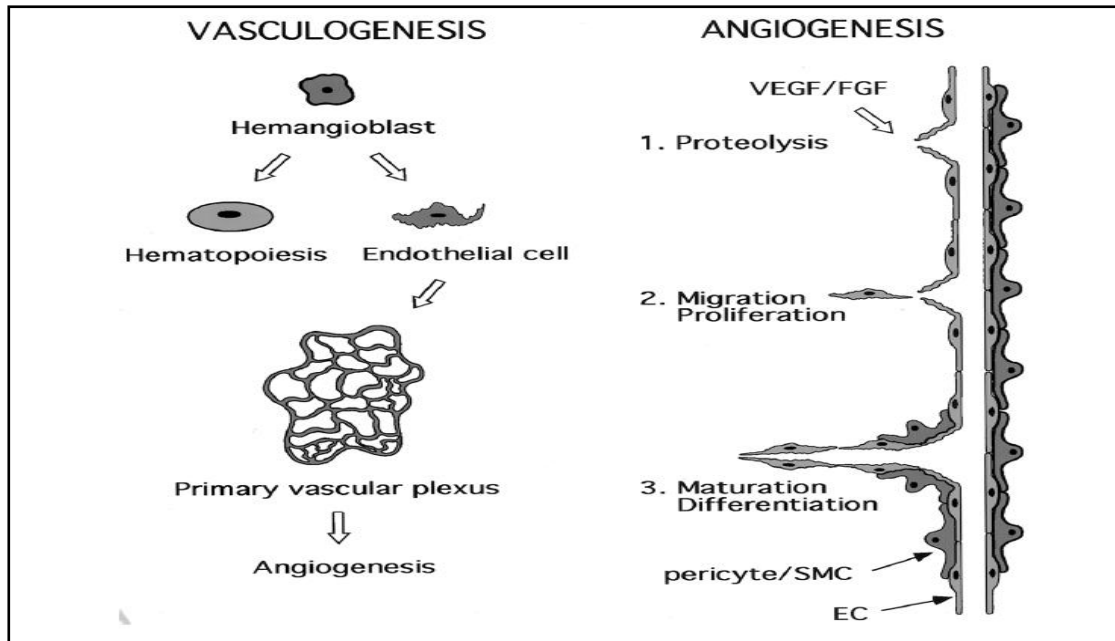
ανεξάρτητες του μεγέθους του πρωτοπαθούς όγκου και εμφανίζονται σε ποσοστό 0%, 3% και 7% σε ασθενείς σταδίου I, II και II αντίστοιχα [5]. Στις ίδιες ομάδες ασθενών, 18 μήνες μετά την διάγνωση και θεραπεία τα ποσοστά μετάστασης είναι 5% για το στάδιο I και 25% για το στάδιο III.

Τέλος, ένα πλήθος από ενδιαφέροντα δεδομένα έχει προκύψει μέσα από νεκροτομικές μελέτες, στις οποίες ανευρίσκονται συχνά μικροσκοπικές συναθροίσεις καρκινικών κυττάρων ή καρκίνων *in situ* σε ασθενείς που δεν είχαν ποτέ εκδηλώσει σημεία κακοήθους νόσου και που απεβίωσαν λόγω άλλης αιτίας (π.χ. τραυματισμός σε τροχαίο ατύχημα) [41, 44, 45]. Πιο συγκεκριμένα, σε μεγάλες νεκροτομικές σειρές όπου έγιναν βιοψίες μαστού σε γυναίκες ηλικίας 40 έως 50 ετών, βρέθηκε ότι περίπου το ένα τρίτο από αυτές έφεραν καρκινώματα *in situ* στον μαστό, ενώ το πραγματικό ποσοστό ανεύρεσης διηθητικού καρκίνου με κλινικά κριτήρια σε αυτήν την ηλικιακή ομάδα κυμαίνεται περί το 1% [44, 46]. Παράλληλα, μικροσκοπικοί, κλινικά μη ανιχνεύσιμοι καρκίνοι παρατηρήθηκαν στο 46% των ανδρών ηλικίας 60 έως 70 ετών που υποβλήθηκαν σε βιοψία προστάτη στα πλαίσια νεκροψίας λόγω θανάτου από τροχαίο ατύχημα [47, 48]. Επιπλέον, σχεδόν όλες (98%) οι βιοψίες του θυρεοειδούς αδένος ατόμων ηλικίας μεταξύ 50 και 70 ετών είχαν μικροσκοπικές εντοπίσεις καρκινικών κυττάρων, παρ' όλο που λιγότερο από 0,1 % των ανθρώπων διαγιγνώσκεται κλινικά με καρκίνο του θυρεοειδούς σε αυτές τις ηλικίες [41].

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ορισμοί

Σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσε ένας από τους πρώτους και σημαντικότερους μελετητές της αγγειογένεσης, ο Judah Folkman, ως αγγειογένεση ορίζεται «η διαδικασία σχηματισμού και επέκτασης των αιμοφόρων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο, σαν απάντηση σε ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα» ('Angiogenesis is the generation and expansion of blood vessels from a pre-existing vascular network under endogenous or exogenous stimuli') [49]. Στην ξενόγλωσση βιβλιογραφία, εντούτοις, αναφέρονται δύο διαφορετικοί όροι για την συγκεκριμένη διεργασία, ανάλογα με τον ιδιαίτερο μηχανισμό με τον οποίο αυτή επιτελείται, κάτι που όμως δεν ισχύει και για τα Ελληνικά δεδομένα. Έτσι, υπάρχει ο όρος 'angiogenesis', που αναφέρεται στην δημιουργία των νέων αγγείων ως επέκταση του υπάρχοντος αγγειακού δικτύου [27] και ο όρος 'vasculogenesis', που περιγράφει τον σχηματισμό των νέων αγγείων μέσω της μετανάστευσης προγονικών μορφών επιθηλιακών κυττάρων από τον μυελό των οστών (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) στο σημείο σχηματισμού τους και της επί τόπου διαφοροποίησή τους σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Σχήμα 1) [50, 51].



Σχήμα 1. Οι δύο μηχανισμοί της αγγειογένεσης σχηματικά [51].

Αγγειογένεση σε φυσιολογικές καταστάσεις

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η αγγειογένεση παρατηρείται κατά τα στάδια της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου, όπου παράλληλα με την οργανογένεση επισυμβαίνει και η ανάπτυξη του αντίστοιχου αγγειακού δικτύου για το κάθε όργανο ή ιστό [52]. Η μέχρι σήμερα έρευνα υποστηρίζει ότι και οι δύο προαναφερθέντες μηχανισμοί (angiogenesis και vasculogenesis) συμμετέχουν στην αγγειογένεση του εμβρύου [24, 53]. Η αγγειογένεση συνεχίζεται και μετά τη γέννηση του ατόμου ακολουθώντας το πρότυπο ανάπτυξης του οργανισμού. Μετά το στάδιο της ενηλικίωσης, όμως, και καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ανθρώπου, δεν σχηματίζονται αιμοφόρα αγγεία εκ νέου (νεο-αγγειογένεση), καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται στη φάση ηρεμίας G_0 του κυτταρικού κύκλου [24, 52]. Αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού είναι ο συνολικός αριθμός των αγγείων να παραμένει σταθερός στον φυσιολογικό ενήλικα, εκτός από συγκεκριμένες εξαιρέσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, μάλιστα, ο κύριος μηχανισμός σχηματισμού νεοαγγείων είναι μέσω επέκτασης του υπάρχοντος δικτύου (angiogenesis) [24, 53], γι' αυτό και προφανώς έχει επικρατήσει συνολικά ο όρος αγγειογένεση.

Μία τέτοια εξαίρεση αποτελεί η νέο-αγγειογένεση που παρατηρείται στον καταμήνιο κύκλο της γυναίκας, όπου η ανάπτυξη του ενδομητρίου κατά την ωοθυλακική φάση συνοδεύεται από σχηματισμό πλούσιου αγγειακού δικτύου, το οποίο αργότερα (κατά την ωχρινική φάση του κύκλου) θα υποστρέψει μαζί με το ενδομήτριο, εκτός και αν επισυμβεί γονιμοποίηση του ωαρίου [24]. Η όλη διεργασία είναι εξόχως ενορρηστρωμένη και επαναλαμβάνεται με απαρέγκλιτη ακρίβεια εκατοντάδες φορές κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής φάσης στης ζωή μιας

γυναίκας. Επιπλέον, κατά την εγκυμοσύνη η ανάπτυξη του πλακούντα απαιτεί πλούσια αγγειακή παροχή, η οποία επίσης επιτελείται μέσω της νέο-αγγειογένεσης [24].

Δημιουργία νέων αγγείων συμβαίνει και κατά την διαδικασία επούλωση ενός τραύματος [54]. Ανεξάρτητα από την αιτία που προκαλεί την ιστική βλάβη (έγκαυμα, μηχανική κάκωση, χειρουργικό τραύμα κλπ), η απόκριση του οργανισμού συνίσταται σε μια συντονισμένη και πλήρως ελεγχόμενη αλληλουχία συνδεδεμένων μεταξύ τους γεγονότων που αποσκοπεί στην ανατομική και λειτουργική αποκατάσταση του προσβεβλημένου οργάνου ή ιστού. Πρόκειται για μια αυτοπεριοριζόμενη διεργασία όπου ο μηχανισμός της νεο-αγγειογένεσης διαδραματίζει προεξάρχοντα ρόλο, καθώς αποτελεί βασική προϋπόθεση για την μεταφορά οξυγόνου, μεταβολιτών, αυξητικών παραγόντων, κυττάρων κλπ, προκειμένου να επιτευχθεί η επούλωση.

Νέο-αγγειογένεση σε παθολογικές καταστάσεις

Υπάρχουν, όμως, και αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπου παρατηρείται νέο-αγγειογένεση. Η μικροαγγειοπάθεια στο Σακχαρώδη Διαβήτη (τύπου I ή II) θεωρείται απότοκο αγγειακής βλάβης και ισχαιμίας στην μικροκυκλοφορία, με την προκύπτουσα υποξία να πυροδοτεί τον υπερβολικό αλλά και ανώμαλο σχηματισμό νέων αγγείων [55]. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η νεφρική βλάβη οφείλονται σε αυτό ακριβώς το φαινόμενο [56, 57]. Σε ασθενείς με σημαντικές στενώσεις στο αγγειακό δίκτυο των άκρων (περιφερική αγγειοπάθεια) όπως και σε όσους υποφέρουν από στεφανιαία νόσο, αναπτύσσεται παράπλευρο αγγειακό δίκτυο προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της υποάρδρευσης του οργάνου-στόχου [49]. Παράγοντες που εκλύονται σαν απάντηση στην υποξία πυροδοτούν τους μηχανισμούς νεο-αγγείωσης στις καταστάσεις αυτές [49, 58]. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η ενδομητρίωση είναι μερικά ακόμη από τα πολλά νοσήματα όπου η παθολογική αγγειογένεση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο [25].

Χειρουργικό τραύμα και νέο-αγγειογένεση

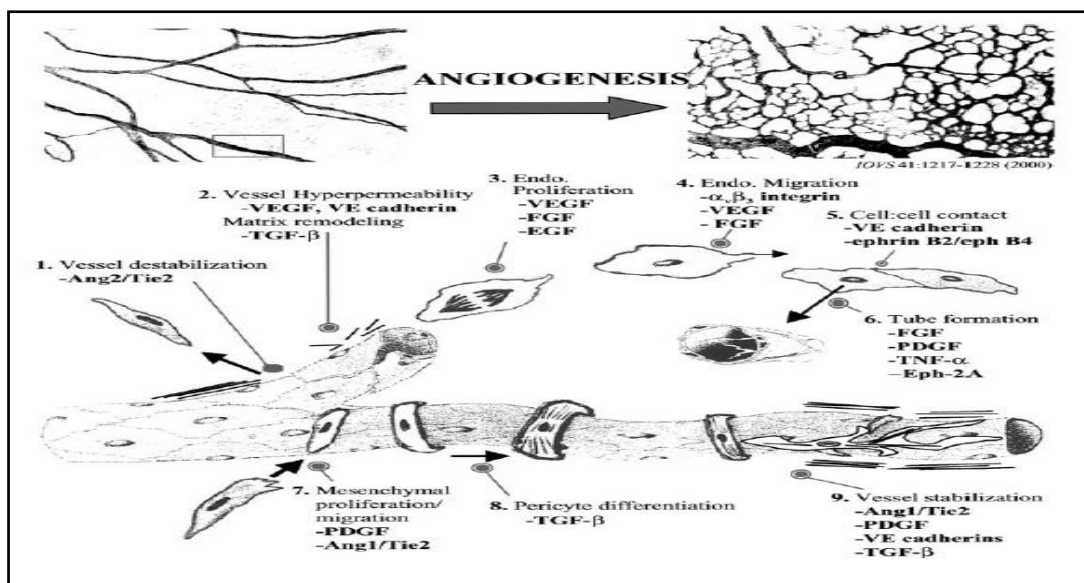
Η αντίδραση του οργανισμού στο χειρουργικό τραύμα, το οποίο αποτελεί «αναγκαίο κακό» προκειμένου να αντιμετωπιστεί μια απειλητική παθολογική κατάσταση, διέπεται από τους ίδιους κανόνες που ισχύουν και για όλους τους άλλους τύπους ιστικής βλάβης. Έτσι, αμέσως μόλις επιτευχθεί αιμόσταση και ελεγχθεί η αιμορραγία, προσχηματισμένοι παράγοντες (PIGF, TGF-β κ.α.) που βρίσκονται αποθηκευμένοι στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων λειτουργούν χημειοτακτικά και προσελκύουν ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα από το περιφερικό αίμα στο σημείο της βλάβης, αλλά και μονοκύτταρα τα οποία ωριμάζουν σε μακροφάγα των ιστών [54]. Με τη συμμετοχή και άλλων παραγόντων (IL-1, TNF-α κ.α.) ολοκληρώνεται το πρώτο στάδιο της επούλωσης, όπου προεξάρχει η φλεγμονώδης διεργασία. Σκοπός

της είναι η απομάκρυνση των ιστικών υπολειμμάτων αλλά και τυχόν μικροβιακών παραγόντων που έχουν διεισδύσει στην περιοχή εξαιτίας της καταστροφής των τοπικών φραγμών.

Ακολουθεί η φάση πολλαπλασιασμού διαφόρων κυτταρικών τύπων με την εμπλοκή επιπλέον αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών (IL-6, FGF-b κ.α.). Τα επιθηλιακά κύτταρα πρόκειται να σχηματίσουν την βασική μεμβράνη, οι ινοβλάστες θα αναλάβουν τον σχηματισμό της εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, ελαστίνη), ενώ από τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα προκύψει το νέο αγγειακό δίκτυο. Κατά το τελευταίο στάδιο της επούλωσης, οι νεοσχηματισθείσες δομές θα αναδιαταχθούν στο χώρο και θα λάβουν την τελική τους μορφή, καταλείποντας ουλώδη ιστό στο σημείο της αρχικής βλάβης.

Μηχανισμός αγγειογένεσης

Η όλη διεργασία του σχηματισμού νέων αγγείων στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μια αυτοπεριοριζόμενη και απόλυτα ελεγχόμενη διαδικασία, αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης τοπικών και συστηματικών παραγόντων, διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και αιμοδυναμικών συνιστωσών, πάντα όμως με μοναδικό γνώμονα την προσφορά επαρκούς αιματικής παροχής στους ιστούς. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν είναι, εκτός φυσικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, μονοκύτταρα-μακροφάγα και περικύτταρα-λείες μυϊκές ίνες, ενώ διάφορα συστατικά της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του νέου δικτύου. Παράλληλα, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση ('pro-angiogenic factors') έχει μέχρι σήμερα αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί (VEGF, FGF, EGF, IL-6, IL-8, endothelin κ.α.). Άλλες από τις πρωτεΐνες αυτές παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα, άλλες από τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς ή ήδη υπάρχουν στην κυκλοφορία. Συνολικά δρουν ως ρυθμιστές της αγγειογένεσης, ασκώντας πολύπλοκες και σε μεγάλο βαθμό ακόμη άγνωστες επιδράσεις στα υπόλοιπα «γρανάζια» του μηχανισμού. Πολλές από αυτές τις δράσεις φαίνονται στο *Σχήμα 2*.



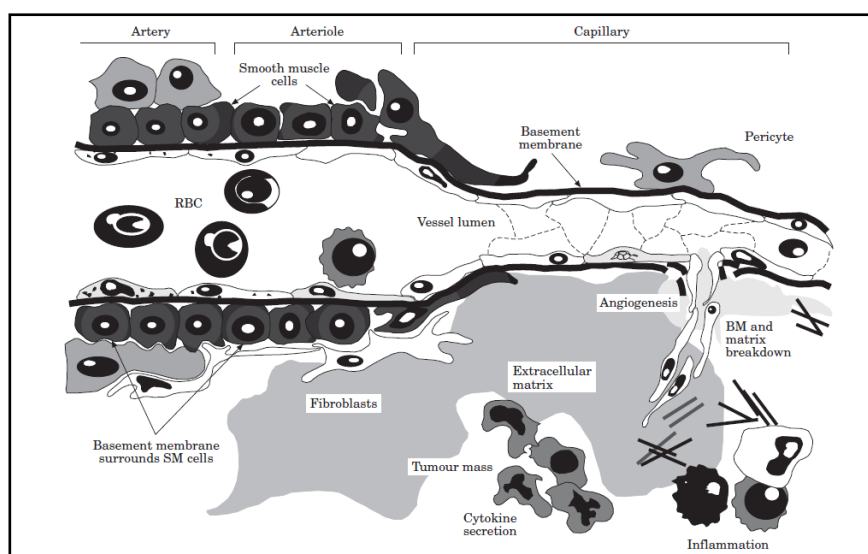
Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της φυσιολογικής αγγειογένεσης. Φαίνεται, επίσης, η επίδραση ορισμένων αγγειογενετικών παραγόντων σε συγκεκριμένα στάδια της διαδικασίας [59].

Υπάρχουν, όμως, και οι αντίστοιχοι αναστολείς της αγγειογένεσης ('angiogenesis inhibitors'), οι οποίοι μπλοκάρουν την όλη διαδικασία (Endostatin, Angiostatin, IL-12, Thrombospondin-1 κ.α.) [60]. Η απομάκρυνση ή η υπερνίκηση της αναστολής που προκαλούν οι παράγοντες αυτοί θεωρείται προαπαιτούμενο ώστε να εκκινήσει η αγγειογένεση και να εξέλθουν τα καρκινικά κύτταρα από την κατάσταση «ύπνωσης». Τόσο οι προαγωγείς όσο και οι αναστολείς δρουν μέσω εξειδικευμένων υποδοχέων στα κύτταρα (π.χ. του τύπου κινάσης τυροσίνης) προκαλώντας προαγωγή ενδοκυττάρων σημάτων και έναρξη περίπλοκων αντιδράσεων υπό μορφή καταρράκτη. Μια αναλυτική παράθεση των πιο σημαντικών από τους παράγοντες που επιδρούν στην αγγειογένεση φαίνεται στο Πίνακα 1

Angiostimulators	Angio-inhibitors
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Thrombospondins-1, -2
Basic and acidic fibroblast growth factors (bFGF, aFGF)	Endostatin
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Angiostatin
Matrix metalloproteinases (MMPs)	Interferons α and β
Insulin-like growth factor (IGF)	Interleukin-12 (IL-12)
Epidermal growth factor (EGF)	Tamoxifen
IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-15	Thalidomide
Angiogenin	Captopril
Integrins α _v β ₃ and α _v β ₅	Dexamethasone
Endotoxin	Indomethacin
Endothelin-1	Diclofenac
Angiopietin-1 (Ang-1)	Angiopietin-2 (Ang-2)
Tumour necrosis factor (TNF)-α (<i>in vivo</i>)	TNF-α (<i>in vitro</i>)

Πίνακας 1. Στην αριστερή στήλη παρατίθενται ορισμένοι από τους βασικότερους παράγοντες που ευοδώνουν την αγγειογένεση, ενώ στη δεξιά στήλη φαίνονται οι κυριότεροι αναστολείς της [61].

Αρχικά απομακρύνονται τα περικύτταρα από τις θέσεις όπου θα αρχίσουν να «εκφύονται» τα νέα αγγεία, ενώ παράλληλα διασπάται η βασική μεμβράνη καθώς και στοιχεία της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας, προκειμένου να επαναδιαταχθούν στο χώρο αργότερα, με την ενσωμάτωση των νεότευκτων αγγειακών δομών [62]. Παρουσία αυξητικών παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν, πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν [59]. Στη συνέχεια αποκτούν γραμμική διάταξη στον χώρο καθώς συνδέονται σταθερά μεταξύ τους με τη βοήθεια μορίων προσκόλλησης της εξωκυττάριας ουσίας, επενδύονται από λείες μυϊκές ίνες και τέλος αποκτούν μορφή και λειτουργικότητα κανονικών αιμοφόρων αγγείων (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρούν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί του ξενιστή με τα καρκινικά κύτταρα κατά την φυσιολογική αγγειογένεση [54]

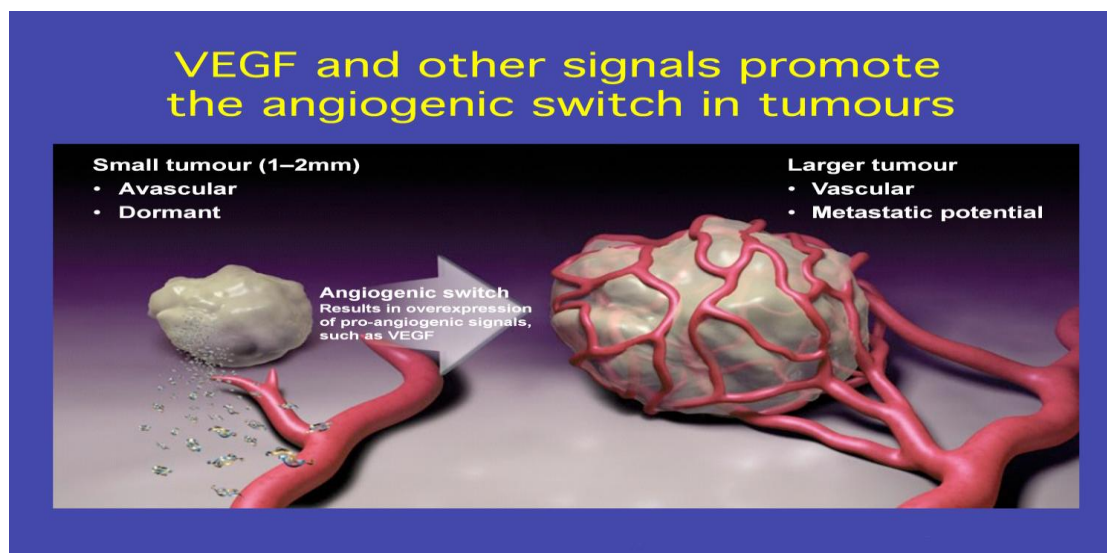
ΝΕΟ-ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Εισαγωγή

Μια μάζα καρκινικών κυττάρων απαιτεί οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά προκειμένου να συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται και να αυξάνεται σε μέγεθος. Στα αρχικά στάδια η ανάγκη αυτή εξυπηρετείται από τους περιβάλλοντες ιστούς, μέσω του μηχανισμού της παθητικής διάχυσης [63]. Καθώς, όμως, η δυνατότητα διάχυσης του οξυγόνου περιορίζεται στα 100 μm, τα κύτταρα αυτά μπορούν μόνο να αναπτυχθούν σε στενή συνάφεια με τις υπάρχουσες αγγειακές δομές, συγκροτώντας «νεοπλασματικές φωλιές» (‘neoplastic niches’) [41]. Το γεγονός αυτό υπαγορεύει και το μέγιστο μέγεθος στο οποίο μπορεί να φτάσει μια τέτοια μάζα καρκινικών κυττάρων και το οποίο υπολογίζεται σε 1-2 χιλιοστά μέγιστης διαμέτρου [63], ή αντίστοιχα αριθμό κυττάρων μεταξύ 10^5 και 10^6 [26, 42].

Η περαιτέρω αύξηση σε μέγεθος προϋποθέτει μια σταθερή παροχή υποστρωμάτων, την οποία ο αναπτυσσόμενος όγκος προσπαθεί να εξασφαλίσει σχηματίζοντας το δικό του δίκτυο αιμοφόρων αγγείων, μέσω του μηχανισμού της νέο-αγγειογένεσης [23]. Χωρίς αυτήν την ικανότητα, ένας όγκος μπορεί να παραμείνει στάσιμος για πολλά χρόνια όντας κλινικά μη εμφανής (in situ καρκίνοι ή σε μικροδιηθητικό στάδιο). Η παραμονή των καρκινικών κυττάρων στην λανθάνουσα αυτή κατάσταση εξασφαλίζεται από μια σειρά όρων και προϋποθέσεων, που έχουν σχέση τόσο με τα ίδια τα κύτταρα αλλά και με τις ιδιαίτερες συνθήκες που διαμορφώνονται γι' αυτά από το μικροπεριβάλλον του ξενιστή.

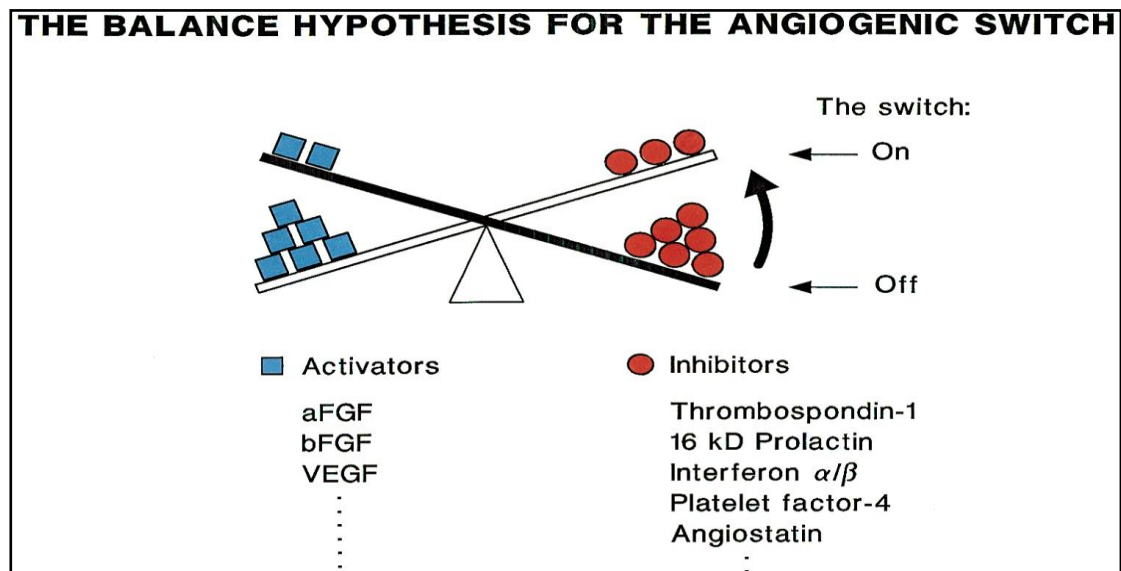
Η έξοδος από τη «ύπνωση» έχει συσχετιστεί στενά με την έκφραση από τον όγκο αγγειογενετικών ιδιοτήτων, αν και δεν είναι απόλυτα σαφές αν υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες – εκτός της αγγειογένεσης – στην όλη διαδικασία, όπως π.χ. μεταβολές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η μεταστροφή στον αγγειογενετικό φαινότυπο ('angiogenic switch') μπορεί να είναι ένα προκαθορισμένο βήμα στην φυσική ιστορία του καρκίνου, καθοριζόμενο από γονιδιακές μεταλλάξεις [24, 42, 64], ή ένα γεγονός επαγόμενο από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η υποξία, το μηχανικό ή μεταβολικό stress, η φλεγμονώδης διαδικασία και η απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην παρουσία του καρκίνου [28, 29, 61]. Αυτό που είναι βέβαιο, πάντως, είναι το ότι η απόκτηση του αγγειογενετικού φαινότυπου επιτρέπει πια στην νεοπλασματική εστία να επάγει τη δημιουργία του δικού της αγγειακού δικτύου και αίρει τους περιορισμούς για απρόσκοπτη ανάπτυξη (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Μικροσκοπικές συναθροίσεις καρκινικών κυττάρων αδυνατούν να αναπτυχθούν πέραν του σταδίου του 1-2 χιλ. σε μέγιστη διάμετρο ('small tumour'), χωρίς την εξασφάλιση σταθερής παροχής οξυγόνου και μεταβολιτών μέσω του δικού τους αγγειακού δικτύου ('avascular'), παραμένοντας υποκλινικές σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλα διαστήματα ('dormant'). Η απόκτηση αγγειογενετικού φαινότυπου ('angiogenic switch') και η δημιουργία αυτόνομου αγγειακού δικτύου ('vascular') επιτρέπει την απρόσκοπτη ανάπτυξή τους ('larger tumour') και την δημιουργία μεταστάσεων ('metastatic potential') [1].

Μηχανισμοί νέο-αγγειογένεσης στον καρκίνο

Για όσο χρονικό διάστημα μια μάζα καρκινικών κυττάρων βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση, η ισορροπία μεταξύ παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση ('proangiogenic factors') και αναστολέων της αγγειογένεσης ('angiogenesis inhibitors') κλίνει προς τη μεριά των τελευταίων [61]. Έτσι, τα κύτταρα αυτά είτε στερούνται αγγειογεντικών ιδιοτήτων είτε αδυνατούν να τις εκφράσουν λόγω της συνεχούς αναστολής από το περιβάλλον [29]. Αυτό εικάζεται ότι μπορεί να είναι αποτέλεσμα του βραχύτερου χρόνου ημιζωής των προαγωγέων σε σχέση με τους αναστολείς, με συνέπεια της συντομότερη παραμονή τους στην κυκλοφορία [60]. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης συμπίπτει με την αύξηση της συγκέντρωσης των προαγωγέων της αγγειογένεσης και την ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των αναστολέων αυτής (άρση αναστολής) (Σχήμα 5) [24].



Σχήμα 5. Στο φυσιολογικό ενδοθήλιο δεν παρατηρείται νέο-αγγειογένεση ('angiogenic switch' off), εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις, καθώς είτε οι παράγοντες που ενεργοποιούν τον μηχανισμό ('activators') απουσιάζουν είτε υπερνικούνται από τους αντίστοιχους αναστολείς ('inhibitors'). Όταν, όμως, η ισορροπία αυτή αλλάζει προς όφελος των προαγωγέων (όπως π.χ. στον καρκίνο, όπου μπορεί να συμβεί παραγωγή VEGF λόγω υποξίας ή μείωση της παραγωγής Thrombospondin-1 στα πλαίσια μετάλλαξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων), τότε ο μηχανισμός της αγγειογένεσης ενεργοποιείται ('angiogenic switch' on) [24]

Ένα πυροδοτικό της αγγειογένεσης γεγονός που έχει μελετηθεί αρκετά είναι η παρουσία υποξίας. Από τη στιγμή, δηλαδή, που η προσφορά οξυγόνου και μεταβολιτών μέσω διάχυσης δεν επαρκεί για τα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, εγκαθίσταται ένα μικροπεριβάλλον υποξίας για τα κύτταρα εκείνα που βρίσκονται στις πιο απομακρυσμένες θέσεις ως προς την εστία αιματικής παροχής [21]. Συνέπεια αυτού είναι η έκφραση του επαγόμενου από την ιστική υποξία

παράγοντα 1 (Hypoxia Inducible factor, HIF-1), ο οποίος με τη σειρά του αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για την προαγωγή της έκφρασης ενός αριθμού μορίων που προάγουν τη διαδικασία της νέο-αγγειογένεσης, όπως ο VEGF και ο PDGF [41, 65, 66]. Οι ουσίες αυτές προκαλούν ενεργοποίηση πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που υπάρχουν πέριξ του όγκου και σε συνδυασμό με άλλες οδηγούν στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης (οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών - MMPs) σε διάφορα σημεία του αγγειακού δένδρου από τα οποία θα εκκινήσουν τα νέα αγγεία. Επιπλέον, συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας διασπώνται για να μπορέσουν να εισχωρήσουν αυτές οι νέες δομές και να εξαπλωθούν, ενώ ειδικά μόρια προσκόλλησης (ανιβ₃ και ανιβ₅ ιντεγκρίνες) προσφέρουν υποστήριξη και κατευθύνουν την σωστή πορεία τους στο χώρο [61].

Η αγγειογένεση στον καρκίνο ακολουθεί σε πολλές περιπτώσεις τα ίδια μονοπάτια με την διαδικασία που παρατηρείται στην φυσιολογική αγγειογένεση [59]. Μάλιστα, έχουν αναγνωριστεί και οι δύο μηχανισμοί ('angiogenesis' και 'vasculogenesis') με τους οποίους αυτή επιτελείται [67], αν και σε ποιο βαθμό συνεισφέρει καθένας από τους δύο αυτούς μηχανισμούς δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως [21]. Όμως, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην οργανογένεση ή την επούλωση του τραύματος, η ενεργοποίηση εδώ είναι ανεξέλεγκτη και μη αυτοπεριοριζόμενη [61]. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί ότι στο τοίχωμα των νεοσχηματιζόμενων αγγείων μπορεί να συμμετέχουν και καρκινικά κύτταρα, αντικαθιστώντας τα ενδοθηλιακά [59, 68, 69]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία παθολογικών αγγείων, με ατέλειες ως προς τη μορφή και τη διακλάδωση (διατεταμένα, ελικοειδή αγγεία) [42], τη λειτουργικότητα και τη «στεγανότητα», λόγω έλλειψη βασικής μεμβράνης στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία [61]. Διάφορα μόρια εξέρχονται από τους διαπερατούς ενδοθηλιακούς φραγμούς των παθολογικών αγγείων αλλά και διαμέσου των διακυτταρικών συνάψεων, αλληλεπιδρούν με στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας και επάγουν φλεγμονή και εναπόθεση ινώδους [28, 70]. Έτσι, η μεταφορά οξυγόνου και μεταβολιτών δεν είναι επαρκής σε όλα τα σημεία του αναπτυσσόμενου όγκου, γεγονός που δημιουργεί περιοχές υποξίας η οποία αποτελεί ερέθισμα για περαιτέρω ενεργοποίηση της αγγειογένεσης [54]. Δημιουργείται, δηλαδή, μια αυτοανατροφοδοτούμενη κατάσταση που συντηρεί την υπάρχουσα παθολογία. Αυτός είναι κι ένας από τους λόγους, άλλωστε, που ο καρκίνος έχει συχνά χαρακτηριστεί σαν «πληγή που δεν κλείνει» [71].

Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη συμμετοχή μονοκύτταρων και μακροφάγων, λεμφοκυττάρων, αιμοπεταλίων, ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων, ινοβλαστών, λείων μυϊκών ινών και περικυττάρων [54]. Συνολικά, η αγγειογένεση στον καρκίνο συνιστά μια περίπλοκη διεργασία με τη συμμετοχή διαφορετικών κυτταρικών σειρών, της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας, καθώς κι ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων που εκκρίνονται τόσο από τον όγκο αλλά και τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού στο πάσχον όργανο. Το αποτέλεσμα απαιτεί την αλληλεπίδραση όλων αυτών των στοιχείων και όχι απλά την επίδραση ενός αυξητικού παράγοντα σ' έναν πληθυσμό κυττάρων.

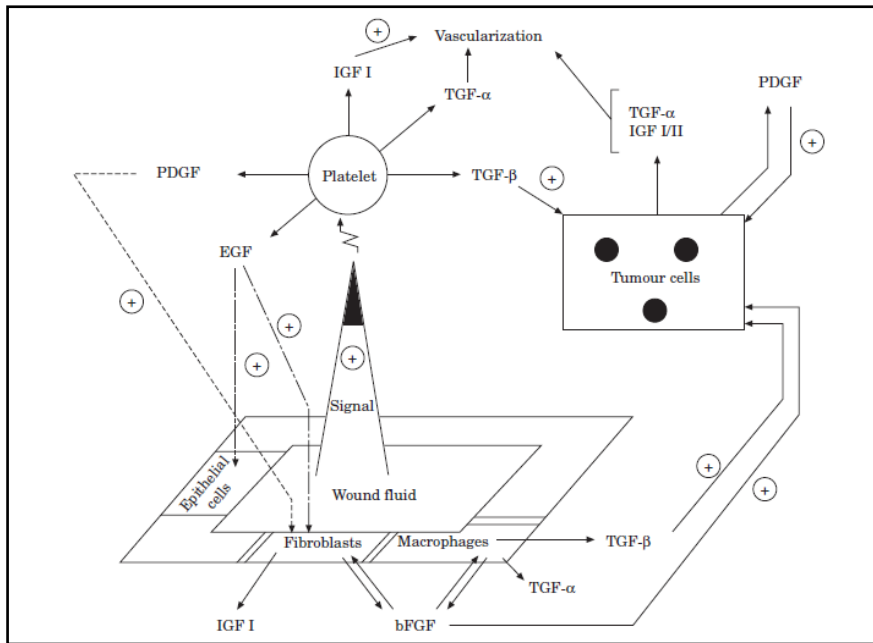
Ο πιθανός ρόλος του χειρουργείου ως παράγοντας προαγωγής της αγγειογένεσης

Τα τελευταία χρόνια αρκετή έρευνα έχει διεξαχθεί σε σχέση με την πιθανή δυσμενή επίδραση του χειρουργείου στην φυσική πορεία του καρκίνου και την επιβίωση του ασθενούς. Αν δηλαδή με το χειρουργικό τραύμα που προκαλείται προκειμένου να εξαιρεθεί ένας όγκος και το συνακόλουθο αγγειογενετικό περιβάλλον που δημιουργείται στα φυσιολογικά πλαίσια της επούλωσης των ιστών, δημιουργούνται παράλληλα οι κατάλληλες προϋποθέσεις για ανάπτυξη μεταστατικών εστιών που μέχρι τότε ήταν σε λανθάνουσα κατάσταση (και που ίσως να παρέμεναν έτσι για αρκετά χρόνια ακόμη), με τελικά αρνητικό αποτέλεσμα στην έκβαση της νόσου, παρά την αρχική πρόθεση για θεραπεία.

Έχει δειχθεί ότι το χειρουργικό τραύμα προάγει την εμφύτευση και ανάπτυξη κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και μάλιστα η επιτυχία της εμφύτευσης αυξάνει αναλογικά με την έκταση της ιστικής καταστροφής [72-74]. Το τραύμα αποτελεί πλούσια πηγή αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, FGF κ.α.) και τα υγρά των παροχετεύσεων από τα σημεία αυτά είναι ταυτόχρονα μιτογόνα αλλά και αγγειογόνα για τα καρκινικά κύτταρα [75-77]. Παράλληλα, τα σημεία εισόδου των εργαλείων εργασίας ('trocar') στην περιτοναϊκή κοιλότητα κατά τις λαπαροσκοπικές ογκολογικές επεμβάσεις αποτελούν όχι σπάνια θέσεις για ανάπτυξη μεταστατικών εστιών μετά την εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου [78, 79]. Το ίδιο συμβαίνει και με τις αναστομώσεις του γαστρεντερικού συστήματος, που αποτελούν συνήθεις εντοπίσεις υποτροπών της νόσου μετά την αρχική εκτομή [70].

Σε ορισμένες μελέτες, η λαπαροσκοπική κολεκτομή σε ασθενείς με καρκίνο του κόλου έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με καλύτερα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα ως προς την επιβίωση των ασθενών σε σχέση με την ανοιχτή κολεκτομή, στα πλαίσια του μικρότερου ιστικού τραυματισμού και της ηπιότερης κινητοποίησης των μηχανισμών της αγγειογένεσης [80]. Παρ' όλα αυτά, αυτή η υπόθεση δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως, με αποτέλεσμα η λαπαροσκοπική προσέγγιση να μην έχει καθιερωθεί οριστικά ως η μέθοδος εκλογής για την αντιμετώπιση των ασθενών αυτών.

Η επίδραση του χειρουργείου μπορεί να συνίσταται εν μέρει στην προαγωγή της αγγειογένεσης μέσω της έκλυσης αγγειογενετικών παραγόντων από το προκαλούμενο χειρουργικό τραύμα (Σχήμα 6), αλλά από την άλλη σημαντικό ρόλο πιθανότατα να διαδραματίζει και το ίδιο το γεγονός της εξαίρεσης της πρωτοπαθούς εστίας, η οποία μέχρι τότε ασκούσε ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη μεταστάσεων, καθώς παρήγαγε αναστολείς της αγγειογένεσης [54]. Σε κάθε περίπτωση, το τελικό αποτέλεσμα είναι το ισοζύγιο των ρυθμιστών της αγγειογένεσης να κλίνει προς τη μεριά των προαγωγέων αυτής εις βάρος των αντίστοιχων αναστολέων και να ευνοεί την απόκτηση αγγειογενετικού δυναμικού από τα δυνητικά εμφυτευμένα ή ήδη κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα.



Σχήμα 6. Σχεδιάγραμμα που αναπαριστά τους αυξητικούς παράγοντες που εκλύονται κατά τη διαδικασία επούλωσης ενός τραύματος και την πιθανή αλληλεπίδρασή τους με εστίες καρκινικών κυττάρων [54].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως μπορεί να γίνει κατανοητό με βάση τα προαναφερθέντα, η χειρουργική επέμβαση διεγείρει το μηχανισμό της νεο-αγγειογένεσης στα πλαίσια της φυσιολογικής διαδικασίας της επούλωσης του χειρουργικού τραύματος. Παρ' όλα αυτά, η ακριβής επίδραση του χειρουργείου δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα δυνατό να κατανοηθεί πλήρως.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης του χειρουργείου στο μηχανισμό της νεο-αγγειογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται το αποτέλεσμα της χειρουργικής εκτομής πρωτοπαθούς κακοήθους νεοπλασίας του γυναικείου μαστού ως προς την πυροδότηση του μηχανισμού της νεο-αγγειογένεσης τόσο σε επίπεδο μοριακό όσο και σε κλινικό. Διερευνάται, δηλαδή, η υπόθεση ότι η αφαίρεση του καρκινικού όγκου με σκοπό την θεραπεία της ασθενούς μπορεί να ευθύνεται για την πιθανή πρόωμη πυροδότηση απομακρυσμένων μεταστάσεων ή και τοπικών υποτροπών, μέσω μικρομεταστατικών εναποθέσεων καρκινικών κυττάρων μακριά από το όργανο στόχο οι οποίες διεγείρονται εξαιτίας της ενεργοποίησης του μηχανισμού της αγγειογένεσης κατά την επούλωση του τραύματος. Ένα τέτοιο ενδεχόμενο θα είχε σαφώς αρνητική επίδραση στην έκβαση της νόσου, τόσο σε επίπεδο επιβίωσης ελεύθερης νόσου (disease-free survival) όσο και σε επίπεδο συνολικής επιβίωσης (overall survival). Παράλληλα, γίνεται σύγκριση με υποομάδα ασθενών που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση στο μαστό για μη κακοήγη νόσο (Ομάδα Ελέγχου, Control Group), με σκοπό τη σύγκρισή τους με τις ασθενείς που χειρουργούνται για αδenoκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης, Study Group).

Τα αποτελέσματα της εργαστηριακής ανάλυσης των δειγμάτων αίματος και των δύο ομάδων συγκρίνονται μεταξύ τους προεγχειρητικά αλλά και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές-κλειδιά. Επίσης, μελετάται και η πορεία των αποτελεσμάτων στη διάρκεια του χρόνου (πριν και μετά το χειρουργείο) για την ίδια ομάδα ασθενών. Τέλος, γίνεται προσπάθεια συσχέτισης των εργαστηριακών μετρήσεων με την κλινική πορεία των ασθενών και την έκβαση της νόσου τους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή ασθενών

Η νέο-αγγειογένεση, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας ανάπτυξης της πρωτοπαθούς εστίας καρκινικών κυττάρων, όσο και των μεταστάσεων. Εκτός, όμως, από την καρκινογένεση, η νέο-αγγειογένεση παρατηρείται και σε πλείστες άλλες φυσιολογικές ή και παθολογικές διεργασίες [25, 81]. Επομένως, για να καταστεί δυνατή η μελέτη της καθαρής επίδρασης του χειρουργείου στον μηχανισμό της αγγειογένεσης θεωρήθηκε απαραίτητο να αποκλειστούν τέτοιες καταστάσεις που πιθανότατα θα οδηγούσαν σε μια λανθασμένη εκτίμηση των αποτελεσμάτων. Έτσι, εφαρμόστηκαν τα παρακάτω κριτήρια αποκλεισμού κατά την επιλογή των υπό μελέτη ασθενών:

- *Σακχαρώδης διαβήτης (τύπου I ή II)*
Η μικροαγγειοπάθεια που παρατηρείται σε χρόνια διαβητικούς ασθενείς έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την νέο-αγγειογένεση [56].
- *Πρόσφατη συστηματική λοίμωξη* [82, 83]
- *Χρόνιες φλεγμονώδεις νόσοι και αυτοάνοσα νοσήματα*
(ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κ.α.)
Οι μεσολαβητές της φλεγμονώδους διεργασίας (IL-1, IL-8, TNF κ.α.) έχουν αναγνωριστεί παράλληλα ως παράγοντες που εμπλέκονται στην νέο-αγγειογένεση και θεωρείται πολύ πιθανό οι μηχανισμοί που κινητοποιούνται στις δύο αυτές διεργασίες να διαθέτουν κοινά μονοπάτια [81, 82, 84].
- *Λήψη ερυθροποιητίνης*
Η χορήγηση ερυθροποιητίνης έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και αυτού του μαστού [85, 86]. Θεωρείται ότι καθιστά τα καρκινικά κύτταρα πιο ανθεκτικά στις συνθήκες ισχαιμίας, ενώ έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον VEGF.
- *Ιστορικό πρόσφατου μείζονος τραυματισμού ή χειρουργικής επέμβασης* [54, 70]
- *Ιστορικό πρόσφατου εμφράγματος του μυοκαρδίου ή άλλου μείζονος καρδιαγγειακού συμβάματος*
(αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, οξεία ισχαιμία άκρου μέλους κ.α.)
Η ισχαιμία αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για την πυροδότηση της νεο-αγγειογένεσης μέσω έκλυσης του HIF-1. Η επαναιμάτωση των ισχαιμικών ιστών επιτυγχάνεται με τη δημιουργία παράπλευρου αγγειακού δικτύου, διαδικασία στην οποία κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει ο VEGF [81, 87].

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν γυναίκες ασθενείς της Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για θεραπεία παθήσεων του μαστού κατά το χρονικό διάστημα 04/05/09 έως 31/05/10 και που δεν ενέπιπταν στα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 10 γυναίκες με καρκίνο του μαστού (Ομάδα Μελέτης) και 6 γυναίκες με ινοαδενώματα, δηλαδή καλοήγη νόσο του μαστού (Ομάδα Ελέγχου). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Η 4^η, η 8^η και η 10^η ασθενής με καρκίνο μαστού ήταν προ-εμμηνοπαυσικές, ενώ οι υπόλοιπες μετεμμηνοπαυσιακές.

Ασθενής	Ηλικία	Πάθηση	TNM Στάδιο	Βαθμός διαφοροποίησης	Τύπος επέμβασης	Ορμονικοί υποδοχείς	HER-2
1	47	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
2	41	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
3	28	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
4	43	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
5	32	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
6	36	Ινοαδένωμα			ΕΚΤΟΜΗ		
7	58	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{1c} N ₁	2	ΕΤΕ+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
8	60	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΑΡ) μαστού	T ₂ N ₀	2	ΤΡΜ+ΛΚΜ	ER+, PR+	0+
9	50	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{1c} N ₀	2	ΤΡΜ+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
10	41	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T _{1b} N ₀	2	ΕΤΕ+ΛΚΜ	ER+, PR+	0+
11	58	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₂	2	ΕΤΕ+ΛΚΜ	ER+, PR+	1+
12	76	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₀	2	ΤΡΜ+ΛΚΜ	ER+, PR+	0+
13	52	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₀	2	ΤΡΜ+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+
14	39	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΑΡ) μαστού	T _{1c} N ₁	3	ΕΤΕ+ΛΚΜ	ER+, PR+	1+
15	55	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΔΕ) μαστού	T ₂ N ₁	2	ΤΡΜ+ΛΚΜ	ER+, PR+	0+
16	43	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα (ΑΡ) μαστού	T _{1b} N ₀	2	ΕΤΕ+ΛΚΜ	ER+, PR+	2+

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. ΕΤΕ: ευρεία τοπική εκτομή, ΛΚΜ: λεμφαδενικός καθαρισμός μασχάλης, ΤΡΜ: τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή, ER: οιστρογονικοί υποδοχείς (estrogen receptors), PR: προγεστερονικοί υποδοχείς (progesterone receptors).

Στοιχεία επέμβασης

Οι ασθενείς της Ομάδας Μελέτης είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη κακοήθεια με core biopsy πριν από το χειρουργείο, η οποία διενεργήθηκε στα Εξωτερικά Ιατρεία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Ιατρείο Μαστού). Ο τύπος της επέμβασης σε κάθε περίπτωση υπαγορεύτηκε από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου της εκάστοτε ασθενούς, αλλά και από την προσωπική επιθυμία σχετικά με τη διατήρηση ή μη του μαστού. Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, από τον ίδιο έμπειρο Χειρουργό, εξειδικευμένο στις παθήσεις του μαστού. Μία ώρα προεγχειρητικά, αλλά και κατά τη διάρκεια της πρώτης μετεγχειρητικής ημέρας χορηγούταν ενδοφλέβια αντιβίωση (αμπικιλίνη και σουλπακτάμη) ανά δωρο. Όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε γενική ενδοφλέβια αναισθησία με ενδοτραχειακή διασωλήνωση. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο χορήγησης αναισθησίας σε όλες τις περιπτώσεις, που περιλάμβανε: προνάρκωση με μιδαζολάμη, εισαγωγή στην αναισθησία με

ενδοφλέβια χορήγηση φαιντανύλης, προποφόλης και μυοχαλαρωτικών, ενώ η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με εισπνεόμενο σεβοφλουράνιο.

Μετεγχειρητική πορεία-παρακολούθηση ασθενών

Η διάρκεια νοσηλείας των ασθενών με καρκίνο μαστού κυμαινόταν από 7 έως 10 ημέρες, ανάλογα με την ποσότητα εκροής λεμφικού υγρού από την παροχέτευση που είχε τοποθετηθεί διεγχειρητικά στη μασχालιαία κοιλότητα. Οι ασθενείς που υποβάλλονταν σε εκτομή ινοαδενώματος μαστού νοσηλεύονταν για 2-3 ημέρες. Δεν καταγράφηκαν μετεγχειρητικές επιπλοκές σε καμία περίπτωση.

Η ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον ίδιο Παθολογοανατόμο, ο οποίος είναι εξειδικευμένος σε παθήσεις του μαστού. Οι ασθενείς με καρκίνο μαστού εκτιμήθηκαν στο Ογκολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Όσες είχαν υποβληθεί σε ευρεία τοπική εκτομή υποβάλλονταν σε συμπληρωματική ακτινοθεραπεία στο Ακτινοθεραπευτικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στις περιπτώσεις ανεύρεσης διηθημένων λεμφαδένων στο ιστολογικό παρασκεύασμα ακολουθούσε επικουρική χημειοθεραπεία, σύμφωνα με τα υπάρχοντα πρωτόκολλα. Επί παρουσίας ορμονικών υποδοχέων χορηγούταν επιπλέον ορμονοθεραπεία με αναστολείς αρωματάσης (per os) για χρονικό διάστημα 5 ετών. Παράλληλα, οι ασθενείς παρακολουθούταν στο Ιατρείο Μαστού με κλινική εξέταση και απεικονιστικές εξετάσεις, για το ενδεχόμενο τοπικής υποτροπής ή εμφάνιση νεοπλασματος στον ετερόπλευρο μαστό.

Οι φάκελοι των ασθενών μελετήθηκαν αναδρομικά, με σκοπό να αξιολογηθεί το ποσοστό εμφάνισης τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης μετάστασης καθώς και να εκτιμηθεί η συνολική επιβίωση των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η παρακολούθηση (follow-up) κυμάνθηκε από 25 έως 37 μήνες (μέσος όρος: 31 μήνες).

Συλλογή δειγμάτων αίματος

Τα δείγματα αίματος προήλθαν τόσο από ασθενείς με καρκίνο μαστού όσο και από ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις του μαστού (ινοαδενώματα). Οι αιμοληψίες έγιναν στις ακόλουθες χρονικές στιγμές: για τους ασθενείς με κακοήθεια την προηγούμενη του χειρουργείου ημέρα (σήμανση ως PRO), την 1^η, 3^η, 7^η και 30^η μετεγχειρητική ημέρα (σήμανση ως D1, D3, D7 και D30 αντίστοιχα), ενώ για τους ασθενείς με καλοήγη νόσο την προηγούμενη του χειρουργείου ημέρα (σήμανση ως PRO), την 1^η και 3^η μετεγχειρητική ημέρα (σήμανση ως D1 και D3 αντίστοιχα). Σε κάθε περίπτωση έγινε συλλογή φλεβικού αίματος συνολικού όγκου 16 ml με φλεβοκέντηση μέσω κλειστού συστήματος (21G BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set, BD Diagnostics®, NJ USA) και πάντα με την εφαρμογή

γαντιών λάτεξ μιας χρήσης, από το ίδιο κάθε φορά άτομο, σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και κατά τις πρωινές ώρες (8-9 π.μ.). Ακολούθως γινόταν διαχωρισμός της συλλεγόμενης ποσότητας αίματος σε 2 ειδικά φιαλίδια απομόνωσης mRNA (PAXgene™ Blood RNA Tubes, PreAnalytix®, GmbH) και 4 φιαλίδια που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για γενική εξέταση αίματος (BD Vacutainer® tubes, BD Diagnostics®, NJ USA).

Κάθε φιαλίδιο mRNA περιείχε 6,9 ml ειδικού αντιδραστηρίου για την απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών και συμπληρωνόταν με 2,5 ml από το συλλεγόμενο αίμα, ενώ τα φιαλίδια γενικής αίματος που περιείχαν αντιπηκτικό K₂EDTA σε συγκέντρωση 3,6 mg/ml πληρούταν με 2 ml φλεβικού αίματος το καθένα. Μετά από ήπια ανάδευση, τα φιαλίδια απομόνωσης mRNA παρέμεναν σε όρθια θέση για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή), προκειμένου να απενεργοποιηθούν οι ριβονουκλεάσες του περιφερικού αίματος. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο της Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπου και αποθηκεύονταν σε ειδικό καταψύκτη αζώτου στους -80°C, μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας τους.

Τα δείγματα αίματος που είχαν συλλεχθεί σε φιαλίδια της γενικής αίματος υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 3.000 στροφές/λεπτό (σε θερμοκρασία δωματίου), στα Εργαστήρια του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και σε χρονικό διάστημα εντός 30 λεπτών από τη διενέργεια της αιμοληψίας. Το υπερκείμενο συλλεγόταν με πιπέτα και τοποθετούταν σε σωληνάρια Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz, GmbH), τα οποία επίσης μεταφέρονταν και αποθηκεύονταν στην Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός δύο ετών από τη στιγμή της συλλογής τους.

Μέτρηση επιπέδων κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων με ELISA

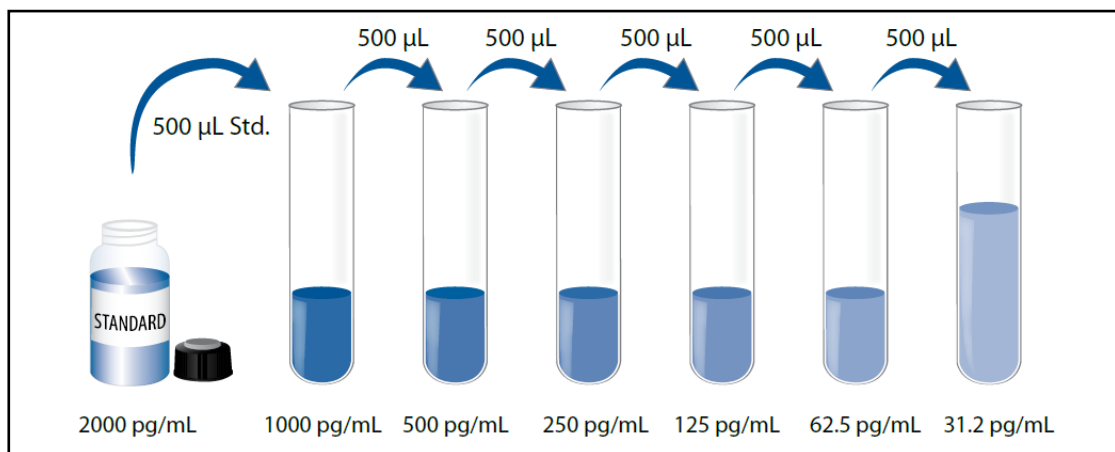
Προσδιορίστηκαν τα κυκλοφορούντα στο περιφερικό αίμα επίπεδα τριών από τους σημαντικότερους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο VEGFA, η IL-8 και ο FGF-b (FGF-2). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος Solid Phase Sandwich ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) για κάθε έναν από τους παραπάνω παράγοντες, σε δείγματα πλάσματος ασθενών με ινοαδένωμα αλλά και αδenoκαρκίνωμα μαστού, τόσο πριν όσο και μετά τη χειρουργική επέμβαση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για κάθε δείγμα στο εργαστήριο και σε θερμοκρασία δωματίου, αφού πρώτα τα δείγματα αίματος των ασθενών αφέθηκαν να ξεπαγώσουν από τους -80°C με φυσικό τρόπο.

VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A)

Χρησιμοποιήθηκε το Human VEGF Quantikine ELISA Kit της R&D Systems® (αριθμός καταλόγου DVE00), με όριο ευαισθησίας τα 9 pg/mL και εύρος ανίχνευσης 15,6 - 1000 pg/mL.

Προετοιμασία διαλυμάτων:

- Ανασύσταση του Standard ρυθμιστικού διαλύματος με το συγκεκριμένο για τον VEGF-A αντιγόνο (Standard VEGF-A) με 5 mL του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος (Calibrator Diluent RD6U για VEGF-A), έτσι ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα με συγκέντρωση 2.000 pg/mL. Η διαδικασία αυτή έγινε τουλάχιστον 15 λεπτά πριν ξεκινήσουν οι αραιώσεις.
- Αραίωση 20 mL συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος για πλύσιμο (Wash Buffer Concentrate) σε 480 mL απιονοσμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος 500 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Wash Buffer.
- Ανάμιξη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια Color Reagent A και Color Reagent B, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος διαλύματος υποστρωμάτων του ενζύμου (Substrate Solution), ικανός να διαχωριστεί ανά 200 μl σε κάθε well (φρεάτιο). Η ανάμιξη των δύο διαλυμάτων πρέπει να γίνει το πολύ 15 λεπτά πριν τη διενέργεια των αντιδράσεων με τα υποστρώματα και σε συνθήκες προστασίας από το φως.
- Μεταφορά 500 μL από το αντίστοιχο Calibrator Diluent σε κάθε ένα από τα 7 σωληνάρια Eppendorf. Προσθήκη 500 μL από το Standard διάλυμα στο πρώτο σωληνάριο, έτσι ώστε να επιτευχθεί αραιώση της τάξης των 1000 pg/mL. Λαμβάνοντας 500 μL από αυτό το αραιωμένο διάλυμα και προσθέτοντάς τα στο επόμενο σωληνάριο προκύπτει αραιώση στα 500 pg/mL. Με την ίδια διαδικασία πετυχαίνουμε διαδοχικές αραιώσεις της τάξης των 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL και 31,2 pg/mL (Σχήμα 7). Το τελευταίο σωληνάριο, που έχει μόνο 500 μL Calibrator Diluent έχει συγκέντρωση 0 pg/mL.



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών μεταγρίσεων του δείγματος ώστε να επιτευχθούν οι τελικές αραιώσεις για τον VEGF-A.

Διαδικασία:

- Προσθήκη 100 μL από το ειδικό για τον VEGF-A Assay Diluent (RD1-W) σε κάθε ένα από τα wells (φρεάτια) του ειδικού plate (δίσκου) όπου θα πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.
- Προσθήκη 100 μL από τα standards, controls και δείγματα σε κάθε well και επικάλυψη του plate με ειδική μεμβράνη επισφράγισης (adhesive strip).
- Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με ηπιότατη ανάδευση κατά διαστήματα για ομοιόμορφη ανάμιξη.
- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε well που γίνεται 3 φορές, κάθε φορά με τον εξής τρόπο: απόρριψη του περιεχομένου, έκπλυση με 400 μL Wash Buffer, απόρριψη του Wash Buffer. Μετά και το τελευταίο πλύσιμο δεν πρέπει να υπάρχουν ούτε ίχνη του Wash Buffer.
- Προσθήκη 200 μL από την αντίστοιχη για τον VEGF-A σημασμένη με ένζυμο αντισφαιρίνη (Conjugate) σε κάθε well. Επικάλυψη με adhesive strip και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε well που γίνεται 3 φορές, με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί το πλεόνασμα της σημασμένης με ένζυμο αντισφαιρίνης.
- Προσθήκη Substrate Solution (που περιέχει ίσους όγκους από το Color Reagent A και B, όπως προετοιμάστηκε νωρίτερα).
- Ακολουθεί επώαση για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους.
- Προσθήκη 50 μL από το Stop Solution σε κάθε well. Πρόκειται για διάλυμα θειικού οξέος το οποίο διακόπτει την αντίδραση (αλλαγή του χρώματος του Stop Solution από μπλε σε κίτρινο).
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm μήκους κύματος.

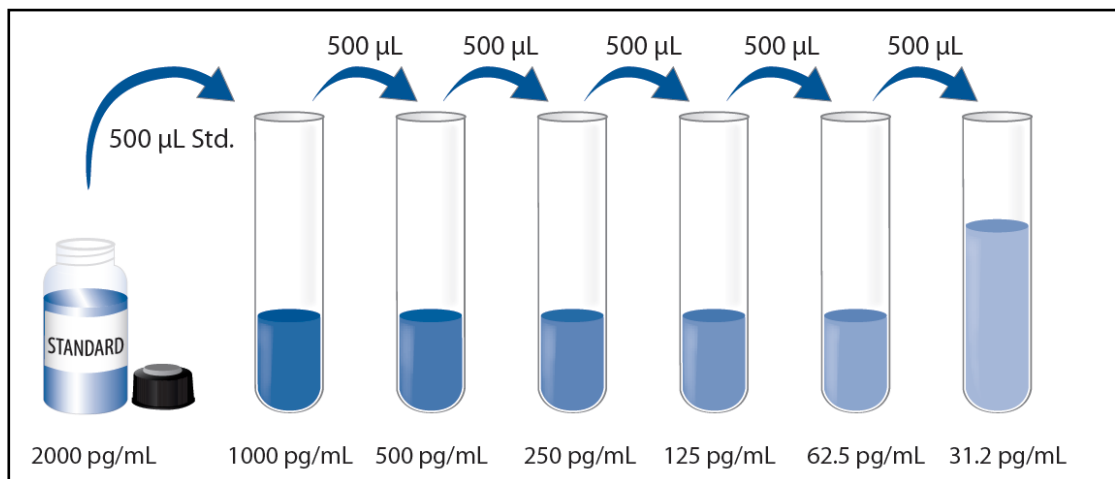
IL-8 (Interleukin-8)

Χρησιμοποιήθηκε το Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit της R&D Systems[®] (αριθμός καταλόγου D8000C), με όριο ευαισθησίας τα 7,5 pg/mL και εύρος ανίχνευσης 31,2 - 2000 pg/mL.

Προετοιμασία διαλυμάτων:

- Ανασύσταση του Standard ρυθμιστικού διαλύματος με το συγκεκριμένο για την IL-8 αντιγόνο (Standard IL-8) με 5 mL του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος για αραιώση ορών (Calibrator Diluent RD6Z για IL-8), έτσι ώστε να προκύψει τελικό διάλυμα με συγκέντρωση 2.000 pg/mL. Η διαδικασία αυτή έγινε τουλάχιστον 15 λεπτά πριν ξεκινήσουν οι αραιώσεις.

- Αραίωση 20 mL συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος για πλύσιμο (Wash Buffer Concentrate) σε 480 mL απιονοσμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος 500 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Wash Buffer.
- Ανάμιξη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια Color Reagent και Color Reagent B, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος διαλύματος υποστρωμάτων του ενζύμου (Substrate Solution), ικανός να διαχωριστεί ανά 200 μL σε κάθε well (φρεάτιο). Η ανάμιξη των δύο διαλυμάτων πρέπει να γίνει το πολύ 15 λεπτά πριν τη διενέργεια των αντιδράσεων με τα υποστρώματα και σε συνθήκες προστασίας από το φως.
- Μεταφορά 500 μL από το αντίστοιχο Calibrator Diluent σε κάθε ένα από τα 7 σωληνάρια Eppendorf. Προσθήκη 500 μL από το Standard διάλυμα στο πρώτο σωληνάριο, έτσι ώστε να επιτευχθεί αρραίωση της τάξης των 1000 pg/mL . Λαμβάνοντας 500 μL από αυτό το αραιωμένο διάλυμα και προσθέτοντάς τα στο επόμενο σωληνάριο προκύπτει αρραίωση στα 500 pg/mL . Με την ίδια διαδικασία πετυχαίνουμε διαδοχικές αραιώσεις της τάξης των 250 pg/mL , 125 pg/mL , 62,5 pg/mL και 31,2 pg/mL (Σχήμα 8). Το τελευταίο σωληνάριο, που έχει μόνο 500 μL Calibrator Diluent έχει συγκέντρωση 0 pg/mL .



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών μεταγίσεων του δείγματος ώστε να επιτευχθούν οι τελικές αραιώσεις για την IL-8.

Διαδικασία:

- Προσθήκη 100 μL από το ειδικό για την IL-8 Assay Diluent (RD1-85) σε κάθε ένα από τα wells (φρεάτια) του ειδικού plate (δίσκου) όπου θα πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.
- Προσθήκη 100 μL από τα Standards, controls και δείγματα σε κάθε well και επικάλυψη του plate με ειδική μεμβράνη επισφράγισης (adhesive strip).
- Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με ηπιότατη ανάδευση κατά διαστήματα για ομοιόμορφη ανάμιξη.

- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε φρεατίου που γίνεται 3 φορές, κάθε φορά με τον εξής τρόπο: απόρριψη του περιεχομένου, έκπλυση με 400 μL Wash Buffer, απόρριψη του Wash Buffer. Μετά και το τελευταίο πλύσιμο δεν πρέπει να υπάρχουν ούτε ίχνη του Wash Buffer.
- Προσθήκη 200 μL από την αντίστοιχη για την IL-8 σημασμένη με ένζυμο αντισφαιρίνη (Conjugate) σε κάθε φρεάτιο. Επικάλυψη με adhesive strip και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε φρεατίου που γίνεται 3 φορές, με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί το πλεόνασμα της σημασμένης με ένζυμο αντισφαιρίνης.
- Προσθήκη Substrate Solution (που περιέχει ίσους όγκους από το Color Reagent A και B, όπως προετοιμάστηκε νωρίτερα).
- Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους.
- Προσθήκη 50 μL από το Stop Solution σε κάθε φρεάτιο. Πρόκειται για διάλυμα θεικού οξέος το οποίο διακόπτει την αντίδραση (αλλαγή του χρώματος του Stop Solution από μπλε σε κίτρινο).
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm μήκους κύματος.

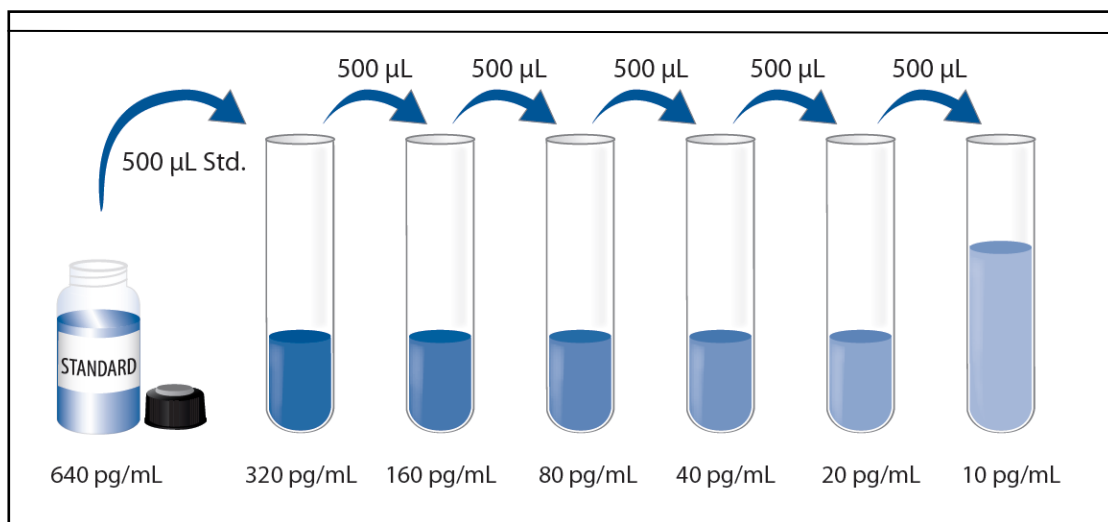
bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

Χρησιμοποιήθηκε το Human FGF basic Quantikine ELISA Kit της R&D Systems[®] (αριθμός καταλόγου DFB50), με όριο ευαισθησίας τα 3 pg/mL και εύρος ανίχνευσης 10 - 640 pg/mL .

Προετοιμασία διαλυμάτων:

- Ανασύσταση του Standard ρυθμιστικού διαλύματος με το συγκεκριμένο για τον FGF-b αντιγόνο (Standard FGF-b) με 5 mL του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος για αραιώση ορών (Calibrator Diluent RD5-14), έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος διαλύματος αραιώσης με συγκέντρωση 640 pg/mL . Η διαδικασία αυτή έγινε τουλάχιστον 15 λεπτά πριν ξεκινήσουν οι αραιώσεις.
- Αραίωση 10 mL συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος για πλύσιμο (Wash Buffer Concentrate) σε 240 mL απιονοσμένο νερό, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος 250 mL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Wash Buffer.
- Ανάμιξη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια Color Reagent A και Color Reagent B, έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος διαλύματος υποστρωμάτων του ενζύμου (Substrate Solution), ικανός να διαχωριστεί ανά 100 μl σε κάθε well (φρεάτιο). Η ανάμιξη των δύο διαλυμάτων πρέπει να γίνει το πολύ 15 λεπτά πριν τη διενέργεια των αντιδράσεων με τα υποστρώματα και σε συνθήκες προστασίας από το φως.
- Μεταφορά 500 μL από το αντίστοιχο Calibrator Diluent σε κάθε ένα από τα 7 σωληνάρια Eppendorf. Προσθήκη 500 μL από το Standard διάλυμα στο πρώτο σωληνάριο, έτσι ώστε να επιτευχθεί αραιώση της τάξης των 320 pg/mL .

Λαμβάνοντας 500 μL από αυτό το αραιωμένο διάλυμα και προσθέτοντάς τα στο επόμενο σωληνάριο προκύπτει αραιώση στα 160 pg/mL . Με την ίδια διαδικασία πετυχαίνουμε διαδοχικές αραιώσεις της τάξης των 80 pg/mL , 40 pg/mL , 20 pg/mL και 10 pg/mL (Σχήμα 9). Το τελευταίο σωληνάριο, που έχει μόνο 500 μL Calibrator Diluent έχει συγκέντρωση 0 pg/mL .



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών μεταγρίσεων του δείγματος ώστε να επιτευχθούν οι τελικές αραιώσεις για τον FGF-b.

Διαδικασία:

- Προσθήκη 100 μL από το ειδικό για τον FGF-b Assay Diluent (RD1-43) σε κάθε ένα από τα 42 wells (φρεατία) του ειδικού plate (δίσκου) όπου θα πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις.
- Προσθήκη 100 μL από τα αντίστοιχα Standards, controls και δείγματα σε κάθε well και επικάλυψη του δίσκου με ειδική μεμβράνη επισφράγισης (adhesive strip).
- Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με ηπιότατη ανάδευση κατά διαστήματα για ομοιόμορφη ανάμιξη.
- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε φρεατίου που γίνεται 3 φορές, κάθε φορά με τον εξής τρόπο: απόρριψη του περιεχομένου, έκπλυση με 400 μL Wash Buffer, απόρριψη του Wash Buffer. Μετά και το τελευταίο πλύσιμο δεν πρέπει να υπάρχουν ούτε ίχνη του WashBuffer.
- Προσθήκη 200 μL από την αντίστοιχη για τον FGF-b σημασμένη με ένζυμο αντισφαιρίνη (Conjugate) σε κάθε φρεατίο. Επικάλυψη με adhesive strip και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακολουθεί έκπλυση του κάθε φρεατίου που γίνεται 3 φορές, με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε, προκειμένου να απομακρυνθεί το πλεόνασμα της σημασμένης με ένζυμο αντισφαιρίνης.
- Προσθήκη Substrate Solution (που περιέχει ίσους όγκους από το Color Reagent A και B, όπως προετοιμάστηκε νωρίτερα).
- Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους.
- Προσθήκη 50 μL από το Stop Solution σε κάθε φρεάτιο. Πρόκειται για διάλυμα θειικού οξέος το οποίο διακόπτει την αντίδραση (αλλαγή του χρώματος του Stop Solution από μπλε σε κίτρινο).
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm μήκους κύματος.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων:

- Υπολογίζεται ο μέσος όρος από τις δύο μετρήσεις για κάθε δείγμα και αφαιρείται η τιμή που αντιστοιχεί στην οπτική πυκνότητα της μηδενικής συγκέντρωσης.
- Με βάση τα νούμερα που προκύπτουν σχηματίζεται η πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια υπολογιστή και τη χρήση ειδικού λογισμικού.

Προσδιορισμός κυκλοφορούντων RNA μεταγράφων με τη μέθοδο RT-PCR

Αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού RNA από 2,5ml ολικού αίματος σε δείγματα 10 ασθενών με καρκίνο του μαστού, που αντιστοιχούσαν στις χρονικές στιγμές PRO, D3 και D7, καθώς και 6 ασθενών με καλοήγη νόσο του μαστού (ινοαδενώματα) στις χρονικές στιγμές PRO και D3. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που είχαν συλλεχθεί στα ειδικά προς αυτό το σκοπό φιαλίδια PAXgene™ Blood RNA Tubes, χρησιμοποιώντας το ειδικό kit απομόνωσης RNA PAXgene® Blood RNA kit. Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου ολικού RNA με φασματοφωτομέτρηση και ποιοτικός έλεγχος αυτού με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Στη συνέχεια έγινε μετατροπή του RNA σε μονόκλωνο cDNA και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα κυκλοφορούντων μεταγράφων 84 γονιδίων με real time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα επιμέρους βήματα που επιτελέστηκαν ήταν τα εξής:

Προετοιμασία διαλυμάτων του PAXgene Blood RNA kit

- Θέρμανση του δεσμευτικού ρυθμιστικού διαλύματος BR2 στους 37°C, προς πλήρη διάλυση και αποσυμπύκνωση.

- Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου (44 mL) ειδικής για νουκλεϊκά οξέα αιθανόλης υψηλής καθαρότητας (96-100%) στον αρχικό όγκο των 11 mL του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (wash buffer 2) BR4 πριν την πρώτη χρήση του, καθ' όσον αυτό παραδίδεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Το αραιωμένο BR4 διάλυμα που προκύπτει φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυση της DNάσης I ελεύθερης RNάσης (RNFD) σε 550 µL διαλύματος επανασύστασης DNάσης DRB και ήπια ανάδευση με το χέρι (δεν επιτρέπεται η χρήση Vortex). Αποθήκευση στους -20°C.

Απομόνωση ολικού RNA

Για κάθε δείγμα αίματος που είχε συλλεχθεί σε φιαλίδιο PAXgene™ Blood RNA Tube ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Ξεπάγωμα του δείγματος με φυσικό τρόπο, με παραμονή για τουλάχιστον 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση PAXgene™ Blood RNA Tube για 10 λεπτά σε 4.000xg (Rotofix 32A), με σκοπό την ιζηματοποίηση των νουκλεϊκών οξέων.
- Πλύση του ιζήματος με προσθήκη 4 ml νερού ελεύθερου RNάσης (RNase-free water, RNFW).
- Σφράγιση του φιαλιδίου με δευτερεύον κλείστρο BD Hemogard™.
- Ανάδευση στο Vortex μέχρι επαναδιάλυσης.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 4.000xg (Rotofix 32A).
- Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 350 µL ρυθμιστικού διαλύματος επανασύστασης BR1.
- Ανάδευση στο Vortex μέχρι επαναδιάλυσης και μεταφορά του δείγματος σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης (MicroCentrifuge Tube, MCT).
- Προσθήκη 300 µL δεσμευτικού ρυθμιστικού διαλύματος BR2 και 40 µL πρωτεϊνάσης K (PK), προς κατάτμηση των πρωτεϊνών.
- Ανάδευση στο Vortex για 5 δευτερόλεπτα.
- Σφράγιση φιαλιδίων με parafilm.
- Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 55°C στις 800 στροφές/λεπτό, με τα σωληνάρια τοποθετημένα πλαγιαστά στον ανακινούμενο επωαστήρα (Heidolph Incubator 1000).
- Μεταφορά του δείγματος σε ειδική στήλη διαχωρισμού-ομογενοποίησης PAXgene Shredder Spin Column (PSC: μωβ χρώμα), εντός σωληναρίου ανάλυσης (Processing Tube, PT) όγκου 2ml.
- Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 15.000xg (Kubota 3500). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ομογενοποίηση του κυτταρικού διαλύματος, προς απομάκρυνση των υπολειμμάτων των κατακερατισμένων κυττάρων.
- Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού της διαρροής (χωρίς μετακίνηση του ιζήματος) σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης (MCT) και προσθήκη 350 µL καθαρής αιθανόλης, για ρύθμιση κατάλληλων συνθηκών δέσμευσης.

- Μεταφορά 700 μL του δείγματος και εναπόθεση σε στήλη διαχωρισμού PAXgene RNA Spin Column (RSC: κόκκινο χρώμα).
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500). Έτσι επιτυγχάνεται εκλεκτική δέσμευση RNA στη μεμβράνη ζελ χαλαζία PAXgene, ενώ επιμικτικά στοιχεία διέρχονται μέσω αυτής.
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT και μεταφορά του υπολοίπου δείγματος (περίπου 300 μL) στην στήλη PRC.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Προσθήκη 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (wash buffer 1) BR3 στη στήλη PRC.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Σε καινούργιο MCT συντίθεται διάλυμα συνολικού όγκου 80 μL , αποτελούμενο από 10 μL DNase I ελεύθερη RNάσης (RNA-free DNase I, RNFD) και 70 μL ρυθμιστικού διαλύματος κατάτμησης DNA (DNA Digestion Buffer, RDD), ανακινώντας τα απαλά.
- Προσθήκη του διαλύματος αυτού (80 μL) ακριβώς πάνω στη μεμβράνη της PRC στήλης του δείγματος.
- Η στήλη αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επωαστεί η μεμβράνη και να απομακρυνθούν τυχόν δεσμευμένα υπόλοιπα του DNA.
- Προσθήκη 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 (wash buffer 1) BR3 στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (wash buffer 2) BR4 στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Προσθήκη 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 (wash buffer 2) BR4 στη στήλη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 3 λεπτά σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500). Με τα πολλαπλά αυτά βήματα πλύσεων απομακρύνονται τυχόν υπόλοιπα επιμικτικών στοιχείων.
- Μεταφορά της στήλης PRC σε νέο σωληνάριο PT.
- Μεταφορά της στήλης στο τελικό MCT.
- Ταυτοποίηση τελικού MCT με κωδικό αποθήκευσης.
- Προσθήκη 40 μL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης BR5 απευθείας πάνω στη μεμβράνη.
- Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).

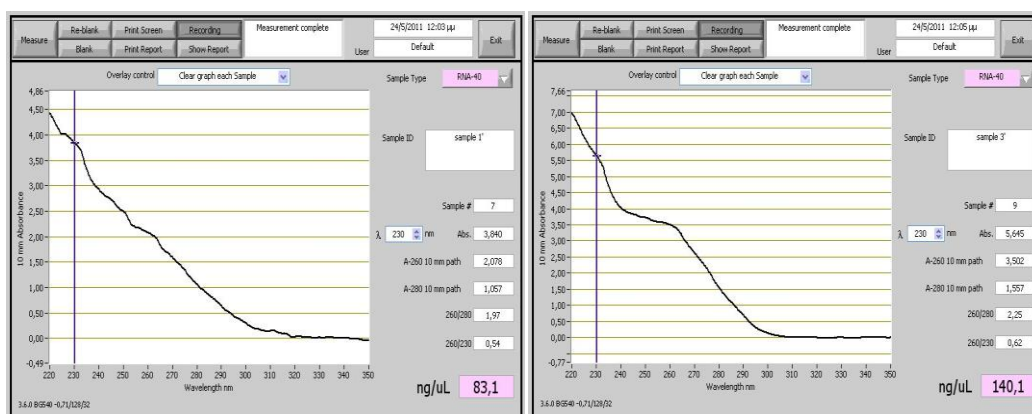
- Προσθήκη 40 μL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης BR5 απευθείας πάνω στη μεμβράνη.
- Φυγοκέντρωση της στήλης για 1 λεπτό σε 15.000xg (Kubota 3500).
- Σφράγισμα με parafilm.
- Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο (χωρίς ανάδευση) για 5 λεπτά στους 65°C.
- Απευθείας μεταφορά στον πάγο ή την κατάψυξη.
- Τελική αποθήκευση στους -80°C.

Ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου RNA έγινε μετρώντας την απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm μήκους κύματος φωτός (A_{260}) με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου (NanoDrop® ND-1000). Η απορρόφηση 1 μονάδας στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 44 μg RNA ανά ml δείγματος. Για κάθε ένα από τα δείγματα RNA που φωτομετρήσαμε λάβαμε ποσότητα 1 μl από τα συνολικά 80 μl όγκου τελικού διαλύματος που είχαμε απομονώσει, αφού πρώτα το δείγμα ξεπάγωσε στον πάγο (δηλαδή από τους -80 °C στους 0 °C). Πριν από οποιαδήποτε μέτρηση προηγήθηκε καθαρισμός των κυψελίδων του φασματοφωτόμετρου με RNA-ase free water και το μηχάνημα μηδενίστηκε χρησιμοποιώντας elution buffer (BR5). Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο κάθε δείγμα υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα (Εικόνα 1), με βάση την τροποποιημένη εξίσωση Beer-Lambert:

$$\text{Συγκέντρωση δείγματος RNA} = 44 \times A_{260}.$$

Η συγκέντρωση που προκύπτει είναι σε ng/ μl δείγματος που φωτομετρήθηκε.



Εικόνα 1. Παράδειγμα υπολογισμού των συγκεντρώσεων ολικού RNA μέσω του NanoDrop ND-1000, σε δύο δείγματα ασθενών (συγκεκριμένα πρόκειται για δείγμα από την ασθενή Νο 3 κατά την 7^η μετ ημέρα και από την ασθενή Νο 4 πριν το χειρουργείο, αντίστοιχα). Η καμπύλη προκύπτει από την απορρόφηση σε διάφορα μήκη κύματος φωτός, ενώ υπολογίζεται αυτόματα και ο λόγος A_{260}/A_{280} . Με τον ίδιο τρόπο έγιναν οι υπολογισμοί και για τις υπόλοιπες ασθενείς.

Το πηλίκο της απορρόφησης του δείγματος RNA στα 260 και στα 280 nm αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη της καθαρότητας του απομονωμένου RNA. Το καθαρό

RNA έχει λόγο απορρόφησης A_{260}/A_{280} που κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, σε pH 7,5. Πιο συγκεκριμένα, λόγος $\sim 1,8$ είναι γενικά αποδεκτός ότι συμβαδίζει με «καθαρό» DNA, ενώ λόγος ~ 2 με «καθαρό» RNA. Ο λόγος αυτός υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα δείγματά μας και βρέθηκε εντός των συγκεκριμένων ορίων, καταδεικνύοντας απομόνωση RNA υψηλής καθαρότητας.

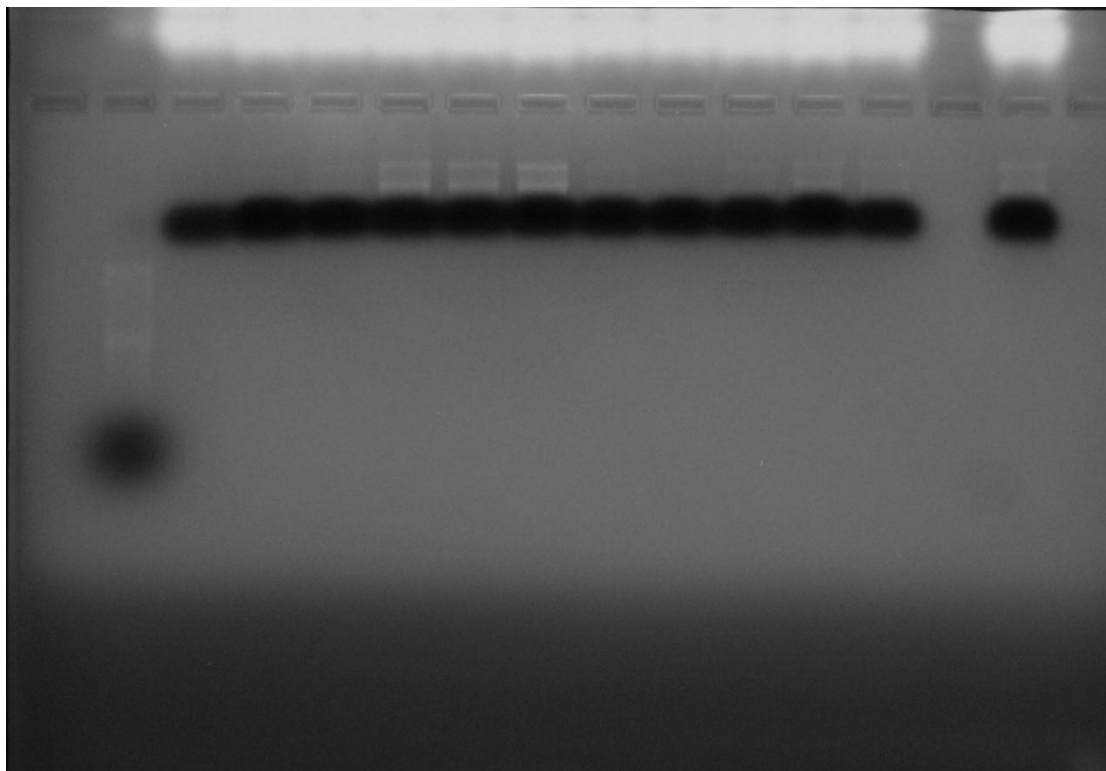
Ποιοτικός προσδιορισμός απομονωμένου RNA

Ακολούθησε ποιοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου RNA με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης 1,2% RNA. Για την κατασκευή του gel χρησιμοποιήθηκαν 1,8 gr αγαρόζης, 122 ml H₂O και 15 ml διαλύματος 10 x MOPS. Όλες οι διεργασίες που περιγράφονται στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν στο hood του εργαστηρίου. Το μίγμα τοποθετήθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων και αφέθηκε να κρυώσει. Στη συνέχεια προστέθηκαν 13 ml φορμαλδεΰδης (formaldehyde) καθώς και 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου (BET) και το τελικό μίγμα αφέθηκε να πήξει. Για το RNA gel χρησιμοποιήθηκε RNA running buffer 1 x MOPS. Ο δίσκος της συσκευής ηλεκτροφόρησης καθώς και όλα τα εξαρτήματα που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν πλύθηκαν με RNase free water και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό.

Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης αφέθηκαν να ξεπαγώσουν στον πάγο και έπειτα ακολούθησε η παρακάτω επεξεργασία:

Για το κάθε δείγμα RNA χρησιμοποιήθηκε όγκος 10 μl, στον οποίον προστέθηκαν 15 μl φορμαμίδιου (formamide), 3 μl διαλύματος 10 x MOPS, 3 μl φορμαλδεΰδης (formaldehyde) και 0,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου μέσα σε φιαλίδιο Eppendorf. Το διάλυμα επώαστηκε στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 68°C. Έπειτα τοποθετήθηκε απευθείας στον πάγο, όπου και προστέθηκαν 6 μl RNA loading buffer.

Για κάθε δείγμα RNA, από τα 37,5 μl τελικού όγκου του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν μόνο 25 μl στο gel ηλεκτροφόρησης, το οποίο παρέμεινε εμβυθισμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα (1 x MOPS) καθ'όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα από ώρα, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου και υπό υπέρυθρο φως (λάμπα UV) κατέστη δυνατό να αναγνωριστούν οι χαρακτηριστικές ζώνες κατά τη διαδρομή της ηλεκτροφόρησης του RNA, που αντιστοιχούν στα 18S και 28S rRNA. Το gel φωτογραφήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων mRNA για ποιοτικό προσδιορισμό. Η πρώτη ζώνη που αναγνωρίζεται αντιστοιχεί στο ριβοσωμικό RNA 28s, ενώ η δεύτερη στο 18s.

Μετατροπή του απομονωμένου RNA σε cDNA

Πραγματοποιήθηκε μετατροπή του RNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα σε cDNA μονής αλυσίδας, με τη χρήση του ειδικού εξοπλισμού RT² First Strand Kit της SABiosciencesTM (Qiagen). Χρησιμοποιήθηκε ίδια ποσότητα από κάθε δείγμα, ίση με 1 µg RNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit. Πραγματοποιήθηκε αναγωγή στο 1 µg, των τιμών από το Nanodrop, προκειμένου να πάρουμε το συγκεκριμένο όγκο από το κάθε δείγμα.

Παράδειγμα: Ασθενής Νο 4

Η φωτομέτρηση έδωσε συγκέντρωση 104,1 ng/µL.

Θέλοντας να πάρουμε 1 µg (=1000ng) πρέπει να κάνουμε τον υπολογισμό

$$x = 1.000/104,1 \text{ σε } \mu\text{L}, \text{ δηλαδή } x = 9,6 \mu\text{L} \text{ από το δείγμα αυτό}$$

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα.

Ανάλυση των δειγμάτων με RT-PCR

Στη συνέχεια, προετοιμάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση τυχόν γενωμικού DNA από τα δείγματα. Βεβαιωνόμαστε ότι όλα τα συστατικά του kit βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου και τα αναδεύουμε για 10-15 δευτερόλεπτα στο Vortex. Ανάλογα με τον όγκο που έχουμε πάρει από το κάθε δείγμα, προσθέτουμε 2 μL ρυθμιστικού διαλύματος GE μαζί με την αντίστοιχη ποσότητα RNase-free water, ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10 μL για κάθε δείγμα. Έπειτα επωάζουμε τα δείγματα στους 42°C για 5 λεπτά και τα τοποθετούμε αμέσως στον πάγο για 1 λεπτό τουλάχιστον.

Ακολούθησε η παρασκευή του διαλύματος της αντίστροφης μεταγραφάσης. Αναμιγνύουμε 4 μL 5x ρυθμιστικού διαλύματος Buffer BC3, μαζί με 1 μL Control P2, 2 μL RE3 Reverse Transcriptase mix και 3 μL RNase-free water, έτσι ώστε να προκύψει μίγμα τελικού όγκου 10 μL , το οποίο και προσθέτουμε στα 10 μL διαλύματος που περιέχει το δείγμα μας και τα αναμιγνύουμε πιπετάροντας απαλά. Τα επωάζουμε στους 42°C για ακριβώς 15 λεπτά και μετά αμέσως αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 95°C, οπότε και συνεχίζουμε την επώαση για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 91 μL RNase-free water και αναδεύουμε. Τελικώς τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο. Όσα δείγματα δεν αναλύθηκαν αμέσως με την PCR καταψύχθηκαν στους -20°C.

Στη συνέχεια προετοιμάζουμε το παρακάτω reaction mix όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3).

	Ποσότητα
2x RT2 Sybr green Master Mix	1350 μl
cDNA	102 μl
RNase free water	1248 μl
Total volume	2700 μl

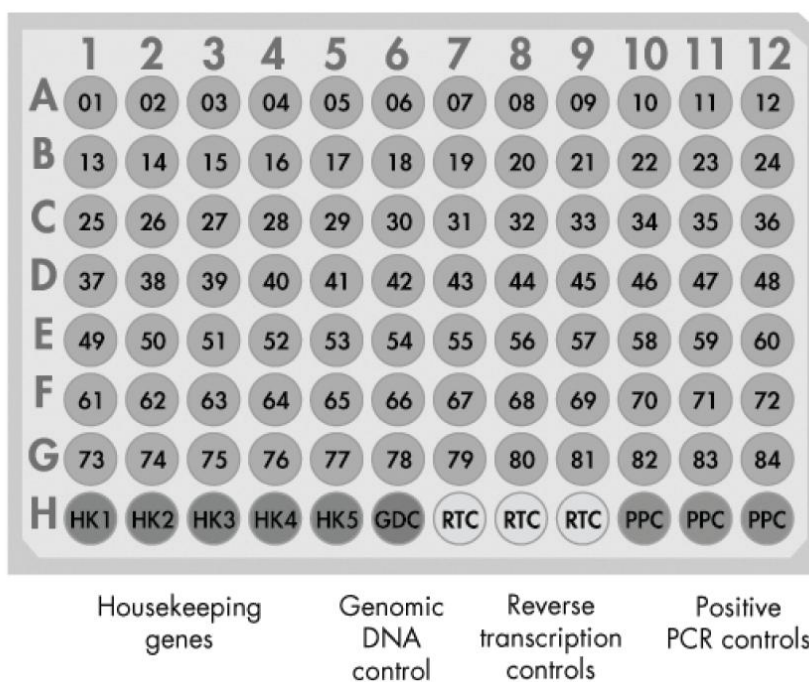
Πίνακας 3. Τα συστατικά για την παρασκευή του reaction mix της PCRarrays.

Από το mix λαμβάνονται 25 μL και τοποθετούνται σε κάθε ένα από τα wells του plate. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος που παρασκευάζουμε είναι μεγαλύτερος ώστε να υπάρχει περίσσεια από αυτό σε περίπτωση ατυχήματος κατά την πλήρωση των φρεατίων. Προσέχουμε να αποφύγουμε τον σχηματισμό φυσαλίδων και καλύπτουμε με διαφανές προστατευτικό φιλμ που διατίθεται μαζί με τη συσκευασία.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται στον αναλυτή Roche® LightCycler® 480, με τη χρήση του αντίστοιχου λογισμικού. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση της

πολυμεράσης (Hot Start DNA *Taq* Polymerase) με θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά. Ακολουθούν 45 διαδοχικοί κύκλοι όπου το cDNA αντιγράφεται με τη βοήθεια της πολυμεράσης και τα προϊόντα του ανιχνεύονται με τη βοήθεια της φθορίζουσας χρωστικής. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται επώαση στους 60°C για 1 λεπτό προκειμένου να αντιγραφεί το DNA και ακολουθεί η διάσπαση των σχηματιζόμενων αλυσίδων με θέρμανση στους 95°C, ώστε να προσδεθεί εκ νέου η πολυμεράση και να πραγματοποιηθεί νέος κύκλος αντιγραφής.

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των RNA μεταγράφων (RNA transcripts) στα δείγματα των ασθενών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RT² Profiler PCR arrays της SABiosciencesTM (Qiagen). Το ευρύ δυναμικό φάσμα της μεθόδου αυτής επιτρέπει τον προσδιορισμό γονιδίων που βρίσκονται ακόμα και σε ελάχιστες ποσότητες στο δείγμα, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων κάθε φορά. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το kit Human Angiogenesis PCR arrays με αριθμό καταλόγου PAHS-024H, το οποίο περιλαμβάνει μια πλατφόρμα ενός συνόλου 96 γονιδίων, με 84 γονίδια μελέτης και 12 γονίδια ελέγχου (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Οι θέσεις H1-H5 στην ειδική πλατφόρμα της PCR καταλαμβάνονται από ειδικά γονίδια-ρυθμιστές ('house-keeping genes') που χρησιμεύουν στον μηδενισμό των ρυθμίσεων του αναλυτή. Στη θέση H6 βρίσκεται ο παράγοντας ελέγχου του DNA γονιδιώματος (Genomic DNA Control; GDC), ο οποίος πραγματοποιεί μια διαδικασία ελέγχου υψηλής ευαισθησίας για τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων με μη μεταφρασμένο DNA γονιδίωμα. Οι θέσεις ελέγχου της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase Controls; RTC) αντιστοιχούν στις θέσεις H7-H9 της πλατφόρμας και πραγματοποιούν έλεγχο της αποδοτικότητας της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής με τη βοήθεια του RT² First Strand Kit δοκιμάζοντας την ορθή ή μη μεταγραφή στανταρισμένων αλληλουχιών RNA. Τέλος, οι θέσεις ελέγχου H9-H12 αντιστοιχούν στις θέσεις ελέγχου της ίδιας της διεργασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Positive PCR Controls; PPC), δοκιμάζοντας την δυνατότητα ανίχνευσης προσχηματισμένων τεχνητών αλληλουχιών DNA.

Αναλυτικά τα 84 γονίδια που ελέγχονται με τη μέθοδο αυτή (καθώς και οι αντίστοιχες θέσεις τους στο plate) φαίνονται στο Σχήμα 11 και τον Πίνακα 4.

Array layout

AKT1 A01	ANGPT1 A02	ANGPT2 A03	ANGPTL3 A04	ANGPTL4 A05	ANPEP A06	BAI1 A07	CCL11 A08	CCL2 A09	CDH5 A10	COL18A1 A11	COL4A3 A12
CXCL1 B01	CXCL10 B02	CXCL3 B03	CXCL5 B04	CXCL6 B05	CXCL9 B06	TYMP B07	S1PR1 B08	EFNA1 B09	EFNA3 B10	EFNB2 B11	EGF B12
ENG C01	EPHB4 C02	EREG C03	FGF1 C04	FGF2 C05	FGFR3 C06	FIGF C07	FLT1 C08	HAND2 C09	HGF C10	HIF1A C11	HPSE C12
ID1 D01	ID3 D02	IFNA1 D03	IFNB1 D04	IFNG D05	IGF1 D06	IL1B D07	IL6 D08	IL8 D09	ITGAV D10	ITGB3 D11	JAG1 D12
KDR E01	LAMA5 E02	LECT1 E03	LEP E04	MDK E05	MMP2 E06	MMP9 E07	NOTCH4 E08	NRP1 E09	NRP2 E10	PDGFA E11	PECAM1 E12
PF4 F01	PGF F02	PLAU F03	PLG F04	PLXDC1 F05	PROK2 F06	PTGS1 F07	SERPINF1 F08	SPHK1 F09	STAB1 F10	TEK F11	TGFA F12
TGFB1 G01	TGFB2 G02	TGFBR1 G03	THBS1 G04	THBS2 G05	TIMP1 G06	TIMP2 G07	TIMP3 G08	TNF G09	TNFAIP2 G10	VEGFA G11	VEGFC G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Σχήμα 11. Η διάταξη των γονιδίων πάνω στην ειδική πλατφόρμα με τα 96 wells (φρεάτια).

ΘΕΣΗ	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
A01	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A02	ANGPT1	Angiopoietin 1
A03	ANGPT2	Angiopoietin 2
A04	ANGPT3	Angiopoietin 3
A05	ANGPT4	Angiopoietin 4
A06	ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase
A07	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
A08	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
A09	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A10	CDH5	Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)
A11	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
A12	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
B01	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B02	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B03	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B04	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
B05	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)
B06	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
B07	TYMP	Thymidine phosphorylase
B08	S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1
B09	EFNA1	Ephrin-A1
B10	EFNA3	Ephrin-A3
B11	EFNB2	Ephrin-B2
B12	EGF	Epidermal growth factor
C01	ENG	Endoglin
C02	EPHB4	EPH receptor B4
C03	EREG	Epiregulin
C04	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
C05	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)

C06	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
C07	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
C08	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
C09	HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2
C10	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
C11	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
C12	HPSE	Heparanase
D01	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
D02	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
D03	IFNA1	Interferon, alpha 1
D04	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
D05	IFNG	Interferon, gamma
D06	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D07	IL1B	Interleukin 1, beta
D08	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D09	IL8	Interleukin 8
D10	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
D11	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
D12	JAG	Jagged 1
E01	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
E02	LAMA5	Laminin, alpha 5
E03	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1
E04	LEP	Leptin
E05	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
E06	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
E07	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E08	NOTCH4	Notch 4
E09	NRP1	Neuropilin 1
E10	NRP2	Neuropilin 2
E11	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
E12	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
F01	PF4	Platelet factor 4
F02	PGF	Placental growth factor
F03	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
F04	PLG	Plasminogen
F05	PLXDC1	Plexin domain containing 1
F06	PROK2	Prokineticin 2
F07	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F08	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
F09	SPHK1	Sphingosine kinase 1
F10	STAB1	Stabilin 1
F11	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
F12	TGFA	Transforming growth factor, alpha
G01	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
G02	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
G03	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
G04	THBS1	Thrombospondin 1
G05	THBS2	Thrombospondin 2
G06	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
G07	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
G08	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
G09	TNF	Tumor necrosis factor

G10	TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
G11	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
G12	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
H01	B2M	Beta-2-microglobulin
H02	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H03	RPL13A	Ribosomal protein L13a
H04	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	ACTB	Actin, beta
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Πίνακας 4. Τα γονίδια που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο RT-PCR. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι θέσεις στους στο plate, στη δεύτερη είναι τα σύμβολα για το κάθε γονίδιο, ενώ στην τελευταία στήλη η πλήρης ονομασία καθενός από αυτά.

Ο αναλυτής εξάγει τα αποτελέσματα από την διαδικασία της PCR υπό μορφή C_T (threshold cycle) αριθμητικών δεδομένων, όπου κάθε αριθμός αντιστοιχεί στον κύκλο της PCR που ανιχνεύθηκε έκφραση του γονιδίου (κατώφλι έκφρασης) στο συγκεκριμένο well του plate. Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αποθηκεύονται σε φύλλο εργασίας του προγράμματος Microsoft Excel[®]. Η σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων με βάση τα αποτελέσματα από τον αναλυτή έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $\Delta\Delta C_T$ (ΔC_T [ομάδα ελέγχου] – ΔC_T [ομάδα αναφοράς]), μέσω του ειδικού λογισμικού που διατίθεται στην ιστοσελίδα της εταιρίας Qiagen (RT² Profiler PCR Array Data Analysis Webportal; www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php).

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε εφαρμόζοντας μεμονωμένα t-test αλλά και κατά ζεύγη (non-paired and paired t-tests), με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism v6.00 για MacOS X (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Διαφορές με $p < 0,05$ ορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

Η ομαδοποίηση και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τον κάθε έναν από τους τρεις μελετώμενους αγγειογενετικούς παράγοντες (VEGF-A, IL-8, bFGF) έγινε με σκοπό να συγκριθούν οι αντίστοιχες τιμές τους πριν και μετά το χειρουργείο, τόσο μεταξύ ασθενών με κακοήγη νόσο του μαστού (αδenoκαρκίνωμα) και καλοήθεια (ινοαδένωμα).

Πιο συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν τα προεγχειρητικά επίπεδα του κάθε παράγοντα ξεχωριστά μεταξύ ασθενών με ινοαδένωμα και καρκίνο μαστού, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η επίδραση του μηχανισμού της αγγειογένεσης στους ασθενείς με κακοήθεια, συγκρίνοντάς τους με άλλους που πάσχουν από καλοήγη νόσο. Επιπλέον, στις ασθενείς με καρκίνο μαστού συγκρίθηκαν τα επίπεδα των αγγειογενετικών παραγόντων σε διαφορετικές στιγμές, πριν και μετά το χειρουργείο, με σκοπό την καταγραφή πιθανών μεταβολών ως αποτέλεσμα της χειρουργικής πράξης καθ' αυτής. Με αυτόν τον τρόπο προσφέρεται μια εικόνα για την περιεγχειρητική κινητική του VEGF-A, της IL-8 και του bFGF.

VEGF-A

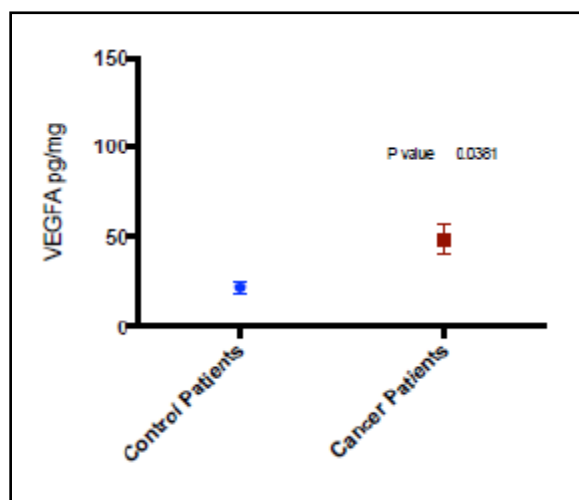
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον VEGF-A εμφανίζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5 σε μονάδες pg/mL.

VEGF-A	PRO	D3	D7
Control-1	13,98258102	32,07856312	
Control-2	36,90534119	60,40464785	
Control-3	18,76554267	22,78665418	
Control-4	10,09101872	32,88172536	
Control-5	19,11762009	20,11092735	
Control-6	28,00918761	40,99018627	
Ca-1	45,06361762	65,06361762	52,91253365
Ca-2	64,66718841	114,7764694	71,20756019
Ca-3	20,09370304	107,8622471	22,6762802
Ca-4	18,07288579	37,47151289	25,06363176
Ca-5	108,5453374	84,49523634	285,6938486
Ca-6	59,71091487	17,72179284	16,45766266
Ca-7	62,76280876	99,10382964	70,88763892
Ca-8	30,12746389	107,1198106	40,66538109
Ca-9	48,00389217	78,99017461	60,88917462
Ca-10	24,71809812	30,87738291	31,10017482

Πίνακας 5. Αναλυτική παράθεση των επιπέδων VEGF-A πλάσματος για όλους τους ασθενείς. PRO: προεγχειρητικά επίπεδα, D3: επίπεδα κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: επίπεδα κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα. Control: ασθενής με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου), Ca: ασθενής με αδenoκαρκίνωμα (Ομάδα Μελέτης)

Σύγκριση επιπέδων VEGF-A στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) ως προς ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο (PRO, baseline values)

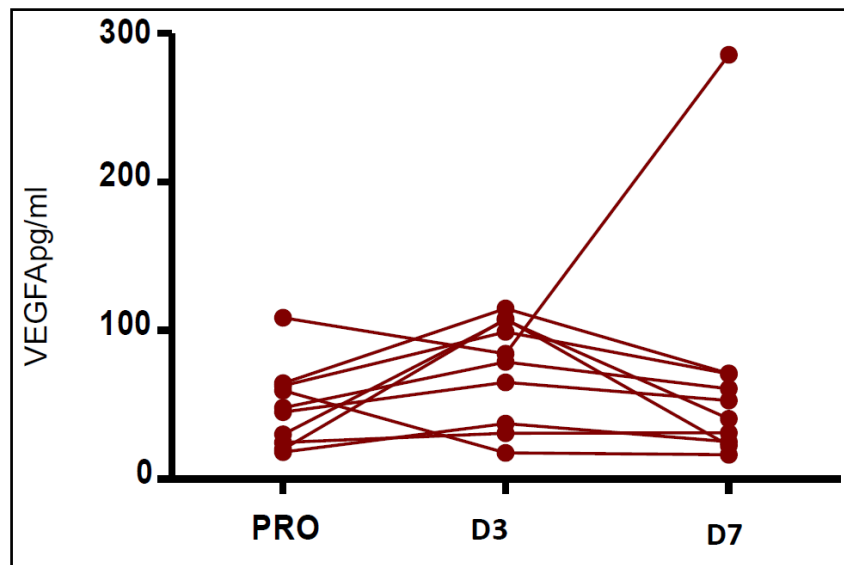
Η Ομάδα Ελέγχου των ασθενών που διαγνώστηκαν με ινοαδένωμα μαστού εμφάνισε τιμές VEGF-A πλάσματος μεταξύ 10 και 36,9 pg/mL, με μέση τιμή 21,145 pg/ml. Αντίθετα, οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) είχαν τιμές μεταξύ 18 και 108,54 pg/mL, με μέση τιμή τα 48,17 pg/mL (Σχήμα 12). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,038$).



Σχήμα 12. Η μέση τιμή των μετρήσεων για τους ασθενείς με ινοαδένωμα μαστού (Control Patients) ήταν σημαντικά χαμηλότερη απ'ότι για τους ασθενείς με καρκίνο μαστού (Cancer Patients) πριν το χειρουργείο.

Σύγκριση επιπέδων VEGF-A στο πλάσμα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3 και D7)

Μεταξύ των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του κυκλοφορούντος στο πλάσμα VEGF-A πριν και μετά τη διενέργεια της μαστεκτομής. Αναλυτικότερα, προεγχειρητικά καταγράφηκαν επίπεδα VEGF-A μεταξύ 18 και 108,54 pg/mL, (μέση τιμή: 48,17 pg/mL), ενώ την 3^η μετεγχειρητική ημέρα υπήρξε μια σημαντική αύξηση, η οποία ακολουθήθηκε από πτώση των επιπέδων του VEGF-A κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, με τις μετρούμενες τιμές όμως να παραμένουν επίσης αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές. Πιο συγκεκριμένα, την 3^η μετεγχειρητική ημέρα καταγράφηκαν τιμές με μια διακύμανση μεταξύ 17,1 και 114,7 pg/mL, με μέσο όρο τα 74,34 pg/mL. Την 7^η μέρα μετά το χειρουργείο καταγράφηκαν επίπεδα μεταξύ 16,45 και 285,7 pg/mL, με μέση τιμή της τάξης των 67,37pg/mL. Η κινητική των επιπέδων του VEGF-A κατά τις διάφορες χρονικές στιγμές πριν και μετά την επέμβαση αναπαριστάται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13. Η κινητική των επιπέδων του VEGF-A πριν (PRO) και μετά το χειρουργείο (D3 και D7) για όλους τους ασθενείς της Ομάδας Μελέτης (αδenoκαρκίνωμα μαστού). Στους περισσότερους παρατηρείται μια αύξηση την 3^η μετεγχειρητική ημέρα που ακολουθείται από πτώση κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, σε επίπεδα όμως αυξημένα σε σχέση με τα προεγχειρητικά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ακραία τιμή που παρατηρείται την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (285,7 pg/mL) αντιστοιχεί στην ασθενή με τον πιο προχωρημένο τοποπεριοχικά όγκο κατά την ταξινόμηση TNM, η οποία ταξινομήθηκε ως T₂N₂ μετά την επέμβαση και με βάση τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης. Η ίδια ασθενής, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 13 άλλωστε, είχε αυξημένα επίπεδα VEGF-A και προεγχειρητικά (108,54 pg/mL). Τρία χρόνια μετά την αρχική επέμβαση (ευρεία τοπική εκτομή και σύστοιχος μασχαλιαίος λεμφαδενικός καθαρισμός) παρουσιάστηκε τοπική υποτροπή στην συγκεκριμένη ασθενή με αποτέλεσμα να υποβληθεί σε επανεπέμβαση.

Σύγκριση επιπέδων VEGF-A στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3)

Οι ασθενείς με καλοήγη νόσο του μαστού την 3^η μετεγχειρητική ημέρα εμφάνισαν επίπεδα VEGF-A μεταξύ 20,11 και 60,40 pg/mL. Η μεταβολή των τιμών αυτών σε σχέση με τα προ του χειρουργείου επίπεδα ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,008$).

IL-8

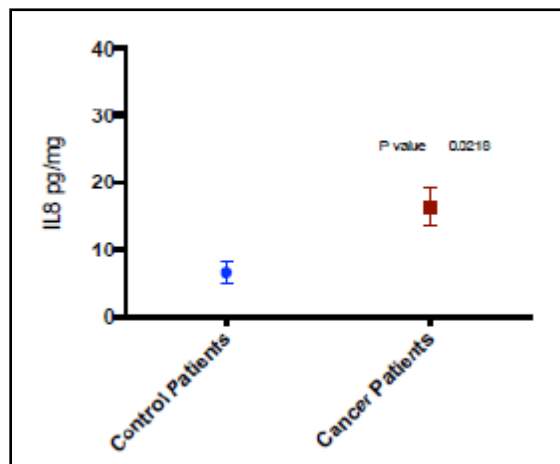
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον VEGF-A εμφανίζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6 σε μονάδες pg/mL.

IL-8	PRO	D3	D7
Control-1	7,99582723	1,092249387	
Control-2	12,30378374	22,22616086	
Control-3	2,00918732	6,99187263	
Control-4	1,88910038	2,99019981	
Control-5	6,99018293	6,09018872	
Control-6	8,01556734	4,99827364	
Ca-1	2,591043492	4,772683109	6,98298286
Ca-2	15,10576683	29,17198942	23,29668343
Ca-3	24,59671784	11,6477555	14,51411042
Ca-4	12,71521227	30,02341848	1,625757664
Ca-5	17,67521828	51,41090683	10,50821842
Ca-6	33,71160644	1,879710929	2,081460192
Ca-7	9,89765234	15,00917283	5,776172839
Ca-8	15,99018627	32,779831	7,99018394
Ca-9	10,09819102	12,99817134	3,99102834
Ca-10	21,00918017	19,11098293	2,99018356

Πίνακας 6. Αναλυτική παράθεση των επιπέδων IL-8 πλάσματος για όλους τους ασθενείς. PRO: προεγχειρητικά επίπεδα, D3: επίπεδα κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: επίπεδα κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, Control: ασθενής με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου), Ca: ασθενής με αδενοκαρκίνωμα (Ομάδα Μελέτης)

Σύγκριση επιπέδων IL-8 στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) ως προς ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο (PRO, baseline values)

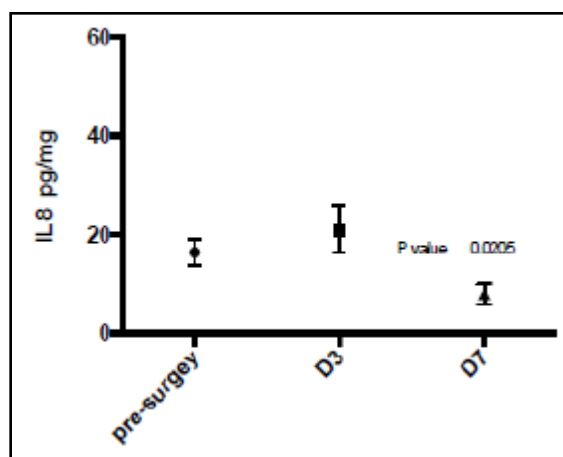
Η Ομάδα Ελέγχου των ασθενών που διαγνώστηκαν με ινοαδένωμα μαστού εμφάνισε τιμές IL-8 πλάσματος μεταξύ 1,89 και 12,3 pg/ml, με μέση τιμή 6,53 pg/ml. Αντίθετα, οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) είχαν τιμές μεταξύ 2,59 και 33,7 pg/mL, με μέση τιμή τα 16,34 pg/mL (Σχήμα 14). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,021$).



Σχήμα 14. Σύγκριση προεγχειρητικών επιπέδων IL-8 μεταξύ ασθενών με καλοήγη νόσο (Control Patients) και ασθενών με καρκίνο μαστού (Cancer Patients). Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p = 0,0216$).

Σύγκριση επιπέδων IL-8 στο πλάσμα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3)

Μεταξύ των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του κυκλοφορούντος στο πλάσμα IL-8 πριν και μετά τη διενέργεια της μαστεκτομής. Αναλυτικότερα, τα προεγχειρητικά επίπεδα της IL-8 κυμάνθηκαν μεταξύ 1,89 και 12,3 pg/mL (μέση τιμή: 6,53 pg/mL). Την 3^η μετεγχειρητική ημέρα υπήρξε μια μικρή αύξηση, η οποία ακολουθήθηκε από σημαντική πτώση των επιπέδων της IL-8 κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, με τις μετρούμενες τιμές μάλιστα να βρίσκονται σε επίπεδο σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τις αντίστοιχες προεγχειρητικές ($p=0,205$). Πιο συγκεκριμένα, την 3^η μετεγχειρητική ημέρα καταγράφηκαν τιμές με διακύμανση μεταξύ 1,88 και 51,4 pg/mL και μέσο όρο 20,88 pg/mL. Την 7^η μέρα μετά το χειρουργείο καταγράφηκαν επίπεδα μεταξύ 1,62 και 23,3 pg/mL, με μέση τιμή της τάξης των 7,97 pg/mL (Σχήμα 15).



Σχήμα 15. Περιεγχειρητική κινητική της IL-8 σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Η αρχική μικρή αύξηση των επιπέδων της IL-8 στο πλάσμα κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα σε σχέση με τα προ χειρουργείου επίπεδα ακολουθείται από σημαντική πτώση την 7^η μετεγχειρητική ημέρα.

Σύγκριση επιπέδων IL-8 στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3)

Τα μετεγχειρητικά επίπεδα κυμάνθηκαν μεταξύ 1,09 και 22,22 pg/mL, ενώ 5 από τις 6 ασθενείς εμφάνισαν επίπεδα κάτω από το όριο ευαισθησίας της μεθόδου. Η μόνη ασθενής που είχε τιμές αναφοράς μεγαλύτερες από το όριο ευαισθησίας της ELISA συνέχισε να έχει αυξημένα επίπεδα και μετά το χειρουργείο. Συνολικά οι

περιεγχειρητικές μεταβολές στην Ομάδα Ελέγχου ήταν στατιστικά μη σημαντικές ($p=0,368$).

bFGF

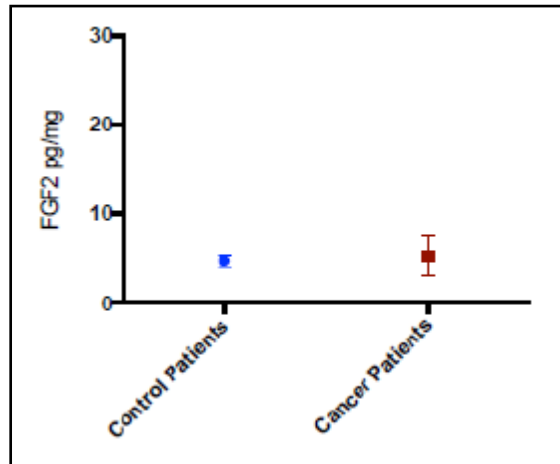
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον bFGF εμφανίζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7 σε μονάδες pg/mL.

bFGF	PRO	D3	D7
Control-1	5,217198646	7,450938814	
Control-2	6,127622076	10,10437317	
Control-3	3,87167872	5,00192783	
Control-4	4,89098711	4,880971892	
Control-5	1,9081178	3,88017344	
Control-6	6,48900101	9,11093855	
Ca-1	1,264479915	1,1686288	9,706270091
Ca-2	1,11628978	5,331135162	13,8588257
Ca-3	3,131229671	14,7831207	11,155380188
Ca-4	1,250450046	6,132714446	10,73789514
Ca-5	4,95763367	9,263407009	2,203842229
Ca-6	23,82756318	19,96951448	30,92389403
Ca-7	3,77001628	4,00193024	5,01934457
Ca-8	7,00182934	5,59092384	10,11093748
Ca-9	1,229348493	4,11092839	4,90977871
Ca-10	4,88973309	6,99098173	8,88937847

Πίνακας 7. Αναλυτική παράθεση των επιπέδων bFGF πλάσματος για όλους τους ασθενείς. PRO: προεγχειρητικά επίπεδα, D3: επίπεδα κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα, D7: επίπεδα κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, Control: ασθενής με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου), Ca: ασθενής με αδενοκαρκίνωμα (Ομάδα Μελέτης).

Σύγκριση επιπέδων bFGF στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) ως προς ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο (PRO, baseline values)

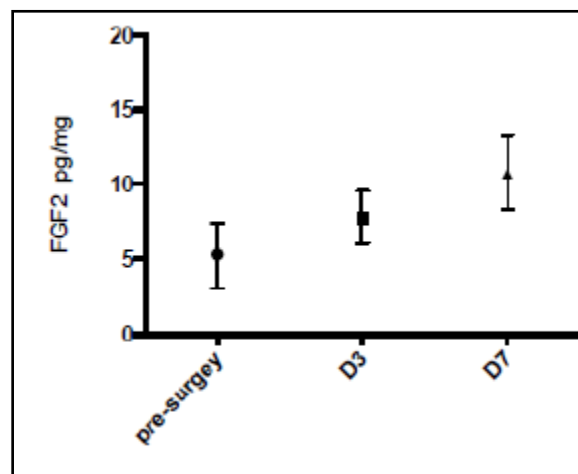
Η Ομάδα Ελέγχου των ασθενών που διαγνώστηκαν με ινοαδένωμα μαστού εμφάνισε τιμές bFGF πλάσματος μεταξύ 1,9 και 6,49 pg/ml, με μέση τιμή 4,75 pg/ml. Αντίθετα, οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) είχαν τιμές μεταξύ 1,11 και 23,82 pg/mL, με μέση τιμή 5,24 pg/mL (Σχήμα 16). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,86$). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις ασθενών οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ευαισθησίας των 3 pg/mL για τη μέθοδο ELISA.



Σχήμα 16. Η σύγκριση των προεγχειρητικών επιπέδων του bFGF στο πλάσμα ασθενών με καλοήγη και κακοήγη νόσο δεν έδειξε σημαντικές διαφορές.

Σύγκριση επιπέδων bFGF στο πλάσμα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3)

Μεταξύ των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του κυκλοφορούντος στο πλάσμα του bFGF πριν και μετά τη διενέργεια της μαστεκτομής. Αναλυτικότερα, τα προεγχειρητικά επίπεδα του bFGF κυμάνθηκαν μεταξύ 1,11 και 23,8 pg/mL, (μέση τιμή: 5,24 pg/mL). Την 3^η μετεγχειρητική ημέρα καταγράφηκαν τιμές με διακύμανση μεταξύ 1,16 και 19,97 pg/mL, με μέσο όρο 7,73 pg/mL. Την 7^η μέρα μετά το χειρουργείο καταγράφηκαν επίπεδα μεταξύ 2,2 και 30,92 pg/mL, με μέση τιμή της τάξης των 10,7 pg/mL (Σχήμα 17). Παρατηρείται, δηλαδή, μια συνεχής αύξηση των επιπέδων του bFGF μετεγχειρητικά, χωρίς όμως η μεταβολή αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,097$ για τη σύγκριση PRO-D3 και $p=0,071$ για τη σύγκριση D3-D7).



Σχήμα 17. Περιεγχειρητική κινητική του bFGF σε ασθενείς πριν και μετά την μαστεκτομή. Παρατηρείται μια συνεχής αύξηση των επιπέδων την 3^η και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, χωρίς όμως οι μεταβολές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές.

Σύγκριση επιπέδων bFGF στο πλάσμα ασθενών με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) πριν και μετά το χειρουργείο (PRO έναντι D3)

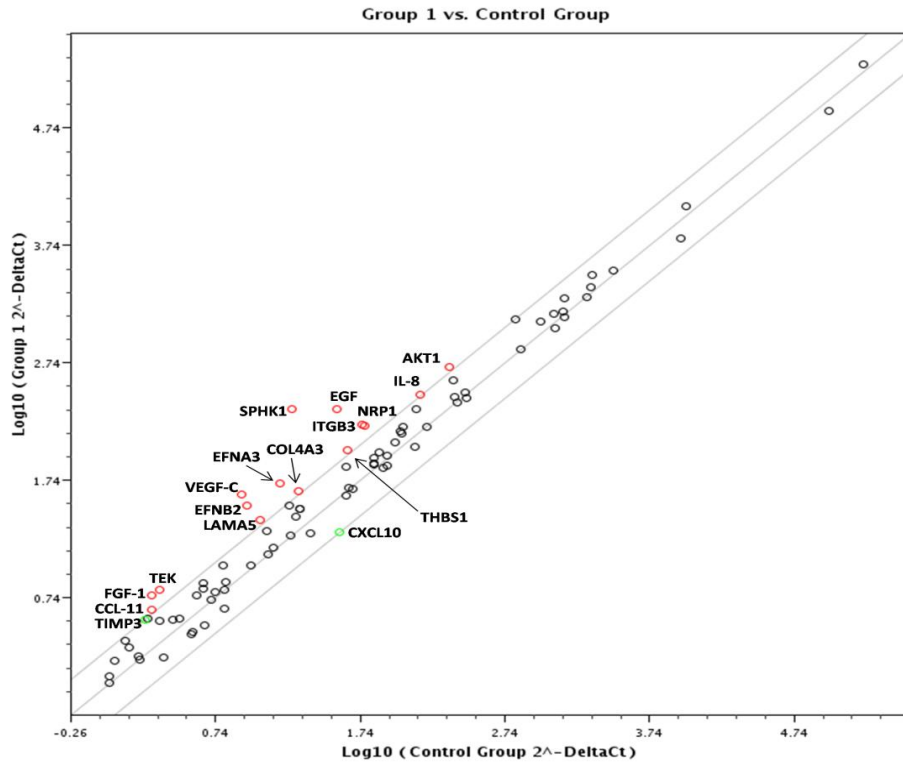
Την 3^η μετεγχειρητική ημέρα οι γυναίκες που υποβλήθηκαν σε αφαίρεση του ινοαδενώματος παρουσίασαν τιμές bFGF που ήταν όλες πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και που κυμάνθηκαν μεταξύ 3,88 και 10,10 pg/mL. Συγκρινόμενες με τις τιμές αναφοράς (baseline values) παρατηρήθηκε αύξηση που ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,007$).

ΜΕΘΟΔΟΣ PCR arrays

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγινε ανιχνεύοντας μέσω Real Time PCR arrays τα κυκλοφορούντα στο περιφερικό αίμα RNA μετάγραφα (mRNA gene transcripts) 84 γονιδίων που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται στενά με την διαδικασία της αγγειογένεσης. Η σχετική έκφραση των γονιδίων μεταξύ ασθενών με καλοήγη νόσο του μαστού (ινοαδένωμα) και αυτών με κακοήθεια (αδενοκαρκίνωμα), αλλά και ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο μαστού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές πριν και μετά το χειρουργείο, αποτυπώνει τις αντίστοιχες μεταβολές σε μόρια-κλειδιά που εμπλέκονται στον αγγειογενετικό μηχανισμό. Συγκρίνοντας τις διαφορές ανάμεσα στις ομάδες που μελετώνται μπορούν να προκύψουν πολύτιμα συμπεράσματα σχετικά με το αγγειογενετικό προφίλ των ασθενών, καθώς και τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να έχει η χειρουργική επέμβαση στην προαγωγή της αγγειογένεσης.

Σύγκριση μεταξύ ασθενών με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου) και καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) προεγχειρητικά (PRO)

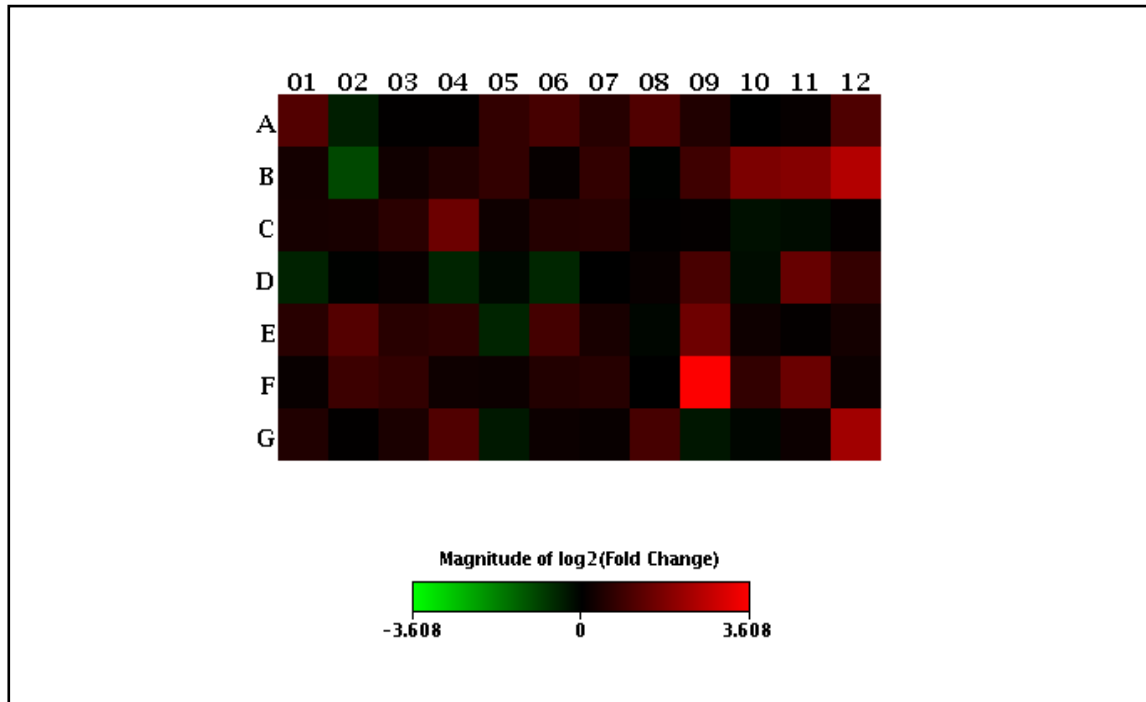
Τα αποτελέσματα της συγκριτικής έκφρασης των αγγειογενετικών γονιδίων μεταξύ της Ομάδας Ελέγχου και της Ομάδας Μελέτης προεγχειρητικά φαίνονται σχηματικά στο διάγραμμα διασποράς (Scatter Plot) της *Εικόνας 3*. Αναλυτικά τα γονίδια που υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται παρατίθενται στον *Πίνακα 8*.



Εικόνα 3. Scatter Plot (διάγραμμα διασποράς) όλων των ασθενών προεγχειρητικά. Στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύονται οι ασθενείς της Ομάδας Ελέγχου (ινοαδένωμα) και στον κάθετο αυτοί της Ομάδας Μελέτης (καρκίνος μαστού). Οι κύκλοι που βρίσκονται πάνω από τη διαγώνιο που αντιπροσωπεύει το 0 (αντιστοιχεί στα house-keeping genes της PCR arrays) παριστάνουν τα γονίδια που υπερεκφράζονται, ενώ οι κύκλοι κάτω από τη διαγώνιο αυτά που υποεκφράζονται. Οι εξωτερικές διαγώνιες γραμμές που πλαισιώνουν την γραμμή αναφοράς για το 0, οριοθετούν τις τιμές που αντιστοιχούν σε διπλάσια έκφραση (2-fold regulation). Επομένως, όσα γονίδια (κύκλοι) βρίσκονται έξω από τις γραμμές αυτές εμφανίζουν τουλάχιστον διπλάσια έκφραση (αύξηση ή μείωση) στη μία ομάδα σε σχέση με την άλλη. Στη δεξιά πλευρά του σχήματος εμφανίζονται τα γονίδια που μεταβάλλονται (με κόκκινο όσα υπερεκφράζονται, με πράσινο όσα υποεκφράζονται).

ΣΥΜΒΟΛΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ (Συντελεστής)
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
SPHK1	Sphingosine kinase 1 (Κινάση σφιγγοσίνης 1)	12,196
EGF	Epidermal growth factor (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)	5,8563
VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor-C (αυξητικός παράγοντας C του αγγειακού ενδοθηίου)	4,9417
NRP1	Neuropilin 1 (Νευροπιλίνη)	2,9214
FGF1	Fibroblast growth factor (Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών)	2,8712
LAMA5	Laminin, alpha 5 (Λαμινίνη)	2,2842
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) (Κολλαγόνο τύπου 4)	2,1485
IL8	Interleukin-8 (Ιντερλευκίνη-8)	2,035
EFNB2	Ephrin-B2 (Εφρίνη B2)	3,6893
EFNA3	Ephrin-A3 (Εφρίνη A3)	3,3909
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (Κινάση τυροσίνης TEK)	2,835
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) (Ιντεγκρίνη B3)	2,7195
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Ακτίνη 1)	2,2372
THBS1	Thrombospondin 1 (Θρομβοσπονδίνη 1)	2,2064
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11 (Χυμοκίνη CCL11)	2,1785
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (αναστολέας ιστικής μεταλλοπρωτεϊνάσης 3)	2
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Χυμοκίνη CXCL10)	-2,0139

Πίνακας 8. Αναλυτικά τα γονίδια που υπερεκφράζονται και υποεκφράζονται στις ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο μαστού σε σχέση με τις ασθενείς που διαγνώστηκαν με ινοαδένωμα. Η δεξιά στήλη δείχνει το παράγοντα μεταβολής (π.χ. η κινάση σφιγγοσίνης είναι υπερεκφρασμένη κατά 12 και πλέον φορές στην Ομάδα Μελέτης ως προς την Ομάδα Ελέγχου)



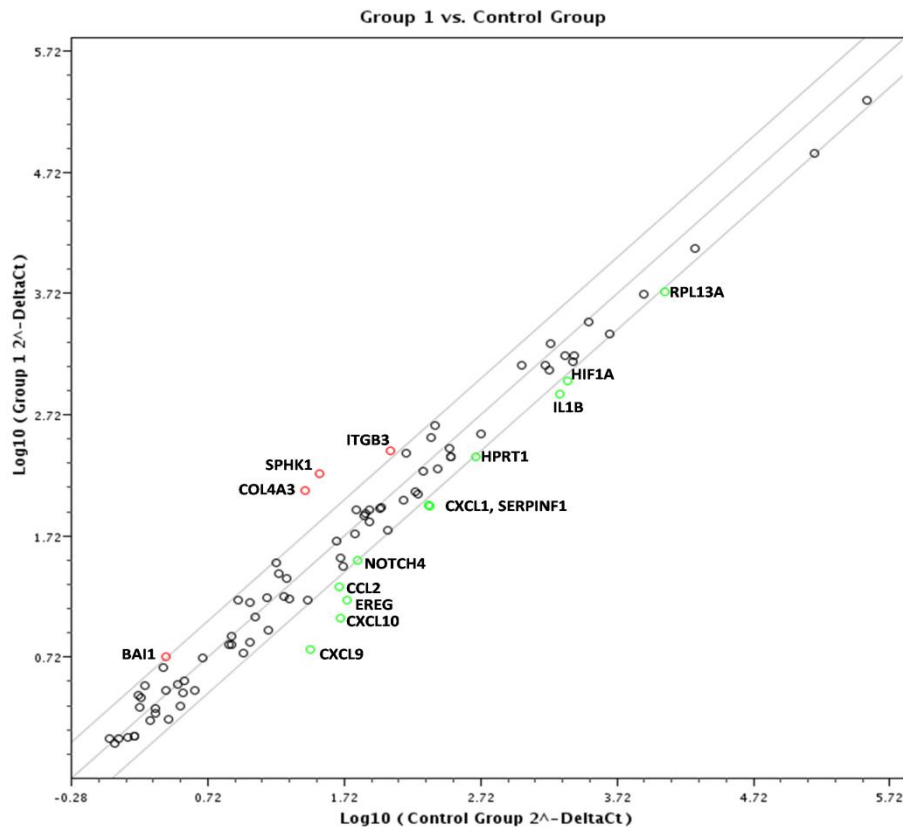
Εικόνα 4. Διάγραμμα θερμότητας (heat map) όπου απεικονίζεται η διαφορά στην σχετική έκφραση του συνόλου των μελετούμενων γονιδίων πριν το χειρουργείο. Τα γονίδια με το πράσινο χρώμα υποεκφράζονται σε σχέση με αυτά που αναπαριστώνται με το κόκκινο χρώμα και τα οποία υπερεκφράζονται. Η ένταση της χρωματικής κλίμακας μάλιστα αντιστοιχεί στον βαθμό που το κάθε γονίδιο υποεκφράζεται ή υπερεκφράζεται.

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	AKT1 1.79	ANGPT1 -1.59	ANGPT2 1.02	ANGPTL3 1.03	ANPTL4 1.64	ANPEP 1.97	BAI1 1.45	CCL11 2.18	CCL2 1.38	CDH5 -1.00	COL18A1 1.06	COL4A3 2.15
B	CXCL1 1.22	CXCL10 -2.01	CXCL3 1.17	CXCL5 1.38	CXCL6 1.64	CXCL9 1.06	TYMP 1.64	S1PR1 -1.01	EFNA1 1.85	EFNA3 3.39	EFNB2 3.69	EGF 5.86
C	ENG 1.23	EPHB4 1.27	EREG 1.50	FGF1 2.87	FGF2 1.14	FGFR3 1.43	FIGF 1.46	FLT1 1.02	HAND2 1.03	HGF -1.17	HIF1A -1.12	HPSE 1.05
D	ID1 -1.39	ID3 -1.02	IFNA1 1.08	IFNB1 -1.42	IFNG -1.08	IGF1 -1.45	IL1B 1.01	IL6 1.08	IL8 2.03	ITGAV -1.13	ITGB3 2.72	JAG1 1.65
E	KDR 1.48	LAMA5 2.28	LECT1 1.48	LEP 1.56	MDK -1.42	MMP2 1.96	MMP9 1.27	NOTCH4 -1.06	NRP1 2.92	NRP2 1.14	PDGFA 1.03	PECAM1 1.22
F	PF4 1.08	PGF 1.82	PLAU 1.63	PLG 1.16	PLXDC1 1.11	PROK2 1.41	PTGS1 1.44	SERPINF1 -1.00	SPHK1 12.20	STAB1 1.62	TEK 2.83	TGFA 1.13
G	TGFB1 1.38	TGFB2 1.01	TGFBR1 1.29	THBS1 2.21	THBS2 -1.26	TIMP1 1.12	TIMP2 1.08	TIMP3 2.00	TNF -1.24	TNFAIP2 -1.05	VEGFA 1.13	VEGFC 4.94

Πίνακας 9. Αναλυτική παράθεση των γονιδίων με τις αντίστοιχες τιμές θέσεις τους πάνω στην πλατφόρμα της PCR arrays. Απεικονίζονται και οι μεταβολές για το κάθε γονίδιο.

Σύγκριση μεταξύ ασθενών με καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο και κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα (PRO έναντι D3)

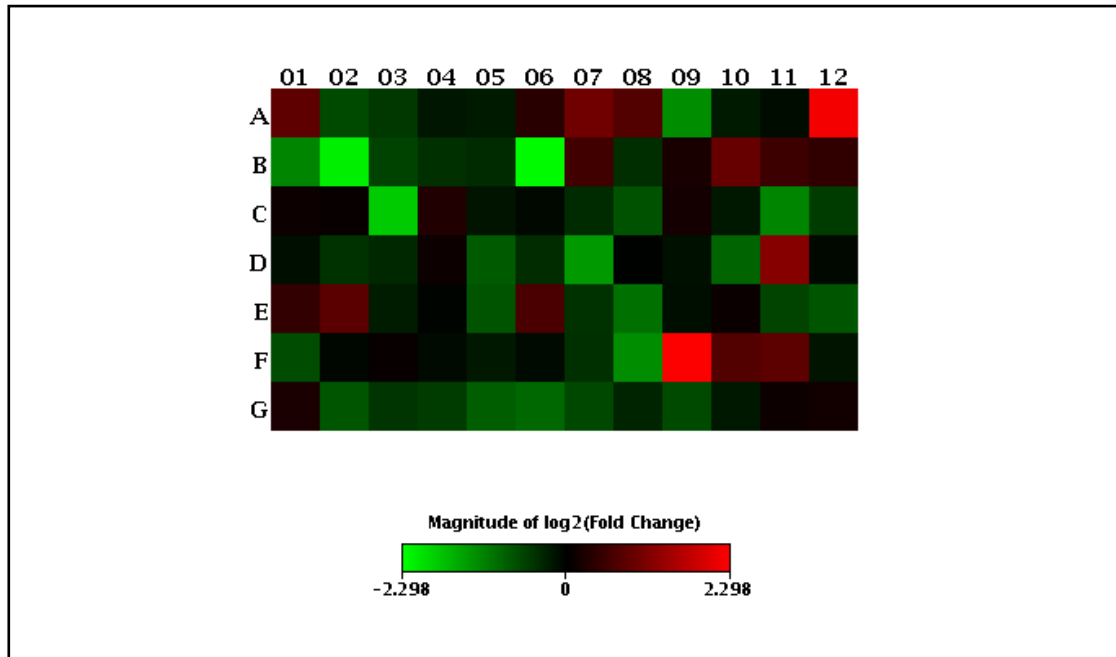
Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ασθενών με καρκίνο μαστού πριν και μετά το χειρουργείο δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης των αγγειογενετικών προφίλ τους σε διαφορετικές χρονικές στιγμές με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για την επίδραση της χειρουργικής πράξης στο μηχανισμό της αγγειογένεσης. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στο Scatter Plot της *Εικόνας 5*. Ο *Πίνακας 10* δείχνει τα γονίδια που υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται.



Εικόνα 5. Συγκριτική γονιδιακή έκφραση των ασθενών με καρκίνο μαστού πριν το χειρουργείο και κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα. Στη δεξιά στήλη φαίνονται οι σχετικές μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση (με κόκκινο όσα υπερεκφράζονται, με πράσινο όσα υποεκφράζονται).

ΣΥΜΒΟΛΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ (ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ)
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
SPHK1	Sphingosine kinase 1 (Κινάση σφινγοσίνης 1)	4,9189
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) (κολλαγόνο τύπου 4)	4,6536
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (Ειδικός για τον εγκέφαλο αναστολέας αγγειογένεσης 1)	2,0023
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) (Ιντεγκρίνη Β3)	2,3349
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
EREG	Epiregulin (Επιρεγουλίνη)	-3,5595
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1 (αναστολέας πεπτιδάσης σερπίνης 1)	-2,4256
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (Χυμοκίνη CXCL9)	-4,8568
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Χυμοκίνη CXCL10)	-4,4898
IL1B	Interleukin 1, beta (Ιντερλευκίνη 1B)	-2,6147
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (Χυμοκίνη CCL2)	-2,4425
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (Χυμοκίνη CXCL1)	-2,3161
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop- helix transcription factor) (Παράγοντας επαγόμενος από υποξία 1)	-2,3001
NOTCH4	Notch 4	-2,0023

Πίνακας 10. Αναλυτικά τα γονίδια και οι σχετικές μεταβολές τους σε ασθενείς με καρκίνο μαστού πριν το χειρουργείο και την 3^η μετεγχειρητική ημέρα.



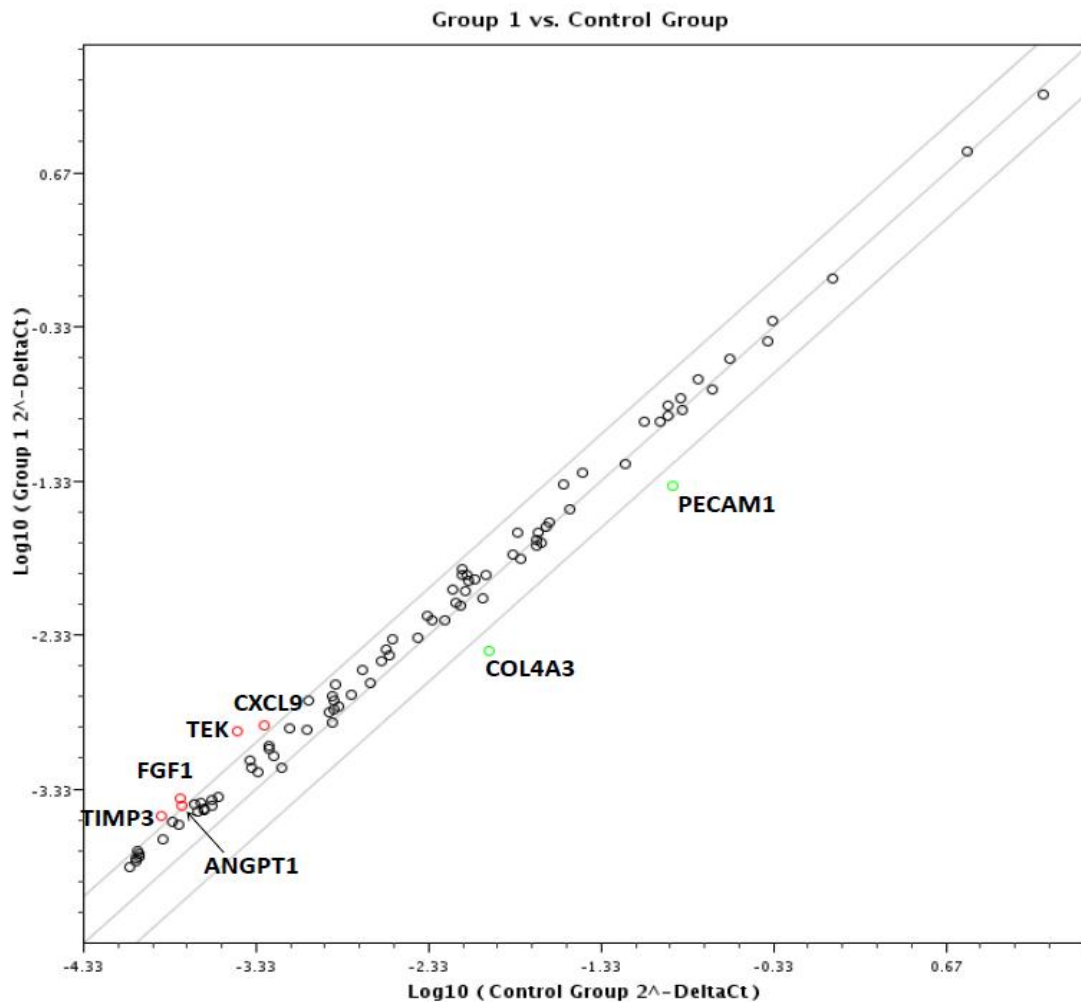
Εικόνα 6. Διάγραμμα θερμότητας (heat map) όπου απεικονίζεται η διαφορά στην σχετική έκφραση του συνόλου των μελετούμενων γονιδίων πριν το χειρουργείο. Τα γονίδια με το πράσινο χρώμα υποεκφράζονται σε σχέση με αυτά που αναπαριστώνται με το κόκκινο χρώμα και τα οποία υπερεκφράζονται. Η ένταση της χρωματικής κλίμακας μάλιστα αντιστοιχεί στον βαθμό που το κάθε γονίδιο υποεκφράζεται ή υπερεκφράζεται.

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	AKT1 1.79	ANGPT1 -1.59	ANGPT2 -1.43	ANGPTL3 -1.15	ANPTL4 -1.18	ANPEP 1.29	BAI1 2.00	CCL11 1.67	CCL2 -2.44	CDH5 -1.18	COL18A1 -1.07	COL4A3 4.65
B	CXCL1 -2.32	CXCL10 -4.49	CXCL3 -1.50	CXCL5 -1.35	CXCL6 -1.30	CXCL9 -4.86	TYMP 1.49	S1PR1 -1.34	EFNA1 1.16	EFNA3 1.90	EFNB2 1.46	EGF 1.36
C	ENG 1.07	EPHB4 1.05	EREG -3.56	FGF1 1.22	FGF2 -1.14	FGFR3 -1.05	FIGF -1.30	FLT1 -1.68	HAND2 1.13	HGF -1.17	HIF1A -2.30	HPSE -1.45
D	ID1 -1.09	ID3 -1.37	IFNA1 -1.29	IFNB1 1.08	IFNG -1.75	IGF1 -1.31	IL1B -2.61	IL6 -1.01	IL8 -1.11	ITGAV -1.88	ITGB3 2.33	JAG1 -1.05
E	KDR 1.36	LAMA5 1.76	LECT1 -1.20	LEP -1.02	MDK -1.68	MMP2 1.60	MMP9 -1.37	NOTCH4 -2.00	NRP1 -1.09	NRP2 1.07	PDGFA -1.53	PECAM1 -1.72
F	PF4 -1.61	PGF -1.04	PLAU 1.05	PLG -1.06	PLXDC1 -1.16	PROK2 -1.06	PTGS1 -1.35	SERPINF1 -2.43	SPHK1 4.92	STAB1 1.68	TEK 1.77	TGFA -1.13
G	TGFB1 1.18	TGFB2 -1.71	TGFBRI -1.38	THBS1 -1.46	THBS2 -1.80	TIMP1 -1.91	TIMP2 -1.57	TIMP3 -1.26	TNF -1.58	TNFAIP2 -1.17	VEGFA 1.07	VEGFC 1.12

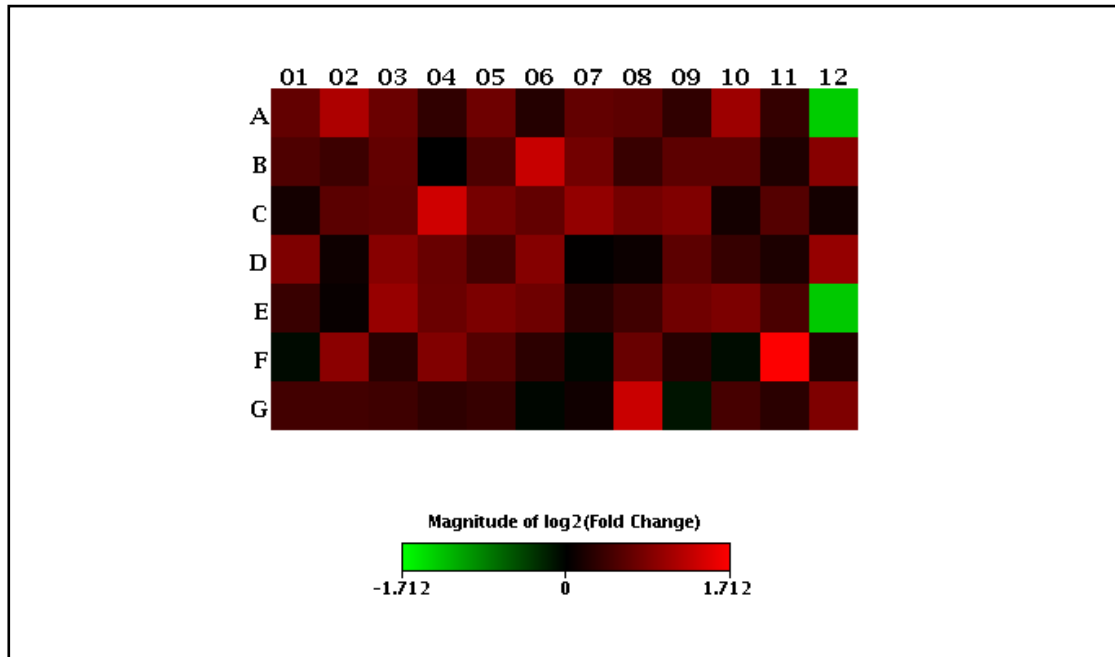
Πίνακας 11. Αναλυτική παράθεση των γονιδίων με τις αντίστοιχες τιμές θέσεις τους πάνω στην πλατφόρμα της PCR arrays. Απεικονίζονται και οι μεταβολές για το κάθε γονίδιο.

Σύγκριση ασθενών με καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας (D3 έναντι D7)

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ασθενών με καρκίνο μαστού όχι μόνο άμεσα μετεγχειρητικά, αλλά και απώτερα κατά την 7^η ημέρα μετά την επέμβαση, προσφέρει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση τη σχετιζόμενη με την αγγειογένεση και επιτρέπει την εξαγωγή πληρέστερων συμπερασμάτων ως προς την κινητική των αγγειορρυθμιστικών παραγόντων περιεγχειρητικά. Σχηματική παράσταση της συγκριτικής γονιδιακής έκφρασης για τις δύο αυτές ομάδες παρατίθεται στην *Εικόνα 7* και 8, ενώ οι μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων φαίνονται στο *Πίνακα 12*.



Εικόνα 7. Συγκριτική γονιδιακή έκφραση ασθενών με καρκίνο μαστού μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας.



Εικόνα 8. Διάγραμμα θερμότητας (heat map) όπου απεικονίζεται η διαφορά στην σχετική έκφραση του συνόλου των μελετούμενων γονιδίων πριν το χειρουργείο. Τα γονίδια με το πράσινο χρώμα υποεκφράζονται σε σχέση με αυτά που αναπαριστώνται με το κόκκινο χρώμα και τα οποία υπερεκφράζονται. Η ένταση της χρωματικής κλίμακας μάλιστα αντιστοιχεί στον βαθμό που το κάθε γονίδιο υποεκφράζεται ή υπερεκφράζεται.

ΣΥΜΒΟΛΟ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ (ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ)
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
ANGPT1	ANGPT1 angiopoietin 1 (Αγγειοποιητίνη 1)	2,0724
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (Χυμοκίνη CXCL9)	2,3424
FGF1	Fibroblast growth factor (Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών)	2,4166
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (Κινάση τυροσίνης TEK)	3,0168
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (αναστολέας ιστικής μεταλλοπρωτεΐνωσης 3)	2,3614
ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ		
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) (κολλαγόνο τύπου 4)	-2,8356
PECAM1	PECAM1 platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (Παράγοντας προσκόλλησης αιμοπεταλίων/ενδοθηλίου 1)	-2,7709

Πίνακας 12. Αναλυτικά τα γονίδια που η έκφρασή τους μεταβάλλεται σε ασθενείς με καρκίνο μαστού μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} ημέρας μετά το χειρουργείο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εισαγωγή

Παρ' όλο που τα τελευταία τουλάχιστον τριάντα χρόνια παρατηρείται έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με την αγγειογένεση, υπάρχουν ακόμη κενά στην πλήρη κατανόηση της λειτουργικής της σημασίας σε ποικίλες κλινικές καταστάσεις και της εμπλοκής της σε συνήθεις καθημερινές ιατρικές κλινικές εφαρμογές. Σήμερα, καταβάλλεται σημαντική προσπάθεια σε παγκόσμιο επίπεδο για την ανεύρεση κατάλληλων μεθόδων «παρακολούθησης» και ποσοτικοποίησης των μεταβολών που επιτελούνται κατά την διάρκεια της αγγειογένεσης, με απώτερο σκοπό την ανεύρεση διαγνωστικών εξετάσεων, αλλά και προγνωστικών δεικτών σε σχέση με την ανταπόκριση στην θεραπεία, την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση.

Έτσι, έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες απεικονιστικές τεχνικές με τη χρήση Αξονικών και Μαγνητικών Τομογράφων υψηλής ανάλυσης που μπορούν να απεικονίζουν δυναμικά και μη επεμβατικά την αιματική ροή στα αγγεία και τις μεταβολές της, την αγγειακή διαπερατότητα κ.α. [88]. Επίσης, η μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density, MVD) έχει προταθεί σαν ένας αξιόπιστος δείκτης της αγγειογενετικής διεργασίας [89, 90]. Άλλοι πιθανοί βιοδείκτες (κυτταρικοί βιοδείκτες) σχετιζόμενοι με την αγγειογένεση είναι τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (Circulating Endothelial Cells, CECs) καθώς και τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells, EPCs), τα οποία καταμετρώνται με κυτταρομετρία ροής και τα οποία αντικατοπτρίζουν την ενεργότητα του αγγειογενετικού μηχανισμού [91]. Τέλος, ολόένα και περισσότερα μόρια που κυκλοφορούν στο αίμα των ασθενών και σχετίζονται με την αγγειογένεση γίνονται στόχος των ερευνητών σε μια προσπάθεια να αναδειχθούν πιθανοί συσχετισμοί (μοριακοί βιοδείκτες) [92].

Τα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων στο αίμα μετρώνται συνήθως με την τεχνική της ELISA, η οποία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που δίνει αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα σε πραγματικούς χρόνους. Παράλληλα, η αξία της έγκειται και στο γεγονός ότι ήδη χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων στο αίμα ασθενών. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες νέες τεχνικές για ακόμη πιο ακριβή προσδιορισμό κυκλοφορούντων μορίων τα οποία βρίσκονται σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις στο ανθρώπινο αίμα [93]. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η μέθοδος ELISA καθώς αποτελεί μια μέθοδο αναφοράς για τα περισσότερα εργαστήρια, χωρίς να είναι οικονομικά απαγορευτική.

Από την άλλη, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) έχει αποδειχθεί μια αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό μικρών ποσοτήτων RNA στο περιφερικό αίμα. Στη μελέτη της αγγειογένεσης χρησιμοποιείται συχνά σε δείγματα από το περιφερικό αίμα ή ακόμη και από ιστικά παρασκευάσματα προκειμένου να εξακριβωθεί και να

ποσοτικοποιηθεί η παρουσία συγκεκριμένων μεταγράφων, τα οποία αντανακλούν την ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδιακών επιτόπων [91].

Τέλος, σε ότι αφορά στην επιλογή των συγκεκριμένων χρονικών στιγμών για τη διενέργεια των εργαστηριακών αναλύσεων (δηλαδή πριν το χειρουργείο, κατά την 3^η και 7^η ημέρα μετά το χειρουργείο), αυτή βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στα κυκλοφορούντα επίπεδα σημαντικών προ-αγγειογενετικών μορίων (όπως VEGF, IL-8, aFGF και bFGF, PlGFκ.λ.π) αρχικά περί τη 2-3^η και στη συνέχεια περί την 5-7^η μετεγχειρητική ημέρα (αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές για τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά έχουν ήδη παρατεθεί). Έτσι, επιλέχθηκαν οι ημέρες αυτές προκειμένου να καταγραφεί η κινητική των μελετούμενων παραγόντων και να συγκριθεί με τα ήδη υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Επίσης, καθώς δεν υπάρχουν παρά ελάχιστες συγκριτικές μελέτες της γονιδιακής έκφρασης στον χρόνο και μάλιστα σε αρκετά μικρότερη κλίμακα απ' ότι επιχειρήθηκε στην παρούσα μελέτη, οι ίδιες χρονικές στιγμές επιλέχθηκαν και για την ανάλυση της έκφρασης των αγγειογενετικών γονιδίων, αφού τα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά μόρια παράγονται από την ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο επιχειρήθηκε μια πιο άμεση αποτύπωση της αγγειογενετικής διεργασίας, στοχεύοντας όχι μόνο στην έμμεση καταγραφή του τελικού προϊόντος της γονιδιακής μετάφρασης (πρωτεϊνικό επίπεδο), αλλά πολύ περισσότερο μελετώντας την ίδια την γονιδιακή ενεργοποίηση στο επίπεδο της μεταγραφής.

Μέθοδος ELISA

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Ανακαλύφθηκε το 1983 και η αρχική ονομασία που του δόθηκε ήταν παράγοντας διαπερατότητας των αγγείων (Vascular Permeability Factor – VPF) [94, 95]. Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που αποτελείται από τους VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C και VEGF-D και με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 20-45 kDa [96, 97]. Ο VEGF-A, γνωστός και ως αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (Placental Growth Factor – PlGF), είναι το κύριο μέλος αυτής της ομάδας μορίων και συχνά βιβλιογραφικά στην ουσία αναφερόμαστε σε αυτόν όταν μιλάμε για VEGF. Ασκεί τη δράση του μέσω τριών υποδοχέων που είναι του τύπου της κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs), δηλαδή του VEGFR1 (ή αλλιώς Flt-1), VEGFR2 (ή KDR/Flk-1) και VEGFR3 (ή Flt-4), αλλά και δύο υποδοχέων που δεν είναι του τύπου κινάσης τυροσίνης και είναι η νευροπιλίνη 1 (neuropilin-1, NRP-1) και 2 (neuropilin-2, NRP-2) (Σχήμα 17) [95, 98, 99]. Επιπλέον, έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον 6 διαφορετικές ισομορφές για τον VEGF-A μέχρι σήμερα, με 121, 145, 165, 183, 189 και 206 αμινοξέα για το κάθε μετάγραφο

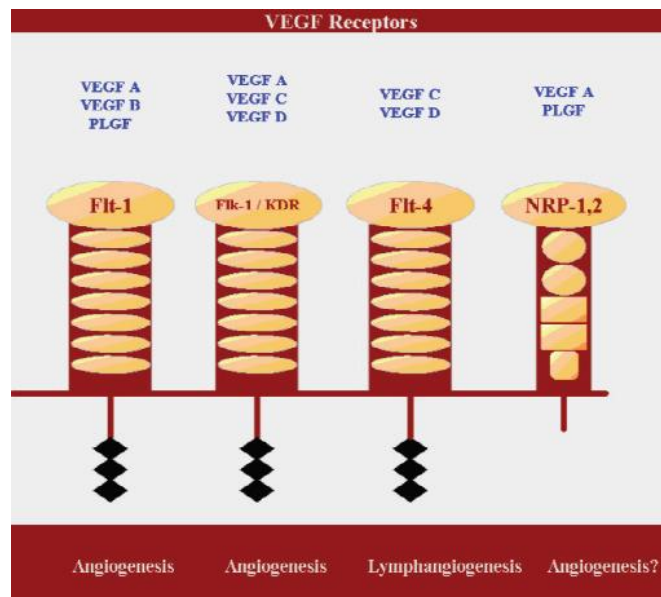
αντίστοιχα. Οι πιο συχνά απαντούμενες ισομορφές πάντως είναι αυτές του VEGF-A₁₂₁ και VEGF-A₁₆₅ (Σχήμα 18).

Φυσιολογικά, ο VEGF προάγει την κυτταρική μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει νευροτροφική και νευροπροστατευτική δράση, ενώ είναι και απαραίτητος στην διαδικασία της αιμοποίησης [99-101]. Ο ρόλος του στην αγγειογένεση έχει καταδειχθεί από μεγάλη σειρά μελετών, τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε επίπεδο κλινικών μελετών. Έτσι, αυξημένα επίπεδα VEGF έχουν ανευρεθεί στο αίμα ατόμων μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, κατά τη διαδικασία επούλωσης τραύματος αλλά και σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου [100], συμπεριλαμβανομένου αυτού του μαστού [83, 102]. Σε ότι αφορά τον καρκίνο, ο VEGF-A παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα του όγκου ως απάντηση στην υποξία (ή και σε άλλα λιγότερο γνωστά ερεθίσματα), συνδεδεμένος με τον HIF-1 και εκκινώντας τον καταρράκτη των αντιδράσεων που οδηγεί στον σχηματισμό των νέων αγγείων [98]. Ειδικά για τους VEGF-C και VEGF-D υπάρχει πληθώρα ενδείξεων ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην λεμφαγγειογένεση, δρώντας κυρίως μέσω του υποδοχέα VEGFR-3, ενώ έχουν πολύ μικρότερη συμμετοχή στην αγγειογένεση [95, 103, 104].

Μέχρι σήμερα έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες προκειμένου ο VEGF να καθιερωθεί σαν προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού. Σε αρκετές μελέτες, οι τιμές του VEGF στο αίμα έχουν βρεθεί αυξημένες σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, σε σχέση με υγιείς ομάδες ελέγχου [83, 97]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του κυκλοφορούντος VEGF και σταδίου νόσου, με τις γυναίκες που πάσχουν από τοποπεριοχικά προχωρημένα ή και μεταστατική μορφή της νόσου να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα του αγγειογενετικού αυτού παράγοντα [83, 105-107].

Αυτό που δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί μέχρι σήμερα είναι το εάν η μέτρηση του VEGF στο πλάσμα ή στον ορό είναι πιο αξιόπιστη. Έχει αποδειχθεί ότι τα αιμοπετάλια μεταφέρουν προσχηματισμένα μόρια VEGF, καθώς και άλλων προαγγειογενετικών παραγόντων ή και αναστολέων της αγγειογένεσης [108], τα οποία αποδίδουν στην κυκλοφορία όταν ενεργοποιηθούν, σε περιπτώσεις δηλαδή τραύματος, αγγειακών κακώσεων κ.λ.π. [109, 110]. Έτσι, οι τιμές του VEGF που μετρώνται στον ορό του αίματος αντιστοιχούν στα πραγματικά κυκλοφορούντα επίπεδα του παράγοντα συν το ποσό που απελευθερώνεται από τα κοκκία των αιμοπεταλίων μετά το χειρουργείο για παράδειγμα ή και κατά την απλή διενέργεια αιμοληψίας [111, 112]. Αντίθετα, όταν η μέτρηση αφορά στο πλάσμα του αίματος, λόγω της παρουσίας της αντιπηκτικής ουσίας δεν πραγματοποιείται σχηματισμός θρόμβου και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να μετρώνται οι πραγματικές τιμές του παράγοντα, οι οποίες στην περίπτωση αυτή ανευρίσκονται πολύ χαμηλότερες σε σχέση με αυτές του ορού [111, 113]. Σήμερα, από τους περισσότερους ερευνητές προτιμάται ο καθορισμός των επιπέδων του VEGF στο περιφερικό αίμα μέσω ανάλυσης δείγματος πλάσματος, το οποίο έχει συλλεχθεί σε ειδικό φιαλίδιο με αντιπηκτική ουσία μετά από φλεβοκέντηση.

Εκτός, όμως από τα κυκλοφορούντα επίπεδα του VEGF, η έκφραση του συγκεκριμένου παράγοντα έχει διερευνηθεί σε ιστολογικά παρασκευάσματα από τον όγκο μέσω τεχνικών ανοσοϊστοχημείας και έχουν γίνει προσπάθειες να συσχετισθεί με την πρόγνωση των αντίστοιχων ασθενών [102, 114-117]. Υπάρχουν επίσης μελέτες που συγκρίνουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF σε παρασκευάσματα από τον όγκο σε σχέση με τα επίπεδά του στο περιφερικό αίμα, για να φανεί η σχετική επίδρασή του σε τοπικό και συστηματικό επίπεδο [118-120]. Τέλος, διερεύνηση των επιπέδων του VEGF έχει πραγματοποιηθεί και στα υγρά των παροχετεύσεων που προέρχονται από το χειρουργικό τραύμα, πολλές φορές μάλιστα σε συσχέτιση και με τα επίπεδα στο αίμα [121, 122], καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι το τραύμα μπορεί να λειτουργεί ως τοπικός φραγμός με σκοπό την παγίδευση του VEGF σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές του αίματος.



Σχήμα 17. Οι διάφορες ισομορφές του VEGF-A, με το μέγεθός τους (σε αμινοξέα), τα αντίστοιχα εξόνια που τα κωδικοποιούν καθώς και τα χαρακτηριστικά του καθενός [96].

Isoforms of human VEGF-A			
Isoform	Size (amino acids)	Coding exons*	Features
VEGF-A ₁₂₁	121	1-5, 8	Secreted
VEGF-A ₁₄₅	145	1-6, 8	Binds NRP2 but not NRPI; secreted
VEGF-A ₁₆₅	165	1-5, 7, 8	The most abundant and biologically active isoform; secreted; binds NRPI and NRP2
VEGF-A _{165b}	165	1-5, 7, alternative exon 8	Secreted, endogenous inhibitory form of VEGF-A ₁₆₅
VEGF-A ₁₈₃	183	1-5, short exon 6, 7, 8	Sequestered in ECM but released by cleavage
VEGF-A ₁₈₉	189	1-8	Sequestered in ECM but released by cleavage
VEGF-A ₂₀₆	206	1-8 plus additional exon 6-encoded sequence	Sequestered in ECM but released by cleavage

Σχήμα 18. Οι διάφοροι τύποι υποδοχέων για τον VEGF και οι λειτουργίες που εξυπηρετούν [95].

Στην παρούσα εργασία αρχικά μετρήθηκαν τα επίπεδα του VEGF-A στο πλάσμα δέκα γυναικών με διαγνωσμένο αδενοκαρκίνωμα μαστού και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα επίπεδα του VEGF-A στο πλάσμα έξι γυναικών με ινοαδένωμα μαστού (δηλαδή με καλοήγη νόσο), σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ως προς την έκφραση παραγόντων που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Καθώς, όπως προαναφέρθηκε, ο αγγειογενετικός μηχανισμός θεωρείται πια ότι αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διαδικασίας της ογκογένεσης από τα πρώιμα κιόλας στάδια, οι ασθενείς με καρκίνο μαστού αναμένεται να έχουν αυξημένα επίπεδα εκφραζόμενων αγγειογενετικών παραγόντων σε σχέση με ασθενείς που δεν πάσχουν από κακοήθεια, εφόσον βέβαια σε αυτούς τους τελευταίους δεν συντρέχει κάποιος άλλος λόγος ενεργοποίησης της αγγειογενετικής διεργασίας (π.χ. τραύμα, φλεγμονή, ΣΔ κ.α.).

Οι ασθενείς με ινοαδένωμα μαστού είχαν μετρούμενα επίπεδα VEGF πλάσματος μεταξύ 10 και 36,9 pg/ml (μέση τιμή 21,145 pg/ml). Αντίθετα, οι ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο μαστού είχαν επίπεδα VEGF μεταξύ 18 και 108, 54 pg/ml (μέση τιμή 48,17 pg/ml), μια διαφορά η οποία αποδείχθηκε ότι ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,038$) (Σχήμα 12). Οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες με τις τιμές που αναφέρουν οι περισσότερες μέχρι σήμερα μελέτες [109, 123, 124]. Παρ' ότι ο αριθμός των ασθενών είναι σαφώς περιορισμένος και δεν είναι δυνατή η κατηγοριοποίηση των τιμών του VEGF ανά στάδιο νόσου στην ομάδα των ασθενών με κακοήθεια, εντούτοις η σημαντική διαφορά των μετρούμενων τιμών στις γυναίκες αυτές ως προς τις γυναίκες με καλοήγη νόσο του μαστού, είναι μια σοβαρή ένδειξη υπέρ της αυξημένης δραστηριότητας του μηχανισμού νέο-αγγειογένεσης στην ομάδα των ασθενών αυτών. Τα τελευταία χρόνια, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός μελετών έρχεται να επιβεβαιώσει την ανίχνευση υψηλότερων επιπέδων VEGF στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σχέση με ασθενείς χωρίς κακοήθεια [106, 124], ανεξάρτητα από το αν ο VEGF μετράται στον ορό [83, 125-127] ή στο πλάσμα του αίματος [120, 123, 128].

Εκτός, όμως, από την «στατική» καταγραφή των τιμών του VEGF-A σε μια δεδομένη χρονική στιγμή για τις δύο ομάδες ασθενών, επιχειρήθηκε επιπλέον και «δυναμική» αποτύπωση των διακυμάνσεων των τιμών του VEGF-A σε σχέση με το χρόνο της χειρουργικής επέμβασης. Η καταγραφή των αντίστοιχων μεταβολών σε διάφορες χρονικές στιγμές στις ίδιες ασθενείς έδωσε τη δυνατότητα αποτύπωσης της κινητικής του VEGF-A, αλλά και των άλλων αγγειογενετικών παραγόντων που μελετήθηκαν και που αναλύονται παρακάτω. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν η 3^η και η 7^η μετεγχειρητική ημέρα προκειμένου για τις ασθενείς με καρκίνο μαστού, ενώ για τις ασθενείς με ινοαδένωμα μαστού η 3^η μετεγχειρητική ημέρα, καθώς από τις υπάρχουσες εργασίες στην βιβλιογραφία έχει δειχθεί ότι σε αυτές τις χρονικές στιγμές παρατηρούνται οι κυριότερες διακυμάνσεις στα επίπεδα των περισσότερων αγγειογενετικών παραγόντων [129-132].

Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στο Σχήμα 13, την 3^η μετεγχειρητική ημέρα (D3) παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων του VEGF σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα στην Ομάδα Μελέτης (κακοήθης νόσος μαστού), ενώ την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (D7) τα επίπεδα του VEGF συνεχίζουν να είναι αυξημένα ως προς τα αρχικά, σε μικρότερο όμως βαθμό. Αυτή η παρατηρούμενη κατά τις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες αύξηση, είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα περαιτέρω ενεργοποίησης του μηχανισμού της αγγειογένεσης στα πλαίσια της επούλωσης του τραύματος, καθώς αντίστοιχη κινητική καταγράφεται και στην Ομάδα Ελέγχου (καλοήθης νόσος μαστού). Αναλυτικότερα, στις ασθενείς με ινοαδένωμα ο VEGF επίσης αυξάνεται την 3^η μετεγχειρητική ημέρα κατά ένα βαθμό που αποδείχθηκε στατιστικά σημαντικός ($p=0,008$). Επιπλέον, στην ομάδα των γυναικών με καρκίνο του μαστού διαφαίνεται μια τάση στις τιμές του VEGF για επιστροφή στα αρχικά επίπεδα (τιμές αναφοράς – ‘baseline’ – πριν την επέμβαση) κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (D7), παραμένοντας όμως έστω και ελαφρά αυξημένες σε σχέση με αυτές.

Το γεγονός αυτό έχει καταγραφεί και σε άλλες μελέτες [132]. Πιθανολογείται ότι ο VEGF διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στα αρχικά στάδια της επούλωσης του τραύματος, ενώ ο μεταγενέστερος ρόλος του είναι λιγότερο σημαντικός, καθώς άλλοι παράγοντες αναλαμβάνουν να προάγουν και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία. Έτσι, σε μια ομάδα ασθενών με καλοήθη νόσο αναμένεται επιστροφή των τιμών του VEGF στα προ του χειρουργείου επίπεδα, εφ’ όσον ολοκληρωθεί η επούλωση του τραύματος [129]. Στους ασθενείς με καρκίνο, όμως, ο αγγειογενετικός μηχανισμός παραμένει ενεργοποιημένος και πέραν της επίτευξης επούλωσης μετά το χειρουργείο, με αποτέλεσμα οι τιμές του να μην επανέρχονται στο φυσιολογικό ή να ομαλοποιούνται αρκετά αργότερα, ανάλογα με το στάδιο της νόσου, συχνά μάλιστα μετά το πέρας της χορήγησης επικουρικής χημειοθεραπείας [133]. Αυτό είναι πιθανόν να οδηγήσει σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία γεγονότων, καθώς αδρανείς μέχρι τότε (‘dormant’) μικρομεταστατικές εναποθέσεις (‘occult micrometastatic foci’) ενεργοποιούνται στο πλούσιο αγγειογενετικό περιβάλλον που εγκαθίσταται μετεγχειρητικά στα πλαίσια της επούλωσης του τραύματος (‘angiogenic switch’) και εκκινούν τη δική τους διαδικασία νέο-αγγειογένεσης (‘angiogenesis triggering’) [5, 134].

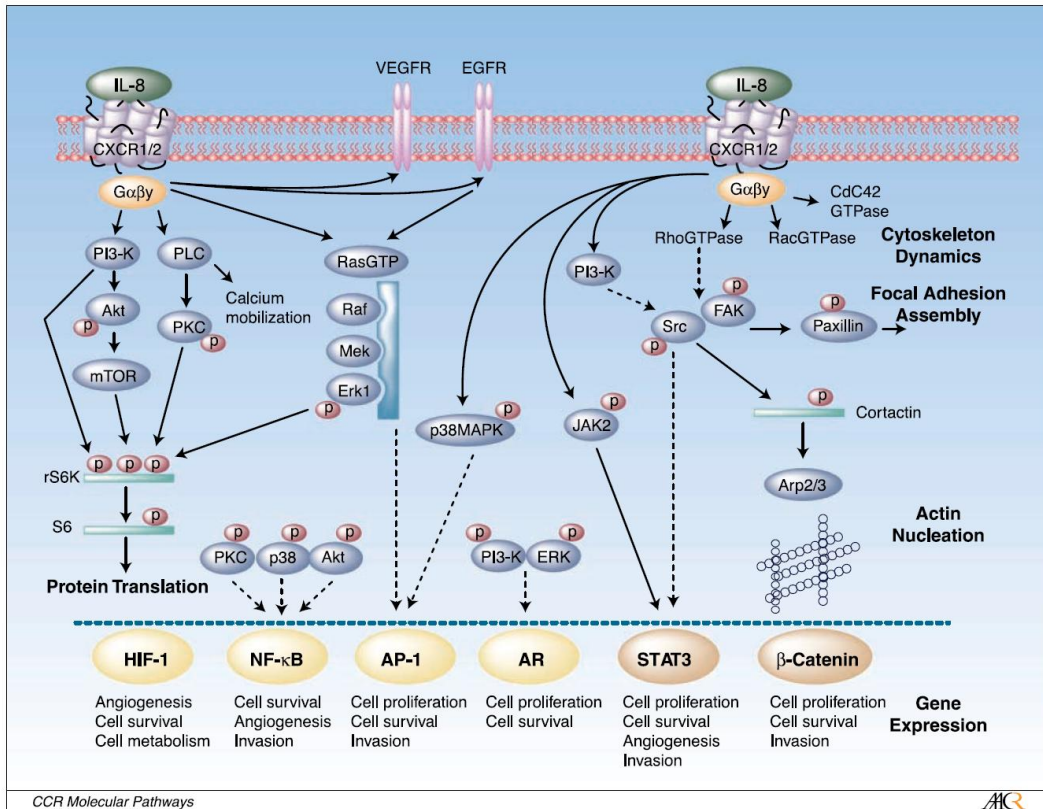
Παρ’ όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν και άλλες μελέτες που αδυνατούν να καταδείξουν μια αύξηση του VEGF σε συστηματικό επίπεδο μετά από επέμβαση στον μαστό, ενώ ανιχνεύουν μόνο παροδική μεταβολή των επιπέδων του σε τοποπεριοχικό επίπεδο, μετρώντας τον στα υγρά των παροχετεύσεων και συγκρίνοντάς τον με τις τιμές του πλάσματος [122, 130]. Μια εξήγηση που έχει προταθεί είναι μέσω της λειτουργίας ενός είδους μηχανισμού φραγμού μεταξύ αίματος και ιστών, ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα του VEGF στην περιοχή του χειρουργικού τραύματος να μην περνούν στην συστηματική κυκλοφορία αλλά να παραμένουν σε αυτήν, αφού ο ρόλος του VEGF είναι να συμμετέχει στη διαδικασία της επούλωσης [121, 132].

Τέλος, ένα γεγονός που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι τις υψηλότερες τιμές VEGF εμφάνισε η ασθενής με το πιο προχωρημένο κλινικό στάδιο T₂N₂ (Σχήμα 13). Τα επίπεδα του VEGF, μάλιστα, συνέχισαν να είναι αυξημένα ακόμη και μία εβδομάδα μετά την επέμβαση. Κατά την παρακολούθηση της ασθενούς εμφανίστηκε υποτροπή του καρκινώματος στην ομόπλευρη μασχαλιαία χώρα 34 μήνες μετά την αρχική επέμβαση (ευρεία τοπική εκτομή και μασχαλιαίος λεμφαδενικός καθαρισμός), η οποία αντιμετωπίστηκε με εκ νέου επέμβαση (τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή και συμπληρωματικός λεμφαδενικός καθαρισμός μασχάλης). Παρ' όλο που αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει τον VEGF με την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού [123], εντούτοις η πραγματική του αξία ως προγνωστικός δείκτης δεν έχει ακόμα επακριβώς καθοριστεί.

IL-8 (Interleukin-8)

Η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8), γνωστή και ως CXCL8, είναι ένα μικρό διαλυτό πεπτιδίο μοριακού βάρους 8-10 kDa, που ανήκει στην υπεροικογένεια των CXC-χυμοκινών [135]. Παράγεται από μια σειρά κυτταρικών πληθυσμών που περιλαμβάνει μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μακροφάγα, ινοβλάστες, επιθηλικά, ενδοθηλιακά, καθώς και καρκινικά κύτταρα [136]. Το υπεύθυνο για την έκφραση της IL-8 γονίδιο (SCYB8) που εδράζει στο χρωμόσωμα 4q12-q21 [136], αρχικά κωδικοποιεί ένα πρωτεϊνικό μόριο 99 αμινοξέων, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται τροποποίηση ώστε να προκύψει η τελικά δραστική χυμοκίνη με τα 72 (παραγόμενη από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα) ή τα 77 αμινοξέα (παραγόμενη από μη-ανοσοποιητικά κύτταρα) [135, 137].

Η IL-8 παράγεται σαν απάντηση σε μια πλειάδα ερεθισμάτων, όπως είναι η ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας (επαγωγή από TNF-α, IL-1 κ.α.), το στρες, η υποξία, αλλά και διάφορες στεροειδείς ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα κ.α.) [137]. Η βιολογική δράση της ασκείται μέσω δύο G-πρωτεϊνικών υποδοχέων επιφανείας, της CXCR1 και της CXCR2 [138, 139], προάγοντας την έκφραση άλλων πρωτεϊνικών μορίων και τροποποιώντας την δραστηριότητα μιας σειράς μεταγραφικών παραγόντων (Σχήμα 19). Η IL-8 αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για όλα τα κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ ενέχει και την μοναδική ικανότητα να ενεργοποιεί ειδικά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα [136]. Πρόκειται για μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη που συμμετέχει ενεργά στην διαδικασία της φλεγμονής αλλά και της επούλωσης του τραύματος, ενεργοποιώντας τους ινοβλάστες και επάγοντας την νέο-αγγειογένεση [136]. Παράλληλα, όμως, έχει ενοχοποιηθεί ότι εμπλέκεται και σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων που εμφανίζουν έντονο ανοσολογικό υπόστρωμα, όπως η κυστική ίνωση [140], το άσθμα [141], η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων [108, 142].



Σχήμα 19. Σχηματικό διάγραμμα που αναπαριστά τις οδούς σηματοδότησης που ενεργοποιούνται με την δράση της IL-8 πάνω στους υποδοχείς CXCR1 και CXCR2 (ανώτερο τμήμα διαγράμματος), καθώς και τις αντίστοιχες βιολογικές δράσεις που προκύπτουν (κατώτερο τμήμα διαγράμματος) [137].

Ο ακριβής ρόλος της IL-8 στην ογκογένεση και την ανάπτυξη μιας καρκινικής μάζας δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί [143], αν και θεωρείται πια αποδεδειγμένος [144]. Αυξημένα επίπεδα IL-8 έχουν βρεθεί στο φλεβικό αίμα που προέρχεται από εστίες ορθοκολικού καρκίνου [145], ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και σε διάφορα μονοπάτια κατά την εξέλιξη του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [146] αλλά και του μελανώματος [147, 148]. Επιπλέον, διάφοροι τύποι καρκίνου (προστάτη, ωθήκης, κόλου κ.α.) φαίνεται να παράγουν σημαντικές ποσότητες IL-8, προερχόμενης είτε από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα είτε από τα κύτταρα του στρώματος [136]. Στον καρκίνο του μαστού, έχει δείχθει ότι η IL-8 εκφράζεται πολύ εντονότερα στον νεοπλασματικό μαζικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό [149], ενώ και οι υποδοχείς της (CXCR1 και CXCR2) φαίνεται να εκφράζονται σε ιστολογικά παρασκευάσματα καρκίνων του μαστού, κάτι που συμβαίνει αντίστοιχα σε πολύ μικρότερο βαθμό στον φυσιολογικό μαστό [150]. Σε ότι αφορά στην αγγειογένεση, τις τελευταίες δύο δεκαετίες διάφορες μελέτες σε πειραματικό επίπεδο [151-154] έχουν καταδείξει τον ρόλο της ως προαγωγέα της αγγειογένεσης μέσω της ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού, της χημειοταξίας και της ικανότητας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και με την ενεργοποίηση πρωτεασών [135]. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι ισχυρά επαγωγικά ερεθίσματα για την έκφραση της IL-8 αποτελούν ο VEGF-A και η υποξία [144, 155].

Στην παρούσα μελέτη αρχικά ταυτοποιήθηκαν τα επίπεδα της IL-8 στο περιφερικό αίμα (πλάσμα) ασθενών με καρκίνο μαστού και συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές στο πλάσμα γυναικών με καλοήγη νόσο. Στην Ομάδα Μελέτης (καρκίνος μαστού) οι μετρούμενες τιμές για την IL-8 ήταν συγκριτικά αυξημένες σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου (ινοαδένωμα μαστού), μια διαφορά που αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0,0218$). Επιπλέον, τρεις από τις έξι ασθενείς της Ομάδας Ελέγχου είχαν τιμές IL-8 κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, δύο από τις έξι ελάχιστα πάνω από το όριο και μόνο μία σαφώς πάνω από το όριο, ενώ στην Ομάδα Μελέτης μόνο μία ασθενής από τις δέκα με καρκίνο είχε τιμές IL-8 μικρότερες από το όριο ευαισθησίας της ELISA. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν κι οι περισσότεροι άλλοι ερευνητές, αν και άλλες από τις μετρήσεις αυτές αφορούν στον ορό [143, 156-159] κι άλλες στο πλάσμα των ασθενών [160, 161]. Αντίθετα, ο Pusztai και συν. δεν κατάφεραν να βρουν σημαντικές διαφορές μεταξύ 70 γυναικών με καρκίνο μαστού και 15 υγιών ατόμων ως προς τα επίπεδα της IL-8 στο πλάσμα [162], ενώ ο Derin και συν. επίσης δεν κατέγραψαν σημαντική διαφορά ως προς την IL-8 του ορού μεταξύ 48 γυναικών με καρκίνο μαστού και 21 υγιών εθελοντριών [163].

Ως προς την κινητική των επιπέδων της IL-8 στο πλάσμα των γυναικών με κακοήθεια, καταγράψαμε μια μικρή αύξηση την 3^η μετεγχειρητική ημέρα ($p=0,22$) που ακολουθήθηκε από μια απότομη μείωση κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, ώστε τελικά να παρατηρούνται επίπεδα μικρότερα ακόμη και από τα επίπεδα αναφοράς (προεγχειρητικά), και μάλιστα αυτή η μεταβολή να έχει στατιστική σημασία ($p=0,0205$). Από την άλλη, η μεταβολή στα επίπεδα της IL-8 στην Ομάδα Ελέγχου πριν και μετά το χειρουργείο δεν ήταν σημαντική ($p=0,368$), δείχνοντας ότι η καθαρή επίδραση της χειρουργικής πράξης καθ' αυτής ήταν μηδαμινή στα κυκλοφορούντα επίπεδα της IL-8.

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

Ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) ή αλλιώς FGF-2, είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 18.000 kDa που κωδικοποιείται από γονίδιο στο χρωμόσωμα 4 και ανήκει στην υπεροικογένεια των FGF παραγόντων που αριθμεί περί τα 20 διαφορετικά μόρια [164]. Εμφανίζουν πλειοτροπικές βιολογικές δράσεις (χημειοταξία, μιτογόνος δράση, αγγειογενετική δράση κ.α.) καθώς συνδέονται μ' έναν μεγάλο αριθμό υποδοχέων σε διάφορα είδη κυτταρικών πληθυσμών. Έτσι, εκτός από τους τυπικούς FGF-υποδοχείς της κατηγορίας τους, δηλαδή του FGFR1, FGFR2, FGFR3 και FGFR4, που ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων του τύπου κινάσης τυροσίνης (RTKs) [164, 165], συνδέονται και με ιντεγκρίνες, γαγγλιοσίδες και πρωτεογλυκάνες θεϊκής ηπαράνης [165]. Μαζί με τον όξινο αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (acidic Fibroblast Growth Factor, aFGF) ή αλλιώς FGF-1, αποτελούν τα πρότυπα μόρια της ομάδας αυτής.

Γενικά οι FGFs συμμετέχουν σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση αρκετών κυτταρικών τύπων (ινοβλαστών, λείων μυϊκών ινών, ενδοθηλιακών κυττάρων κ.α.), ενώ παράλληλα δρουν σαν αντι-αποπτωτικοί παράγοντες ευοδώνοντας την κυτταρική επιβίωση [27, 164, 166]. Η συμμετοχή τους στα διάφορα στάδια επούλωσης του τραύματος θεωρείται δεδομένη [166], ενώ παράλληλα, διαδραματίζουν προεξάρχοντα ρόλο στην οργανογένεση, καθώς εμπλέκονται στον σχηματισμό της καρδιάς, των πνευμόνων, του νευρικού συστήματος, αλλά και στην ανάπτυξη του μαζικού και προστατικού αδένου [164, 166]. Σε ότι αφορά στην αγγειογένεση, έχει τεκμηριωθεί η εμπλοκή των FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5 και FGF-8 [165], οι οποίοι μάλιστα θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες υπό την έννοια ότι επηρεάζουν την σηματοδότηση άλλων αυξητικών παραγόντων, όπως ο VEGF αλλά και διάφορες κυτοκίνες [167].

Ο ρόλος των FGFs στον καρκίνο δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί. Φαίνεται ότι τα μόρια αυτά παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα του όγκου ή τα περιβάλλοντα στρωματικά κύτταρα [166]. Ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού, σε ποσοστό περίπου 10% των περιπτώσεων παρατηρείται ενίσχυση του γονιδιακού επιτόπου για τον FGFR1 που εδράζει στη χρωμοσωμιακή περιοχή 8p11-12, γεγονός που σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση των αντίστοιχων ασθενών [168, 169]. Ο ρόλος του FGFR1 στην καρκινογένεση έχει αναδειχθεί μέσα από πειραματικές διαδικασίες, όπου φαίνεται ότι ασκεί προαγωγική δράση στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση αλλά και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων [170, 171]. Τέλος, αυξημένη παρουσία του aFGF και του υποδοχέα FGFR1 έχει αναδειχθεί σε δείγματα καρκίνων μαστού σε σχέση με μη νεοπλασματικά ιστικά παρασκευάσματα [172].

Μιλώντας αποκλειστικά για τον aFGF, η παρουσία του έχει πιστοποιηθεί σε διάφορους τύπους ιστών στον ανθρώπινο οργανισμό, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του εγκεφάλου, ενώ αποτελεί συστατικό της βασικής μεμβράνης των αγγείων σε όλα τα μέρη του σώματος [173]. Οι αγγειογενετικές ιδιότητες του bFGF (αλλά και του aFGF) έχουν ήδη αναγνωριστεί εδώ και σχεδόν τρεις δεκαετίες, καθώς ήταν στην ουσία ο πρώτος αγγειογενετικός παράγοντας που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή [23, 174]. Πιο συγκεκριμένα, διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό αγγείων από αυτά [27, 173]. Δρα συνεργικά με τον VEGF τόσο κατά την διαδικασία της επούλωσης των ιστών μετά από τραύμα όσο και στη νέο-αγγειογένεση που παρατηρείται στον καρκίνο [175, 176]. Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός της παραγωγής και έκκρισής του παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.

Υπερέκφραση του FGF-2 έχει διαπιστωθεί σε ορισμένες περιπτώσεις τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού ('triple negative breast cancer'), μιας ιδιαίτερα επιθετικής μορφής καρκίνου που δεν εκφράζει υποδοχείς για οιστρογόνα, ούτε για προγεστερόνη αλλά ούτε και για HER-2 (Human EGFR 2/ErbB2), με τις υπάρχουσες θεραπευτικές δυνατότητες να είναι ως επί το πλείστον αναποτελεσματικές [177].

Επιπλέον, φαίνεται να εκφράζεται έντονα και στο στρώμα ορμονο-εξαρτώμενων τύπων καρκίνου του μαστού [178]. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα γενικά υποστηρίζουν την αυξημένη έκφραση του bFGF σε ιστολογικά παρασκευάσματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σχέση με δείγματα από υγιείς μαστούς [179-181]. Άλλοι ερευνητές, όμως, διαπίστωσαν χαμηλότερα επίπεδα bFGF στις γυναίκες με κακοήθεια χρησιμοποιώντας διαφορετική μεθοδολογία [180]. Όσο για τα κυκλοφορούντα επίπεδα του bFGF, υπάρχει μικρός αριθμός μελετών που ερευνούν το θέμα αυτό [182, 183]. Ο Hewalakai συν. διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα του παράγοντα αυτού στον ορό ασθενών με καρκίνο μαστού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [183], ενώ ο Sliutz και συν. αξιολόγησαν τη χρησιμότητά του ως προγνωστικό δείκτη ('surrogate biomarker') για την ανάδειξη υποτροπών και για παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία σε μικρή ομάδα ασθενών [184]. Τέλος, ο Curigliano και συν. κατέγραψαν διαφορές στην περιεγχειρητική κινητική του bFGF ανάλογα με το είδος και την έκταση της επέμβασης, κατά τη μελέτη του παράγοντα αυτού στον ορό γυναικών με κακοήγη νόσο του μαστού [130]. Αντίστοιχες μελέτες και συγκρίσεις έχουν δημοσιευθεί και σε σχέση με τα κυκλοφορούντα στο πλάσμα επίπεδα του bFGF [93, 185, 186].

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι τιμές του bFGF στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο μαστού (Ομάδα Μελέτης) και συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές στο πλάσμα γυναικών με ινοαδένωμα, δηλαδή καλοήγη νόσο του μαστού (Ομάδα Ελέγχου), σε διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με τη διενέργεια της χειρουργικής επέμβασης. Για τον προσδιορισμό αυτό προτιμήθηκε η μέτρηση στο πλάσμα έναντι του ορού του αίματος, καθώς, όπως αναλύθηκε και πρωτύτερα, έχει δειχθεί ότι τα αιμοπετάλια είναι φορείς σημαντικών ποσοτήτων αγγειογενετικών παραγόντων, τους οποίους μάλιστα μεταφέρουν σε περιοχές όπου έχει ενεργοποιηθεί η διαδικασία της νέο-αγγειογένεσης, είτε στα πλαίσια επούλωσης ενός τραύματος είτε στην περίπτωση ανάπτυξης ενός κακοήθους όγκου [187].

Αναλυτικότερα, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του bFGF ανάμεσα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και με ινοαδένωμα, ενώ σε πολλές περιπτώσεις οι καταγραφόμενες τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης για τη μέθοδο. Ο Larsson και συν. σε μια μελέτη που περιλάμβανε 80 υγιείς δότες ανίχνευσαν τιμές του bFGF στο πλάσμα που ήταν μικρότερες των 6,4 ng/L (ή αντίστοιχα 6,4 pg/mL) [185], γεγονός που παρατηρήθηκε και στη δική μας μελέτη όσον αφορά στην Ομάδα Ελέγχου. Στην Ομάδα Ελέγχου παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση των τιμών κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα, κάτι που εξηγείται από την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης στα πλαίσια της επούλωσης του χειρουργικού τραύματος. Μετεγχειρητική αύξηση παρατηρήθηκε και στην Ομάδα Μελέτης, η οποία συνεχίστηκε μάλιστα και κατά την 7^η μετεγχειρητική ημέρα, χωρίς όμως αυτή η μεταβολή να είναι σε καμία φάση στατιστικά σημαντική. Η κινητική αυτή του bFGF διαφέρει από τις αντίστοιχες που καταγράφηκαν για τον VEGF-A και την IL-8, στις οποίες παρατηρήθηκε μια πτωτική τάση στο τέλος της πρώτης μετεγχειρητικής βδομάδας. Η επέκταση της μελέτης και σε απώτερες

χρονικές στιγμές σε σχέση με το χειρουργείο ίσως θα μπορούσε να δώσει απάντηση στο αν τα αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα του bFGF οφείλονται στη διαδικασία της επούλωσης ή στην ενεργοποίηση του αγγειογενετικού μηχανισμού σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.

Μέθοδος RT-PCR

Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων μεταξύ ασθενών με ινοαδένωμα (Ομάδα Ελέγχου) και καρκίνου μαστού (Ομάδα μελέτης) (PRO)

Αρχικά διερευνήθηκαν πιθανές διαφορές μεταξύ ασθενών με καρκίνο μαστού και ινοαδένωμα σε ότι αφορά στα κυκλοφορούντα στο περιφερικό αίμα μέταγραφα μιας ομάδας 84 γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος έδειξε ότι στην Ομάδα Μελέτης υπερεκφράζεται μια σειρά σημαντικών και ήδη αρκετά μελετημένων παραγόντων σε σχέση με την Ομάδα Ελέγχου (Εικόνα 3), όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών τύπου 1 (Fibroblast Growth Factor 1, FGF-1 ή aFGF), η Ιντερλευκίνη 8 (Interleukin 8, IL-8), ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου C (Vascular Endothelial Growth Factor C, VEGF-C) και η Θρομβοσπονδίνη 1 (Thrombospondin 1, THBS1). Επιπλέον, διαπιστώθηκε υπερέκφραση κι άλλων, λιγότερο γνωστών παραγόντων, όπως η Νευροπιλίνη 1 (Neuropilin 1, NRP1), η Εφρίνη Β2 (Ephrin B2, EFNB2) και Α3 (Ephrin A3, EFNA3), η Χυμοκίνη 11 (Chemokineligand 11, CCL11) κ.α. (Πίνακας 8). Τέλος, το γονίδιο που εμφάνισε την πιο ενισχυμένη έκφραση ήταν αυτό της κινάσης σφινγγοσίνης 1 (Sphingosine kinase 1, SPHK1), ενώ το μόνο γονίδιο που φάνηκε να υποεκφράζεται ήταν αυτό της Χυμοκίνης 10 (Chemokone ligand 10, CXCL10).

Πιο συγκεκριμένα, η κινάση σφινγγοσίνης τύπου 1 είναι ένα από τα δύο (μαζί με την κινάση σφινγγοσίνης τύπου 2, Sphingosine kinase 2, SPHK2) ένζυμα που ενεργοποιούν (φωσφορυλιώνουν) το μόριο της σφινγγοσίνης 1, το οποίο αποτελεί ενεργό μεταβολίτη των σφινγγολιπιδίων, δομικών συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης [188]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, παράγεται από αρκετούς κυτταρικούς τύπους (ερυθροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κ.α.) και συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, την απόπτωση και τη φλεγμονή [189]. Την τελευταία δεκαετία, μια σειρά μελετών έχει αποδώσει σημαντικό ρόλο στο ενεργοποιημένο μόριο της σφινγγοσίνης (Sphingosine 1 phosphate, S1P) τόσο στη διαδικασία της ανθρώπινης καρκινογένεσης [190], αλλά και της νέο-αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης [191, 192]. Φαίνεται να παράγεται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και να δρα σε εξωκυττάριο επίπεδο μέσω μιας σειράς εξειδικευμένων υποδοχέων (S1P receptors 1-5) ασκώντας τη δράση της με ενδοκρινικό, αυτοκρινικό αλλά και παρακρινικό τρόπο [189]. Σήμερα πια πιστεύεται ότι η υπερέκφραση της SPHK1 που παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και

αυτού του μαστού [193, 194], είναι το αποτέλεσμα της υποξίας που επάγεται μέσω του μορίου του HIF1a [195, 196]. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του μορίου της κινάσης σφιγγοσίνης μπορεί να έχουν προγνωστικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού [197].

Ο ρόλος της IL-8 στην αγγειογένεση αναπτύχθηκε νωρίτερα, ενώ σε ότι αφορά στον FGF-1/aFGF, αυτός ανήκει (μαζί με τον FGF-2/bFGF) στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών και αποτελεί έναν επίσης καλά μελετημένο προ-αγγειογενετικό παράγοντα [61, 173]. Πρόκειται για ένα πρωτεϊνικό μόριο με 155 αμινοξέα που, εκτός των άλλων, συμμετέχει σε πλείστες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η οργανογένεση και η ανάπτυξη, καθώς και η φλεγμονή [166]. Σε μια από τις πρώτες μελέτες σχετικά με τον FGF-1, ο Bansal και συν. κατέγραψαν με τη βοήθεια RT-PCR σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα τόσο του πρόδρομου mRNA όσο και του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος του παράγοντα αυτού σε δείγματα ιστών από ασθενείς με καρκίνο μαστού σε σχέση με υγιείς γυναίκες που υποβλήθηκαν σε βιοψία μαστού [198]. Ο Renault-Llorca και συν. διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον FGF-1 (αλλά και τον FGF2) σε δείγματα από κακοήθεις όγκους του μαστού [168]. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφερε και ο Yoshimura και συν. [172], ενώ ο Jaakkola και συν. βρήκαν ότι το υπεύθυνο γονίδιο για τον FGFR4, τον πιο εξειδικευμένο υποδοχέα από τους 4 που υπάρχουν για τον FGF-1, εκφράζεται ισχυρότερα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού καθώς και σε γυναικολογικές κακοήθειες [199]. Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι αυξημένη έκφραση του FGF-1 αλλά και του FGFR4 έχει διαπιστωθεί σε ιστολογικά παρασκευάσματα προερχόμενα από ινοαδενώματα [200]. Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, ο ρόλος του FGF-1 στον καρκίνο του μαστού δεν έχει μέχρι σήμερα πλήρως διευκρινιστεί.

Ένα άλλο γονίδιο που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στις ασθενείς με καρκίνο μαστού σε σχέση με τις γυναίκες που είχαν ινοαδένωμα ήταν αυτό του VEGF-C. Ο VEGF-C ανήκει στην κατηγορία των αυξητικών παραγόντων του αγγειακού ενδοθηλίου και ασκεί την δράση του μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα VEGFR2 (νέο-αγγειογένεση) καθώς και τον VEGFR3 (λεμφοαγγειογένεση), ο οποίος μάλιστα εκφράζεται μόνο σε λεμφαγγεία [201]. Η παρουσία του VEGF-C έχει αναγνωριστεί σε ιστολογικά δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού [202, 203] και επιπλέον έχει συσχετιστεί θετικά με την παρουσία διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων [204], ενώ υπάρχουν και μελέτες που τον αξιολογούν ως πιθανό προγνωστικό δείκτη στην κατηγορία των ασθενών αυτών [201, 205].

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι ένα από τα πολλά μόρια-αγωνιστές (όπως TGF-α, AREG, NRG1, TDGF-1 κ.α.) που συνδέονται με την ErbB κατηγορία τύπου I υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs), που περιλαμβάνει τον ErbB1 (EGFR, HER1), τον ErbB2 (Neu, HER2), τον ErbB3 (HER3) και τον ErbB4 (HER4) [206]. Οι υποδοχείς αυτοί τροποποιούν την ανάπτυξη του μαζικού αδένου και συχνά εμφανίζουν υπερέκφραση ή μεταλλάξεις σε ασθενείς με καρκίνο μαστού [207, 208]. Επίσης, φαίνεται ότι οι οδοί σηματοδότησης του VEGF και του EGFR

μοιράζονται αρκετά κοινά μονοπάτια, ενώ ο ίδιος ο EGF παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση του VEGF [209].

Εκτός, όμως, από τους παραπάνω υπερεκφραζόμενους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες, ανάμεσα στα γονίδια με ενισχυμένη έκφραση ήταν και δύο που κωδικοποιούν αναστολείς της αγγειογένεσης ('angiogenesis inhibitor'). Η TIMP3 ανήκει στους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of metalloproteinase, TIMP), μιας οικογένειας πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους που καταστέλλουν την δράση των μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποσύνθεση ('degeneration') και αναδιοργάνωση ('remodelling') της εξωκυττάριας ουσίας [210]. Ειδικότερα για την TIMP3 έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την σύνδεση του VEGF στον υποδοχέα VEGFR-2, σταματώντας τον καταρράκτη αντιδράσεων που επάγεται από την αντίδραση αυτή [211]. Αυξημένα επίπεδα mRNA για την TIMP3 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις στη μασχάλη [212]. Επιπλέον, συγκεκριμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί μπορεί να προσδίδουν στις TIMPs ιδιότητες που τελικά να ευνοούν την αγγειογένεση και την ανάπτυξη του καρκίνου [213].

Η Θρομβοσπονδίνη 1 (Thrombospondin 1, THBS1 ή TSP-1) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 450 kDa, η οποία βρίσκεται αποθηκευμένη στην εξωκυττάρια ουσία αλλά και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων [214, 215]. Ο ρόλος της στη φλεγμονή και την επούλωση του τραύματος έχει από καιρό αναγνωριστεί [214, 215]. Η επίδρασή της στον μηχανισμό της αγγειογένεσης φαίνεται να είναι ανασταλτική [61], καθώς δρα άμεσα πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα (αλλά και έμμεσα σε άλλους τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην όλη διαδικασία) επηρεάζοντας την κινητικότητα και την βιωσιμότητά τους [165, 216]. Παρ' όλα αυτά, ο Clezardin και συν κατέγραψαν αυξημένα επίπεδα mRNA της TSP-1 σε δείγματα από καρκίνο μαστού σε σχέση με υλικό από φυσιολογικούς ή υπερπλαστικούς μαστούς [217, 218]. Επίσης, σε *in vitro* μελέτες φάνηκε ότι η TSP-1 μπορεί να σχετίζεται με την απόκτηση μεταστατικού δυναμικού από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού [216].

Σε ότι αφορά στα υπόλοιπα γονίδια που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στις ασθενείς με κακοήθεια, δεν κρίνεται σκόπιμη η παρουσίαση αναλυτικών στοιχείων καθώς η βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη και ο ακριβής ρόλος τους στην αγγειογένεση δεν έχει πλήρως διελευκανθεί. Συνοπτικά, λοιπόν, Νευροπιλίνη 1 (Neuropilin 1, NRP-1) είναι ένας συνυποδοχέας για την οικογένεια των VEGF παραγόντων (Εικόνα 3) αλλά και των Σεμαφορινών (Semaphorins, Semma family), που αποτελούν νευρωνικούς διαμεσολαβητές [219]. Αυξημένη έκφρασή της έχει αναδειχθεί στον καρκίνο του μαστού αλλά και τους περιβάλλοντες υγείς ιστούς [220, 221], ενώ διερευνάται η πιθανότητα να αποτελέσει σύντομα στόχο αντι-αγγειογενετικών θεραπειών [222]. Η Εφρίνη A3 (Ephrin A3, EFNA3) και η Εφρίνη B2 (Ephrin B2, EFNB2) είναι υποδοχείς του τύπου κινάσης τυροσίνης με ενισχυτικό αλλά πιθανώς και ανασταλτικό ρόλο στην καρκινογένεση [223, 224], ενώ επίσης έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού [224]. Η λαμινίνη άλφα 5 (Laminin-alpha-5, LAMA5) είναι βασικό συστατικό της βασικής μεμβράνης και συμμετέχει σε διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών και

μεσεγγυματικών κυττάρων [225], ενώ πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την εμπλοκή της στην διαδικασία προσκόλλησης μεταστατικών καρκινικών κυττάρων του μαστού [226].

Όσο για τα υπόλοιπα γονίδια που εμφάνισαν υπερέκφραση, το TEK (ή Tie-2) είναι ένας υποδοχέας του τύπου κινάσης τυροσίνης πάνω στο οποίο προσδέεται το μόριο της αγγειοποιητίνης-1 (angiopoietin-1) [227]. Ελλείμματα στο TEK σχετίζονται με ενδογενείς αγγειακές ανωμαλίες [228]. Το γονίδιο AKT-1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης η οποία φαίνεται να δραστηριοποιείται έντονα στον καρκίνο του μαστού [229] και της οποίας η αναστολή ενδέχεται να επιβραδύνει την εξέλιξη του [230]. Η CCL11 (ουσία χημειοτακτική για τα ηωσινόφιλα) είναι άλλη μια χυμοκίνη που εμπλέκεται στο μηχανισμό της καρκινογένεσης [231], όπως και η COL4A3 [232, 233] αλλά και η ITGB3 [234], που αναλύονται παρακάτω.

Ο μόνος παράγοντας που βρέθηκε να υποεκφράζεται στην Ομάδα Μελέτης ήταν ο CXCL10 (ή IP-10), μια κυτοκίνη που δρα μέσω του υποδοχέα CXCR3. Ο υποδοχέας αυτός έχει βρεθεί να παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε δείγματα ιστών με καρκίνο μαστού [235, 236], όμως η βιολογική συμπεριφορά του CXCL10 δεν έχει επακριβώς καθοριστεί. Από τη μία φαίνεται να διαθέτει ιδιότητες που ευοδώνουν την ανάπτυξη των όγκων [235] και από την άλλη μπορεί να λειτουργεί ως αναστολέας της καρκινογένεσης [237, 238]. Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα εξηγείται από το γεγονός ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα CXCR3 με διαφορετική κατανομή στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Έτσι, η πρόσδεση του CXCL10 στον υποδοχέα CXCR3 ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την χημειοταξία, ενώ η σύνδεση με τον CXCR3B έχει κυτταροστατική δράση [235].

Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Ομάδα μελέτης) πριν το χειρουργείο και κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα (PRO έναντι D3)

Όπως δείχθηκε νωρίτερα, οι γυναίκες ασθενείς με κλινικά διαπιστωμένο αδενοκαρκίνωμα μαστού έχουν διαφορετικό προφίλ κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων σε σύγκριση με ασθενείς που πάσχουν από ινοαδένωμα μαστού, καθώς σε αυτές παρατηρείται αυξημένη γονιδιακή έκφραση ενός αριθμού παραγόντων που έχει αποδειχθεί ότι έχουν προαγωγικό ρόλο στη διαδικασία της νέο-αγγειογένεσης. Όμως, καθώς η χειρουργική πράξη που αποσκοπεί στην εξαίρεση της τοποπεριοχικής νόσου ενεργοποιεί κι αυτή με τη σειρά της την νέο-αγγειογένεση στα πλαίσια της επούλωσης του χειρουργικού τραύματος, θα ήταν ενδιαφέρον να καταγραφούν οι μεταβολές στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε σχέση με το χειρουργείο, δηλαδή πριν από αυτό καθώς και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά από αυτό. Στην παρούσα μελέτη, λοιπόν, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στην έκφραση των 84 σχετιζόμενων με την αγγειογένεση γονιδίων αρχικά μεταξύ της

ημέρας που προηγήθηκε της επέμβασης και της 3^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας και στη συνέχεια μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας.

Αναλυτικότερα, οι γυναίκες με αδενοκαρκίνωμα μαστού εμφάνισαν την 3^η μετεγχειρητική ημέρα αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την SPHK1, COL4A3, BAI1 και ITGB3. Η κινάση σφιγγοσίνης τύπου 1 (SPHK1), όπως έχει ήδη αναφερθεί, επάγεται από τον HIF-1α στα πλαίσια της υποξίας και συμμετέχει στην φλεγμονή. Η αύξησή της μετά το χειρουργείο μπορεί να δικαιολογηθεί από την εμπλοκή της στους παραπάνω μηχανισμούς, εντούτοις το μόριο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον στόχο για περαιτέρω διερεύνηση τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε γονιδιακό επίπεδο. Η COL4A3 (κολλαγόνο τύπου IVάλφα 3 ή αντιγόνο Goodpasture) είναι μια χυμοκίνη της οποίας ο ρόλος στο σύνδρομο Alport και το σύνδρομο Goodpasture έχει αναγνωριστεί [239]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να συσχετίζεται σε διάφορες μελέτες με διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του πνεύμονα [232] ή του στομάχου [233]. Εμπλέκεται στον σχηματισμό της βασικής μεμβράνης και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επούλωση του τραύματος [239]. Η αυξημένη έκφρασή της μετεγχειρητικά θα μπορούσε να αποδοθεί στην διαδικασία αναδόμησης της βασικής μεμβράνης λόγω της επούλωσης.

Το γονίδιο ITGB3 (ιντεγκρίνη β3, αντιγόνο CD61) παράγει την αλυσίδα β3 της ιντεγκρίνης, η οποία βρίσκεται στα αιμοπετάλια και συμμετέχει σε διαδικασίες προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων καθώς και σηματοδότηση μέσω μορίων επιφανείας [234]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό οδηγούν στο σχηματισμό μη λειτουργικών ιντεγκρινών με συνέπεια την παθολογική συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων, σε μια παθολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από διάφορης βαρύτητας βλεννογονοδερματικές αιμορραγίες (θρομβοπάθεια Glanzmann) [234]. Η σχέση της παθολογικής λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων με την καρκινογένεση έχει αρκετό παρελθόν, όμως πρόσφατα άρχισε και πάλι να μελετάται συστηματικά. Τέλος, ο ειδικός για τον εγκέφαλο αναστολέας της αγγειογένεσης 1 που κωδικοποιείται από το γονίδιο BAI1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1), ανακαλύφθηκε το 1997 από τον Nishimori και συν. [240] και φαίνεται να διαθέτει ανασταλτικές ιδιότητες ως προς τη νέο-αγγειογένεση [241]. Μάλιστα, σε διάφορους τύπους καρκίνου (και όχι μόνο του εγκεφάλου) τα επίπεδά του ανευρίσκονται σημαντικά μειωμένα σε σχέση με περίξ υγιείς ιστούς, γεγονός που επιτρέπει την προαγωγή της καρκινογένεσης [242].

Εκτός, όμως, από τους παραπάνω αγγειογενετικούς παράγοντες που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται την 3^η μετεγχειρητική ημέρα σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα έκφρασής τους, υπήρξε κι ένας σημαντικός αριθμός μορίων που φάνηκε να υποεκφράζονται. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια αυτά ήταν η Επιρεγουλίνη (Epregrulin, EREG), ο αναστολέας της πεπτιδάσης της σερπίνης (Serpineptidase inhibitor 1, SERPINF1), η Ιντερλευκίνη 1B (Interleukin1B, IL1B), οι χυμοκίνες CXCL1, CXCL9, CXCL10 και CCL2, ο παράγοντας υποξίας 1A (Hypoxia inducible factor 1 alphas ubmit) και η NOTCH4 (*Πίνακας 10*). Αναλυτικότερα, η Επιρεγουλίνη είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο EREG και ανήκει στην οικογένεια

των μορίων που σχετίζονται με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF). Συνδέεται με τον EGFR υποδοχέα του EGF, καθώς και με τους περισσότερους ERB υποδοχείς του τύπου της κινάσης τυροσίνης [243]. Η έκφραση της σε ιστολογικά παρασκευάσματα από αδενοκαρκίνωμα μαστού πρόσφατα επιβεβαιώθηκε [244]. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτής και της έκφρασης οιστρογονικών ή προγεστερονικών υποδοχέων. Αυξημένα επίπεδα IL-1 (είτε ως IL-1α είτε ως IL-1β) έχουν καταγραφεί σε δείγματα καρκίνου μαστού [245], ενώ έχει διαπιστωθεί ότι προάγει την έκφραση του VEGF αλλά και του υποδοχέα του VEGFR2 [246]. Για το σκοπό αυτό, μάλιστα, μπορεί να δρα συνεργικά μαζί με τον παράγοντα NOTCH4, ενός επίσης διαπιστωμένου προ-αγγειογενετικού παράγοντα, που έχει συσχετισθεί με αρνητική πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο μαστού [246]. Η συγκριτικά μειωμένη έκφραση τους στην παρούσα μελέτη κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα μπορεί να δικαιολογηθεί στα πλαίσια της απομάκρυνσης της πρωτοπαθούς εστίας και μαζί πολλών από τους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες που ο ίδιος όγκος παράγει.

Άλλοι παράγοντες που επίσης βρέθηκαν να υποεκφράζονται μετά τη διενέργεια της επέμβασης ήταν ο HIF1A, ο SERPINF1 και οι κυτοκίνες CXCL1, CCL2 και CXCL9. Η CXCL9 είναι μια χυμοκίνη της οποίας ο φυσιολογικός ρόλος δεν έχει ακόμη επακριβώς καθοριστεί. Πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη χημειοταξία των T λεμφοκυττάρων, ενώ έχει βρεθεί ότι απελευθερώνεται και από διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, όπως αυτών του νεφρού αλλά και μελανωμάτων [247]. Σε μια πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα της CXCL9 στον ορό γυναικών με καρκίνο μαστού σε σχέση με υγιείς εθελόντριες που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου [247]. Η CCL2 είναι άλλη μια προ-φλεγμονώδης χυμοκίνη, η οποία ασκεί χημειοτακτική δράση στα μονοκύτταρα και τα βασεόφιλα, ενώ σε σχέση με την καρκινογένεση τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι αντικρουόμενα [248, 249]. Η CXCL1 εκτός από τη συμμετοχή της στους μηχανισμούς της φλεγμονής, φαίνεται να διαθέτει και προ-αγγειογενετικές ιδιότητες [250]. Όσο για τον SERPINF1, πρόκειται για ένα όχι ιδιαίτερα καλά μελετημένο παράγοντα, ο οποίος από τις μέχρι τώρα ενδείξεις δείχνει να διαθέτει αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες [251]. Τέλος, ο HIF1A, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, αποτελεί μόριο-κλειδί στην διαδικασία της αγγειογένεσης, που ενεργοποιείται μάλιστα πρώιμα στον όλο καταρράκτη αντιδράσεων, έχοντας σαν εκλυτικό ερέθισμα την παρουσία ιστικής υποξίας [252].

Συγκριτική έκφραση μεταγράφων αγγειογενετικών γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Ομάδα μελέτης) μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας (D3 έναντι D7)

Την 7^η μετεγχειρητική ημέρα καταγράφηκε μια αύξηση στην έκφραση της CXCL9 χυμοκίνης, η οποία αρχικά είχε φανεί να υποεκφράζεται σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα. Την ακριβώς αντίθετη τάση έδειξε η COL4A3, η οποία την 3^η μετεγχειρητική ημέρα υποεκφραζόταν σε σχέση με τα προ του χειρουργείου επίπεδα. Αυξημένη έκφραση μια βδομάδα μετά το χειρουργείο καταγράφηκε για τον

FGF-1 και τον TEK, καθώς και για την TIMP3, παράγοντες οι οποίοι αναλύθηκαν παραπάνω.

Η Αγγειοποιητίνη 1 (Angiopoietin 1, ANGPT1) είναι μια πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων αλλά και στην νέο-αγγειογένεση που παρατηρείται στον καρκίνο. Συνδεεται με τον υποδοχέα Tie-2 που είναι υποδοχέας του τύπου κινάσης-τυροσίνης και ρυθμίζει διάφορες αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων με την εξωκυττάρια μητρική ουσία, συμβάλλοντας στην σταθεροποίηση και ωρίμανση του αγγειακού ενδοθηλίου [253]. Η ANGPT1 έχει χαρακτηριστεί ως προ-αγγειογενετικός παράγοντας, σε αντίθεση με την ANGPT2, που θεωρείται αναστολέας της αγγειογένεσης [61]. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της νέο-αγγειογένεσης ('angiogenic switch') έχει συσχετισθεί με την επικράτηση της ANGPT2 σε βάρος της ANGPT1 [254]. Τέλος, το μόριο προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, PECAM1), που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο, εμφανίζει μια σειρά από σημαντικές δράσεις σε σχέση με την λειτουργικότητα του αγγειακού ενδοθηλίου, μεταξύ των οποίων και η νέο-αγγειογένεση [255].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς με αδеноκαρκίνωμα μαστού εμφανίζουν διαφορετικό αγγειογενετικό προφίλ σε σχέση με ασθενείς με ινοαδένωμα μαστού (καλοήθης νόσος). Αυτό προκύπτει από την διαπίστωση ότι στην παρούσα μελέτη τα κυκλοφορούντα στο πλάσμα επίπεδα των VEGF-A, IL-8 και bFGF ήταν αυξημένα στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο μαστού, ενώ στις γυναίκες με ινοαδένωμα συχνά ήταν κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης της μεθόδου ELISA. Επιπλέον, στην Ομάδα Μελέτης παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση ενός αριθμού μεταγράφων γονιδίων που αποδεδειγμένα σχετίζονται με την αγγειογένεση. Συνεπώς, μπορεί να λεχθεί ότι οι ασθενείς με αδеноκαρκίνωμα μαστού παρουσιάζουν σε άλλοτε άλλο βαθμό πρόωμη ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης, στα πλαίσια της ανάπτυξης του πρωτοπαθούς όγκου αλλά και της μεταστατικής διασποράς του καρκίνου. Η υιοθέτηση συγκεκριμένων μορίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση ως βιοδεικτών για την διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού απαιτεί ακόμη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που την διέπουν.

Από την άλλη, η επίδραση του χειρουργείου στην αγγειογενετικό καταρράκτη αντιδράσεων στα πλαίσια της επούλωσης του χειρουργικού τραύματος, καταγράφηκε ως μια μεταβολή στην συγκέντρωση των κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων στην παρούσα μελέτη, αλλά και του βαθμού έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων τους (προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών). Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος του κάθε παράγοντα ξεχωριστά απαιτούνται πιο εκτεταμένες και λεπτομερείς αναλύσεις, δεδομένων των εξαιρετικά πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων αυτών με τα στοιχεία της εξωκυττάριας μητρικής ουσίας, των καρκινικών κυττάρων, καθώς και των ενδοθηλιακών και ανοσοποιητικών κυττάρων του ξενιστή. Το γεγονός αυτό θα επιτρέψει το σωστότερο σχεδιασμό αποτελεσματικότερων θεραπευτικών παρεμβάσεων (αντι-αγγειογενετικές θεραπείες), ενώ η ουσιαστική κατανόηση της επίδρασης του χειρουργείου στο μηχανισμό της αγγειογένεσης και στην εξέλιξη της καρκινογένεσης θα δώσει απάντηση στο ερώτημα του πότε ακριβώς πρέπει να χορηγείται η αντι-αγγειογενετική θεραπεία σε σχέση με τον χρόνο της χειρουργικής επέμβασης, δεδομένων των παρενεργειών που προκαλεί στην επούλωση του τραύματος. Η μελέτη της επίδρασης του χειρουργικού τραύματος στη διεργασία της αγγειογένεσης μπορεί να είναι η απάντηση προς την κατεύθυνση αυτή.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Τα πρώιμα δεδομένα της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκαν στο 19^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας που πραγματοποιήθηκε στο Ηράκλειο Κρήτης στις 27-29 Οκτωβρίου 2011, με τον τίτλο: «Post-surgery kinetics of circulating 84 key genes involved in modulating the biological processes of angiogenesis in breast cancer patients undergoing mastectomy»

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκαν στο 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής-Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα στις 21-24 Νοεμβρίου 2012, με τον τίτλο: «Περιεγχειρητική κινητική αγγειορυθμιστικών μορίων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και ινοαδένωμα μαστού»

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δημοσιεύτηκαν στο διεθνές Ιατρικό περιοδικό World Journal of Surgical Oncology στις 27 Αυγούστου 2013 με τον εξής τίτλο: «Georgiou et al.: Impact of breast cancer surgery on angiogenesis circulating biomarkers: a prospective longitudinal study. World Journal of Surgical Oncology 2013, 11:213»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: η ταυτόχρονη εμπλοκή του μηχανισμού της αγγειογένεσης στα διάφορα στάδια καρκινογένεσης αλλά και στην επούλωση ενός χειρουργικού τραύματος, εγείρει τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες συζητήσεις σχετικά με την πιθανή αρνητική επίδραση της χειρουργικής επέμβασης στην επιβίωση πολλών ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Σκοπός: η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε με σκοπό να η διερευνήσει την πιθανή επίδραση του χειρουργείου στον μηχανισμό της αγγειογένεσης, μελετώντας μια σειρά παραγόντων που σχετίζονται με αυτήν σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού πριν και μετά τη διενέργεια της μαστεκτομής και συγκρίνοντάς τους με αντίστοιχες μετρήσεις σε ασθενείς που επίσης υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση στο μαστό, για καλοήγη όμως νόσο.

Υλικό – Μέθοδος: πραγματοποιήθηκε συλλογή φλεβικού αίματος από 10 γυναίκες ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού (Ομάδα Μελέτης) πριν το χειρουργείο (σήμανση ως PRO), καθώς και την 3^η και 7^η μετεγχειρητική ημέρα (σήμανση ως D3 και D7 αντίστοιχα). Επίσης, φλεβικό αίμα συλλέχθηκε και από 6 γυναίκες με ινοαδένωμα μαστού (Ομάδα Ελέγχου) πριν το χειρουργείο (σήμανση ως PRO) και κατά την 3^η μετεγχειρητική ημέρα (D3). Σε αυτά τα δείγματα αίματος αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πλάσματος τριών από τους σημαντικότερους παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A), της Ιντερλευκίνης 8 (Interleukin-8, IL-8) και του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth factor, bFGF ή FGF-2). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα κυκλοφορούντα μετάγραφα 84 γονιδίων που αποδεδειγμένα σχετίζονται με την αγγειογένεση με τη βοήθεια της μεθόδου RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction). Ακολούθησε σύγκριση των εξαγόμενων αποτελεσμάτων μεταξύ των ασθενών της Ομάδας Μελέτης με την Ομάδα Ελέγχου, αλλά και ανάμεσα στους ασθενείς που ανήκαν στην ίδια ομάδα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές πριν και μετά το χειρουργείο. Τέλος, τα δεδομένα συσχετίστηκαν με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου αλλά και την κλινική έκβαση των ασθενών.

Αποτελέσματα: με τη μέθοδο της ELISA αναδείχθηκαν αυξημένα προεγχειρητικά επίπεδα για τον VEGF-A και την IL-8 στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα μαστού σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των ασθενών με ινοαδένωμα μαστού ($p=0,0381$ και $p=0,0218$ αντίστοιχα), ενώ για τον bFGF η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η χειρουργική επέμβαση είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του VEGF-A στο πλάσμα την 3^η ($p=0,0389$) και 7^η μετεγχειρητική ημέρα ($p=0,0172$) σε σχέση με τα αρχικά του επίπεδα. Όσο για την IL-8, η περιεγχειρητική κινητική της έδειξε ήπιες αυξητικές τάσεις μετά την επέμβαση χωρίς στατιστική σημασία. Τα μετεγχειρητικά επίπεδα του bFGF ήταν ελαφρώς αυξημένα την 3^η μετεγχειρητική ημέρα σε σχέση με τις προεγχειρητικές τιμές, ενώ την 7^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν

χαμηλότερες ακόμη και από τα προ του χειρουργείου επίπεδα ($p=0,0205$). Σε ότι αφορά στην μελέτη με την RT-PCR, αναδείχθηκαν διαφορές στα κυκλοφορούντα μεταγράφα ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση μεταξύ των ασθενών της Ομάδας Ελέγχου και της Ομάδας Μελέτης: υπερέκφραση των VEGF-C, EGF, IL-8, FGF-1, SPHK1, NRP1, LAMA5, COL4A3, TEK, EFNA3, EFNB2, AKT1, ITGB3, THBS1, CCL11, TIMP3 και υποέκφραση της CXCL10. Επιπλέον, η μαστεκτομή προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην έκφραση πολλών γονιδίων την 3^η μετεγχειρητική ημέρα στους ασθενείς με καρκίνο μαστού: υπερέκφραση των THBS1, COL4A3, BAI1, ITGB3 και υποέκφραση των EREG, SERPINF1, CXCL9, CXCL10, IL1B, CCL2, CXCL1, HIF1A, NOTCH4.

Συμπεράσματα: οι ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα μαστού έχουν διαφορετικό αγγειογενετικό προφίλ σε σχέση με τις ασθενείς με ινοαδένωμα μαστού, όπως φαίνεται από τα διαφορετικά επίπεδα κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων στο περιφερικό αίμα τους. Τα επίπεδα αυτά μεταβάλλονται μετά την επέμβαση, με τον VEGF να εμφανίζει μια παροδική αύξηση και τον bFGF μια αρχική αύξηση που όμως ακολουθείται από απότομη πτώση. Επιπλέον, η επίδραση της μαστεκτομής συνίσταται σε σημαντικές μεταβολές στον τρόπο έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδιακών μεταγράφων που σχετίζονται με την αγγειογένεση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ (ABSTRACT)

Background: angiogenesis is seen during the multiple stages of carcinogenesis, as well as during the process of surgical wound healing, a fact which has led to substantial debate over the last decades about the potential impact of surgery upon the final outcome of ceratin patients treated for breast cancer.

Aim: the present research aims at investigating the potential effect of surgery on the process of angiogenesis, by studying a number of factors that are related to the latter, in patients suffering from breast cancer before and after the time of the procedure, whilst comparing these results with those of patients that were operated on their breast for non-malignant disease.

Material-Methods: blood from 10 female patients with breast adenocarcinoma (Study Group) was collected via venipuncture before surgery (labeled as PRO), as well as on post-operative day 3 (labeled as D3) and day 7 (labeled as D7). Moreover, blood samples were also taken from 6 female patients with fibroadenoma (Control Group) before surgery (PRO) and on day 3 afetr surgery (D3). These samples were measured for detection of circulating levels of three established angiogenesis biomarkers using ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEFG-A), Interleukin-8 (IL-8) and basic Fibroblast Growth factor (bFGF or FGF-2). In addition, circulating transcripts of 84 agiogenesi-related genes were determined using RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction). The two groups of patients were firstly compared to each other regarding their results. Also, patients belonging to the Study Group were analized at different time points regarding surgery. Finally, the results were investigated against clinicopathological data and patient outcome.

Results: using ELISA we were able to detect increased levels of circulating VEGF-A and IL-8 in the Study Group patients compared to the Control Group patients preoperatively ($p=0,0381$ and $p=0,0218$ respectively), while for bFGF there was no statistically significant difference documented. Surgery resulted in a significant increase in VEGF-A levels on D3 ($p=0,0389$) and D7 ($p=0,0172$) as compared to PRO levels. Perioperative kinetics of IL-8 showed a mild trend towards increase, which, however, was not statistically significant. Postoperative levels of bFGF were slightly increased on D3, but on D7 they were even lower than preoperative values ($p=0,0205$). Using RT-PCR certain differences between the Study Group and the Control Group were recorded regarding the circulating transcripts of a great number of angiogenesis-related genes preoperatively: upregulation of VEGF-C, EGF, IL-8, FGF-1, SPHK1, NRP1, LAMA5, COL4A3, TEK, EFNA3, EFNB2. AKT1, ITGB3, THBS1, CCL11, TIMP3 and downregulation of CXCL10. Moreover, mastectomy induced an altered expression in several key-genes in breast cancer patients: upregulation of THBS1, COL4A3, BAI1, ITGB3 and downregulation of EREG, SERPIFN1, CXCL9, CXCL10, IL1B, CCL2, CXCL1, HIF1A, NOTCH4.

Conclusions: patients suffering from breast cancer have a different angiogenic profile in comparison to patients with fibroadenoma, as documented through their differences in circulating levels of angiogenic factors. These levels are greatly changed after the surgical procedure. VEGF showed a transient increase, while bFGF initially increased but only to finally decrease to levels that were even lower than the preoperative ones. Moreover, mastectomy promoted a shift in the expression pattern of a broad panel of angiogenesis-related gene transcripts.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *World Cancer Report*. International Agency for Research on Cancer, 2008.
2. American Cancer Society.: *Cancer Facts and Figures 2013*. Atlanta, G.A.C.S., 2013.
3. Fentiman, I.S., A. Fourquet, and G.N. Hortobagyi, *Male breast cancer*. *Lancet*, 2006. 367(9510): p. 595-604.
4. NCCN, *Breast cancer*. version 3.2013.
5. Baum, M., et al., *Does surgery unfavourably perturb the "natural history" of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases?* *Eur J Cancer*, 2005. 41(4): p. 508-15.
6. Michael Retsky, R.D., William Hrushesky, Michael Baum and Isaac Gukas *Surgery Triggers Outgrowth of Latent Distant Disease in Breast Cancer: An Inconvenient Truth?* *Cancers*, 2010(2): p. 305-337.
7. Irving, A., *A historical review of breast cancer treatment*. Johnson, Wise, eds. *Breast Cancer: Controversies in Management.*, 1994.
8. Virchow, R., *Die Krankhaften Geschwulste, Vol. 1*, Berlin, Hirshwald Publisers. p. 1863-1873.
9. Demicheli, R., et al., *The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations*. *Ann Oncol*, 2008. 19(11): p. 1821-8.
10. Rosen, P.R., et al., *A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma*. *J Clin Oncol*, 1989. 7(3): p. 355-66.
11. Fisher, B., *Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture*. *Cancer Res*, 1980. 40(11): p. 3863-74.
12. Demicheli, R., et al., *Proposal for a new model of breast cancer metastatic development*. *Ann Oncol*, 1997. 8(11): p. 1075-80.
13. Klauber-DeMore, N., et al., *Biological behavior of human breast cancer micrometastases*. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(8): p. 2434-9.
14. Norton, L., *A Gompertzian model of human breast cancer growth*. *Cancer Res*, 1988. 48(24 Pt 1): p. 7067-71.
15. Demicheli, R., et al., *Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86(1): p. 45-8.
16. Demicheli, R., et al., *Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy*. *Breast Cancer Res Treat*, 1996. 41(2): p. 177-85.
17. Hadfield, G., *The dormant cancer cell*. *Br Med J*, 1954. 2(4888): p. 607-10.
18. Meltzer, A., *Dormancy and breast cancer*. *J Surg Oncol*, 1990. 43(3): p. 181-8.
19. Holmgren, L., M.S. O'Reilly, and J. Folkman, *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. *Nat Med*, 1995. 1(2): p. 149-53.
20. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. 285(21): p. 1182-6.
21. Fan, F., et al., *Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis*. *J Oncol*, 2012. 2012: p. 281261.
22. Hertig, A., *Angiogenesis in th early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey*. *Contributions to Embryology*, 1935. 25: p. 37-81.
23. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. *J Exp Med*, 1971. 133(2): p. 275-88.
24. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. *Cell*, 1996. 86(3): p. 353-64.
25. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6(4): p. 273-86.
26. Demicheli, R., et al., *Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007. 4(12): p. 699-710.
27. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. *J Biol Chem*, 1992. 267(16): p. 10931-4.
28. John, A.R., S.R. Bramhall, and M.C. Eggo, *Antiangiogenic therapy and surgical practice*. *Br J Surg*, 2008. 95(3): p. 281-93.
29. Indraccolo, S., E. Favaro, and A. Amadori, *Dormant tumors awaken by a short-term angiogenic burst: the spike hypothesis*. *Cell Cycle*, 2006. 5(16): p. 1751-5.

30. Simpson-Herren, L., A.H. Sanford, and J.P. Holmquist, *Effects of surgery on the cell kinetics of residual tumor*. *Cancer Treat Rep*, 1976. 60(12): p. 1749-60.
31. Gunduz, N., B. Fisher, and E.A. Saffer, *Effect of surgical removal on the growth and kinetics of residual tumor*. *Cancer Res*, 1979. 39(10): p. 3861-5.
32. Varani, J., E.J. Lovett, 3rd, and J. Lundy, *A model of tumor cell dormancy: effects of anesthesia and surgery*. *J Surg Oncol*, 1981. 17(1): p. 9-14.
33. Keller, R., *Elicitation of macroscopic metastases via surgery: various forms of surgical intervention differ in their induction of metastatic outgrowth*. *Invasion Metastasis*, 1983. 3(3): p. 183-92.
34. Fisher, B., et al., *Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice*. *Cancer Res*, 1989. 49(8): p. 1996-2001.
35. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization*. *J Exp Med*, 1972. 136(2): p. 261-76.
36. Luzzi, K.J., 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): p. 865-73.
37. Fisher, B. and E.R. Fisher, *Experimental evidence in support of the dormant tumor cell*. *Science*, 1959. 130(3380): p. 918-9.
38. Arbiser, J.L., et al., *Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(3): p. 861-6.
39. Naumov, G.N., et al., *Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy*. *Cancer Res*, 2002. 62(7): p. 2162-8.
40. Shirakawa, K., et al., *Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer*. *Int J Cancer*, 2002. 99(3): p. 344-51.
41. Naumov, G.N., L.A. Akslen, and J. Folkman, *Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch*. *Cell Cycle*, 2006. 5(16): p. 1779-87.
42. Li, C.Y., et al., *Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(2): p. 143-7.
43. Meng, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(24): p. 8152-62.
44. Folkman, J. and R. Kalluri, *Cancer without disease*. *Nature*, 2004. 427(6977): p. 787.
45. Black, W.C. and H.G. Welch, *Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy*. *N Engl J Med*, 1993. 328(17): p. 1237-43.
46. Nielsen, M., et al., *Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies*. *Br J Cancer*, 1987. 56(6): p. 814-9.
47. Whitmore, W.F., Jr., *Proceedings: The natural history of prostatic cancer*. *Cancer*, 1973. 32(5): p. 1104-12.
48. Montie, J.E., et al., *Adenocarcinoma of the prostate in cystoprostatectomy specimens removed for bladder cancer*. *Cancer*, 1989. 63(2): p. 381-5.
49. Lorier, G., C. Tourino, and R.A. Kalil, *Coronary angiogenesis as an endogenous response to myocardial ischemia in adults*. *Arq Bras Cardiol*, 2011. 97(6): p. e140-8.
50. Risau, W., et al., *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies*. *Development*, 1988. 102(3): p. 471-8.
51. Gerwins, P., E. Skoldenberg, and L. Claesson-Welsh, *Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000. 34(3): p. 185-94.
52. Risau, W., *Differentiation of endothelium*. *FASEB J*, 1995. 9(10): p. 926-33.
53. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. 275(5302): p. 964-7.
54. Hofer, S.O., et al., *The effect of surgical wounding on tumour development*. *Eur J Surg Oncol*, 1999. 25(3): p. 231-43.
55. Costa, P.Z. and R. Soares, *Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox*. *Life Sci*, 2013.
56. Adamis, A.P., et al., *Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*. *Am J Ophthalmol*, 1994. 118(4): p. 445-50.
57. Tahergorabi, Z. and M. Khazaei, *Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms*. *Int J Prev Med*, 2012. 3(12): p. 827-38.
58. Mitsos, S., et al., *Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials*. *Angiogenesis*, 2012. 15(1): p. 1-22.

59. Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 282(5): p. C947-70.
60. Griffioen, A.W. and G. Molema, *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. Pharmacol Rev, 2000. 52(2): p. 237-68.
61. Atkin, G.K. and A. Chopada, *Tumour angiogenesis: the relevance to surgeons*. Ann R Coll Surg Engl, 2006. 88(6): p. 525-9.
62. Moses, M.A., *The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Stem Cells, 1997. 15(3): p. 180-9.
63. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. 82(1): p. 4-6.
64. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. 339(6219): p. 58-61.
65. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. 16(9): p. 4604-13.
66. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res, 1999. 59(22): p. 5830-5.
67. Shirakawa, K., et al., *Induction of vasculogenesis in breast cancer models*. Br J Cancer, 2002. 87(12): p. 1454-61.
68. Folberg, R., M.J. Hendrix, and A.J. Maniatis, *Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis*. Am J Pathol, 2000. 156(2): p. 361-81.
69. Chang, Y.S., et al., *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(26): p. 14608-13.
70. van der Bilt, J.D. and I.H. Borel Rinkes, *Surgery and angiogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1654(1): p. 95-104.
71. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. 315(26): p. 1650-9.
72. Murthy, S.M., et al., *The influence of surgical trauma on experimental metastasis*. Cancer, 1989. 64(10): p. 2035-44.
73. Bogden, A.E., J.P. Moreau, and P.A. Eden, *Proliferative response of human and animal tumours to surgical wounding of normal tissues: onset, duration and inhibition*. Br J Cancer, 1997. 75(7): p. 1021-7.
74. Lee, J.Y., S.M. Murphy, and E.F. Scanlon, *Effect of trauma on implantation of metastatic tumor in bone in mice*. J Surg Oncol, 1994. 56(3): p. 178-84.
75. Abramovitch, R., et al., *Stimulation of tumour angiogenesis by proximal wounds: spatial and temporal analysis by MRI*. Br J Cancer, 1998. 77(3): p. 440-7.
76. Abramovitch, R., et al., *Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors*. Br J Cancer, 1999. 79(9-10): p. 1392-8.
77. Tagliabue, E., et al., *Role of HER2 in wound-induced breast carcinoma proliferation*. Lancet, 2003. 362(9383): p. 527-33.
78. Martinez, J., et al., *Port site metastasis. An unresolved problem in laparoscopic surgery. A review*. Int Surg, 1995. 80(4): p. 315-21.
79. Nduka, C.C. and A. Darzi, *Port-site metastasis in patients undergoing laparoscopy for gastrointestinal malignancy*. Br J Surg, 1997. 84(4): p. 583.
80. Condon, E.T., et al., *Laparoscopic surgery protects against the oncologic adverse effects of open surgery by attenuating endothelial progenitor cell mobilization*. Surg Endosc, 2007. 21(1): p. 87-90.
81. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. 1(1): p. 27-31.
82. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. 357(9255): p. 539-45.
83. Kraft, A., et al., *Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease*. Cancer, 1999. 85(1): p. 178-87.
84. Folkman, J., *Targeted Therapies in Rheumatology (eds Smolen, J. S. & Lipsky P. E.) p111-131 (Martin Dunitz, London). 2003*.
85. Cao, Y., *Erythropoietin in cancer: a dilemma in risk therapy*. Trends Endocrinol Metab, 2013. 24(4): p. 190-9.
86. Acs, G., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. Cancer Res, 2001. 61(9): p. 3561-5.

87. Schaper W., S.J., *Collateral Circulation; Heart, Brain, Kidney, Limbs*. Kluwer Academic Publishers (Boston), 1993.
88. Jain, R.K., et al., *Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. 6(6): p. 327-38.
89. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman, *Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(12): p. 883-93.
90. Longatto Filho, A., J.M. Lopes, and F.C. Schmitt, *Angiogenesis and breast cancer*. *J Oncol*, 2010. 2010.
91. Bertolini, F., et al., *Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology*. *Drug Discov Today*, 2007. 12(19-20): p. 806-12.
92. Goulart, B.H., et al., *Trends in the use and role of biomarkers in phase I oncology trials*. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(22 Pt 1): p. 6719-26.
93. Kornacker, M., et al., *Quantification of vascular endothelial growth factor, interleukin-8, and basic fibroblast growth factor in plasma of cancer patients and healthy volunteers - comparison of ELISA and microsphere-based multiplexed immunoassay*. *Clin Chem Lab Med*, 2008. 46(9): p. 1256-64.
94. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. *Science*, 1983. 219(4587): p. 983-5.
95. Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. *J Cell Mol Med*, 2005. 9(4): p. 777-94.
96. Holmes, D.I. and I. Zachary, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease*. *Genome Biol*, 2005. 6(2): p. 209.
97. Pande, D., et al., *Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer*. *J Breast Cancer*, 2011. 14(3): p. 181-4.
98. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
99. Yamazaki, Y. and T. Morita, *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. *Mol Divers*, 2006. 10(4): p. 515-27.
100. Kut, C., F. Mac Gabhann, and A.S. Popel, *Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer*. *Br J Cancer*, 2007. 97(7): p. 978-85.
101. Dvorak, H.F., *Angiogenesis: update 2005*. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8): p. 1835-42.
102. Bando, H., et al., *Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer*. *Br J Cancer*, 2005. 92(3): p. 553-61.
103. Makinen, T., et al., *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. *EMBO J*, 2001. 20(17): p. 4762-73.
104. Cao, R., et al., *Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability*. *Circ Res*, 2004. 94(5): p. 664-70.
105. Gasparini, G., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer*. *Oncologist*, 2000. 5 Suppl 1: p. 37-44.
106. Nishimura, R., et al., *Higher plasma vascular endothelial growth factor levels correlate with menopause, overexpression of p53, and recurrence of breast cancer*. *Breast Cancer*, 2003. 10(2): p. 120-8.
107. Zhao, J., et al., *Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer*. *Cancer Lett*, 2004. 204(1): p. 87-95.
108. Italiano, J.E., Jr., et al., *Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released*. *Blood*, 2008. 111(3): p. 1227-33.
109. Salven, P., A. Orpana, and H. Joensuu, *Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor*. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(3): p. 487-91.
110. George, M.L., et al., *Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet scavenging?* *Clin Cancer Res*, 2000. 6(8): p. 3147-52.

111. McIlhenny, C., W.D. George, and J.C. Doughty, *A comparison of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor during the menstrual cycle in healthy female volunteers*. Br J Cancer, 2002. 86(11): p. 1786-9.
112. Salgado, R., et al., *Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study*. Angiogenesis, 2001. 4(1): p. 37-43.
113. Arisato, T., et al., *Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region*. J Thromb Haemost, 2003. 1(12): p. 2589-93.
114. Gasparini, G., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1997. 89(2): p. 139-47.
115. Gasparini, G. and A.L. Harris, *Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool*. J Clin Oncol, 1995. 13(3): p. 765-82.
116. Nicolini, A., 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): p. 275-81.
117. Moran, M.S., et al., *Evaluation of vascular endothelial growth factor as a prognostic marker for local relapse in early-stage breast cancer patients treated with breast-conserving therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011. 81(5): p. 1236-43.
118. Balsari, A., et al., *Correlation between tumor vascularity, vascular endothelial growth factor production by tumor cells, serum vascular endothelial growth factor levels, and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma*. Lab Invest, 1999. 79(7): p. 897-902.
119. Garvin, S. and C. Dabrosin, *In vivo measurement of tumor estradiol and vascular endothelial growth factor in breast cancer patients*. BMC Cancer, 2008. 8: p. 73.
120. Caine, G.J., et al., *A comparison of plasma versus histologic indices of angiogenic markers in breast cancer*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007. 15(4): p. 382-8.
121. Karayiannakis, A.J., et al., *Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds*. Eur Surg Res, 2003. 35(6): p. 492-6.
122. Wu, F.P., et al., *VEGF and endostatin levels in wound fluid and plasma after breast surgery*. Angiogenesis, 2003. 6(4): p. 255-7.
123. Adams, J., 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): p. 2898-905.
124. Benoy, I., et al., *Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients*. Clin Breast Cancer, 2002. 2(4): p. 311-5.
125. Rykala, J., et al., *Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables*. Pathol Oncol Res, 2011. 17(4): p. 809-17.
126. Konukoglu, D., et al., *Relation of serum vascular endothelial growth factor as an angiogenesis biomarker with nitric oxide & urokinase-type plasminogen activator in breast cancer patients*. Indian J Med Res, 2007. 125(6): p. 747-51.
127. Yamamoto, Y., et al., *Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients*. Clin Cancer Res, 1996. 2(5): p. 821-6.
128. Caine, G.J., et al., *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1*. Eur J Clin Invest, 2003. 33(10): p. 883-90.
129. Bondestam, J., et al., *Major surgery increases serum levels of vascular endothelial growth factor only temporarily*. Am J Surg, 2000. 179(1): p. 57-9.
130. Curigliano, G., et al., *Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery*. Breast Cancer Res Treat, 2005. 93(1): p. 35-40.
131. Belizon, A., et al., *Major abdominal surgery increases plasma levels of vascular endothelial growth factor: open more so than minimally invasive methods*. Ann Surg, 2006. 244(5): p. 792-8.
132. Hormbrey, E., et al., *The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis*. Clin Cancer Res, 2003. 9(12): p. 4332-9.
133. Caine, G.J., et al., *Changes in plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors following surgery for breast cancer*. Cancer Lett, 2007. 248(1): p. 131-6.

134. Retsky, M.W., et al., *Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer*. *APMIS*, 2008. 116(7-8): p. 730-41.
135. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. *Neuro Oncol*, 2005. 7(2): p. 122-33.
136. Qazi, B.S., K. Tang, and A. Qazi, *Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis*. *Int J Inflam*, 2011. 2011: p. 908468.
137. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(21): p. 6735-41.
138. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. *Science*, 1991. 253(5025): p. 1278-80.
139. Murphy, P.M. and H.L. Tiffany, *Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor*. *Science*, 1991. 253(5025): p. 1280-3.
140. Nakamura, H., et al., *Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line*. *J Clin Invest*, 1992. 89(5): p. 1478-84.
141. Marini, M., et al., *Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 1992. 89(5): p. 1001-9.
142. Donnelly, S.C., et al., *Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups*. *Lancet*, 1993. 341(8846): p. 643-7.
143. Benoy, I.H., et al., *Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(21): p. 7157-62.
144. Xie, K., *Interleukin-8 and human cancer biology*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001. 12(4): p. 375-91.
145. Haraguchi, M., et al., *Elevated IL-8 levels in the drainage vein of resectable Dukes' C colorectal cancer indicate high risk for developing hepatic metastasis*. *Oncol Rep*, 2002. 9(1): p. 159-65.
146. Yuan, A., et al., *Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. 20(4): p. 900-10.
147. Ugurel, S., et al., *Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival*. *J Clin Oncol*, 2001. 19(2): p. 577-83.
148. Huang, S., et al., *Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma*. *Am J Pathol*, 2002. 161(1): p. 125-34.
149. Green, A.R., et al., *Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours*. *Int J Cancer*, 1997. 72(6): p. 937-41.
150. Miller, L.J., et al., *Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue*. *Anticancer Res*, 1998. 18(1A): p. 77-81.
151. Strieter, R.M., et al., *Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization*. *Am J Pathol*, 1992. 141(6): p. 1279-84.
152. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. *Science*, 1992. 258(5089): p. 1798-801.
153. Hu, D.E., Y. Hori, and T.P. Fan, *Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats*. *Inflammation*, 1993. 17(2): p. 135-43.
154. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. *J Immunol*, 2003. 170(6): p. 3369-76.
155. Kunz, M., et al., *Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness*. *Am J Pathol*, 1999. 155(3): p. 753-63.
156. Lyon, D.E., et al., *Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy*. *Nurs Res*, 2008. 57(1): p. 51-8.
157. Ahmed, O.I., et al., *Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients*. *Egypt J Immunol*, 2006. 13(2): p. 61-8.

158. Fuksiewicz, M., et al., *Serum cytokine levels and the expression of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients*. Clin Chem Lab Med, 2006. 44(9): p. 1092-7.
159. Kozłowski, L., et al., *Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients*. Roczniki Akad Med Białymst, 2003. 48: p. 82-4.
160. Zakrzewska, I. and J. Omyła, [The value of plasma interleukin-6 and interleukin-8 in monitoring of patients with breast cancer]. Pol Merkuriusz Lekarski, 2005. 18(106): p. 424-6.
161. Hamed, E.A., M.M. Zakhary, and D.W. Maximous, *Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. 138(6): p. 999-1009.
162. Pusztai, L., et al., *Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy*. Cytokine, 2004. 25(3): p. 94-102.
163. Derin, D., et al., *Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer*. Med Oncol, 2007. 24(2): p. 163-8.
164. Wesche, J., K. Haglund, and E.M. Haugsten, *Fibroblast growth factors and their receptors in cancer*. Biochem J, 2011. 437(2): p. 199-213.
165. Tarabouletti, G., et al., *Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors*. Oncotarget, 2010. 1(7): p. 662-73.
166. Powers, C.J., S.W. McLeskey, and A. Wellstein, *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. Endocr Relat Cancer, 2000. 7(3): p. 165-97.
167. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(2): p. 159-78.
168. Penault-Llorca, F., et al., *Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer*. Int J Cancer, 1995. 61(2): p. 170-6.
169. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. Cancer Cell, 2006. 10(6): p. 515-27.
170. Xian, W., et al., *Fibroblast growth factor receptor 1-transformed mammary epithelial cells are dependent on RSK activity for growth and survival*. Cancer Res, 2009. 69(6): p. 2244-51.
171. Xian, W., et al., *Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model*. J Cell Biol, 2005. 171(4): p. 663-73.
172. Yoshimura, N., et al., *The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. 89(1): p. 28-34.
173. Slavina, J., *Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis*. Cell Biol Int, 1995. 19(5): p. 431-44.
174. Gospodarowicz, D., *Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth*. Nature, 1974. 249(453): p. 123-7.
175. Przybylski, M., *A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis*. J Wound Care, 2009. 18(12): p. 516-9.
176. Pepper, M.S., et al., *Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 189(2): p. 824-31.
177. Turner, N., et al., *Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets*. Oncogene, 2010. 29(14): p. 2013-23.
178. Giulianelli, S., et al., *Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis*. Int J Cancer, 2008. 123(11): p. 2518-31.
179. Relf, M., et al., *Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis*. Cancer Res, 1997. 57(5): p. 963-9.
180. Anandappa, S.Y., et al., *Comparative expression of fibroblast growth factor mRNAs in benign and malignant breast disease*. Br J Cancer, 1994. 69(4): p. 772-6.
181. Smith, K., et al., *Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival*. Ann Oncol, 1999. 10(6): p. 707-13.

182. Dabrosin, C., *Positive correlation between estradiol and vascular endothelial growth factor but not fibroblast growth factor-2 in normal human breast tissue in vivo*. Clin Cancer Res, 2005. 11(22): p. 8036-41.
183. Hewala, T.I., et al., *Diagnostic and prognostic value of serum nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, basic fibroblast growth factor and copper as angiogenic markers in premenopausal breast cancer patients: a case-control study*. Br J Biomed Sci, 2010. 67(4): p. 167-76.
184. Sliutz, G., et al., *Serum evaluation of basic FGF in breast cancer patients*. Anticancer Res, 1995. 15(6B): p. 2675-7.
185. Larsson, A., E. Skoldenberg, and H. Ericson, *Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors*. Angiogenesis, 2002. 5(1-2): p. 107-10.
186. Fuhrmann-Benzakein, E., et al., *Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients*. Int J Cancer, 2000. 85(1): p. 40-5.
187. Klement, G.L., et al., *Platelets actively sequester angiogenesis regulators*. Blood, 2009. 113(12): p. 2835-42.
188. Kim, R.H., et al., *Export and functions of sphingosine-1-phosphate*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1791(7): p. 692-6.
189. Anelli, V., et al., *Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro*. FASEB J, 2010. 24(8): p. 2727-38.
190. Pyne, S. and N.J. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells*. Biochem J, 2000. 349(Pt 2): p. 385-402.
191. Nagahashi, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis*. Cancer Res, 2012. 72(3): p. 726-35.
192. Aoyagi, T., et al., *The role of sphingosine-1-phosphate in breast cancer tumor-induced lymphangiogenesis*. Lymphat Res Biol, 2012. 10(3): p. 97-106.
193. Cuvillier, O., et al., *Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: implications for therapeutic targeting*. Curr Mol Pharmacol, 2010. 3(2): p. 53-65.
194. Nava, V.E., et al., *Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells*. Exp Cell Res, 2002. 281(1): p. 115-27.
195. Takuwa, N., et al., *Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 - Jekyll Hidden behind Hyde*. Am J Cancer Res, 2011. 1(4): p. 460-81.
196. Ader, I., B. Malavaud, and O. Cuvillier, *When the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy*. Cancer Res, 2009. 69(9): p. 3723-6.
197. Ruckhaberle, E., et al., *Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. 112(1): p. 41-52.
198. Bansal, G.S., et al., *Expression of fibroblast growth factor 1 is lower in breast cancer than in the normal human breast*. Br J Cancer, 1995. 72(6): p. 1420-6.
199. Jaakkola, S., et al., *Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers*. Int J Cancer, 1993. 54(3): p. 378-82.
200. La Rosa, S., et al., *Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas*. J Clin Pathol, 2001. 54(1): p. 37-41.
201. Mohammed, R.A., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis*. Br J Cancer, 2007. 96(7): p. 1092-100.
202. Zhao, Y.C., et al., *Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients*. World J Surg Oncol, 2012. 10: p. 165.
203. Li, X., X. Dang, and X. Sun, *Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis*. Eur J Gynaecol Oncol, 2012. 33(2): p. 178-82.
204. Nakamura, Y., et al., *Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up*. Mod Pathol, 2003. 16(4): p. 309-14.
205. Wang, J., et al., *Lymphatic microvessel density and vascular endothelial growth factor-C and -D as prognostic factors in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature*. Mol Biol Rep, 2012. 39(12): p. 11153-65.

206. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. *Gene*, 2006. 366(1): p. 2-16.
207. Hardy, K.M., et al., *ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. 15(2): p. 191-9.
208. Foley, J., et al., *EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. 21(9): p. 951-60.
209. Tabernero, J., *The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents*. *Mol Cancer Res*, 2007. 5(3): p. 203-20.
210. Sun, J., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells*. *J Signal Transduct*, 2010. 2010: p. 985132.
211. Qi, J.H., et al., *A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2*. *Nat Med*, 2003. 9(4): p. 407-15.
212. Jiang, X., et al., *[Relationship between tissue inhibitors of metalloproteinase and metastasis and prognosis in breast cancer]*. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2000. 38(4): p. 291-3, 19.
213. Peterson, N.B., et al., *Polymorphisms in tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -3 and breast cancer susceptibility and survival*. *Int J Cancer*, 2009. 125(4): p. 844-50.
214. Lopez-Dee, Z., K. Pidcock, and L.S. Gutierrez, *Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation*. *Mediators Inflamm*, 2011. 2011: p. 296069.
215. Kyriakides, T.R. and S. Maclauchlan, *The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction*. *J Cell Commun Signal*, 2009. 3(3-4): p. 215-25.
216. Zhang, X. and J. Lawler, *Thrombospondin-based antiangiogenic therapy*. *Microvasc Res*, 2007. 74(2-3): p. 90-9.
217. Clezardin, P., et al., *Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast*. *Cancer Res*, 1993. 53(6): p. 1421-30.
218. Bertin, N., et al., *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): p. 396-9.
219. Gagnon, M.L., et al., *Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(6): p. 2573-8.
220. Vintonenko, N., et al., *Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRPI under stress conditions*. *Cell Adh Migr*, 2011. 5(4): p. 332-43.
221. Glinka, Y., et al., *Neuropilin-1 is expressed by breast cancer stem-like cells and is linked to NF-kappaB activation and tumor sphere formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 425(4): p. 775-80.
222. Jubb, A.M., et al., *Neuropilin-1 expression in cancer and development*. *J Pathol*, 2012. 226(1): p. 50-60.
223. Kaenel, P., M. Mosimann, and A.C. Andres, *The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer*. *Cell Adh Migr*, 2012. 6(2): p. 138-47.
224. Brantley-Sieders, D.M., *Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling*. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. 23(1): p. 102-8.
225. Spenle, C., et al., *Laminin alpha5 guides tissue patterning and organogenesis*. *Cell Adh Migr*, 2013. 7(1): p. 90-100.
226. Kusuma, N., R.L. Anderson, and N. Pouliot, *Laminin alpha5-derived peptides modulate the properties of metastatic breast tumour cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2011. 28(8): p. 909-21.
227. Zheng, Q., et al., *Association study between of Tie2/angiopoietin-2 and VEGF/KDR pathway gene polymorphisms and vascular malformations*. *Gene*, 2013. 523(2): p. 195-8.
228. Ye, C., et al., *Somatic mutations in exon 17 of the TEK gene in vascular tumors and vascular malformations*. *J Vasc Surg*, 2011. 54(6): p. 1760-8.
229. Iacovides, D.C., et al., *Identification and quantification of AKT isoforms and phosphoforms in breast cancer using a novel nanofluidic immunoassay*. *Mol Cell Proteomics*, 2013.
230. Watson, K.L. and R.A. Moorehead, *Loss of Akt1 or Akt2 delays mammary tumor onset and suppresses tumor growth rate in MTB-IGFIR transgenic mice*. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 375.

231. Devapatla, B., J. Sanders, and D.J. Samuelson, *Genetically determined inflammatory-response related cytokine and chemokine transcript profiles between mammary carcinoma resistant and susceptible rat strains*. *Cytokine*, 2012. 59(2): p. 223-7.
232. Jiang, C.P., et al., *High COL4A3 expression correlates with poor prognosis after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer*. *Tumour Biol*, 2013. 34(1): p. 415-20.
233. Nie, X.C., et al., *COL4A3 expression correlates with pathogenesis, pathologic behaviors, and prognosis of gastric carcinomas*. *Hum Pathol*, 2013. 44(1): p. 77-86.
234. Nurden, A.T., et al., *Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models*. *Blood*, 2011. 118(23): p. 5996-6005.
235. Datta, D., et al., *Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer*. *Cancer Res*, 2006. 66(19): p. 9509-18.
236. Goldberg-Bittman, L., et al., *The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines*. *Immunol Lett*, 2004. 92(1-2): p. 171-8.
237. Luster, A.D. and P. Leder, *IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo*. *J Exp Med*, 1993. 178(3): p. 1057-65.
238. Romagnani, P., et al., *Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity*. *J Clin Invest*, 2001. 107(1): p. 53-63.
239. Abreu-Velez, A.M. and M.S. Howard, *Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes*. *N Am J Med Sci*, 2012. 4(1): p. 1-8.
240. Nishimori, H., et al., *A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis*. *Oncogene*, 1997. 15(18): p. 2145-50.
241. Duda, D.G., et al., *Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumour angiogenesis*. *Br J Cancer*, 2002. 86(3): p. 490-6.
242. Cork, S.M. and E.G. Van Meir, *Emerging roles for the BAI1 protein family in the regulation of phagocytosis, synaptogenesis, neurovasculature, and tumor development*. *J Mol Med (Berl)*, 2011. 89(8): p. 743-52.
243. Komurasaki, T., et al., *Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4*. *Oncogene*, 1997. 15(23): p. 2841-8.
244. Revillion, F., et al., *ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis*. *Ann Oncol*, 2008. 19(1): p. 73-80.
245. Apte, R.N., et al., *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(3): p. 387-408.
246. Guo, S. and R.R. Gonzalez-Perez, *Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer*. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e21467.
247. Ruiz-Garcia, E., et al., *Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening*. *Br J Cancer*, 2010. 102(3): p. 462-8.
248. Mitchem, J.B. and D.G. Denardo, *Battle over CCL2 for control of the metastatic niche: neutrophils versus monocytes*. *Breast Cancer Res*, 2012. 14(4): p. 315.
249. Wang, J., et al., *Chemokines fluctuate in the progression of primary breast cancer*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013. 17(5): p. 596-608.
250. Miyake, M., et al., *Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways*. *Lab Invest*, 2013. 93(7): p. 768-78.
251. Ren, J.G., C. Jie, and C. Talbot, *How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway*. *Med Hypotheses*, 2005. 64(1): p. 74-8.
252. Rundqvist, H. and R.S. Johnson, *Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis*. *J Intern Med*, 2013. 274(2): p. 105-12.
253. Fukuhara, S., et al., *Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis*. *Histol Histopathol*, 2010. 25(3): p. 387-96.
254. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. *J Pathol*, 2004. 204(1): p. 1-10.

255. Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh, *PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(12): p. 2514-23.