



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**

**ΛΑΜΠΡΗ Σ. ΕΥΑΓΓΕΛΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**

**ΛΑΜΠΡΗ Σ. ΕΥΑΓΓΕΛΗ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

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 της κ. Λάμπρη Ευαγγελή: 11-11-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 551^α/29-3-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία –Εμβρυολογία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-6-2005

«Μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αγγειογένεση στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου. Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 557^α/24-5-2005

Επιβλέπουσα

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπριασούλης Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 752^α/16-5-2013

Αγνάντη Νίκη	Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία – Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Καθηγητής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής

Μπατιστάτου Άννα

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-10-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Ανδρέας Φωτόπουλος

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος



Μαρία Καπιτοπούλου

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αφιερώνεται
στη μνήμη του αδερφού μου
Αλέξανδρου Λάμπρη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ολοκληρώνοντας αυτό το μακρύ ταξίδι, η συγγραφή αυτής της ενότητας μου δίνει ιδιαίτερη χαρά, γνωρίζοντας ότι στην πορεία αυτή δεν ήμουν μόνη, αλλά είχα τη υποστήριξη ανθρώπων που συνέβαλλαν ουσιαστικά, άμεσα ή έμμεσα, ο καθένας διαφορετικά σε αυτή την προσπάθεια.

Αρχικά, αν και φαντάζει αρκετά δύσκολο να βρω τα κατάλληλα λόγια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα Μαρία Μπάη, επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την αστείρευτη και απόλυτα ειλικρινή διάθεσή της για ισχυρά επιστημολογική και υψηλοτάτου επιπέδου ακαδημαϊκή καθοδήγηση, επίβλεψη και δημιουργική κριτική της δουλειάς μου. Την ευχαριστώ για την υπομονή της να διαβάξει μερδεμένα χειρόγραφα και να σχολιάζει αναλυτικά την κάθε γραμμή, και συνολικότερα, για την καρποφόρο επίβλεψη και την επιστημονική της καθοδήγηση.

Ευτύχησα να έχω ως μέλη της τριμελούς επιτροπής την Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα Νίκη Αγνάντη και τον Καθηγητή Ογκολογίας κ Ευάγγελο Μπριασούλη. Η διακριτική στήριξη της πρώτης και η παρακολούθηση της διατριβής ήταν πολύτιμη. Ως καθηγήτρια με δίδαξε όχι μόνο από έδρας αλλά και με το παραδειγμά της στα πρώτα βήματα μου και με έκανε να αγαπήσω την Παθολογική Ανατομική και την έρευνα, με την προσήλωσή της και την αγάπη της για αυτή. Στο πλαίσιο της συνεργασίας μας, η θετική της στάση, η ενθάρρυνση, οι συμβουλές και η καθοδήγησή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο ήταν πολύτιμες για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ειλικρινά ευχαριστώ τον Καθηγητή Ογκολογίας Ευάγγελο Μπριασούλη για τη σταθερή παρουσία του και το συνεχές ενδιαφέρον του στη παρούσα μελέτη με τις καίριες παρατηρήσεις και υποδείξεις του. Τα λόγια μπορούν μόνο εν μέρει να αποδώσουν τη βοήθεια που μου πρόσφερε, την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, για την ανιδιοτελή υποστήριξή του και την ακούραστη και ποικίλη συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια των ερευνητικών μου δραστηριοτήτων. Τον ευχαριστώ για την αισιοδοξία που μου ενέπνεε, τον ενθουσιασμό για έρευνα που διοχέτευε και την πίστη του ότι θα τα καταφέρω. Τον ευχαριστώ για το ταξίδι στο όραμα και την μάθηση.

Εκτός από τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς επιτροπής θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που με τίμησαν με τη συμμετοχή και συμβολή τους, με υποστήριξαν και έδειξαν ενδιαφέρον και εμπιστοσύνη στην προσπάθειά μου αυτή. Ιδιαίτερος τους Καθηγητές Καναβάρο Παναγιώτη και Στεφάνου Δημήτριο, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μπατιστάτου Άννα τους ευχαριστώ γιατί σεβάστηκαν την προσέγγισή μου και μέσα σ' ένα πνεύμα ελευθερίας της πανεπιστημιακής έρευνας συνέβαλαν εποικοδομητικά στην ευδοκίμηση αυτής της προσπάθειας. Η συμπαράστασή τους ήταν αμέριστη και η εκπαίδευση που μου πρόσφεραν ουσιαστική.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στην Επίκουρη Καθηγήτρια κα Άννα Γούσια, την οποία ευχαριστώ βαθύτατα για τη μοναδική προθυμία της, την ατελείωτη όρεξή της, τον πραγματικά άπειρο χρόνο της και την αστείρευτη υπομονή της. Πέρα από την ουσιαστική της βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή της, η ίδια με το παράδειγμά της αποτελεί πρότυπο για μια νέα Παθολογοανατόμο.

Θα ήθελα ακόμα, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους συνεργάτες-συνοδοιπόρους-ερευνητές στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής για την εποικοδομητική μας συνεργασία και τη συμβολή τους στην ερευνητική μου προσπάθεια. Επίσης θερμά ευχαριστώ την παρασκευάστρια κα Άντα Χριστοδούλου και τη βιολόγο Κωνσταντίνα Γκρέπη για τη βοήθειά τους και για όσα μυστικά της τέχνης και επιστήμης τους με μύησαν.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Βασιλική και Σπύρο, που μου καλλιέργησαν και μου ανέπτυξαν την ανάγκη για την συνεχή αναζήτηση της γνώσης, που ποτέ δεν έπαψαν να πιστεύουν σε εμένα, προσφέροντας τις κατάλληλες αρχικές συνθήκες για να βρίσκομαι σε αυτή τη θέση, και που δεν σταμάτησαν ποτέ να μου θυμίζουν ότι το μόνο που μπορεί να σταματήσει έναν άνθρωπο που προσπαθεί είναι ο ίδιος του ο εαυτός. Βέβαια, η παρούσα διατριβή δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την απεριόριστη αγάπη, ενθάρρυνση και υποστήριξη του Δημήτρη, συζύγου και συντρόφου μου, που είναι πάντοτε κοντά μου. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο συγνώμη στα δύο μου παιδιά, Ελευθερία και Αλέξανδρο, για το χρόνο που τους στέρησα τη μαμά τους.

	Σελίδα
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ	
1.1 Ορισμός	15
1.2 Εντόπιση	15
1.3 Επιδημιολογία-Αιτιολογία	15
1.4 Μόλυνση με ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού	17
1.5 Γενετικοί παράγοντες	18
1.6 Προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις	20
1.6.1 Γαστρίτιδα και εντερική μετάπλαση	20
1.6.2 Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία	20
1.6.3 Αδένωμα-Αδενωματώδης πολύποδας	21
1.6.4 Πολύποδες	21
1.7 Τύποι καρκινώματος στομάχου	22
1.7.1 Κλινικά στοιχεία	22
1.7.2 Απεικόνιση και ενδοσκόπηση	22
1.7.3 Μακροσκοπικά	23
1.7.4 Ιστολογικοί τύποι	25
1.8 Επέκταση και σταδιοποίηση του όγκου	28
1.9 Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
2.1 Ορισμός αγγειογένεσης	33
2.2 Αγγειογένεση και φυσιολογική εξέλιξη	34
2.3 Αγγειογένεση και μη νεοπλασματικές ασθένειες	34

2.4 Αγγειογένεση και κακοήθης εξάλλαγή	35
2.5 Παράγοντες που επάγουν την έναρξη της νεο-αγγειογένεσης	37
2.6 Δομή αιμοφόρων αγγείων	37
2.7 Μηχανισμοί δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων	
2.7.1 Μηχανισμός της αγγειογένεσης σε κυτταρικό επίπεδο	39
2.7.2 Μηχανισμός de novo σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis) κατά την εμβρυική ζωή	41
2.7.3 Μηχανισμοί de novo σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis) σε ενήλικες	44
2.7.3.α. Νεοαγγειογένεση (Vasculogenesis) σε ενήλικες	45
2.7.3.β. Μηχανισμός φυσιολογικής αγγειογένεσης. Επέκταση και διαμόρφωση των αγγείων	48
2.7.3.γ. Αρτηριογένεση (arteriogenesis)	49
2.7.3.δ. Παράλληλη αύξηση των αγγείων (Collateral growth)	50
2.7.4 Λεμφαγγειογένεση	52
2.8 Σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων στη νεοπλασία	53
2.8.1. Μηχανισμοί σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων στη νεοπλασία	53
2.8.2. Κινητοποίηση βλαστικών κυττάρων (stem cells) από το μυελό των οστών	56
2.8.3. Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων	57
2.9 Ο ρόλος της υποξίας στην αγγειογένεση	58
2.10 Χαρακτηριστικά των αιμοφόρων αγγείων των νεοπλασματικών ιστών	61
2.11 Μέθοδοι εκτίμησης-αποτίμησης της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

3.1 Εισαγωγή	67
3.2 Επαγωγείς της αγγειογένεσης	67
3.3 Αναστολείς της αγγειογένεσης	71
3.4 Μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την αγγειογένεση	74
3.5. Αντι-αγγειογενετικές θεραπείες	76

3.5.1	Εισαγωγή	76
3.5.2.	Θεραπευτικές προσεγγίσεις	76
3.5.3	Αναστολείς της αγγειογένεσης - Κλινικές δοκιμές	81
3.5.4	Τρόποι δράσης των αντι-αγγειογενετικών θεραπειών	85
3.5.5	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αντιαγγειογενετικής θεραπείας	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ο ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF, ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ VEGFR-1 ΚΑΙ VEGFR-2 ΚΑΙ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ CD34 ΚΑΙ CD105

4.1	Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης (VEGF)	
4.1.1	Εισαγωγή	89
4.1.2	Οικογένεια των πρωτεϊνών VEGF (βιολογική δράση και λειτουργία)	90
4.1.3	Δομή και οργάνωση του γονιδίου VEGF-A	91
4.1.4	Αγγειογενετικές δράσεις του VEGF-A	94
4.1.5	Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του VEGF-A και των υποδοχέων του	97
4.1.6	Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του VEGF	98
4.2	Υποδοχείς αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGFRs)	99
4.2.1	Υποδοχέας 1 αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGFR1) (fms-like tyrosyl kinase-1 ήFlt-1)	101
4.2.2	Υποδοχέας 2 αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGFR2) (kinase domain region (KDR) ήFlk-1)	102
4.3	CD34	103
4.4	CD105	104

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗ ΚΑΙ ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

5.1	Εισαγωγή	107
5.2	VEGF και γαστρικό καρκίνωμα	107
5.3	Υποδοχείς του VEGF (VEGFR) και γαστρικό καρκίνωμα	110
5.4	Μικροαγγειακή πυκνότητα και γαστρικό καρκίνωμα	112

5.5 Εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με το δείκτη CD105	113
5.6 Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί στο γαστρικό καρκίνωμα	115
5.6.1 COX-2	115
5.6.2 Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP)	115
5.6.3 PTEN	116
5.6.4 Θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1)	116
5.6.5 Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PDECGF)	116
5.6.6 Αγγειοποιητίνες	116
5.6.7 Ιντεγκρίνη	117
5.6.8 E-καντχερίνη και β-κατενίνη	117
5.6.9 Ιντερλευκίνη (IL)-8	117
5.7 Ο ρόλος του p53 στην αγγειογένεση του γαστρικού καρκινώματος	118
5.8 Αγγειογένεση και κυτταρικός πολλαπλασιασμός	119
5.9 Αγγειογένεση και ιστολογικοί τύποι γαστρικού καρκινώματος	119
5.10 Αγγειογένεση και δενδριτικά κύτταρα (DCs)	120
5.11 Ο ρόλος των μαστοκυττάρων στην αγγειογένεση	120
5.12 Ο ρόλος των σχετιζόμενων με τον όγκο μακροφάγων (Tumor-Associated Macrophages, TAMs) στην αγγειογένεση	121
5.13 Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και αγγειογένεση	121
5.14 Μικρομετάσταση και αγγειογένεση	122
5.15 Αντιαγγειογενετική θεραπεία του γαστρικού καρκινώματος	122
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
Σκοπός της μελέτης	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικό και μέθοδοι	
2.1 Υλικό	
2.1.1 Συλλογή δειγμάτων γαστρικού καρκινώματος	129
2.1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	129
2.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη	131

2.2 Περιγραφή μεθόδων

2.2.1 Ανοσοϊστοχημεία	132
2.2.2 Αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία	133
2.2.3 Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης των πρωτεϊνών VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67	134
2.2.4 Εκτίμηση MVD μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση για CD34 και CD105	134
2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	135

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα μελέτης

3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου	137
3.2 Εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με τους δείκτες CD34 και CD105	140
3.3 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53, Ki-67 και της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105)	142
3.4. Συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων	144
3.5 Συσχετίσεις μεταξύ MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων	150
3.6 Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67, της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105), της ηλικίας, του φύλου και της εντόπισης με την επιβίωση των ασθενών.	154

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	161
-------------------------------	-----

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	167
---------------------	-----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	169
-----------------	-----

SUMMARY	171
----------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	173
---------------------	-----

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome): σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας,

ALK (Activin-like kinase): κινάση παρόμοια με αυτή της ακτιβίνης.

Ang (Angiopoietins): αγγειοποιητίνες.

Ang-1 (Angiopoietin-1): αγγειοποιητίνης-1

Ang-2 (Angiopoietin-1): αγγειοποιητίνης-2

BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor): νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο

BMD-ECP (Bone Marrow Derived Endothelial Cells Progenitor): πρόγονα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών

CAFs (Carcinoma-associated fibroblast): Ινοβλάστες-σχετιζόμενοι με καρκίνωμα (Carcinoma-associated fibroblast,)

CEPs (Circulating Endothelial Progenitor cells):κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα

COX (Cyclooxygenase): κυκλοξυγενάση

DBD (DNA-binding domain): περιοχή σύνδεσης του DNA

DC (Dendritic Cell): δενδριτικό κύτταρο

EPCs (Endothelial Progenitor Cells): πρόγονα ενδοθηλιακά κύτταρα.

FGF (Fibroblast Growth Factor): ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας

EGF (Epidermal Growth Factor): επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

Erk (Extracellular signal-regulated protein kinase)

HDGC (Hereditary Diffuse Gastric Carcinoma): κληρονομούμενο διαχύτου τύπου γαστρικό καρκίνωμα

HIF (Hypoxia Inducible Factor): επαγόμενος παράγοντας υποξίας.

HGF (Hepatocyte Growth Factor): ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας

HNPCC (Hereditary nonpolyposis Colon Cancer): κληρονομικό καρκίνωμα παχέος εντέρου χωρίς πολυποδίαση

H.P. (*Helicobacter pylori*, **H.P.**): ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

HRE (Hypoxia Response Element): στοιχείο ανταπόκρισης σε υποξία.

HRP (Horse Raddish Peroxidase): ραφανιδική υπεροξειδάση.

HSCs (Haematopoietic Stem Cells): αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1): ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας 1

IFN-α, -γ (Interferon-α, γ): ιντερφερόνη-α και γ

iNOS (*Inducible nitric oxide synthetase*)

G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor):

GM-CSF (Granulocyte- Monocyte Colony Stimulating Factor):

iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase):

MAPCs (Multipotent Adult Progenitor Cells): πολυδύναμα πρόδρομα κύτταρα ενηλίκων

MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein-1): μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη-1

MMPs (Matrix Mettaloproteinases): μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας.

MVD (Microvascular density): βαθμός πυκνότητας των αγγείων.

NFκB (Nuclear Factor kappa B): πυρηνικός παράγοντας kappa B

NO (Nitric Oxide): μονοξείδιο του αζώτου

Nrp (Neuropilin): νευροπιλίνη

ODC (Ornithine DeCarboxylase)

PA (Plasminogen Activator): ενεργοποιητής του πλασμινογόνου.

PAI (Plasminogen Activator Inhibitor): αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

PAK1 (P21-activated kinase)

PBS (Phosphate Buffer Saline): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor): αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule ή CD31): μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίου ενδοθηλιακού κυττάρου

PI(3)P (Phosphatidyl Inositole 3-Phosphate): 3-φωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη.

PIGF (Placental Growth Factor): πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας

PDECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor).

PKC (Protein Kinase C): πρωτεϊνική κινάση C

PTTG1 (Pituitary Tumor Transforming Gene 1)

PyMT (Polyoma Middle T antigen)

Sca1 (Stem cell antigen-1): Αντιγόνο 1 βλαστικών κυττάρων

SDF-1α (Stromal cell-Derived Factor): Παράγοντας 1^α προερχόμενος από στρωματικά κύτταρα

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SHP-1 (Src Homology domain 2-containing Protein tyrosine phosphatase-1)

sKitL (stem-cell cytokine-soluble KIT ligand):

SMCs (Smooth Muscle Cells): λεία μυϊκά κύτταρα

TAMs ((**Tumor-Associated Macrophages, TAMs**): σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα

TGF-β (**Transforming Growth Factor-β**): αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β.

TNF-α (**Tumour Necrosis Factor-a**): Παράγοντας α νέκρωσης του όγκου

TIMPs (**Tissue Inhibitors of Metalloproteinases**): αναστολείς μεταλλοπρωτεασών ιστικού τύπου.

tPA (**tissue-type plasminogen activator**): ενεργοποιητής του πλασμινογόνου ιστικού τύπου

TSP (**thrombospondin**): θρομβοσποντίνη

uPA (**urokinase-type plasminogen activator**): ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης

VE-Cadherin (**Vascular Endothelial Cadherin**): αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη

VEGF (**Vascular Endothelial Growth Factor**): αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

VEGFR1 (**Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1**): υποδοχέας 1 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα

VEGFR2 (**Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2**): υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα

VHL (**von Hippel-Lindau**)

v-P3K (oncogenic variant of **PI3K** p110)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το καρκίνωμα του στομάχου (γνωστό και ως γαστρικό καρκίνωμα) αποτελεί μια από τις συχνότερες κακοήθειες παγκοσμίως. Παρ' όλον ότι οι επιπτώσεις από το καρκίνωμα αυτό έχουν μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στις βιομηχανικές χώρες, συνεχίζει να αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου σε όλο τον κόσμο. Η πρόγνωση του καρκινώματος του στομάχου είναι γενικά πτωχή. Τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης κυρίως οφείλονται σε καθυστέρηση της διάγνωσης, εφ' όσον η πλειοψηφία των περιπτώσεων διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια, καθώς και στις συχνές τοπικές υποτροπές.

Η αύξηση του μεγέθους των συμπαγών όγκων απαιτεί το συνεχή σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία, μέσα και γύρω από τον όγκο, μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση. Η αγγειογένεση εφοδιάζει τον όγκο με τροφή και οξυγόνο, απομακρύνει τα μεταβολικά απόβλητα από τα νεοπλασματικά κύτταρα, παράγει παρακρινείς διεγέρτες και προσφέρει πιθανές διόδους διασποράς του όγκου, εφ' όσον τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία του όγκου έχουν λιγότερο ανθεκτική βασική μεμβράνη και λιγότερες διακυττάρειες συνδέσεις.

Η αγγειογένεση των όγκων εκτιμάται μέσω της καταμέτρησης των αιμοφόρων αγγείων, γνωστή ως μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD). Αυτή μπορεί να γίνει μορφολογικά, συνήθως όμως χρησιμοποιούνται ανοσοϊστοχημικοί δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο CD31 (MVD/CD31), ο CD34 (MVD/CD34) και ο CD105 (MVD/CD105). Η πρωτεΐνη CD105 (ενδογλίνη) είναι μια ομοδιμερής μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία ανιχνεύεται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που συμμετέχουν στην αγγειογένεση του όγκου, ενώ δεν εκφράζεται ή εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων φυσιολογικών ιστών. Μελέτες έδειξαν ότι ο δείκτης CD105 είναι ο πλέον ειδικός και ευαίσθητος δείκτης ενδοθηλιακών κυττάρων για να εκτιμήσει την MVD των όγκων του στομάχου κι όχι μόνο.

Η αγγειογένεση εξελίσσεται μέσω μιας σύνθετης διαδικασίας η οποία ελέγχεται από προαγγειογενετικούς και αντιαγγειογενετικούς παράγοντες προερχόμενους από ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα. Μεταξύ των μορίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A) και οι υποδοχείς του (VEGFR-1

και -2) ρυθμίζουν τόσο τη φυσιολογική όσο και την παθολογική αγγειογένεση. Ο υποδοχέας VEGFR-2 (fetal liver kinase-1, flk-1) έχει ισχυρή δράση τυροσινικής κινάσης και μεταδίδει τα κύρια σήματα της αγγειογένεσης. Ο υποδοχέας VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase,flt) έχει διπλή δράση, αναστέλλει την αγγειογένεση κατά την εμβρυϊκή ζωή και επάγει την αγγειογένεση κατά την ενήλικη ζωή. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο ρόλος του VEGFR-1 στην αγγειογένεση είναι πολύ πιο σύνθετος από ότι αρχικά εθεωρείτο.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ο VEGF-A και οι υποδοχείς του, VEGFR-1 και VEGFR-2, εκφράζονται στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου και η έκφραση του VEGF-A συσχετίζεται με την MVD. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα όσον αφορά την προγνωστική αξία της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2, καθώς και της MVD στα καρκινώματα του στομάχου είναι αντιφατικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν: 1) η ανοσοϊστοχημική έκφραση της αγγειογενετικής πρωτεΐνης VEGF-A και των δύο υποδοχέων της VEGFR-1 και VEGFR-2, 2) η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες CD34 και CD105 και 3) η έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου p53 και Ki-67 σε 145 αδενοκαρκινώματα στομάχου. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική πορεία των ασθενών. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση παθογενετικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται οι VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2 και της προγνωστικής αξίας της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών και της MVD στα καρκινώματα του στομάχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ

1.1 Ορισμός

Το καρκίνωμα του στομάχου αποτελεί κακοήγη επιθηλιακό όγκο του βλεννογόνου του στομάχου με αδενική διαφοροποίηση¹. Διακρίνεται σε δύο τύπους, τον εντερικό και τον διάχυτο. Αποτελεί την συνηθέστερη κακοήθεια του στομάχου (≈ 90%), ενώ τα λεμφώματα, οι στρωματικοί όγκοι (GIST) και οι νευροενδοκρινικοί όγκοι αποτελούν το υπόλοιπο 10% των νεοπλασμάτων².

1.2 Εντόπιση

Το καρκίνωμα του στομάχου αναπτύσσεται σε όλο το μήκος του στομάχου, από την καρδία έως τον πυλωρό και προσβάλλει κατά σειρά συχνότητας: το άντρο και τον πυλωρό (47%), το σώμα (23%), την καρδιακή μοίρα (21%) και το θόλο (2%). Το έλασσον τόξο προσβάλλεται περίπου στο 40% των περιπτώσεων και το μείζον στο 12%. Τα νεοπλάσματα του κάτω οισοφαγικού σφιγκτήρα θεωρείται ότι προέρχονται από τον οισοφάγο και ταξινομούνται ως όγκοι του οισοφάγου^{1,2,3}.

1.3 Επιδημιολογία-Αιτιολογία

Το καρκίνωμα του στομάχου αποτελεί μια από τις συχνότερες κακοήθειες παγκοσμίως, με 870.000 νέες περιπτώσεις και 650.000 θανάτους το χρόνο. Αποτελεί το δεύτερο σε θνητότητα καρκίνωμα μετά από αυτό των πνευμόνων και την τέταρτη σε συχνότητα κακοήθεια³.

Έχει παρατηρηθεί τις τελευταίες δεκαετίες μια σταθερή μείωση των ποσοστών επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκινώματος του στομάχου, αλλά ο απόλυτος αριθμός των νέων περιπτώσεων ανά έτος αυξάνεται, κυρίως εξαιτίας της αύξησης του μέσου όρου ηλικίας του πληθυσμού.

Στις Δυτικές χώρες, η πενταετής επιβίωση είναι μεταξύ 8% και 26%. Τα χαμηλά επίπεδα επιβίωσης οφείλονται 1) σε καθυστερημένη διάγνωση, αφού η πλειοψηφία των περιπτώσεων διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια και 2) σε συχνές τοπικές υποτροπές της νόσου. Η νόσος είναι συχνότερη σε άνδρες από ότι σε γυναίκες (1.8–2.6:1)^{4,5}.

Το νεόπλασμα αναπτύσσεται συχνότερα (>40/100.000 σε άνδρες) στην Ανατολική Ασία, σε περιοχές των Άνδεων, της Νότιας Αμερικής και της Ανατολικής Ευρώπης. Χαμηλή συχνότητα (<15/100.000) απαντάται στη Βόρεια Αμερική, Βόρεια Ευρώπη και στις περισσότερες περιοχές της Αφρικής και της Νότιας Ασίας. Τα ποσοστά στην Ιαπωνία είναι 20 φορές μεγαλύτερα σε σύγκριση με αυτά που παρατηρούνται σε λευκούς πληθυσμούς των Η.Π.Α. και κάποιων Αφρικανικών χωρών. Το αδενοκαρκίνωμα εντερικού τύπου είναι συχνότερο σε περιοχές υψηλού κινδύνου, ενώ το διαχύτου τύπου είναι σχετικά συχνότερο σε περιοχές χαμηλού κινδύνου³.

Το καρκίνωμα του στομάχου είναι εξαιρετικά σπάνιο σε ηλικίες κάτω των 30 ετών, ενώ μετά την ηλικία αυτή αυξάνεται σημαντικά και σταθερά και φτάνει τα ψηλότερα ποσοστά σε μεγάλες ηλικιακές ομάδες, τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Η συχνότητα των εντερικού τύπου αδενοκαρκινωμάτων παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση με την ηλικία από ότι τα διαχύτου και είναι συχνότερα σε άνδρες από ότι σε γυναίκες. Τα διαχύτου τύπου καρκινώματα τείνουν να προσβάλλουν νεαρότερα άτομα, κυρίως γυναίκες και συχνά έχουν κληρονομούμενα χαρακτηριστικά. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου, εξαιτίας των αντιοξειδωτικών δράσεων τους. Από την άλλη πλευρά η κατανάλωση άλατος συσχετίζεται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου και πρόδρομων αλλοιώσεων του. Επιπλέον, με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος σχετίζονται τα καπνιστά αλλαντικά ή ψάρια, τα λαχανικά τουρσί και οι καυτερές πιπεριές. Το αλκοόλ, το κάπνισμα και η επαγγελματική έκθεση σε νιτροζαμίνες και ανόργανες σκόνη έχουν μελετηθεί σε διάφορους πληθυσμούς, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Τέλος, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου αυξάνει 5-10 χρόνια μετά από χειρουργική επέμβαση του στομάχου, ειδικά όταν πρόκειται για εγχείρηση Billroth II, λόγω παλινδρόμησης χολής. Σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του στομάχου παίζει, επίσης, και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού^{1,3}.

1.4 Μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αποτελεί τη συχνότερη αιτία χρόνιας γαστρίτιδας και εμπλέκεται σε διάφορα στάδια του καταρράκτη της καρκινογένεσης του στομάχου. Το ελικοβακτηρίδιο μειώνει την έκκριση της όξινης πεψίνης και παρεμβαίνει σε αντιοξειδωτικές λειτουργίες μειώνοντας τις συγκεντρώσεις του ενδογαστρικού ασκορβικού οξέος. Επιπλέον, προκαλεί αλλοιώσεις του βλεννογόνου που οδηγούν στην ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος, όπως ατροφία του βλεννογόνου, εντερική μετάπλαση και δυσπλασία.

Της ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου προηγείται μια παρατεταμένη προκαρκινωμάτωσης διαδικασία, η οποία διαρκεί για δεκαετίες. Αυτή περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαδοχικές αλλοιώσεις: χρόνια γαστρίτιδα, πολυεστιακή ατροφία, εντερική μετάπλαση και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία. Η γαστρίτιδα και η ατροφία μεταβάλλουν την έκκριση του γαστρικού οξέος, αυξάνοντας το γαστρικό pH, αλλάζοντας τη χλωρίδα και επιτρέποντας σε αναερόβια βακτήρια να αποικίσουν τον στομάχο. Αυτά τα βακτήρια παράγουν ενεργείς αναγωγάσες (reductases) που μετατρέπουν τα νιτρικά των τροφών σε νιτρώδη, ένα ενεργό μόριο ικανό να αντιδράσει με αμίνες, αμίδια και ουρία και να σχηματίσει καρκινογόνα σύμπλοκα νιτροσαμινών.

Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού συναντάται στην βλέννη και στο επιφανειακό επιθήλιο του φυσιολογικού γαστρικού βλεννογόνου, ενώ απουσιάζει από περιοχές εντερικής μετάπλασης, όπου συνήθως ξεκινά η καρκινογένεση. Επομένως, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού ασκεί την καρκινογόνο δράση μέσω διαλυτών βακτηριδιακών προϊόντων ή της φλεγμονώδους απάντησης που επάγεται από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Όλα τα στελέχη του ελικοβακτηριδίου μπορεί να μην έχουν τον ίδιο ρόλο στην ανάπτυξη κακοήθειας. Στελέχη που περιέχουν μια ομάδα γονιδίων που καλείται 'cag pathogenicity island' προκαλούν μεγαλύτερου βαθμού φλεγμονή. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την επιθηλιακή παραγωγή ιντερλευκίνης 8 μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κB (NFκB). Υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ μόλυνσης από cag-θετικά στελέχη ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου. Το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού μπορεί ακόμη να παράγει μια κυτταροτοξίνη, υπεύθυνη για την καταστροφή επιθηλιακών κυττάρων και την καρκινογένεση. Επιπλέον, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός του επιθηλίου είναι ψηλότερος όταν υπάρχει μόλυνση από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, η οποία μειώνεται σημαντικά μετά από εξάλειψη της

μόλυνσης. Τέλος, η αμμωνία, μια ουσία που διεγείρει την κυτταρική αναπαραγωγή απελευθερώνεται σε αφθονία από τη δράση της ουρεάσης του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού στο γαστρικό επιθήλιο^{1,3}.

1.5 Γενετικοί παράγοντες

Το 10% των καρκινωμάτων του στομάχου θεωρείται ότι κληρονομείται, ενώ το υπόλοιπο 90% εμφανίζεται σποραδικά. Μελέτες δείχνουν αυξανόμενο κίνδυνο σε πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με καρκίνωμα του στομάχου.

Το κληρονομικό καρκίνωμα του στομάχου ταξινομείται ως:

1. Κληρονομικό/οικογενές διαχύτου τύπου καρκίνωμα του στομάχου χαρακτηριζόμενο από μεταλλάξεις της πρωτεΐνης προσκόλλησης E-cadherin (CDH1).
2. Οικογενές καρκίνωμα εντερικού τύπου.
3. Λοιπά σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος: FAP, Li-Fraumeni, κληρονομικό καρκίνωμα παχέος εντέρου χωρίς πολυποδίαση (hereditary nonpolyposis colon cancer, HNPCC), κληρονομικό καρκίνωμα γονιδιακής γραμμής BRCA 1/2, σύνδρομα Peutz-Jeghers και Cauden (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος του στομάχου.

Σύνδρομα Κληρονομικού καρκινώματος		Γενετικές αλλοιώσεις
FAP	Οικογενής Πολυποδίαση	APC
Li-Fraumeni		ATM5 TP53
HNPCC	Κληρονομικό καρκίνωμα χωρίς πολυποδίαση	MS1
Κληρονομικό καρκίνωμα		BRCA1/2
Peutz – Jeghers		
Cauden		

Στα σύνδρομα κληρονομικού καρκινώματος, εκτός από τις γενετικές αλλοιώσεις, καθοριστικό ρόλο παίζουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Επίσης, οι γενετικές αλλαγές δεν χαρακτηρίζουν μόνο κληρονομικά καρκινώματα αλλά παρατηρούνται και στα σποραδικά καρκινώματα. Οι γενετικές αυτές αλλαγές μπορεί

να αφορούν 1) ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αυξητικών παραγόντων, 2) απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, επανορθωτικών γονιδίων και μορίων προσκόλλησης και 3) αλλαγές γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου. Οι αναφερόμενες αυτές γενετικές αλλαγές προκαλούνται από μεταλλάξεις γονιδίων, απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH), ενίσχυση/υπερέκφραση γονιδίων, υπερμεθυλίωση, μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), γενετικό πολυμορφισμό και ενεργοποίηση τελομεράσης.

Σημαντικοί επίτοποι σχετιζόμενοι με το καρκίνωμα του στομάχου περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.2.^{1,2,6}.

Πίνακας 1.2. Σημαντικές γενετικές αλλοιώσεις καρκινώματος του στομάχου

APC μεταλλάξεις
TP53 μεταλλάξεις
P16 απώλεια
P21 gas
18 Q
20 Q
Υπερέκφραση πρωτεΐνης bcl-2
11P15 LOH
RB απώλεια
DCC απώλεια
Βλάβες επανορθωτικών γονιδίων ⇒ Φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) 15-44%
Υπερέκφραση Cyclin D1 (ρυθμιστής κυτταρικού κύκλου)
Αυξητικοί Παράγοντες : EGFR , TGF , VEGF, CMET, CERB2, BAX
Μόρια προσκόλλησης E- Cadherin (απώλεια έκφρασης)

Η ογκοπρωτεΐνη p21 gas έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στη δυσπλασία, στην εντερική μετάπλαση και στο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου και στους δύο τύπους. Επίσης, υπερέκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 ανιχνεύεται περίπου στο

50% των περιπτώσεων, ενώ υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 μόνο στο καρκίνωμα του στομάχου “εντερικού” τύπου.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι δύο κύριοι ιστολογικοί τύποι κατά Lauren (εντερικός και διάχυτος) έχουν διαφορετικούς μοριακούς παθογενετικούς μηχανισμούς. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης (E-Cadherin, μιας διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης που διαμεσολαβεί την κυτταρο-κυτταρική προσκόλληση) παρατηρείται στα καρκινώματα του στομάχου διαχύτου τύπου και πολύ πιο σπάνια στα εντερικού τύπου. Η έκφραση της E-καντχερίνης σχετίζεται επίσης με το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα εντερικού τύπου καρκινώματα διαφέρουν γενετικά από τα διαχύτου τύπου³.

1.6 Προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις

1.6.1 Γαστρίτιδα και εντερική μετάπλαση

Η χρόνια γαστρίτιδα, η γαστρική ατροφία και η εντερική μετάπλαση συνήθως προηγούνται και/ή συνοδεύουν το εντερικού τύπου αδenoκαρκίνωμα του στομάχου. Αντίθετα, τα διαχύτου τύπου καρκινώματα του στομάχου συχνά ξεκινούν επί απουσίας ατροφικής γαστρίτιδας και εντερικής μετάπλασης. Επιπρόσθετα, η αυτοάνοση γαστρίτιδα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος του στομάχου.

1.6.2 Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (δυσπλασία) αναπτύσσεται σε επιθήλιο αμιγές γαστρικό ή γαστρικό με εντερική μετάπλαση. Ορίζεται ως μη διηθητική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, η οποία χαρακτηρίζεται από κυτταρολογικές και αρχιτεκτονικές αλλοιώσεις, όπως διαταραχή αναλογίας πυρήνα-κυτταροπλάσματος, πολυστοιβάδωση και ηθμοειδές πρότυπο ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων.

Στην πολυσταδιακή θεωρία της ογκογένεσης του στομάχου, η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία βρίσκεται μεταξύ ατροφικών μεταπλαστικών βλαβών και διηθητικού καρκινώματος. Περιπτώσεις που δεν εμφανίζουν όλα τα κριτήρια για μια σίγουρη διάγνωση ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας, τοποθετούνται στην κατηγορία της «ακαθόριστης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας».

Η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία διακρίνεται σε χαμηλόβαθμη (low grade) και υψηλόβαθμη (high grade). Σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση της WHO αντί για τον όρο *in situ* καρκίνωμα προτιμάται ο όρος σοβαρού βαθμού δυσπλασία. Περισσότερες των 80% των περιπτώσεων ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας θα εξελιχθούν σε καρκίνωμα και μπορεί ένα διηθητικό καρκίνωμα να συνυπάρχει με υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία χωρίς εμφανή μάζα.

1.6.3 Αδένωμα-Αδενωματώδης πολύποδας

Πρόκειται για σαφώς περιγεγραμμένη βλάβη, αποτελούμενη από σωληνώδεις και/ή λαχνωτές δυσπλαστικές επιθηλιακές δομές. Η συχνότητα κακοήθους εξαλλαγής εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης και τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Κακοήθης εξαλλαγή παρατηρείται στο 2% των βλαβών με διάμετρο < 2 εκ. και στο 40-50% των βλαβών με διάμετρο > 2 εκ. Τα επίπεδα αδενώματα φαίνεται ότι παρουσιάζουν υψηλότερη συχνότητα κακοήθους εξαλλαγής.

1.6.4 Πολύποδες

- *Υπερπλαστικοί πολύποδες*

Οι υπερπλαστικοί πολύποδες είναι οι συχνότεροι γαστρικοί πολύποδες. Είναι έμμισχοι ή άμισχοι, με διάμετρο συνήθως <2 εκ. Συναντώνται συνήθως στο άντρο σε έδαφος γαστρίτιδας από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.

- *Πολύποδες από αδένια του θόλου του στομάχου (“Fundic gland”)*

Οι πολύποδες από αδένια του θόλου του στομάχου είναι οι συχνότεροι πολύποδες στους δυτικούς πληθυσμούς. Απαντώνται σποραδικά και δεν σχετίζονται με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού. Συχνά εμφανίζονται σε ασθενείς με μακροχρόνια κατανάλωση αναστολέων αντλίας πρωτονίων ή σε ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση.

- *Σύνδρομα πολυποδίασης*

Πολύποδες που παρατηρούνται σε κληρονομούμενα σύνδρομα πολυποδίασης είναι οι πολύποδες Peutz-Jeghers, οι νεανικοί πολύποδες και οι πολύποδες Cowden.

Άλλες προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις του στομάχου είναι: το χρόνια γαστρικό έλκος, η υφολική γαστρεκτομή, η κακοήθης αναιμία και η νόσος Menetrier^{1,2}.

1.7 Τύποι καρκινώματος στομάχου

Το καρκίνωμα του στομάχου διακρίνεται σε **πρώιμο (αρχόμενο-early)** και σε **προχωρημένο**. Το πρώιμο καρκίνωμα του στομάχου ορίζεται ως το καρκίνωμα που αναπτύσσεται στον βλεννογόνο ή και στον υποβλεννογόνο χιτώνα ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων σε περιγαστρικούς λεμφαδένες. Το κύριο χαρακτηριστικό του είναι η εξαιρετική πρόγνωση (πενταετής επιβίωση 95%). Το ποσοστό διάγνωσης του αυξάνεται συνεχώς και υπολογίζεται στο 20% στη Δύση και στο 50% στην Ιαπωνία. Το υψηλό ποσοστό της Ιαπωνίας οφείλεται στη συχνή γαστροσκόπηση και λήψη βιοψιών από περιοχές δυσπλασίας και ατροφικής γαστρίτιδας^{3,6}.

1.7.1 Κλινικά στοιχεία

Το πρώιμο καρκίνωμα του στομάχου συνήθως δεν δίνει συμπτώματα, εκτός από δυσπεψία. Στα συμπτώματα του προχωρημένου καρκινώματος περιλαμβάνεται ο κοιλιακός πόνος που συχνά είναι επίμονος και δεν υποχωρεί με την λήψη τροφής. Εξελκωμένοι όγκοι μπορεί να προκαλέσουν αιμορραγία και αιματέμεση και όγκοι που αποφράσσουν τον πυλωρό μπορεί να προκαλέσουν εμέτους. Συστηματικά συμπτώματα, όπως ανορεξία και απώλεια βάρους συνοδεύουν μεταστατική νόσο.

Η έλλειψη πρώιμων συμπτωμάτων συχνά καθυστερεί τη διάγνωση του καρκινώματος του στομάχου. Το 80-90% των ασθενών στο Δυτικό κόσμο έχει όγκους προχωρημένου σταδίου με αποτέλεσμα τα ποσοστά θεραπείας να είναι χαμηλά. Στην Ιαπωνία, όπου το καρκίνωμα του στομάχου είναι συχνό, η κυβέρνηση έχει ενθαρρύνει προγράμματα προληπτικού ελέγχου του πληθυσμού των ενηλίκων και το καρκίνωμα διαγιγνώσκεται σε πρώιμα στάδια. Περίπου 80% των γαστρικών κακοηθειών που εντοπίστηκαν με τα προγράμματα προληπτικού ελέγχου είναι πρώιμα γαστρικά καρκινώματα.

1.7.2 Απεικόνιση και ενδοσκόπηση

Με τη χρήση του εύκαμπτου γαστροσκοπίου και τη λήψη βιοψιών έχει επιτευχθεί μεγάλη πρόοδος στη διάγνωση των νεοπλασμάτων του στομάχου. Η ενδοσκόπηση θεωρείται ως η πιο ευαίσθητη και ειδική διαγνωστική μέθοδος για το καρκίνωμα του στομάχου. Η διαγνωστική ακρίβεια της φτάνει το 95% και αυξάνεται

όσο αυξάνεται ο αριθμός των ιστοτεμαχιδίων του βιοπτικού υλικού που λαμβάνεται κατά τη γαστροσκόπηση.

Με την ενδοσκόπηση υψηλής ανάλυσης είναι δυνατόν να ανιχνευθούν μικρές αλλαγές στο χρώμα και στην αρχιτεκτονική του βλεννογόνου που υποδηλώνουν πρώιμο καρκίνωμα του στομάχου. Η ενδοσκοπική ανίχνευση αυτών των πρώιμων βλαβών μπορεί να βελτιωθεί με χρωμοενδοσκόπηση (π.χ. χρησιμοποιώντας indigo carmine solution 0.4 %). Παρ' όλα αυτά ακόμα και με αυτές τις μεθόδους ένας σημαντικός αριθμός πρώιμων γαστρικών καρκινωμάτων μπορεί να μην αναγνωρισθεί.

Η ακτινογραφία μετά από βαριούχο γέυμα χρησιμοποιείται ακόμα σε πρωτόκολλα μαζικού προληπτικού ελέγχου στην Ιαπωνία, όπου μετά την ανεύρεση κάποιας ανωμαλίας ακολουθεί ενδοσκόπηση.

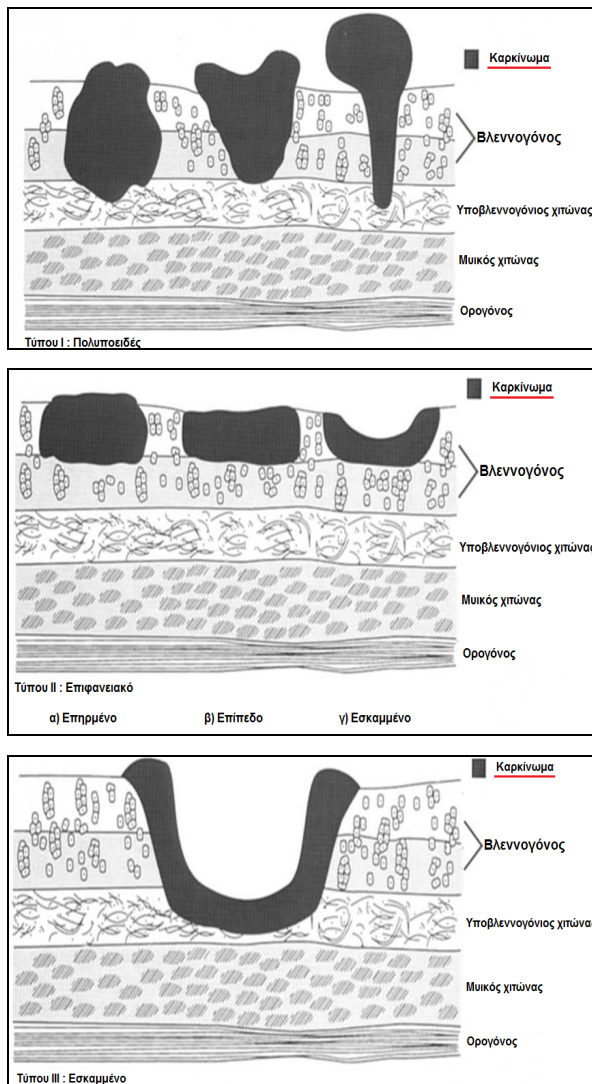
Η σταδιοποίηση του όγκου πριν τη θεραπεία περιλαμβάνει διαδερμικό υπερηχογράφημα ή αξονική τομογραφία προκειμένου να ανιχνευθούν ηπατικές ή απομακρυσμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις. Βέβαια η λαπαροσκοπική σταδιοποίηση αποτελεί συχνά το μόνο τρόπο αποκλεισμού περιτοναϊκής διασποράς σε απουσία ασκίτη.

1.7.3 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά καρκινωμάτων του στομάχου

ο Πρώιμο καρκίνωμα του στομάχου

Οι μακροσκοπικοί τύποι του πρώιμου καρκινώματος του στομάχου είναι οι ακόλουθοι (Εικόνα 1.1):

- τύπος I: πολυποδοειδής
- τύπος II: επιφανειακός
 - ο τύπος IIα: επηρμένος
 - ο τύπος IIβ: επίπεδος
 - ο τύπος IIγ: επιφανειακά εσκαμμένος
- τύπος III: εσκαμμένος

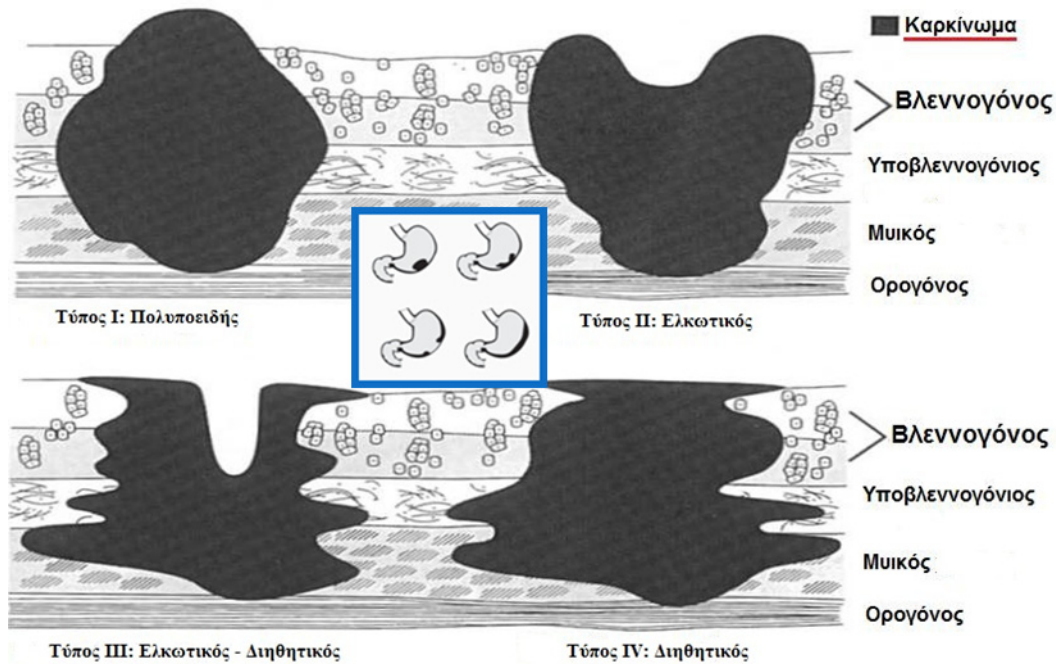


Εικόνα 1.1. Μακροσκοπικοί τύποι πρώιμου καρκινώματος του στομάχου⁶

○ **Προχωρημένο καρκίνωμα του στομάχου**

Η μακροσκοπική περιγραφή του καρκινώματος του στομάχου στηρίζεται στην ταξινόμηση κατά Borrmann (Εικόνα 1.2):

- τύπος I: πολυποδοειδής, προβάλλον ή μυκητοειδής, που εμφανίζεται ως προεξέχουσα μάζα μέσα στον αυλό
- τύπος II: ελκωτικός με χαρακτηριστικό κρατήρα στο τοίχωμα του στομάχου
- τύπος III: ελκωτικός με διήθηση του τοιχώματος
- τύπος IV: διηθητικός
- τύπος V: αταξινόμητος



Εικόνα 1.2. Μακροσκοπικοί τύποι προχωρημένου καρκινώματος στομάχου—ταξινόμηση κατά Borrmann⁶.

Εκτεταμένη διήθηση του στομάχου δίνει την εικόνα της πλαστικής λινίτιδας ή το λεγόμενο ‘δερμάτινο μπουκάλι’. Ιδιαίτερη μακροσκοπική εικόνα εμφανίζει και το βλενώδες αδενοκαρκίνωμα που είναι ζελατινώδες με γυαλιστερή επιφάνεια διατομής¹.

1.7.4 Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων του στομάχου

Υπάρχουν διάφορες ιστολογικές ταξινομήσεις των καρκινωμάτων του στομάχου, όπως των Ming, Carniero και Goseki, αλλά η συχνότερα χρησιμοποιούμενη είναι η ταξινόμηση κατά Lauren.

A. Ταξινόμηση κατά Lauren

Τα καρκινώματα του στομάχου ταξινομούνται σε ένα από τους δύο τύπους: τον εντερικό ή το διάχυτο. Οι όγκοι αποτελούμενοι από εντερικού και διαχύτου τύπου καρκινώματα σε ίση αναλογία ταξινομούνται ως **μικτά καρκινώματα**. Τα αποδιαφοροποιημένα καρκινώματα ταξινομούνται στην κατηγορία των ακαθόριστων καρκινωμάτων.

α. Εντερικού τύπου καρκινώματα

Τα καρκινώματα εντερικού τύπου σχηματίζουν αναγνωρίσιμους αδένες και μπορεί να είναι καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένοι όγκοι. Συνήθως αναπτύσσονται σε έδαφος εντερικής μετάπλασης.

β. Διαχύτου τύπου καρκινώματα

Τα διαχύτου τύπου καρκινώματα αποτελούνται από μεμονωμένα ή μικρές ομάδες κυττάρων τα οποία διηθούν διάχυτα το γαστρικό τοίχωμα. Τα κύτταρα συνήθως είναι υποστρόγγυλα, μικρού μεγέθους και περιέχουν άφθονη ενδοκυττάρια βλέννη που απωθεί τον πυρήνα στην περιφέρεια δίνοντας την εικόνα “σφραγιστήρων δακτυλίου”. Μικρή ποσότητα βλέννης στο διάμεσο υπόστρωμα μπορεί να είναι παρούσα. Στα διαχύτου τύπου καρκινώματα, ο αριθμός των μιτώσεων είναι μικρότερος από αυτόν των εντερικού τύπου.

B. Ταξινόμηση Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO)

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO, το καρκίνωμα του στομάχου ταξινομείται σε:

αδενοκαρκίνωμα καλής-μέσης-χαμηλής διαφοροποίησης με υποτύπους: σωληνώδες, θηλώδες, βλενώδες, δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, αδιαφοροποίητο, καθώς και σε σπάνιους τύπους, όπως αδenoπλακώδες, πλακώδες, μυελοειδές, ηπατοκυτταροειδές και εμβρυϊκό (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Ιστολογική ταξινόμηση γαστρικού καρκινώματος κατά WHO¹

WHO histological classification of gastric tumours	
Epithelial tumours	Non-epithelial tumours
Intraepithelial neoplasia – Adenoma	Leiomyoma
	Schwannoma
Carcinoma	Granular cell tumour
Adenocarcinoma	Glomus tumour
intestinal type	Leiomyosarcoma
diffuse type	GI stromal tumour
Papillary adenocarcinoma	benign
Tubular adenocarcinoma	uncertain malignant potential
Mucinous adenocarcinoma	malignant
Signet-ring cell carcinoma	Kaposi sarcoma
Adenosquamous carcinoma	Others
Squamous cell carcinoma	Malignant lymphomas
Small cell carcinoma	Marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type
Undifferentiated carcinoma	Mantle cell lymphoma
Others	Diffuse large B-cell lymphoma
Carcinoid (well differentiated endocrine neoplasm)	Others
	Secondary tumours

Γ. Στρωματική αντίδραση στο καρκίνωμα του στομάχου

Οι συχνότερες στρωματικές αντιδράσεις στο καρκίνωμα του στομάχου είναι η δεσμοπλασία, οι λεμφοκυτταρικές διηθήσεις, η υαλοειδοποίηση και η κοκκιωματώδης αντίδραση. Η κοκκιωματώδης αντίδραση χαρακτηρίζεται από την παρουσία μονήρους ή συρρεόντων μικρών σαρκοειδόμορφων κοκκιωμάτων και συνοδό μονοπυρηνική κυτταρική διήθηση. Η λεμφοκυτταρική διήθηση σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση.

Δ. Βαθμός διαφοροποίησης (Grading) αδενοκαρκινώματος στομάχου

Ο βαθμός κακοήθειας των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου βασίζεται στην έκταση της αδενικής διαφοροποίησης. Αυτά διακρίνονται σε:

Καλά διαφοροποιημένα (Grade 1) αδενοκαρκινώματα: > 95% του όγκου αποτελείται από καλά σχηματισμένα αδένια.

Μέτρια διαφοροποιημένα (Grade 2) αδενοκαρκινώματα: 50% έως 95% του όγκου αποτελείται από καλά σχηματισμένα αδένια.

Φτωχά διαφοροποιημένα (Grade 3) αδενοκαρκινώματα: \leq 49% του όγκου αποτελείται από σχηματισμένα αδένια. Στην υπόλοιπη έκταση του αποτελείται από ακανόνιστα αδένια, τα οποία αναγνωρίζονται με δυσκολία, ή κύτταρα που αναπτύσσονται διάχυτα ή σχηματίζουν μικρές ή μεγάλες αθροίσεις ή δοκιδώδεις.

Τα σωληνώδη αδενοκαρκινώματα τυπικά δεν διαβαθμίζονται ιστολογικά, θεωρούνται καλά διαφοροποιημένοι όγκοι και αντιστοιχούν σε grade 1 καρκινώματα. Τα καρκινώματα τύπου σφραγιστήρος δακτυλίου, στα οποία >50% των κυττάρων έχουν χαρακτήρες “σφραγιστήρος δακτυλίου”, θεωρούνται καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας και ταξινομούνται ως grade 3. Τα μικροκυτταρικά και τα αποδιαφοροποιημένα καρκινώματα ταξινομούνται ως grade 4. Τα πολύ σπάνια πλακώδη καρκινώματα, ταξινομούνται ως καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένα⁷.

1.8 Επέκταση και σταδιοποίηση του όγκου

Τα γαστρικά καρκινώματα επεκτείνονται κατά συνέχεια ιστών σε γειτονικά όργανα ή διασπείρονται περιτοναϊκά ή ακόμη μεθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα. Στη διατοιχωματική επέκταση στο δωδεκαδάκτυλο ή στον οισοφάγο σημασία έχει το βάθος της διήθησης. Οι όγκοι που διηθούν το δωδεκαδάκτυλο είναι συνήθως διαχύτου τύπου καρκινώματα που συχνά διηθούν τον ορογόνο χιτώνα, λεμφαγγεία και αιμοφόρα αγγεία και έχουν ήδη δώσει λεμφαδενικές μεταστάσεις. Η δωδεκαδακτυλική επέκταση πραγματοποιείται μέσω του υποβλεννόγονιου ή του υποορογόνιου χιτώνα ή ακόμη μέσω υποβλεννογόνιων λεμφαγγείων και συμβαίνει συχνότερα από όσο αναμένεται στη μακροσκοπική εξέταση.

Τα εντερικού τύπου καρκινώματα μεθίστανται αιματογενώς στο ήπαρ, ενώ τα διαχύτου τύπου καρκινώματα μεθίστανται κυρίως σε περιτοναϊκές επιφάνειες. Όταν το καρκίνωμα διηθεί τον ορογόνο χιτώνα, οι περιτοναϊκές εμφυτεύσεις είναι πολλαπλές. Η αμφοτερόπλευρη μαζική διήθηση των ωοθηκών (όγκος Krukenberg) μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαπεριτοναϊκής ή αιματογενούς διασποράς^{1,7}.

Η TNM σταδιοποίηση του καρκινώματος του στομάχου των American Joint Cancer Committee/Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC), 7^η έκδοση, είναι η ακόλουθη⁷:

Τ ορίζεται ο πρωτοπαθής όγκος (Εικόνες 1.3, 1.4 και 1.5)

pTis: ενδοεπιθηλιακός όγκος χωρίς διηθητική ανάπτυξη - Καρκίνωμα in situ

pT1: όγκος που διηθεί το χόριο, τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα ή και τον υποβλεννογόνο χιτώνα

___ **pT1a:** όγκος που διηθεί το χόριο

___ **pT1b:** όγκος που διηθεί τον υποβλεννογόνο χιτώνα

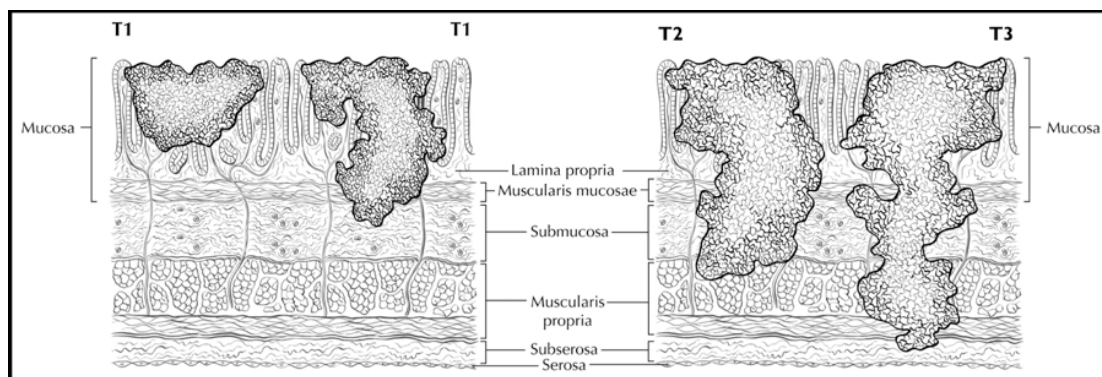
pT2: όγκος που διηθεί το μυϊκό χιτώνα

pT3: όγκος που διηθεί τον υποορογόνο συνδετικό ιστό, όχι όμως το σπλαχνικό περιτόναιο ή γειτονικές δομές

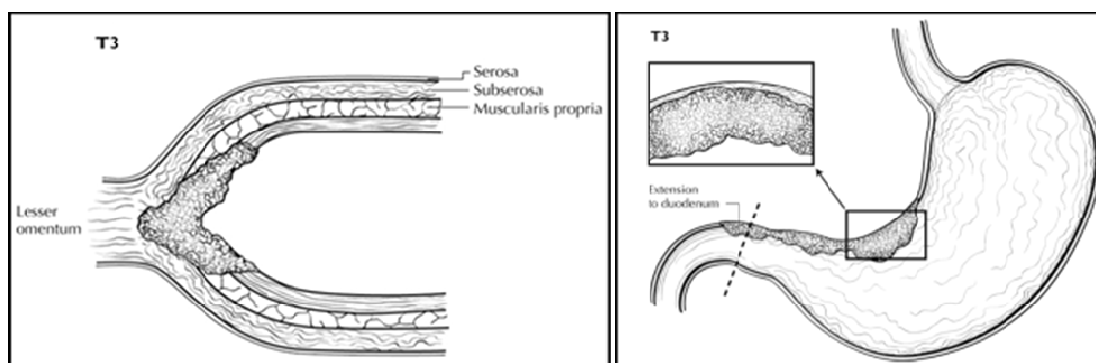
pT4: όγκος που διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο) ή και γειτονικές δομές

___ **pT4a:** όγκος που διηθεί τον ορογόνο (σπλαχνικό περιτόναιο)

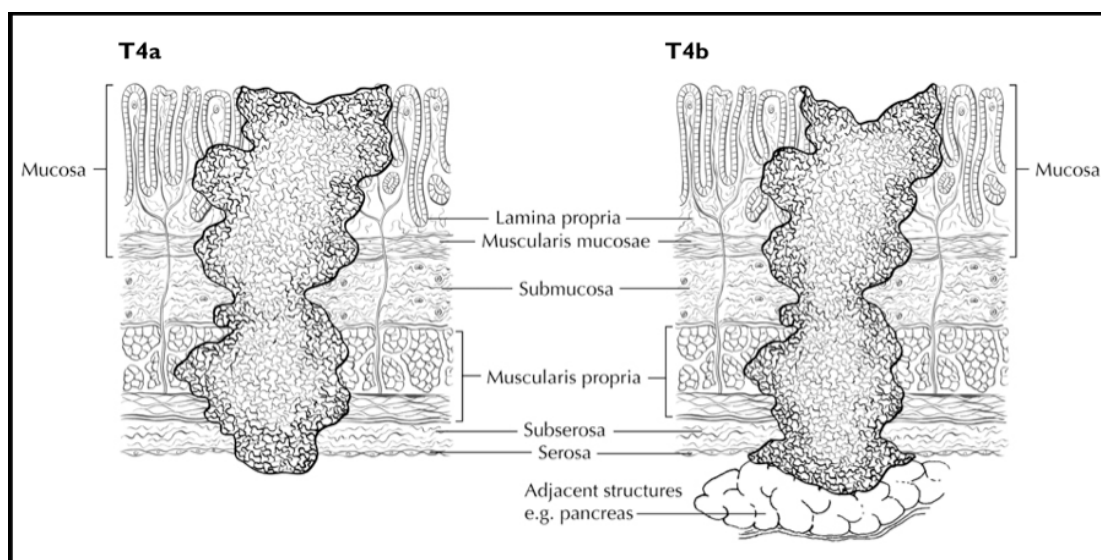
___ **pT4b:** όγκος που διηθεί γειτονικές δομές



Εικόνα 1.3. Όγκοι T1a, T1b, T2 και T3⁷.



Εικόνα 1.4. Όγκος T3. Η επέκταση στο δωδεκαδάκτυλο δεν επηρεάζει την ταξινόμηση του πρωτοπαθούς όγκου (T)⁷.



Εικόνα 1.5. Όγκος T4a και T4b⁷.

Με το **N** περιγράφεται η κατάσταση των λεμφαδένων:

pN0: απουσία διήθησης επιχώριων λεμφαδένων

pN1: διήθηση 1 έως 2 περιγαστρικών λεμφαδένων

pN2: διήθηση 3 έως 6 περιγαστρικών λεμφαδένων

pN3: διήθηση περισσότερων των 6 περιγαστρικών λεμφαδένων

Με το **M** προσδιορίζονται οι απομακρυσμένες μεταστάσεις :

M0: απουσία μεταστάσεων

M1: παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (π.χ. ήπαρ)

Με βάση τα ανωτέρω, το εκάστοτε γαστρικό καρκίνωμα ταξινομείται σε ένα από τα τέσσερα στάδια (0-IV), που φαίνονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4. Στάδια γαστρικού καρκινώματος⁷

Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο 1A	T1	N0	M0
Στάδιο 1B	T2	N0	M0
Στάδιο IIA	T1	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
Στάδιο IIB	T1	N2	M0
	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
Στάδιο IIIA	T2	N2	M0
	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
Στάδιο IIIB	T2	N3	M0
	T4b	N0 ή N1	M0
	T4a	N2	M0
Στάδιο IIIC	T3	N3	M0
	T4b	N2 ή N3	M0
	T4a	N3	M0
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Επισημαίνεται ότι ο στατιστικά σημαντικότερος προγνωστικός δείκτης αναδεικνύεται το βάθος διήθησης του όγκου, εφόσον βέβαια αυτός είναι εξαιρεσιμος. Ελεύθερα νεοπλασματικής διήθησης είναι τα εγχειρητικά όρια των 3 εκ. Ο λεμφαδενικός καθαρισμός στη Δύση περιλαμβάνει τους επιχώριους λεμφαδένες του μείζονος και ελάσσονος τόξου. Στην Ιαπωνία εφαρμόζεται ευρύτερος λεμφαδενικός καθαρισμός χωρίς όμως αυτός να έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση.

1.9 Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες

Σε προχωρημένα καρκινώματα του στομάχου, το σύστημα σταδιοποίησης TNM έχει προγνωστική αξία. Διηθήσεις λεμφαγγείων και αιμοφόρων αγγείων παρατηρούνται σε προχωρημένου σταδίου καρκινώματα και σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση. Τα αποτελέσματα μελετών που αφορούν τον ιστολογικό τύπο είναι αντιφατικά. Αυτό σχετίζεται εν μέρει με τη ταξινόμηση που χρησιμοποιείται. Τα καρκινώματα εντερικού τύπου κατά Lauren σχετίζονται με μεγαλύτερη πενταετή επιβίωση από ότι του διαχύτου τύπου (26% και 16% αντίστοιχα). Τα καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης, με ανευπλοειδία και αυτά που φέρουν μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια σχετίζονται με βραχύτερη επιβίωση³.

Η εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου έχει επίσης σημασία. Η πενταετής επιβίωση μετά από χειρουργική εξαίρεση του όγκου είναι περίπου 20-25% σε ασθενείς με όγκους στο άπω τρίτο του στομάχου, 10% σε ασθενείς με εγγύς όγκους και 5% σε ασθενείς με όγκους που διηθούν όλο το στόμαχο. Η ελαττωμένη επιβίωση των ασθενών με εγγύς όγκους μπορεί να οφείλεται: 1) στο ότι οι όγκοι αυτοί είναι συνήθως διαχύτου τύπου και 2) στις τεχνικές δυσκολίες της χειρουργικής εξαίρεσης τους³.

Η πρόγνωση των καρκινωμάτων του στομάχου είναι ιδιαίτερα φτωχή στα παιδιατρικά περιστατικά και στους νέους ενήλικες. Στην πρόγνωση του γαστρικού καρκινώματος φαίνεται να παίζουν ρόλο η κοινωνική κατάσταση, το επάγγελμα και ο τόπος διαμονής⁵. Επίσης, η επάρκεια της χειρουργικής εξαίρεσης είναι καθοριστικός παράγοντας για την πρόγνωση του γαστρικού καρκινώματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

2.1 Ορισμός αγγειογένεσης.

Η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων των θηλαστικών απαιτεί την επαρκή τροφοδότησή τους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων. Για την επιβίωσή τους τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 100-200 μm από τα αιμοφόρα αγγεία^{8,9}.

Η μελέτη των αιμοφόρων αγγείων είχε εγείρει το ενδιαφέρον από τα αρχαία χρόνια. Πάνω από 6000 χρόνια πριν, Αιγύπτιοι γιατροί αναγνώρισαν ότι «υπάρχουν αγγεία στο ανθρώπινο σώμα, τα οποία ήταν κοίλα και έχουν ένα στόμιο που ανοίγει για να απορροφήσει φάρμακα και ένα για να απομακρύνει άχρηστα προϊόντα». Ο Αριστοτέλης θεωρούσε ότι «τα αιμοφόρα αγγεία είναι όπως τα αυλάκια στους κήπους, ξεκινούν από μία πηγή και διακλαδίζονται σε πολυάριθμα κανάλια, ώστε να μεταφέρουν νερό σε κάθε μέρος του κήπου»¹⁰.

Η δημιουργία του αγγειακού δικτύου σε έναν οργανισμό είναι μια φυσιολογική διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυογένεση μέσω διαφοροποίησης πρόδρομων κυττάρων, των αποκαλούμενων αγγειοβλαστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν δημιουργώντας ένα πρώτο απλό δίκτυο που καλείται πρωτογενές αγγειακό πλέγμα^{11,12,13}. Η de novo αυτή δημιουργία αγγείων καλείται **νεοαγγείωση (vasculogenesis)**. Η νεοαγγείωση ξεκινά όταν το έμβρυο αποκτά ένα μέγεθος που η απλή διάχυση δεν επαρκεί να ικανοποιήσει τις τροφικές απαιτήσεις του¹².

Ακολουθεί μια σύνθετη διεργασία ολοκλήρωσης του αγγειακού δικτύου μέσω της διαμόρφωσης και επέκτασης των ήδη υπάρχοντων αγγείων, μια διαδικασία που καλείται **αγγειογένεση (angiogenesis)**. Κατά την αγγειογένεση λαμβάνουν χώρα μια σειρά κυτταρικών διεργασιών που ως στόχο έχουν την κινητοποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των «εν ηρεμία» ενδοθηλιακών κυττάρων, προκειμένου αυτά να οργανωθούν σε τριχοειδή. Πρόσφατα, ο όρος αγγειογένεση επεκτάθηκε και υποδηλώνει την ανάπτυξη και την διαδικασία ανακατασκευής και αναδιαμόρφωσης του αρχέγονου-πρόδρομου δικτύου σε ένα πολύπλοκο αγγειακό δίκτυο¹⁴.

2.2 Αγγειογένεση σε φυσιολογικούς ιστούς

Φυσιολογικά, η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όσο και σε διάφορες καταστάσεις στην ενήλικη ζωή, όπως αύξηση της μάζας του σώματος και επούλωση πληγών. Παρατηρείται επίσης κατά την εμφύτευση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο προκειμένου να σχηματιστεί ο πλακούντας και κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου. Στον τελευταίο παρατηρούνται αυξομειώσεις των αγγειογενετικών παραγόντων, με σημαντική μείωση τους κατά τη διάρκεια της έμμηνου ρύσης και αύξηση κατά την παραγωγική φάση του κύκλου, η οποία ακολουθείται από σταδιακή μείωση μέχρι το τέλος του κύκλου¹⁵.

Κατά την διεργασία του φυσιολογικού σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων είναι χαρακτηριστικό ότι λαμβάνει χώρα ταχύς σχηματισμός και ωρίμανση των αγγείων. Το νέο αγγειακό δίκτυο οργανώνεται με τάξη και έχει σαφή όρια. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία επέρχεται και πάλι αγγειογενετική αδράνεια στους ιστούς¹⁶. Στους ενήλικες, μόνο 0.01% των ενδοθηλιακών κυττάρων βρίσκονται σε κυτταρική διαίρεση.

2.3 Αγγειογένεση σε μη νεοπλασματικές παθήσεις.

Υπάρχουν πολυάριθμες φλεγμονώδεις, αλλεργικές, μεταβολικές και ορμονικές διαταραχές, που χαρακτηρίζονται από υπερβολική αύξηση των αγγείων, όπως αθηροσκλήρυνση, αρτηριοπάθεια, μεταμόσχευση, αλλεργική δερματίτιδα, χηλοειδές ουλή, περιτοναϊκές συμφύσεις, υμενίτιδα, οστεομυελίτιδα, άσθμα, ρινικοί πολύποδες, ενδοφθάλμιες και χοριοειδείς διαταραχές, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, ενδομητρίωση, μητροραγίες, κύστεις ωοθήκης κ.τ.λ. Επιπλέον, υπερβολική αύξηση ενός ιστού, όπως του λιπώδους ιστού συνοδεύεται από αγγειογένεση. Μια δίαιτα υψηλή σε λιπαρά επάγει ένα αγγειογενετικό γονιδιακό πρόγραμμα στο λιπώδη ιστό, προκειμένου αγγειογενετικοί παράγοντες να διεγείρουν τη λιπογένεση. Έχει παρατηρηθεί ότι θεραπεία παχύσαρκων ποντικών με αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες οδηγεί σε μείωση του βάρους τους και απώλεια λιπώδους ιστού.

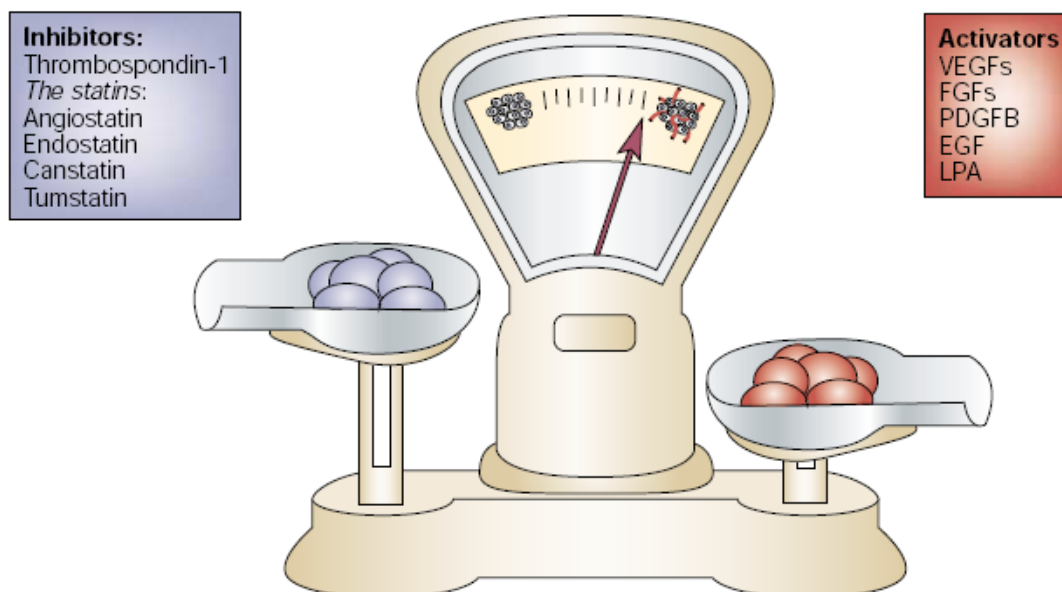
Στον αντίποδα υπάρχουν διάφορες διαταραχές που χαρακτηρίζονται ή αποδίδονται σε ανεπαρκή αγγειογένεση. Για παράδειγμα, χαμηλότερα των φυσιολογικών επίπεδα του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (Vascular

Endothelial Growth Factor, VEGF) προκαλούν οργανική δυσλειτουργία σε έγκυες γυναίκες με προεκλαμψία. Μια προοδευτική απώλεια του μικροαγγειακού δικτύου παρατηρείται σε πολλές νόσους που σχετίζονται με την ηλικία. Στο δέρμα, η εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση της αγγειακής πυκνότητας προκαλεί ευθραυστότητα των αγγείων οδηγώντας στην ανάπτυξη πορφύρας, τηλεαγγειεκτασιών, ωχρότητας (πελιδνότητα), αγγειωμάτων και φλεβικής στάσης. Ακόμη, η ανεπαρκής αγγειογένεση έχει εμπλακεί με νευροπάθεια, απώλεια οστού και μη επανεπιθηλιοποίηση μετά από αρτηριακό τραυματισμό. Η υπέρταση, η πνευμονική ίνωση και το εμφύσημα προκαλούν μικροαγγειακή αραίωση. Επιπλέον, η ανεπαρκής αύξηση των αγγείων επηρεάζει σημαντικά το νευρικό σύστημα, καθώς η έκταση της αγγειογένεσης σχετίζεται με την επιβίωση ασθενών με εγκεφαλικό επεισόδιο¹⁰.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ορισμένες φλεγμονώδεις νόσους, οφειλόμενες σε ιούς και παθογόνα βακτήρια, εκφράζονται αγγειογενετικά γονίδια ή επηρεάζεται η έκφραση αγγειογενετικών γονιδίων, όπως συμβαίνει με τον ανθρώπινο ερπητοϊό 8 και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.

2.4 Αγγειογένεση και κακοήθης εξαλλαγή

Πολλά μοντέλα πολυσταδιακής ογκογένεσης έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό. Επιπρόσθετα όλων των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν, απαραίτητη για την αύξηση και επέκταση των όγκων είναι η αγγειογένεση. Άλλωστε καμιά νεοπλασματική εξεργασία δεν θα μπορούσε να υπερβεί το μέγεθος των 2 χιλιοστών εάν δεν υποστηριζόταν από ένα πλούσιο αγγειακό δίκτυο¹⁶. Αντίθετα από την αγγειογένεση που παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, η αγγειογένεση στην νεοπλασία δεν αυτοπεριορίζεται. Το κλασικό μοντέλο ρύθμισης της αγγειογένεσης προσομοιάζεται με μία ζυγαριά με τους αναστολείς της αγγειογένεσης από τη μία πλευρά και τους επαγωγείς της από την άλλη. (Εικόνα 2.1) Σημείο κλειδί στην όλη διαδικασία είναι η έναρξη της αγγειογένεσης που δίνεται από τη διατάραξη της παραπάνω δυναμικής ισορροπίας υπέρ των επαγωγέων, με αποτέλεσμα την «αφύπνιση του όγκου»¹⁶.



Εικόνα 2.1. Ρύθμιση της αγγειογένεσης (Bergers et al., 2003)⁸

Πρώτος ο Folkman το 1971 περιέγραψε ως «αδράνεια του καρκίνου» το μη σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων⁸. Ο ίδιος υποστήριξε ότι για την ανάπτυξη και τη μετάσταση των όγκων είναι απαραίτητη η αγγειογενετική διαδικασία^{15,17}. Σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών, περιγράφεται η ανεύρεση μικροσκοπικών μεταστατικών εστιών, που είναι αδύνατον να εντοπιστούν μακροσκοπικά ή απεικονιστικά. Οι μικρομεταστατικές αυτές εστίες είναι χαρακτηριστικά φτωχές σε αγγεία και υποστηρίζεται ότι παραμένουν «σε αδράνεια» για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν αυξημένο μιτωτικό δείκτη. Οι συγκεκριμένες μεταστατικές εστίες φαίνεται να διατηρούν μικρό μέγεθος για εβδομάδες μέχρι της ενεργοποίησης του αγγειογενετικού μηχανισμού, οπότε αποκτούν αγγεία, αυξάνονται προοδευτικά σε μέγεθος και τελικά δίνουν μεταστάσεις^{18,19}.

Οι αγγειοβριθείς όγκοι εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα μεταστάσεων από ότι οι λιγότεροι αγγειοβριθείς, προφανώς λόγω της ευκολότερης πρόσβασης των νεοπλασματικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Επομένως, η αγγειογένεση φαίνεται ότι είναι απαραίτητη στην νεοπλασία αυξάνοντας την διεισδυτικότητα και τη μεταστατική ικανότητα του όγκου²⁰.

2.5 Παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση.

Η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία, γεγονός που αποδεικνύεται από την ποικιλία των μηχανισμών και τη φύση των μορίων που την ελέγχουν. Διάφοροι παράγοντες²¹⁻²⁵ φαίνεται να επάγουν την αγγειογένεση, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται:

α) *Μεταβολική πίεση-υποξία*. Η αγγειογένεση επάγεται σε περιβάλλον χαμηλής πίεσης οξυγόνου (pO₂), χαμηλού pH και υπογλυκαιμίας.

β) *Μηχανική πίεση*. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μέσα σε ένα όγκο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης μεταξύ των κυττάρων²⁶.

γ) *Ανοσοαπόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής*. Φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία διηθούν τους ιστούς ελευθερώνουν κυτοκίνες και πρωτεάσες συνεισφέροντας στην αγγειογενετική διαδικασία και προάγοντας τη μετάσταση²⁷.

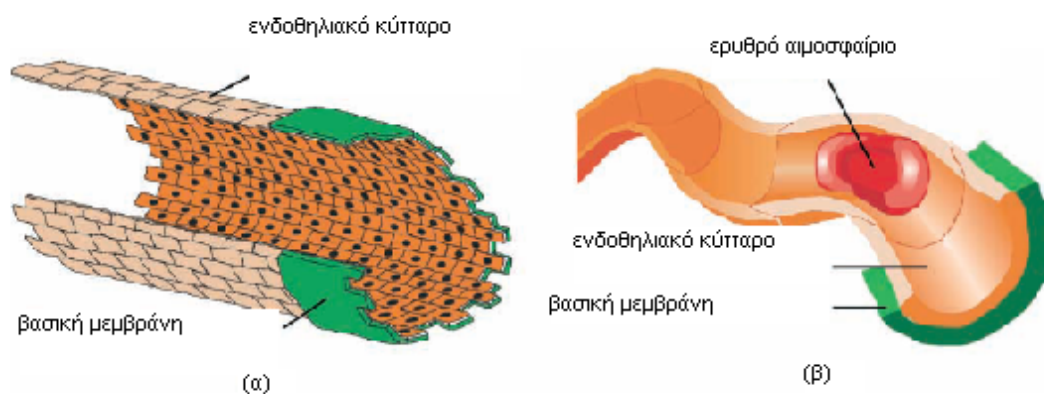
δ) *Γενετικές αλλοιώσεις-μεταλλάξεις*. Πρόκειται για μεταλλάξεις που προκαλούν ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απαλοιφή ογκο-κατασταλτικών γονιδίων τα οποία ελέγχουν την παραγωγή ρυθμιστικών μορίων της αγγειογένεσης.

ε) *Συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων*. Η αγγειογένεση ελέγχεται τόσο γενετικά όσο και περιβαλλοντικά²⁸.

2.6 Δομή αιμοφόρων αγγείων

Κάθε αγγείο, από την αορτή έως τα μικρότερα τριχοειδή, επενδύεται εσωτερικά από μια στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, το ενδοθήλιο (Εικόνα 2.2α). Στα μικρότερα αγγεία, σε μια εγκάρσια τομή το ενδοθήλιο μπορεί να αποτελείται από μόνο ένα ενδοθηλιακό κύτταρο, το οποίο περιτυλίσσεται και σχηματίζει τον αυλό (Εικόνα 2.2β). Το ενδοθήλιο ελέγχει τη διαπίδυση θρεπτικών συστατικών, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφόρων άλλων στοιχείων μεταξύ του αίματος και των ιστών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδέονται στενά μεταξύ τους και παρουσιάζουν χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εξωτερικά του ενδοθηλίου, υπάρχει μια εξωκυττάρια επένδυση, η βασική μεμβράνη, η οποία χωρίζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό. Αυτή αποτελείται από ίνες πρωτεϊνών, κυρίως λαμνίνη και κολλαγόνο. Μπορεί επίσης να υπάρχουν κύτταρα περιενδοθηλιακής υποστήριξης. Τα τελευταία αντιστοιχούν στα περικύτταρα των μικρών αγγείων (τριχοειδή) και στα λεία μυϊκά κύτταρα των μεγαλύτερων αγγείων. Η βασική μεμβράνη λειτουργεί ως το καλούπι όπου τα ενδοθηλιακά κύτταρα στηρίζονται, ενώ

παράλληλα βοηθά στη διατήρηση του ενδοθηλίου σε κατάσταση ηρεμίας. Διακυτταρικές επαφές, όπως και επαφές κυττάρων–βασικής μεμβράνης μεσολαβούνται μέσω μορίων προσκόλλησης όπως καντχερίνες και ιντεγκρίνες, αντίστοιχα. Οι επαφές αυτές έχουν εξαιρετική σημασία καθώς απώλεια τους μπορεί να οδηγήσει σε τοπική αποσταθεροποίηση του ενδοθηλίου και απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων²⁹.



Εικόνα 1.2. Δομή αιμοφόρων αγγείων. (α) Μεγάλο αγγείο και (β) τριχοειδές (Plank et al., 2003)²⁹.

Οι ενδοθηλιακοί σωλήνες που σχηματίζουν το πρώιμο αγγειακό πλέγμα δεν ξεχωρίζουν μορφολογικά μέχρι να αποκτήσουν τη αρτηριακή ή φλεβική τους ταυτότητα, οπότε διαφέρουν στην κατανομή της εξωκυττάριας ουσίας, στο πάχος της επένδυσης από λεία μυϊκά κύτταρα και άλλα υποστηρικτικά κύτταρα. Επισημαίνεται ότι οι αρτηριακές και φλεβικές μοριακές υπογραφές, παρ' όλο ότι εδραιώνονται νωρίς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των αγγείων, μπορεί να μην είναι αρκετές να διατηρήσουν την αρτηριακή ή φλεβική ταυτότητα. Τοπικοί παράγοντες, καθώς επίσης μηχανικές δυνάμεις, συμπεριλαμβανομένων της ροής του αίματος και της πίεσης μπορεί να ρυθμίζουν την ειδικότητα των αγγείων^{26,30}.

Επιπλέον, τα κύτταρα των αγγείων διαφορετικών οργάνων αποκτούν ειδικά χαρακτηριστικά, τα οποία τους επιτρέπουν να εκτελούν ειδικές λειτουργίες. Για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου συνδέονται στενά μεταξύ τους και περιβάλλονται από πολυάριθμα περι-ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν ένα φραγμό που προστατεύει τα εγκεφαλικά κύτταρα από πιθανά τοξικά μόρια της κυκλοφορίας του αίματος. Αντίθετα, στα αγγεία των ενδοκρινών αδένων τα ενδοθηλιακά τους κύτταρα αφήνουν μεταξύ τους παράθυρα (fenestrations) που

επιτρέπουν την κυκλοφορία των ορμονών. Εκτός από την ετερογένεια των αγγειακών κυττάρων στα διάφορα όργανα, τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα μπορεί να παρουσιάζουν ετερογένεια στο ίδιο όργανο. Στην καρδιά για παράδειγμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε διαφορετικές θέσεις των στεφανιαίων αγγείων διαφέρουν στην έκφραση μορίων προσκόλλησης κι άλλων παραγόντων^{10,30}.

2.7 Μηχανισμός δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων.

2.7.1 Μηχανισμός της αγγειογένεσης σε κυτταρικό επίπεδο

Η διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την πυροδότηση των αγγειογενετικών μηχανισμών είναι σύνθετη και ρυθμίζεται από την έκκριση κυτταρικών παραγόντων που προέρχονται τόσο από τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και από τα κυτταρικά στοιχεία της περιοχής που απαιτεί περαιτέρω άρδευση.

Ο μηχανισμός της αγγειογένεσης ξεκινά με την αποσταθεροποίηση των προϋπαρχόντων αγγείων, η οποία επιτυγχάνεται μέσω χαλάρωσης των δεσμών μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας. Σε αυτή τη φάση τα περικύτταρα, που οργανώνουν, στηρίζουν μεταβολικά και ορίζουν το αγγείο ως ανατομική οντότητα, αποδιοργανώνονται και απομακρύνονται από τη θέση τους. Η απομάκρυνση των περικυττάρων σε συνδυασμό με τον παράγοντα VEGF-A, αυξάνουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου με αποτέλεσμα διάφορες πρωτεΐνες να εξαγγειώνονται στο μεσεγγυματικό περιαγγειακό χώρο. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν ένζυμα (μεταλλοπρωτεΐνες, κολλαγενάσες, ηπαρινάσες κι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου) που επιφέρουν πρωτεολυτική αποδόμηση της βασικής μεμβράνης των αγγείων και της παρακείμενης εξωκυττάριας ουσίας. Η απουσία βασικής μεμβράνης, η οποία συμβάλει στην διατήρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε κατάσταση ηρεμίας και η παρουσία ισχυρών αγγειογενετικών παραγόντων επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση των VEGF, της αγγειοποιητίνης-1 (Ang1) και των πρωτεϊνών του μεσεγγύματος (ιντεγκρίνες α και β) μεταναστεύουν προς την περιοχή όπου λαμβάνει χώρα η αγγειογενετική διεργασία και έρχονται σε επαφή με την αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (Vascular Endothelial Cadherin, VE-Cadherin), οπότε ακολουθεί σχηματισμός μικρών συμπαγών αγγειακών εκβλαστήσεων¹⁶.

Η διαδικασία της αγγειογένεσης ακολουθεί τέσσερα στάδια:

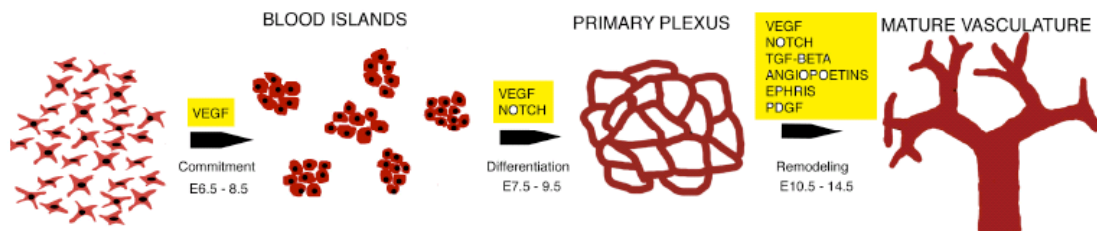
1. Το **στάδιο της εκβλάστησης (sprouting)** κατά το οποίο αναπτύσσονται μικρές εκβλαστήσεις στα τοιχώματα προϋπαρχόντων αγγείων. Ξεχωριστή θέση κατέχει το «οδηγών» κύτταρο (αναφέρεται και ως “tip cell”). Το κύτταρο αυτό δεν πολλαπλασιάζεται αλλά δίνει την κατεύθυνση προς την οποία θα δημιουργηθεί το νέο αγγείο, ανάλογα με τα ερεθίσματα που λαμβάνει. Παράλληλα στο στάδιο αυτό ξεκινά η στρατολόγηση και διαφοροποίηση των κυττάρων που θα περιβάλλουν και θα στηρίζουν το νέο αγγείο, όπως περικύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Στο στάδιο της εκβλάστησης ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μονοπάτια VEGF και Notch²⁶.
2. Το **στάδιο της εσωτερικής διαίρεσης (intussuseption)**, που αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία το τοίχωμα ενός τριχοειδικού αγγείου εκτείνεται προς τον αυλό με αποτέλεσμα το τριχοειδές να διαιρεθεί στα δύο³¹.
3. Το **στάδιο της επιμήκυνσης/διεύρυνσης των αγγείων**, κατά το οποίο ο συνεχιζόμενος κυτταρικός πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα επιτρέπει την αύξηση της διαμέτρου και του μήκους των αγγείων³². Στην επέκταση των αγγείων συμμετέχουν ειδικοί επαγωγείς και αναστολείς που βρίσκονται σε μια αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία. Παραδείγματα φυσικών αναστολέων αποτελούν η ενδοστατίνη και η αγγειοστατίνη.
4. Στο τελικό **στάδιο**, λαμβάνει χώρα η **ενσωμάτωση** των ενδοθηλιακών πρόδρομων κυττάρων (αγγειοβλαστών), που κινητοποιούνται από το μυελό των οστών και μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος ώστε να ενσωματωθούν στο τοίχωμα των νεοσχηματισθέντων αγγείων. Παράγοντες, όπως VEGF-A, πλακουντιακός παράγοντας αύξησης (placental growth factor, PlGF) και Ang-1 φαίνεται να επάγουν αυτή τη διαδικασία¹⁶.

Παράλληλα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που οργανώνονται σε πρώιμες αγγειακές δομές πολλαπλασιάζονται και τα μεσεγχυματικά κύτταρα, υπό την επίδραση του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) και της Ang-2. Όταν τα μεσεγχυματικά κύτταρα φτάσουν σε περιαγγειακές θέσεις, διαφοροποιούνται σε περικύτταρα και/ή λεία μυϊκά κύτταρα με την επίδραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β (Transforming Growth Factor beta, TGF-β). Η συνολική δομή σταθεροποιείται με την οργάνωση των περικυττάρων και αποτελεί πλέον ένα λειτουργικό νεόπλαστο τριχοειδές με σταθερή αιματική ροή και καθορισμένη διαπερατότητα^{25, 26, 30}.

2.7.2 Μηχανισμός *de novo* σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis) κατά την εμβρυϊκή ζωή

Με τον όρο “vasculogenesis” περιγράφεται ο μηχανισμός δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων, που λαμβάνει χώρα κυρίως κατά την εμβρυϊκή ζωή και οδηγεί στη δημιουργία πρόδρομου-αρχέγονου αγγειακού δικτύου. Τα αγγεία του εμβρύου αναδύονται σε διακριτά σημεία από διαφορετικούς μεσοδερμικούς προδρόμους¹⁰.

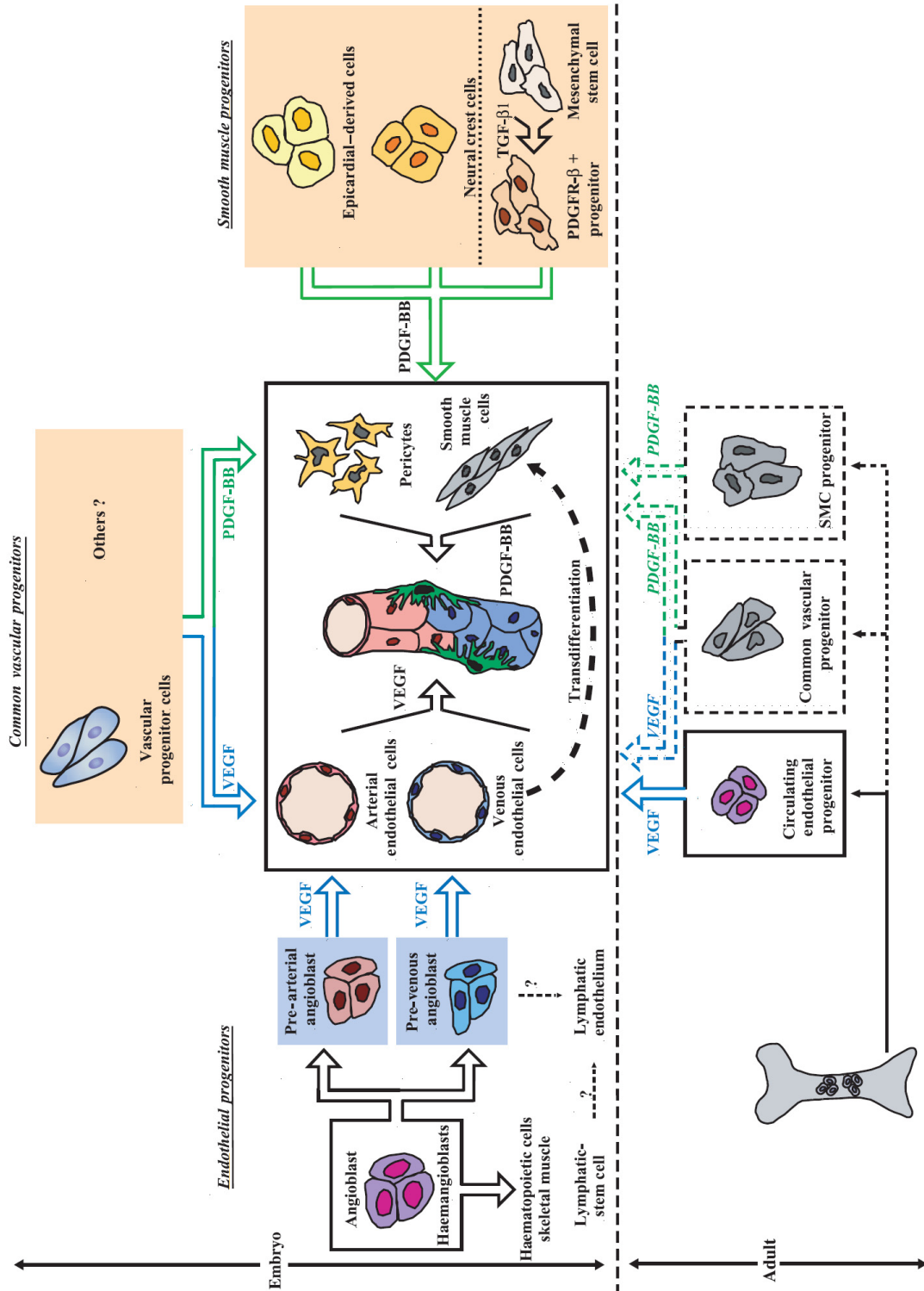
Το αγγειακό δίκτυο παρουσιάζει μια ιδιαίτερη σχέση με τον αιμοποιητικό ιστό, καθώς προέρχονται από κοινά αρχέγονα κύτταρα, τους αιμαγγειοβλάστες (hemangioblasts). Οι τελευταίοι σχηματίζουν συσσωματώματα κυττάρων. Τα κύτταρα της εσωτερικής μοίρας των συσσωματωμάτων διαφοροποιούνται προς πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ τα κύτταρα στην επιφάνεια τους διαφοροποιούνται προς ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 2.3, 2.4). Οι αγγειοβλάστες έχουν την ικανότητά να μεταναστεύουν πριν από την *in situ* διαφοροποίησή τους και να σχηματίζουν αγγειακά πλέγματα. Παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση των αγγειοβλαστών είναι ο VEGF-A, ο υποδοχέας του VEGF τύπου 2 (VEGFR-2), και ο βασικός ινοβλαστικός παράγοντας ανάπτυξης (basic fibroblast growth factor, bFGF)²⁶.



Εικόνα 2.3. Ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων.

Αδιαφοροποίητα μεσεγγυματικά κύτταρα κάτω από την επίδραση του VEGF διαφοροποιούνται είτε προς αιμοποιητικά είτε προς ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζοντας μικρές ομάδες κυττάρων, γνωστές ως νησίδες αίματος (blood islands). Αυτές οι κυτταρικές νησίδες αποκτούν αυλό, ενώνονται και σχηματίζουν το πρωταρχικό αγγειακό δίκτυο. Ακολούθως λαμβάνουν χώρα γεγονότα, όπως εκβλάστηση αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία και σχηματισμός συνδέσεων μεταξύ των πρώτων αγγείων που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πρωταρχικού αγγειακού δικτύου. Το δίκτυο αυτό θα αναδιαμορφωθεί με σύντηξη και υποστροφή των πρώιμων αγγείων και θα σχηματίσει ένα ώριμο ιεραρχικά δομημένο αγγειακό δίκτυο (Iruela-Arispe, 2005)²⁶.

Τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα, που έρχονται να επενδύσουν και να σταθεροποιήσουν τα νεοσχηματισθέντα αγγεία, έχουν μια σύνθετη προέλευση, η οποία εξαρτάται από την εντόπισή τους στο έμβρυο. Επιπλέον, φαίνεται ότι υπάρχει ένα κοινό προγονικό κύτταρο που εκφράζει τον υποδοχέα VEGFR-2 το οποίο διαφοροποιείται σε ενδοθηλιακό κύτταρο υπό την επίδραση του VEGF και σε λείο μυϊκό κύτταρο υπό την επίδραση του PDGF-BB¹⁰ (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4. Αγγειακά προγονικά κύτταρα στο έμβryo και στον ενήλικα (Carmeliet P., 2004)¹⁰.

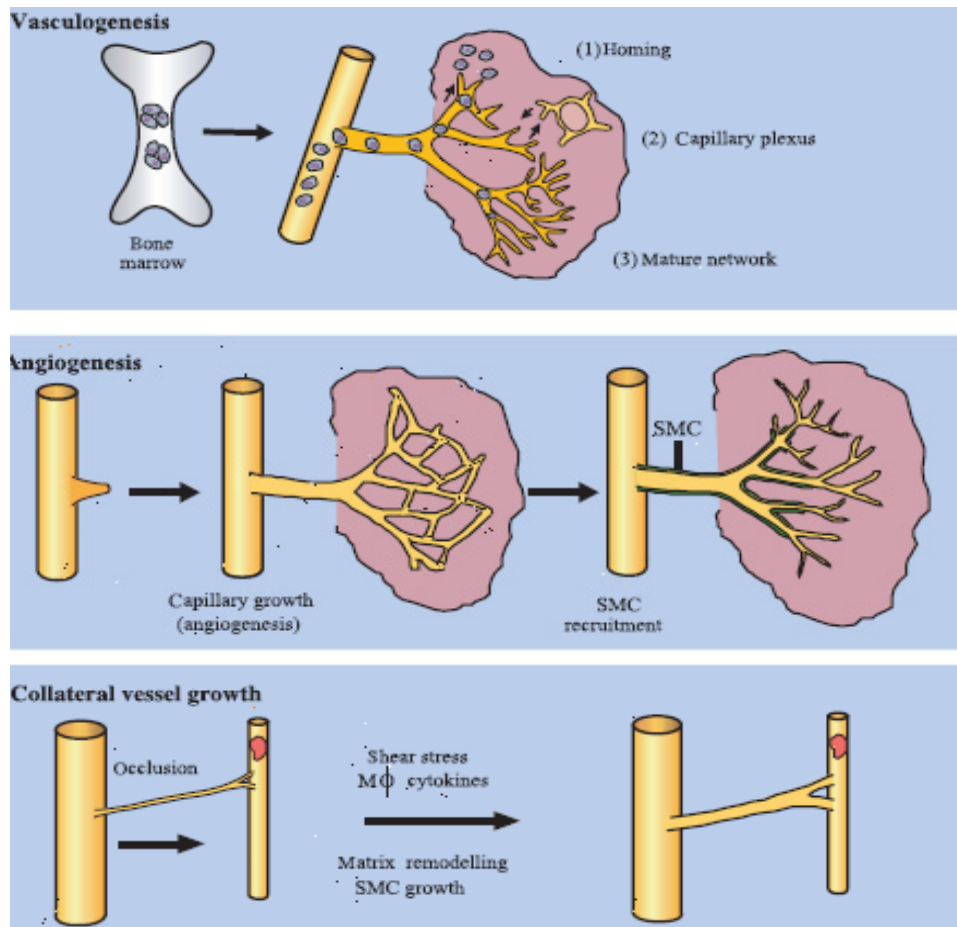
2.7.3 Μηχανισμοί *de novo* σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων (vasculogenesis) σε ενήλικες

Υπάρχουν, τουλάχιστον, τρεις διακριτοί μηχανισμοί αύξησης του αγγειακού δικτύου στους ενήλικες (Εικόνα 2.5):

A. Η *Νεοαγγειογένεση (Vasculogenesis)* κατά την οποία στρατολογούνται από το μυελό των οστών ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, τα οποία ενσωματώνονται μέσα στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία ή διεγείρουν την δημιουργία νέων αγγείων απελευθερώνοντας αγγειογενετικούς παράγοντες.

B. Η *Αγγειογένεση* κατά την οποία αναπτύσσονται εκβλαστήσεις νέων αγγείων στα ήδη υπάρχοντα αγγεία και η *αρτηριογένεση* κατά την οποία οι εκβλαστήσεις των νέων αγγείων σταθεροποιούνται μετά από επικάλυψη τους με λεία μυϊκά κύτταρα.

Γ. Η *Παράλληλη αύξηση (Collateral growth)* κατά την οποία επεκτείνονται προϋπάρχοντα παράλληλα (collateral) αγγεία λόγω απόφραξης, όπως στη θρόμβωση αγγείου¹⁰.



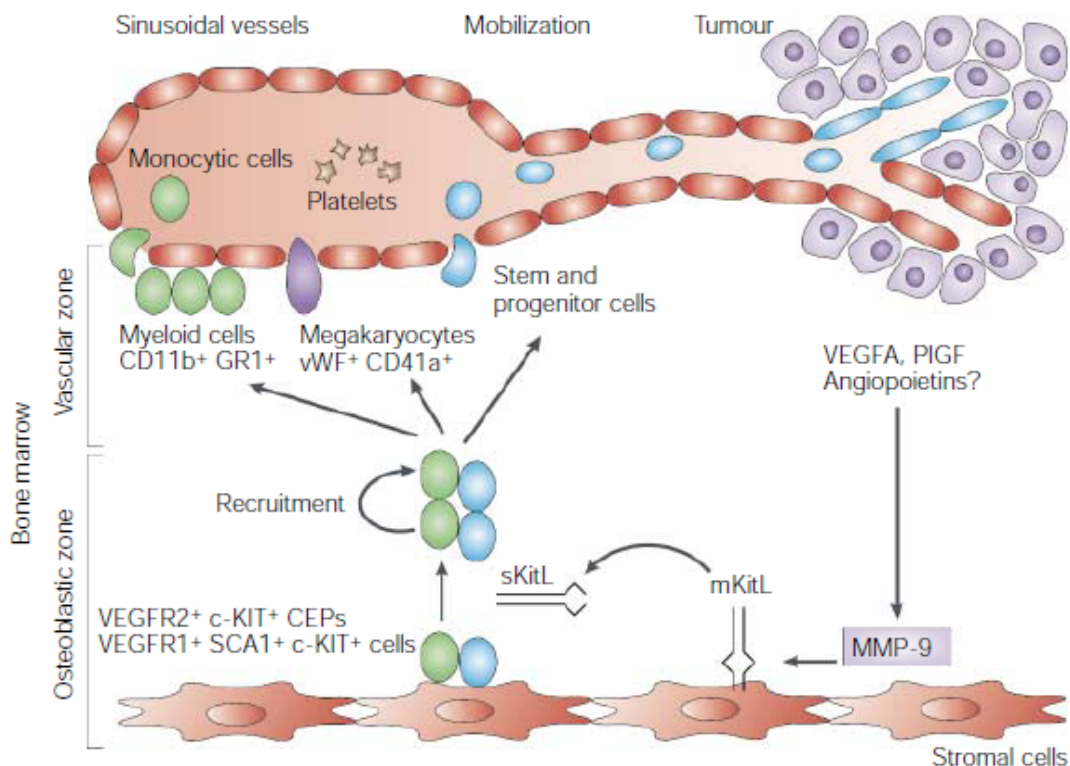
Εικόνα 2.5. Μηχανισμοί αύξησης του αγγειακού δικτύου στους ενήλικες (Carmeliet P., 2004)¹⁰.

2.7.3.a. Νεοαγγειογένεση (Vasculogenesis) σε ενήλικες

Αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν συναντώνται μόνο κατά την εμβρυϊκή ζωή, έχουν βρεθεί στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα των ενηλίκων. Οι παράγοντες VEGF-A, bFGF και ο ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) διεγείρουν την διαφοροποίηση και την κινητικότητα των κυττάρων αυτών¹¹. Κατά την νεοαγγειογένεση, τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα των ενηλίκων (multipotent adult progenitor cells, MAPCs) διαφοροποιούνται σε πρώιμα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) και αποκτούν αιμοποιητικούς και ενδοθηλιακούς δείκτες, όπως οι VEGFR-2 και CD34. Τα EPCs έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα^{26,33}. Τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (circulating endothelial progenitor cells, CEPs) φυσιολογικά αποτελούν περίπου το 0,002% των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος. Η συγκέντρωσή τους αυξάνεται όταν επάγεται νεοαγγειογένεση. Αυξημένη συγκέντρωση EPCs έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρκινώματα³³.

Στο μυελό των οστών τα EPCs οργανώνονται σε δύο λειτουργικές ζώνες/διαμερίσματα (Εικόνα 2.6). Η πρώτη ζώνη, γνωστή ως αγγειακή ζώνη, αποτελείται από EPCs που βρίσκονται στη S ή G2M φάση του κυτταρικού κύκλου, τα οποία είναι ικανά να διαφοροποιηθούν και να εισέλθουν στην περιφερική κυκλοφορία μετά τη λήψη ειδικών ερεθισμάτων. Η δεύτερη ζώνη, γνωστή ως οστεοβλαστική ζώνη, αποτελείται από EPCs που βρίσκονται στη G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, τα οποία δεν απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η ισορροπία μεταξύ των δύο λειτουργικών διαμερισμάτων διατηρείται λόγω της παρουσίας κυτταροκινών της εξωκυττάριας ουσίας και των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών. Κάτω από σταθερές καταστάσεις, τα περισσότερα από τα βλαστικά κύτταρα διατηρούνται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου και είναι καθηλωμένα στον μυελό των οστών.

Έχει διαπιστωθεί ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κινητοποίηση των EPCs επάγεται από ορισμένες μεταλοπρωτεϊνάσες (MMPs) μέσω της απελευθέρωσης κυτταροκινών, όπως του sKitL (stem-cell cytokine-soluble KIT ligand), το οποίο επάγεται από τη VEGF-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση της MMP-9 (Εικόνα 2.6)^{10,33-36}.

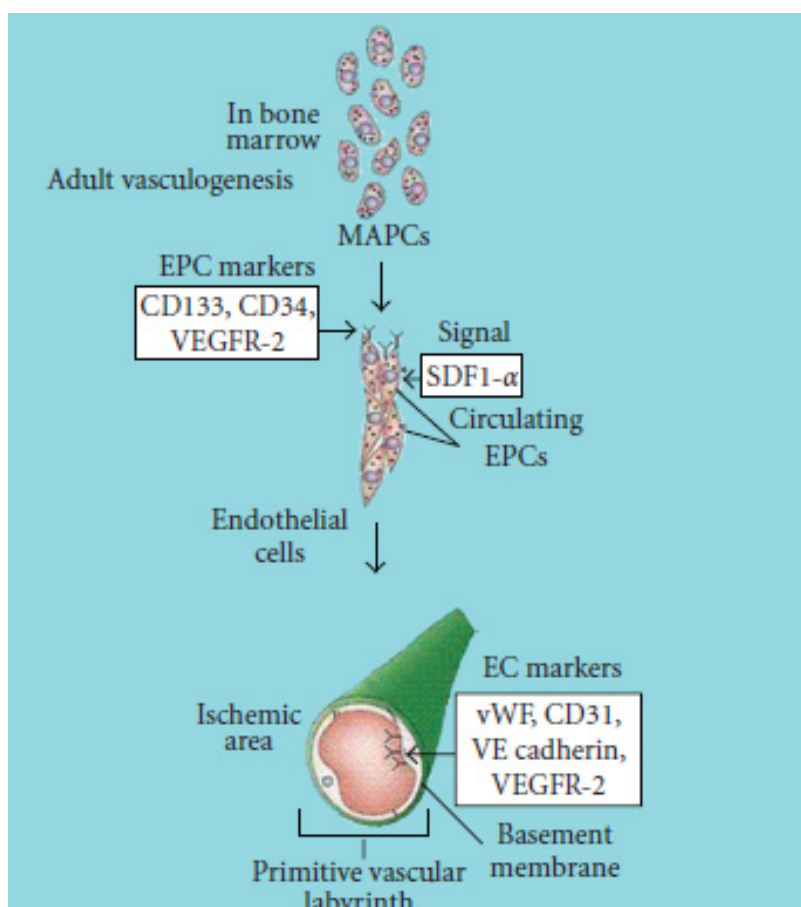


Εικόνα 2.6. Η μεσολαβούμενη από την MMP-9 απελευθέρωση του sKitL είναι αναγκαία για την κινητοποίηση των CEPs και των EPCs. Οι παράγοντες VEGF, PIGF και πιθανώς οι αγγειοποιητίνες ενεργοποιούν την MMP-9 στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, η οποία οδηγεί στην διάσπαση του sKitL, που επάγει την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, καθώς και την κινητικότητα των CEPs και των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα μετακινούνται από την οστεοβλαστική ζώνη στην αγγειακή ζώνη, όπου πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και εν συνεχεία περνούν στην κυκλοφορία του αίματος (Rafii et al., 2002)³⁴.

Η στρατολόγηση των EPCs γίνεται μέσω αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων, όπως του VEGF, της αγγειοποιητίνης και του παράγοντα 1^α του προερχόμενου από στρωματικά κύτταρα (stromal cell-derived factor, SDF-1^α). Ο τελευταίος συνδέεται στον υποδοχέα της χημοκίνης CXCR-4, που εκφράζεται στα EPCs. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται ακόμα πρώιμα EPCs γιατί εκφράζουν τους δείκτες CD133, CD34, CXCR4, CD146, VE-cadherin και VEGFR-2. Τα EPCs που κυκλοφορούν στο αίμα συνεχίζουν σταδιακά να διαφοροποιούνται, χάνουν το δείκτη

CD133 και αποκτούν ειδικούς δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως von Willebrand Factor (vWF), CD31, και VE cadherin^{10, 33, 34}. (Εικόνα 2.7)

Ορισμένα από τα EPCs που φτάνουν στον ιστό στόχο, συνεχίζουν να διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ωρίμανση των ενδοθηλιακών κυττάρων σημειώνεται από την απώλεια του επιφανειακού δείκτη CD34. Πιστεύεται ότι τα κύτταρα που δεν διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα λειτουργούν ως πηγή προαγγειογενετικών κυτταροκινών, απελευθερώνοντας αυξητικούς παράγοντες, όπως VEGF, ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (hepatocyte growth factor, HGF), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) και GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor)^{13, 33}. Επομένως, τα EPCs συνεισφέρουν με δύο τρόπους στην αύξηση των αγγείων: 1) διαφοροποιούμενα σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εντοιχίζονται στα νεοσχηματισθέντα αγγεία και 2) συμβάλλοντας στη δημιουργία ενός προ-αγγειογενετικού μικροπεριβάλλοντος μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων^{10, 13, 33}.



Εικόνα 2.7. Νεοαγγειογένεση (Vasculogenesis) ενηλίκων (Nussenbaum et al., 2010)¹³

2.7.3.β. Μηχανισμός φυσιολογικής αγγειογένεσης. Επέκταση και διαμόρφωση των αγγείων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο σχηματισμός νέων αγγείων ξεκινά με την απομάκρυνση των τοιχωματικών κυττάρων (περικυττάρων) από τα προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία. Η απουσία περικυττάρων βοηθά στην διάσπαση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας μέσω των μεταλοπρωτεϊνών (MMPs). Καθώς η βασική μεμβράνη και η εξωκυττάρια ουσία αποδομούνται, τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται έως ότου σχηματιστεί ένα μη σταθερό μικρο αγγείο. Ακολουθεί στρατολόγηση μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται σε περικύτταρα και έτσι, διασφαλίζεται ο σχηματισμός σταθερών αιμοφόρων αγγείων¹³. Ακολουθεί η διαμόρφωση τους, η οποία είναι αποτέλεσμα συνδυασμένης δράσης της κατευθυνόμενης εκβλάστησης, της εκλεκτικής αγγειακής σύντηξης και της απόπτωσης. Έτσι, μερικά αγγεία περιορίζονται, ενώ άλλα αυξάνονται σε μέγεθος δίνοντας την τυπική σαν δένδρο δομή των αιμοφόρων αγγείων. Αφού σχηματιστεί ένα πρώιμο αγγειακό δίκτυο, ακολουθεί περαιτέρω αναδιαμόρφωση των πρώιμων αγγείων σε πιο περίπλοκο δίκτυο που απαιτεί το διαχωρισμό του σε αρτηριακό και φλεβικό, ορίζοντας έτσι και την αγγειακή πολικότητα^{26,30}. Η εδραίωση της αρτηριακής και φλεβικής ταυτότητας συμβαίνει παράλληλα με τη διαμόρφωση και την εκλεκτική σύντηξη νέων εκβλαστήσεων. Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο νευρωνικό μονοπάτι σηματοδοτούν και την αγγειογένεση²⁶.

Ο VEGF συμβάλλει ουσιαστικά στον σχηματισμό των εκβλαστήσεων και ειδικά ορισμένες ισομορφές του (VEGF188). Η neuropilin επάγει την αξονική ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου. Μια άλλη σημαντική ομάδα μορίων σηματοδότησης που εμπλέκονται στη διαμόρφωση του αγγειακού δικτύου είναι οι πλεξίνες (plexins), ειδικά η πλεξίνη D1, μέσω της Semaphorin 3E. Σημαντικό είναι ακόμη το μονοπάτι Notch που συμβάλει στην διαμόρφωση του αυλού, στη σταθεροποίηση των αγγείων, καθώς και στην αναδιαμόρφωση τους²⁶.

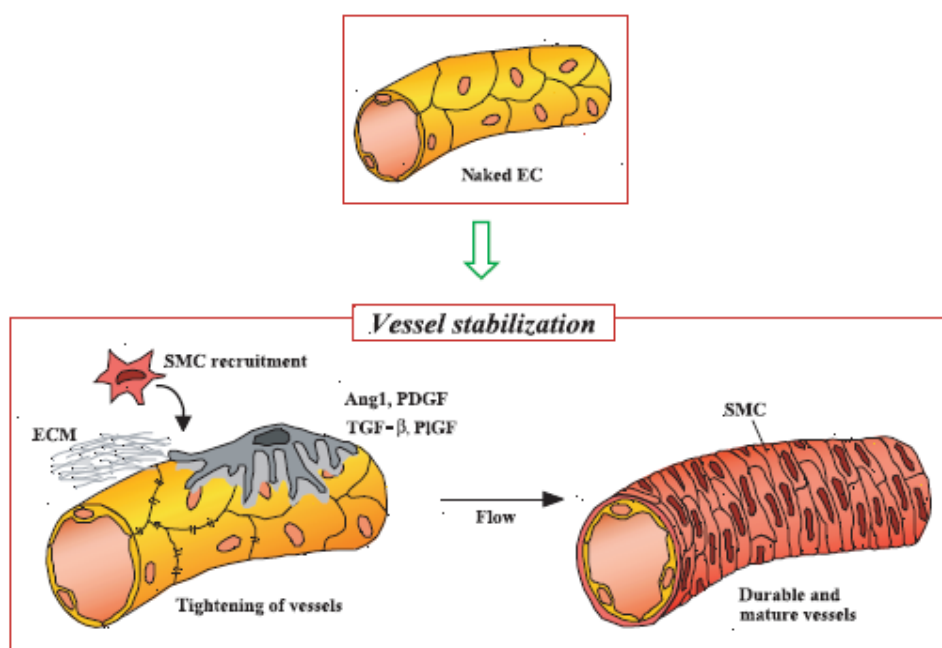
Επιπλέον, μόρια της εξωκυττάριας ουσίας συμβάλουν στην σταθεροποίηση των αγγείων και επομένως και στην αναδιαμόρφωσή τους. Το κολλαγόνο τύπου XVIII, ένα στοιχείο της βασικής μεμβράνης, απαιτείται για την υποστρόφη των υαλοειδών αγγείων στο αναπτυσσόμενο μάτι. Τα υαλοειδή αγγεία σχηματίζονται για να προσφέρουν θρεπτικά συστατικά στην κάψα των φακών. Όταν η διαδικασία αυτή

ολοκληρωθεί, τα υαλοειδή αγγεία υποστρέφουν ως μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης του ματιού. Απουσία του κολλαγόνου τύπου XVIII εμποδίζει αυτή την υποστροφή. Επιπλέον, είναι πιθανό σήματα από τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας που μεταφέρονται μέσω εντεγκρινών, όπως των alpha v, alpha 5 και beta 3, να συνεισφέρουν σημαντικά στη διαμόρφωση και σταθερότητα των αγγείων²⁶.

2.7.3.γ. Αρτηριογένεση (arteriogenesis)

Για να επεκταθούν και να διακλαδισθούν τα αγγεία θα πρέπει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να πολλαπλασιασθούν, να μεταναστεύσουν και να επιβιώσουν. Επιπρόσθετα, για τη σωστή λειτουργία των νεοσχηματισθέντων αγγείων (όλων εκτός των τριχοειδών) είναι απαραίτητη η κάλυψη τους από τοιχωματικά κύτταρα, τα οποία προσδίδουν ωριμότητα και σταθερότητα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **αρτηριογένεση**.

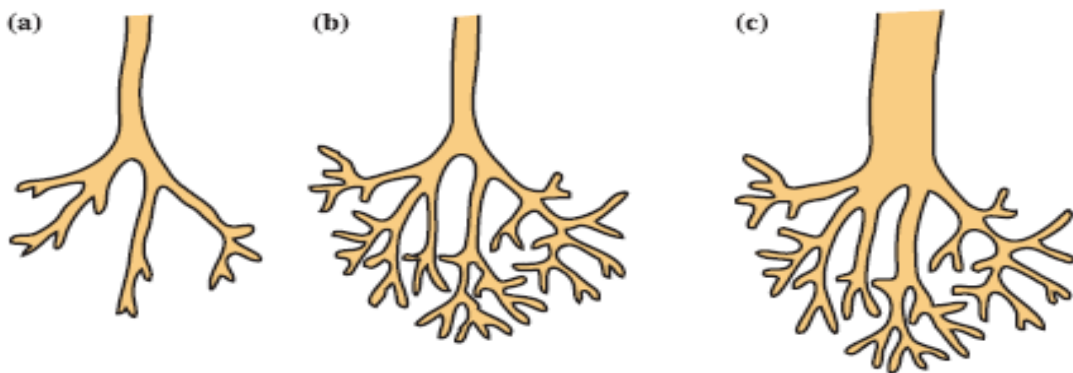
Μετά την εκβλάστηση των αγγείων, σχηματίζεται αρχικά ένα κανάλι από ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα εκκολαπτόμενα αγγεία σταθεροποιούνται με τη στρατολόγηση λείων μυϊκών κυττάρων και περικυττάρων, τις εναποθέσεις εξωκυττάριας ουσίας και τη σύσφιξη των κυτταρικών σχέσεων. (Εικόνα 2.8). Η ροή του αίματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητά τους, αγγεία που υποαιματώνονται είναι καταδικασμένα σε υποστροφή¹⁰.



Εικόνα 2.8. Ωρίμανση και σταθεροποίηση των αγγείων (Carmeliet P., 2004)¹⁰.

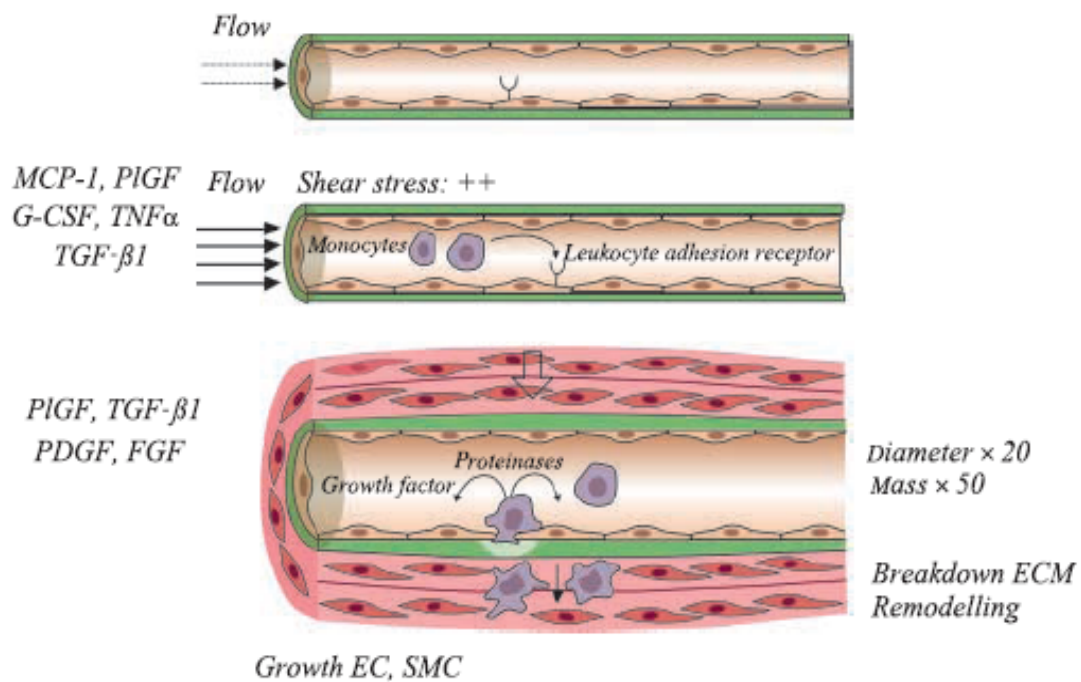
2.7.3.δ. Παράλληλη αύξηση των αγγείων (Collateral growth)

Οι αρτηρίες παρέχουν μεγάλο όγκο αίματος στους ιστούς. Όταν μια αρτηρία αποφράσσεται, η περιοχή που αιματώνει ισχαιμεί. Στις περιπτώσεις αυτές, επειδή το αρτηριακό σύστημα συχνά διαπλέκεται με προϋπάρχοντα παράλληλα αγγεία, αυτά μπορεί να διαταθούν και να διασώσουν την ισχαιμική περιοχή. Για να αυξηθεί η αιμάτωση ενός ιστού που ισχαιμεί, πρέπει τα εγγύτερα παράλληλα αγγεία να διαταθούν, ώστε να αυξηθεί η ροή του αίματος και από τα μικρότερα άπω αγγεία να δημιουργηθούν νέα μικρά αγγεία (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9. Μηχανισμοί αύξησης της ροής του αίματος στα παράλληλα αγγεία: α) αγγείο πριν την απόφραξη, β) αγγειογένεση μικρών άπω αγγείων, γ) διαστολή των εγγύς παράλληλων (collateral) και των μικρών αγγείων (Carmeliet P., 2004)¹⁰.

Οι διαφορές πίεσης μεταξύ των περιοχών αιμάτωσης, ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα οποία προσκολλώνται μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες και πρωτεϊνάσες (uPA και MMPs), που επάγουν την μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Οι κυτταροκίνες που προσελκύουν μονοκύτταρα ή παρατείνουν την επιβίωσή τους (MCP-1, GM-CSF, TGF- β 1, TNF- α , TNF α - R β 55) επάγουν την παράλληλη αύξηση των αγγείων, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (π.χ. IL-10) δρουν ανασταλτικά. Ο PlGF επάγει την παράλληλη αύξηση των αγγείων, όχι μόνο γιατί στρατολογεί μονοκύτταρα, αλλά και γιατί διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων. Η απελευθέρωση aFGF, FGF-4 ή bFGF (και PDGF-BB) διεγείρει την παράλληλη αύξηση των αγγείων, εν μέρει με την θετική ρύθμιση της έκφρασης του PDGFR, ενώ η δράση του VEGF παραμένει διαφορούμενη¹⁰.



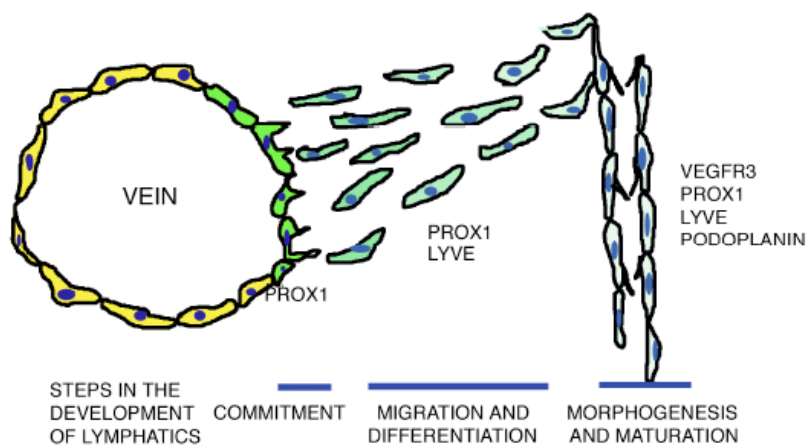
Εικόνα 2.10. Μηχανισμοί παράλληλης αύξησης αγγείων. Σε απόφραξη ενός τροφοδοτικού αγγείου, η ροή του αίματος μέσω των προϋπαρχόντων παράλληλων βοηθητικών αγγείων αυξάνεται. Αυτό έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, το οποίο εκκρίνει παράγοντες προσέλκυσης μονοκυττάρων και την έκφραση υποδοχέων προσκόλλησης λευκοκυττάρων. Τα μονοκύτταρα παράγουν μιτογόνους παράγοντες των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων και πρωτεϊνάσες, οδηγώντας στην διάταση των παράλληλων αγγείων. Στην εικόνα φαίνονται τα μόρια που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία (Carmeliet P., 2004)¹⁰.

2.7.4 Λεμφαγγειογένεση

Η λεμφική αγγείωση αποτελείται από τριχοειδή με τυφλά άκρα που αρδεύουν διάμεσο υγρό και πρωτεΐνες από τους ιστούς. Το περιεχόμενό τους επιστρέφει στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των μεγάλων λεμφικών αγωγών (θωρακικός πόρος) που καταλήγουν στην αριστερή υποκλείδια φλέβα. Τα λεμφαγγεία είναι ακόμη υπεύθυνα για την πρόσληψη λίπους από το έντερο και παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η λεμφαγγειογένεση ξεκινά από υποομάδες φλεβών. Τα κύτταρα των φλεβών από τα οποία θα προκύψει η λεμφαγγειογένεση εκφράζουν τον Prox1, έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση ορισμένων γονιδίων. Τα κύτταρα αυτά αποκολλώνται από τις μητρικές φλέβες, μεταναστεύουν και οργανώνουν ένα παράλληλο αγγειακό δίκτυο, αυτό των λεμφαγγείων που αρδεύει το περιεχόμενό του σε μεγάλες φλέβες²⁶.

Η ωρίμανση του λεμφικού αγγειακού δικτύου, όπως και η ομοιοστατική λειτουργία του απαιτεί την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-C και την ενεργοποίηση του υποδοχέα 3 του VEGF (VEGFR-3). Ο υποδοχέας VEGFR-3 δεν απαντάται μόνο σε λεμφαγγεία, αλλά και στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, όπως άλλωστε και ο υποδοχέας VEGFR-2. Στα λεμφαγγεία, η πρωτεΐνη VEGF-C ενεργοποιεί την έκφραση των υποδοχέων VEGFR-2 και VEGFR-3. Εξίσου σημαντικά στην λεμφαγγειογένεση είναι τα μονοπάτια σηματοδότησης της αγγειοποιητίνης και του υποδοχέα Tie2. Άλλες πρωτεΐνες που εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων είναι οι LYVE και podoplanin (Εικόνα 2.11)²⁶.



Εικόνα 2.11: Λεμφαγγειογένεση (Iruela-Arispe, 2005)²⁶.

2.8 Σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων στη νεοπλασία

Τα κακοήθη νεοπλάσματα καθώς αναπτύσσονται απομακρύνονται από τα πλησιέστερα αιμοφόρα αγγεία με αποτέλεσμα να μη μπορούν να αναπτυχθούν πέραν ενός ορισμένου μεγέθους, λόγω στέρησης βασικών θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Επομένως, ένα κακόηθες νεόπλασμα μπορεί να παραμείνει για πολλά χρόνια σε λανθάνουσα κατάσταση ή να εκμεταλλευτεί την διαδικασία της αγγειογένεσης και να σχηματίσει το δικό του αγγειακό δίκτυο που θα του επιτρέψει να επεκταθεί και να διηθήσει παρακείμενους ιστούς ή όργανα ή να δώσει μεταστάσεις³⁷⁻³⁹.

Επικρατεί η άποψη ότι οι αγγειογενετικοί παράγοντες απελευθερώνονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και διεγείρουν την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από τα προϋπάρχοντα. Όμως οι όγκοι μπορεί να αιματώνονται και μέσω άλλων διαδικασιών, όπως: 1) “Vascular co-option”, χρησιμοποίηση των ήδη υπαρχόντων αγγείων και 2) “Vascular mimicry”, σχηματισμός αγγειακών καναλιών από τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα χωρίς τη συμμετοχή ενδοθηλιακών κυττάρων. Πάντως, οι νεοπλασματικοί όγκοι γενικά απαιτούν λιγότερο οξυγόνο και μεταβολίτες από ότι οι ιστοί μέσα στους οποίους αναπτύσσονται.

2.8.1. Μηχανισμοί σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων στη νεοπλασία

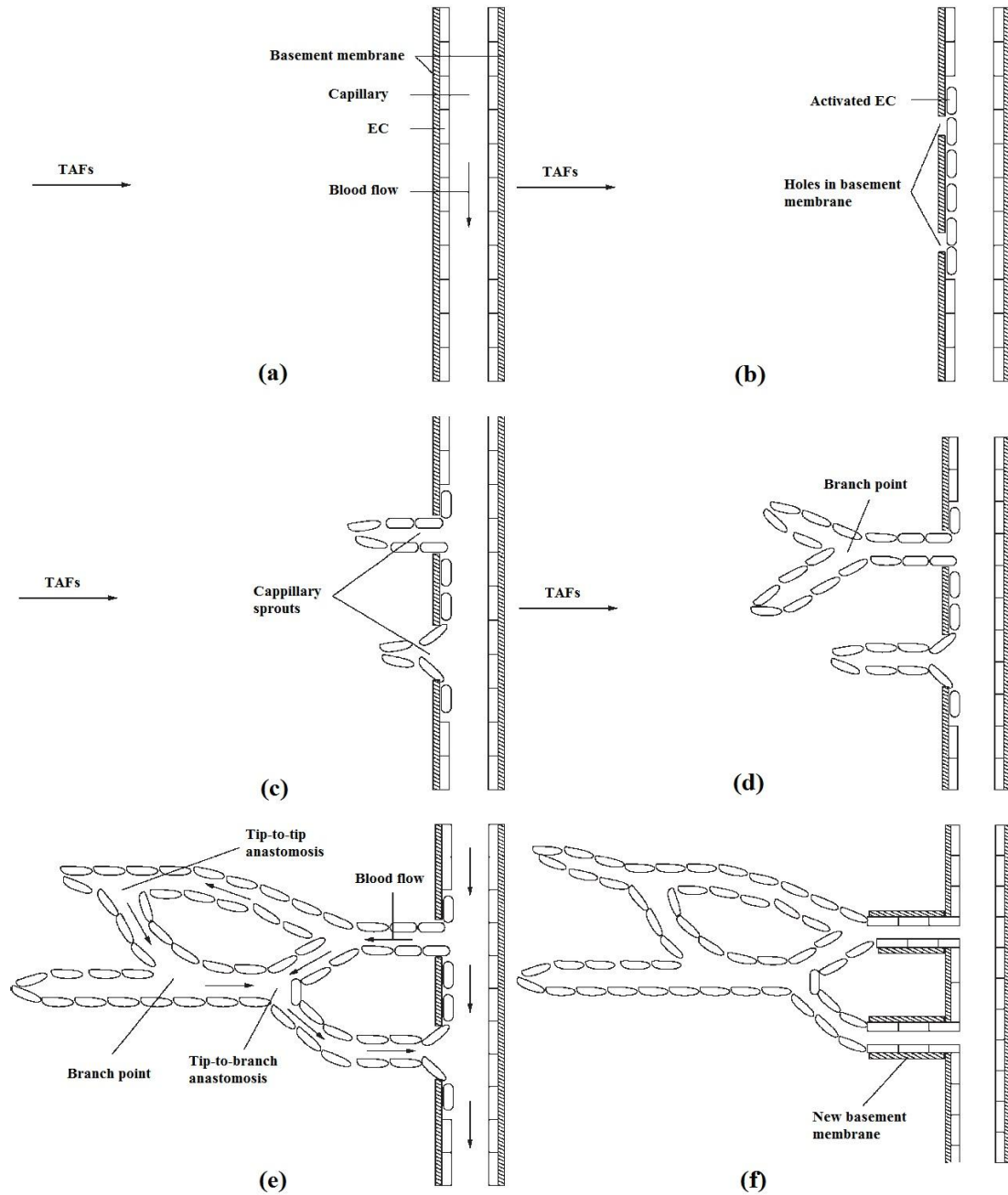
Η αγγειογένεση των νεοπλασμάτων φαίνεται να περιλαμβάνει δύο φάσεις. Η πρώτη φάση ορίζεται ως ‘μη αγγειακή φάση’ (‘avascular phase’) και απαντάται σε μικρούς όγκους που δεν ξεπερνούν τα 1-2 χιλιοστά σε διάμετρο. Οι όγκοι αυτοί παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση διατηρώντας μια ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Ένα μέρος αυτών των όγκων θα περάσει στη δεύτερη φάση, την αποκαλούμενη ‘φάση αγγείωσης’ (‘vascular phase’) κατά την οποία λαμβάνει χώρα η επέκταση του όγκου. Η ίδια αρχή διέπει και τη θεωρία που αφορά τις μεταστάσεις¹⁶.

Ο μηχανισμός δημιουργίας αγγείων στους κακοήθεις όγκους³⁹⁻⁴¹ περιλαμβάνει συνοπτικά τα παρακάτω βασικά στάδια:

- 1. Αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης των αγγείων με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων.** Είναι το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα και πραγματοποιείται με την απελευθέρωση από τα νεοπλασματικά κύτταρα ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Η πλασμίνη

που προκύπτει από το πλασμινογόνο αποδομεί πλήθος συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας και τον πρωτεϊνικό πυρήνα των πρωτεογλυκανών. Η δράση των ουσιών αυτών επάγεται από την έκκριση πλήθους άλλων αυξητικών παραγόντων (κυρίως VEGF, bFGF, IGF1) και κυτοκινών από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

2. **Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο.** Υπό την επίδραση του VEGF και της Ang-2 τα αγγεία διαστελλονται, αυξάνει η διαπερατότητά τους μέχρι διαρροής, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο.
3. **Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και συνάθροιση τους με σχηματισμό αυλών.** Η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγονται από την έκκριση του VEGF-A και της Ang-1. Η συνάθροιση των ενδοθηλιακών κυττάρων υποβοηθείται από ιντεγκρίνες.
4. **Προσέλκυση περικυττάρων, λείων μυϊκών και άλλων υποστηρικτικών κυττάρων και σχηματισμός νέας βασικής μεμβράνης γύρω από τα νεο-σχηματισθέντα αγγεία.** Με τη βοήθεια του PDGF-BB, του TGF-β1 και της Ang-1 προσελκύονται περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία επενδύουν τα νεο-σχηματισθέντα αγγεία. Επιπλέον, νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να πολλαπλασιαστούν γύρω από προϋπάρχοντα αγγεία και να σχηματιστεί ένας περιαγγειακός χιτώνας⁴².



Εικόνα 2.12: Αγγειογένεση των όγκων: α) απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων από τον όγκο, β) απελευθέρωση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα πρωτεασών που διασπών τη βασική μεμβράνη, γ) απόσπαση ενδοθηλιακών κυττάρων από το μητρικό αγγείο, σχηματισμός νέων τριχοειδικών εκβλαστήσεων, δ) πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμός τριχοειδικών διακλαδώσεων, ε) σχηματισμός κλειστών αγκυλών (loop) και ροή αίματος εντός των καινούριων τριχοειδών, στ) ωρίμανση των νεοσχηματισθέντων αγγείων, απενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμός νέων βασικών μεμβρανών (TAF: Tumour Angiogenesis Factor, EC: Endothelial Cell) (Plank et al., 2003)²⁹.

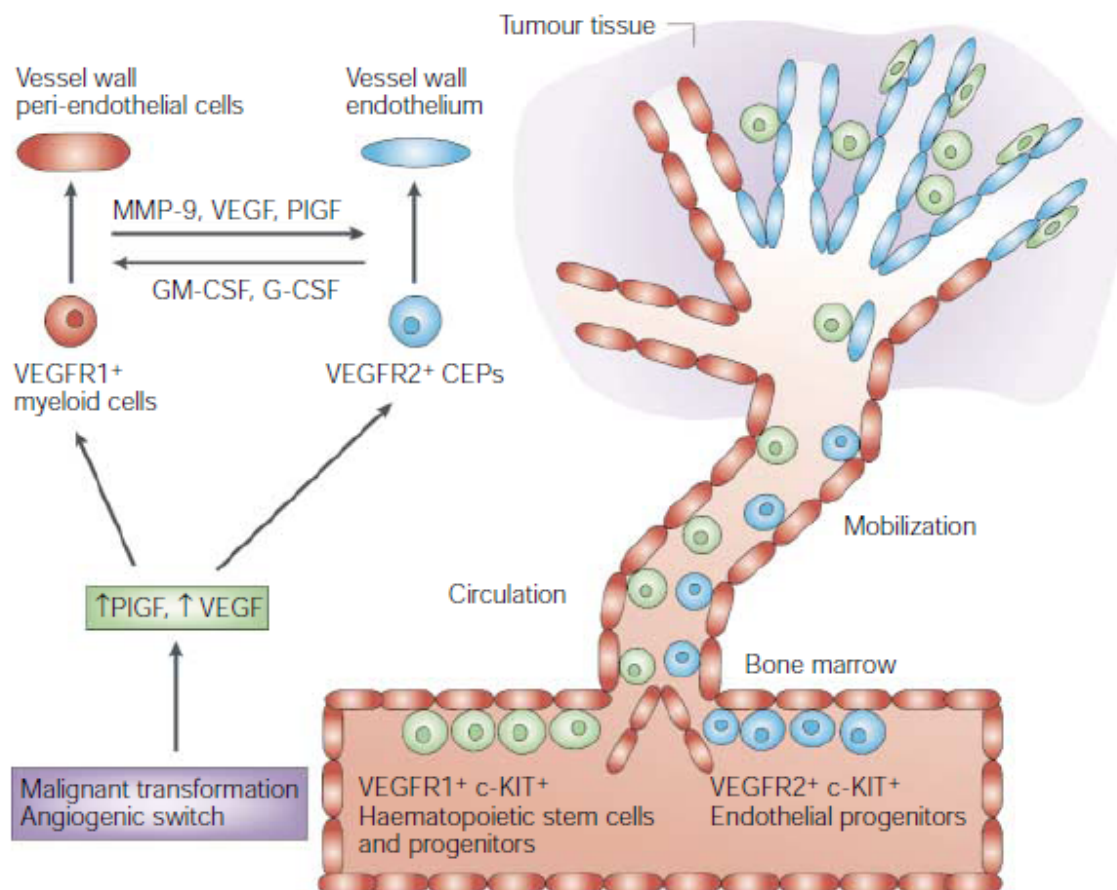
2.8.2. Κινητοποίηση βλαστικών κυττάρων (stem cells) από το μυελό των οστών

Διάφορα σήματα από τον όγκο μπορούν να κινητοποιήσουν βλαστικά κύτταρα από το μυελό των οστών. Στο μυελό των οστών, τα βλαστικά κύτταρα λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από τα στρωματικά κύτταρα, τα οποία όμως χάνουν όταν απομακρυνθούν και επομένως αποπίπτουν, εκτός βέβαια εάν εκτεθούν σε νέα σήματα επιβίωσης⁴³.

Κατά την αρχική φάση ανάπτυξης διαφόρων όγκων, στο νεοσχηματισθέν αγγειακό δίκτυο ανιχνεύονται βλαστικά κύτταρα VEGFR-2 θετικά. Σε λεμφώματα, το 95% των αγγείων περιέχει βλαστικά κύτταρα, ενώ σε θυμώματα το 25-30%. Σε καρκινώματα μαστού, ο αριθμός των κυττάρων αυτών είναι μικρότερος, ενώ υπάρχουν και όγκοι στους οποίους δεν κινητοποιούνται βλαστικά κύτταρα⁴³.

Δύο τύποι βλαστικών κυττάρων είναι απαραίτητοι για την αγγειογένεση: 1) τα βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR-2, τα οποία διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεισφέρουν στην επέκταση του αγγειακού δικτύου και 2) τα βλαστικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR-1, διαφοροποιούνται σε πρόδρομα μονοκύτταρα (precursor), μεταναστεύουν στον όγκο και υποστηρίζουν την αγγειογένεση του⁴³.

Η κινητοποίηση των παραπάνω βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών είναι μια δυναμική διαδικασία που απαιτεί την ενεργοποίηση διαφόρων μορίων, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλοπρωτεϊνών και ενεργοποιημένων κυτταροκινών από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η πρωτεΐνη VEGF-A, μέσω της δράσης της στους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, συμβάλει ουσιαστικά στη κινητοποίηση αυτών των βλαστικών κυττάρων⁴³⁻⁴⁵. Εξίσου σύνθετος, αλλά λιγότερο κατανοητός, είναι ο μηχανισμός με τον οποίο τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (CEP) διαφοροποιούνται και ενσωματώνονται στα νέα αγγεία του όγκου (Εικόνα 2.13)³⁴.



Εικόνα 2.13. Αγγειογενετικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του όγκου κινητοποιούν ταυτόχρονα VEGFR1+ αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και VEGFR2+ κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα από το μυελό των οστών. Η κινητοποίηση τόσο των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων όσο και των αιμοποιητικών κυττάρων θεωρείται απαραίτητη για την ενσωμάτωση των διαφοροποιημένων κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στο αγγειακό δίκτυο του όγκου (Rafii et al., 2002)³⁴.

2.8.3. Ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων

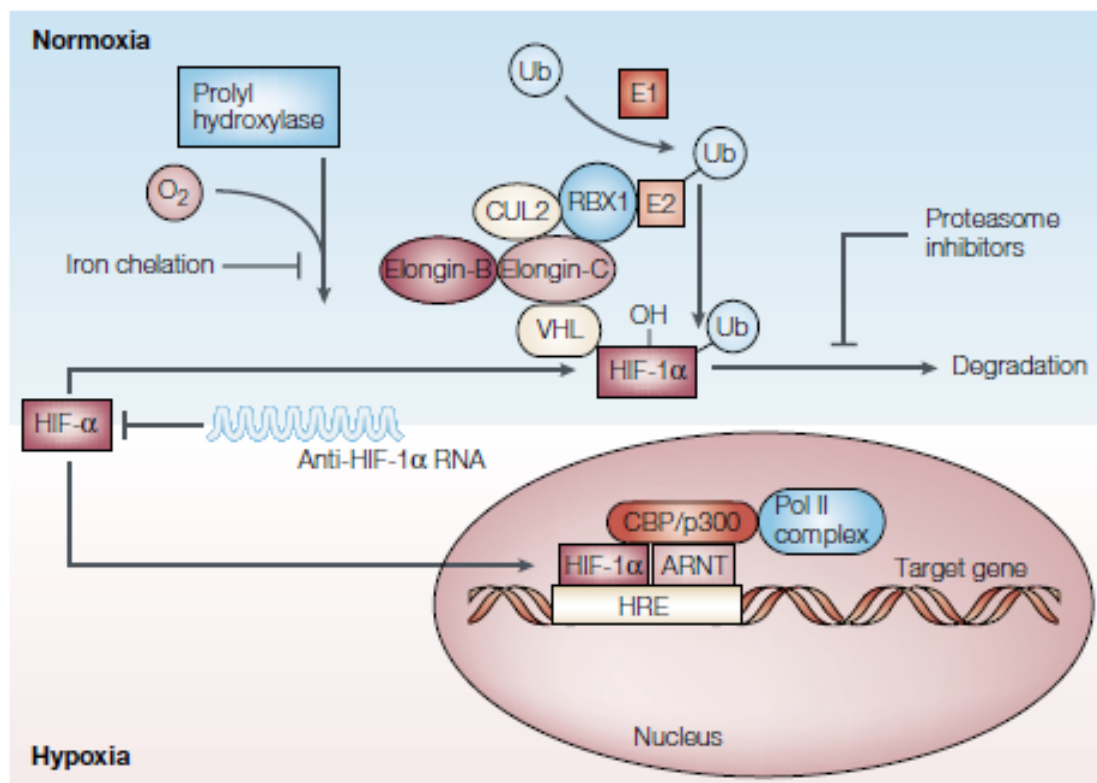
Ιδιαίτερα σημαντικός είναι και ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων που διηθούν τους νεοπλασματικούς όγκους, όπως λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, μαστοκυττάρων και ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ιδιότητα να επάγουν από μόνα τους την αγγειογενετική διαδικασία. Συγκεκριμένα, τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν πληθώρα αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, όπως: VEGF, PIGF, PDGF, basic FGF, Ang1, Ang-2, EGF, TGF- α , TGF- β 1, TNF- α , MCP-1 και ιντερλευκίνες (ιντερλευκίνη

8), οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παράλληλα εκκρίνουν και πλήθος πρωτεασών, όπως τρυπτάση (tryptase), χυμάση (chymase), MMPs, ηπαρινάση (heparanase) και uPA που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη, καθώς και ουσίες που προάγουν την αγγειογένεση. Εντούτοις, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα ίδια κύτταρα παράγουν και αναστολείς της αγγειογένεσης, όπως θρομβοσπονδίνη 1 (thrombospondin 1, TSP-1), ιντερφερόνες α και γ (Interferon-α, γ) κ.α. Ο μηχανισμός που ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης που εκκρίνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα δεν είναι γνωστός. Παρόλα αυτά, η συνεισφορά των φλεγμονωδών κυττάρων στη δημιουργία των αιμοφόρων αγγείων των όγκων έχειδειχθεί από πολλές πειραματικές μελέτες^{27,46,47}. Είναι γνωστό ότι τα λευκοκύτταρα και τα κύτταρα των αγγείων αλληλοεπηρεάζονται. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες ενισχύουν τη φλεγμονώδη διαδικασία κινητοποιώντας και επηρεάζοντας τη λειτουργία των λευκοκυττάρων. Για παράδειγμα, ο VEGF επάγει την νεοπλασία, όχι μόνο διεγείροντας την αγγειογένεση, αλλά επίσης αναστέλλοντας τη λειτουργική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Άλλα αγγειογενετικά μόρια, όπως PIGF, TGF-β1, PDGF, FGFs, επίσης ρυθμίζουν τη λειτουργία των λευκοκυττάρων. Επιπλέον, οι χημοκίνες στρατολογούν λευκοκύτταρα και διεγείρουν άμεσα τα ενδοθηλιακά κύτταρα^{30,34}.

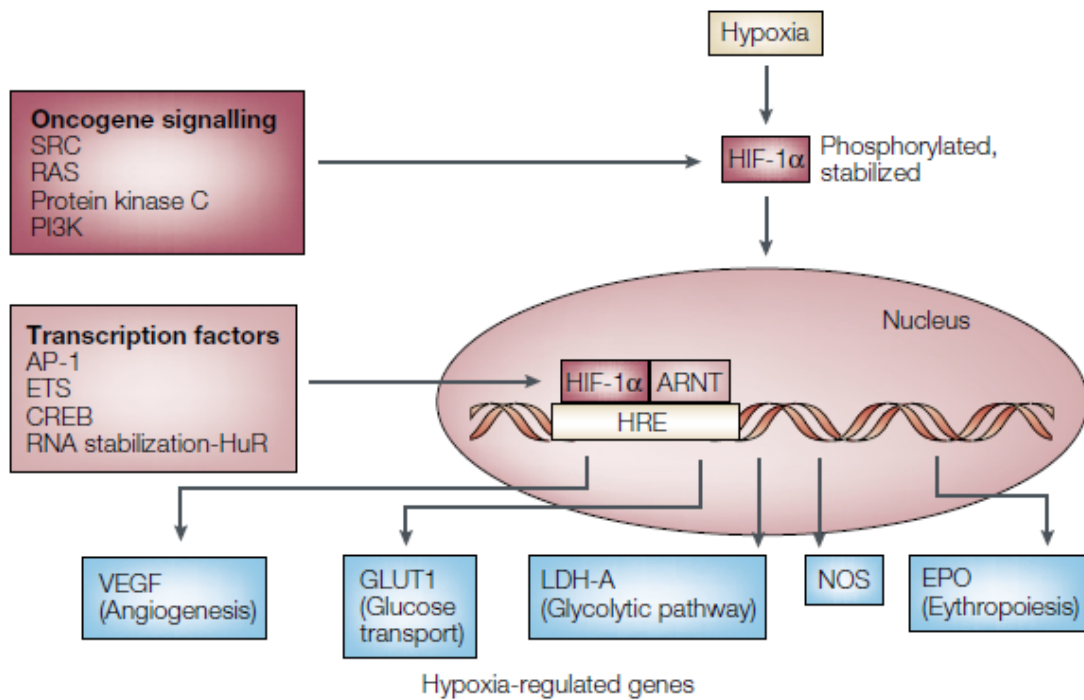
2.9. Ο ρόλος της υποξίας στην αγγειογένεση

Η ταχεία αύξηση του όγκου σε συνδυασμό με την ανώμαλη και ακανόνιστη οργάνωση του αγγειακού δικτύου έχει ως συνέπεια ορισμένα νεοπλασματικά κύτταρα να βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη των 100μm από αιμοφόρα αγγεία με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε υποξικό περιβάλλον. Παρόλο ότι η υποξία είναι τοξική τόσο για τα φυσιολογικά όσο και για τα νεοπλασματικά κύτταρα, τα τελευταία υποβάλλονται σε γενετικές και άλλες προσαρμοστικές αλλαγές που τους επιτρέπουν να επιβιώσουν, ακόμα και να πολλαπλασιαστούν σε ένα υποξικό περιβάλλον. Αυτές οι διαδικασίες συνεισφέρουν στον κακοήθη φαινότυπο και στην επιθετική συμπεριφορά του όγκου⁴⁸. Τα γονίδια που επάγονται από την υποξία ρυθμίζουν και διάφορες άλλες βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης, του μεταβολισμού και της απόπτωσης.

Τα κύτταρα απαντούν στα μειωμένα επίπεδα οξυγόνου μέσω του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα, HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor 1). Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τον παράγοντα HIF-1α και τον HIF-1β (ή aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). Παρουσία οξυγόνου, ο HIF-1α υδρολύεται, ακετυλιώνεται και τελικά συνδέεται στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη VHL (Von Hippel–Lindau). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί τον HIF-1α στο πρωτεόσωμα, όπου διασπάται (Εικόνα 2.14). Απουσία οξυγόνου, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται και σταθεροποιείται μέσω ογκογόνων μονοπατιών σηματοδότησης, τα οποία περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες SRC, RAS, πρωτεϊνική κινάση C, PI3K (Phosphatidylinositol 3-OH kinase) και p42/p44 mitogen-activated protein kinases. Ο σταθεροποιημένος πλέον HIF-1α μεταφέρεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες, όπως ARNT, CBP/p300 και το σύμπλεγμα DNA πολυμεράση II (Pol II) προκειμένου να συνδεθεί με τα στοιχεία ανταπόκρισης στην υποξία (hypoxia-response elements, HREs) και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων που απαντούν στην υποξία, μεταξύ των οποίων και τον προαγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα VEGF-A (Εικόνα 2.15)⁴⁸.



Εικόνα 2.14. Σηματοδοτικό μονοπάτι του HIF-1 (Harris, A.L., 2002)⁴⁸.



Εικόνα 2.15. Σε υποξικές συνθήκες, ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται και σταθεροποιείται. Στον πυρήνα, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι AP-1, ETS και CREB (cyclic AMP-response-element-binding protein), οπότε ενεργοποιείται η μεταγραφή των RNA συνδεόμενων πρωτεϊνών (RNA-binding proteins), που βοηθούν στη σταθεροποίηση του mRNA. Από τον HIF-1α ενεργοποιούνται τα γονίδια των: α) VEGF-A που επάγει την αγγειογένεση, β) GLUT1 (Glucose transporter 1) που ενεργοποιεί τη μεταφορά της γλυκόζης, γ) LDH-A (lactate dehydrogenase-A) που εμπλέκεται στο γλυκολυτικό μονοπάτι και δ) της ερυθροποιητίνης (EPO) που επάγει την ερυθροποίηση. Ο HIF-1α επιπλέον ενεργοποιεί τη μεταγραφή της συνθάσης του νιτρικού οξέος [nitric oxide synthase (NOS)], που επάγει την αγγειογένεση και την αγγειοδιαστολή (Harris, A.L., 2002)⁴⁸.

Ο HIF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του VEGF-A και ενός από τους υποδοχείς του, του VEGFR1/FLT-1. Η αγγειογένεση που προκαλείται κατά την υποξία αναστέλλεται από αναστολείς των ογκογόνων μονοπατιών RAS, EGFR και HER2/neu (receptor tyrosine kinase 2, ERBB2), αποκαλύπτοντας έτσι μια επικοινωνία μεταξύ ογκογόνων μονοπατιών και μονοπατιών που ενεργοποιούνται κατά την υποξία. Η ενεργοποίηση του HIF-1 μπορεί επίσης να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση αντι-αγγειογενετικών πρωτεϊνών, όπως θρομβοσπονδίνη 1 και 2⁴⁸.

Ο HIF-1 επάγει επίσης την απόπτωση ενεργοποιώντας τη μεταγραφή πολλών προ-αποπτωτικών γονιδίων. Οι αποφωσφορυλιωμένες μορφές του HIF-1α συνδέονται στο p53 και επάγουν την p53 εξαρτώμενη απόπτωση. Κάτω από υποξικές συνθήκες, ο HIF1α φωσφορυλιώνεται και το p53 σταθεροποιείται. Επιπλέον, το p53 στοχεύει τον HIF-1α σε ένα μονοπάτι αποδόμησης όπου εμπλέκεται το MDM2. Επομένως, ο HIF-1α μπορεί να μεσολαβεί στην απόπτωση συνδέοντας και σταθεροποιώντας το p53, ή το p53 μπορεί να εμποδίζει το HIF-1α στην ενεργοποίηση της μεταγραφής αντι-αποπτωτικών γονιδίων⁴⁸.

2.10 Χαρακτηριστικά των αιμοφόρων αγγείων των νεοπλασματικών ιστών

Μολονότι τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία ενός νεοπλάσματος αποτελούνται από φυσιολογικά κύτταρα, εν τούτοις παρουσιάζουν σημαντικές παρεκκλίσεις από τα φυσιολογικά αγγεία. Αυτό κυρίως οφείλεται στην απουσία δυναμικής ισορροπίας μεταξύ επαγωγέων και αναστολέων της αγγειογένεσης⁴⁹.

Όπως τα φυσιολογικά αιμοφόρα αγγεία έτσι και τα αγγεία των νεοπλασμάτων αποτελούνται από: ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα (τοιχωματικά κύτταρα) και βασική μεμβράνη, όμως τα τρία αυτά στοιχεία παρουσιάζουν αρκετές διαταραχές. Στα φυσιολογικά αγγεία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν μια στιβάδα (in vivo και in vitro) και οι συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι σφιχτές δημιουργώντας ένα φραγμό στην εξαγγείωση μακρομορίων. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου είναι δομικά ανώμαλα και παρουσιάζουν διαταραχές στη λειτουργία του φραγμού. Διαθέτουν περισσότερους και ευρύτερους πόρους από ότι τα φυσιολογικά αγγεία και παρουσιάζουν διαρροές μακρομορίων, που διαφέρουν από όγκο σε όγκο⁴³. Επίσης, η βασική μεμβράνη μπορεί να είναι απύσα ή ασυνεχής ή να έχει πολλαπλές στιβάδες, να συνδέεται χαλαρά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα περικύτταρα, δημιουργώντας “ανοίγματα” ή διευρυμένες ενδοσυνδέσεις, καθιστώντας το αγγειακό δίκτυο του όγκου πολλές φορές αιμορραγικό. Συχνά τα ενδοθηλιακά κύτταρα υποκαθίστανται από νεοπλασματικά ή νεοπλασματικά κύτταρα μαζί με πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα από το μυελό των οστών δημιουργώντας ένα μωσαϊκό στο νεοσχηματισμένο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων. Αυτές οι ανωμαλίες είναι κυρίως καταφανείς σε ταχέως αυξανόμενους όγκους^{16,50,51}.

Επιπλέον, τα περικύτταρα που φυσιολογικά συμβάλλουν στον εγκλιματισμό των αγγείων στις αλλαγές του περιβάλλοντος και στην επαγωγή της “αδράνειας”, στα αγγεία του όγκου παρουσιάζουν δομικές ανωμαλίες και είναι ετερογενή, εκφράζουν δείκτες μη αναμενόμενους, έχουν ασυνήθιστη μορφολογία και μη φυσιολογική χαλαρή σχέση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα⁴³. Επομένως, τα αιμοφόρα αγγεία των νεοπλασιών δεν βρίσκονται ποτέ σε «αδράνεια» και η αγγειογενετική δραστηριότητα που λαμβάνει χώρα σε αρχόμενες *in situ* και σε διηθητικές νεοπλασματικές εξεργασίες είναι αισθητά μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή που λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες^{16,50,51}.

Τα αιμοφόρα αγγεία των όγκων εμφανίζουν μια χαοτική αρχιτεκτονική και διαταραχές στη ροή του αίματος. Δεν είναι οργανωμένα σε τριχοειδή αγγεία, φλεβίδια και μικρές αρτηρίες, εμφανίζουν ανώμαλο, ελικοειδές σχήμα, πολλές διακλαδώσεις και είναι διογκωμένα. Λόγω των διαταραχών αυτών, η ροή αίματος είναι αργή και δυσχερής^{16,50,51}.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων δεν παρουσιάζουν ομοιόμορφη έκφραση επιφανειακών δεικτών. Αυτά εκφράζουν πρωτεΐνες επιφανείας που απουσιάζουν ή σπανίζουν στα ώριμα αγγεία κι έτσι αποτελούν δυνατούς στόχους για εκλεκτική κατανομή των φαρμάκων στους όγκους. Μελέτες του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης έχει ταυτοποιήσει πρωτεΐνες που εκφράζονται εκλεκτικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των όγκων, όπως οι ιντεγκρίνες $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_5\beta_1$ ⁴³.

Επιπλέον, τα λεμφαγγεία απουσιάζουν από τις κεντρικές περιοχές του όγκου, πιθανώς λόγω μηχανικού stress, ενώ μεγεθύνονται στην περιφέρεια του όγκου λόγω περίσσειας VEGF-C²⁵.

2.11 Μέθοδοι εκτίμησης της αγγειογενετικής δραστηριότητας των νεοπλασιών

Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την αγγειογένεση, γίνεται φανερό ότι δεν είναι εύκολο να καθοριστεί μία και μόνο παράμετρος για την εκτίμηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας ενός όγκου. Σκοπός της προσπάθειας ανεύρεσης ενός ή περισσότερων δεικτών της αγγειογένεσης των όγκων είναι:

α) η ταυτοποίηση ενός αγγειογενετικού δείκτη που θα βοηθήσει στην ευχερέστερη ταξινόμηση των όγκων,

β) η ανεύρεση ενός ασφαλούς προγνωστικού δείκτη της νόσου, δεδομένου ότι η αγγειογενετική δραστηριότητα εμφανίζει ετερογένεια ακόμα και μέσα στον ίδιο τον όγκο,

γ) η αναγνώριση ασθενών που πιθανά να ωφεληθούν από μία αντι-αγγειογενετική θεραπεία, καθώς και

δ) η ανεύρεση δεικτών οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο παρακολούθησης της ανταπόκρισης του όγκου στη θεραπευτική αγωγή.

Οι κυριότερες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την αξιολόγηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας ενός όγκου είναι η μέτρηση των μικρών αγγείων του όγκου (microvessel count, MCV) και η μέτρηση της αγγειακής πυκνότητας του όγκου (microvessel density, MVD) με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων και πανενδοθηλιακών δεικτών ή αντισωμάτων που ανιχνεύουν πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η βασική μέθοδος εκτίμησης της αγγείωσης προτάθηκε από τον Weidner και τους συνεργάτες του. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει:

α) ανοσοχρώση για πανενδοθηλιακούς δείκτες, όπως παράγοντας VIII, CD31, CD34, CD36, EN-4 και PAL-E,

β) έλεγχο με μικρή μεγέθυνση (40X) όλης της ιστολογικής τομής του όγκου και ανεύρεση της περιοχής με την πυκνότερη αγγείωση ('hot spot'),

γ) μέτρηση σε μεγάλη μεγέθυνση (200X) των αγγείων. Κάθε χρωσμένο ενδοθηλιακό κύτταρο ή διακριτές αθροίσεις ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς την παρουσία αγγειακού αυλού εκτιμώνται ως ξεχωριστά αγγεία.

Μειονεκτήματα της χρήσης πανενδοθηλιακών δεικτών είναι:

1. η αδυναμία διαχωρισμού των αιμοφόρων αγγείων από τα λεμφαγγεία,
2. η μη ειδική χρώση των δεικτών σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς (π.χ. πλασματοκύτταρα) και

3. η αδυναμία διάκρισης των νεόπλαστων αγγείων από τα προϋπάρχοντα.

Νέοι δείκτες πιο ειδικοί από τους προαναφερθέντες είναι οι: CD105 (ενδογλίνη), LM609 (αντι-ιντεγκρίνης ανβ3) και EP, που θεωρείται ότι δίνουν την δυνατότητα να διακρίνουν το ‘ενεργοποιημένο’ πολλαπλασιαζόμενο από το ‘ήρεμο’ (quiescent) ενδοθήλιο.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν σφάλματα λόγω υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση του ανοσοϊστοχημικού αποτελέσματος αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι: α) του Chalkley με την οποία υπολογίζονται τα αγγεία που διέρχονται από ένα πλέγμα 25 σημείων το οποίο προσανατολίζεται έτσι, ώστε ο μεγαλύτερος δυνατόν αριθμός αγγείων να διέρχεται από το πλέγμα και β) το πολυπαραγοντικό σύστημα επεξεργασίας εικόνας με ηλεκτρονικό υπολογιστή που αξιολογεί την περιοχή αγγείωσης, τον αριθμό των μικρών αγγείων, των περικυττάρων και την ένταση της χρώσης.

Άλλες μη επεμβατικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση της αγγειογενετικής δραστηριότητας στην περιφέρεια των όγκων είναι ο υπέρηχος Doppler, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET) και η απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, MRI)⁵².

Η ποσοτική εκτίμηση της αγγειακής πυκνότητας είναι πλέον εφικτή μέσω ανοσοϊστοχημικών μεθόδων. Αυτή αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη πρόγνωσης τουλάχιστον σε ορισμένα νεοπλάσματα, καθώς η αυξημένη αγγειοβρίθεια συσχετίζεται με περισσότερο επιθετικούς και με υψηλότερο μεταστατικό δυναμικό όγκους. Με την ίδια μέθοδο ποσοτικής εκτίμησης της αγγειακής πυκνότητας είναι δυνατόν να αναγνωρισθούν ασθενείς, οι οποίοι χρήζουν περισσότερο επιθετικής θεραπείας ή θεραπείας με παράγοντες που αναστέλλουν την αγγειογένεση, καθώς οι αγγειοβριθείς όγκοι φαίνεται ότι ανταποκρίνονται καλύτερα στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία⁵³⁻⁵⁵. Είναι όμως γνωστό ότι οι κακοήθεις όγκοι παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ακόμη και στον ίδιο όγκο και επομένως η MVD δεν μπορεί να αποτελέσει έναν ενιαίο δείκτη για την επιλογή της θεραπείας και τον καθορισμό της πρόγνωσης όλων των όγκων.

Οι παραπάνω μέθοδοι, εκτός από τις αδυναμίες που οφείλονται σε τεχνικές δυσκολίες κατά την εφαρμογή τους, παρουσιάζουν το μειονέκτημα ότι δεν δίνουν πληροφορίες της πραγματικής λειτουργίας των αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών γονιδίων που ρυθμίζουν την αγγειογενετική δραστηριότητα του

όγκου. Ο αριθμός των μικρών αγγείων του όγκου περιγράφει το φαινόμενο της αγγειογένεσης εκ του αποτελέσματος, ενώ το βιοχημικό μονοπάτι είναι στην ουσία άγνωστο. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια γίνεται μια μεγάλη στροφή της έρευνας στην αξιολόγηση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων στους διάφορους τύπους νεοπλασιών, με σκοπό να ελεγχθεί και να προσδιοριστεί η πιθανή τους χρήση ως μοριακοί δείκτες της αγγειογενετικής δραστηριότητας. Μια πιο ολοκληρωμένη άποψη όσον αφορά τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων που ενεργοποιούν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση θα μπορούσε να βοηθήσει στην εκλεκτική αναστολή της αγγειογένεσης των όγκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΑΓΩΓΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

3.1 Εισαγωγή

Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο των ιστών αποτελεί μια πολυσταδιακή, πολυπαραγοντική και πολύπλοκη διαδικασία. Η αγγειογενετική δραστηριότητα σε έναν ιστό, σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, καθορίζεται από το αθροιστικό αποτέλεσμα αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων. Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την αύξηση των επαγωγέων της αγγειογένεσης ή την καταστολή των αναστολέων της ή και των δύο ταυτόχρονα δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός.

Η αγγειογενετική ανταπόκριση στους διάφορους παράγοντες ενός νεοπλασματικού ιστού φαίνεται ότι εξαρτάται: 1) από το γενετικό υλικό του ξενιστή που ελέγχει την αγγειογενετική δραστηριότητα του νεοπλάσματος μέσω ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *ras*, *p53*, *VHL*)^{18,56}, 2) το μικροπεριβάλλον του στρώματος και 3) τον ιστολογικό τύπο του νεοπλάσματος¹⁶.

3.2 Επαγωγείς της αγγειογένεσης.

Η νεο-αγγειογένεση επάγεται από την έκκριση ειδικών αυξητικών παραγόντων που παράγονται από τα νεοπλασματικά, τα ενδοθηλιακά και ορισμένα στρωματικά κύτταρα, όπως μακροφάγα, μαστοκύτταρα και ινοβλάστες. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες δρουν σε ορισμένα είδη κυττάρων, ενώ άλλοι δεν παρουσιάζουν κυτταρική εξειδίκευση. Μέχρι σήμερα έχει αναγνωρισθεί πλήθος αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικοί είναι οι: VEGF, PDGF, όξινος και βασικός TGF (acidic and basic Transforming Growth Factor), όξινος και βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (acidic and basic Fibroblast Growth Factor, α, β -FGF), TNF- α , ιντερλευκίνες 8 και 6 (IL-8, IL-6), λεπτίνη (Leptin) και άλλοι²⁰.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παράγοντας PDGF, ο οποίος εμφανίζει σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία του με τον VEGF, αν και τα πρότυπα έκφρασης και οι λειτουργικές ιδιότητες τους είναι εμφανώς διακριτές. Η οικογένεια του PDGF περιλαμβάνει πέντε διαφορετικές ισομορφές (PDGF-A, B, C, D και το ετεροδιμερές AB), οι οποίες συνδέονται με διακριτή εκλεκτικότητα στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης PDGFR- α και - β που απαντώνται σε ενδοθηλιακά και λεία

μυϊκά κύτταρα. Ο παράγοντας PDGF-B μέσω του υποδοχέα PDGFR-b παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση των νεοσχηματισθέντων αγγείων επάγοντας την επικάλυψή τους με περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό ενός πιο ώριμου αγγειακού δικτύου. Ο PDGF-C επάγει την αγγειακή ανάπτυξη των εμβρύων και των πληγών και ο PDGF-D διεγείρει την νεοαγγείωση νεοπλασμάτων^{10, 26, 30}.

Ένα άλλο σύστημα σηματοδότησης της αγγειογένεσης είναι ο υποδοχέας Tie-2, στον οποίο συνδέονται οι αγγειοποιητίνες 1 και 2 (Ang-1, 2). Η Ang-1 ενεργοποιεί τον υποδοχέα Tie-2, ενώ η Ang-2 μπορεί να ενεργοποιεί ή να μπλοκάρει τον υποδοχέα αυτό ανάλογα με το είδος των κυττάρων που εκφράζεται και τις συνθήκες που επικρατούν. Η Ang-1 επάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, κινητοποιεί τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (CEP) και τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSC), στρατολογεί περικύτταρα και συμβάλει στη σταθεροποίηση των αγγείων μέσω της δράσης των PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), VE-cadherin και occluding. Στον αντίποδα βρίσκεται η Ang-2 που μπορεί να εξουδετερώσει τη δράση της Ang-1. Η Ang-2 φαίνεται να διεγείρει την ανάπτυξη ανώριμων (φτωχών σε λεία μυϊκά κύτταρα) αγγείων εντός των νεοπλασμάτων, χαλαρώνοντας τις σχέσεις ενδοθηλιακών κυττάρων-περικυττάρων και διασπώντας την εξωκυττάρια ουσία μέσω διέγερσης των πρωτεϊνών. Η Ang-2 σε συνεργασία με τον VEGF διεγείρει την αγγειογένεση αλλά, όταν τα αγγειογενετικά σήματα ανεπαρκούν, η Ang-2 μπορεί να προκαλέσει το θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων και την υποστροφή των αγγείων^{10, 26, 30}.

Επίσης, σημαντικά μόρια σηματοδότησης της αγγειογένεσης είναι τα μέλη της υπερικογένειας TGF-β που δρουν μέσω των τριών τύπων υποδοχέων τους. Συνδέτες της οικογένειας TGF-β διεγείρουν τους τύπου II υποδοχείς που, με τη σειρά τους, φωσφορυλιώνουν τους τύπου I υποδοχείς (όπως την activin receptor-like kinase, ALK) ενεργοποιώντας τον καταρράκτη σηματοδότησης Smads. Η ενδογλίνη είναι ο τύπου III υποδοχέας, ο οποίος διευκολύνει τη σύνδεση του TGF-β1 στους τύπου II υποδοχείς. Ο παράγοντας TGF-b1 έχει τόσο προ- όσο και αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες. Σε χαμηλές δόσεις ο TGF-b1 συμβάλει στην έναρξη της αγγειογένεσης, διεγείροντας αγγειογενετικούς παράγοντες (π.χ VEGF) και πρωτεϊνάσες (uPA), ενώ σε υψηλές δόσεις καταστέλλει της αγγειογένεσης αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, προάγοντας την αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης και διεγείροντας τη στρατολόγηση

μεσεγχυματικών κυττάρων (μέσω διέγερσης του PDGF-B) και τη διαφοροποίησή τους σε λεία μυϊκά κύτταρα (μέσω διέγερσης των SM22a, SMC actin)^{11,30}.

Σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση φαίνεται να παίζουν και οι εφρίνες (eprhins) μέσω των υποδοχέων τους Eph. Η οικογένεια των υποδοχέων αυτών περιλαμβάνει μια μεγάλη ομάδα υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (συνολικά 14) που ρυθμίζουν μια εντυπωσιακή ποικιλία βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένης και της αγγειακής ανάπτυξης. Έχουν ταυτοποιηθεί 8 συνδέτες των εφρινών, παρ' όλα αυτά μόνο μια υποομάδα τους φαίνεται να έχει δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Έκφραση της εφρίνης B2 και του υποδοχέα της EphB2 έχει παρατηρηθεί σε μεσεγχυματικά κύτταρα, υποδηλώνοντας ένα πιθανό ρόλο της στην κινητοποίηση τοιχωματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης των αγγείων. Επίσης, η σηματοδότηση του υποδοχέα EphA2 από την εφρίνη A1 στα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα καταστέλλει σήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεσολαβούμενα από τον VEGF, μέσω του μονοπατιού Erk^{26,57}.

Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ειδικών μορίων της εξωκυττάριας ουσίας, που μεταφέρουν αμφίδρομα πληροφορίες στα αγγειακά κύτταρα, επάγοντας έτσι τον σχηματισμό νέων αγγείων σε συνεργασία με το περιβάλλον τους. Οι ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5 θεωρούνται θετικοί ρυθμιστές της έναρξης της αγγειογένεσης, καθώς οι φαρμακολογικοί ανταγωνιστές τους καταστέλλουν την παθολογική αγγειογένεση, όμως μελέτες με γενετικές διαγραφές δείχνουν ότι οι ιντεγκρίνες αναστέλλουν, αντί να διεγείρουν την αγγείωση του όγκου. Αυτή η ανασταλτική δράση μπορεί να συνεισφέρει στην ικανότητα των ιντεγκρινών ανβ3 και ανβ5 να καταστείλουν την VEGF/VEGFR2-διαμεσολαβούμενη επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, κυρίως αναστέλλοντας την δράση άλλων ιντεγκρινών ή μεσολαβώντας στην αντι-αγγειογενετική δράση της TSP και άλλων αναστολέων της αγγειογένεσης (π.χ. ενδοστατίνη, αγγειοστατίνη κ.α.)³⁰.

Οι κυτοκίνες αποτελούν μια ξεχωριστή οικογένεια αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι ιντερλευκίνες συμμετέχουν στη σύνθεση της βασικής μεμβράνης των νέο-σχηματισθέντων αγγείων. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των νευροφιλινών (neurophilins) από τις σεμαφορίνες (semaphorins) συμμετέχει στην αγγειακή μορφογένεση. Στον Πίνακα 3.1 περιλαμβάνονται οι πιο σημαντικοί αυξητικοί παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση.

Πίνακας 3.1. Οι σημαντικότεροι αυξητικοί παράγοντες της αγγειογένεσης και η λειτουργία τους.

Επαγωγείς αγγειογένεσης	Λειτουργία
VEGF και μέλη της οικογένειας	Επαγωγή πρόδρομου δικτύου αγγειογένεσης και διαπερατότητας αγγείων
Υποδοχείς VEGF, Νευροφιλίνη 1 (NRP-1)	Λήψη σημάτων αγγειογένεσης και επιβίωσης κυττάρων
Αγγειοποιητίνη 1 και ο υποδοχέας της Tie2	Σταθεροποίηση αγγείων και αναστολή διαπερατότητας
PDGF-BB και οι υποδοχείς του	Προσέλκυση λείων μυϊκών κυττάρων
TGF-β1, ενδογλίνη, υποδοχείς TGF-β	Επαγωγή δημιουργίας εξωκυττάριου υλικού
FGF, Hepatocyte Growth factor, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)	Επαγωγή αγγειογένεσης και αρτηριογένεσης
Ιντεγκρίνες	Επαγωγή αλληλεπίδρασης ενδοθηλιακών κυττάρων με το εξωκυττάριο περιβάλλον
VE-Cadherin, PECAM (CD31)	Επαγωγή συγκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων
Εφρίνες και οι υποδοχείς τους Eph	Ρύθμιση φλεβικής και αρτηριακής εξειδίκευσης Εφρίνη A1: αγγειογένεση της φλεγμονής Εφρίνη B1: συνάθροιση και συγκόλληση ενδοθηλιακών κυττάρων
Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, Μεταλοπρωτεϊνάσες (MMPs)	Απελευθέρωση και ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων, αποικοδόμηση βασικής μεμβράνης, αναδιαμόρφωση εξωκυττάριας ουσίας
Αναστολείς πρωτεϊνασών-1 (PAI-1)	Σταθεροποίηση αγγείων
Nitric oxide synthase (NOS), COX-2	Επαγωγή αγγειογένεσης και αγγειοδιαστολής
AC 133	Ρύθμιση διαφοροποίησης αγγειοβλαστών
Χημοκίνες	Πλειοτρόπο δράση
Αναστολείς διαφοροποίησης (Inhibitors of differentiation) Id1/Id3	Ρύθμιση πλαστικότητας ενδοθηλιακών κυττάρων

3.3 Αναστολείς της αγγειογένεσης.

Στους φυσιολογικούς ιστούς δεν παρατηρείται αγγειογένεση λόγω της εξισορρόπησης των επαγωγέων και των αναστολέων. Οι αναστολείς είναι μόρια που εμπλέκονται σε ένα, ή και περισσότερα στάδια της αγγειογένεσης και ασκούν τη βιολογική τους δράση στον αναπτυσσόμενο πληθυσμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ή σε μια ποικιλία άλλων κυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων^{39,57}. Με βάση το μηχανισμό δράσης τους οι αγγειοκατασταλτικοί παράγοντες ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς κινητικότητας, μετανάστευσης και συνένωσης κυττάρων.

Παράδειγμα αναστολέων της κινητικότητας, μετανάστευσης και συνένωσης κυττάρων αποτελούν οι θρομβοσπονδίνες 1 και 2 (TSP-1, 2), η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη.

Η TSP-1 αποτελεί αναστολέα της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς επίσης και της μετακίνησης και εγκατάστασης, δια της αιματικής ροής, κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο υποδοχέας της CD36 επάγει την ανασταλτική της δράση στις ιντεγκρίνες της εξωκυττάριας ουσίας⁵⁸.

Η αγγειοστατίνη αποτελεί τμήμα του πλασμινογόνου και είναι προϊόν πρωτεόλυσης. Αναφέρεται ότι η έκφραση της σε νεοπλασματικά κύτταρα αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση, μέσω αναστολής του VEGFR-2⁵⁹.

Η ενδοστατίνη είναι επίσης προϊόν πρωτεόλυσης του κολλαγόνου XVIII. Σχετίζεται με την αναστολή της μεταλλοπρωτεϊνάσης-2⁶⁰, ενώ ταυτόχρονα επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων⁶¹.

2. Αναστολείς πρωτεολυτικών ενζύμων που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη

Παράδειγμα αναστολέων πρωτεολυτικών ενζύμων που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη αποτελούν οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών, όπως η αντιθρομβίνη κ.α.¹⁰.

3. Ανταγωνιστές αγγειογενετικών παραγόντων

Παραδείγματα ανταγωνιστών αγγειογενετικών παραγόντων αποτελούν μόρια με άμεση αντι-αγγειογενετική δράση όπως οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων VEGF (κυρίως ο VEGFR-1) και FGF (FGFRs).

4. Αναστολείς ενδοκυττάριας επικοινωνίας ενδοθηλιακών κυττάρων

Παράδειγμα αναστολέων ενδοκυττάριας επικοινωνίας ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί η αγγειοποιητίνη 2, η οποία παρεμποδίζει τη σύνδεση της αγγειοποιητίνης 1 με τον υποδοχέα της Tie2, με συνέπεια την αναστολή δημιουργίας αγγείων από την Ang1. Παρόμοια δράση έχουν και οι αναστολείς των ιντεγκρινών.

5. Κυτοκίνες με αντιαγγειογενετική δράση

Στην κατηγορία των κυτοκινών με αντι-αγγειογενετική δράση περιλαμβάνονται μόρια όπως η ιντερφερόνη- α , - β και - γ (IFN- α , - β , - γ) και οι ιντερλευκίνες- 4, -8 και -12 (IL-4, IL-8, IL-12). Οι IFN αποτελούν μια τριμελή ομάδα με μέλη τις μορφές α , β και γ . Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες με πολλαπλές λειτουργίες. Η IFN- α αναστέλλει την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι IFN- α/β αναστέλλουν την έκκριση του bFGF και επάγουν την απόπτωση^{62,63} και η IFN γ φαίνεται να ελαττώνει τη μεταγραφή των γονιδίων VEGF και bFGF⁶⁴. Η IL-4 επάγει την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή εναντίον των κυττάρων του όγκου και αναστέλλει την νεοπλασματική αγγειογένεση *in vivo*, κυρίως αναστέλλοντας την έκκριση του bFGF⁶⁵.

Επιπρόσθετοι αναστολείς είναι οι υποδοχείς χημοκινών CXCR3 (PF-4, MIG, IP-10 κ.α.). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 30 αναστολείς της αγγειογένεσης. Στον Πίνακα 3.2 αναφέρονται οι κυριότεροι αγγειοκατασταλτικοί παράγοντες και ο τρόπος λειτουργίας τους.

Πίνακας 3.2. Οι σημαντικότεροι αναστολείς της αγγειογένεσης και η λειτουργία τους.

Αναστολείς αγγειογένεσης	Λειτουργία
Υποδοχείς VEGF, νευροφιλίνη 1 (NRP-1)	Δέσμευση VEGF και PlGF
Αγγειοποιητίνη-2 (Ang 2)	Ανταγωνιστής Ang 1
Αγγειοστατίνη, plasminogen kringle	Καταστολή αγγειογένεσης
Ενδοστατίνη	Αναστολή μετανάστευσης και επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων
Βαζοστατίνη, calreticulin	Αναστολή ενδοθηλιακής ανάπτυξης
Παράγοντας αιμοπεταλίων-4, προλακτίνη (M 16K)	Αναστολή δέσμευσης VEGF και bFGF
Αναστολείς MMPs, ιστικοί αναστολείς MMPs (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)	Καταστολή παθολογικής αγγειογένεσης
Meth-1, Meth-2	Περιέχουν τμήματα MMPs, TIMPs και θρομβοσπονδίνης
IFN- α , - β και - γ , Inducible protein-10, IL-12 και 18	Αναστολή ενδοθηλιακής μετανάστευσης, καταστολή bFGF
Τμήμα οστεοποντίνης	Παρεμπόδιση μετάδοσης σήματος ιντεγκρινών
VEGI (μέλος της TNF οικογένειας)	Ρύθμιση κυτταρικής ανάπτυξης
Maspin	Αναστολή πρωτεασών
Προθρομβίνη-2, τμήμα αντιθρομβίνης III	Αναστολή ενδοθηλιακής ανάπτυξης
Canstatin, proliferin related protein, restin	Άγνωστος μηχανισμός δράσης

Όταν ένας αναστολέας της αγγειογένεσης προκαλέσει απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ένα αγγείο, τα νεοπλασματικά κύτταρα που υποστηρίζονται από αυτό το αγγείο (σε απόσταση περίπου 150 μm) θα υποστούν απόπτωση. Όμως οι αναστολείς της αγγειογένεσης προκαλούν απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων όχι μόνο διακόπτοντας την παροχή οξυγόνου και

θρεπτικών συστατικών, αλλά και μειώνοντας τα επίπεδα παρακρινών παραγόντων που προέρχονται από ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγουν την κυτταρική επιβίωση⁶⁶.

3.4 Μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την αγγειογένεση

Υπάρχουν ογκογονίδια όπως το *proto-c met* και τα *K-* και *H-ras* που καταστέλλουν την έκφραση φυσικών αναστολέων της αγγειογένεσης, όπως για παράδειγμα της θρομβοσπονδίνης-1 (TSP-1) και της Ang-1, ενώ επάγουν αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως VEGF, PlGF και FGF. Επίσης ογκογονίδια, όπως *ras*, *myc*, *raf*, και *fos* επάγουν την έκφραση του VEGF με επακόλουθο την επαγωγή σχηματισμού νέων αγγείων. Αντίθετα ορισμένα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, όπως το *p53* καταστέλλουν την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης της TSP-1^{20,67-70}. Τέλος, κοινά μοριακά μονοπάτια φαίνεται να ακολουθούν η αγγειογένεση και η απόπτωση, καθώς γονίδια όπως το *B-Raf* εμπλέκονται και στα δύο κυτταρικά φαινόμενα, ενώ ορισμένοι αναστολείς της αγγειογένεσης, όπως η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη και η ιντερλευκίνη-12, επάγουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η κινάση Raf ενεργοποιείται από 1) τον bFGF μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από την P21-activated kinase (PAK1) και 2) τον VEGF μέσω ενός μονοπατιού που εξαρτάται από την πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC) και τη φωσφορυλίωση της Src κινάσης, αλλά όχι του PAK1. Η πρωτεΐνη Raf, αφού ενεργοποιηθεί, μετακινείται στα μιτοχόνδρια, όπου φωσφορυλιώνει την Bad και επάγει την κυτταρική επιβίωση. Η απομάκρυνση της Bad από τα μιτοχόνδρια αναστέλει τον προκαλούμενο από το στρες αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η πρωτεΐνη bFGF προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το στρες λόγω ανεπαρκούς τροφοδότησης θρεπτικών συστατικών και υποξίας. Η πρωτεΐνη VEGF προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση που μεσολαβείται από τον συνδέτη Fas ή τους διαμεσολαβητές της φλεγμονής⁴³.

Η αγγειογένεση που επάγεται από την IL-8 και τον TNF-α μοιάζει με αυτή που επάγεται από την πρωτεΐνη bFGF, όσον αφορά την εξάρτησή τους από την $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη και οι παράγοντες TGF- β και phorbol ester έχουν παρόμοια δράση στην αγγειογένεση που επάγεται από την πρωτεΐνη VEGF λόγω της εξάρτησής τους από την ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_5$.

Όλα τα ανωτέρω μόρια των ενδοκυττάρων μονοπατιών της κινάσης map ξεκινούν με την ενεργοποίηση της κινάσης Raf. Η κινάση Raf έχει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση, ανεξάρτητα από τα ερεθίσματα ενεργοποίησής της⁴³.

Πίνακας 3.3. Ογκογονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αγγειογένεσης^{71,72}.

Ογκογονίδιο	Αγγειογενετική δράση
K-ras, H-ras	Επαγωγή VEGF, PlGF και FGF, αναστολή TSP-1 και Ang-1
v-src	Επαγωγή VEGF, αναστολή TSP-1
c-myb	Αναστολή TSP-2
N-myc	Καταστολή αγγειογενετικών αναστολέων (activin A), επαγωγή IL-6
c-myc	Αγγειογενετικές ιδιότητες στην επιδερμίδα
HER-2	Επαγωγή VEGF
EGFR	Επαγωγή VEGF, bFGF και IL-8
bcl-2	Επαγωγή VEGF σε υποξία
PyMT	Αναστολή TSP-1
c-fos	Έκφραση VEGF
tkb	Αναστολή αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF)
HPV-16	Έκκριση VEGF και IF-a
MDM-2	Επαγωγή VEGF
v-P3K	Παραγωγή VEGF και αγγειογένεση
ODC	Αγγειογενετικός παράγοντας
PTTG1	Επαγωγή VEGF και bFGF
E2a-Pbx1	Επαγωγή mouse angiogenin-3 και VEGF
v-Abl	Επαγωγή VEGF
Bcr-abl	Επαγωγή VEGF
v-sis	Επαγωγή VEGF
PML-RAR α	Επαγωγή VEGF
RhoC	Επαγωγή VEGF και κυτοκινών
HHV8	Επαγωγή VEGF
eIF-4E	Επαγωγή VEGF (μετάφραση)
NOX-1	Επαγωγή VEGF

3.5. Αντι-αγγειογενετικές θεραπείες

3.5.1 Εισαγωγή

Οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες προκάλεσαν έντονο ενδιαφέρον για τρεις κυρίως λόγους:

α) Οι περισσότεροι όγκοι φαίνεται να εξαρτώνται από την αγγειογένεση, επομένως υπάρχει ένας κοινός στόχος θεραπείας μιας ευρέως ετερογενούς νόσου.

β) Δεν θεωρείται πιθανό τα ενδοθηλιακά κύτταρα να αναπτύξουν προσαρμοστικές ικανότητες παράκαμψης των επιδράσεων των φαρμάκων (π.χ. ανθεκτικότητα στο φάρμακο).

γ) Τα αγγεία ενός νεοπλασματος, καθώς πολλαπλασιάζονται, αποτελούν ένα διαφορετικό στόχο από αυτό των ήδη υπάρχοντων αγγείων των φυσιολογικών ιστών²⁶.

3.5.2. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες παρεμβαίνουν στη διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων και στην καταστροφή του ανώριμου νεοσχηματισθέντος αγγειακού δικτύου⁷³.

3.5.2.1 Παρέμβαση της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας στη διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων

Η αγγειογένεση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη διάσπαση της αγγειακής βασικής μεμβράνης και το σχηματισμό αγγειακών σωλήνων και δικτύων, τα οποία τελικά συνδέονται με τα προϋπάρχοντα αγγειακά δίκτυα. Όλα τα προαναφερθέντα γίνονται κάτω από τον έλεγχο παραγόντων που επάγουν ή αναστέλλουν την αγγειογένεση⁷³.

A. Καταστολή προαγγειογενετικών σημάτων.

Η καταστολή των προαγγειογενετικών σημάτων πραγματοποιείται είτε μέσω μείωσης των ποσοτήτων αγγειογενετικών μεσολαβητών ικανών να επάγουν την αγγειογένεση του όγκου είτε παρεμβαίνοντας στη διαδικασία της σηματοδότησης των αγγειογενετικών μεσολαβητών στο ενδοθηλιακό κύτταρο διακόπτοντας τον καταρράκτη της αγγειογένεσης. Υπάρχουν διάφορα μόρια διαφορετικών σταδίων της αγγειογένεσης που μπορούν να δράσουν ως στόχοι⁷³.

1. Στόχευση αγγειογενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στη μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι αυξητικοί παράγοντες που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

α. Παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια του VEGF και των αγγειοποιητινών, οι οποίοι δρουν ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αναστολή μπορεί να γίνει είτε στο στάδιο της σύνδεσης των προαγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, bFGF και PDGF) στους υποδοχείς τους είτε στα διαδοχικά βήματα σηματοδότησης, όπως στη φωσφορυλίωση των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι ανταγωνιστές του VEGF, όπως το αντίσωμα anti-VEGF HuMV και οι χαμηλού μοριακού βάρους αναστολείς του VEGFR-2 (KDR) υποδοχέα, PTK787/ZK22254 και SU 5416. Οι SU 6668 και ZD6474, είναι αναστολείς των VEGF, FGF και PDGF υποδοχέων τυροσινικής κινάσης.

β. Μόρια που δρουν περισσότερο άμεσα, όπως κυτταροκίνες, χημοκίνες και αγγειογενετικά ένζυμα που ενεργοποιούν μια σειρά κυττάρων στόχων εκτός των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ένα πρότυπο μέλος αυτής της ομάδας, είναι ο FGF-2.

γ. Μόρια που δρουν έμμεσα και η δράση τους στην αγγειογένεση είναι αποτέλεσμα απελευθέρωσης παραγόντων από μακροφάγα, ενδοθηλιακά και νεοπλασματικά κύτταρα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι TNF-α και TGF-β⁷³.

2. Στόχευση των πρωτεολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στη διάσπαση της βασικής μεμβράνης. Για να ξεκινήσει ο σχηματισμός νέων αγγείων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των υπαρχόντων αγγείων πρέπει να διασπάσουν την υποκείμενη βασική μεμβράνη για να διεισδύσουν στο στρώμα του γειτονικού ιστού. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών (MMPs) και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PA)

3. Στόχευση μορίων προσκόλλησης τα οποία εμπλέκονται στις επαφές μεταξύ κυττάρων και κυττάρων-εξωκυττάριας ουσίας. Τα μόρια προσκόλλησης μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις οικογένειες, ανάλογα τα βιοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά τους. Οι οικογένειες αυτές περιλαμβάνουν 1) τις σελεκτίνες, 2) την οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, 3) τις καντχερίνες και 4) τις ιντεγκρίνες. Μέλη κάθε μιας από αυτές τις οικογένειες εμπλέκονται στην νεοαγγειογένεση. Για παράδειγμα, γνωστοί αναστολείς των ιντεγκρινών είναι το Vitaxin(γ) (LM609) που αποτελεί ένα μονοκλωνικό anti-ανβ3 αντίσωμα, το Sch221153 που ανταγωνίζεται τις ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5 και ο EMD121974 που είναι ένας ανβ3 αναστολέας⁷³.

B. Αύξηση της δράσης αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Καθώς η αγγειογένεση είναι το αποτέλεσμα μιας δυναμικής ισορροπίας προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων στο εξωκυττάριο μικροπεριβάλλον του όγκου, η αύξηση των τοπικών συγκεντρώσεων ενδογενών αναστολέων της αγγειογένεσης αποτελεί μια άλλη θεραπευτική στρατηγική⁷³.

1. *Στόχευση ενδογενών αναστολέων της αγγειογένεσης.* Υπάρχουν διάφοροι αναστολείς ενδογενών πρωτεϊνών της αγγειογένεσης. Συνήθως πρόκειται για πρωτεολυτικά θραύσματα πρόδρομων πρωτεϊνών που παράγονται ενδογενώς *in vivo*, όπως θρομβοσπονδίνη, ιντερφερόνη α/β, το 16 kd κομμάτι της προλακτίνης, αγγειοστατίνη, ενδοστατίνη, VEGI, βαζοστατίνη, Meth-1, Meth-2, προϊόντα διάσπασης του παράγοντα αιμοπεταλίων-4 και της αντιθρομβίνης III. Η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη είναι δύο εκκρινόμενες πρωτεΐνες που αναστέλλουν τη σύνθεση του ATP και παίζουν ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα να διατηρούνται σε ήρεμη κατάσταση τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα^{73,74}.
2. *Στόχευση ογκογονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση του όγκου.* Έχει παρατηρηθεί ότι η απώλεια της λειτουργίας του p53 οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης. Πολλά ογκογονίδια, όπως το μεταλλαγμένο *ras*, *VHL* και *p16*, μπορεί να συνεισφέρουν στην αγγειογένεση του όγκου επηρεάζοντας την παραγωγή προαγγειογενετικών μορίων, όπως του VEGF. Έτσι, θεραπείες με φάρμακα, όπως *Ras farnesyltransferase inhibitors* (*Ras FTIs*) που αναστέλλει τη λειτουργία της ογκοπρωτεΐνης πιθανώς συνεισφέρει στην αναστολή της αγγειογένεσης⁷³.

3.5.2.2 Καταστροφή “ανώριμης” νεο-αγγείωσης

Σε αντίθεση με την προηγούμενη προσέγγιση, όπου υπάρχει παρέμβαση στον καταρράκτη της αγγειογένεσης και μείωση του σχηματισμού νέων αγγείων, η αντιαγγειακή προσέγγιση είναι μια γρήγορη και εκτεταμένη παύση του ήδη εγκατεστημένου αγγειακού δικτύου του όγκου, η οποία οδηγεί τα νεοπλασματικά κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο. Αυτή η θεραπεία μπορεί να στοχεύει το ίδιο το αγγειακό δίκτυο ή μόνο τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια θεμελιώδης αρχή αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης είναι ότι η αγγείωση του όγκου είναι διαφορετική από αυτή των φυσιολογικών ιστών (μειωμένος αριθμός περιαγγειακών κυττάρων)⁷³.

Στόχος των θεραπευτικών παραγόντων αυτής της κατηγορίας είναι να προκληθεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και θρόμβωση των αγγείων. Παραδείγματα αυτού του είδους θεραπείας είναι αντισώματα που ειδικά στοχεύουν αντιγόνα που εκφράζονται στο ενδοθήλιο του όγκου ή υβριδικά μόρια ικανά να προκαλέσουν διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ανοσοδραστικών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων του όγκου. Πλεονέκτημα μιας τέτοιας θεραπείας μπορεί να είναι η ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης. Διακοπή της τροφοδοσίας αίματος του όγκου και πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης μπορεί να δρουν παράλληλα μειώνοντας το φορτίο του όγκου⁷³.

Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η ομάδα των συνδεόμενων στην τουμπολίνη (tubulin-binding) παραγόντων, που εκλεκτικά δρουν στην αγγείωση του όγκου επηρεάζοντας τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα, ο κυτταροσκελετός να καταστρέφεται, οδηγώντας έτσι σε θρόμβωση των μικρών αγγείων και κυτταρικό θάνατο. Δύο τέτοια μόρια τα οποία βρίσκονται σε κλινικές μελέτες είναι τα Combretastatin-A-4 prodrug (OxiGene) και ZD6126 (AstraZeneca)⁷⁵.

Οι ειδικοί αγγειακοί δείκτες των ιστών αποτελούν νέους υποσχόμενους στόχους με τους οποίους μπορεί να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη τοξικότητα προς άλλους ιστούς. Οι δείκτες αυτοί στηρίζονται στο γεγονός ότι η αγγείωση των φυσιολογικών ιστών παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση και κάθε όγκος μεθίστανται σε συγκεκριμένα όργανα, γεγονός που είναι πιθανό να οφείλεται στην προσκόλληση μεταξύ κυττάρων του όγκου και ειδικών των οργάνων μορίων των ενδοθηλιακών κυττάρων⁷³.

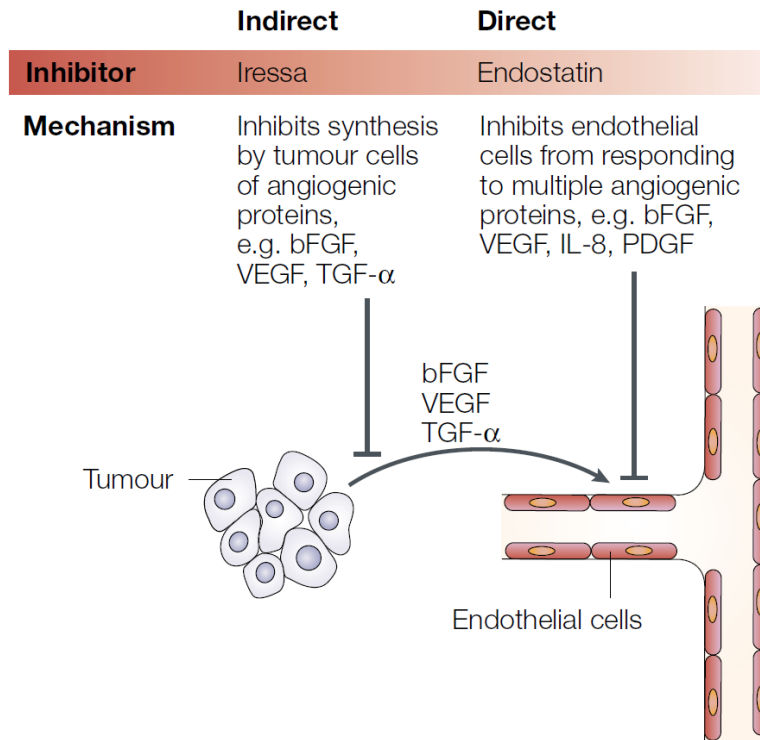
Υπό μελέτη βρίσκονται επίσης *εμβόλια ενδοθηλιακών κυττάρων*. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενιόμενα *in vivo* μπορεί να αποτελούν μια πηγή ανοσογόνων (immunogens) που μπορεί να προκαλέσουν απάντηση του ξενιστή στον όγκο⁷³. Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των αντι-αγγειογενετικών και αντι-αγγειακών φαρμάκων φαίνονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αντιαγγειογενετικών και αντιαγγειακών φαρμάκων⁷⁶.

Αντιαγγειογενετικά φάρμακα		Αντιαγγειακά φάρμακα	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Χαμηλή τοξικότητα	Απαιτείται χρόνια θεραπεία με μεγάλες ποσότητες φαρμάκου	Απαιτείται μικρής διάρκειας θεραπεία με μικρές ποσότητες φαρμάκου	Πιθανή τοξικότητα που εξαρτάται από τη δόση
Αποτελεσματική παρεμπόδιση της αύξησης μικρών όγκων και εμφάνισης μεταστάσεων	Οι μεγάλοι όγκοι δεν ανταποκρίνονται επαρκώς	Ανταποκρίνονται οι μεγάλοι όγκοι	Μόνο λίγοι δείκτες εκφράζονται εκλεκτικά και ομοιογενώς στα αγγεία του όγκου
Χρησιμοποιούνται σε πολλούς τύπους όγκου	Το μέγεθος του όγκου περιορίζεται ακόμα και μετά το τέλος της θεραπείας	Η δράση τους επεκτείνεται και σε αγγεία με αρνητικούς δείκτες που βρίσκονται πριν και μετά από τα θρομβωμένα αγγεία	Θρόμβωση

3.5.3 Αναστολείς της αγγειογένεσης-Κλινικές δοκιμές

Υπάρχουν δύο ομάδες αναστολέων της αγγειογένεσης, οι άμεσοι και οι έμμεσοι. (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Άμεσοι και έμμεσοι αναστολείς της αγγειογένεσης⁶⁶.

Οι **άμεσοι αναστολείς** της αγγειογένεσης εμποδίζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων να πολλαπλασιαστούν, να μεταναστεύσουν ή να αποφύγουν τον κυτταρικό θάνατο ως απάντηση σε διάφορες προ-αγγειογενετικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των VEGF, bFGF, IL-8, PDGF και PD-EGF (Πίνακας 3.5). Οι άμεσοι αναστολείς της αγγειογένεσης παρουσιάζουν μικρή πιθανότητα να προκαλέσουν επίκτητη φαρμακευτική ανθεκτικότητα, γιατί στοχεύουν τα γενετικά σταθερά ενδοθηλιακά κύτταρα κι όχι τα ασταθή εύκολα μεταλλασόμενα νεοπλασματικά κύτταρα. Ένας από τους πιο γνωστούς άμεσους αναστολείς της αγγειογένεσης είναι η ενδοστατίνη, η οποία στοχεύει ενδοθηλιακά κύτταρα που κινητοποιούνται στην περιοχή του όγκου και η οποία τα εμποδίζει να απαντήσουν σε μιτογόνα ερεθίσματα και ερεθίσματα που παρεμβαίνουν στην κινητοποίησή τους⁶⁶. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν επίσης συνθετικά μόρια όπως το TNP-470 και η θαλιδομιδίνη (Thalidomide). Επιπλέον, αναστολή των ιντεγκρινών $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$ επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αναστέλλει την αύξηση νέων αγγείων και καταστέλλει την αύξηση των όγκων⁴³.

Πίνακας 3.5. Άμεσοι αναστολείς αγγειογένεσης⁶⁶

Φάρμακα	Στόχος ενδοθηλιακού κυττάρου
Αγγειοστατίνη	Συνδέεται με τη σύνθεση του ATP, την αγγειομοτίνη και την ανεξίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα εμποδίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων
Bevacizumab (Avastin)	Anti-VEGF ανασυνδυασμένο ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα
Arresten	Πιστεύεται ότι συνδέεται στην ιντεγκρίνη – $\alpha_1\beta_1$ προκειμένου να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και το σχηματισμό σωληνίων και την νεοαγγείωση
Canstatin	Πιστεύεται ότι συνδέεται στην ιντεγκρίνη – $\alpha_v\beta_3$ προκειμένου να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και το σχηματισμό σωληνίων
Combretastatin	Προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης επηρεάζοντας τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων των ενδοθηλιακών κυττάρων
Ενδοστατίνη	Πιστεύεται ότι στοχεύει την ιντεγκρίνη – $\alpha_5\beta_1$ προκειμένου να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και να προκαλέσει απόπτωση των πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων
NM-3	Πρόκειται για ένα ισοκουμαρινικό μικρού μοριακού βάρους αναστολέα του VEGF. Φάνηκε ότι αναστέλλει εκλεκτικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη διακλάδωση και το σχηματισμό σωληνίων <i>in vitro</i>
Θρομβοσπονδίνη	Αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την νεοαγγείωση στον κερατοειδή χιτώνα, αλλά μπορεί να μην είναι ειδικό για τα ενδοθηλιακά κύτταρα
Tumstatin	Συνδέεται στην ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την νεοαγγείωση
2-μεθοξυοιστραδιόλη	Αναστέλλει τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων στα πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων
Vitaxin	Ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης $\alpha_v\beta_3$

Οι έμμεσοι αναστολείς της αγγειογένεσης 1) εμποδίζουν την έκφραση προαγγειογενετικών πρωτεϊνών, 2) εμποδίζουν την δράση πρωτεϊνών του νεοπλάσματος που επάγουν την αγγειογένεση και 3) εμποδίζουν την έκφραση υποδοχέων αγγειογενετικών πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Πίνακας 3.6)⁶⁶.

Πίνακας 3.6. Έμμεσοι αναστολείς της αγγειογένεσης⁶⁶.

Στόχος στο νεοπλασματικό κύτταρο	Προαγγειογενετικές πρωτεΐνες που αναστέλονται	Φάρμακο
EGF υποδοχέας τυροσινικής κινάσης	VEGF, bFGF, TGF- α	ZD1839 (Iressa), ZD6474, OSI774 (Tarceva), CI1033, PKI1666, IMC225 (Erbix)
VEGF υποδοχέας	VEGF υποδοχέας του ενδοθηλιακού κυττάρου	PTK787, ZD6474, SU6668, SU11248
PDGF υποδοχέας	PDGF υποδοχέας	PTK787, SU11248
ERBB-2 (HER-2/neu υποδοχέας τυροσινικής κινάσης)	VEGF, Ang-1, TGF- β , PAI1 (επάγει τη θρομβοσπονδίνη-1)	Herceptin
Υποδοχέας ιντερφερόνης (IFN)- α	Αναστέλλει την έκφραση του bFGF στα νεοπλασματικά κύτταρα	IFN-α

Η ιντερφερόνη α μπορεί να θεωρηθεί τόσο άμεσος αναστολέας, γιατί αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όσο και έμμεσος αναστολέας, γιατί αναστέλλει τη σύνθεση bFGF (mRNA και πρωτεΐνης) από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Στον Πίνακα 3.7 περιγράφονται ορισμένα επιπλέον μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές αντιαγγειογενετικών θεραπειών, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους⁷⁷⁻⁷⁹.

Πίνακας 3.7. Αντιαγγειογενετική θεραπεία-Παράγοντες και μηχανισμός δράσης.

Αντιαγγειογενετική θεραπεία	Μηχανισμός δράσης
<i>Αναστολείς ενδοθηλιακής διαμόρφωσης</i>	
PEX, Batimastat (BB-94), prinomastat (AG-3340), Marimastat (BB-2516), Metastat (COL-3, CMT-3), BMS-2752291, CGS 27023A, Bay 12-9566, Neovastat, TIMP-1, 2, 3, PAI-1, uPA	Αναστολή των MMPs και του uPA, παρεμπόδιση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετάστασης των νεοπλασματικών κυττάρων
<i>Αναστολείς μορίων συγκόλλησης</i>	
Παράγωγα βενζοδιαζεπίνης, Vitaxin (LM 609), EMD 121974	Αναστολή της ενδοθηλιακής συγκόλλησης και επαγωγή της απόπτωσης Τα LM 609 και EMD 121974 αναστέλλουν την ιντεγκρίνη ανβ3
<i>Αναστολείς “ενεργοποίησης” ενδοθηλιακών κυττάρων</i>	
Ενδοστατίνη, αγγειοστατίνη, IFN-α, γ, IL-12, TSP-1, θαλιδομίδη, linomide, TNP-470	Αναστολή της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και επαγωγή της απόπτωσης
<i>Αναστολείς διαμεσολαβητών και υποδοχέων τους</i>	
IFN-a, PF-4, προλακτίνη, suramin, bFGF Ab, αντινοσηματικό-bFGF, ασπιρίνη, RhuMAb Anti-VEGF (anti-VEGF), PTK787/ZK22584 (anti-VEGFR), SU 5416 (anti-VEGFR), SU101 (anti-PDGFR), SU6668 (anti-VEGFR-2, PDGFR and FGFRs)	Αναστολείς του VEGF, FGF2, PDGF και καταστολή της ενδοθηλιακής ανάπτυξης
<i>Αναστολείς ενδοκυττάρων σημάτων στα ενδοθηλιακά κύτταρα</i>	
Genistein, Ang-2, Lavendustin A	Αναστολείς των τυροσινικών κινασών, του Tie-2, της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων
<i>Μόρια που στοχεύουν το αγγειακό δίκτυο του όγκου</i>	
DT385	Στοχεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον VEGF

3.5.4 Τρόποι δράσης των αντι-αγγειογενετικών θεραπειών.

Τα αντι-αγγειογενετικά φάρμακα είναι σχετικά νέα αντινεοπλασματικά φάρμακα, των οποίων τα βιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά διαφέρουν από αυτά των παραδοσιακών κυτταροτοξικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Οι προ-αγγειογενετικές μέθοδοι, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, μπορεί να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: 1. γονιδιακή θεραπεία, 2. πρωτεϊνική θεραπεία και 3. θεραπείες βασισμένες στο κύτταρο.

Η **γονιδιακή θεραπεία** αποτελεί την πλέον ελκυστική θεραπεία του καρκίνου. Κατά τη γονιδιακή θεραπεία της αγγειογένεσης μεταφέρεται στο κύτταρο του ξενιστή ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια αγγειογενετική πρωτεΐνη. Τα πλεονεκτήματα αυτής της θεραπείας είναι 1) η εκλεκτική κατανομή και η συνεχόμενη έκφραση αγγειογενετικών μορίων, 2) η δυνατότητα αναστολής πολλαπλών αγγειογενετικών μονοπατιών (μεταφορά περισσότερων του ενός αντινοσηματικών γονιδίων (transgene), 3) η δημιουργία κατάλληλων ανασταλτικών μορίων και 4) το δυνητικά μειωμένο κόστος⁷³. Τα προβλήματα που έχουν προκύψει από τις μέχρι τώρα γονιδιακές θεραπείες, οφείλονται στην ετερογένεια των νεοπλασμάτων και στην γενετική αστάθεια των νεοπλασματικών κυττάρων-στόχων⁷⁷⁻⁷⁹. Τα προβλήματα αυτά όμως δεν υφίστανται στην περίπτωση της αγγειογενετικής γονιδιακής θεραπείας καθώς στόχο αποτελούν τα γενετικά σταθερά ενδοθηλιακά κύτταρα και επιτυγχάνεται καταστολή των όγκων ανεξάρτητα από την ετερογένεια των νεοπλασματικών κυττάρων. Πλεονέκτημα επίσης αποτελεί η βελτίωση των ικών φορέων, η οποία επιτρέπει την έκφραση των εισαγόμενων γονιδίων για μήνες ή χρόνια στον οργανισμό. Από τη μέχρι τώρα εφαρμογή της αγγειογενετικής γονιδιακής θεραπείας με την εισαγωγή cDNA που κωδικοποιεί την αγγειοστατίνη⁸⁰, το PF-4⁸¹, ή το αντινοσητικό (antisense) VEGF⁸² επιτεύχθηκε αναστολή της ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και αναστολή της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης των όγκων *in vivo*.

Υπάρχουν ακόμα σοβαρά, άλυτα προβλήματα στη γονιδιακή θεραπεία, όπως: 1) δυσκολία ενσωμάτωσης του θεραπευτικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου, 2) ανάπτυξη μη επιθυμητής ανοσοαπάντησης, 3) τοξικότητα, 4) ανοσογονικότητα, 5) φλεγμονώδη απάντηση και 6) ογκογένεση σχετιζόμενη με τους ικούς φορείς. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες επιπλοκές της γονιδιακής θεραπείας είναι η καρδιακή νόσος, η υψηλή αρτηριακή υπέρταση, ο διαβήτης και η νόσος Alzheimer, οι οποίες πιθανό να οφείλονται σε συνδυασμένες επιδράσεις σε διάφορα γονίδια.

Η **πρωτεϊνική θεραπεία** με προ-αγγειογενετικούς παράγοντες χρησιμοποιεί με ακρίβεια δομημένες πρωτεΐνες με γνωστές βιολογικές δράσεις, στις οποίες έχει προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση. Στη θεραπεία αυτή υπάρχει πρόβλημα με την οδό χορήγησης, η οποία μπορεί να επηρεάσει το επιθυμητό αποτέλεσμα, καθώς η θεραπευτική πρωτεΐνη μπορεί να μεταβολιστεί ή να αποβληθεί πριν φτάσει στον ιστό στόχο.

Στις **θεραπίες βασισμένες στο κύτταρο**, τα κύτταρα που εισάγονται στον οργανισμό έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν παράγοντες, όπως κυτοκίνες, χημοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση. Οι θεραπείες αυτές βρίσκονται ακόμα σε πρώιμα ερευνητικά στάδια.

3.5.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας.

3.5.5.1 Πλεονεκτήματα αντι-αγγειογενετικής θεραπείας

Η αντι-αγγειογενετική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής αντικαρκινικής θεραπείας διότι έχει ευρεία εφαρμογή, εφόσον στοχεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, ενώ τα νεοπλασματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και μεταναστεύουν ταχύτατα. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γενετικά σταθερά και αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό συγκρινόμενα με τον πληθυσμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτή η γενετική σταθερότητα δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στις αντι-αγγειογενετικές θεραπείες, σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία που στόχο έχει τα νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία γρήγορα μεταλλάσσονται και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εύκολα προσβάσιμα από τα φάρμακα. Ακόμα σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των νεοπλασμάτων υπερεκφράζουν συγκεκριμένα μόρια, τα οποία μπορεί να αποτελέσουν ιδανικούς θεραπευτικούς στόχους χωρίς να επηρεάζονται τα αγγεία των φυσιολογικών ιστών^{31,83}.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα αντι-αγγειογενετικά φάρμακα παρουσιάζουν συνεργιστική δράση με ορισμένα άλλα αντι-αγγειογενετικά και κυτταροτοξικά φάρμακα, καθώς και την ακτινοθεραπεία. Φαίνεται ότι η συνδυασμένη χρήση αγγειογενετικών αναστολέων ή αντι-αγγειογενετικών παραγόντων με ανοσοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία μπορεί να

αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματική. Ο λόγος είναι ότι ποικίλοι μηχανισμοί δράσης και διαφορετικοί κυτταρικοί θεραπευτικοί στόχοι μπορεί να έχουν επιπρόσθετες αντικαρκινικές δράσεις. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι κάθε στάδιο της αγγειογένεσης στηρίζεται σε διαφορετικούς παράγοντες. Παράδειγμα αποτελεί η αγγειογένεση στα καρκινώματα του μαστού, η οποία σε πρώιμα στάδια υποστηρίζεται κυρίως από τον VEGF, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια εμπλέκονται κι άλλοι παράγοντες, όπως FGF και TGF. Γι' αυτό ένας συνδυασμός αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, «αντι-αγγειογενετικά κοκτέιλ», επηρεάζει τη λειτουργία διαφορετικών μονοπατιών της αγγειογένεσης. Επιπλέον, στο συνδυασμό αναστολέων της αγγειογένεσης με ακτινοθεραπεία, οι αναστολείς της αγγειογένεσης μπορεί να λειτουργήσουν ως ευαισθητοποιητές της ακτινοβολίας (radiation-sensitizers) ή η ακτινοβολία να αυξήσει την παραγωγή διαφόρων αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως της ενδοστατίνης^{31,52,73,83}.

3.5.5.2 Μειονεκτήματα αντι-αγγειογενετικής θεραπείας

Η αντι-αγγειογενετική θεραπεία δεν στερείται μειονεκτημάτων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των όγκων φέρουν κι αυτά γενετικές ανωμαλίες, όπως τα νεοπλασματικά κύτταρα. Έτσι, τα αγγεία του όγκου έχουν θεωρητικά τη δυνατότητα να αναπτύξουν κι αυτά ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Επίσης, είναι πολύ πιθανό, εάν στοχεύεται θεραπευτικά ένα αγγειογενετικό μόριο, ο όγκος να χρησιμοποιήσει ένα εναλλακτικό μόριο που θα του επιτρέψει να συνεχίσει να αναπτύσσεται ή ακόμη ο όγκος να αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης μετά από μακροχρόνια θεραπεία³¹. Ένας μηχανισμός με τον οποίο τα νεοπλασματικά κύτταρα ανθίστανται στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία είναι η υποξία, αλλά ακόμα και αυτά που επιβιώνουν κάτω από υποξικές συνθήκες, δεν μπορούν να επιβιώσουν στην ανοξία που τελικά συνοδεύει την απώλεια της μικροαγγείωσης⁶⁶.

Οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται στα αποτελέσματα προ-κλινικών μελετών σε πειραματόζωα⁷⁷⁻⁷⁹. Οι κλινικές δοκιμές που σχεδιάστηκαν δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Η αποτυχία αυτή οφείλεται στο ότι οι θεραπείες πραγματοποιούνται σε υποδόριους όγκους οι οποίοι δε συναντώνται συχνά σε ασθενείς. Η θέση στην οποία ένας όγκος αναπτύσσεται παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας τόσο σε προκλινικές όσο και κλινικές μελέτες. Το μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να επηρεάσει την

αποτελεσματικότητα διαφόρων παραγόντων. Επιπλέον, τα μοριακά χαρακτηριστικά των μικρών αγγείων του όγκου φαίνεται να ποικίλουν περισσότερο από όσο αναμένεται. Επίσης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν διαφορετικό φαινότυπο σε διαφορετικά όργανα και γι' αυτό ένας συγκεκριμένος αντι-αγγειογενετικός παράγοντας που χρησιμοποιείται θεραπευτικά, μπορεί να είναι αποτελεσματικός σε ένα όργανο και όχι σε ένα άλλο. Αυτό μπορεί να οφείλεται, για παράδειγμα, στη συμμετοχή των νεοπλασματικών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα (“vascular mimicry”)²⁶.

Επιπλέον, το μέγεθος των όγκων στις προκλινικές μελέτες είναι σχετικά μικρό. Ο αντι-αγγειογενετικός παράγοντας διανέμεται στον όγκο σε διάμετρο μικρότερη των 5 χιλιοστών. Αντίθετα στις κλινικές μελέτες οι όγκοι έχουν συνήθως πολύ μεγαλύτερο μέγεθος. Η “ωριμότητα” των αγγείων που στοχεύεται θεραπευτικά σε προκλινικές μελέτες δεν συγκρίνεται με αυτή των όγκων των ασθενών, όπου τα αγγεία είναι περισσότερο “ώριμα” και διαφοροποιημένα. Στην τελευταία περίπτωση τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιβάλλονται από περικύτταρα, τα οποία τα προστατεύουν από την απόπτωση^{9,74,84-86}. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπ' όψιν ότι οι θεραπευτικές αυτές μελέτες έχουν ως στόχο τη συρρίκνωση και όχι την εκρίζωση του όγκου, και έστω και λίγα εναπομείναντα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να επαναδημιουργήσουν τον όγκο.

Εφόσον ο πρωταρχικός στόχος των αντι-αγγειογενετικών θεραπειών είναι να ελέγξουν τον όγκο, κι όχι να τον θεραπεύσουν, είναι πολύ πιθανό να απαιτείται δια βίου θεραπεία. Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία είναι η έλλειψη αντιπροσωπευτικών δεικτών της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας⁶⁶.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

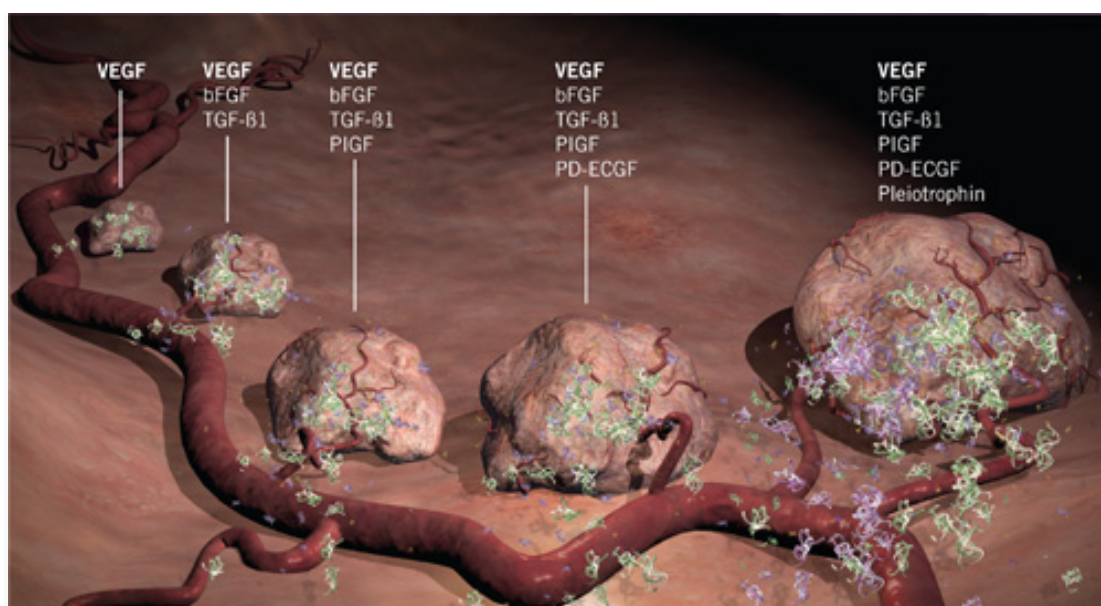
Ο ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF, ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ VEGFR-1 ΚΑΙ VEGFR-2 ΚΑΙ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ CD34 ΚΑΙ CD105

4.1 Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας αύξησης (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

4.1.1 Εισαγωγή

Το 1983 ο Senger και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν μια πρωτεΐνη που αυξάνει την διαπερατότητα του τοιχώματος των αγγείων, την οποία ονόμασαν παράγοντα αγγειακής διαπερατότητας (Vascular Permeability factor, VPF)⁸⁷. Το γονίδιο της πρωτεΐνης αυτής αποκωδικοποιήθηκε από τον Ferrara (1989), ο οποίος της έδωσε την ονομασία VEGF⁸⁸. Η έκφραση του γονιδίου VEGF συσχετίστηκε με την έκταση της αγγείωσης εμβρύων ποντικών¹¹, ενώ η απώλεια ενός αλληλίου του διαταράσσει την αγγειακή ανάπτυξή τους.⁸⁹ Από την μικρή αυτή ιστορική αναδρομή διαφαίνεται ότι ο VEGF παρουσιάζει ισχυρή αγγειογενετική δράση.

Ο VEGF είναι ο μόνος αγγειογενετικός παράγοντας που είναι παρόν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των κακόηθων νεοπλασιών και που υπερεκφράζεται παράλληλα με δευτερογενείς αγγειογενετικές πρωτεΐνες, όπως bFGF, TGFβ, PIGF και PD-ECGF (Εικόνα 4.1.).



Εικόνα 4.1: Σταθερή έκφραση του VEGF σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του όγκου (<http://www.avastin.net/vegf-and-moa/vegf-inhibition.html>)

Έκφραση του VEGF περιγράφεται σε καρκινώματα του γαστρεντερικού σωλήνα, των πνευμόνων, κεφαλής - τραχήλου, του γυναικείου και ανδρικού γενετικού συστήματος, του μαστού και του ουροποιητικού συστήματος⁹⁰⁻⁹⁶. Εκτός των καρκινωμάτων, ο VEGF εκφράζεται και σε όγκους του νευρικού συστήματος, μεσεγγυματογενή νεοπλάσματα, όπως το αιμαγγειοσάρκωμα, καθώς και σε νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος⁹⁷.

4.1.2 Οικογένεια των πρωτεϊνών VEGF (βιολογική δράση και λειτουργία)

Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες: VEGF-A, -B, -C, -D, -E και PlGFs-1,2,3 (Placental Growth Factors-1,2,3). Όλα τα μέλη της οικογένειας του VEGF εκκρίνονται ως διμερείς γλυκοπρωτεΐνες (34 - 45 kd), που τα μονομερή τους συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι θέσεις σύνδεσης του VEGF με τους υποδοχείς του σχηματίζονται από αμινοξέα και των δύο μονομερών που βρίσκονται στους πόλους αντιπαράλληλων διμερών. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων του VEGF επιτυγχάνεται μέσω του διμερισμού τους. Η σηματοδότηση ξεκινά όταν ο VEGF συνδέεται με δύο μονομερή ενός υποδοχέα του⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Το γονίδιο **VEGF-A** περιέχει 8 εξόνια και απαντάται σε έξι ισομορφές, τις VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 και VEGF206, οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (splicing) των εξονίων¹⁰¹. Η ισομορφή VEGF-A (42kDa) αποτελεί ισχυρό μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων των μικρών αγγείων, των φλεβών και των αρτηριών. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη διαπερατότητα των αγγείων μέσω επαγωγής πόρων και θυρίδων στο ενδοθήλιο, έλκει πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα από το μυελό των οστών και συμβάλει στη διαφοροποίησή τους. Παράλληλα, ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν πρωτεάσες που αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη των ήδη υπάρχοντων αγγείων. Ο ρόλος της επίσης επεκτείνεται στην επαγωγή της έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και στην αναστολή διαφοροποίησης δένδριτικών κυττάρων¹⁰².

Το γονίδιο **VEGF-B** περιέχει 7 εξόνια από τα οποία μετά από εναλλακτικό μάτισμα προκύπτουν οι ισομορφές VEGF-B167 και VEGF-B186. Ο VEGF-B συνδέεται τόσο με τον υποδοχέα VEGFR-1 όσο και με τον Nrp1. Η λειτουργία του VEGF-B παραμένει ασαφής και οι δύο ισομορφές του εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα, συχνότερα σε κύτταρα της καρδιάς και των σκελετικών μυών.

Το γονίδιο **VEGF-C** αποτελείται από 8 εξόνια και δεν υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα. Η πρωτεΐνη VEGF-C είναι ένα ομοδιμερές (21kDa), που συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-2 και 3. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι κυρίως να επάγει τη λεμφαγγειογένεση. Χαμηλά επίπεδα mRNA του VEGF-C εκφράζονται στην καρδιά, στις ωοθήκες και στο θυρεοειδή αδένα.

Το γονίδιο **VEGF-D** περιέχει 7 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα X. Η πρωτεΐνη VEGF-D παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την VEGF-C και συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-2 και -3, ως μη ομοιοπολικό ομοδιμερές. Έχει δειχθεί ότι αποτελεί μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων των μικρών αγγείων. Εκφράζεται στους πνεύμονες, στους σκελετικούς μύες και στο παχύ και λεπτό έντερο.

Το τελευταίο μέλος της οικογένειας του VEGF είναι ο **PlGF**. Το γονίδιο PlGF περιέχει 7 εξόνια. Με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτουν τέσσερις ισομορφές. Αυτές οι ισομορφές εκφράζονται κυρίως στον πλακούντα, αλλά απαντώνται επίσης στην καρδιά, στον αμφιβληστροειδή, στο δέρμα και τους σκελετικούς μύς¹⁰³. Σε παθολογικές καταστάσεις, ο PlGF συνδέεται με τον VEGFR-1 και επάγει την αγγειογένεση, εκτοπίζοντας τον VEGF-A από τον VEGFR-1. Έτσι, ο PlGF αφήνει περισσότερο ελεύθερο VEGF-A να συνδεθεί με τον VEGFR-2⁴³.

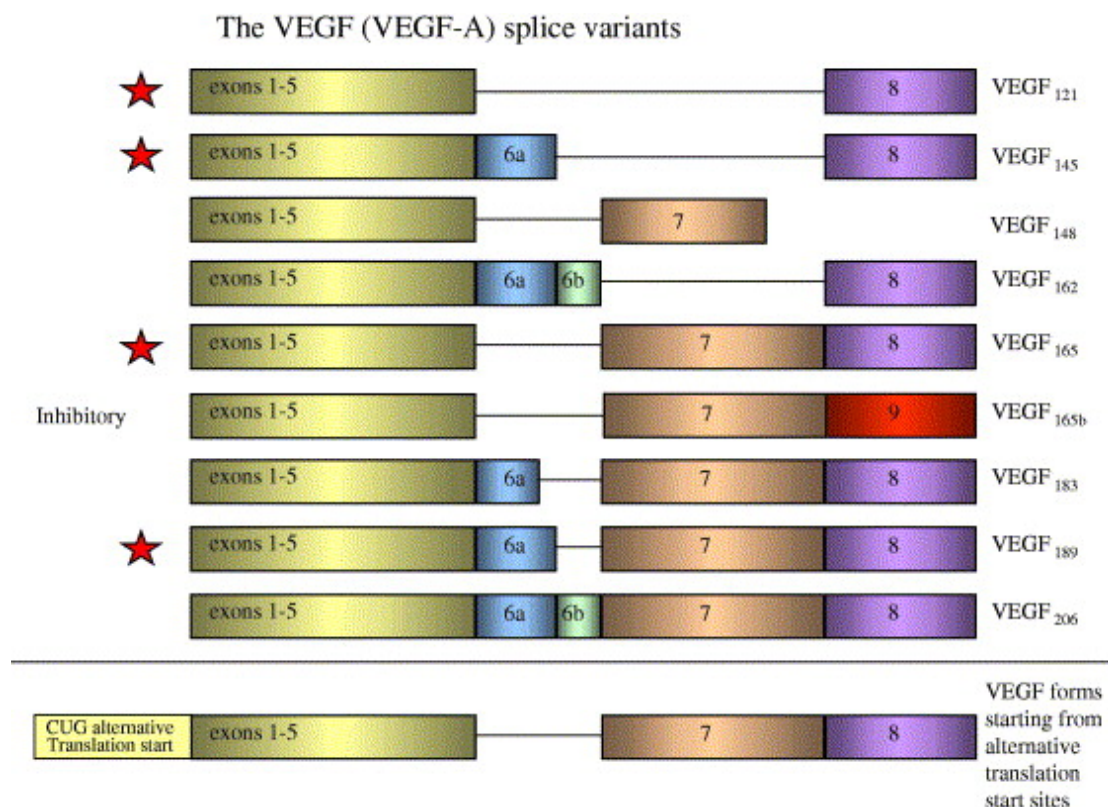
Η περισσότερο μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας VEGF είναι η VEGF-A, η οποία αναφέρεται συχνά στην βιβλιογραφία ως VEGF.

4.1.3 Δομή και οργάνωση του γονιδίου VEGF-A

Το γονίδιο του ανθρώπινου VEGF-A εδράζεται στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6, στη θέση 6p21.3. Η κωδικοποιούσα περιοχή αποτελείται από 14000 βάσεις και η οργάνωση του γονιδίου περιλαμβάνει 8 εξόνια στα οποία παρεμβάλλονται 7 ιντρόνια. Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζεται σχηματικά το εναλλακτικό μάτισμα του VEGF-A mRNA από το οποίο προκύπτουν οι έξι (6) ισομορφές του.

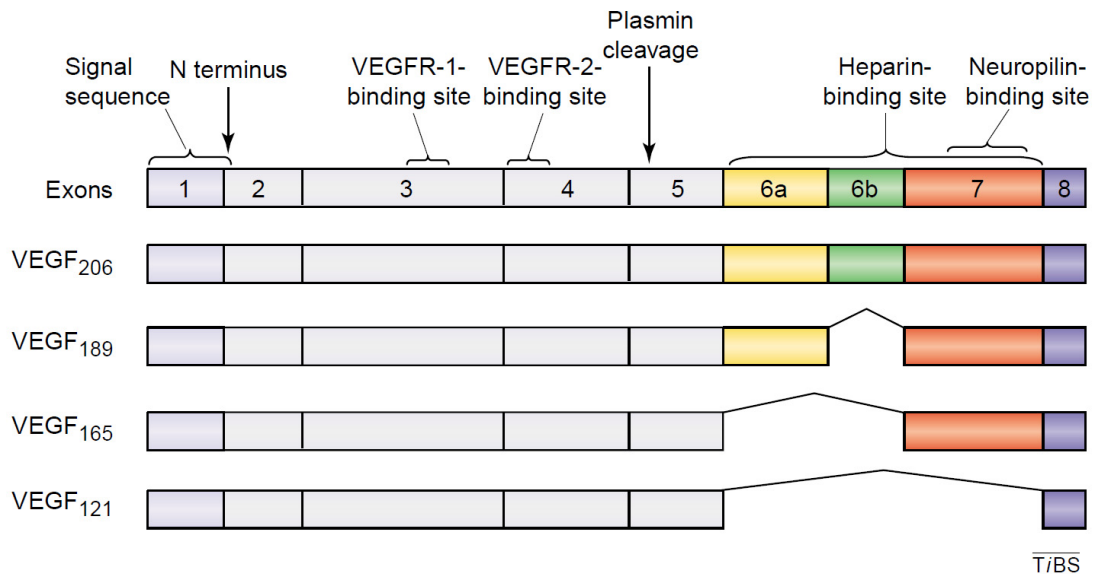
Τα εξόνια 1-5 και 8 βρίσκονται σε όλες τις ισομορφές του VEGF-A και αυτό που τις διαχωρίζει είναι η παρουσία των πεπτιδίων που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6α, 6β και 7 του γονιδίου. Η πρωτεΐνη VEGF165 στερείται τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 6, ενώ η VEGF121 στερείται αυτά που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6 και 7. Το ισομερές VEGF183 σχηματίζεται με

έλλειψη μιας περιοχής 18 ζευγών βάσεων από το εξόνιο 6a. Το ισομερές VEGF189 κωδικοποιείται και από τα οχτώ εξόνια. Στις πρωτεΐνες VEGF189 και VEGF206 υπάρχει μια εισαγωγή 24 και 17 αμινοξέων εμπλουτισμένων σε βασικά κατάλοιπα αντίστοιχα. Το ισομερές VEGF145 περιλαμβάνει το εξόνιο 6a αλλά όχι το 7¹⁰¹.



Εικόνα 4.2. Σχηματική παράσταση του εναλλακτικού ματίσματος του VEGF-A mRNA (Guttman-Raviv et al., 2006)¹⁰⁰

Οι διαφορετικές ισομορφές, λόγω της διαφορετικής πρωτοταγούς τους δομής, έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και κατά συνέπεια διαφορετική συμπεριφορά των πεπτιδίων. Τα πεπτίδια των μεγαλύτερων ισομορφών (VEGF183, VEGF189, VEGF206) παραμένουν συνδεδεμένα στα κύτταρα, γιατί έχουν στο καρβοξυτελικό άκρο τους θέση πρόσδεσης με την ηπαρίνη που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο και ως εκ τούτου είναι αποκλειστικά προσδεδεμένα σε αυτόν. Αντιθέτως, τα μικρότερα πεπτίδια (VEGF145 και VEGF165) είναι περισσότερο ελεύθερα, αν και ένα κλάσμα αυτών συνδέεται επίσης με την εξωκυττάρια ουσία⁸⁹. Μόνο το ισομερές VEGF121 αποτελεί αποκλειστικά διαλυτό όξινο πολυπεπτίδιο που διαχέεται ελεύθερα στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 4.3).



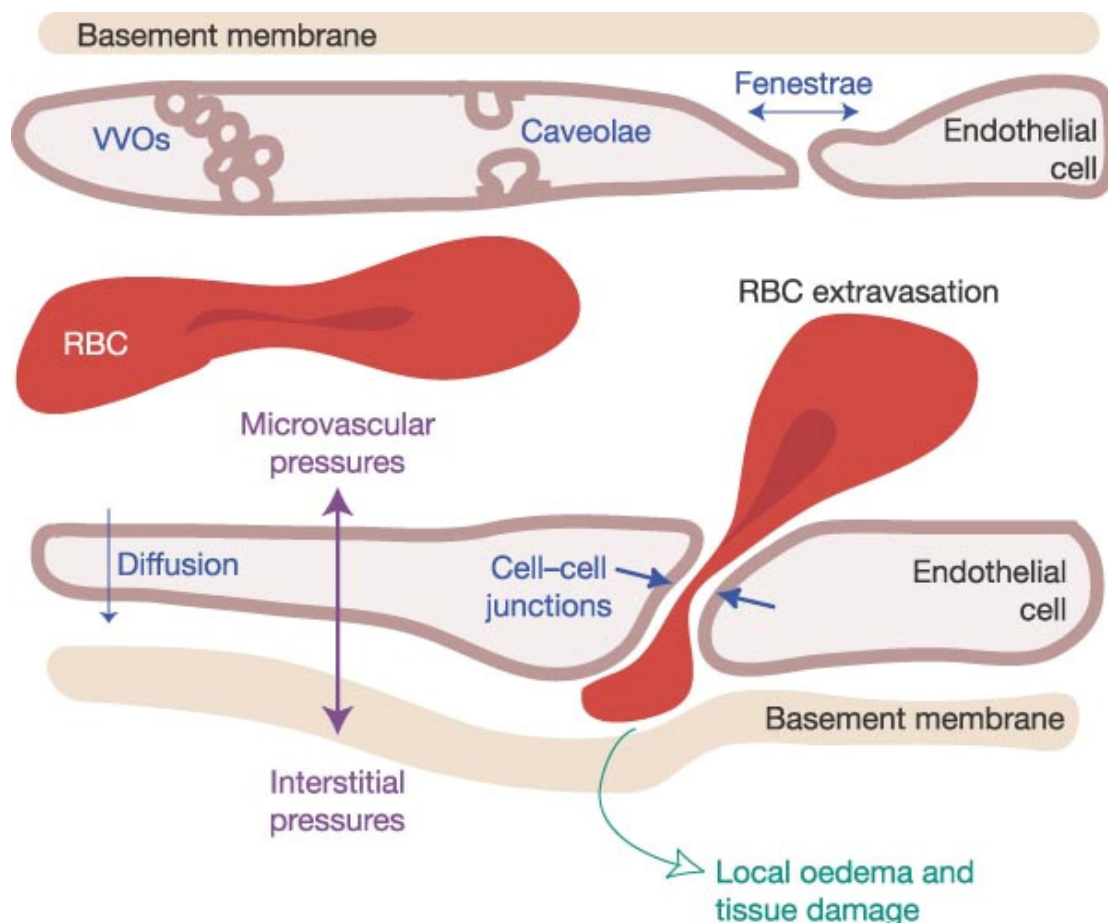
Εικόνα 4.3: Δομή των εξονίων των ποικιλιών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του VEGF-A (Cross et al., 2003)¹⁰⁴.

Αν και το αγγειογενετικό μήνυμα μεταδίδεται κυρίως από τα πεπτίδια των μικρότερων ισομορφών, οι μεγαλύτερες ισομορφές το ενισχύουν. Με την επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων οι μεγαλύτερες ισομορφές αποδίδουν ένα θραύσμα, που περιέχει τα 110 πρώτα κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης VEGF-A, το οποίο είναι μεν διαλυτό, παρουσιάζει όμως 50-100 φορές μικρότερη δραστηριότητα από τις άλλες ισομορφές του VEGF-A^{98-101,105}.

Οι ισομορφές του VEGF-A διαφέρουν ως προς τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η ισομορφή VEGF165 είναι αυτή που κυρίως εκκρίνεται τόσο από φυσιολογικά όσο και από νεοπλασματικά κύτταρα και ακολουθούν οι ισομορφές VEGF121 και 189. Η ισομορφή VEGF145 εκκρίνεται κυρίως από τα νεοπλασματικά κύτταρα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, ενώ η VEGF206 αποτελεί γενικά σπάνια ισομορφή¹⁰³.

4.1.4 Αγγειογενετικές δράσεις του VEGF-A.

Ιστορικά, ο VEGF-A απομονώθηκε ως η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την αύξηση της διαπερατότητας των μικρών αγγείων. Πράγματι, ο VEGF-A αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα περισσότερο από κάθε άλλο παράγοντα, δρα σε συγκεντρώσεις κάτω του 1 nM/L, και με μια δυναμική 50.000 φορές μεγαλύτερη της ισταμίνης. Θεωρείται ότι ο VEGF-A αυξάνει την διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της αύξησης της κινητικότητας κυστικών οργανιδίων που ευθύνονται για τη μεταφορά ουσιών από τον ενδαγγειακό στον εξωαγγειακό χώρο και αντίστροφα^{106,107}. Επιπλέον, ο VEGF-A ευθύνεται για το σχηματισμό μικρών εγκολπώσεων του κυτταροπλάσματος, αποκαλούμενων “μικροσπηλιών” (caveolae), που επιτρέπουν τη μεταφορά μικρών πρωτεϊνών. Οι εγκολπώσεις αυτές συγχωνεύονται και σχηματίζουν κανάλια στο κυτταρόπλασμα του ενδοθηλιακού κυττάρου. Το μέγεθος και ο αριθμός αυτών των καναλιών επηρεάζονται από τον VEGF-A με ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο¹⁰⁸. Επίσης, ο VEGF-A προάγει τη δημιουργία ενδοθηλιακών “παραθύρων” (‘fenestrations’) ή μικρών πόρων, επιτρέποντας τη διάχυση μικρών διαλυτών μορίων, προσφέροντας έτσι ένα επιπρόσθετο διακυτταρικό μονοπάτι εξαγγείωσης¹⁰¹. Παράλληλα, αυξάνεται η μεσοκυττάρια διαπερατότητα με την χαλάρωση των μεσοκυττάρων συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω αναδιάταξης του συστήματος κατενινών/καντχερινών¹⁰⁹ (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Μηχανισμοί μέσω των οποίων ο VEGF-A αυξάνει την διαπερατότητα των αγγείων (VVOs, vesiculo-vacuolar organelles) (Weis et al., 2005)¹⁰⁸

Το οίδημα που σχηματίζεται από τη συγκέντρωση υγρών στον εξωκυττάριο χώρο, αυξάνει τη διάμεση πίεση. Σε περιοχές αγγειακής διαρροής προσελκύονται αιμοπετάλια ή ακόμα και νεοπλασματικά κύτταρα. Τα αιμοπετάλια συνδέονται με τον παράγοντα von Willebrand, την ιννεκτίνη ή το υποκείμενο κολλαγόνο, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν υψηλά επίπεδα VEGF-A, προκαλώντας μεγαλύτερη διαρροή και προσέλκυση περισσότερων αιμοπεταλίων, τα οποία μπορεί να αποφράξουν τα μικρά αγγεία προκαλώντας τοπικά ισχαιμία. Η ισχαιμία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω έκφραση του VEGF-A^{102,108}.

Σε μοριακό επίπεδο, ο VEGF-A επαναπρογραμματίζει τη γονιδιακή έκφραση των ενδοθηλιακών κυττάρων, επάγοντας την έκφραση των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen activators, uPA&tPA), του αναστολέα των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), των

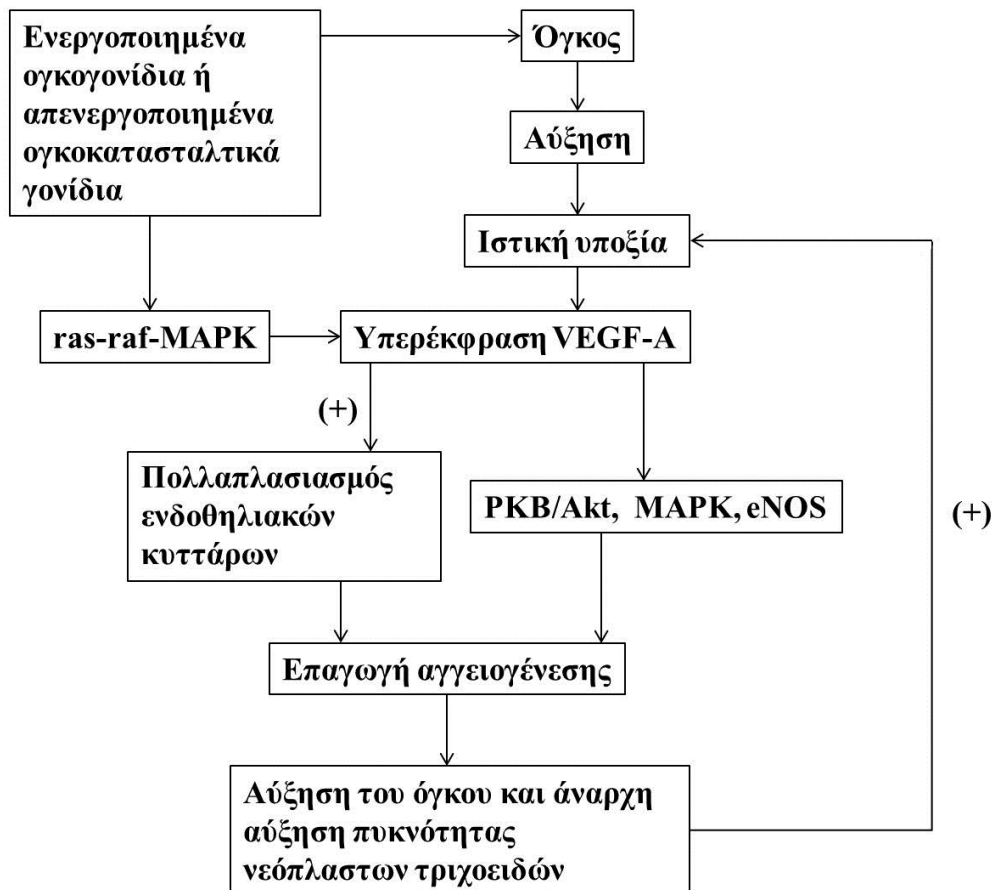
μεταλλοπρωτεΐναιών και της κολλαγενάσης που συναντάται στον διάμεσο χώρο. Ο VEGF-A επίσης επάγει την έκφραση μιας άλλης πρωτεΐνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, της interstitial collagenase^{102,110}. Επομένως, φαίνεται ότι με την αύξηση της διαπερατότητας και την ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων ο VEGF-A αναδιατάσσει την εξωκυττάρια ουσία με τρόπο που ευνοεί την αγγειογένεση.

Επιπλέον, πιθανώς ο VEGF-A να έχει αυτοκρινείς δράσεις σε νεοπλασματικά κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς του¹⁰¹. Έχει δειχθεί ότι ο VEGF-A επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων¹¹¹. Η επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού φαίνεται ότι είναι απολύτως ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα εφόσον πειράματα έδειξαν ότι ο VEGF-A δεν επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών και άλλων κυττάρων^{97,112,113}. Ταυτόχρονα, ο VEGF-A φαίνεται ότι αναστέλλει την απόπτωση μέσω των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, A1, σαρβιβίνης και XIAP^{101,114}, επιβεβαιώνοντας την άποψη ότι ο VEGF-A λειτουργεί και ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ο VEGF-A επάγει την ενδοθηλιακή μετανάστευση και εκβλάστηση προς τα σημεία που ο ίδιος παράγεται¹¹⁵, μέσω διέγερσης των υποδοχέων της ιντεγκρίνης $\alpha V\beta 3$, $\alpha 1\beta 1$, και $\alpha 1\beta 2$. Τέλος, ο VEGF-A επάγει την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεΐναιών.

Παρότι ο VEGF-A δρα πρωταρχικά στο ενδοθήλιο των αγγείων, αλληλεπιδρά και με άλλους τύπους κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς του. Έτσι, ο VEGF-A διεγείρει τη χημειοταξία μονοκυττάρων/μακροφάγων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων της μήτρας. Ο VEGF-A έχει επιπρόσθετα δράση σε λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, προγονικά κύτταρα μακροφάγων, οστεοβλάστες, κύτταρα Schwann, μεσαγγειακά κύτταρα (mesangial cells) και επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς. Ακόμη, ο VEGF-A αναστέλλει τη λειτουργική ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων και εμπλέκεται στην ανοσία των όγκων¹¹⁶. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ο VEGF-A προάγει και τη λεμφαγγειογένεση, μια διαδικασία που θεωρείτο ότι μεσολαβείται αποκλειστικά από τη δράση του VEGF-C στον VEGFR-3.

4.1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση του VEGF-A και των υποδοχέων του

Πλήθος μηχανισμών φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση του VEGF-A, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η στέρηση γλυκόζης, το οξειδωτικό και μηχανικό στρες, όπως και μεταλλάξεις ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος της υποξίας. Η χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου στους ιστούς πυροδοτεί την παραγωγή του HIF. Ειδικότερα ο HIF1α, προσδένεται σε cis στοιχεία του εκκινητή του γονιδίου του VEGF-A και αυξάνει την μεταγραφική του δραστηριότητα (Εικόνα 4.5)¹¹⁷. Η αύξηση της πρωτεΐνης VEGF-A εξασφαλίζει επαρκή αγγείωση και οξυγόνωση των υποξικών ιστών. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και σε υποξικές περιοχές όγκων. Η υπερέκφραση του VEGF-A λόγω υποξίας προσφέρει στους ιστούς έναν εναλλακτικό μηχανισμό οξυγόνωσης, εφ' όσον αναπτύσσονται νέα αγγεία. Όταν η οξυγόνωση των ιστών αποκατασταθεί, τα νεοσχηματισμένα αγγεία υποστρέφουν.



Εικόνα 4.5: Σχηματική παράσταση της σχέσης του VEGF-A με την υποξία και την αγγειογένεση στις νεοπλασίες (Gupta et al., 2003)¹¹⁸.

Επιπρόσθετα, ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια επηρεάζουν την έκφραση του VEGF-A. Τα ογκογονίδια c-Src, Bcr-Abl, erbB και Ras επάγουν την έκκρισή του, ενώ τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53, p73, LKB1 και von Hippel Lindau (*vHL*) περιορίζουν την έκφρασή του¹⁰¹.

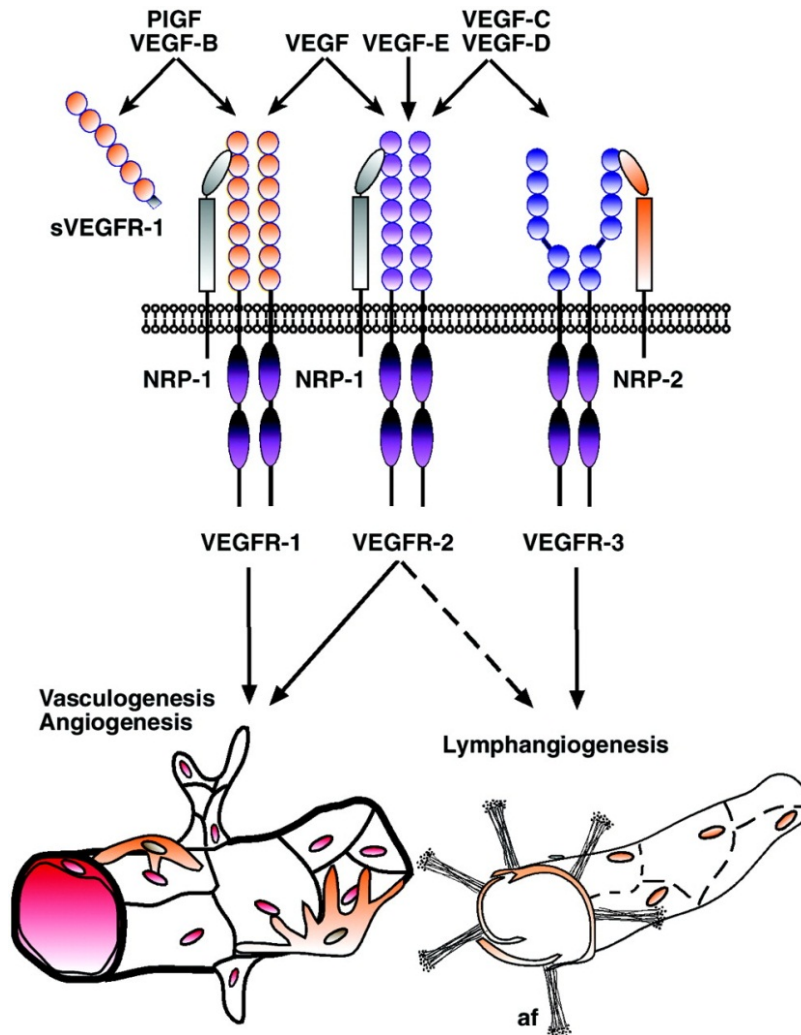
Τέλος, πολυάριθμοι αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και μεσολαβητές λιπιδίων διεγείρουν την έκφραση του VEGF-A σε διαφορετικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των EGF, TGF- α , FGF-2, TGF- β , TNF, ιντερλευκίνη-1 και -6, IGF-1, HGF, κυκλοξυγενάση-2 (COX-2), PDGF, PDGF-BB και προσταγλανδίνες E1 και E2. Αύξηση της παραγωγής του VEGF-A προκαλείται επίσης από επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων, όπως EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER-2 (Human Epidermal Receptor-2) και IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)¹⁰¹.

Η έκφραση των υποδοχέων του VEGF-A ρυθμίζεται με διαφορετικούς τρόπους. Το επίπεδο έκφρασης του VEGFR-1 αυξάνεται κατά την υποξία, πιθανώς μέσω του HIF-1 α . Ο VEGFR-2 υπερεκφράζεται: α) παρουσία του VEGF-A, πολλαπλασιάζοντας το αγγειογενετικό σήμα και β) μέσω του HIF-2 α ^{119, 120}.

4.1.6 Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του VEGF

Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών VEGF έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς επιφανειακούς υποδοχείς. Η σύνδεση αυτή προκαλεί τον διμερισμό των υποδοχέων και την μεταγωγή σήματος. Οι υποδοχείς του VEGF αποτελούν μια στενά σχετιζόμενη οικογένεια υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης και είναι οι: α) VEGFR-1 (ή Flt-1), β) VEGFR-2 (ή Flk-1 ή KDR) και γ) VEGFR-3 (ή Flt-3). Οι VEGFR-1 και -2 εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, ενώ ο VEGFR-3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι υποδοχείς όπως οι νευροφιλίνες (neuropilins 1,2, NRP 1,2)¹⁰².

Ο VEGF-A συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, οι VEGF-B και PLGF συνδέονται μόνο με τον VEGFR-1, ενώ οι VEGF-C και VEGF-D με τους υποδοχείς VEGFR-2 και VEGFR-3 (Εικόνα 4.6).



Εκόνια 4.6: Σχηματική παράσταση της σύνδεσης των ισομορφών του VEGF με τους υποδοχείς τους (Jussila et al., 2002)¹²¹.

4.2 Υποδοχείς αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGFRs)

Η οικογένεια των VEGFR-1, 2, 3 είναι υποομάδα της οικογένειας των υποδοχέων PDGF. Αυτοί αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή, που έχει επτά περιοχές ομόλογες της ανοσοσφαιρίνης (Ig), μια μονήρη διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή τυροσινικής κινάσης, η οποία διακόπτεται από μια περιοχή ένθετης κινάσης και ένα καρβοξυτελικό άκρο.¹²² Η πρόσδεση των VEGF στους υποδοχείς επάγει τον διμερισμό τους καθώς επίσης την αυτό- και τρανσ-φωσφορυλίωση τους από την ενδοκυττάρια τυροσινική κινάση τους¹²³.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι υποδοχείς VEGFR-1 και -2 είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική ανάπτυξη του αρχέγονου αγγειακού δικτύου, ο ρόλος τους όμως στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του ενδοθηλίου φαίνεται να διαφέρει. Αν και ο VEGFR-1 έχει σαφώς μεγαλύτερη συγγένεια για τον VEGF-A από

ότι ο VEGFR-2¹²⁴, παραδόξως, ο δεύτερος ευθύνεται για την επίδραση του VEGF-A στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην μετανάστευση και στην αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων¹²⁵. Παρ' όλο ότι ο VEGFR-1 προσελκύει μονοκύτταρα και μακροφάγα στην περιοχή της αγγειογένεσης, μέσω επαγωγής της διαφοροποίησης πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, η επίδρασή του στην αγγειογενετική διαδικασία φαίνεται να είναι κατασταλτική.

Η άμεση εμπλοκή των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 στην αγγειογένεση αποδεικνύεται και *in vivo*. Πειραματόζωα που δεν εκφράζουν τον VEGFR-1 δημιουργούν πρώιμες αγγειακές δομές, όμως δεν είναι σε θέση να οργανώσουν ώριμα-λειτουργικά αγγεία,^{126,127} ενώ πειραματόζωα που δεν εκφράζουν τον VEGFR-2 αδυνατούν να σχηματίσουν αγγειακά δίκτυα¹²⁸. Από τα ευρήματα αυτά, είναι φανερό ότι οι δύο κύριοι υποδοχείς του VEGF είναι υπεύθυνοι για διαφορετικές φάσεις ωρίμανσης του αγγειακού δικτύου, πιθανώς μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ετεροδιμερή που σχηματίζουν οι υποδοχείς VEGFR-1 και- 2 φαίνεται να έχουν ισχυρότερα αποτελέσματα όσον αφορά τη βιολογική δράση του VEGF-A από τα ομοδιμερή του VEGFR-2 που θεωρούνται οι κατεξοχήν μεταγωγείς σήματος του VEGF-A^{129,130}.

Παρ' όλον αρχικά υποστηρίχθηκε ότι οι υποδοχείς του VEGF εκφράζονται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η ιστική κατανομή των υποδοχέων αυτών πλέον περιλαμβάνει λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, οστεοβλάστες, καρδιακά μυοκύτταρα, μυοϊνοβλάστες, νευρώνες και διάφορα νεοπλασματικά κύτταρα¹⁰⁸.

Ο VEGFR-3 λόγω της έκφρασής του κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα λεμφαγγείων φαίνεται να είναι ουσιώδης στην δημιουργία του λεμφαγγειακού συστήματος μετά από σύνδεσή του με τον VEGF-C.

Υποδοχείς VEGF, οι οποίοι δεν ανήκουν στην οικογένεια των προαναφερομένων υποδοχέων είναι οι νευροπιλίνη-1 και 2 (neuropilin-1, -2)^{131,132}, οι οποίοι είναι λιγότερο εκλεκτικά εκφραζόμενοι από το ενδοθήλιο των αγγείων από ότι οι υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2^{101,133}.

4.2.1 Υποδοχέας VEGFR-1 (fms-like tyrosyl kinase-1 ήFlt-1).

Ο υποδοχέας VEGFR-1, αν και έχει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής αγγειογένεσης (π.χ. σχηματισμός αγγείων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης), δεν φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός στην αγγειογένεση των όγκων. Ο ρόλος του VEGFR-1 ποικίλει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των αγγείων, τις συνθήκες (φυσιολογικές ή παθολογικές) και τον τύπο των κυττάρων. Ο VEGFR-1 συνδέεται όχι μόνο με τον VEGF-A αλλά και με τους αγγειογενετικούς παράγοντες PLGF και VEGF-B.

Από εναλλακτικό μάτισμα του VEGFR-1 προκύπτει μια διαλυτή μορφή του υποδοχέα (sVEGFR-1) που περιέχει τις πρώτες έξι από τις επτά περιοχές ανοσοσφαιρίνης. Μελέτες έδειξαν ότι αυτή η υδατοδιαλυτή μορφή του VEGFR-1 ρυθμίζει αρνητικά την αγγειογένεση δεσμεύοντας το VEGF-A, όπως επίσης και τα ομοδιμερή του υποδοχέα.

Ο VEGFR-1 πιθανώς να υφίσταται μια ασθενή αυτοφωσφορυλίωση τυροσίνης μετά από σύνδεση με τον VEGF-A. Πιστεύεται ότι ο VEGFR-1 μπορεί να μην είναι πρωταρχικά ένας υποδοχέας μετάδοσης μιτογόνων σημάτων, αλλά μάλλον ένας υποδοχέας δόλωμα, ικανός να ρυθμίσει αρνητικά τη δραστηριότητα του VEGF-A στο ενδοθήλιο των αγγείων, εμποδίζοντας τη σύνδεση του VEGF-A με το VEGFR-2. Η συγγένεια του VEGFR-1 με τον VEGF-A είναι σχεδόν 10 φορές ισχυρότερη από ότι αυτή του VEGFR-2 με τον VEGF-A. Όμως παρά την ισχυρή συγγένεια σύνδεσης του VEGFR-1 με τον VEGF-A, η δραστηριότητα της κινάσης αυτού του υποδοχέα είναι ασθενής κάνοντας δύσκολη την εκτίμηση των επιπέδων αυτοφωσφορυλίωσης του. Η παρατηρούμενη ενίσχυση της δραστηριότητας του VEGF-A από το PIGF μπορεί να εξηγηθεί τουλάχιστον εν μέρει από την εκτόπιση του VEGF-A από τη θέση σύνδεσης του με το VEGFR-1¹¹⁶.

Παρόλον ότι η ακριβής σηματοδότηση του VEGFR-1 παραμένει ασαφής, υποστηρίζεται ότι εμπλέκεται στην αιμοποίηση, στη χημειοταξία μονοκυττάρων και στην κινητοποίηση από τον μυελό των οστών προγονικών κυττάρων. Ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα όσον αφορά στο ρόλο του VEGFR-1 στην αιμοποίηση, ο οποίος ενεργοποιούμενος από το PIGF κινητοποιεί VEGFR-1-θετικά αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs).

Επιπλέον, ο VEGFR-1 εμπλέκεται στην παρακρινή απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προάγει την VEGF-B διαμεσολαβούμενη έκφραση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της μεταλλοπρωτεϊνάσης-

9 (MMP9), των uPA και PAI-1, μορίων αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία επιπρόσθετα διευκολύνουν την απελευθέρωση του VEGF-A και την κυτταρική μετανάστευση¹¹⁶.

Τέλος, η σύνδεση του VEGF-A με τον VEGFR-1 φαίνεται να επάγει την SHP-1 (Src Homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1) δραστηριότητα φωσφατάσης που με τη σειρά της μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του VEGFR-2.

4.2.2 Υποδοχέας VEGFR-2 (kinase domain region (KDR) ήFlk-1).

Ο υποδοχέας VEGFR-2 έχει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση και στην αιμοποίηση. Είναι ο υποδοχέας ο οποίος μεσολαβεί την πλειονότητα των αγγειογενετικών δράσεων του VEGF-A. Οι δράσεις αυτές περιλαμβάνουν την μικροαγγειακή διαπερατότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διασπορά, τη μετανάστευση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρ' όλων ό,τι ο VEGFR-2 έχει μικρότερη συγγένεια με τον VEGF-A από ότι ο VEGFR-1, έχει ισχυρότερη δράση κινάσης. Όταν ο VEGF-A συνδέεται στον VEGFR-2 προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα και φωσφορυλίωση, προάγοντας έτσι όλες τις ανωτέρω δράσεις του συνδέτη του.

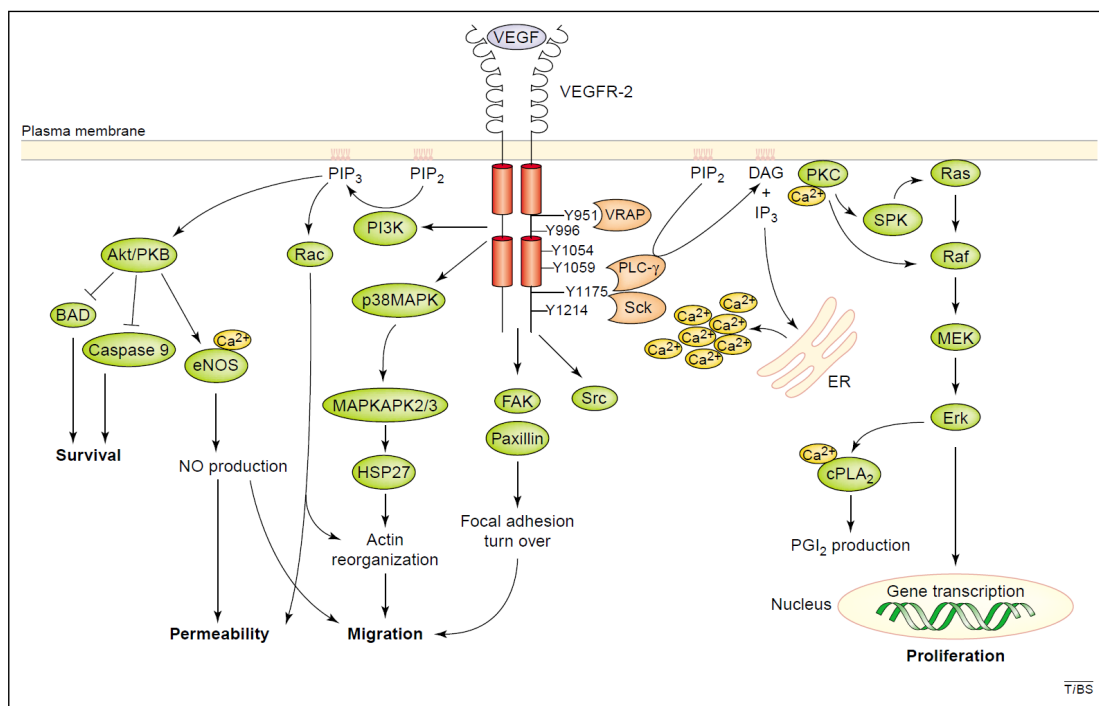
Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες του VEGFR-2 φαίνεται να είναι και η διατήρηση της ισορροπίας επιβίωσης/απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση της αγγειακής ομοιόστασης. Οι αντιαποπτωτικές δράσεις του VEGF-A εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του VEGFR-2 και όχι του VEGFR-1¹¹⁶.

Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ο VEGFR-2 μπορεί να διεγείρει την αγγειογένεση από μόνος του. Αυτή η ενεργοποίηση και σηματοδότηση του VEGFR-2 φαίνεται να επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από την συνέκφραση και ενεργοποίηση του VEGFR-1¹¹⁶.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGFR-2 μπορεί να καθορίσει ειδικά γεγονότα σηματοδότησης μετά από διέγερση από τον VEGF-A. Για παράδειγμα, ο VEGFR-2 μέσω των καντχερινών μπορεί να διευκολύνει την αγγειακή διαπερατότητα, ενώ μέσω των ιντεγκρινών ανβ3 και ανβ5 επηρεάζει τη διαπερατότητα και την αγγειογένεση. Η περαιτέρω ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω του VEGF-A περιλαμβάνει μεταγωγικά μόρια, όπως phosphatidyl inositol-3-OH kinase

(PI(3)K)/Akt, Ras/Raf/MEK/Erk, Src και phospholipaseCg (PLC-g)/endothelial nitricoxide synthase (eNOS)^{104,108,133} (Εικόνα 4.8).

Τέλος, έχει ταυτοποιηθεί μια διαλυτή κυκλοφορούσα μορφή του VEGFR-2, η οποία αναστέλλει την λεμφαγγειογένεση¹⁰³.



Εικόνα 4.8: Σχηματική παράσταση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Cross et al., 2003)¹⁰⁴.

4.3 CD34

Η πρωτεΐνη CD34 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας με μοριακό βάρος 110kD. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, στη θέση 1q32¹³⁴. Έχουν αποδοθεί διάφορες ιδιότητες στην πρωτεΐνη CD34, χωρίς ο ακριβής της ρόλος να είναι πλήρως γνωστός.

Η πρωτεΐνη CD34 έχει προσκολλητικές ιδιότητες και συμβάλλει στην αιμοποίηση μεσολαβώντας στην επισύναψη των βλαστικών κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία του μυελού των οστών¹³⁵. Επίσης αναστέλλει την προσκόλληση μαστοκυττάρων, διευκολύνει την διεύρυνση των αγγειακών αυλών, καθώς και την κυτταρική μετανάστευση¹³⁴⁻¹³⁶. Επιπλέον, αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη ποσοτικοποίησης της αγγειογένεσης των όγκων, μέσω της μέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας.

Έκφραση της πρωτεΐνης CD34 ανευρίσκεται στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου και του μυελού των οστών, σε υποομάδα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αλλά όχι λεμφικών αγγείων (εκτός λεμφαγγείων του υπεζωκότα), σε μαστοκύτταρα, σε υποπληθυσμό δένδριτικών κυττάρων (αρνητικών στον παράγοντα XIIIa) στο διάμεσο χώρο και γύρω από τα εξαρτήματα του χορίου του δέρματος¹³⁵.

Επίσης, το CD34 εκφράζεται σε νεοπλασματικά κύτταρα όγκων, όπως σε προβάλλον δερματοϊνοσάρκωμα (Dermatofibrosarcomaprotuberans, DFSP), στρωματικούς όγκους γαστρεντερικού συστήματος (Gastrointestinal Stromal Tumor, GIST), κακοήθεις όγκους ελύτρων των περιφερικών νεύρων (Peripheral neural sheath tumor, PNSTs), κυψελιδικό σάρκωμα μαλακών μορίων, γιγαντοκυτταρικό ινοβλάστωμα, κοκκιοκυτταρικό σάρκωμα, σάρκωμα Kaposi, λιποσάρκωμα, κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα, μηνιγγικό αιμαγγειοπερικύττωμα, μηνιγγίωμα, νευροίνωμα, σβάννωμα και θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς. Επίσης ανιχνεύεται σε πρε-B οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (θετικό στο 75%), οξεία μυελογενή λευχαιμία (40%), οξεία μυελογενή λευχαιμία -M7 (στα περισσότερα περιστατικά)¹³⁶.

4.4 πρωτεΐνη CD105 (ενδογλίνη)

Η ενδογλίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 180 kDa. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9, στη θέση 9q34. Ο εκκινητής (promoter) του γονιδίου δείχνει μια ισχυρή εκλεκτική δραστηριότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εναλλακτικό μάτισμα δίνει δύο μεταγραφικές ποικιλίες που κωδικοποιούν δύο διαφορετικές ισομορφές ενδογλίνης, την L και την S, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική έκφραση στους διάφορους ιστούς. Η ισομορφή L έχει 8 φορές υψηλότερη ικανότητα φωσφορυλίωσης από την ισομορφή S και εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα¹³⁷⁻¹³⁹.

Σε ανθρώπινους ιστούς ενηλίκων, η ενδογλίνη εκφράζεται κυρίως στο ενδοθήλιο των αγγείων και στα στρωματικά κύτταρα, ενώ ανιχνεύεται ασθενώς σε ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, μακροφάγα, πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς, ινοβλάστες, μεσαγγειακά κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα λεμφοζιδίων, πρώιμα B κύτταρα (early B cells), αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα της καρδιάς και μελανοκύτταρα, καθώς επίσης σε συγκυτιοτροφοβλάστες του πλακούντα (term placenta)^{137,140}.

Η ενδογλίνη εκφράζεται τόσο σε ώριμα όσο και ανώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, σε ιστούς με έντονη αγγειογένεση, όπως αναγεννώμενοι και φλεγμονώδεις, καθώς και σε νεοπλασματικούς ιστούς. Έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της ενδογλίνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων νεοπλασματικών ιστών, σε σύγκριση με τους πανενδοθηλιακούς δείκτες CD31 και CD34. Επομένως, η ενδογλίνη θεωρείται ένας από τους καταλληλότερους δείκτες ποσοτικοποίησης της αγγειογένεσης των όγκων, μέσω της εκτίμησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD), η οποία φαίνεται να έχει προγνωστική αξία σε ορισμένα νεοπλάσματα. Έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της ενδογλίνης με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων¹³⁷.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της ενδογλίνης σχετίζονται με την κληρονομούμενη αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία τύπου 1 (hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1, HHT1), ένα νόσημα κληρονομούμενο με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, το οποίο χαρακτηρίζεται από αρτηριοφλεβώδεις δυσμορφίες και συχνές αιμορραγίες¹³⁹.

Οι βιοχημικές και βιολογικές λειτουργίες της ενδογλίνης (CD105) είναι υπό μελέτη.

Η ενδογλίνη συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες της υπεροικογένειας του TGF- β , όπως activin-A, BMP-7 (bone morphogenetic protein), και BMP-2. Ειδικότερα, η ενδογλίνη συνδέεται με τους TGF- β 1 και TGF- β 3, ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να δράσει και ανεξάρτητα από το μονοπάτι σηματοδότησης του TGF- β ¹³⁷. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι της συνθετάσης του ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) και ρυθμίζει την έκφραση και τη δράση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2), ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο (tone)¹³⁷. Επιπρόσθετα, η ενδογλίνη παίζει ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση ρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως ινονεκτίνη, κολλαγόνο, PAI-1 και lumican.

Παρ' ότι υπάρχουν εκτενή δεδομένα για τη δράση της ενδογλίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ελάχιστα είναι γνωστά για τη δράση της στα νεοπλασματικά κύτταρα, πιθανώς λόγω της περιορισμένης έκφρασής της σε αυτά¹³⁷. Έκφραση της ενδογλίνης έχει παρατηρηθεί στο κυτταρόπλασμα νεοπλασματικών κυττάρων μηνιγγιωμάτων, σαρκωμάτων διαφορετικών ιστολογικών τύπων, καρκινωμάτων του μαστού και των ωοθηκών, καθώς και μελανωμάτων¹³⁹⁻¹⁴⁵.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΝΕΣΗ ΚΑΙ ΓΑΣΤΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

5.1 Εισαγωγή

Η θεραπεία του γαστρικού καρκινώματος στηρίζεται στη πρόιμη διάγνωση, στη χειρουργική αντιμετώπιση με λεμφαδενικό καθαρισμό και στην χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Παρόλα αυτά, περίπου το ένα τέταρτο των ασθενών πεθαίνει από υποτροπή της νόσου¹⁴⁶. Σε αντίθεση με άλλους συμπαγείς όγκους, όπως του μαστού και του εντέρου, δεν υπάρχει μια τυποποιημένη θεραπεία για το γαστρικό καρκίνωμα.

Η επείγουσα ανάγκη να μελετηθούν νέοι προγνωστικοί δείκτες ικανοί να διαχωρίσουν ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής αυξάνει το ενδιαφέρον του υπό μελέτη νεοπλάσματος. Στις μέχρι τώρα μελέτες, παρατηρείται μεγάλη ποικιλία στην έκφραση των διαφόρων δεικτών και αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά τη μακροχρόνια εξέλιξη της νόσου, θέτοντας σε αμφισβήτηση τόσο την ακρίβεια των τεχνικών που χρησιμοποιούνται όσο και την προγνωστική σημασία αυτών των βιομορίων. Συγκέντρωση υλικού από διαφορετικά νοσοκομεία, διαφορετικές μονιμοποιήσεις, αποκλίσεις μεταξύ των παρατηρητών, χρόνος αποθήκευσης του υλικού και αυθαίρετες τιμές των κατώτερων τιμών θετικότητας θα μπορούσαν, εν μέρει, να εξηγήσουν τα αντιφατικά αποτελέσματα των μελετών¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

5.2 VEGF-A και Γαστρικό καρκίνωμα

Ο VEGF-A θεωρείται ότι είναι ο ισχυρότερος επαγωγέας αγγειογένεσης στους όγκους του γαστρεντερικού συστήματος⁴². Η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A σε γαστρικά καρκινώματα έχει μελετηθεί εκτενώς, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.1. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ικανοποιητικό αριθμό περιστατικών και το ποσοστό έκφρασης κυμαίνεται από 28 έως 90.1%. Η πρωτεΐνη VEGF-A εκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα του όγκου¹⁴⁸⁻¹⁸⁴. Η χρώση είναι κυτταροπλασματική, κοκκιώδης ή διάχυτη και μερικές φορές μεμβρανική. Επιπλέον, έκφραση του VEGF-A περιγράφεται σε θέσεις εντερικής μετάπλασης και δυσπλασίας του επιθηλίου υποδηλώνοντας μια πρόιμη αγγειογενετική αντίδραση κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης. Έκφραση περιγράφεται και στον παρακείμενο φαινομενικά φυσιολογικό βλενογόνο, στα υπερπλαστικά γαστρικά βοθρία και στα τοιχωματικά κύτταρα^{164,172,173}. Στην εργασία του Maeda και συνεργατών (1999)¹⁵² παρατηρήθηκε περιστασιακά και ασθενής χρώση σε μερικά ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.

Πίνακας 5.1: Δημοσιευμένες μελέτες της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A στο καρκίνωμα του στομάχου

Συγγραφέας	Έτος	Αριθμός περιστατικών	Ποσοστό έκφρασης VEGF %
Takahashi et al ¹⁵⁰	1996	89	
Maeda et al ¹⁵¹	1998	120	35
Maeda et al ¹⁵²	1999	195	
Ikeguchi et al ¹⁵³	1999	97(t3, n0, stage II)	28
Metges et al ¹⁵⁴	2000	43	74,4
Maehara et al ¹⁵⁵	2000	300	
Ichikura et al ¹⁵⁶	2001	76	39
Liu et al ¹⁴⁹	2000	50	50
Liu et al ¹⁵⁷	2001	60	73,3
Feng et al ¹⁵⁸	2002	55	51
Song et al ¹⁵⁹	2002	46	76,09
Kakeji et al ¹⁶⁰	2002	243	42
Du et al ¹⁶¹	2003	80	67,5
Shi et al, 2003 ¹⁶²	2003	232	52,6
Fondevila et al ¹⁶³	2004	156	74
Song et al ¹⁶⁴	2004	85	75,4
Cabuk et al ¹⁶⁵	2005	51	65
Choi et al ¹⁶⁶	2006	137	68.6
Ozdemir et al ¹⁶⁷	2006	51	56.9
Driessen et al ¹⁶⁸	2006	154	64
Kondo et al ¹⁶⁹	2007	80	51,3
Cabuk et al ¹⁷⁰	2007	51	65
Nikiteas et al ¹⁷¹	2007	100	36 (cut off 50%)
Lieto et al ¹⁴⁸	2008	88	48
Lazăr et al ¹⁷²	2008	61	65,6
Raica et al ¹⁷³	2008	80	70
Oh et al ¹⁷⁴	2008		57,9
Lee et al ¹⁷⁵	2009	375	90,1
Iordache et al, 2010 ¹⁷⁶	2010	40	45
Zhou et al, 2010 ¹⁷⁷	2010	200	81.5
Lee et al ¹⁷⁸	2010	102	85.3
Yang et al ¹⁷⁹	2010	118	54.2
Suzuki et al ¹⁸⁰	2010	109	41.3
Wang et al ¹⁸¹	2010	128	45.3
Zhao et al ¹⁸²	2012	107	66.4
Liu et al ¹⁸³	2012	55	43.6
Partyka et al ¹⁸⁴	2012	24	87.5

Από τις μέχρι τώρα μελέτες (Πίνακας 5.1) προκύπτουν αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A στο γαστρικό καρκίνωμα. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης^{146,148,152,156,160-163,167,171,172,177,185-189}, ενώ άλλες ότι δεν έχει προγνωστική αξία^{165,168,174,175,190-192}. Οι περισσότερες όμως από τις μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A αποτελεί δείκτη αγγειακής διήθησης ή μετάστασης, επιπρόσθετα της προγνωστικής της αξίας^{146,160,169,193}. Συγκεκριμένα, η έκφραση του VEGF-A έχει συσχετισθεί με λεμφαδενικές^{159,163,169,190,192,194} και απομακρυσμένες μεταστάσεις^{163,190,192}, με λεμφική^{148,161,169}, φλεβική¹⁵⁶, αγγειακή^{148, 162, 163, 169} διήθηση, καθώς και διήθηση του ορογόνου του στομάχου¹⁶⁵. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι ο VEGF-A αποτελεί δείκτη κινδύνου για ηπατικές μεταστάσεις^{146,160}.

Η έκφραση του VEGF-A σε γαστρικά καρκινώματα έχει συσχετισθεί και με άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, όπως το βαθμό διαφοροποίησης^{161,169,172,178,189,191}, το στάδιο της νόσου^{159,176,190,194} και το βάθος διήθησης του όγκου^{169,172,191}. Βέβαια δεν απουσιάζουν από τη βιβλιογραφία μελέτες^{159,172,173} στις οποίες δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της έκφρασης του VEGF-A με το στάδιο της νόσου ή με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου.

Συσχέτιση έχει βρεθεί επίσης μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A και του ιστολογικού τύπου¹⁵⁰. Έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρείται συχνότερα σε εντερικού από ότι σε διαχύτου τύπου καρκινώματα^{156,172}, χωρίς όμως η διαφορά να είναι πάντα στατιστικά σημαντική¹⁷².

Η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A έχει συσχετισθεί ακόμα με την πιθανότητα αιμορραγίας από το ανώτερο πεπτικό, την αιματογενή διασπορά σε πρώιμα στάδια γαστρικού καρκινώματος¹⁷⁶ και την τοπική υποτροπή του όγκου^{118,129}.

Θετική ανοσοχρώση της πρωτεΐνης VEGF-A περιγράφεται συχνότερα σε άνδρες από ότι σε γυναίκες, χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ η ηλικία των ασθενών και η εντόπιση του όγκου δεν φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A¹⁷².

Τέλος, συσχέτιση του VEGF-A με την μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) των γαστρικών καρκινωμάτων περιγράφεται σε διάφορες μελέτες^{150,151,161,163,168,172,177,189-193,195-202}, χωρίς να λείπουν βέβαια και μελέτες στις οποίες δεν βρέθηκε ανάλογη συσχέτιση¹⁵⁹.

Η πρωτεΐνη VEGF-A παράγεται τόσο από νεοπλασματικά κύτταρα, όσο και από ινοβλάστες και φλεγμονώδη κύτταρα του στρώματος του όγκου²⁰³, όπως μαστοκύτταρα ή μακροφάγα, που αποτελούν πιθανές πηγές VEGF-A²⁰⁴, όμως έκφραση του VEGF-A στα κύτταρα αυτά δεν περιγράφεται σε όλες τις μελέτες^{153,173}. Ο Ohta και συνεργάτες (2003)²⁰⁵ μελέτησαν τα επίπεδα του VEGF στο περιφερικό αίμα και βρήκαν αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με φλεβική διήθηση και λεμφαδενικές μεταστάσεις. Επίσης ο Karayiannakis και συνεργάτες (2002)²⁰⁶ βρήκαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων VEGF του ορού, το στάδιο της νόσου, το βάθος διήθησης του όγκου και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.

Στην βιβλιογραφία περιγράφονται συσχετίσεις της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A με άλλα μόρια, όπως τη φωσφορυλάση της θυμιδίνης (thymidine phosphorylase, TP). Η υψηλή συνέκφραση αυτών των δύο πρωτεϊνών έχει συσχετισθεί στατιστικώς σημαντικά με υψηλή MVD²⁰⁷. Επίσης, ασθενείς με όγκους ίδιου σταδίου TNM φαίνεται να έχουν σημαντικές διαφορές στην επιβίωσή τους όταν ομαδοποιούνται με βάση την έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A και EGFR¹⁴⁸.

5.3 Υποδοχείς του VEGF-A (VEGFR) και γαστρικό καρκίνωμα

Αρχικά επικράτησε η άποψη ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα του γαστρικού καρκινώματος εκκρίνουν την πρωτεΐνη VEGF-A, ενώ οι υποδοχείς VEGFR-2 και VEGFR-1 εκφράζονται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι VEGFRs εκφράζονται και από τα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκινώματος, εύρημα που δείχνει ότι πιθανώς υπάρχει και αυτοκρινής δράση του VEGF-A στο γαστρικό καρκίνωμα. Η αυτοκρινής δράση του VEGF-A έχει αποδειχθεί σε 5 διαφορετικούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένων μελανωμάτων, ωοθηκικών και παγκρεατικών καρκινωμάτων, σαρκώματος Kaposi και λευχαιμιών. Επομένως, η πρωτεΐνη VEGF δρα όχι μόνο ως παρακρινής παράγοντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και ως αυτοκρινής παράγοντας στα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα που την παράγουν²⁰⁸⁻²¹⁷.

Ο Zhang και συνεργάτες (2002) μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A και των υποδοχέων της σε 8 κυτταρικές σειρές γαστρικών καρκινωμάτων σε επίπεδο mRNA. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε συχνή συνέκφραση του συνδέτη VEGF-A και των VEGFRs²⁰⁸. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η εξωγενής χορήγηση

VEGF-A αυξάνει τα VEGF-R2-θετικά νεοπλασματικά κύτταρα και την σύνθεση DNA^{208,218}.

Στις μέχρι τώρα μελέτες το ποσοστό της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δύο υποδοχέων του VEGF-A ποικίλει. Ο Zhang και συνεργάτες (2002) βρήκαν ότι το 84.6% και το 70% των καρκινωμάτων ήταν θετικά για τον VEGFR-1 και VEGFR-2, αντίστοιχα. Η ανοσοχρώση ήταν εντονότερη σε καλά διαφοροποιημένα από ότι σε φτωχά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα. Έκφραση του VEGFR-1 περιγράφεται και στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων, καθώς και στη βάση (bottom) των φυσιολογικών κυττάρων των γαστρικών αδενίων²⁰⁸.

Σε άλλη μελέτη βρέθηκε σημαντικά μικρότερο ποσοστό έκφρασης του υποδοχέα VEGFR-2 και υψηλότερο ποσοστό σε εντερικού έναντι διαχύτου τύπου καρκινώματα (39,2% έναντι 15,8%). Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα περισσότερα VEGFR-2 θετικά καρκινώματα προερχόταν από ασθενείς προχωρημένου σταδίου¹⁵⁰. Ο Tanigawa και συνεργάτες (1997) βρήκαν ότι το 54% των ογδόντα οκτώ γαστρικών καρκινωμάτων που μελετήθηκαν ήταν θετικά για τον VEGFR-2, χωρίς όμως ο υποδοχέας αυτός να συσχετίζεται με την αγγείωση του όγκου ή την έκφραση του VEGF-A¹⁸⁹.

Ο Liu και συνεργάτες (2001) παρατήρησαν ότι η έκφραση του VEGF-A εντοπιζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων, ενώ αυτή του VEGFR-2 κυρίως στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα και γύρω από τα καρκινώματα. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι σε 2 από τα 50 δείγματα, τα νεοπλασματικά κύτταρα έκφραζαν τον υποδοχέα VEGFR-2 κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά και υποστήριξαν ότι ο VEGF-A μπορεί να έχει και αυτοκρινή δράση στα γαστρικά καρκινώματα¹⁴⁹.

Ο Hirashima και συνεργάτες (2009)²¹⁹ μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των VEGFR- 1, 2, και 3 σε 86 περιπτώσεις καρκινωμάτων του στομάχου. Εκτιμήθηκε η έκφραση των υποδοχέων τόσο σε νεοπλασματικά κύτταρα όσο και σε στρωματικά αγγεία. Αυτή ήταν για τον υποδοχέα VEGFR-1 76% και 42%, για τον υποδοχέα VEGFR-2 0 και 53% και για τον υποδοχέα VEGFR-3 0 και 87%, αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η έκφραση των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 στα στρωματικά αγγεία αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη φτωχής πρόγνωσης. Δεν υπάρχουν μελέτες που να αναφέρουν συσχέτιση της έκφρασης των VEGFRs των νεοπλασματικών κυττάρων με την επιβίωση.

5.4 Μικροαγγειακή πυκνότητα και γαστρικό καρκίνωμα

Διάφοροι δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD). Ειδικά για το γαστρικό καρκίνωμα, έχουν χρησιμοποιηθεί ο παράγοντας VIII^{150,151,161,193,204,220-224} και οι δείκτες CD31^{155,176}, CD34^{165,172,176,179,190,225} και CD105²²⁶.

Προηγούμενες μελέτες σε πρώιμο γαστρικό καρκίνωμα, υποστηρίζουν ότι η MVD αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη λεμφαδενικών μεταστάσεων²²⁰ και ότι αυτή συσχετίζεται με το διηθητικό πρότυπο αύξησης (ψηλότερη σε επιφανειακά εξαπλωμένους από ότι σε διηθητικού τύπου όγκους)²²², το μέγεθος²²⁰ και την υποβλεννογόνια διήθηση του όγκου²²⁰.

Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι στο γαστρικό καρκίνωμα η MVD συσχετίζεται με το στάδιο της νόσου^{159, 172}, το βαθμό διαφοροποίησης^{161,172,224,227}, την υποτροπή¹⁶³, την αγγειακή διήθηση^{162,191}, τις λεμφαδενικές^{161-163,172,191,223,224}, καθώς και τις απομακρυσμένες (ηπατικές και περιτοναϊκές) μεταστάσεις^{189,223}, αλλά και τις μικρομεταστάσεις στο μυελό των οστών^{163,228}. Ορισμένες από τις προαναφερόμενες μελέτες^{188,189,191,221,224,225} έδειξαν ότι η MVD αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη, ενώ ο Joo και συνεργάτες (2002)¹⁹² δεν βρήκαν την MVD-CD34 να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη. Η Giatomanolakis και συνεργάτες (2000)²⁰⁷ υποστηρίζουν ότι οι περιπτώσεις που έχουν ενδιάμεση τιμή MVD παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση.

Η τιμή της MVD στα γαστρικά καρκινώματα ποικίλει μεταξύ 12 και 65, με ένα μέσο όρο 38.7. Σε σύγκριση με το φυσιολογικό βλεννογόνο, στα γαστρικά καρκινώματα η MVD είναι ψηλότερη και η ανάπτυξη των αγγείων είναι ακανόνιστη με σχηματισμό συσσωματωμάτων αγγείων, που κατανέμονται άνισα στον όγκο κι έχουν ακανόνιστους ή ανύπαρκτους αυλούς. Ο όγκος που αναπτύσσεται διάχυτα σε όλο τον στόμαχο και αυτός που εντοπίζεται στην καρδιά δείχνουν εντονότερη αγγειογενετική δραστηριότητα¹⁷².

Ακόμη, περιγράφεται συσχέτιση της MVD (χρώση με το δείκτη CD34) με τον ιστολογικό τύπο. Έχει παρατηρηθεί ψηλότερη τιμή σε διαχύτου τύπου γαστρικά καρκινώματα^{172,227}, επιπλέον σε ασθενείς με αιμορραγία του ανώτερου πεπτικού¹⁷⁶, ασκίτη²²⁹ και σε όγκους που εκφράζουν VEGF, HIF-1alpha¹⁶⁵, οστεοποντίνη (OPN)¹⁹⁰ και κυκλοξυγενάση-2 (COX-2)^{190,191}.

Η MVD πιθανώς να αποτελεί έναν υποσχόμενο προγνωστικό δείκτη, παρότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα στην βιβλιογραφία. Υπάρχουν αρκετές πιθανές εξηγήσεις. Πρώτα από όλα, η ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης του όγκου με την MVD είναι δύσκολο να συγκριθεί εξαιτίας των διαφορετικών συστημάτων αξιολόγησης και των διαφορετικών αντισωμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί. Η ακριβής μέτρηση της MVD απαιτεί καλή ανοσοχρώση, αντιπροσωπευτικό ιστό του όγκου, σχετικά σταθερή έκταση του πεδίου που εκτιμάται και αρκετή εμπειρία στην ιστοπαθολογία του όγκου. Επιπλέον, οι βιολογικές διαδικασίες, όπως αύξηση του όγκου και μετάσταση, ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλοεπιδράσεων διαφόρων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων αγγειογενετικών, αυξητικών, κινητικότητας και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Τέλος, η ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να επάγουν την αγγειογένεση δεν σχετίζεται πάντα με την κακοήγη δυναμική τους και δεν είναι σαφές εάν η αύξηση του όγκου, η μετάσταση και η κλινική εξέλιξη του εξαρτώνται μόνο από την αγγειογένεση¹⁹².

5.5 Εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας με το δείκτη CD105

Η ενδογλίνη (CD-105) είναι ένας υποδοχέας του μορίου transforming growth factor-β1 (TGF-β1), ο οποίος εκφράζεται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που συμμετέχουν στην αγγειογένεση του όγκου, ενώ η έκφρασή του είναι ασθενής ή αρνητική στο ενδοθήλιο των αγγείων φυσιολογικών ιστών. Επομένως, η MVD που εκτιμάται με το δείκτη CD105 ανιχνεύει τα νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία και αποτελεί έναν περισσότερο υποσχόμενο δείκτη από ότι οι υπόλοιποι ενδοθηλιακοί δείκτες. Έχει ήδη βρεθεί ότι είναι ένας σημαντικός δείκτης επιβίωσης σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, χωρίς ακόμα ο βιολογικός του ρόλος να είναι πλήρως γνωστός. Στο καρκίνωμα του μαστού, του εντέρου και του ενδομητρίου περιγράφονται σημαντικές συσχετίσεις με φτωχή επιβίωση^{171,226}.

Ο Ding και συνεργάτες (2006)²²⁹ εκτίμησαν την MVD με τους δείκτες CD34 και CD105 σε 15 περιπτώσεις χρόνιας ηρεμούσας γαστρίτιδας, 15 ατροφικής γαστρίτιδας, 10 υπερπλαστικούς πολύποδες και 50 γαστρικά καρκινώματα. Στις καλοήθεις αλλοιώσεις, τα μικρά αγγεία του χορίου εξέφραζαν έντονα τον δείκτη CD34, ενώ ασθενώς και σε μικρότερο βαθμό τον δείκτη CD105. Σε βλάβες ηρεμούσας γαστρίτιδας και ατροφικής γαστρίτιδας, τα περισσότερα CD34-θετικά αγγεία ήταν καλοσηματισμένα με αυλό, ενώ η MVD εκτιμώμενη με το δείκτη CD105 ήταν σημαντικά μικρότερη από την MVD με το CD34. Στα γαστρικά

καρκινώματα, η CD34-θετική MVD ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τις γαστρίτιδες. Επίσης, ο δείκτης CD34 αναδείκνυε περισσότερα αγγεία από ότι ο δείκτης CD105. Τα περισσότερα από τα μικρά αγγεία που ήταν θετικά για το CD34 είχαν εμφανείς αυλούς, σε αντίθεση με τα μικρά αγγεία που εξέφραζαν το CD105 τα οποία δεν είχαν αυλούς και φαινόταν να προέρχονται από πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η MVD με το δείκτη CD105 ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης και ήταν σημαντικά ψηλότερη σε ασθενείς με διήθηση αγγείων, απομακρυσμένες μεταστάσεις και ασκίτη. Στην ίδια μελέτη, η MVD εκτιμώμενη με το δείκτη CD105 ή το δείκτη CD34 δεν συσχετίστηκε με την ηλικία των ασθενών, το φύλο, το μέγεθος του όγκου, την εντόπιση, το βαθμό κακοήθειας, τη λεμφική διήθηση και τους ιστολογικούς υποτύπους.

Ο Yu και συνεργάτες (2003)²²⁶ έδειξαν μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της MVD, εκτιμώμενης με το δείκτη CD-105 και της έκφρασης της πρωτεΐνης TGFβ1 σε περιπτώσεις γαστρικών καρκινωμάτων, η οποία πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το CD105 είναι ένας από τους υποδοχείς του TGFβ1. Από την άλλη πλευρά, ο TGFβ1 είναι ένας πιθανός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, καθώς και ένας επαγωγέας της αγγειογένεσης *in vivo*.

5.6 Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί στο γαστρικό καρκίνωμα

5.6.1 COX-2

Η κυκλοξυγενάση (COX) αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί στη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο ισομορφές, οι COX-1 και COX-2. Η COX-1 εκφράζεται σε πολυάριθμους ιστούς και θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, ενώ η COX-2 επάγεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως φλεγμονή, καθώς και από διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που παράγονται από νεοπλασματικά κύτταρα. Φυσιολογικά, ο γαστρικός βλεννογόνος δεν εκφράζει ανιχνεύσιμα επίπεδα της πρωτεΐνης COX-2, σημαντική όμως έκφραση παρατηρείται σε γαστρικά καρκινώματα, καθώς και σε προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις (άτυπη υπερπλασία και εντερική μετάπλαση)²³⁰⁻²³². Τα ευρήματα αυτά στηρίζουν την άποψη ότι η COX-2 εμπλέκεται παθογενετικά στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του γαστρικού καρκινώματος²³³. Επίσης, η COX-2 έχει συσχετισθεί με λεμφαδενικές μεταστάσεις, το βάθος διήθησης, το βαθμό διαφοροποίησης, την πρόοδο του γαστρικού καρκινώματος^{191,199,234,235} και την επιβίωση^{162,235}, αν και μερικές μελέτες^{191,236} δεν επιβεβαιώνουν την τελευταία συσχέτιση. Επιπλέον, έχει περιγραφεί σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της COX-2 με την έκφραση του VEGF-A και την MVD των γαστρικών καρκινωμάτων²³⁶⁻²³⁸. Είναι πιθανό από την προκαλούμενη COX-2 αγγειογένεση να προάγεται η διήθηση και η μετάσταση του καρκινώματος και η πρωτεΐνη να αποτελεί ένα νέο αντι-αγγειογενετικό θεραπευτικό στόχο^{199,239}.

5.6.2 Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP)

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) αποτελούν ένζυμα που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία επιτρέποντας τα νεοπλασματικά κύτταρα να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς. Ειδικότερα η MMP-9 έχει πρωτεολυτική δράση έναντι της λαμίνης-5 και του τύπου IV κολλαγόνου, που αποτελούν κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης. Η MMP-9 φαίνεται να συσχετίζεται με την αγγειογένεση, καθώς και με φτωχή επιβίωση ασθενών με γαστρικό καρκίνωμα¹⁷⁹.

Άλλες δύο μεταλλοπρωτεϊνάσες που έχουν συσχετισθεί με το γαστρικό καρκίνωμα είναι η MMP-1 και MMP-2. Αυξημένη έκφραση της MMP-1 έχει συσχετισθεί με φτωχή πρόγνωση και αυξημένη έκφραση της MMP-2 με περισσότερες λεμφαδενικές μεταστάσεις, βαθύτερη διήθηση και μεγαλύτερο μέγεθος όγκου¹⁷⁷.

5.6.3 PTEN

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN συνεισφέρει στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην αναπαραγωγή και στην απόπτωση, καθώς και στη κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων. Χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης PTEN έχει συσχετισθεί με το βάθος διήθησης και την παρουσία μεταστάσεων, καθώς και με το πρότυπο αύξησης και το βαθμό διαφοροποίησης του καρκινώματος του στομάχου. Η έκφρασή του είναι ψηλότερη σε συμπαγείς καλά διαφοροποιημένους και εντερικού τύπου όγκους έναντι φτωχά διαφοροποιημένους και διαχύτου τύπου όγκους. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι απουσία ή μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης PTEN μπορεί να διευκολύνει τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινωμάτων, μειώνοντας την κυτταρική προσκόλληση, διεγείροντας τη σύνθεση μεταλλοπρωτεϊνών και VEGF-A και επομένως την αγγειογένεση του όγκου. Στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση έχει περιγραφεί μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN και της MVD^{199, 240,241}.

5.6.4 Θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1)

Η TSP-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Λειτουργεί ως διεγέρτης ή αναστολέας της αγγειογένεσης ανάλογα με το όργανο και τη συγκέντρωσή της. Η πρωτεΐνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την αγγειογένεση, ενώ σε υψηλές τη διεγείρει. Περιγράφεται έντονη κυτταροπλασματική έκφραση της TSP-1 σε γαστρικά καρκινώματα και θετική συσχέτιση της έκφρασής της με την MVD του όγκου^{199,242}.

5.6.5 Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF).

Ο παράγοντας PD-ECGF εκφράζεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα, εντερικού κυρίως τύπου γαστρικών καρκινωμάτων. Έχει περιγραφεί συσχέτιση της έκφρασης του PD-ECGF με την έκφραση του VEGF-A και την MVD^{202,243}.

5.6.6 Αγγειοποιητίνες

Οι αγγειοποιητίνες -1 και -2 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε γαστρικά καρκινώματα^{244,245}. Η αγγειοποιητίνη-2 επάγει την αγγειογένεση των όγκων παρουσία VEGF-A²⁴⁶.

5.6.7 Ιντεγκρίνη β3

Περιγράφεται έντονη έκφραση του mRNA της ιντεγκρίνης β3 σε περιπτώσεις γαστρικού καρκινώματος και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φτωχής διαφοροποίησης, με διήθηση του ορογόνου, λεμφαδενικές και ηπατικές μεταστάσεις, καθώς και με περιτοναϊκή διασπορά. Επίσης, η έκφραση της ιντεγκρίνης β3 έχει συσχετισθεί με την MVD και την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A. Η ιντεγκρίνη β3 επιτρέπει στην πρωτεΐνη VEGF-A να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης των VEGFR-2 και VEGFR-3. Αυτή η συνεργική δράση της ιντεγκρίνης β3 και της πρωτεΐνης VEGF-A στην αγγειογένεση του όγκου οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διήθηση και μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων. Υποστηρίζεται ότι η έκφραση της ιντεγκρίνης β3, του VEGF-A, καθώς και MVD \geq 54.9, είναι δείκτες φτωχής πρόγνωσης του καρκινώματος του στομάχου²⁴⁷.

5.6.8 E-καντχερίνη και β-κατενίνη

Η έκφραση της E-καντχερίνης (E-cadherin) και της β-κατενίνης (β-catenin) σε καρκινώματα στομάχου έχει συσχετισθεί με απουσία μεταστάσεων σε περιοχικούς λεμφαδένες και απομακρυσμένα όργανα, αντίστοιχα και επομένως με ευνοϊκή κλινική πορεία της νόσου. Έκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών παρατηρείται κυρίως σε πρώιμα στάδια γαστρικού καρκινώματος, κυρίως εντερικού τύπου¹⁹⁴.

5.6.9 Ιντερλευκίνη (IL)-8.

Η IL-8 είναι μια πολυλειτουργική κυτοκίνη που επάγει την αγγειογένεση. Περιγράφεται έκφραση του IL-8 mRNA στις περισσότερες σειρές γαστρικών καρκινωμάτων. Επιπλέον, βρέθηκε υψηλότερη έκφραση της IL-8 (mRNA και πρωτεΐνης) σε ιστό από καρκινώματα στομάχου, από ότι στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο και στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων IL-8 mRNA με την MVD, υποδηλώνοντας ένα πιθανό ρόλο της στην αγγειογένεση των γαστρικών καρκινωμάτων^{248,249}. Η παραγωγή IL-8 στο γαστρικό βλεννογόνο αυξάνει σημαντικά μετά από λοίμωξη με το H.P., ενώ η εκρίζωση του H.P. συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων της^{249,250}.

5.7 Ο ρόλος του p53 στην αγγειογένεση του γαστρικού καρκινώματος

Στις μέχρι τώρα μελέτες, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης του μεταλλαγμένου γονιδίου p53 (P53) κυμαίνεται από 4% έως 60%²⁵¹ και είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης των καρκινωμάτων του στομάχου^{151,163,252-255}. Επιπλέον, αυτή έχει συσχετισθεί με το στάδιο της νόσου, το μέγεθος του όγκου και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις^{174,225,253-257}, χωρίς όμως οι συσχετίσεις αυτές να επιβεβαιώνονται σε όλες τις μελέτες^{151,163,258}. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 ανευρέθηκαν στο 37% των πρώιμων γαστρικών καρκινωμάτων²⁵⁹ και έκφραση της πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε μεταπλαστικό γαστρικό βλεννογόνο²⁶⁰, ευρήματα τα οποία δείχνουν ότι το p53 πιθανώς να εμπλέκεται στην παθογένεση των πρώιμων σταδίων της καρκινογένεσης του στομάχου^{158,208}. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης P53 συσχετίζεται με φτωχή πρόγνωση των καρκινωμάτων ανεξάρτητα λεμφαδενικών μεταστάσεων, καθώς και με το βάθος διήθησης (pT) του όγκου^{163, 202, 254}.

Το υποξικό περιβάλλον και η γενετική αστάθεια ευνοούν την ανάπτυξη και την εξέλιξη κυτταρικών κλώνων με μη-λειτουργικό p53^{163,261,262}. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αγγειογένεση μπορεί, εν μέρει, να ρυθμιστεί από το γονίδιο p53. Η απώλεια της λειτουργίας του επάγει την αγγειογένεση με διπλό τρόπο. Πρώτον, επάγει την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως της πρωτεΐνης VEGF-A (μέσω της πρωτεϊνικής κίνησης C²⁶¹) και της COX-2²⁶³ και δεύτερον, μειώνει την παραγωγή παραγόντων που αναστέλλουν την αγγειογένεση, όπως της TSP-1. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται απορύθμιση και στα δύο σκέλη της ζυγαριάς που ρυθμίζει την αγγειογένεση με το γονίδιο p53 να αποτελεί ένα δυνητικό διεγέρτη της αγγειογένεσης¹⁹². Αντίθετα, η λειτουργική πρωτεΐνη ελαττώνει την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A²⁶⁴.

Στα καρκινώματα του στομάχου περιγράφονται συσχετίσεις μεταξύ του μεταλλαγμένου γονιδίου p53, της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A και της MVD. Μελέτες έδειξαν ότι η MVD είναι ψηλότερη σε όγκους που εκφράζουν ανοσοϊστοχημικά τόσο την πρωτεΐνη VEGF-A όσο και την μη λειτουργική p53^{151,155,163,207,265-268}. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υποστηρίζεται σε όλες τις μελέτες η άποψη ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 επάγουν την αγγειογένεση μέσω επαγωγής της έκφρασης του VEGF-A¹⁶³. Άλλωστε δεν λείπουν και οι μελέτες στις οποίες δεν ανευρέθηκαν συσχετίσεις της έκφρασης της πρωτεΐνης P53 με την πρωτεΐνη VEGF-A και την MVD^{192,207,258}.

Η γνώση της λειτουργικής κατάστασης του γονιδίου p53 και της αγγειογένεσης μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία. Πράγματι, απενεργοποίηση του γονιδίου p53 είτε από μεταλλάξεις είτε από διαγραφή συχνά έχει ως αποτέλεσμα ανθεκτικότητα του όγκου σε αντινεοπλασματικά φάρμακα. Βρέθηκε ότι p53-αρνητικά και VEGF-θετικά καρκινώματα απαντούν καλύτερα στην χημειοθεραπεία με 5-fluorouracil και cisplatin και ότι οι ασθενείς παρουσιάζουν μακρύτερη επιβίωση μετά από adjuvant χημειοθεραπεία^{269,270}. Σε συμφωνία με αυτές τις παρατηρήσεις, ο Fondevila και συνεργάτες (2004)¹⁶³ διαπίστωσαν ότι η χημειοθεραπεία ήταν λιγότερο αποτελεσματική σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι εξέφραζαν την πρωτεΐνη P53, ενώ η MVD και η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A δεν είχαν καμία προγνωστική αξία.

5.8 Αγγειογένεση και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Ο Ikeguchi και συνεργάτες (1999)¹⁵³ περιέγραψαν θετική συσχέτιση της έκφρασης του δείκτη Ki-67 του όγκου με την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A. Η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε από τον Mattioli και συνεργάτες (2007)²⁷¹, οι οποίοι όμως βρήκαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πρωτεΐνης VEGF-A με τις πρωτεΐνες pRb2/p130 και p21WAF1, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Άλλες μελέτες βρήκαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αγγειογενίνης και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67²⁷², καθώς και μεταξύ της πρωτεΐνης c-H-ras p21 με τον VEGF-A, καθώς και την MVD²⁷³.

Ακόμη, στη βιβλιογραφία απαντώνται αρκετές μελέτες που αναδεικνύουν αντίστροφη συσχέτιση της αγγειογένεσης με την απόπτωση^{199,227,274-278}.

5.9 Αγγειογένεση και ιστολογικοί τύποι γαστρικού καρκινώματος

Τα εντερικού και διαχύτου τύπου γαστρικά καρκινώματα έχουν διαφορετικό πρότυπο ανάπτυξης και διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Τα εντερικού τύπου έχουν εξωφυτικό πρότυπο ανάπτυξης και συνήθως μεθίστανται στο ήπαρ, ενώ τα διαχύτου τύπου έχουν διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης και δίνουν περιτοναϊκές μεταστάσεις. Επιπλέον, στους δύο αυτούς τύπους διαφέρει και ο αγγειογενετικός φαινότυπος. Τα εντερικού τύπου καρκινώματα εξαρτώνται περισσότερο από την αγγειογένεση συγκρινόμενα με τα διαχύτου τύπου. Εκφράζουν ψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF-A και συσχετίζονται με την MVD^{150,201}. Γαστρικά καρκινώματα,

εντερικού τύπου, με ηπατικές μεταστάσεις εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό αγγείων και ψηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A από ότι όγκοι με περιτοναϊκή διασπορά¹⁵⁰. Επίσης, η έκφραση της πρωτεΐνης bFGF είναι ψηλότερη σε εντερικού τύπου όγκους από ότι σε διαχύτου τύπου¹⁵⁰. Αντιθέτως, η έκφραση της πρωτεΐνης FGF-2 είναι ψηλότερη σε διαχύτου τύπου καρκινώματα, ειδικά σκιρρώδους τύπου^{275,279}. Γενικά επικρατεί η άποψη ότι οι διαδικασίες της αύξησης και της μετάστασης στα εντερικού τύπου γαστρικά καρκινώματα εξαρτώνται περισσότερο από την αγγειογένεση από ότι στα διαχύτου τύπου¹⁵⁰.

5.10 Αγγειογένεση και δενδριτικά κύτταρα (DCs)

Τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) επάγουν ειδικές ανοσολογικές απαντήσεις στην περιοχή της νεοπλασίας. Έχει βρεθεί μειωμένος αριθμός DCs σε φτωχότερης πρόγνωσης γαστρικά καρκινώματα και επιπλέον σε δύο μελέτες διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των DCs είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης^{188,280}. Επίσης, αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη VEGF-A αναστέλλει τη λειτουργική ωρίμανση των CD34 θετικών πρόδρομων κυττάρων. Έτσι, η πρωτεΐνη VEGF-A σχετίζεται με την εξέλιξη του νεοπλάσματος όχι μόνο διεγείροντας την αγγειογένεση αλλά επίσης επιτρέποντας στους όγκους να διαφύγουν από τον έλεγχο του ανοσολογικού συστήματος. Ουσιαστικά, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του αριθμού των DCs και της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF²⁸⁰.

5.11 Ο ρόλος των μαστοκυττάρων στην αγγειογένεση

Η συσσώρευση μαστοκυττάρων γύρω από ένα νεόπλασμα φαίνεται να συντελεί στην αύξηση του όγκου μέσω των προϊόντων αποκοκκίωσης τους. Με την αποκοκκίωση, απελευθερώνονται ουσίες, όπως η ηπαρίνη και η ισταμίνη, καθώς και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων ο bFGF και ο VEGF, που επάγουν την αγγειογένεση και επομένως την αύξηση του όγκου και το μεταστατικό του δυναμικό. Άλλωστε και τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα προσελκύουν μαστοκύτταρα εκκρίνοντας τον παράγοντα κινητοποίησης των μαστοκυττάρων (chemoattractants)¹⁹⁹. Έχει ανιχνευθεί αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων στο γαστρικό καρκίνωμα σε σχέση με το φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο. Τα μαστοκύτταρα, τα περισσότερα από αυτά αποκοκκιωμένα, γειτνιάζουν με περιοχές νεοαγγείωσης. Ο αριθμός τους συσχετίζεται σημαντικά με το βάθος διήθησης, τις

λεμφαδενικές μεταστάσεις, τη λεμφική και την αγγειακή διήθηση, το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, καθώς και την MVD²⁰⁴.

5.12 Ο ρόλος των σχετιζόμενων με τον όγκο μακροφάγων (Tumor-Associated Macrophages, TAMs) στην αγγειογένεση

Η διήθηση του στρώματος του γαστρικού καρκινώματος από μακροφάγα (TAMs) συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με το βάθος διήθησης του όγκου, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και το κλινικό στάδιο της νόσου. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν τα TAMs και στην αγγειογένεση, εκκρίνοντας παράγοντες, όπως ο VEGF-A, η IL-8, ο FGF2 και ο PD-ECGF. Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης της COX-2 σε μακροφάγα συσχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A και την MVD σε γαστρικά καρκινώματα. Επιπλέον, οι παράγοντες MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) και συνδέτης CD40L φάνηκε να έχουν συνεργιστική δράση στην έκφραση της COX-2 και κατά συνέπεια την παραγωγή της πρωτεΐνης VEGF-A από τα μακροφάγα σε γαστρικά καρκινώματα²⁸¹⁻²⁸³.

5.13 Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και αγγειογένεση

Υπάρχουν διάφορα γονίδια του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*, H.P.) που συσχετίζονται με την τοξικότητα του βακτηριδίου, όπως *cagA*, *vacA*, *iceA* και *babA*²⁸⁴. Τα *cagA*-θετικά στελέχη ανευρίσκονται συχνότερα σε περπτώσεις με σοβαρή γαστρίτιδα και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκινώματος^{250,285-287}.

Βρέθηκε ότι συγκαλλιέργεια κυττάρων καρκινώματος στομάχου και H.P. επάγει την παραγωγή IL-8, VEGF-A, αγγειογενίνης, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) και MMP-9 από τα νεοπλασματικά κύτταρα²⁸⁵.

Διήθηση του φυσιολογικού και του νεοπλασματικού ιστού από τον H.P. προκαλεί μια ισχυρή φλεγμονώδη απάντηση που ευνοεί την καρκινογένεση²⁸⁸. Το H.P. είναι ένας δυναμικός ενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του NF-κB επάγει μια ποικιλία κυτταροκινών, αγγειογενετικών παραγόντων, MMPs και μορίων προσκόλλησης^{289,290}. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη του Wu και συνεργατών (2005)²⁸⁶, στην οποία το H.P. φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του VEGF-A και της MMP-9 μέσω

του COX-2- και του NF-κB. Σε καρκινώματα του στομάχου που συνυπάρχει λοίμωξη με το H.P. παρατηρείται μεγαλύτερη τιμή MVD από αυτή που ανευρίσκεται μετά από εκρίζωση του βακτηριδίου²⁹¹. Το εύρημα αυτό δείχνει μια πιθανή συσχέτιση της λοίμωξης με την αγγειογένεση.

5.14 Μικρομετάσταση και αγγειογένεση

Στα καρκινώματα του στομάχου περιγράφονται μικρομεταστάσεις στο μυελό των οστών οι οποίες συσχετίζονται με την αγγειογένεση του πρωτοπαθούς όγκου, όπως αυτή εκφράζεται από την τιμή της MVD²²⁸ και την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A^{292,293}. Η επιβίωση των ασθενών με μικρομεταστάσεις στο μυελό των οστών είναι μικρότερη από αυτή των ασθενών που δεν παρουσιάζουν μικρομεταστάσεις. Μικρομεταστάσεις έχουν ανευρεθεί ακόμα και σε ασθενείς με ενδοβλεννογόνο γαστρικό νεόπλασμα, επομένως διασπορά νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να συμβεί ακόμα και σε πρώιμα στάδια του όγκου^{199,292,294}.

Έχει περιγραφεί παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων (μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση για κυτοκερατίνη) στο μυελό των οστών στο 53% των ασθενών με γαστρικό καρκίνωμα κατά τη στιγμή της εκτομής του πρωτοπαθούς όγκου²⁹⁴. Η ασυμφωνία μεταξύ κλινικής εκδήλωσης οστικών μεταστάσεων και μικρομεταστάσεων του μυελού των οστών μπορεί να εξηγηθεί μόνο εάν θεωρηθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση αδράνειας. Φαίνεται ότι η παρουσία μικρομεταστάσεων στο μυελό των οστών αντιπροσωπεύει ένα δείκτη γενικής διασποράς των νεοπλασματικών κυττάρων ή ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου και είναι ανεξάρτητη της έναρξης μεταστατικής νόσου στο σκελετικό σύστημα⁷¹. Αν και σε αρκετές μελέτες περιγράφεται συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A του πρωτοπαθούς όγκου και των μικρομεταστάσεων του μυελού των οστών, η σημασία αυτών των ευρημάτων δεν έχει πλήρως διερευνηθεί^{71,146,199,228,292-294}.

5.15 Αντιαγγειογενετική θεραπεία του γαστρικού καρκινώματος

Εφόσον η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A του όγκου συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο της νόσου και φτωχή πρόγνωση, η αναστολή της αποτελεί μια λογική στρατηγική θεραπείας. Το Bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον VEGF-A, ενώ το Ramucirumab στοχεύει τον υποδοχέα του VEGFR-2^{72,295,296}.

Ο Kanai και συνεργάτες²⁹⁷ έδειξαν ότι το αντι-VEGF αντισώμα αναστέλλει τόσο την αύξηση του πρωτοπαθούς όγκου όσο και τις μεταστάσεις σε μοντέλα ποντικών στα οποία είχαν εμφυτευθεί καρκινωματώδη κύτταρα στομάχου. Η αντιογκογόνος δράση του αντι-VEGF αντισώματος σε ανθρώπινα γαστρικά καρκινώματα οφείλεται στην προκαλούμενη ήπια υποξία, η οποία ακολουθείται από απόπτωση, γεγονότα τα οποία δεν επηρεάζουν την έκφραση του VEGF mRNA των καρκινωμάτων^{146,298}.

Τα τελευταία χρόνια υπήρχε πρόοδος στη διάγνωση και στη θεραπεία των γαστρικών καρκινωμάτων. Πλέον, η πρόγνωση των ασθενών με επιφανειακό γαστρικό καρκίνωμα είναι ευνοϊκότερη, αλλά και αυτών με προχωρημένα στάδια της νόσου, αν και το ποσοστό θνησιμότητας δεν έχει αλλάξει σημαντικά. Το ποσοστό θνησιμότητας εξαρτάται κυρίως από την διασπορά του όγκου μέσω των λεμφαγγείων και των αιμοφόρων αγγείων, που οδηγεί σε συστηματική μεταστατική νόσο¹⁷³.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ο VEGF-A εκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα των αδеноκαρκινωμάτων του στομάχου, στα οποία συχνά συνεκφράζονται και οι υποδοχείς του, VEGFR-1 και VEGFR-2, καθώς και θετική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-A με την MVD των καρκινωμάτων. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα όσον αφορά την προγνωστική αξία της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2 και της MVD στα αδеноκαρκινώματα του στομάχου είναι αντιφατικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν: 1) η ανοσοϊστοχημική έκφραση της αγγειογενετικής πρωτεΐνης VEGF-A και των υποδοχέων της VEGFR-1 και VEGFR-2, 2) η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες CD34 (MVD-CD34) και CD105 (MVD-CD105) και 3) η έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου p53 και Ki-67 σε 145 αδеноκαρκινώματα στομάχου. Τα ευρήματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική πορεία των ασθενών. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση παθογενετικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται οι VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2 και της προγνωστικής αξίας της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών και της MVD στα καρκινώματα του στομάχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικό και μέθοδοι

2.1 Υλικό

2.1.1 Συλλογή δειγμάτων

Το υλικό αποτέλεσαν 145 περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου, οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και διαγνώστηκαν μεταξύ 09/1986 και 06/2007. Η επιλογή έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκές βιοπτικό υλικό, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Όλα τα περιστατικά είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και είχαν εγκλεισθεί σε μπλοκ παραφίνης, από τα οποία παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 3 χιλιοστών. Μια ιστολογική τομή χρωματίστηκε με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H+E) και χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική επανεκτίμηση.

Τα αδενοκαρκινώματα του στομάχου ταξινομήθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου που προτείνει η American Joint Committee on Cancer (AJCC) και η International Union against Cancer (IUCC), 7^η έκδοση (2012).

2.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι 65/145 ασθενείς είχαν θεραπευτεί και παρακολουθηθεί στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και ήταν δυνατή η ανεύρεση του ιατρικού τους φακέλου και η καταγραφή κλινικών παραμέτρων και της επιβίωσης. Η παρακολούθηση των ασθενών κυμαινόταν από 1 έως 200 μήνες (μέσος όρος 37.15; S.D. 38.13 μήνες). Η περίοδος επιβίωσης υπολογίστηκε από το μήνα της επέμβασης έως το μήνα του θανάτου ή της τελευταίας επιβεβαίωσης ότι ο ασθενής ήταν ζωντανός.

Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των 145 ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά		
Ηλικία (mean \pm S.D., year)	65 \pm 11.52	
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	93/52	
	Αριθμός περιπτώσεων	Ποσοστό (%)
T στάδιο		
T1a	6/124	5
T1b	10/124	8
T2	60/124	48
T3	42/124	34
T4	6/124	5
Λεμφαδενικές μεταστάσεις		
N0	38/138	27
N1	59/138	43
N2	26/138	19
N3	15/138	11
Άλλες μεταστάσεις		
Negative	57/65	88
Positive	8/65	12
Στάδιο κατά τη διάγνωση		
IA	6/124	5
IB	22/124	18
IIA	32/124	26
IIB	28/124	22
IIIA	16/124	13
IIIB	10/124	8
IIIC	2/124	2
IV	8/124	6
Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας		
Grade 1	9/145	6
Grade 2	41/145	28
Grade 3	95/145	66
Ταξινόμηση κατά Lauren		
Εντερικού τύπου	74/145	51
Διαχύτου τύπου	56/145	39
Μεικτού τύπου	15/145	10
Αγγειακή διήθηση		
Αρνητική	91/145	63
Θετική	54/145	37
Περινευρική διήθηση		
Αρνητική	120/145	83
Θετική	25/145	17
Θέση ανάπτυξης του όγκου		
Εγγύς	8/98	8
Άπω	14/98	14
Έλασσον τόξο	48/98	49
Μείζον τόξο	26/98	27
Αναστόμωση	2/98	2

2.1.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Τα αντισώματα για τις πρωτεΐνες VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2 εφαρμόστηκαν με τη κλασσική μέθοδο της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB Kit, Dako SA, Glostrup, Denmark), ενώ για τις πρωτεΐνες Ki-67, p53, CD34 και CD105 χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο μηχάνημα ανοσοχρώσεων της Ventana (Ventana NEXES; Ventana Strasbourg, France). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος, ο χρόνος επώασης και η αραίωση τους παρατίθεται στον Πίνακα 2.2

Πίνακας 2.2. Πρωτογενή αντισώματα της μελέτης.

Αντίσωμα	Πηγή	Κλώνος	Χρόνος επώασης	Αραίωση
VEGF	Neomarker	VG-1	ολονύκτια	1:80
VEGFR-1 (Flt-1)	Neomarker	Ab-1	ολονύκτια	1:10
VEGFR-2 (Flk-1/KDR)	Neomarker	Ab-1	ολονύκτια	1:10
P53	Dako	DO-7	1 ώρα	Ready-to-use
Ki-67 (MIB-1)	Dako	SP6	1 ώρα	Ready-to-use
CD34	BioGenex	AM236-5M	1 ώρα	Ready-to-use
CD105	Dako	SN6h	1 ώρα	1:50

2.2 Περιγραφή μεθόδων

2.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Χρησιμοποιήθηκε η κλασική μέθοδος της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAbidin Biotin) με το kit Lab Vision Corporation, UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use). Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (παράλειψη της προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος).

Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου:

1. Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση: τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60°C για 18 ώρες. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος ξυλόλης για 30 λεπτά σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C για 20 λεπτά. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης θερμοκρασίας δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθησε η διαδικασία ενυδάτωσης των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους για 30 δευτερόλεπτα X 2 διαδοχικά σε κατιούσα σειρά οινόπνευμάτων (100%, 96%) και τέλος σε αποσταγμένο νερό.

2. Αποκάλυψη του αντιγόνου: πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με νερό βρύσης X3. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέος 10% (630 ml απεσταγμένο νερό και 70 ml κιτρικό οξύ, Buffer for Antigen Retrieval) σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο παραπάνω διάλυμα, ώστε να αναδειχθεί η αντιγονικότητα του ιστού. Εφαρμόστηκαν 2 κύκλοι θέρμανσης εντός του φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 300Watt επί 15 λεπτά για κάθε κύκλο. Το διάλυμα με τα πλακίδια αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά, και ακολούθησε έκπλυση σε αποσταγμένο νερό x3.

3. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης: Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης μετά από ανάμειξη 500ml H₂O₂ (30%) με 50 ml μεθανόλη. Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα για 30' και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (εναλλακτικά, ενστάλαξη 2-3 σταγόνων από το Hydrogen Peroxide Block που παρέχεται έτοιμο στο Kit, και επώαση για 15').

4. Προεπώαση: Ακολούθησε έκπλυση με αποσταγμένο νερό X3 και με διάλυμα TBS για 5' (TBS: Tris Buffer Solution, 20g NaCl, 1.5g Tris σε 2.5 lt dH₂O και pH 7.6). Στη συνέχεια γίνεται ενστάλαξη 2-3 σταγόνων Ultra V Block από το Kit

και τα πλακίδια επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση (δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων του ιστού).

5. Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα: Μετά από έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 5 λεπτά, ακολούθησε ενστάλαξη του πρωτοταγούς αντισώματος σε αραιώση που έχει προσδιοριστεί μετά από χρώσεις. Το χρονικό διάστημα επώασης καθορίστηκε από το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος και τις δοκιμές που προηγήθηκαν και κυμάνθηκε από ώρες μέχρι ολονύκτια επώαση.

6. Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα: Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα TBS για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα το οποίο είναι βιοτινισμένο (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, έτοιμο προς χρήση) για 30'. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε το ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνης συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη- υπεροξειδάση) το οποίο επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση σε TBS για 5 λεπτά X2

7. Προσθήκη χρωμογόνων: Για την προετοιμασία του χρωμογόνου αναμίχθηκαν 20μl DAB (χρωμογόνο, 3,3 τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) σε 1ml από το αντίστοιχο Buffer. Τοποθετήθηκε διάλυμα χρωμογόνου (DAB 0.1% W/V) στις τομές για 3 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε αποσταγμένο νερό για 10 λεπτά, και επίχρωσή τους με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10ml αιματοξυλίνης 100% σε 90ml αποσταγμένου νερού) για 2 λεπτά. Τέλος, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 1 λεπτό.

8. Αφυδάτωση των ιστών: Τέλος τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ανιούσα σειρά οινόπνευμάτων (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες.

2.2.2 Αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για την ανίχνευση των αντιγόνων p53, Ki-67, CD34 και CD105 πραγματοποιήθηκαν σε αυτοματοποιημένο μηχάνημα ανοσοχρώσεων της Ventana (Ventana NEXES; Ventana Strasbourg, France), σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες που το συνοδεύουν.

2.2.3 Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των πρωτεϊνών VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67.

Οι ανοσοχρώσεις εκτιμήθηκαν σε τουλάχιστον 10 επιλεγμένα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (X400) νεοπλασματικού ιστού που εξέφραζαν την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ο αριθμός των ανοσοθετικών νεοπλασματικών κυττάρων διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των νεοπλασματικών κυττάρων που μετρήθηκαν και η έκφραση προσδιορίστηκε ως το επί τοις εκατό ποσοστό των ανοσοθετικών νεοπλασματικών κυττάρων. Για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο σημεία αποκοπής των θετικών από τις αρνητικές περιπτώσεις, τα οποία ορίστηκαν κατά συνθήκη. Έτσι, προσδιορίστηκαν οι περιπτώσεις με υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών, όταν αυτές εξέφραζαν την πρωτεΐνη σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων και σε ποσοστό μεγαλύτερο της διάμεσης τιμής.

Όλες οι ανοσοχρώσεις αξιολογήθηκαν από δύο παρατηρητές.

2.2.4 Εκτίμηση της MVD με τους δείκτες CD34 και CD105.

Η MVD προσδιορίστηκε μετά από καταμέτρηση των CD34 ή CD105 θετικών αγγείων. Σε κάθε περίπτωση εντοπίστηκαν τρεις περιοχές με τη μεγαλύτερη μικροαγγειακή πυκνότητα (γνωστές και ως hot spots) σε μεγέθυνση X100. Σε κάθε μια από τις τρεις αυτές περιοχές μετρήθηκαν τα CD34 ή CD105 θετικά αγγεία σε μεγέθυνση X400. Η μέση τιμή του αριθμού των αγγείων στις τρεις αυτές περιοχές θεωρήθηκε ως η μέση τιμή της μικροαγγειακής πυκνότητας κάθε περίπτωσης. Μεμονωμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμπλέγματα ενδοθηλιακών κυττάρων, με ή χωρίς αυλό, θεωρήθηκαν ως ξεχωριστά αγγεία. Όλα τα περιστατικά αξιολογήθηκαν από δύο παρατηρητές.

2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS έκδοση 17.0.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και της MVD. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος έκφρασης (mean value), η τυπική απόκλιση της τιμής κάθε παραμέτρου (SD, standard deviation – δείκτης που προσδιορίζει πόσο διαφέρουν κατά μέσο όρο οι τιμές της μεταβλητής από το μέσο όρο του συνόλου στο οποίο ανήκουν) καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum- minimum values).

Η διερεύνηση ενδεχομένων συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών έγινε με δύο ελέγχους. Στον πρώτο έλεγχο, οι μεταβλητές ελήφθησαν ως συνεχείς τιμές και χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Spearman (Spearman's correlation coefficient, αριθμητικό μέτρο ή δείκτης του βαθμού συσχέτισης μεταξύ δύο συνόλων τιμών). Στο δεύτερο έλεγχο πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κατάστασης έκφρασης των πρωτεϊνών (θετικές έναντι αρνητικών περιπτώσεων, βάσει 2 ορίων αποκοπής). Δεδομένου ότι οι μεταβλητές στην περίπτωση αυτή είναι δίτιμες κατηγορικές, ένας απλός έλεγχος για την ύπαρξη συσχετίσεων είναι ο χ^2 έλεγχος. Βέβαια υπάρχει το ενδεχόμενο ο έλεγχος αυτός να μη δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρά δείγματα. Έτσι, υπάρχει και ένας άλλος έλεγχος, που δεν επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος, ο ακριβής έλεγχος του Fisher, ο οποίος μπορεί να εντοπίσει αν υπάρχει ανεξαρτησία ή συσχέτιση στα δεδομένα.

Επιπλέον, αναλύθηκαν ενδεχόμενες συσχετίσεις δίτιμων τιμών (θετικές-αρνητικές περιπτώσεις) με συνεχείς μεταβλητές με τη χρήση του ελέγχου Kruskal-Wallis.

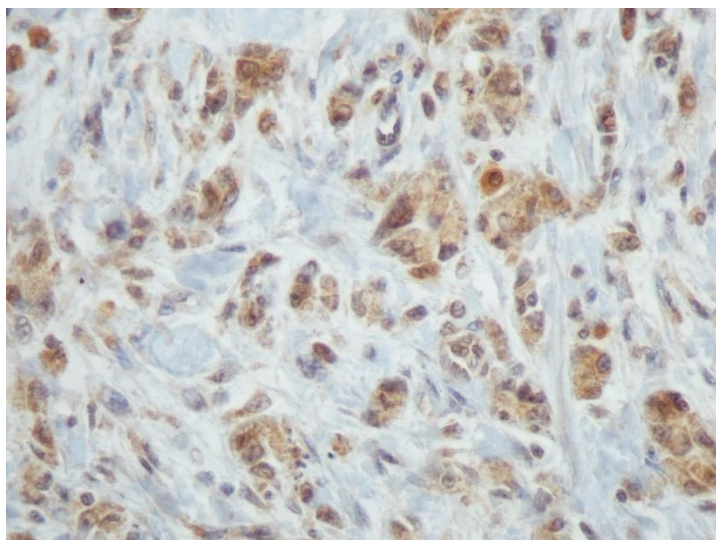
Η επιβίωση των ασθενών εκτιμήθηκε ως το μεσοδιάστημα μεταξύ της ημερομηνίας διάγνωσης και θανάτου ή της τελευταίας επίσκεψης του ασθενούς στο νοσοκομείο, υπολογιζόμενη με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για τη συσχέτιση μεταξύ των καμπυλών επιβίωσης, καθώς και των άλλων μεταβλητών με την επιβίωση πραγματοποιήθηκε έλεγχος Log-rank. Οι πολυπαραγοντικές αναλύσεις των προγνωστικών παραγόντων έγιναν με το μοντέλο COX.

Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

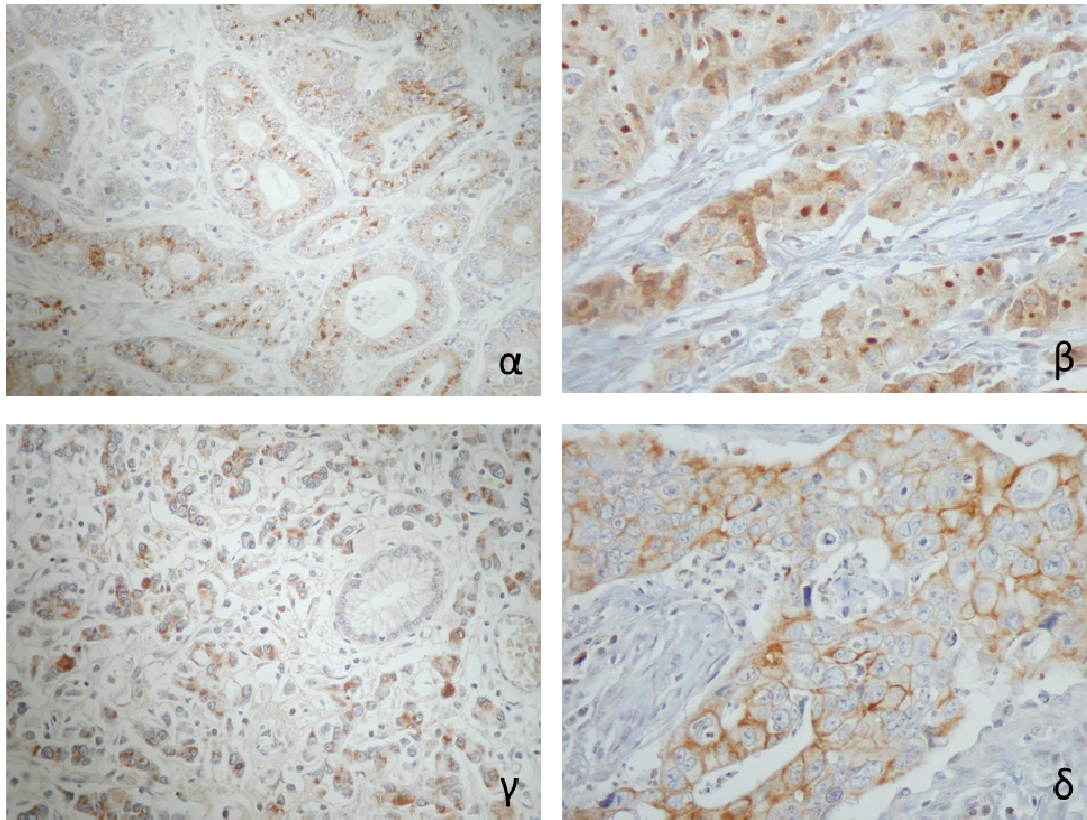
3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 στα νεοπλασματικά κύτταρα καρκινωμάτων του στομάχου

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A παρατηρήθηκε σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα. Αυτή ήταν κοκκιώδης, κυτταροπλασματική και εμφάνιζε ετερογένεια στην κατανομή και διακυμάνσεις στην ένταση (Εικόνα 3.1). Επιπλέον, έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε λείες μυϊκές ίνες, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας για την αξιολόγηση της χρώσης. Τα βασικά στατιστικά χαρακτηριστικά της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A στα νεοπλασματικά κύτταρα του γαστρικού καρκινώματος παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1.



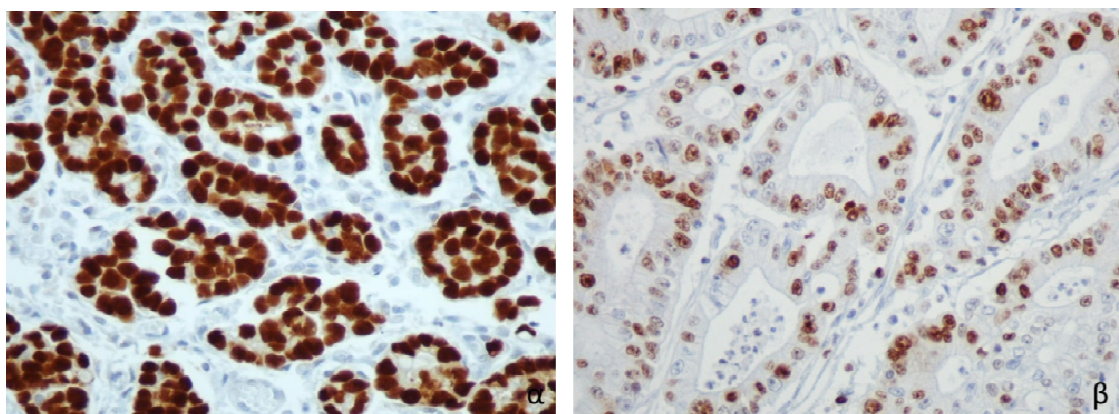
Εικόνα 3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A σε νεοπλασματικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του στομάχου (x400).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1 (Flt-1) (Εικόνα 3.2 α και β) και VEGFR-2 (Flt-1/KDR) (Εικόνα 3.2 γ και δ) παρατηρήθηκε σε νεοπλασματικά και στρωματικά κύτταρα. Αυτή ήταν κοκκιώδης κυτταροπλασματική και εμφάνιζε ετερογένεια στην κατανομή και διακυμάνσεις στην ένταση. Τα βασικά στατιστικά χαρακτηριστικά της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών στα νεοπλασματικά κύτταρα του γαστρικού καρκινώματος παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1.



Εικόνα 3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **VEGFR-1** (α, β) και **VEGFR-2** (γ, δ) σε νεοπλασματικά κύτταρα αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (x400).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53 και Ki-67 ήταν πυρηνική (Εικόνα 3.3 α και β, αντίστοιχα). Οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.



Εικόνα 3.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών **p53** και **Ki-67** σε νεοπλασματικά κύτταρα αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (x400).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1. Βασικές στατιστικές παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 στα νεοπλασματικά κύτταρα αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου						
	Αριθμός περιπτώσεων	Θετικές περιπτώσεις (%)	Μέση τιμή (%)	Διάμεση τιμή (%)	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή (%)
VEGF-A	145	123/145 (84,8)	39,56	35	33,93	0-98
VEGFR-1	144	127/144 (88,2)	42,1	45	31,14	0-95
VEGFR-2	143	105/143 (73,4)	23,2	8	28,76	0-95
p53	145	104/145 (71,7)	31,57	12	36,4	0-98
Ki-67	145	143/145 (98,6)	43,3	40	27,7	0-99

Παρατηρήθηκε θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A στο 84,8% των περιπτώσεων, της VEGFR-1 στο 88,2%, της VEGFR-2 στο 73,4%, της p53 στο 71,7% και της Ki-67 στο 98,6%.

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% των νεοπλασματικών κυττάρων διαπιστώθηκε ότι 111/145 (76,55%) περιπτώσεις γαστρικών καρκινωμάτων ήταν θετικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A, 113/144 (78,5%) της VEGFR-1, 84/143 (57,9%) της VEGFR-2, 79/145 (54,5%) της p53 και 135/145 (93,1%) της Ki-67 (Πίνακας 3.2).

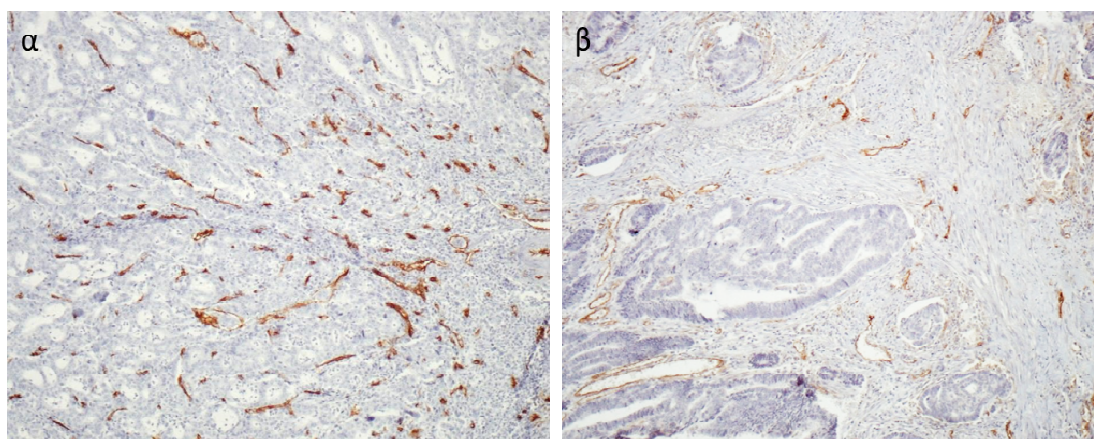
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση (>10% των νεοπλασματικών κυττάρων) των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου			
	Αριθμός περιπτώσεων	Αριθμός θετικών περιπτώσεων	Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)
VEGF-A	145	111	76,55
VEGFR-1	144	113	78,5
VEGFR-2	143	84	57,9
p53	145	79	54,5
Ki-67	145	135	93,1

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας τη διάμεση τιμή της έκφρασης κάθε πρωτεΐνης διαπιστώθηκε ότι 79/145 (54,5%) περιπτώσεις γαστρικών καρκινωμάτων ήταν θετικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A, 75/144 (52,1%) της VEGFR-1, 75/143 (52,4%) της VEGFR-2, 74/145 (51%) της p53 και 76/145 (52,4%) της Ki-67 (Πίνακας 3.3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση (> της διάμεσης τιμής) των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου			
	Αριθμός περιπτώσεων	Αριθμός θετικών περιπτώσεων	Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)
VEGF-A	145	79	54,5
VEGFR-1	144	75	52,1
VEGFR-2	143	75	52,4
p53	145	74	51
Ki-67	145	76	52,4

3.2. Εκτίμηση της Μικροαγγειακής Πυκνότητας με τους δείκτες CD34 και CD105

Η μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density, MVD) αξιολογήθηκε με βάση την ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD34 και CD105 (MVD-CD34 και MVD-CD105). Έκφραση του δείκτη CD34 παρατηρήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα μικρού και μέσου μεγέθους αγγείων του όγκου (Εικόνα 3.4α) και του δείκτη CD105 στα ενδοθηλιακά κύτταρα κυρίως μικρού μεγέθους αγγείων (Εικόνα 3.4β). Στο μη νεοπλασματικό ιστό έκφραση του δείκτη CD34 παρατηρήθηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάλογη έκφραση του δείκτη CD105. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση των δύο αυτών δεικτών σε νεοπλασματικά κύτταρα. Τα βασικά στατιστικά χαρακτηριστικά της MVD παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.4.



Εικόνα 3.4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών **CD34** και **CD105** σε αγγεία αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου (x100).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4. Βασικές στατιστικές παράμετροι των τιμών της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου					
	Αριθμός περιπτώσεων	Μέση τιμή	Διάμεση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη – μέγιστη τιμή
MVD-CD34	145	64,99	60,00	29,51	13,33-206,67
MVD-CD105	145	23,56	19,68	18,44	0-100

3.3 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53, Ki-67 και της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105)

Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν προσδιορίστηκαν υπολογίζοντας τους συντελεστές συσχέτισης r κατά Spearman (συνεχείς μεταβλητές) (Πίνακας 3.5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου (έλεγχος κατά Spearman)		
Ζεύγη παραμέτρων με στατιστικά σημαντική συσχέτιση	Συντελεστής συσχέτισης r	Τιμή p
VEGF-A/ VEGFR-1	0,256	0,002
VEGF-A/ VEGFR-2	0,384	0,046
VEGF-A/ MVD-CD105	0,189	0,024
VEGF-A/p53	0,276	0,045
VEGF-A/ Ki-67	0,359	<0,001
VEGFR-1 / VEGFR-2	0,537	<0,001
MVD-CD105 / Ki-67	0,350	<0,001
MVD-CD105 / p53	0,289	<0,001
MVD-CD105 / MVD-CD34	0,344	<0,001
Ki-67/p53	0.259	0,002

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατά Pearson (Πίνακα 3.6) και προέκυψαν ανάλογες συσχετίσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου (συνεχείς μεταβλητές, έλεγχος κατά Pearson)		
Ζεύγη παραμέτρων με στατιστικά σημαντική συσχέτιση	Συντελεστής συσχέτισης r	Τιμή p
VEGF-A/ VEGFR-1	0,273	0,001
VEGF-A/ VEGFR-2	0,488	0,046
VEGF-A/ MVD-CD105	0,173	0,039
VEGF-A/ p53	0,138	0,057
VEGF-A/ Ki-67	0,362	<0,001
VEGFR-1 / VEGFR-2	0,453	<0,001
MVD-CD105 / Ki-67	0,336	<0,001
MVD-CD105 / p53	0,313	<0,001
MVD-CD105 / MVD-CD34	0,344	<0,001
Ki-67/p53	0,282	0,001

Από τις ανωτέρω αναλύσεις (Spearman και Pearson) προέκυψε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των υποδοχέων VEGFR-1 ($p=0,002$) και VEGFR-2 ($p=0,046$), το p53 ($p=0,045$), τον δείκτη Ki-67 ($p<0,001$) και την MVD-CD105 ($p=0,024$). Η έκφραση του VEGFR-1 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του VEGFR-2 ($p<0,001$). Επιπλέον, θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ της MVD-CD105 και της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 ($p<0,001$), όπως και μεταξύ της MVD-CD105 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p<0,001$). Σημαντικές ήταν ακόμη οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών της MVD-CD105 και της MVD-CD34 ($p<0,001$) και μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών Ki-67 και p53 ($p=0,002$).

Ελέγχθηκαν ακόμη οι συσχετίσεις μεταξύ της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) (συνεχείς τιμές) και της θετικής έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67, χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% και τη διάμεση τιμή της έκφρασης τους (έλεγχος U των Mann-Whitney). Ανεξαρτήτως του κατωτέρου ορίου θετικότητας των πρωτεϊνών, επιπλέον των ανωτέρω συσχετίσεων (Spearman και Pearson), βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της MVD-CD34 με τον VEGFR-2, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του VEGFR-1 και της MVD με το επίπεδο έκφρασης (θετικών έναντι αρνητικών περιπτώσεων) της πρωτεΐνης VEGFR-2 (Mann-Whitney U test)				
	VEGFR-2 ομάδα	Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος	Τιμή p
VEGFR-1	αρνητικό	66	55.36	<0.001
	θετικό	76	90.09	
MVD-CD34	αρνητικό	67	64.98	0.05
	θετικό	76	78.19	

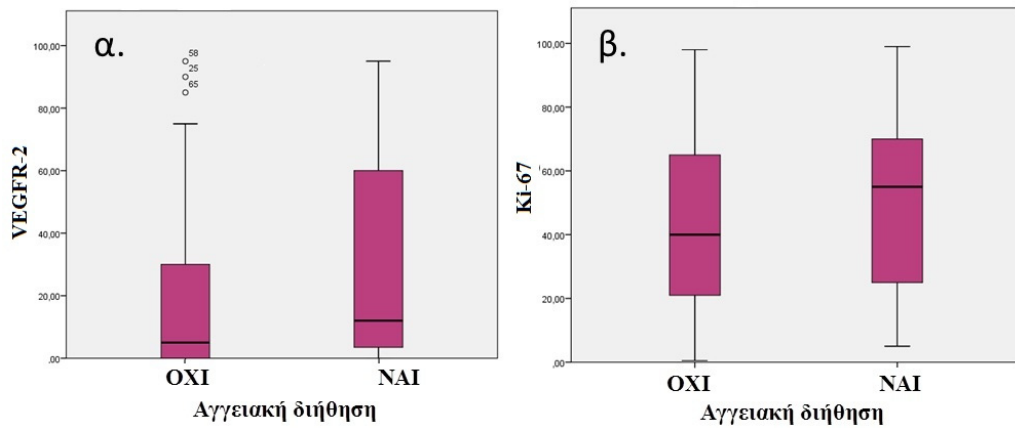
Επεξήγηση. Οι περιπτώσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε θετικές και αρνητικές χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10%

3.4. Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων.

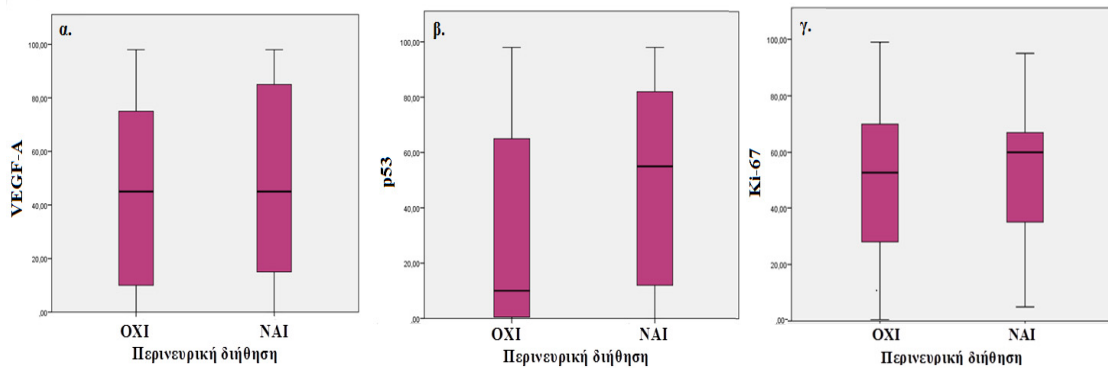
Για την ανεύρεση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 (συνεχείς μεταβλητές) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis. Τα αποτελέσματα του ελέγχου φαίνονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8: Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki 67 και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (έλεγχος Kruskal- Wallis).					
	VEGF-A	VEGFR-1	VEGFR-2	p53	Ki-67
Ατροφία αδενίων	0.731	0.311	0.298	0.379	0.281
Ιστολογικός Τύπος	0.237	0.196	0.131	0.011	0.016
Θέση ανάπτυξης νεοπλασματος	0.063	0.194	0.016	0.005	0.005
Βαθμός κακοήθειας	0.665	0.109	0.457	0.537	0.177
Στάδιο νόσου	0.427	0.781	0.859	0.876	0.320
Εξελκώσεις	0.769	0.491	0.487	0.068	0.090
Εντερική μετάπλαση	0.186	0.227	0.643	0.098	0.340
Παρουσία μεταστάσεων (M)	0.347	0.922	0.788	0.316	0.573
Θετικοί λεμφαδένες (N)	0.475	0.477	0.795	0.908	0.698
Διήθηση λεμφαδένων	0.661	0.205	0.451	0.624	0.365
Βάθος διήθησης όγκου	0.599	0.753	0.174	0.655	0.382
Δυσπλασία παρακείμενου βλεννογόνου	0.324	0.535	0.124	0.041	0.013
Αγγειακή διήθηση	0.528	0.065	0.001	0.148	0.045
Νευρική διήθηση	0.004	0.795	0.315	0.013	<0.001
Νεκρώσεις	0.831	0.357	0.091	0.692	0.416
Παραγωγή βλέννης	0.862	0.865	0.308	0.322	0.067

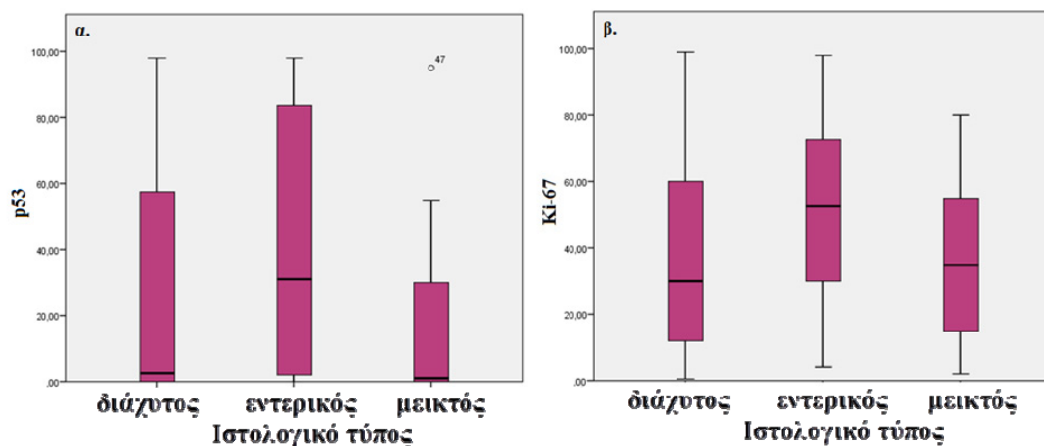
Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα του ελέγχου Kruskal-Wallis παρατίθενται με τη μορφή διαγραμμάτων πλαισίου-απολήξεων (box-plots) στις εικόνες 3.5 έως 3.9.



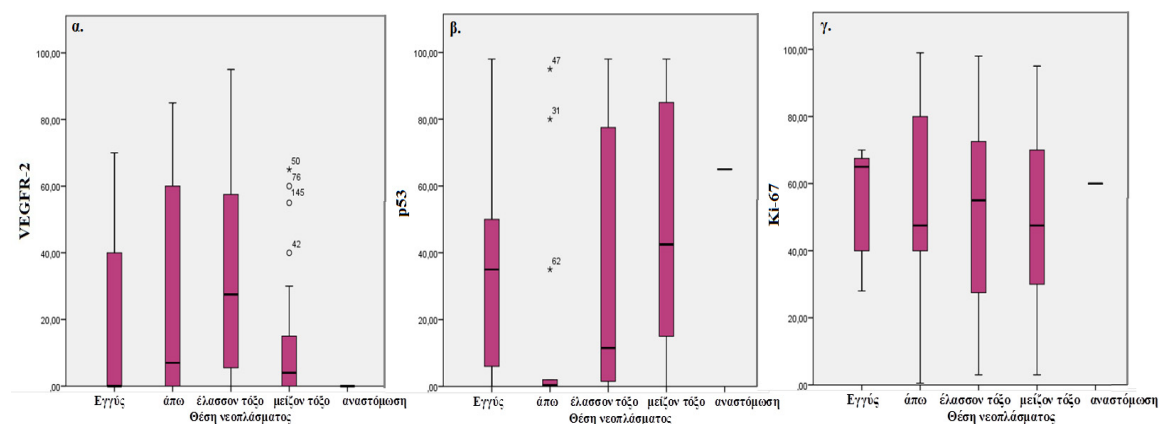
Εικόνα 3.5: Τα διαγράμματα πλαισίου απολήξεων δείχνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-2 (α) και Ki-67 (β) είναι σημαντικά υψηλότερη σε περιπτώσεις καρκινωμάτων με αγγειακή διήθηση ($p=0,001$ και $p=0,045$, αντίστοιχα).



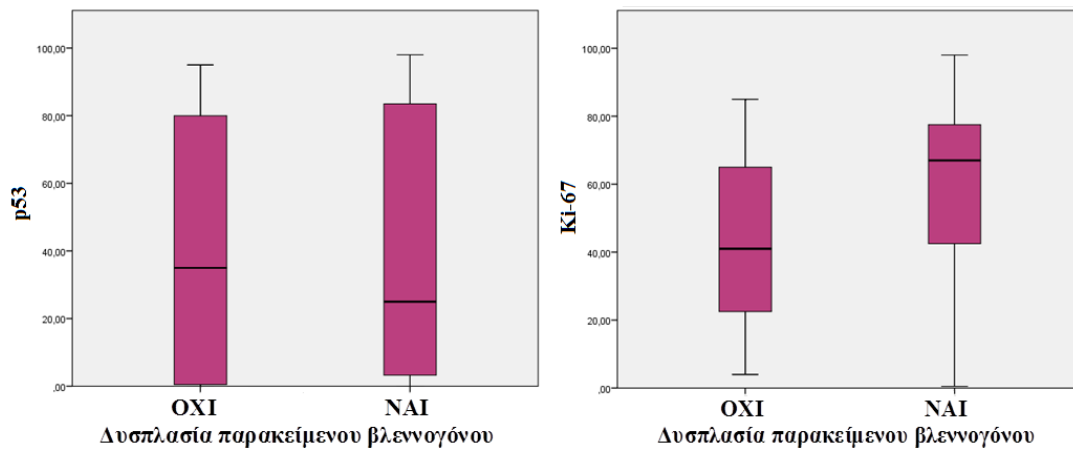
Εικόνα 3.6: Τα διαγράμματα πλαισίου απολήξεων δείχνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A (α), p53 (β) και Ki-67 (γ) είναι υψηλότερη σε περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων με περινευρική διήθηση ($p=0,004$, $p=0,013$ και $p<0,001$, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.7: Τα διαγράμματα πλαισίου απολήξεων δείχνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών p53 (α) και Ki-67 (β) είναι υψηλότερη στα εντερικού τύπου καρκινώματα σε σχέση με τα διαχύτου και τα μεικτού τύπου καρκινώματα ($p=0.011$ και $p=0.013$, αντίστοιχα).



Εικόνα 3.8: Τα διαγράμματα πλαισίου απολήξεων δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών VEGFR-2 (α), p53 (β) και Ki-67 (γ) είναι υψηλότερα σε καρκινώματα που εντοπίζονται στο έλασσον τόξο του στομάχου ($p=0.016$, $p=0.005$ και $p=0.005$, αντίστοιχα), σε σχέση με αυτά που παρουσιάζουν άλλες εντοπίσεις.



Εικόνα 3.9: Τα διαγράμματα πλαισίου απολήξεων δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών p53 (α) και Ki-67 (β) είναι υψηλότερα σε περιπτώσεις με δυσπλασία του παρακείμενου βλεννογόνου ($p=0.041$ και $p=0.013$, αντίστοιχα) σε σχέση με αυτές που δεν υπάρχει.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος U των Mann-Whitney μέσω του οποίου συγκρίθηκαν δύο υποομάδες των κατηγοριοποιημένων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων με τις συνεχείς τιμές της έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67, καθώς και την MVD. Τα αποτελέσματα του ελέγχου φαίνονται στον Πίνακας 3.9.

Πίνακας 3.9: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (έλεγχος U των Mann-Whitney)

			Αριθμός περιπτώσεων	Μέσος όρος	p
VEGF-A	Στάδιο	II	61	36,79	0.041
		IV	8	21,38	
VEGF-A	Βάθος διήθησης	T1a	5	12	0.035
		T2b	43	25,95	
VEGF-A	Βάθος διήθησης	T1	15	25,87	0.05
		T2	53	36,94	
VEGFR-1	Ιστολογικός Τύπος	εντερικός	71	45,42	0.042
		διαχύτου	14	30,75	
VEGFR-1	Αγγειακή διήθηση	NAI	53	55,74	0.05
		OXI	72	68,35	
VEGFR-2	Αγγειακή διήθηση	NAI	53	54,05	0.023
		OXI	71	68,81	
p53	Ιστολογικός Τύπος	εντερικός	72	46	0.035
		διαχύτου	14	30,64	
Ki-67	Δυσπλασία	NAI	23	33,09	0.045
		OXI	32	24,34	
MVD-CD105	Ιστολογικός Τύπος	εντερικός	72	45,7	0.036
		διαχύτου	14	31	
MVD-CD105	Αγγειακή διήθηση	NAI	53	69,79	0.05
		OXI	71	57,06	
MVD-CD105	Περινευρική διήθηση	NAI	25	53,56	0.05
		OXI	64	41,66	

Με τον έλεγχο U των Mann-Whitney βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του VEGF-A και του σταδίου της νόσου (II έναντι IV, $p=0,041$). Η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A ήταν υψηλότερη σε περιπτώσεις με περινευρική διήθηση ($p=0.004$, έλεγχος Kruskal-Wallis) και με μεγαλύτερο βάθος διήθησης (T1a έναντι T1b, $p=0.035$ και T1 έναντι T2, $p=0.05$). Η έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1 και p53, καθώς και η τιμή της MVD-CD105 συσχετίστηκαν με το ιστολογικό τύπο του καρκινώματος, όντας υψηλότερες στα εντερικού τύπου καρκινώματα ($p=0,042$, $p=0,035$ και $p=0,036$, αντίστοιχα). Η έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1, VEGFR-2 και η τιμή της MVD-CD105

συσχετίστηκαν με την παρουσία αγγειακής διήθησης ($p=0,05$, $p=0,023$ και $p=0,05$, αντίστοιχα). Η MVD-CD105 συσχετίστηκε με την περινευρική διήθηση ($p=0.05$) και ο δείκτης Ki-67 με την παρουσία δυσπλασίας στον παρακείμενο βλεννογόνο ($p=0.045$).

Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση πιθανών συσχετίσεων της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67, ως κατηγορικές/μη παραμετρικές τιμές, με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους χρησιμοποιώντας τους ελέγχους ανεξαρτησίας X^2 και Fisher (F). Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακας 3.10.

Πίνακας 3.10: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν (κατώτερο όριο θετικότητας το 10%) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (έλεγχοι X^2 και Fisher)										
	VEGF-A		VEGFR-1		VEGFR-2		p53		Ki-67	
	X^2	F	X^2	F	X^2	F	X^2	F	X^2	F
Ατροφία αδενίων										
Ιστολογικός Τύπος			0,002	0,005			0,007		0,016	0,068
Θέση ανάπτυξης νεοπλάσματος					0,008					
Βαθμός κακοήθειας			0,037							0,098
Στάδιο νόσου	0,007									
Αγγειακή διήθηση					0,045	0,035			0,030	0,032
Νευρική διήθηση							0,06			
Νεκρώσεις										
Γαστρίτιδα					0,035	0,038				

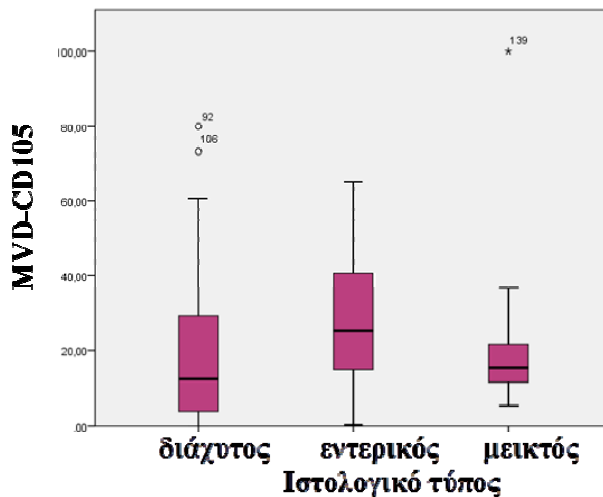
Με τον έλεγχο ανεξαρτησίας X^2 προέκυψε μια επιπλέον συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGFR-1 και του βαθμού κακοήθειας του όγκου ($p=0.037$).

3.5 Συσχετίσεις μεταξύ MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για την ανεύρεση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της τιμής της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) (συνεχείς τιμές) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (μη συνεχείς τιμές). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3.11.

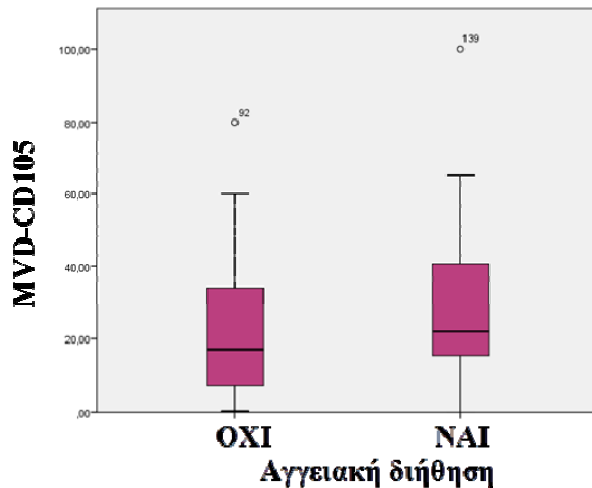
Πίνακας 3.11: Συσχετίσεις μεταξύ MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (έλεγχος Kruskal- Wallis)		
	MVD-CD34	MVD-CD105
Ατροφία αδενίων	0.460	0.534
Ιστολογικός Τύπος	0.236	0.006
Θέση ανάπτυξης νεοπλάσματος	0.876	0.07
Βαθμός κακοήθειας	0.280	0.369
Στάδιο νόσου	0.585	0.560
Εξελκώσεις	0.574	0.460
Εντερική μετάπλαση	0.413	0.09
Παρουσία μεταστάσεων (M)	0.873	0.957
Διήθηση λεμφαδένων	0.352	0.660
Βάθος διήθησης του όγκου	0.479	0.095
Δυσπλασία παρακείμενου βλεννογόνου	0.493	0.364
Αγγειακή διήθηση	0.049	0.05
Νευρική διήθηση	0.218	<0.001
Νεκρώσεις	0.648	0.548
Παραγωγή βλέννης	0.556	0.677

Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων που φαίνεται στην Εικόνα 3.10 δείχνει ότι η τιμή της MVD-CD105 ήταν υψηλότερη σε εντερικού τύπου καρκινώματα από ότι σε διαχύτου ή μεικτά ($p=0.006$). Πιο συγκεκριμένα, συγκριτικά με το διάχυτο τύπο, ο εντερικός έχει τιμές MVD-CD105 μετατοπισμένες προς τα επάνω, ενώ ο μεικτός έχει μικρότερο εύρος τιμών και διάμεση τιμή κοντά στη διάμεση τιμή του διαχύτου.



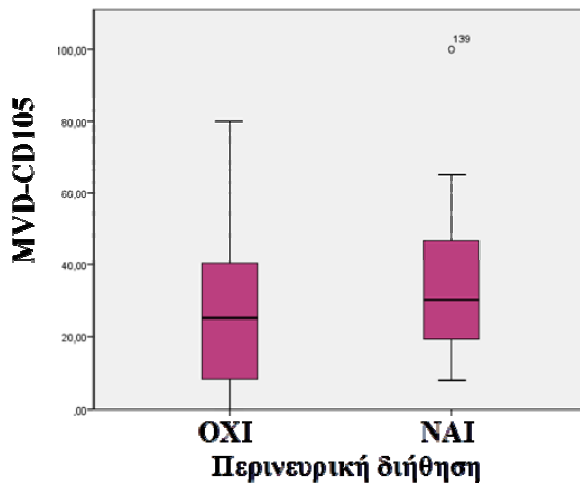
Εικόνα 3.10: Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων (Kruskal- Wallis). Στον κάθετο άξονα φαίνονται οι τιμές της MVD-CD105 και στον οριζόντιο οι ιστολογικοί τύποι του αδενοκαρκινώματος του στομάχου.

Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων που φαίνεται στην Εικόνα 3.11, δείχνει ότι η τιμή της MVD-CD105 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση ($p=0,05$). Παρατηρείται μετατόπιση τιμών προς τα επάνω στις περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση σε σχέση με αυτές που δεν παρουσιάζουν αγγειακή διήθηση.



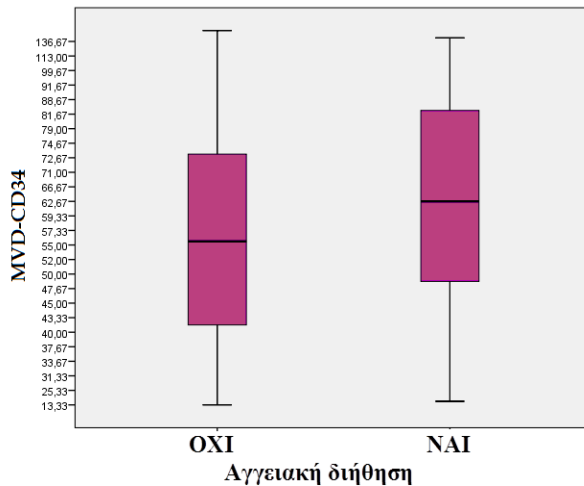
Εικόνα 3.11: Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων (Kruskal- Wallis). Στον κάθετο άξονα φαίνονται οι τιμές της MVD-CD105 και στον οριζόντιο οι ομάδες των περιπτώσεων με και χωρίς αγγειακή διήθηση.

Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων που φαίνεται στην Εικόνα 3.12, δείχνει ότι η τιμή της MVD-CD105 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις με περινευρική διήθηση ($p < 0,001$). Και εδώ παρατηρείται μετατόπιση των τιμών της ομάδας με περινευρική διήθηση προς τα επάνω, καθώς επίσης και μείωση του εύρους των τιμών της σε σχέση με την ομάδα χωρίς περινευρική διήθηση.



Εικόνα 3.12: Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων (Kruskal- Wallis). Στον κάθετο άξονα φαίνονται οι τιμές της MVD-CD105 και στον οριζόντιο οι ομάδες των περιπτώσεων με και χωρίς περινευρική διήθηση.

Το διάγραμμα πλαισίου απολήξεων που φαίνεται στην Εικόνα 3.13, δείχνει ότι η τιμή της MVD-CD34 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση ($p=0,049$). Παρατηρείται μετατόπιση τιμών προς τα επάνω στις περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση σε σχέση με αυτές που δεν παρουσιάζουν αγγειακή διήθηση.

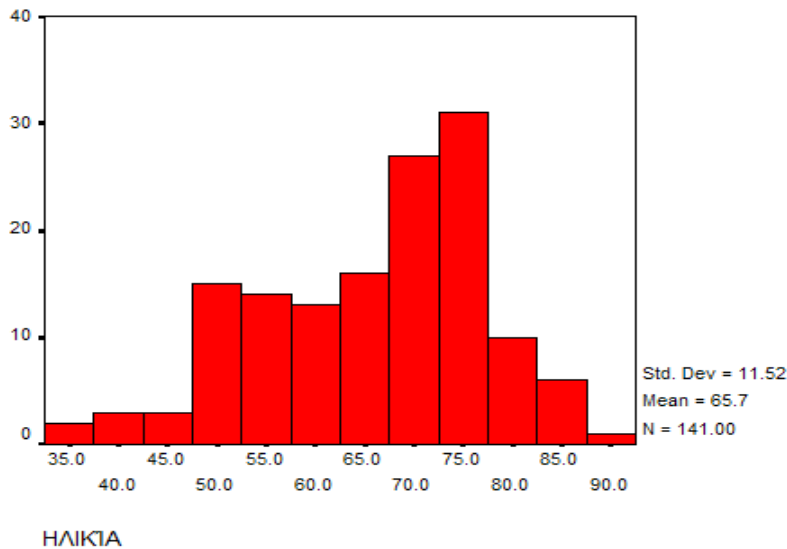


Εικόνα 3.13: Διάγραμμα πλαισίου απολήξεων (Kruskal- Wallis). Στον κάθετο άξονα φαίνονται οι τιμές της MVD-CD34 και στον οριζόντιο οι ομάδες των περιπτώσεων με και χωρίς αγγειακή διήθηση.

Συμπερασματικά, η MVD-CD105 του όγκου φαίνεται να συσχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος, όντας υψηλότερη στα εντερικού τύπου καρκινώματα ($p=0,006$, Kruskal-Wallis και $p=0,036$, U των Mann-Whitney), στις περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση ($p=0,05$, Kruskal-Wallis και $p=0,05$, U των Mann-Whitney) και περινευρική διήθηση ($p<0,001$, Kruskal-Wallis και $p=0,05$, U των Mann-Whitney). Η MVD-CD34 είναι υψηλότερη σε περιπτώσεις με αγγειακή διήθηση ($p=0,049$, Kruskal-Wallis).

3.6 Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67, της MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105), της ηλικίας, του φύλου και της εντόπισης με την επιβίωση των ασθενών.

Η ηλικία των ασθενών ομαδοποιήθηκε για να γίνει πιο εύχρηστη. Δημιουργήθηκε το ιστόγραμμα της ηλικίας των ασθενών (Εικόνα 3.14), όπου διακρίνονται δύο κορυφές, οι οποίες ξεχωρίζουν περίπου στην τιμή 65 και κρίθηκε σωστό η ηλικία να ομαδοποιηθεί με σημείο διαχωρισμού τα 65 έτη.

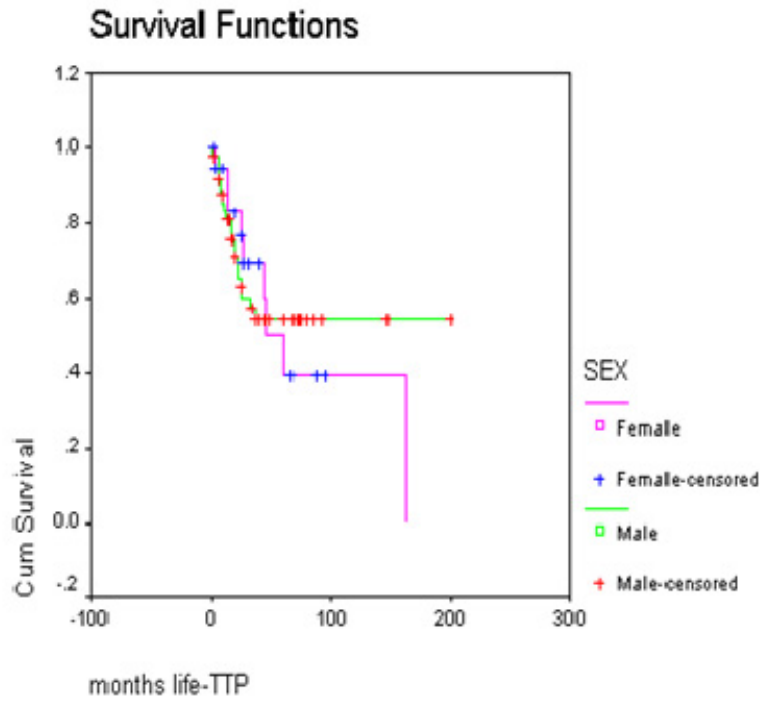


Εικόνα 3.14: Ιστόγραμμα της ηλικίας των ασθενών της μελέτης

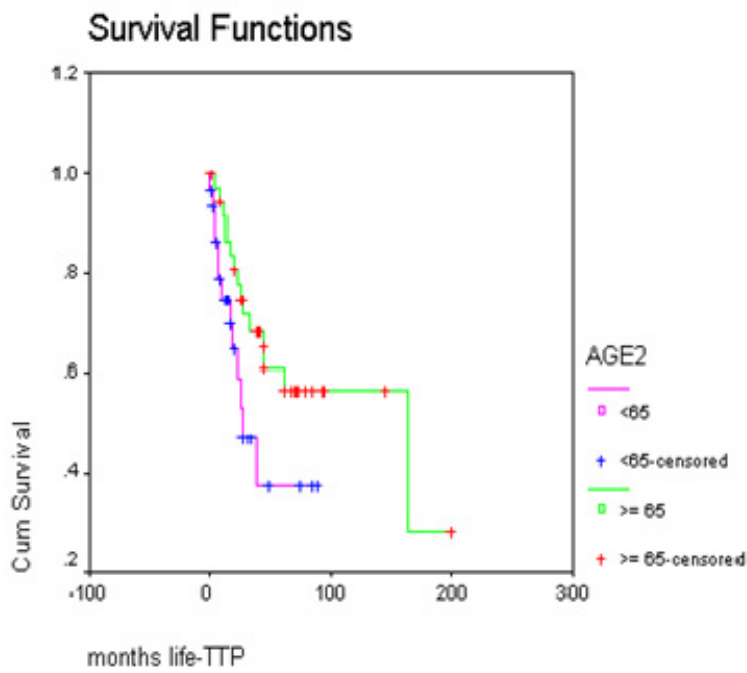
Ελέγχθηκε (έλεγχος Log-rank) εάν η επιβίωση των ασθενών διαφέρει μεταξύ ανδρών και γυναικών και μεταξύ ασθενών ηλικίας μεγαλύτερης και μικρότερης των 65 ετών. Στον Πίνακα 3.12 φαίνονται τα αποτελέσματα των δύο ελέγχων και μερικά περιγραφικά στοιχεία.

Πίνακας 3.12: Συσχέτιση της ηλικίας και του φύλου με την επιβίωση των ασθενών(έλεγχος Log- rank)							
Μεταβλητή		N	% περικ/νες τιμές	Διάμεση τιμή	95% Διάστημα εμπιστοσύνης	εύρος	p
Φύλο	Ανδρες	49	61.22	61	(6,116)	200	0.917
	Γυναίκες	21	57.14	45	(21,69)	160	
Ηλικία	<65	31	58.06	26	(10,42)	88	0.05
	>=65	38	60.53	162	(18,306)	198	

Από τους ελέγχους Log-rank αναδείχθηκε ότι το φύλο δεν επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών, ενώ οι ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 65 ετών ($p=0,005$). Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier όσον αφορά το φύλο και την ηλικία των ασθενών φαίνονται στην εικόνα 3.15).



(α.)



(β.)

Εικόνα 3.15: Γραφήματα των καμπυλών επιβίωσης Kaplan-Meier για το φύλο (α) και την ηλικία (β) των ασθενών.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση (μοντέλο Cox) της συσχέτισης της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 (συνεχείς μεταβλητές) με την επιβίωση έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τις πρωτεΐνες VEGFR-2 και p53 ($p=0,005$ και $p=0,048$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.13).

Πίνακας 3.13: Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 με την επιβίωση των ασθενών (μοντέλο Cox)	
Μεταβλητή	Τιμές p
VEGF-A	0.346
VEGFR-1	0.298
VEGFR-2	0.050
P53	0.048
Ki-67	0.745

Η πολυπαραγοντική ανάλυση (μοντέλο Cox) της συσχέτισης των τιμών της μικροαγγειακής πυκνότητας με την επιβίωση έδειξε ότι η MVD είτε εκτιμώμενη με το δείκτη CD34 είτε με το CD105, δεν σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών (Πίνακας 3.14).

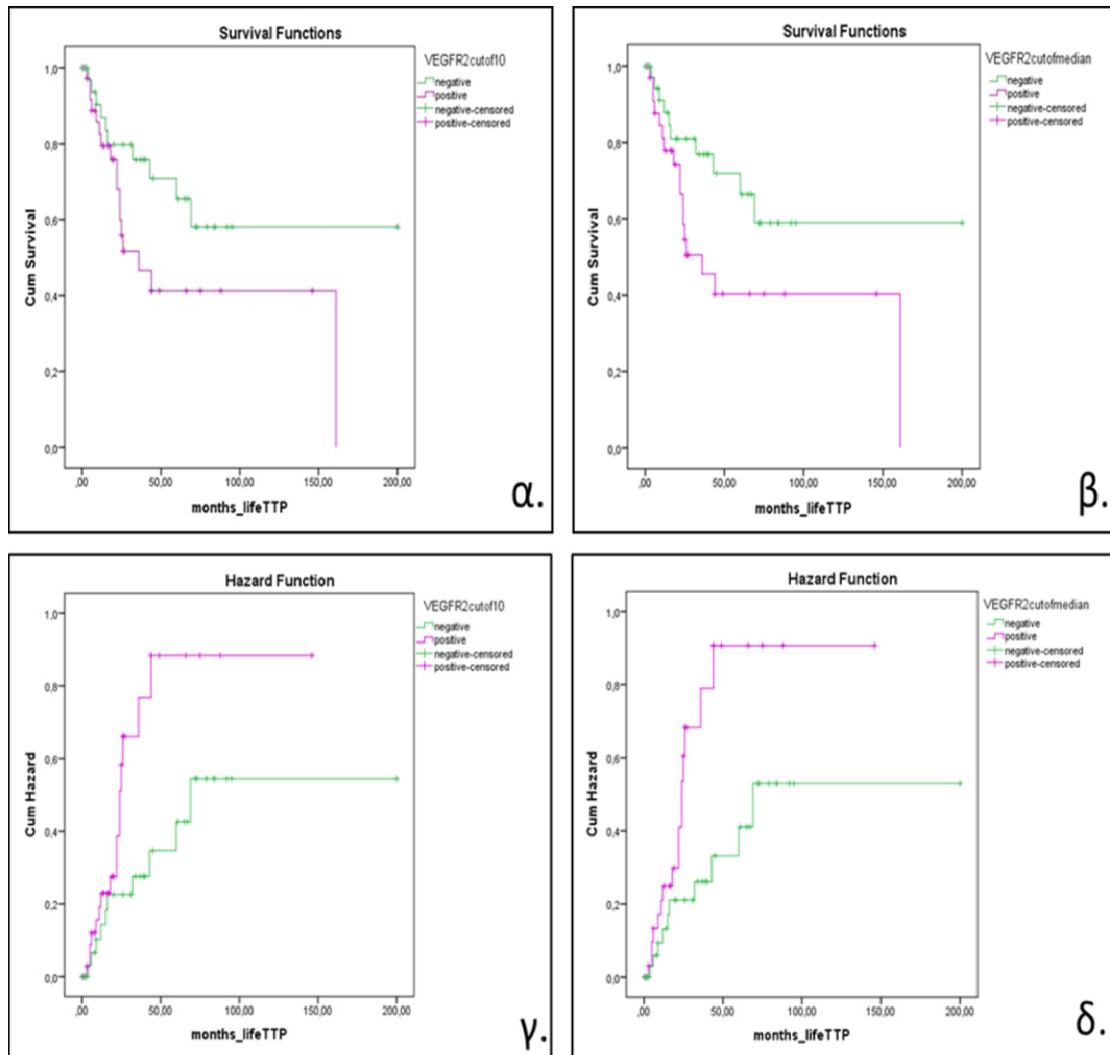
Πίνακας 3.14: Συσχέτιση της MVD-CD34 και της MVD-CD105 με την επιβίωση των ασθενών (μοντέλο Cox)	
Μεταβλητή	Τιμές p
MVD-CD34	0.542
MVD-CD105	0.371

Επιπλέον, ελέγχθηκε (έλεγχος Log-rank) η διαφορά επιβίωσης ανάμεσα στις κατηγοριοποιημένες ομάδες έκφρασης των πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% (Πίνακας 3.15) και τη διάμεση τιμή (Πίνακας 3.16).

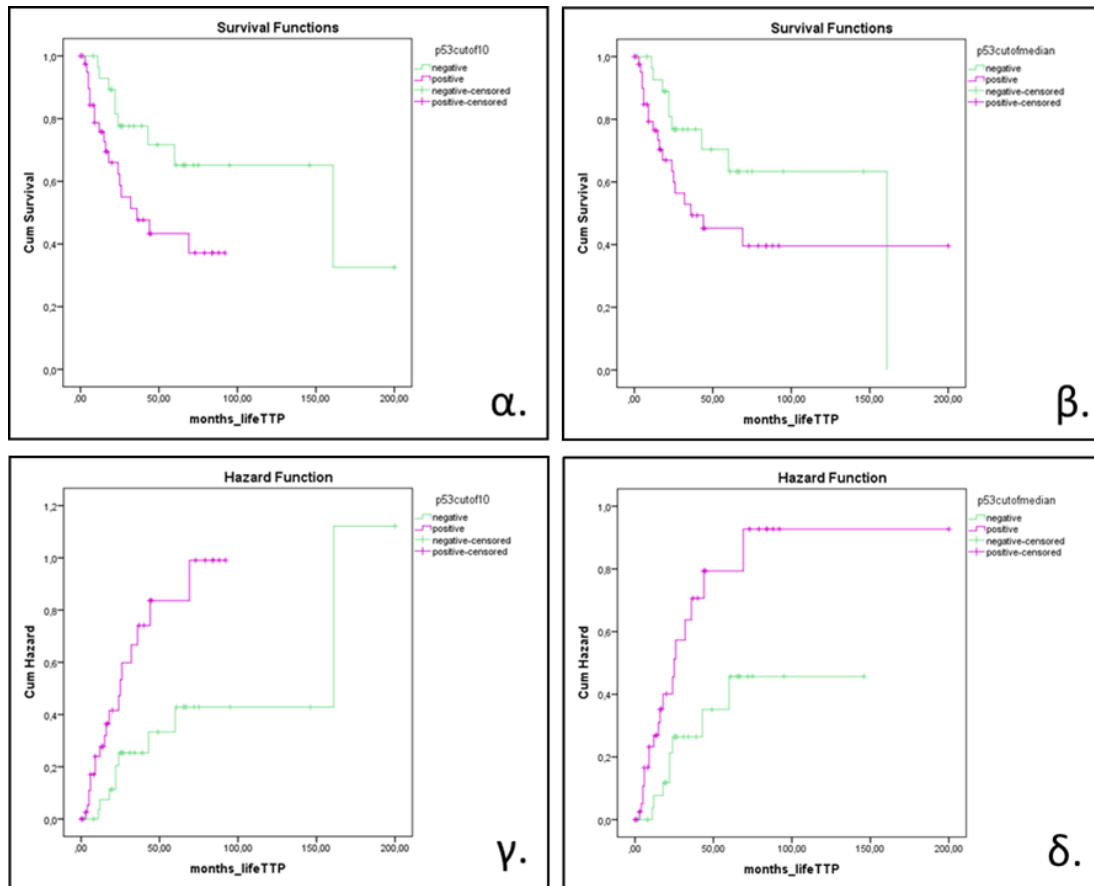
Πίνακας 3.15: Συσχετίσεις των κατηγοριοποιημένων ομάδων των πρωτεϊνών (κατώτερο όριο θετικότητας το 10%) με την επιβίωση των ασθενών				
Μεταβλητή		N	% περικομμένες τιμές	Τιμές p
VEGF-A	<10%	27	70,4	0,220
	≥10%	46	56,5	
VEGFR-1	<10%	36	55,6	0,296
	≥10%	37	67,6	
VEGFR-2	<10%	34	70,6	0.045
	≥10%	38	55,3	
p53	<10%	31	71	0.026
	≥10%	42	54,8	
Ki67	<10%	11	63,6	0.369
	≥10%	62	61,6	

Πίνακας 3.16: Συσχετίσεις των κατηγοριοποιημένων ομάδων των πρωτεϊνών (κατώτερο όριο θετικότητας τη διάμεση τιμή) με την επιβίωση των ασθενών				
Μεταβλητή		N	% περικομμένες τιμές	Τιμές p
VEGF-A	<διάμεση τιμή	39	61,5	0,951
	≥διάμεση τιμή	34	61,8	
VEGFR-1	<διάμεση τιμή	36	55,6	0,296
	≥διάμεση τιμή	37	67,6	
VEGFR-2	<διάμεση τιμή	38	73,7	0.04
	≥διάμεση τιμή	34	50,0	
p53	<διάμεση τιμή	30	70	0.04
	≥διάμεση τιμή	43	55,8	
Ki67	<διάμεση τιμή	30	63,3	0,339
	>διάμεση τιμή	43	60,5	

Η ανάλυση έδειξε ότι μόνο δύο πρωτεΐνες, ο υποδοχέας VEGFR-2 και το p53 δίνουν διαφορετική καμπύλη επιβίωσης και κινδύνου για τις δύο ομάδες. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τις δύο πρωτεΐνες φαίνονται στην Εικόνα 3.16 και 3.17.



Εικόνα 3.16: Γράφημα της καμπύλης επιβίωσης (α, β) και κινδύνου (γ, δ) για την κατηγοριοποιημένη μορφή της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGFR-2 με κατώτερο όριο θετικότητας το 10% (α, γ) και τη διάμεση τιμή (β και δ).



Εικόνα 3.17: Γράφημα της καμπύλης επιβίωσης (α, β) και κινδύνου (γ, δ) για την κατηγοριοποιημένη μορφή της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 με κατώτερο όριο θετικότητας το 10% (α, γ) και τη διάμεση τιμή (β και δ).

Συμπερασματικά, κατά την περίοδο της μελέτης απεβίωσαν 12/70 ασθενείς. Δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση του φύλου των ασθενών και της εντόπισης του όγκου με την επιβίωση, ενώ η ηλικία φάνηκε να επηρεάζει την επιβίωση των ασθενών ($p=0.05$). Ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών εμφάνισαν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης (Εικόνα 3.14). Επιπλέον, η επιβίωση των ασθενών συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών VEGFR-2 και p53. Οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών παρουσίασαν χειρότερη πρόγνωση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF-A, των υποδοχέων του VEGFR-1 (Flt-1) και VEGFR-2 (Flk-1/KDR), καθώς και η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου.

Όπως και σε προηγούμενες μελέτες αναδείχθηκε έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A και των υποδοχέων του VEGFR-1 και VEGFR-2 στα νεοπλασματικά κύτταρα των γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων^{150-184,208-219}, σε ποσοστά 84,8%, 88,2% και 73,4%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, όπως και προηγούμενων μελετών^{154,157,159,161,163,164,166,173}, δείχνουν, ότι η κύρια πηγή VEGF-A στα καρκινώματα του στομάχου είναι τα νεοπλασματικά κύτταρα. Όσον αφορά το ποσοστό της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 στα νεοπλασματικά κύτταρα, οι μελέτες είναι πολύ περιορισμένες. Οι Hirashima και συνεργάτες (2009)²¹⁹ περιγράφουν έκφραση του VEGFR-1 στο 76% των περιπτώσεων και οι Tanigawa και συνεργάτες (1997)¹⁸⁹ έκφραση του VEGFR-2 στο 54% των περιπτώσεων. Τα ποσοστά αυτά είναι ανάλογα με αυτά που αναδείχθηκαν στην μελέτη αυτή.

Παράλληλα, στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-A και των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2, στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ευρήματα τα οποία πιθανώς να δείχνουν ότι η πρωτεΐνη VEGF-A δεν είναι μόνο ένας παρακρινής διεγέρτης της αγγειογένεσης των καρκινωμάτων του στομάχου, αλλά και ένας αυτοκρινής διεγέρτης των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως υποστηρίζεται και σε προηγούμενες μελέτες^{149,208-217,299}. Είναι γνωστό ότι η σύνδεση του VEGF-A με τους υποδοχείς του, έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση τους και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μορίων/μονοπατιών, όπως MEK [MAPK (mitogen activated protein kinase)/ERK (extracellular-signal regulated kinase) kinase]/ERK μέσω διέγερσης των Ras/Raf, PKC (protein kinase calcium) μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C γ (PLC γ , phospholipase C γ) και Akt μέσω διέγερσης της PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Συντονισμένη ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών πιθανώς να οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση του κυττάρου³⁰⁰. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και της έκφρασης του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων, εύρημα το οποίο στηρίζει την αυτοκρινή δράση του VEGF-A και το ρόλο

του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου. Ανάλογη συσχέτιση σε αδενοκαρκινώματα του στομάχου δεν περιγράφεται στη βιβλιογραφία, από όσο τουλάχιστον γνωρίζουμε.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των δύο υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2. Ο υποδοχέας VEGFR-2 μεταδίδει τα κύρια αγγειογενετικά σήματα, έχει ισχυρή δράση τυροσινικής κινάσης και χρησιμοποιεί το μονοπάτι της φωσφολιπάσης Cγ-πρωτεϊνικής κινάσης C για να ενεργοποιήσει την κινάση MAP και τη σύνθεση DNA, σε απάντηση στον VEGF-A και λιγότερο στο μονοπάτι Ras. Ο υποδοχέας VEGFR-1 έχει διπλή δράση, αναστέλλει την αγγειογένεση κατά την εμβρυϊκή ζωή πιθανώς παγιδεύοντας, την πρωτεΐνη VEGF-A και επάγει την αγγειογένεση κατά την ενήλικη ζωή με ένα τρόπο εξαρτώμενο από την τυροσινική κινάση³⁰¹. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο ρόλος του VEGFR-1 στην αγγειογένεση είναι πολύ πιο περίπλοκος από ότι αρχικά θεωρούσαν. Ουσιαστικά, η ικανότητά του να ρυθμίζει την αγγειογένεση δεν περιορίζεται σε ένα ρόλο υποδοχέα-παγίδα του VEGF-A. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, ο υποδοχέας VEGFR-1 μπορεί να σχηματίζει ετεροδιμερή με τον VEGFR-2, ενεργοποιώντας τον VEGFR-2 και επάγοντας την αγγειογένεση. Αντίθετα, όταν ο VEGFR-1 ενεργοποιείται από ένα συνδέτη που επάγει μόνο τον ομοδιμερισμό του, χωρίς να προκαλεί ετεροδιμερισμό του με τον VEGFR-2, δεν μπορεί να προκαλέσει βιολογικές απαντήσεις, όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική μετανάστευση και διακυττάρια απελευθέρωση ασβεστίου. Επομένως, η ικανότητα του VEGFR-1 να μεταδώσει σήματα και να διεγείρει βιολογικές απαντήσεις, θετικές ή αρνητικές, περιορίζεται στην ικανότητά του να ετεροδιμερίζεται με τον VEGFR-2³⁰²⁻³⁰⁴. Ίσως η θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των δύο υποδοχέων να οφείλεται στον τρόπο δράσης τους.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η MVD των όγκων με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες CD34 και CD105. Σημαντική θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ MVD-CD34 και MVD-CD105. Η μέση τιμή της MVD-CD34 ήταν 64,9 και της MVD-CD105 (MVD-CD105) 23,5. Σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή MVD-CD34 σε καρκινώματα στομάχου ανιχνεύθηκε και στη μελέτη των Ding και των συνεργατών του (2006)²²⁹. Το εύρημα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς ο δείκτης CD105 εκφράζεται σε πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ιστούς που υφίστανται ενεργή αγγειογένεση και όχι σε προϋπάρχοντα αγγεία, ενώ ο δείκτης CD34 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα όλων των αγγείων, προϋπαρχόντων και

νεοσχηματισμένων. Επομένως, ο δείκτης CD105 φαίνεται να είναι περισσότερο ειδικός στην εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης των καρκινωμάτων του στομάχου^{142,305}.

Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων και της MVD των καρκινωμάτων του στομάχου, εκτιμώμενης με διάφορους δείκτες, όπως παράγοντας VIII^{150,151,161,193,204,220-224}, CD31¹⁵⁵, CD34^{165,172,179,190,225} και CD105²²⁶. Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων και της MVD εκτιμώμενης με τον δείκτη CD105, ενώ δεν αναδείχθηκε ανάλογη συσχέτιση με τον δείκτη CD34. Το εύρημα αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή VEGF-A και ότι ο VEGF-A, ο παραγόμενος από τα νεοπλασματικά κύτταρα, έχει παρακρινή δράση στα αδενοκαρκινώματα του στομάχου και επάγει την νεοαγγειογένεση.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη ανεβρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση του δείκτη Ki-67 των νεοπλασματικών κυττάρων και της MVD-CD105 του όγκου. Ανάλογη συσχέτιση σε καρκινώματα στομάχου δεν περιγράφεται στην βιβλιογραφία. Ίσως η συσχέτιση αυτή να είναι αναμενόμενη εφ' όσον τόσο η αγγειογένεση όσο και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός εν μέρει ρυθμίζονται από τον VEGF-A.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 στο 71,7% των περιπτώσεων. Σε ανάλογες προηγούμενες μελέτες, αυτή κυμαίνεται από 4% έως 70%²⁵¹. Επιπλέον, όπως και σε ορισμένες προηγούμενες μελέτες^{151,155,207,265}, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A και της έκφρασης του p53. Είναι γνωστό ότι η αγγειογένεση ρυθμίζεται, εν μέρει και από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο P53^{261,262}. Το μεταλλαγμένο γονίδιο του P53 αναστέλλει την έκφραση αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως της θρομβοσπονδίνης και επάγει την έκφραση του VEGF-A μέσω της πρωτεϊνικής κίνησης C²⁶¹ και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1^{307,308}. Παράλληλα, το μεταλλαγμένο γονίδιο του P53 επάγει τον HIF1a (Hypoxia Inducible Factor 1a), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την υπερέκφραση του VEGF-A σε καταστάσεις υποξίας³⁰⁹. Επομένως, το γονίδιο P53 είναι ένας πιθανώς διεγέρτης της αγγειογένεσης¹⁹², άποψη η οποία στηρίζεται και από την ανεύρεση στην παρούσα μελέτη σημαντικής θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και της MVD εκτιμώμενης με τον δείκτη CD105. Σε δύο προηγούμενες μελέτες^{151,207}

περιγράφεται υψηλότερη τιμή MVD-CD105 σε p53-θετικά από ότι σε p53-αρνητικά καρκινώματα του στομάχου.

Σε προηγούμενες μελέτες περιγράφονται στους δύο ιστολογικούς τύπους αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου κατά Lauren διαφορές στην έκφραση αγγειογενετικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι τα εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα εκφράζουν συχνότερα τις πρωτεΐνες VEGF-A^{156,172}, VEGFR-2¹⁵⁰ και bFGF και έχουν υψηλότερη τιμή MVD, εκτιμώμενη ανοσοϊστοχημικά με τον παράγοντα VIII¹⁵⁰ και το δείκτη CD34²⁰¹ από ότι τα διαχύτου τύπου, αν και σε μια μελέτη βρέθηκε υψηλότερη MVD-CD34 στα διαχύτου τύπου αδενοκαρκινώματα^{172,20}. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα εντερικού τύπου αδενοκαρκινώματα του στομάχου παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη τιμή MVD-CD105 σε σχέση με τα διαχύτου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1, p53 και Ki-67 στα εντερικού σε σχέση με τα διαχύτου τύπου καρκινώματα.

Όσον αφορά την νεοπλασματική διήθηση των αγγείων, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών^{155, 163}. Η διήθηση των αγγείων συσχετίστηκε με την έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1, VEGFR-2 και Ki-67, καθώς και με την MVD-CD105, ενισχύοντας την άποψη ότι η νεοαγγειογένεση συμβάλει στη διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων και ότι επιθετικοί όγκοι παρουσιάζουν συχνότερα αγγειακή διήθηση. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A και της νεοπλασματικής διήθησης των αγγείων, όπως και στη μελέτη του Fondevila και των συνεργατών του¹⁶³, αν και στις περισσότερες προηγούμενες μελέτες υποστηρίζεται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-A αποτελεί δείκτη νεοπλασματικής διήθησης αγγείων^{146,148,160,162,163,169,193}. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις της MVD-CD105 και της έκφρασης της p53 με την περινευρική διήθηση.

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών όσον αφορά την προγνωστική αξία της έκφρασης του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων. Σε ορισμένες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του VEGF-A είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης του γαστρικού καρκινώματος^{146,148,152,156,160-163,167,171,172,177,185-188}, ενώ σε άλλες^{165,168,174,175,190-192}, όπως και στην παρούσα μελέτη, η έκφραση του VEGF-A δεν βρέθηκε να έχει προγνωστική αξία. Επιπλέον, η έκφραση του VEGF-A έχει συσχετισθεί με λεμφαδενικές^{159,163,169,190,192,194} και απομακρυσμένες

μεταστάσεις^{146,160,163,190,192}, με λεμφική^{148,161,169}, φλεβική¹⁵⁶ και ορογόνια¹⁶⁵ νεοπλασματική διήθηση, καθώς και με το στάδιο της νόσου^{159,176,190,194}. Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A και του σταδίου (II έναντι IV) της νόσου.

Όσον αφορά τη συσχέτιση των υποδοχέων με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, στη μελέτη αυτή βρέθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης του VEGFR-1 με το βαθμό διαφοροποίησης του καρκινώματος και του VEGFR-2 με την MVD-CD34, την νεοπλασματική διήθηση αγγείων και την επιβίωση των ασθενών, ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Στις μέχρι τώρα μελέτες δεν περιγράφονται ανάλογες συσχετίσεις των υποδοχέων με την επιβίωση των ασθενών ή κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους^{167,219}.

Ακόμη στη μελέτη αυτή, όπως και σε προηγούμενες^{151,163,252-255}, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 των νεοπλασματικών κυττάρων είναι ένας ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός δείκτης του καρκινώματος του στομάχου.

Σε αρκετές προηγούμενες μελέτες γαστρικών καρκινωμάτων βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ της MVD και δυσμενών κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων, όπως το στάδιο της νόσου^{159,172,176}, ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκινώματος^{161,172,224,227}, η υποτροπή¹⁶³, η αγγειακή διήθηση^{162,191}, οι λεμφαδενικές μεταστάσεις^{161-163,172,191,223,224}, οι απομακρυσμένες (ηπατικές και περιτοναϊκές) μεταστάσεις^{189,228} και οι μικρομεταστάσεις στο μυελό των οστών^{71,228,292,294}. Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες στις οποίες βρέθηκε ότι η MVD εκτιμώμενη με τον παράγοντα VIII²²⁰⁻²²⁴ και το δείκτη CD34^{176,189,225} είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Σε άλλες μελέτες γαστρικών καρκινωμάτων, η MVD εκτιμώμενη με το δείκτη CD105 βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης²²⁹ και δείκτης υποτροπής³¹⁰. Στη μελέτη αυτή, η MVD, ανεξάρτητα του ανοσοϊστοχημικού δείκτη που χρησιμοποιήθηκε, CD34 ή CD105, δεν βρέθηκε να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα της μελέτης του Joo και των συνεργατών του (2002)¹⁹² που μελέτησαν την MVD με το δείκτη CD34. Στην παρούσα μελέτη οι υψηλές τιμές της MVD-CD105 συσχετίστηκαν με περινευρική και αγγειακή διήθηση.

Τα ανωτέρω αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων μελετών μπορεί να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, διαφορετικών αντισωμάτων και μεθόδων εκτίμησης της MVD, καθώς και σε πιθανούς πολυμορφισμούς του γονιδίου του VEGF-A. Εκτός των άλλων, οι βιολογικές

διαδικασίες, όπως αύξηση του μεγέθους του όγκου και μετάσταση ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων αγγειογενετικών, κινητικότητας, καθώς και μορίων προσκόλλησης. Επομένως, η ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να επάγουν την αγγειογένεση δεν συσχετίζεται πάντα με το κακόηθες δυναμικό του όγκου και δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσον η αύξηση του όγκου, οι μεταστάσεις και η κλινική πορεία των ασθενών εξαρτώνται από την αγγειογένεση¹⁹².

Σήμερα, που προωθούνται κλινικές εφαρμογές της αντιαγγειογενετικής θεραπείας, κάθε ερευνητική μελέτη που προσφέρει δεδομένα που βοηθούν στην κατανόησή των παθογενετικών μηχανισμών της αγγειογένεσης συγκεκριμένων τύπων καρκινωμάτων, είναι πολύτιμη. Πλέον, υπάρχει η πεποίθηση ότι ο ορθολογικός συνδυασμός κυτταροτοξικών και αντι-αγγειογενετικών θεραπειών μπορεί να αποδώσει το μέγιστο θεραπευτικό όφελος σε ένα ευρύ φάσμα κακοηθών νεοπλασμάτων. Πρόσφατες μελέτες που αφορούν τη διάγνωση και τη θεραπεία συνέβαλαν στη βελτίωση της πρόγνωσης ασθενών με επιφανειακό γαστρικό καρκίνωμα, παρότι σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου το ποσοστό θνησιμότητας δεν μεταβλήθηκε σημαντικά. Η θνησιμότητα των ασθενών οφείλεται κυρίως στη συστηματική διασπορά του όγκου μέσω λεμφαγγείων και αιμοφόρων αγγείων.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη αναδείχτηκαν: 1) υψηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του VEGF-A και των υποδοχέων του VEGFR-1 και VEGFR-2 στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου, 2) θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A και των υποδοχέων του και 3) θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-A και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67, ευρήματα τα οποία στηρίζουν την άποψη ότι ο VEGF-A πιθανόν να έχει αυτοκρινή δράση στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου.

Επιπλέον, η έκφραση του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων συσχετίστηκε θετικά με την MVD-CD105 επιβεβαιώνοντας την πιθανή παρακρινή δράση του στα καρκινώματα του στομάχου. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του VEGFR-2 και της p53 των νεοπλασματικών κυττάρων έχει προγνωστική αξία. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι ανεξάρτητοι δυσμενείς προγνωστικοί δείκτες των καρκινωμάτων του στομάχου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη

1. Αναδείχθηκαν υψηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του VEGF-A και των ειδικών υποδοχέων του, VEGFR-1 και VEGFR-2, στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου με ποσοστά 84,8%, 88,2% και 73,4%, αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι κύρια πηγή VEGF-A στα καρκινώματα του στομάχου είναι τα νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία συχνά συνεκφράζουν και τους υποδοχείς του.
2. Βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του VEGF-A και των υποδοχέων του, VEGFR-1 και VEGFR-2, των νεοπλασματικών κυττάρων και σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του VEGF-A και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. Ανάλογη συσχέτιση δεν περιγράφεται στην βιβλιογραφία. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι πιθανώς ο VEGF-A να έχει αυτοκρινή δράση στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου και η σύνδεσή του με τους υποδοχείς του να ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
3. Βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 των νεοπλασματικών κυττάρων των καρκινωμάτων του στομάχου. Η συσχέτιση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στον τρόπο δράσης των υποδοχέων του VEGF-A, π.χ. ετεροδιμερισμός.
4. Αναδείχθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της τιμής της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD) του όγκου που εκτιμήθηκε με τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη CD34 (MVD-CD34) και αυτής που εκτιμήθηκε με τον δείκτη CD105 (MVD-CD105). Η μέση τιμή της MVD-CD105 ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της MVD-CD34 (23,5 και 64,9, αντίστοιχα) και συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του VEGF-A των νεοπλασματικών κυττάρων, εύρημα το οποίο δείχνει ότι στα καρκινώματα του στομάχου: α) ο VEGF-A, ο παραγόμενος από τα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκινώματος, πιθανώς να έχει παρακρινή δράση και β) ο δείκτης CD105 είναι περισσότερο αξιόπιστος από τον δείκτη CD34 για την εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης του όγκου.

5. Αναδείχθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις 1) μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και της έκφρασης του VEGF-A, 2) μεταξύ της p53 και της MVD-CD105. Είναι γνωστό ότι η αγγειογένεση ρυθμίζεται εν μέρει από το γονίδιο P53 και ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο επάγει την έκφραση του VEGF-A είτε άμεσα είτε μέσω επαγωγής της έκφρασης του HIF-1α.
6. Βρέθηκαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης του VEGF-A με το στάδιο της νόσου και το βάθος διήθησης του όγκου, της έκφρασης του VEGFR-1 με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και της έκφρασης του VEGFR-2 με την MVD-CD34. Επιπλέον, η νεοπλασματική διήθηση αγγείων συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-1, VEGFR-2, p53, Ki-67 και την MVD-CD105, καθώς επίσης η νεοπλασματική διήθηση νεύρων με την έκφραση της πρωτεΐνης p53 και την MVD-CD105.
7. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφραση των πρωτεϊνών VEGFR-2 και p53 στα νεοπλασματικά κύτταρα των καρκινωμάτων του στομάχου έχουν προγνωστική αξία και είναι ανεξάρτητοι δυσμενείς προγνωστικοί δείκτες ($p=0,03$ και $0,01$, αντίστοιχα), ενώ η έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 και Ki-67, καθώς και η MVD (MVD-CD34 και MVD-CD105) δεν βρέθηκε να έχουν προγνωστική αξία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη κυτταρική διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από διαφόρους αγγειογενετικούς παράγοντες, σημαντικότερος των οποίων είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), ο οποίος δρα μέσω των εξειδικευμένων υποδοχέων του, VEGFR-1 και VEGFR-2. Αρκετές προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι έκφραση του VEGF-A στα νεοπλασματικά κύτταρα των γαστρικών καρκινωμάτων και συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-A με την μικροαγγειακή πυκνότητα (micro vessel density, MVD). Τα αποτελέσματα όσον αφορά την προγνωστική αξία της έκφρασης του VEGF-A, των υποδοχέων του και της MVD είναι αντιφατικά.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν σε 145 περιπτώσεις γαστρικών καρκινωμάτων 1) η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 και 2) η MVD με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες CD34 και CD105 (MVD-CD34 και MVD-CD105) προκειμένου να διερευνηθούν περαιτέρω παθογενετικοί μηχανισμοί των καρκινωμάτων αυτών. Επιπλέον, τα ευρήματα συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική έκβαση των ασθενών με σκοπό την διερεύνηση της προγνωστικής αξίας της πρωτεϊνικής έκφρασης των VEGF-A, VEGFR-1 και VEGFR-2, καθώς και της MVD στα καρκινώματα του στομάχου.

Έκφραση των πρωτεϊνών VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 και Ki-67 στα νεοπλασματικά κύτταρα ανιχνεύθηκε σε 123/145 (84.8%), 127/144 (88.2%), 105/143 (73.4%), 104/145 (71.7%) και 143/145 (98.6%) περιπτώσεις, αντίστοιχα. Η MVD-CD34 και η MVD-CD105 ήταν 64.99 και 23.56, αντίστοιχα. Θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των VEGF-A και VEGFR-1, VEGFR-2, p53, Ki-67 και MVD-CD105 ($p=0.002$, $p=0.046$, $p=0.045$, $p<0.001$ και $p=0.024$, αντίστοιχα) και μεταξύ της MVD-CD105 και MVD-CD34, Ki-67 και p53 ($p<0.001$, $p<0.001$ και $p<0.001$, αντίστοιχα). Παρόμοια συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των υποδοχέων VEGFR-1 και VEGFR-2 ($p<0.001$).

Ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών και της MVD του όγκου με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους έδειξε ότι η έκφραση του VEGF-A συσχετίζεται με το κλινικό στάδιο ($p=0.007$), η έκφραση του VEGFR-1 με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος ($p=0.037$).

και $p=0.002$, αντίστοιχα), η έκφραση του VEGFR-2 με τη νεοπλασματική διήθηση αγγείων ($p=0.045$) και η έκφραση του Ki-67 με τον ιστολογικό τύπο και την νεοπλασματική διήθηση αγγείων ($p=0.016$ και $p=0.032$, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, αναδεικνύεται ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών VEGFR-2 και p53 συσχετίζονται με την πρόγνωση και αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες δυσμενούς κλινικής έκβασης.

Η πρωτεΐνη VEGF-A και οι υποδοχείς της, VEGFR-1 και VEGFR-2, εκφράζονται στα νεοπλασματικά κύτταρα στην πλειονότητα των γαστρικών καρκινωμάτων και πιθανώς να έχουν παρακρινή και αυτοκρινή δράση επάγοντας την αγγειογένεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα επίπεδα έκφρασης των VEGFR-2 και p53 σχετίζονται με την πρόγνωση και είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες δυσμενούς κλινικής έκβασης των γαστρικών καρκινωμάτων.

SUMMARY

Angiogenesis is a complex process, depending on a great variety of angiogenic factors, one of the most important being the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), which acts through its specific receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2). Several previous studies showed expression of VEGF-A in tumor cells of gastric carcinomas and correlations of VEGF-A with the micro vessel density (MVD). However, there are contradictory results as far as it concerns the prognostic value of VEGF-A, its receptors and MVD.

Therefore, in the present study we analyzed 145 cases of gastric carcinomas for 1) the immunohistochemical expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 and Ki-67 proteins and 2) the MVD with the immunohistochemical markers CD34 and CD105 (MVD-CD34 and MVD-CD105) to gain further insight on the pathogenesis of this tumor. Moreover, the results were correlated to clinicopathological parameters and clinical outcome of the patients.

Expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, p53 and Ki-67 proteins in tumor cells was detected in 123/145 (84.8%), 127/144 (88.2%), 105/143 (73.4%), 104/145 (71.7%) and 143/145 (98.6%) cases, respectively. The MVD-CD34 and the MVD-CD105 were 64.99 and 23.56, respectively. Positive correlations were found between VEGF-A and VEGFR-1, VEGFR-2, p53, Ki-67 and MVD-CD105 ($p=0.002$, $p=0.046$, $p=0.045$, $p<0.001$ and $p=0.024$, respectively) and between MVD-CD105 and MVD-CD34, Ki-67 and p53 ($p<0.001$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). Similar correlation was found between VEGFR-1 and VEGFR-2 ($p<0.001$).

Analysis of protein expressions and MVD of the tumor with clinicopathological parameters showed that, VEGF-A expression was correlated with the clinical stage ($p=0.007$), VEGFR-1 expression with the histological grade and histological type of the tumor ($p=0.037$ and $p=0.002$, respectively), VEGFR-2 expression with the vascular invasion ($p=0.045$), and Ki-67 expression with the histological type and the vascular invasion ($p=0.016$ and $p=0.032$, respectively). In addition, the expression of VEGFR-2 and p53 proteins were correlated with prognosis. VEGFR-2 and p53 were found to be independent predictor factors of unfavourable clinical outcome.

The results of the present study suggests an important role of angiogenesis in the pathogenesis of gastric carcinoma. Expression of pro-angiogenic proteins VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 by tumor cells is a common event. VEGF-A produced by tumour cell may act as paracrine and autocrine growth factor in gastric adenocarcinoma by promoting angiogenesis and tumor cell proliferation through its receptors. Moreover, protein expression of VEGFR-2 and p53 are independent predictor factors of unfavorable clinical outcome in gastric carcinomas.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): World Health Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press:Lyon: 2000.
2. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Isaacson PG. Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text. 3 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
3. Stewart B. W. and Kleihues P. (Eds):World Cancer Report. IARCPress. Lyon, 2003.
4. Smith JK, McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Sullivan ME, Litwin DE et al. National outcomes after gastric resection for neoplasm. *Arch Surg* 2007; 142(4):387-393.
5. Lazar D, Taban S, Dema A, Cornianu M, Goldis A, Ratiu I et al. Gastric cancer: the correlation between the clinicopathological factors and patients' survival (I). *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50(1):41-50.
6. Λαρίου Κ. Καρκίνος του στομάχου-Ιστολογική Ταξινόμηση. Available from: www.exe1928.gr/static/media/2011/07/38.doc (accessed 30 December 2011).
7. Washington K, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons P et al. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Carcinoma of the Stomach. Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. Available from: http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2012/Stomach_12protocol_3200.pdf (accessed 30 Jule 2012).
8. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21):1182-1186.
9. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249-257.
10. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 2004; 255(5):538-561.
11. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114(2):521-532.
12. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6(3):230-247.

13. Nussenbaum F, Herman IM. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol* 2010; 2010:132641, 24 pages.
14. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6(4):389-395.
15. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(5):C947-C970.
16. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):401-410.
17. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267(16):10931-10934.
18. Φραγκια Κ. Αγγειογένεση και μετάσταση στον καρκίνο. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 2002; 19(2):116-118.
19. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-364.
20. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 37(2):97-114.
21. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):505-515.
22. Carmeliet P. Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999; 401(6754):657-658.
23. Knowles HJ, Harris AL. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumourigenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3(5):318-322.
24. Σιβρίδης Ε, Γιατρομανωλάκης Α. Αγγειογένεση, αγγειογενετικοί παράγοντες και καρκίνος: νέοι στόχοι, νέες προοπτικές. *Ελληνική Ογκολογία* 2000; 36:73-80.
25. Γούναρη Α. Αγγειογένεση στον καρκίνο. Αναφορά στην επισκόπηση των Ρ. Carmeliet και Ρ. Jain (Nature 407, Sept. 2000). *Ογκολογική Ενημέρωση* 2001; 3(1).
26. Iruela-Arispe ML. Vascular Development and Angiogenesis. In: Meyers R, editor. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2005: 201-232.
27. Yu JL, Rak JW. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res* 2003; 5(2):83-88.

28. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation* 1999; 6(1):23-44.
29. Plank MJ, Sleeman BD. Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine* 2003; 5:137-153.
30. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6):653-660.
31. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004; 231(3):474-488.
32. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(2):91-100.
33. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8(3):294-300.
34. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; 2(11):826-835.
35. Carmeliet P. Developmental biology. One cell, two fates. *Nature* 2000; 408(6808):43, 45.
36. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6(4):389-395.
37. Qutub AA, Mac GF, Karagiannis ED, Vempati P, Popel AS. Multiscale models of angiogenesis. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2009; 28(2):14-31.
38. King RJB. *Cancer biology* / R.J.B. King. Harlow, Essex, England : Longman, 1996.
39. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(3):253-270.
40. Cristofanilli M, Charnsangavej C, Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(6):415-426.
41. Sharma RA, Harris AL, Dalglish AG, Steward WP, O'Byrne KJ. Angiogenesis as a biomarker and target in cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2001; 2(12):726-732.

42. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801):242-248.
43. McDonald DM, Teicher BA, Stetler-Stevenson W, Ng SS, Figg WD, Folkman J et al. Report from the society for biological therapy and vascular biology faculty of the NCI workshop on angiogenesis monitoring. *J Immunother* 2004; 27(2):161-175.
44. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000; 7(6):451-457.
45. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000; 105(1):17-19.
46. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 1977; 269(5631):804-806.
47. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(7):1104-1117.
48. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1):38-47.
49. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(2):83-90.
50. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002; 160(3):985-1000.
51. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156(2):361-381.
52. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38(12):1564-1579.
53. Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol* 1994; 5(4):305-311.
54. Strohmeyer D, Rossing C, Strauss F, Bauerfeind A, Kaufmann O, Loening S. Tumor angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. *Prostate* 2000; 42(1):26-33.

55. Chaudhary R, Bromley M, Clarke NW, Betts CD, Barnard RJ, Ryder WD et al. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res* 1999; 19(4C):3479-3484.
56. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3):219-227.
57. Sullivan DC, Bicknell R. New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer* 2003; 89(2):228-231.
58. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(5):634-640.
59. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002; 277(31):27872-27879.
60. Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2000; 60(19):5410-5413.
61. Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engstrom A et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000; 95(11):3403-3411.
62. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10):2726-2734.
63. Ozawa S, Shinohara H, Kanayama HO, Bruns CJ, Bucana CD, Ellis LM et al. Suppression of angiogenesis and therapy of human colon cancer liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. *Neoplasia* 2001; 3(2):154-164.
64. Sasamura H, Takahashi A, Miyao N, Yanase M, Masumori N, Kitamura H et al. Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86(5):768-773.

65. Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1998; 188(6):1039-1046.
66. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):727-739.
67. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5(4):237-256.
68. Rak J, Mitsushashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60(2):490-498.
69. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7):3609-3614.
70. Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavenee WK. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 1994; 8(2):171-176.
71. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(6):1810-1817.
72. Yamashita-Kashima Y, Fujimoto-Ouchi K, Yorozu K, Kurasawa M, Yanagisawa M, Yasuno H et al. Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models. *BMC Cancer* 2012; 12:37. doi: 10.1186/1471-2407-12-37.:37-12.
73. Zhang ZL, Wang JH, Liu XY. Current strategies and future directions of antiangiogenic tumor therapy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2003; 35(10):873-880.
74. McCarty MF, Liu W, Fan F, Parikh A, Reimuth N, Stoeltzing O et al. Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials. *Trends Mol Med* 2003; 9(2):53-58.

75. Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2):415-427.
76. Schnitzer JE. Vascular targeting as a strategy for cancer therapy. *N Engl J Med* 1998; 339(7):472-474.
77. Atiqur RM, Toi M. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(10):463-470.
78. Morabito A, Sarmiento R, Bonginelli P, Gasparini G. Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49(2):91-107.
79. Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34(2):89-110.
80. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; 279(5349):377-380.
81. Tanaka T, Manome Y, Wen P, Kufe DW, Fine HA. Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997; 3(4):437-442.
82. Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS et al. Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999; 59(4):895-900.
83. Kakeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs* 1997; 15(1):39-48.
84. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7(9):987-989.
85. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307(5706):58-62.
86. Miller KD. Issues and challenges for antiangiogenic therapies. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75 Suppl 1:S45-50; discussion S57-8.:S45-S50.
87. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587):983-985.

88. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
89. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272(11):7151-7158.
90. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, Ntzani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol* 2004; 19: 37-42.
91. Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2003;23(6C):4715-20.
92. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis N. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2 *Modern Pathology* 2005; 18: 485-494.
93. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131(9):624-30.
94. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol* 2004;40(9):941-7.
95. Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Association with Microvessel Density in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer *In vivo* 2004; 18: 155-160.
96. E. Stavropoulos NE, Bouropoulos C, Ioachim IE, Michael M, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Liamis Z, Stefanaki S, Agnantis NI. Prognostic significance of angiogenesis in superficial bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 2004;36(2):163-7.
97. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77(7):527-543.

98. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9(3):211-220.
99. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2413-2422.
100. Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Herzog Y, Neufeld G. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett* 2006; 231(1):1-11.
101. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20(21):4368-4380.
102. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5):1029-1039.
103. Sullivan LA, Brekken RA. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *MAbs* 2010; 2(2):165-175.
104. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(9):488-494.
105. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996; 271(13):7788-7795.
106. Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 1992; 67(5):596-607.
107. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(25):13612-13617.
108. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437(7058):497-504.
109. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 13):1853-1865.

110. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153(3):557-562.
111. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84(5):1470-1478.
112. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56(3):794-814.
113. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:1-30.:1-30.
114. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273(46):30336-30343.
115. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2000; 477(3):258-262.
116. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23(5):1011-1027.
117. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95(1):189-197.
118. Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9(6):1144-1155.
119. Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* 1997; 57(17):3852-3859.
120. Elvert G, Lanz S, Kappel A, Flamme I. mRNA cloning and expression studies of the quail homologue of HIF-2alpha. *Mech Dev* 1999; 87(1-2):193-197.
121. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002; 82(3):673-700.

122. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97(3):785-791.
123. Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G et al. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem* 1997; 272(16):10382-10388.
124. Beck L, Jr., D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11(5):365-373.
125. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269(43):26988-26995.
126. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376(6535):66-70.
127. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9349-9354.
128. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376(6535):62-66.
129. Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 1):20-24.
130. Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(4):315-324.
131. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92(6):735-745.
132. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999; 126(21):4895-4902.

133. Helotera H, Alitalo K. The VEGF family, the inside story. *Cell* 2007; 130(4):591-592.
134. CD34 CD34 molecule [Homo sapiens] [updated 2012 Jul 29; cited 2012 Jul 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/947>
135. GeneCards: CD34 molecule [updated 2012 May 1; cited 2012 Jul 30]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cd34>
136. Benter T, Ratei R, Ludwig W-D. *J Lab Med* 2001; 25(11/12): 512-532.
137. Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res* 2010; 86(1):12-19.
138. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; 17(9):984-992.
139. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 2003; 22(42):6557-6563.
140. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004; 2(1):18.
141. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M et al. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis. *Lung Cancer* 2003; 39(3):289-296.
142. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002; 51(4):268-275.
143. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999; 59(4):856-861.
144. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN et al. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol* 2004; 35(2):176-183.
145. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN et al. Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2,

- Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905). *Br J Cancer* 2004; 90(6):1216-1221.
146. Kakeji Y, Maehara Y, Sumiyoshi Y, Oda S, Emi Y. Angiogenesis as a target for gastric cancer. *Surgery* 2002; 131(1 Suppl):S48-S54.
147. Kitadai Y. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer. *J Oncol* 2010; 2010:468725, 8 pages.
148. Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(1):69-79.
149. Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001; 7(4):500-505.
150. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2(10):1679-1684.
151. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55(6):594-599.
152. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T et al. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86(4):566-571.
153. Ikeguchi M, Oka S, Saito H, Kondo A, Tsujitani S, Maeta M et al. The expression of vascular endothelial growth factor and proliferative activity of cancer cells in gastric cancer. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384(3):264-270.
154. Metges JP, Fondevila C, Doucet L, Robinet G, Pera M, Morin JF et al. Angiogenesis and p53 status in gastric cancer: A prospective serum and immunohistochemical study. *Annals of Oncology* 2000; 11, Suppl 4:64.
155. Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y et al. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 128(3):408-416.

156. Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78(2):132-137.
157. Liu D, Wang B, Jiang R. Expression of VEGF and its receptors Flt and KDR in gastric cancer. *Chinese J Dig Dis* 2001; 2(4):171-173.
158. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002; 2:8.:8.
159. Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4):591-595.
160. Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21(1):125-129.
161. Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003; 9(7):1604-1606.
162. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(7):1421-1426.
163. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; 90(1):206-215.
164. Song ZY, Wen SQ, Peng JP, Huang X, Qian KD. Significance of vascular endothelial growth factor expression and its correlation with inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9):1250-1255.
165. D. Cabuk, G. Basaran, P. F. Yumuk, C. Celikel, F. Dane, M. S. Iyikesici, M. Ekenel and N. S. Turhal. VEGF, HIF-1 alpha and CD34 expressions in gastric tumors (tms): Relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No 16S (June 1 Supplement), 2005: 4040

166. Choi JH, Ahn MJ, Park CK, Han HX, Kwon SJ, Lee YY et al. Phospho-Stat3 expression and correlation with VEGF, p53, and Bcl-2 in gastric carcinoma using tissue microarray. *APMIS* 2006; 114(9):619-625.
167. Ozdemir F, Akdogan R, Aydin F, Reis A, Kavgaci H, Gul S et al. The effects of VEGF and VEGFR-2 on survival in patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25(1):83-88.
168. Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K et al. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann Surg* 2006; 243(3):334-340.
169. Kondo K, Kaneko T, Baba M, Konno H. VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(4):633-637.
170. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, Dane F, Yumuk PF, Iyikesici MS et al. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology* 2007; 72(1-2):111-117.
171. Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2007; 10(1):12-17.
172. Lazar D, Taban S, Raica M, Sporea I, Cornianu M, Goldis A et al. Immunohistochemical evaluation of the tumor neoangiogenesis as a prognostic factor for gastric cancers. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49(2):137-148.
173. Raica M, Mogoanta L, Cimpean AM, Alexa A, Ioanovici S, Margaritescu C et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in intestinal type gastric carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49(1):37-42.
174. Oh SY, Kwon HC, Kim SH, Jang JS, Kim MC, Kim KH et al. Clinicopathologic significance of HIF-1alpha, p53, and VEGF expression and preoperative serum VEGF level in gastric cancer. *BMC Cancer* 2008; 8:123.:123.

175. Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Moon JH, Kim SN et al. No association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C expression with survival in patients with gastric cancer. *Cancer Res Treat* 2009; 41(4):218-223.
176. Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, Ramboiu S, Gheonea DI, Filip M et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density--two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2010; 19(2):135-139.
177. Zhou Y, Li G, Wu J, Zhang Z, Wu Z, Fan P et al. Clinicopathological significance of E-cadherin, VEGF, and MMPs in gastric cancer. *Tumour Biol* 2010; 31(6): 549-558.
178. Lee SA, Choi SR, Jang JS, Lee JH, Roh MH, Kim SO et al. Expression of VEGF, EGFR, and IL-6 in gastric adenomas and adenocarcinomas by endoscopic submucosal dissection. *Dig Dis Sci* 2010; 55(7):1955-1963.
179. Yang Q, Ye ZY, Zhang JX, Tao HQ, Li SG, Zhao ZS. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and vascular endothelial growth factor protein in gastric carcinoma and its relationship to its pathological features and prognosis. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293(12):2012-2019.
180. Suzuki S, Dobashi Y, Hatakeyama Y, Tajiri R, Fujimura T, Heldin CH et al. Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor-beta phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:659.:659.
181. Wang X, Cao W, Mo M, Wang W, Wu H, Wang J. VEGF and cortactin expression are independent predictors of tumor recurrence following curative resection of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102(4):325-330.
182. Zhao ZQ, Yang S, Lu HS. Expression of midkine and vascular endothelial growth factor in gastric cancer and the association of high levels with poor prognosis and survival. *Mol Med Report* 2012; 5(2):415-419.
183. Liu YF, Guo S, Zhao R, Chen YG, Wang XQ, Xu KS. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with tumor recurrence and poor prognosis in patients with pN0 gastric cancer. *World J Surg* 2012; 36(1):109-117.

184. Partyka R, Gonciarz M, Jalowiecki P, Kokocinska D, Byrczek T. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP 2) expression in gastric cancer tissue. *Med Sci Monit* 2012; 18(4):BR130-BR134.
185. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R et al. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56(11):2671-2676.
186. Kido S, Kitadai Y, Hattori N, Haruma K, Kido T, Ohta M et al. Interleukin 8 and vascular endothelial growth factor -- prognostic factors in human gastric carcinomas? *Eur J Cancer* 2001; 37(12):1482-1487.
187. Vidal O, Metges JP, Soriano-Izquierdo A, Palacvn A, Elizalde I, Castells A et al. Prognostic value of angiogenesis in patients following curative resection of gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings 2005; 23, No 16S (June 1 Supplement).
188. Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Ohro S et al. Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters. *J Surg Oncol* 2007; 95(2):123-128.
189. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15(2):826-832.
190. Tang H, Wang J, Bai F, Zhai H, Gao J, Hong L et al. Positive correlation of osteopontin, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Cancer Invest* 2008; 26(1):60-67.
191. Zhao HC, Qin R, Chen XX, Sheng X, Wu JF, Wang DB et al. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(47):7598-7603.
192. Joo YE, Sohn YH, Joo SY, Lee WS, Min SW, Park CH et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 status for angiogenesis in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2002; 17(4):211-219.
193. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77(5):858-863.

194. Bazas VM, Lukyanova NY, Demash DV, Galakhin KO, Myasoedov DV. Relation between cell-to-cell adhesion and angiogenesis and clinico-morphological prognostic factors in patients with gastric cancer. *Exp Oncol* 2008; 30(3):235-239.
195. Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, Miyagi M, Imaizumi T, Takeda J et al. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8(3):155-163.
196. Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85(11):2340-2346.
197. Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8(2):86-94.
198. Liu L, Li Z, Feng G, You W, Li J. Expression of connective tissue growth factor is in agreement with the expression of VEGF, VEGF-C, -D and associated with shorter survival in gastric cancer. *Pathol Int* 2007; 57(11):712-718.
199. Lazar D, Raica M, Sporea I, Taban S, Goldis A, Cornianu M. Tumor angiogenesis in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47(1):5-13.
200. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53(19):4727-4735.
201. Yamamoto S, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Haruma K, Kajiyama G et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas. *Pathol Int* 1998; 48(7):499-506.
202. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M et al. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73(8):884-888.
203. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94(6):715-725.

204. Yano H, Kinuta M, Tateishi H, Nakano Y, Matsui S, Monden T et al. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer* 1999; 2(1):26-32.
205. Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Syouji T et al. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 192(2):215-225.
206. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Zbar A, Kouraklis G, Simopoulos C et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; 236(1):37-42.
207. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, Kapsoritakis A, Paspatis G, Kakolyris S et al. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncol Res* 2000; 12(1):33-41.
208. Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8(6):994-998.
209. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59(3):728-733.
210. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000; 106(4):511-521.
211. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19):10857-10862.
212. Hayashibara T, Yamada Y, Miyanishi T, Mori H, Joh T, Maeda T et al. Vascular endothelial growth factor and cellular chemotaxis: a possible autocrine pathway in adult T-cell leukemia cell invasion. *Clin Cancer Res* 2001; 7(9):2719-2726.
213. von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R, Plath T, Schirner M et al. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic

- cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology* 2000; 119(5):1358-1372.
214. de Jong JS, van Diest PJ, van d, V, Baak JP. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 1998; 184(1):44-52.
215. Meister B, Grunebach F, Bautz F, Brugger W, Fink FM, Kanz L et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1999; 35(3):445-449.
216. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001; 98(6):1904-1913.
217. Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Kido A, Sakitani H, Iki K et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors during lung carcinogenesis by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol Carcinog* 1999; 24(4):287-293.
218. Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286(3):505-512.
219. Hirashima Y, Yamada Y, Matsubara J, Takahari D, Okita N, Takashima A et al. Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2009; 100(2):310-315.
220. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S et al. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 1998; 5(7):585-589.
221. Erenoglu C, Akin ML, Uluutku H, Tezcan L, Yildirim S, Batkin A. Angiogenesis predicts poor prognosis in gastric carcinoma. *Dig Surg* 2000; 17(6):581-586.
222. Che X, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S et al. Tumor angiogenesis related to growth pattern and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111(12):1090-1093.

223. Araya M, Terashima M, Takagane A, Abe K, Nishizuka S, Yonezawa H et al. Microvessel count predicts metastasis and prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol* 1997; 65(4):232-236.
224. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13(2):477-481.
225. Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E et al. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15(2):455-462.
226. Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, Zhang QY, Chen H, Lin M et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12):2866-2869.
227. Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(2):129-134.
228. Maehara Y, Hasuda S, Abe T, Oki E, Kakeji Y, Ohno S et al. Tumor angiogenesis and micrometastasis in bone marrow of patients with early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(9):2129-2134.
229. Ding S, Li C, Lin S, Yang Y, Liu D, Han Y et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions. *Hum Pathol* 2006; 37: 861-866.
230. Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 91(10):1876-1881.
231. van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburg P et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002; 196(2):171-179.
232. Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(2):250-253.

233. Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(4):674-677.
234. Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(2):451-455.
235. Hahm KB, Lim HY, Sohn S, Kwon HJ, Lee KM, Lee JS et al. In vitro evidence of the role of COX-2 in attenuating gastric inflammation and promoting gastric carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002; 21(2):165-176.
236. Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(1):28-33.
237. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1):135-138.
238. Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, Gudis K, Tsukui T, Kishida T et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol* 2004; 35(4):488-495.
239. Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM et al. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001; 7(6):796-800.
240. Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG et al. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8):1662-1666.
241. Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem* 2002; 277(13):10760-10766.
242. Zhang J, Ito R, Oue N, Zhu X, Kitadai Y, Yoshida K et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6):563-568.

243. Takahashi Y, Bucana CD, Akagi Y, Liu W, Cleary KR, Mai M et al. Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(2):429-434.
244. Wang J, Wu K, Zhang D, Tang H, Xie H, Hong L et al. Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(1):386-393.
245. Nakayama T, Yoshizaki A, Kawahara N, Ohtsuru A, Wen CY, Fukuda E et al. Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *Histopathology* 2004; 44(3):232-239.
246. Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61(5):2145-2153.
247. Li SG, Ye ZY, Zhao ZS, Tao HQ, Wang YY, Niu CY. Correlation of integrin beta3 mRNA and vascular endothelial growth factor protein expression profiles with the clinicopathological features and prognosis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(3):421-427.
248. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol* 1998; 152(1):93-100.
249. Kitadai Y. Cancer-Stromal Cell Interaction and Tumor Angiogenesis in Gastric Cancer. *Cancer Microenviron* 2010; 3:109-116
250. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N et al. Interleukin-8 expression in Helicobacter pylori infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994; 47(1):61-66.
251. Teh M, Lee YS. An immunohistochemical study of p53 protein in the different histological subtypes of gastric carcinoma. *Pathology* 1994; 26(4):432-434.
252. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50(6):859-862.
253. Monig SP, Eidt S, Zirbes TK, Stippel D, Baldus SE, Pichlmaier H. p53 expression in gastric cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Dig Dis Sci* 1997; 42(12):2463-2467.

254. Tzanakis NE, Peros G, Karakitsos P, Giannopoulos GA, Efstathiou SP, Rallis G et al. Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric cancer patients. *Acta Chir Belg* 2009; 109(5):606-611.
255. Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y et al. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer--a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999; 79(7-8):1255-1261.
256. Kim JH, Uhm HD, Gong SJ, Shin DH, Choi JH, Lee HR et al. Relationship between p53 overexpression and gastric cancer progression. *Oncology* 1997; 54(2):166-170.
257. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67(3):589-593.
258. Baba M, Konno H, Maruo Y, Tanaka T, Kanai T, Matsumoto K et al. Relationship of p53 and vascular endothelial growth factor expression of clinicopathological factors in human scirrhus gastric cancer. *Eur Surg Res* 1998; 30(2):130-137.
259. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993; 54(5):759-764.
260. Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer* 1996; 69(1):28-33.
261. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9(3):963-969.
262. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265(5178):1582-1584.
263. Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Yamasaki S, Kato M et al. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, Helicobacter pylori infection, and vascular endothelial growth factor expression. *J Surg Oncol* 2002; 80(2):79-88.

264. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55(24):6161-6165.
265. Saito H, Tujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Neoangiogenesis and relationship to nuclear p53 accumulation and vascular endothelial growth factor expression in advanced gastric carcinoma. *Oncology* 1999; 57(2):164-172.
266. Sakatani T, Okamoto E, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, Ito H. Expressions of thymidine phosphorylase (dThdPase) and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in intestinal-type gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2000; 7(4):831-836.
267. Ikeguchi M, Oka S, Saito H, Kondo A, Tsujitani S, Maeta M et al. Nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer strongly correlates with enlargement of nuclear area of cancer cells. *Oncol Rep* 2000; 7(3):579-584.
268. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin JT. Tumor angiogenesis increases with nuclear p53 accumulation in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(47):1453-1456.
269. Boku N, Chin K, Hosokawa K, Ohtsu A, Tajiri H, Yoshida S et al. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res* 1998; 4(6):1469-1474.
270. Diez M, Medrano MJ, Gutierrez A, Lopez A, Muguera JM, Hernandez P et al. P53 protein expression in gastric adenocarcinoma. Negative predictor of survival after postoperative adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res* 2000; 20(5C):3929-3933.
271. Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D et al. Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol* 2007; 210(1):183-191.
272. Chen Y, Zhang S, Chen YP, Lin JY. Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation. *World J Gastroenterol* 2006; 12(32):5135-5139.
273. Kim YB, Han JY, Kim TS, Kim PS, Chu YC. Overexpression of c-H-ras p21 is correlated with vascular endothelial growth factor expression and

- neovascularization in advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(12):1393-1399.
274. Vindigni C, Miracco C, Spina D, Presenti L, Gallorini M, Vatti R et al. Cell proliferation, cell death and angiogenesis in early and advanced gastric cancer of intestinal type. *Int J Cancer* 1997; 74(6):637-641.
275. Ikeguchi M, Cai J, Fukuda K, Oka S, Katano K, Tsujitani S et al. Correlation between spontaneous apoptosis and the expression of angiogenic factors in advanced gastric adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20(2):257-263.
276. Lu C, Tanigawa N. Spontaneous apoptosis is inversely related to intratumoral microvessel density in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57(2):221-224.
277. Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Ito H. Tubular adenoma and intramucosal intestinal-type adenocarcinoma of the stomach: what are the pathobiological differences? *Gastric Cancer* 2003; 6(2):71-79.
278. Osaki M, Sakatani T, Okamoto E, Goto E, Adachi H, Ito H. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 437(1):31-36.
279. Tanimoto H, Yoshida K, Yokozaki H, Yasui W, Nakayama H, Ito H et al. Expression of basic fibroblast growth factor in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991; 61(4):263-267.
280. Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78(12):1573-1577.
281. Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003; 22(4):773-778.
282. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M et al. Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 2003; 23(5A):4079-4083.
283. Futagami S, Tatsuguchi A, Hiratsuka T, Shindo T, Horie A, Hamamoto T et al. Monocyte chemoattractant protein 1 and CD40 ligation have a synergistic

- effect on vascular endothelial growth factor production through cyclooxygenase 2 upregulation in gastric cancer. *J Gastroenterol* 2008; 43(3):216-224.
284. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(19):2979-2990.
285. Kitadai Y, Sasaki A, Ito M, Tanaka S, Oue N, Yasui W et al. Helicobacter pylori infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(4):809-814.
286. Wu CY, Wang CJ, Tseng CC, Chen HP, Wu MS, Lin JT et al. Helicobacter pylori promote gastric cancer cells invasion through a NF-kappaB and COX-2-mediated pathway. *World J Gastroenterol* 2005; 11(21):3197-3203.
287. Pousa ID, Gisbert JP. Gastric angiogenesis and Helicobacter pylori infection. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98(7):527-541.
288. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007; 132(3):1009-1023.
289. Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD. Activation of IL-8 gene expression by Helicobacter pylori is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 1998; 160(5):2401-2407.
290. Hatz RA, Rieder G, Stolte M, Bayerdorffer E, Meimarakis G, Schildberg FW et al. Pattern of adhesion molecule expression on vascular endothelium in Helicobacter pylori-associated antral gastritis. *Gastroenterology* 1997; 112(6):1908-1919.
291. Sasaki A, Kitadai Y, Ito M, Sumii M, Tanaka S, Yoshihara M et al. Helicobacter pylori infection influences tumor growth of human gastric carcinomas. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(2):153-158.
292. Kakeji Y, Maehara Y, Shibahara K, Hasuda S, Tokunaga E, Oki E et al. Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation to angiogenesis. *Gastric Cancer* 1999; 2(1):46-51.

293. Gretschel S, Astrosini C, Vieth M, Jons T, Tomov T, Hocker M et al. Markers of tumour angiogenesis and tumour cells in bone marrow in gastric cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34(6):642-647.
294. Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J et al. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 1991; 27(11):1461-1465.
295. Meza-Junco J, Sawyer MB. Metastatic gastric cancer - focus on targeted therapies. *Biologics* 2012; 6:137-146.
296. Van Cutsem E, de Haas S, Kang YK, Ohtsu A, Tebbutt NC, Ming XJ et al. Bevacizumab in Combination With Chemotherapy As First-Line Therapy in Advanced Gastric Cancer: A Biomarker Evaluation From the AVAGAST Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(17):2119-2127.
297. Kanai T, Konno H, Tanaka T, Baba M, Matsumoto K, Nakamura S et al. Anti-tumor and anti-metastatic effects of human-vascular-endothelial-growth-factor-neutralizing antibody on human colon and gastric carcinoma xenotransplanted orthotopically into nude mice. *Int J Cancer* 1998; 77(6):933-936.
298. Kamiya K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Matsumoto K, Sakaguchi T et al. Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(7):794-800.
299. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1:3-10.:3-10.
300. Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med* 2003. 9(6): 669–676.
301. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(5):469-478.
302. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9(7):936-943.
303. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006; 11:818-29.:818-829.

304. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16986-16992.
305. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A et al. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* 1999; 81(4):568-572.
306. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(1):21-27
307. Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(18):6952-6957.
308. Milanini-Mongiati J, Pouyssegur J, Pagès G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem.* 2002; 277(23):20631-9.
309. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14(1):34-44.
310. Koyama Y, Okayama H, Kumamoto K, Saito K, Nakamura I, Ohki S, Takenoshita S. Overexpression of endoglin (CD105) is associated with recurrence in radically resected gastric cancer. *Exp. Ther Med* 2010; 1(4): 627-633.

