



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΣΤΑΥΡΟΣ Η. ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΩΝ
ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ**

ΓΕΩΡΓΙΑ ΧΑΡΔΑΒΕΛΛΑ

ΙΑΤΡΟΣ

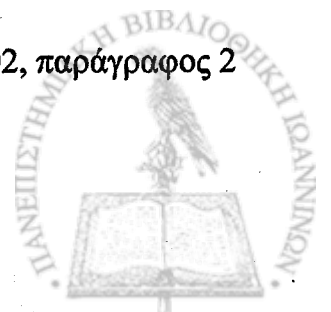
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



«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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Χαρδαβέλλα Γεωργίας: 23-10-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 524^α/27-1-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Βασιλείου Μιλτιάδης Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 601^α/27-3-2007

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-

Εμβρυολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-9-2004

«Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στα καρκινώματα των πνευμόνων. Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους και την πρόγνωση»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 610^α/19-6-2007

1. Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
2. Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας, επιβλέπων
3. Τσατσούλης Αγαθοκλής Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, μέλος
4. Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, μέλος
5. Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
6. Χαραλαμπίδης Κων/νος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία, μέλος
7. Δασκαλόπουλος Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας, μέλος

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-10-2007



ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Στους γονείς μου,

Φώτη και Σοφία



Πρόλογος

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως.

Αποτελεί το πρώτο αίτιο θανάτου από νεοπλασίες και το τρίτο κυριότερο αίτιο θανάτου επί του συνόλου στις αναπτυγμένες χώρες. Η θεραπευτική αντιμετώπισή του αποτελεί μία δύσκολη πρόκληση λαμβάνοντας υπόψιν τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης τα οποία δεν έχουν βελτιωθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Αναμφίβολα, υπάρχει μεγάλη ανάγκη ανεύρεσης δεικτών που θα διαχωρίζουν τους ασθενείς με βάση την πρόγνωση και θα καθιστούν εφικτό τον ανάλογο στοχευμένο θεραπευτικό προγραμματισμό.

Η αγγειογένεση στα κακοήγη νεοπλάσματα αποτελεί μία πολυσταδιακή διεργασία η οποία πυροδοτείται και ελέγχεται από τα καρκινικά κύτταρα, και αποσκοπεί στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου του νεοπλάσματος, ώστε ο όγκος να μπορεί να εκδηλώσει πλήρως το αυξητικό και μεταστατικό του δυναμικό. Πλήθος παραγόντων εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή, με αδιαμφισβήτητα προεξάρχοντα, τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF).

Διάφορες πρόσφατες μελέτες προτείνουν την αξιολόγηση της αγγειογένεσης και της έκφρασης του VEGF ως σημαντικά προγνωστικά στοιχεία στην κλινική πορεία καρκινοπαθών ασθενών. Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται κλινικές δοκιμές που αφορούν σε μονοκλωνικά αντισώματα κατά του VEGF αλλά και σε άλλους αναστολείς της αγγειογένεσης σε διάφορες μορφές κακοηθών νεοπλασμάτων.

Παρόλα αυτά, η διερεύνηση της αγγειογένεσης στα καρκινώματα των πνευμόνων (μικροκυτταρικά και μη μικροκυτταρικά) υπολείπεται σημαντικά.

Η λεμφαγγειογένεση, διαδικασία αντίστοιχη της αγγειογένεσης που αφορά όμως στο λεμφαγγειακό δίκτυο, πιστεύεται ότι κατέχει εξίσου σημαντική θέση στην μεταστατική διασπορά καρκινικών κυττάρων δεδομένου ότι τα λεμφαγγεία αποτελούν αρχική οδό για την



διασπορά των όγκων. Η έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα καρκινώματα των πνευμόνων αποτελεί ένα γεγονός που δεν έχει μελετηθεί ως τώρα επαρκώς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης και στις δύο ιστολογικές κατηγορίες των καρκινωμάτων των πνευμόνων (μικροκυτταρικά και μη μικροκυτταρικά), η μεταξύ τους σύγκριση και η συσχέτισή τους με τις κλινικές παραμέτρους και τα δημογραφικά στοιχεία με απώτερο σκοπό την αναζήτηση προγνωστικών δεικτών που εμπλέκονται στις διαδικασίες αυτές.

Πριν το τέλος αυτού του προλόγου, επιθυμώ να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Σταύρο Κωνσταντόπουλο, ο οποίος ακούραστα προσέφερε την συμπαράσταση και τις επιστημονικές του υποδείξεις στο κλινικό μέρος αυτής της διατριβής, η οποία εκπονήθηκε κάτω από την δική του εποπτεία.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω επίσης:

Στην κ. Νίκη Ι. Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στον κ. Δημήτριο Στεφάνου, αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για το αμέριστο ενδιαφέρον τους, την τεχνογνωσία, την συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Στην κ. Γιωτάννα Δαλαβάγκα, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας – Ιστολογίας – Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για το εν γένει ενδιαφέρον της στην προσπάθειά μου.

Στην κ. Ευδοκία Αρκουμάνη, Ιατρό Παθολογοανατόμο, διδάκτωρα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την σημαντική συνεχή βοήθειά της στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.



Στην κ. Μαρία Γιαννάτου, Ιατρό Αναισθησιολόγο και Διευθύντρια του Αναισθησιολογικού Τμήματος του Γ.Ν.Ν.Θ.Α «Η Σωτηρία», για την ηθική συμπαράστασή της.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πρόθυμη συνεργασία τους για την πραγματοποίηση του τεχνικού μέρους αυτής της μελέτης.

Τέλος, θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω τους γονείς μου χωρίς την συμπαράσταση των οποίων δε θα ολοκληρωνόταν η παρούσα προσπάθεια.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1-60
1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	1-23
• Επιδημιολογικά δεδομένα	1
• Αιτιολογικοί παράγοντες	4
• Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία	8
• Εντοπίσεις-Κλινική εικόνα	12
• Οδοί μεταστάσεων	15
• Σταδιοποίηση	17
• Διαγνωστικές μέθοδοι	20
• Θεραπευτική αντιμετώπιση	21
• Πρόγνωση	22
2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	25-52
• Εισαγωγή	25
• Νεοαγγειογένεση και ανάπτυξη όγκων	27
• Ρύθμιστές της αγγειογένεσης	30-37
Ενισχυτικοί παράγοντες	30
Ανασταλτικοί παράγοντες	34
• Αξιολόγηση της αγγειογένεσης και μέτρηση μικροαγγείων στα καρκινώματα των πνευμόνων	37-55
Επιλογή αντισώματος	37
Μέθοδοι καταμέτρησης	38



Η μικροαγγειακή πυκνότητα στα καρκινώματα των πνευμόνων	40
• Η οικογένεια του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF)	41
Πρωτεϊνική δομή και βιολογικές δράσεις	41
• Οι υποδοχείς του VEGF	44
Υποδοχέας VEGF-R1	44
Υποδοχέας VEGF-R2	45
Neuropilins NP1, NP2	46
• Βιολογικές δράσεις του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα	46
• Ρυθμιστικοί παράγοντες του VEGF και της έκφρασής του	48
• Θεραπευτικές προοπτικές	50
3. ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	53-60
• Εισαγωγή	53
• Λεμφαγγειογένεση και καρκίνος-Μοριακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί	54
• Η λεμφαγγειογένεση στον καρκίνο πνεύμονα	55
• Αναστολή της λεμφαγγειογένεσης	56
• CD105 και λεμφαγγειογένεση	57
• Μοριακά χαρακτηριστικά του CD105	58
Πρωτεϊνική δομή	58
Μηχανισμός δράσης	58
• CD105 και πρόγνωση σε νεοπλασίες	59



ΣΚΟΠΟΣ	61-62
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	63-132
1. Υλικό και μέθοδοι	65-70
• Επιλογή δείγματος	65
• Ασθενείς-Κλινικοπαθολογικά δεδομένα-Επιβίωση	66
• Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας	67
• Αξιολόγηση της έκφρασης των VEGF, VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1 και CD105	68
• Στατιστική επεξεργασία	70
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71-122
• Μη ΜΚΠ-Έκφραση αντισωμάτων και συσχέτιση αυτών με κλινικές παραμέτρους	74-98
Έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1	74
CD105 και λεμφαγγειακή προσβολή στα μη ΜΚΠ	86
• ΜΚΠ-Έκφραση αντισωμάτων και συσχέτιση αυτών με κλινικές παραμέτρους	98-122
Έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1	98
CD105 και λεμφαγγειακή προσβολή στα μη ΜΚΠ	110
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	123-129
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131-132



Περίληψη	133-135
Abstract	137-139
Βιβλιογραφία	141-176



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Ο παρών προγραμματικός οδηγός περιγράφει τις διαδικασίες και τα κριτήρια για την επιλογή των υποψηφίων επιχειρηματιών που θα συμμετάσχουν στο πρόγραμμα. Ο οδηγός αυτός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του προγράμματος και ισχύει για όλους τους υποψηφίους επιχειρηματίες που θα συμμετάσχουν στο πρόγραμμα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ο παρών οδηγός περιγράφει τις διαδικασίες και τα κριτήρια για την επιλογή των υποψηφίων επιχειρηματιών που θα συμμετάσχουν στο πρόγραμμα. Ο οδηγός αυτός αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του προγράμματος και ισχύει για όλους τους υποψηφίους επιχειρηματίες που θα συμμετάσχουν στο πρόγραμμα.



ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Επιδημιολογικά δεδομένα

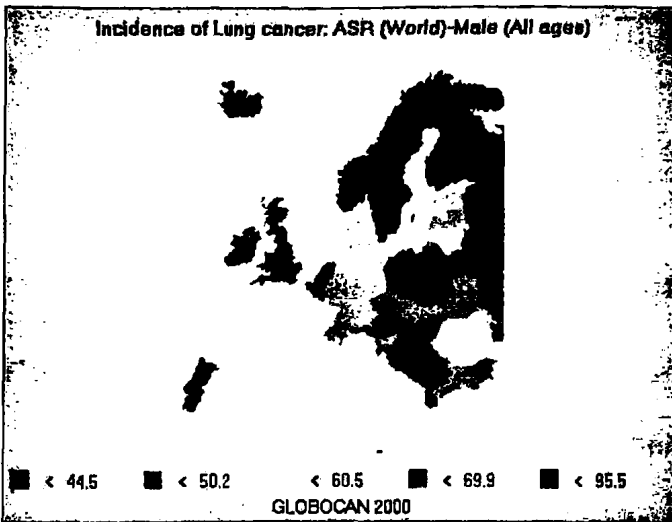
Κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητα του καρκίνου του πνεύμονα παρουσίασαν αλματώδη αύξηση στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες καθιστώντας τον μία από τις μεγαλύτερες επιδημίες του περασμένου αιώνα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί στις μέρες μας τη συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως με ποσοστό 12,3% επί του συνόλου των νεοεμφανιζόμενων μορφών καρκίνου. Στους άνδρες, τα μεγαλύτερα ποσοστά επίπτωσης παρατηρούνται στην Ευρώπη (ιδιαίτερα Ανατολική Ευρώπη) και στη Βόρεια Αμερική ενώ στις γυναίκες παρατηρούνται στη Βόρεια Αμερική και στη Βορειοδυτική Ευρώπη¹.

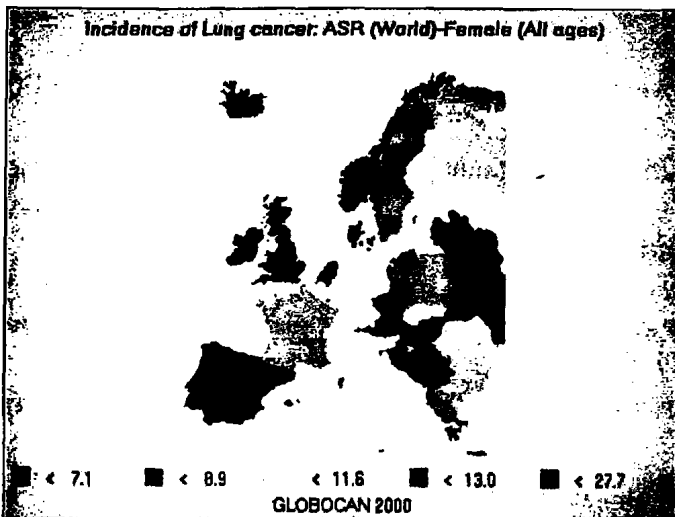
Σε ευρωπαϊκό επίπεδο ο καρκίνος του πνεύμονα κατέχει εξίσου σημαντική θέση με 400.000 νέα κρούσματα ετησίως² και αποτελεί το 25% των νεοεμφανιζόμενων καρκίνων στους άνδρες και το 6% όλων των καρκίνων στις γυναίκες.

Παρατηρούνται διαφορές στη συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ διαφορετικών περιοχών και πληθυσμών στην Ευρώπη. Όσον αφορά στους άνδρες τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης και αθροιστικού κινδύνου είναι στην Ανατολική Ευρώπη (Εικόνα 1) ενώ στις γυναίκες στη Βόρεια Ευρώπη και μάλιστα σε ποσοστό διπλάσιο σε σχέση με τη Δυτική και υπερδιπλάσιο σε σχέση με την Ανατολική και Νότια Ευρώπη (Εικόνα 2).





Εικόνα 1: Επίπτωση καρκίνου πνεύμονα σε άνδρες όλων των ηλικιών, στον ευρωπαϊκό χώρο. (Πηγή: GLOBOCAN 2002)



Εικόνα 2: Επίπτωση καρκίνου του πνεύμονα σε γυναίκες όλων των ηλικιών στον ευρωπαϊκό χώρο. (Πηγή: GLOBOCAN 2002)

Στοιχεία του 2000 από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Αρχείων Καταγραφής Νεοπλασιών (European Network of Cancer Registries) που αφορούσαν σε κάθε ευρωπαϊκή χώρα χωριστά έδειξαν ότι τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης σε άνδρες, τυποποιημένα ως προς την ηλικία,



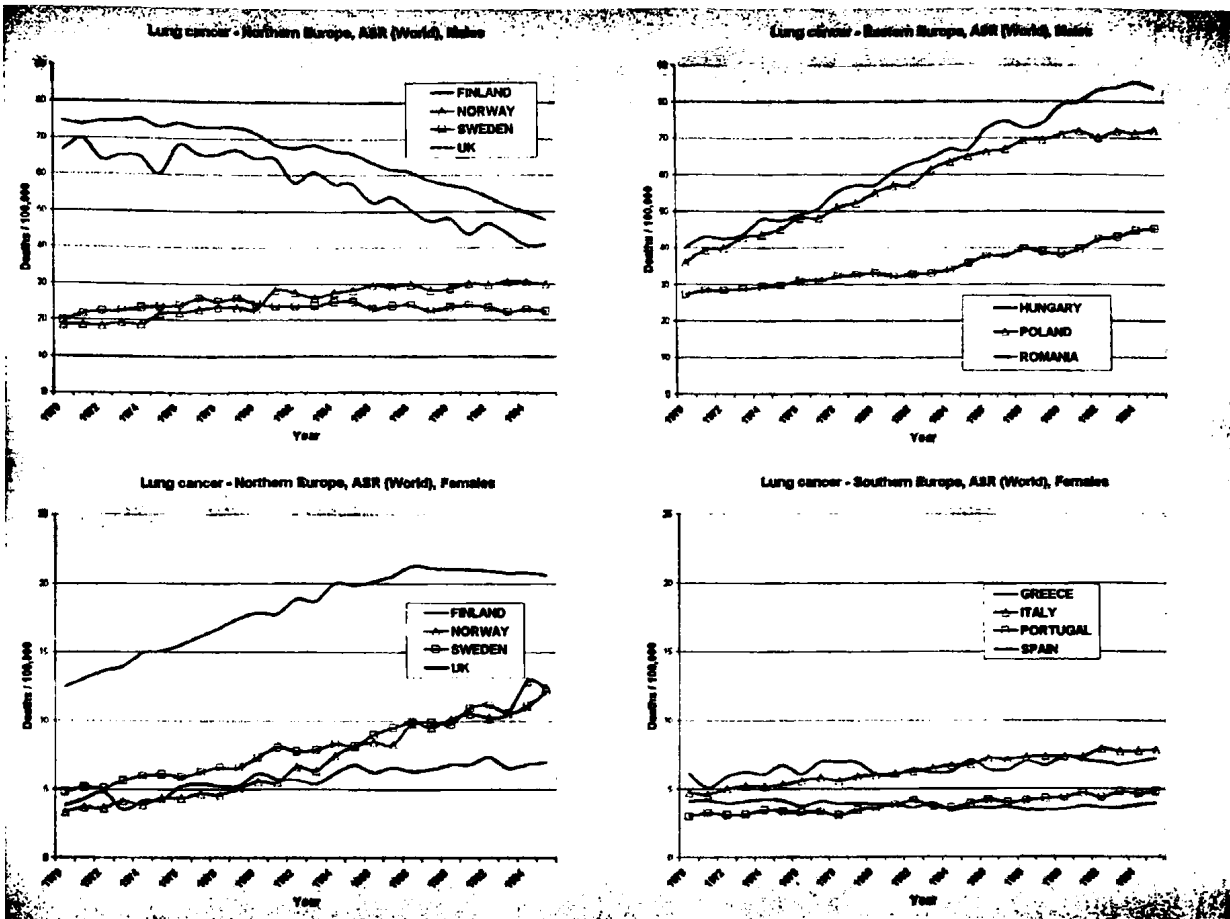
παρατηρήθηκαν στην Ουγγαρία ($95.5/10^5$), Κροατία ($82.5/10^5$), Βοσνία-Ερζεγοβίνη ($82.2/10^5$) και Γιουγκοσλαβία ($80.9/10^5$) και για γυναίκες στη Δανία ($27.7/10^5$), Ισλανδία ($23.8/10^5$), Ουγγαρία ($22.6/10^5$), και Ηνωμένο Βασίλειο ($21.8/10^5$). Η Ελλάδα βρίσκεται στη μέση της κατάταξης με $55.8/10^5$ για τους άνδρες και $8.3/10^5$ για τις γυναίκες (1) ενώ σύμφωνα με τα νεότερα δεδομένα του 2002, ο 5ετής επιπολασμός της νόσου για τους Έλληνες άνδρες είναι 12, 9% και για τις Ελληνίδες μόλις 2, 3%³.

Σήμερα ο καρκίνος του πνεύμονα εξακολουθεί να αποτελεί το πρώτο αίτιο θανάτου από νεοπλασίες^{4,5} και το τρίτο κυριότερο αίτιο θανάτου επί του συνόλου (6%) στις αναπτυγμένες χώρες⁶. Το 2001 βρισκόταν στην 10^η θέση (2, 4%) του δείκτη DALY's (Disability Adjusted Life Years-Χρόνια Χαμένης Υγιούς Ζωής) στις αναπτυγμένες χώρες⁷.

Στον ευρωπαϊκό χώρο, τα ποσοστά θνησιμότητας στους άνδρες μειώνονται στη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη (π.χ Ηνωμένο Βασίλειο ή Φινλανδία) (Διάγραμμα 1) ή είναι χαμηλά και σταθερά ενώ παρατηρείται αύξηση σε χώρες όπως η Ρουμανία και η Ουγγαρία.

Μέχρι πρόσφατα, τα ποσοστά θνησιμότητας των γυναικών στο Ηνωμένο Βασίλειο ήταν υψηλά και με αυξητική τάση αλλά από το 1989 και μετά παρουσίασαν τάση μείωσης. Τα τελευταία 25 χρόνια έχει παρατηρηθεί μία αντίστοιχη αύξηση των ποσοστών αυτών στη Σουηδία και τη Νορβηγία τα οποία παρόλα αυτά εξακολουθούν να είναι χαμηλότερα από του Ηνωμένου Βασιλείου. Αντιθέτως, χώρες της Νότιας Ευρώπης όπως η Ελλάδα και η Ισπανία εξακολουθούν να έχουν χαμηλά και σταθερά ποσοστά θνησιμότητας από τον καρκίνο του πνεύμονα ή έστω μία σχετικά μικρή αύξηση (Ιταλία, Πορτογαλία).





Διάγραμμα 1: Δείκτες θνησιμότητας για τον καρκίνο του πνεύμονα σε Βόρεια και Νότια Ευρώπη, και για τα δύο φύλα. (Πηγή: GLOBOCAN 2002)

Αιτιολογικοί παράγοντες

Καπνός

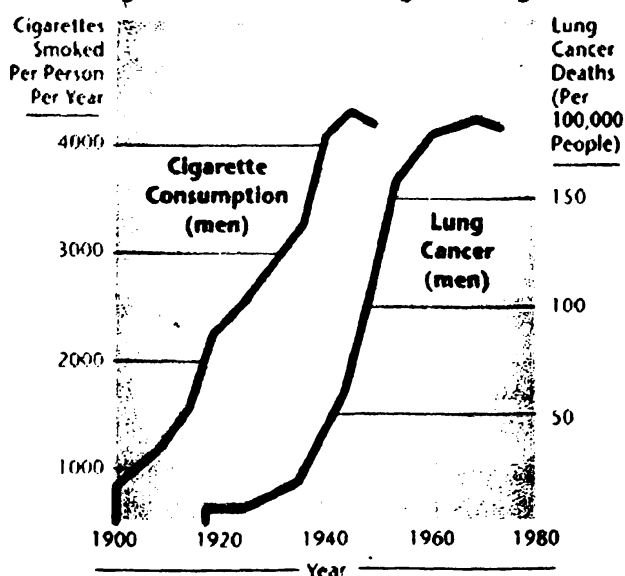
Σήμερα είναι γνωστό ότι ο καπνός του τσιγάρου περιέχει ένα μείγμα καρκινογόνων ουσιών. Το κάπνισμα αποτελεί τον κυριότερο αιτιολογικό παράγοντα που σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα, ιδιαίτερα για τους ιστολογικούς τύπους του μικροκυτταρικού και επιθηλιακού. Έχει αποδειχτεί ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα είναι δεκαπλάσιος στους καπνιστές⁸. Ο κίνδυνος αυξάνει με την ένταση και διάρκεια του καπνίσματος καθώς και με την περιεκτικότητα του καπνού σε πίσσα⁹⁻¹⁶.



Τα κύρια καρκινογόνα του καπνού των σιγαρέτων είναι βενζοπυρένια, νιτροζαμίνες και το βενζαθρακένιο.

Η διακοπή του καπνίσματος συνοδεύεται από σταδιακή ελάττωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου¹⁷· μέχρι εξίσωσης με τον κίνδυνο του μη καπνιστού μετά την παρέλευση δεκαπενταετίας. Δυστυχώς, η προσπάθεια διακοπής του καπνίσματος προσκρούει στον ισχυρό εθισμό στη νικοτίνη. Τελευταία έχουν εισαχθεί στην αγορά εναλλακτικές μορφές καπνού (π.χ σουηδικό snuff) οι οποίες φαίνεται να είναι λιγότερο βλαβερές σε σχέση με τον κλασικό καπνό¹⁸⁻²⁰. Στο διάγραμμα 2 φαίνεται ο λανθάνων χρόνος αντίδρασης από τη μαζική έναρξη καπνίσματος στους άνδρες στις αρχές του 20^{ου} αιώνα μέχρι την εμφάνιση των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα²¹. Το παθητικό κάπνισμα ενοχοποιείται εξίσου ως προς την πρόκληση νεοπλασματικών εξεργασιών στον πνεύμονα²²⁻³¹.

20-Year Lag Time Between Smoking and Lung Cancer



Διάγραμμα 2: Λανθάνον διάστημα 20 ετών μεταξύ της έναρξης μαζικής κατανάλωσης τσιγάρων από τους άνδρες στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και την έναρξη εμφάνισης θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα.



Ατμοσφαιρική ρύπανση

Επιδημιολογικά στοιχεία συνάδουν με τα κλινικά και πειραματικά στοιχεία ως προς τον συσχετισμό των επιπέδων ατμοσφαιρικής ρύπανσης, τόσο σε εξωτερικό όσο και σε εσωτερικό περιβάλλον, με επιπτώσεις στο αναπνευστικό σύστημα, μεταξύ των οποίων και η πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα. Οι ατμοσφαιρικοί ρυπαντές, όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το διοξείδιο του θείου (SO₂), οξείδια αζώτου (NO_x), πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs), όζον (O₃), βαρέα μέταλλα και εισπνεόμενα σωματίδια (PM_{2.5} και PM₁₀), διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χημική τους σύσταση, ιδιότητες αντίδρασης, εκπομπή, χρόνο αποδόμησης καθώς και ικανότητα διάχυσης σε μεγάλες ή μικρές αποστάσεις. Η ατμοσφαιρική ρύπανση επιφέρει οξείες και χρόνιες επιπλοκές στο αναπνευστικό σύστημα οι οποίες ποικίλουν από ελάσσονα ερεθισμό της ανώτερης αναπνευστικής οδού, οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις στα παιδιά και χρόνια βρογχίτιδα στους ενήλικες μέχρι και καρκίνο του πνεύμονα. Επιπροσθέτως, έκθεση μικρής ή μεγάλης διάρκειας σχετίζεται με πρόωμη θνησιμότητα και μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης³²⁻⁴⁸.

Επαγγελματικοί παράγοντες

Η έκθεση σε ίνες αμιάντου ενοχοποιείται για την εμφάνιση βρογχογενούς καρκίνου ή μεσοθηλιώματος (υπεζωκότα ή περιτοναίου). Έχει αποδειχτεί ότι εργάτες μεταλλείων ή χυτηρίων νικελίου, αργύρου, χρωμίου, καδμίου, βηρυλλίου, κοβαλτίου, χάλυβα, σεληνίου και ραδιενεργών υλικών έχει αποδειχτεί ότι ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν και άλλοι βλαβεροί δυνητικά καρκινογόνοι παράγοντες (π.χ κάπνισμα)⁴⁹⁻⁶² (Πίνακας 1).



Παραγωγή εντομοκτόνων (αρσενικό)
Εργάτες αμπελουργίας (αρσενικό)
Εργάτες ασφάλτου
Εργάτες φωταερίου
Βιομηχανία παραγωγής αμιάντου
Εργάτες κατασκευών/μονώσεων
Εργάτες ναυπηγείων/λιμανιών
Εξόρυξη: αρσενικού, σιδηρομεταλλεύματος, αμιάντου, ουρανίου/ραδονίου
Χημικές βιομηχανίες: χρωμιούχες χρωστικές, δις-χλωρομεθυλμεθυλαιθέρας (BCME)/χλωρομεθυλαιθέρας (CMME)
Μεταλλουργία: παραγωγή συσσωρευτών, επεξεργασία καδμίου, επεξεργασία χαλκού, επιχρωμιώσεις, παραγωγή σιδηροχρωμίου, παραγωγή χάλυβα, κάθαρση νικελίου, χυτήρια σιδήρου
Αζωθυπερίτης
Άλλα επαγγέλματα με έκθεση στον αμιάντο

Πίνακας 1: Αναγνωρισμένα καρκινογόνα και επαγγέλματα με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα για τον άνθρωπο.

Όλοι οι εξωγενείς παράγοντες που προαναφέρθηκαν προκαλούν ή προδιαθέτουν σε βλάβες του γονιδιώματος των κυττάρων, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν την έναρξη της καρκινογένεσης. Οι βλάβες του γονιδιώματος αφορούν κατά κανόνα ενεργοποίηση



ογκογονιδίων ή αναστολή κατασταλτικών ογκογονιδίων. Συνήθως απαιτείται μια μεγάλη σειρά γενετικών βλαβών προκειμένου να δημιουργηθεί ένας παθολογικός κλώνος καρκινικών κυττάρων. Από το σημείο αυτό ως την ανάπτυξη του όγκου συμμετέχουν και πεπτιδικές ορμόνες που παράγονται από τα ίδια καρκινικά κύτταρα και δρουν σαν αυξητικοί παράγοντες⁸.

Ιστολογία – Παθολογική ανατομία

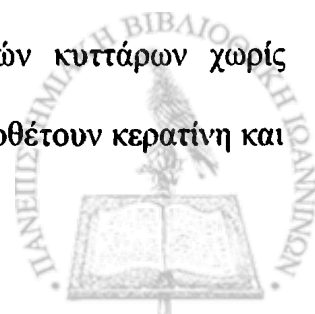
Με την πρόοδο και την ανάπτυξη των διαγνωστικών και διαφοροδιαγνωστικών μεθόδων, σπάνια βρίσκει κανείς σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία την έκθεση της συχνότητας των διαφόρων μορφών του καρκινώματος πνεύμονα⁶³⁻⁶⁵. Αυτό αποφεύγεται γιατί τα κριτήρια διάγνωσης είναι ποικίλα καθώς και η διάγνωση μικτών τύπων φαίνεται ότι είναι σαφώς αυξανόμενη⁶⁶.

Έχουν προταθεί διάφορες ταξινομήσεις, αλλά θα παρατεθεί η ευρύτερα προτεινόμενη και χρησιμοποιούμενη σήμερα, που προέρχεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO)⁶⁷.

Περιλαμβάνει τις παρακάτω κατηγορίες:

1. Καρκίνωμα από πλακώδη κύτταρα (επιδερμοειδές)

Διακρίνεται σε καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένο. Αντιστοιχεί στο 30 ή 40% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του πνεύμονα. Αναπτύσσεται συνήθως στις κεντρικές περιοχές ή γύρω από βασικούς βρόγχους, με πολίστιβη ή ψευδοπορώδη διάταξη. Η καλά διαφοροποιημένη μορφή με σαφή κερατινοποίηση είναι σπάνια. Συνήθως τα κύτταρα εμφανίζουν στρογγυλές μαργαριτοειδείς μάζες από επιθηλιακά κύτταρα με ανεξάρτητη κερατινοποίηση. Παρατηρείται συγκεντρική διάταξη των επιθηλιακών κυττάρων χωρίς ουσιώδη κερατινοποίηση και με ικανή πολυμορφία. Οι όγκοι αυτοί εναποθέτουν κερατίνη και



κατά την ανάπτυξή τους αναπτύσσουν μία νεκρωτική, κεράτινη μάζα η οποία εμφανίζεται τυροειδής κατά τη διατομή⁶⁶⁻⁶⁸ (Εικόνα 3).

2. Αδενοκαρκίνωμα

α. Χωρίς ειδικούς χαρακτήρες

β. Βρογχιολοκυψελιδικό

Τα αδενοκαρκινώματα εμφανίζονται περιφερικά από βλεννώδεις αδένες και τα κύτταρα διατηρούν μέρος της σωληνώδους, κυψελιδώδους ή θηλώδους διαφοροποίησης και παραγωγής βλέννης⁶⁶⁻⁶⁸ (Εικόνα 4). Συνήθως προσβάλλουν τον υπεζωκότα και τους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και συχνά μεθίστανται στον εγκέφαλο και τα οστά. Επίσης, μπορεί να παρουσιαστούν γύρω από ουλώδη ιστό ή να σχετίζονται με ιστορικό έκθεσης σε αμίαντο και είναι αναλογικά λιγότερο συχνά σε μη καπνιστές. Η διαφορική διάγνωση από άλλου τύπου καρκινώματα γίνεται με την αναζήτηση βλέννης με τη χρώση PAS (Periodic Acid Schiff)⁶⁶.

3. Αδενοπλακώδες (αδενοεπιδερμοειδές)

Παρουσιάζει αδένες, παραγωγή βλεννίνης (10%) και πλακώδη διαφοροποίηση (>10%). Εμφανίζει ταυτόχρονα χαρακτηριστικά αδενοκαρκινώματος και καρκινώματος από πλακώδη κύτταρα^{69,70}.

4. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

α. Κλασσικό Oat cell

β. Μικτό μικρό/μεγάλο κυτταρικό

γ. συνδυαζόμενο



Το κλασικό μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (oat cell) αντιστοιχεί στο 20-30% όλων των καρκίνων πνεύμονα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εκκρίνουν ένα μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδικών ορμονών, γεγονός που θεωρείται αποτέλεσμα της ανάπτυξής τους από το σύστημα APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Το γεγονός αυτό συντελεί στην εμφάνιση εξωπνευμονικών εκδηλώσεων όπως το σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (SIADH- Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion) και το σύνδρομο έκτοπης παραγωγής αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH- Adrenocorticotropic Hormone)^{69,70}. Η συγκεκριμένη μορφή νεοπλασματος ανταποκρίνεται στη χημειοθεραπεία ενώ σχετίζεται άμεσα με το κάπνισμα ως αιτιολογικό παράγοντα. Μικροσκοπικά, εμφανίζει σειρές ελλειψοειδών ή ατρακτοειδών κυττάρων με βαθυχρωματικούς πυρήνες και μικρό κυτταρόπλασμα. Η εκκριτική δραστηριότητά τους φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μέσω της παρουσίας νευροεκκριτικών κοκκίων στο κυτταρόπλασμα^{66,67,71,72} (Εικόνα 5).

5. Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα

Μικροσκοπικά εμφανίζει μεγάλα κύτταρα χωρίς την παρουσία αδένων, μαργαριτοειδείς μάζες κερατίνης ("keratin pearls"), διακυττάρειες γέφυρες, μέτριο κυτταρόπλασμα, υψηλό μιτωτικό βαθμό, ανομοιόμορφη χρωματίνη, προεξάρχοντα πυρήνια^{66,67} (Εικόνα 6). Είναι ιδιαίτερα κακοήθης μορφή με ταχείες μεταστάσεις.

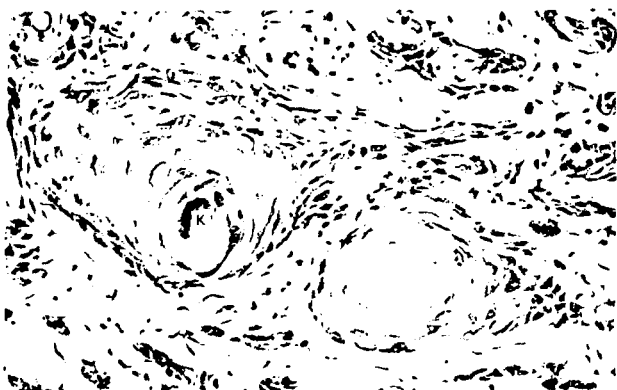
6. Γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα

Πρόκειται για ένα ιδιαίτερα σπάνιο νεόπλασμα που αντιστοιχεί στο 0,4% των καρκινωμάτων πνεύμονα. Διακρίνεται για την ιστολογική ετερογένειά του καθώς και την επιθηλιακή και μεσεγχυματική διαφοροποίησή του. Είναι ιδιαίτερα κακοήθης με ταχείες μεταστάσεις^{66,67,71,72}.



7. Ειδικοί-σπάνιοι τύποι (Καρκινοειδές, Αδενοκυστικό, Βλεννοεπιδερμοειδές, Διαυγοκυτταρικό, Βασικοκυτταρικό)⁶⁶

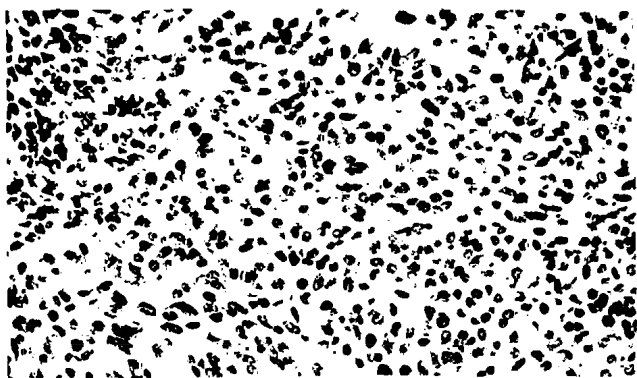
Λόγω διαφορών στη βιολογική συμπεριφορά και στη θεραπευτική αντιμετώπιση, πολλοί κλινικοί γιατροί διαιρούν τους όγκους αυτούς σε μικροκυτταρικού και σε μη μικροκυτταρικού τύπου καρκινώματα⁷³. Οι ιστολογικοί τύποι όπως προτείνονται παραπάνω από την WHO αποτελούν σήμερα τη βάση για τη διάγνωση με το κοινό μικροσκόπιο. Έχουν άλλοτε μικρότερη και άλλοτε μεγαλύτερη συσχέτιση με την εντόπιση, την μακροσκοπική εμφάνιση, την παθογένεια, την πρόγνωση, τις μεταστάσεις και την ανάπτυξη παρανεοπλασματικών φαινομένων.



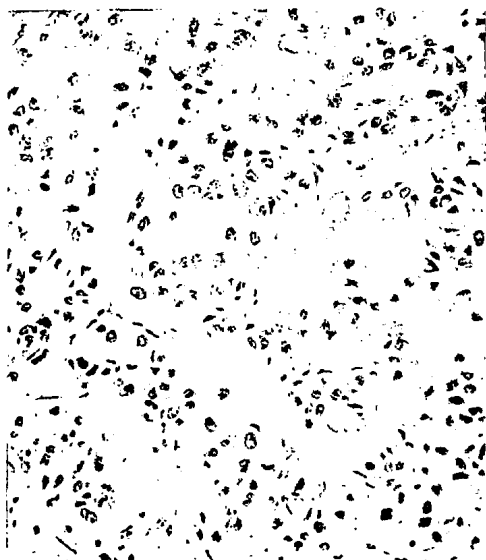
Εικόνα 3: Καρκίνωμα από πλακώδη κύτταρα του πνεύμονα με διαφόρου βαθμού διαφοροποίηση. Περιοχές καλής διαφοροποίησης με άφθονη παραγωγή κερατίνης (K)⁷³.



Εικόνα 4: Ιστολογική εικόνα κυψελιδώδους τύπου αδενοκαρκινώματος πνεύμονα με εμφανείς αδενοειδείς χώρους (S) επενδύομενους από κυλινδρικό επιθήλιο⁷³.



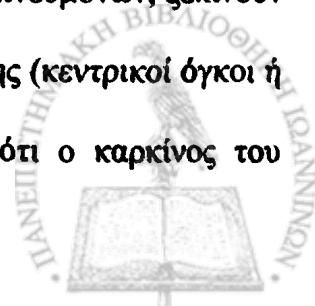
Εικόνα 5: Μικροκυτταρικό αναπλαστικό καρκίνωμα πνεύμονα. Αυτό το είδος καρκίνου παρουσιάζει νευροενδοκρινική διαφοροποίηση. Τα κύτταρα έχουν στρογγυλό ή ωειδές σχήμα και λίγο πρωτόπλασμα. Εγείρεται η υπόνοια νεοπλάσματος από λεμφικά κύτταρα. Άλλες μορφές χαρακτηρίζονται από επιμηκυμένους πυρήνες και περισσότερο πρωτόπλασμα (ποικιλία με ενδιάμεσα κύτταρα)⁷³.



Εικόνα 6: Αναπλαστικό καρκίνωμα του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα. Όγκος αποτελούμενος από πολύμορφα μεγάλα κύτταρα χωρίς ιδιαίτερους μορφολογικούς χαρακτήρες διαφοροποίησης⁷³.

Εντοπίσεις – Κλινική εικόνα

Το σαφώς μεγαλύτερο ποσοστό (~70%), γενικά των νεοπλασμάτων των πνευμόνων, ξεκινούν από τους βρόγχους ή γύρω από αυτούς, είναι δηλαδή κεντρικής εντόπισης (κεντρικοί όγκοι ή όγκοι των πυλών). Σε σειρές από μελέτες έχει διαπιστωθεί επίσης ότι ο καρκίνος του



πνεύμονα εντοπίζεται συχνότερα στους άνω λοβούς και περισσότερο στον δεξιό πνεύμονα⁷³. Η κεντρική εντόπιση συνοδεύεται και από ορισμένα χαρακτηριστικά μακροσκοπικά στοιχεία που προκαλούν αντίστοιχα κλινικά φαινόμενα ή θέτουν κλινικές υποψίες. Αυτά είναι η εξέλκωση του βρόγχου, η βρογχική απόφραξη και η κεντρική νέκρωση. Κατ' αυτόν τον τρόπο έχουμε χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα όπως αιμόπτυση, δύσπνοια και βρογχεκτασία ή ύποπτα όπως αύξηση εκκρίσεων (πτύελα), απώλεια βάρους, πυρετό και νυκτερινούς ιδρώτες. Τα περιφερικής εντόπισης νεοπλάσματα (~30%) προέρχονται από περιφερικούς αεραγωγούς ή από τις κυψελίδες, εμφανίζουν συνήθως "κλινική σιγή" και συνήθως ανακαλύπτονται τυχαία (ακτινογραφία θώρακος)^{66,73}.

Οι συχνότεροι λόγοι προσφυγής του ασθενούς στο γιατρό είναι⁷⁴:

1. εμφάνιση νέου συμπτώματος από το αναπνευστικό ή επιδείνωση παλαιού
2. τυχαίο ακτινολογικό εύρημα κατά τη διάρκεια εξέτασης ρουτίνας
3. εμφάνιση μη ειδικών συμπτωμάτων (κακουχία, απώλεια βάρους, υποτροπιάζον γριπώδες σύνδρομο)
4. συμπτώματα από μεταστατική νόσο και
5. συμπτώματα από παρανεοπλασματική νόσο.

Η κλινική συμπεριφορά των διαφορετικών ιστολογικών τύπων του καρκίνου του πνεύμονα διαφέρει, ανάλογα με τη θέση ανάπτυξής τους και την ταχύτητα με την οποία εμφανίζονται οι μεταστάσεις. Στους πίνακες 2, 3 και 4 αναφέρονται τα συμπτώματα σε σχέση με την εντόπιση του όγκου^{8,74-76}.



• Βήχας
• Αιμόπτυση
• Συριγμός
• Δύσπνοια (από απόφραξη βρόγχου)
• Πνευμονίτιδα από απόφραξη (πυρετός, παραγωγικός βήχας)
• Θωρακικός πόνος

Πίνακας 2: Συμπτώματα από κεντρική ή ενδοβρογχική ανάπτυξη του όγκου

• Στένωση της τραχείας (δύσπνοια)
• Πίεση του οισοφάγου (δυσφαγία)
• Παράλυση του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου (βράγχος φωνής)
• Πάρεση του φρενικού νεύρου με άνωση του ημιδιαφράγματος και δύσπνοια
• Παράλυση του συμπαθητικού πλέγματος (σύνδρομο Claude-Bernard-Horner: ενόφθαλμος μύση, πτώση του βλεφάρου, ετερόπλευρη σύστοιχη ανιδρωσία του προσώπου)
• Διήθηση του 8 ^{ου} αυχενικού και των πρώτων θωρακικών νεύρων (σύνδρομο Pancoast: όγκος της κορυφής)
• Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας
• Διήθηση περικαρδίου και μυοκαρδίου με επιπωματισμό, αρρυθμίες και καρδιακή ανεπάρκεια
• Απόφραξη λεμφαγγείων (υπεζωκοτική συλλογή)
• Λεμφαγγειακή διασπορά με δύσπνοια και υποξυγοναιμία

Πίνακας 3: Συμπτώματα από τοπική επέκταση του όγκου στο θώρακα

• Πόνος από διήθηση του υπεζωκότα ή του θωρακικού τοιχώματος
• Βήχας από ερεθισμό του υπεζωκότα
• Δύσπνοια από πόνο ή υπεζωκοτική συλλογή
• Συμπτωματολογία πνευμονικού αποστήματος λόγω τήξης του όγκου

Πίνακας 4: Συμπτώματα από περιφερική ανάπτυξη του όγκου



Οδοί μεταστάσεων

Ο καρκίνος του πνεύμονα μεθίσταται σε απομακρυσμένες ανατομικές περιοχές μέσω αίματος ή λεμφικώς.

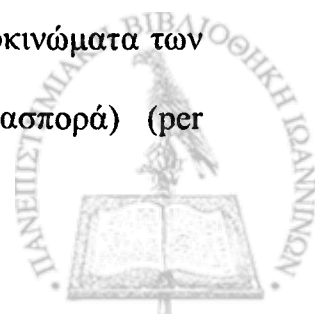
Η λεμφική διασπορά έχει συνήθως τοπικό χαρακτήρα, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι πυλαίοι, οι μεσοθωρακικοί και οι περιβρογχικοί λεμφαδένες. Η συμπίεση παρακείμενων ιστών από διογκωμένους, διηθημένους λεμφαδένες μπορεί να προκαλέσει αντίστοιχα συμπτώματα^{73,77}. Ένα απλό σύστημα ταξινόμησης των επιχωρίων λεμφαδένων, το οποίο είναι συμβατό με το Διεθνές Σύστημα Ταξινόμησης του Καρκίνου του Πνεύμονα και αποδεκτό από τους οργανισμούς εναντίον του Καρκίνου, αναπτύχθηκε από τους Mountain και Dressler το 1997⁷⁸ και παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Η αιματογενής διασπορά μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε όργανο και κυρίως το ήπαρ, τα οστά, τα επινεφρίδια και τον εγκέφαλο^{73,79,80}. Οι οστικές μεταστάσεις εντοπίζονται συχνότερα στις πλευρές, στους σπονδύλους, στα βραχιόνια και στα μηριαία οστά προκαλώντας πόνο και παθολογικά κατάγματα.

Η μεταστατική διασπορά περιλαμβάνει πλήθος διαδικασιών, μεταξύ των οποίων προεξάρχον ρόλο κατέχει η μετακίνηση κυττάρων μέσω της βασικής μεμβράνης στην εξωκυττάρια ουσία.

Η διήθηση της βασικής μεμβράνης αποτελεί την ειδοποιό διαφορά μεταξύ καλοηθών και κακοηθών εξέργασιών. Τα ένζυμα των νεοπλασματικών κυττάρων (πρωτεάσες, καθεψίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες) έχουν τη δυνατότητα αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας^{8,74,80}. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θεωρούνται ότι συμμετέχουν στη διαδικασία ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης και μελέτες ασχολούνται με την πιθανότητα αναστολής της λειτουργίας αυτών των ενζύμων και την παρεμπόδιση μεταστάσεων⁸¹.

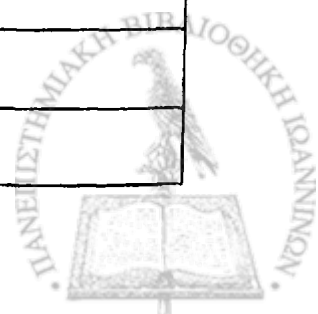
Εκτός από τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (αιματογενώς, λεμφικώς), τα καρκινώματα των πνευμόνων συχνά προσβάλλουν τους περιβάλλοντες ιστούς (τοπική διασπορά) (per



continuitatem) και προκαλούν τοπικές επιπλοκές όπως απόφραξη, εξέλκωση, διήθηση αλλά και συστηματικές εκδηλώσεις λόγω κεντρικής νέκρωσης και παρανεοπλασματικών φαινομένων⁸². Η περιβρογχική διασπορά κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας των βρόγχων σε απομακρυσμένα τμήματα του πνεύμονα είναι συχνή. Η απευθείας επέκταση στον υπεζωκότα και στους παρακείμενους σχηματισμούς του μεσοθωρακίου είναι εύρημα προχωρημένης νόσου⁷³.

Η απόφραξη γειτνιάζουσας ανατομικής περιοχής (είτε λόγω άσκησης πίεσης εκ του όγκου ή διήθησης) μπορεί να περιλαμβάνει απόφραξη άνω κοίλης φλέβας, παράλυση φωνητικών χορδών λόγω βλάβης του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου, δύσπνοια λόγω λοβώδους ατελεκτασίας και δυσφαγία. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί διασπορά διαμέσου του περισπλάγγνιου πετάλου του υπεζωκότα όπου νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να διασπαρθούν μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα προκαλώντας νεοπλασματικές εστίες και πλευριτικό εξίδρωμα⁷³.

N2 ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ
Βρίσκονται εντός της θήκης του υπεζωκότος και του μεσοθωρακίου.
1. Ανώτεροι λεμφαδένες του μεσοθωρακίου
2. Ανώτεροι παρατραχειακοί λεμφαδένες
3. Προτραχειακοί, Οπισθοτραχειακοί ή Λεμφαδένες Οπίσθιου Μεσοθωρακίου (#3p) και Προσθίου Μεσοθωρακίου (#3a)
4. Κατώτεροι Παρατραχειακοί ή Τραχειοβρογχικοί λεμφαδένες
5. Υποαορτικοί λεμφαδένες (αορτο-πνευμονικού παράθυρου)
6. Παραορτικοί λεμφαδένες (ανιούσας αορτής ή φρενικού νεύρου)
7. Λεμφαδένες της Τρόπιδας
8. Παραοισοφαγικοί Λεμφαδένες (Κάτωθεν της Τρόπιδας)



9. Λεμφαδένες του Πνευμονικού Συνδέσμου
ΝΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ Βρίσκονται περιφερικότερα της ανάκαμψης του υπεζωκότα του μεσοθωρακίου και εντός του σπλαγγνικού υπεζωκότα.
10. Πυλαίοι Λεμφαδένες
11. Μεσολόβιοι Λεμφαδένες
12. Λοβαίοι Λεμφαδένες
13. Τμηματικοί Λεμφαδένες
14. Υποτμηματικοί Λεμφαδένες

Πίνακας 5: Οι θέσεις των λεμφαδένων στον πνεύμονα.

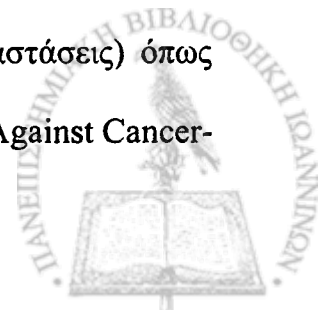
Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα κατέχει σημαντικό ρόλο, τόσο για τη χρησιμοποίηση ομοίων κριτηρίων για την κατάταξη των ασθενών σε ομάδες στα διάφορα πρωτόκολλα θεραπείας με σκοπό την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων όσο και για τον τρόπο θεραπευτικής αντιμετώπισής τους.

Η TNM ταξινόμηση επινοήθηκε από τον Denoix το 1944 με σκοπό να αποτελέσει ένα κοινό σύστημα περιγραφής της πραγματικής έκτασης της νόσου⁸³.

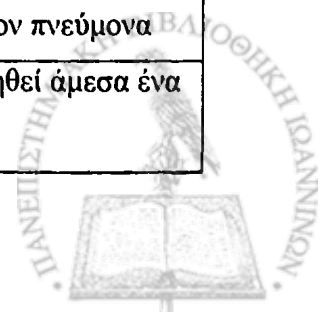
Μια ομοιόμορφη κλινική ταξινόμηση για όλες σχεδόν τις μορφές καρκίνου αναπτύχθηκε αργότερα⁸⁴.

Το σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα εδράζεται επί της κλινικής ταξινόμησης των παραγόντων TNM (T-primary tumor, πρωτοπαθής όγκος, N-regional lymph nodes, επιχώριοι λεμφαδένες, M-distant metastasis, απομακρυσμένες μεταστάσεις) όπως καθιερώθηκε από τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer-



UICC) και την Διατομεακή Αμερικανική Επιτροπή κατά του Καρκίνου (Americal Joint Committee on Cancer-AJCC). Τροποποιήθηκε το 1997 (Πίνακες 6, 7)^{85,86} και αναφέρεται τόσο στο μη μικροκυτταρικό όσο και στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί η χρήση του παλαιότερου συστήματος ταξινόμησης για τον μικροκυτταρικό τύπο σύμφωνα με την οποία γίνεται διάκριση σε περιορισμένη (limited) και σε εκτεταμένη (extensive) νόσο βάσει της απουσίας ή της παρουσίας μεταστάσεων αντίστοιχα.

Πρωτοπαθής Όγκος (T)	Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δε μπορεί να εκτιμηθεί ή αποδεικνύεται από την παρουσία κακοηθών κυττάρων στα πτύελα ή τις βρογχικές εκκρίσεις αλλά δεν εντοπίζεται απεικονιστικά ή με βρογχοσκόπηση
	T ₀	Δεν υπάρχει μαρτυρία πρωτοπαθούς όγκου
	Tis	Καρκίνωμα in situ
	T1	Όγκος διαμέτρου <3cm εντός του πνευμονικού παρεγχύματος ή των ορίων του σπλαγγχνικού υπεζωκότα, χωρίς βρογχοσκοπική μαρτυρία διήθησης εγγύτερον λοβαίου βρόγχου
	T2	Όγκος διαμέτρου >3cm ή με ένα εκ των κάτωθι χαρακτηριστικών: <ul style="list-style-type: none"> - προσβολή του στελεχιαίου βρόγχου σε απόσταση >2cm πέραν της τρόπιδας - διήθηση του περισπλαγγχνίου πετάλου του υπεζωκότα - συνοδεύεται από ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα η οποία επεκτείνεται ως την πύλη αλλά δεν καταλαμβάνει ολόκληρο τον πνεύμονα
	T3	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους ο οποίος διηθεί άμεσα ένα από τα παρακάτω:



		θωρακικό τοίχωμα (περιλαμβανομένων των όγκων Pancoast), διάφραγμα, τον υπεζωκότα του μεσοθωρακίου ή το τοιχωματικό περικάρδιο Όγκος σε απόσταση <2cm από την τρόπιδα χωρίς διήθηση αυτής. Συνοδεύεται από ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα ολόκληρου του πνεύμονος
	T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί ένα από τα παρακάτω όργανα: μεσοθωράκιο, καρδιά, μεγάλα αγγεία, τραχεία, οισοφάγος, σώματα σπονδύλων, τρόπιδα, όγκος με κακοήθη πλευριτική συλλογή ή περικαρδιακή συλλογή ή με δορυφορικά οζίδια στον ίδιο λοβό με την πρωτοπαθή βλάβη
Επιχώριοι Λεμφαδένες (N)	Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν
	N0	Δεν υπάρχουν επιχώριοι λεμφαδένες
	N1	Μετάσταση σε περιβρογχικούς λεμφαδένες ομοπλεύρως ή πυλαίους λεμφαδένες ομοπλεύρως και ενδοπνευμονικούς λεμφαδένες από άμεση επέκταση του πρωτοπαθούς όγκου
	N2	Μετάσταση σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου ομοπλεύρως ή σε λεμφαδένες της τρόπιδας
	N3	Μετάσταση σε ετερόπλευρους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, ετερόπλευρους πυλαίους, ομόπλευρους ή ετερόπλευρους σκαληνούς ή υπερκλείδιους λεμφαδένες
Μεταστάσεις (M)	Mx	Η παρουσία μεταστάσεων δε μπορεί να αξιολογηθεί
	M0	Δεν υπάρχουν μεταστάσεις
	M1	Υπάρχουν μεταστάσεις. Η παρουσία οζιδίων σε άλλο λοβό από εκείνον του πρωτοπαθούς όγκου ομοπλεύρως, ταξινομείται επίσης ως M1.

Πίνακας 6: Η νέα σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα με βάση το σύστημα TNM (πρωτοπαθής όγκος, λεμφαδένες, μεταστάσεις).



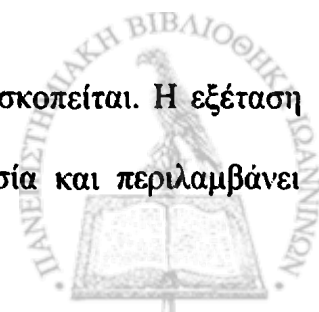
ΣΤΑΔΙΟ	TNM
0	Καρκίνωμα in situ
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
IIA	T1N1M0
IIB	T2N1M0 T3N0M0
IIIA	T3N1M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N2M0
IIIB	T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0 T4N3M0 T1N3M0 T2N3M0 T3N3M0
IV	Κάθε T, Κάθε N, M1

Πίνακας 7: Η νέα σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Αντιστοιχία σταδίου με ταξινόμηση TNM.

Διαγνωστικές Μέθοδοι

Τα παθολογικά ευρήματα στην οπισθοπρόσθια και πλάγια ακτινογραφία θώρακα (περιφερική παρεγχυματική βλάβη, πολλαπλά οζίδια, ατελεκτασία, διόγκωση της πύλης, διεύρυνση του μεσοθωρακίου ή υπεζωκοτική συλλογή) αποτελούν την αφετηρία για κάθε επόμενο διαγνωστικό χειρισμό, ο οποίος συνήθως είναι η πραγματοποίηση αξονικής τομογραφίας θώρακα (CT scan)⁸⁷.

Κάθε ασθενής με υπόνοια νεοπλασματος πνεύμονα πρέπει να βρογχοσκοπείται. Η εξέταση γίνεται με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο (ινοσκόπιο), με τοπική αναισθησία και περιλαμβάνει



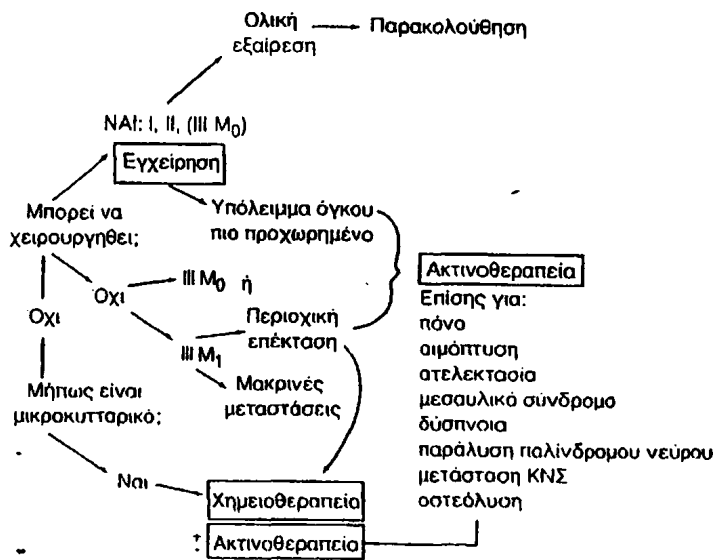
επισκόπηση του βρογχικού δένδρου και δειγματοληψία ιστικών βλαβών (βιοψία με λαβίδα, αναρρόφηση με βελόνη, λήψη ψήκτρας και βρογχικού εκπλύματος)^{74,75}. Επιτυγχάνει να δώσει θετική ιστολογική ή κυτταρολογική επιβεβαίωση σε προσπελάσιμους όγκους (κεντρικούς) ή επί υπάρξεως μεταστατικών λεμφαδένων κάτω από το διχασμό της τραχείας, σε ποσοστό 85%. Η πιθανότητα επιπλοκών είναι 0,12% και η θνητότητα 0,04%⁸⁸. Σε περιπτώσεις άρνησης του ασθενούς για βρογχοσκόπηση, σε ιατρική αντένδειξη (π.χ πρόσφατο έμφραγμα μυοκαρδίου) ή μη διαθεσιμότητα βρογχοσκοπίου μπορεί να λάβει χώρα κυτταρολογική εξέταση πτυέλων η οποία δίδει θετικά αποτελέσματα με απόδοση που κυμαίνεται από 30%-75%. Το αρνητικό αποτέλεσμα της εξέτασης σε καμία περίπτωση δεν αποκλείει τη νόσο⁸⁷. Σε περιφερικές σκιάσεις των πνευμόνων ύποπτες για καρκίνο προτιμάται συνήθως ως πρώτος διαγνωστικός χειρισμός, η διατοιχωματική με βελόνη αναρρόφηση, με υψηλή διαγνωστική απόδοση (80%) και ελάχιστες επιπλοκές (αιμορραγία, πνευμοθώρακας)^{75,76}. Σε περιπτώσεις υπεζωκοτικής συλλογής με απουσία άλλων πνευμονικών σκιάσεων, οι διαγνωστικοί χειρισμοί είναι κατά σειρά, παρακέντηση θώρακα και κυτταρολογική εξέταση πλευριτικού υγρού (απόδοση 30-70%)^{74-76,88}. Σε αρνητικό αποτέλεσμα, εκτελείται κλειστή βιοψία υπεζωκότα (απόδοση 50-60%) ή θωρακοσκόπηση (video assisted thoracic surgery). Σε περίπτωση αποτυχίας διάγνωσης με τους παραπάνω χειρισμούς γίνεται διαγνωστική θωρακοτομή, εφόσον το επιτρέπει η κατάσταση του αρρώστου⁸⁸. Ο ρόλος των διαφόρων βιολογικών δεικτών στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι περιορισμένος και μέλλει να καθοριστεί^{74,75}.

Θεραπευτική αντιμετώπιση

Ο καρκίνος του πνεύμονα αντιμετωπίζεται με χειρουργική εξαίρεση του όγκου, όπου αυτή είναι δυνατή (σφηνοειδής εκτομή του πνευμονικού παρεγχύματος, τμηματεκτομή,



λοβεκτομή, πνευμονεκτομή), με ακτινοθεραπεία, με αντινεοπλασματική χημειοθεραπεία (παρηγορητική-palliative, προεγχειρητική neo-adjuvant, μετεγχειρητική-adjuvant) ή με συνδυασμούς των ανωτέρω⁸⁹⁻⁹⁷. Συγκεντρωτικά, η θεραπευτική προσέγγιση του ασθενή με καρκίνο πνεύμονα φαίνεται στην Εικόνα 7. Λόγω της διαφορετικής βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου και της χημειοευαισθησίας του μικροκυτταρικού καρκίνου, η θεραπεία του διαφέρει από εκείνη των άλλων ιστολογικών τύπων, που χαρακτηρίζονται συλλογικά ως μη μικροκυτταρικοί όγκοι. Έτσι σε ασθενείς με εκτεταμένη νόσο συστήνεται χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα ενώ με περιορισμένη νόσο συστήνεται ακτινοθεραπεία. Η χειρουργική εκτομή δεν ενδείκνυται στην περιορισμένη μορφή της νόσου παρά μόνο στην σπάνια περίπτωση ιδιαίτερας περιορισμένης μορφής T1-2 N0⁹⁸.



Εικόνα 7: Θεραπευτική προσέγγιση στον καρκίνο του πνεύμονα. (Μ. Παπαδημητρίου. Εσωτερική Παθολογία. Εκδόσεις University Studio Press, 1^η έκδοση, 1998, σελ. 511, τόμος Α)

Πρόγνωση

Η πρόγνωση της νόσου εξαρτάται από την έκτασή της και τον ιστολογικό τύπο, αλλά και άλλους παράγοντες. Το πλακώδες καρκίνωμα έχει καλύτερη πρόγνωση, συγκριτικά με τους άλλους τύπους⁹⁰⁻⁹⁵. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα έχει τη χειρότερη πρόγνωση για λόγους



βιολογικής συμπεριφοράς (ταχύς χρόνος διπλασιασμού, τάση γενίκευσης της νόσου στο χρόνο διάγνωσης)⁹⁸. Μόνο το 5% των ασθενών με περιορισμένη νόσο επιβιώνει για μια πενταετία. Η μέση επιβίωση στους ανταποκρινόμενους στη θεραπεία ασθενείς φθάνει στους 19 μήνες στην περιορισμένη νόσο (σταδίου ως IIIB) ενώ η μέση επιβίωση στη γενικευμένη νόσο περιορίζεται στους 10 μήνες^{86,98}. Στον Πίνακα 8 φαίνονται τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα σε σχέση με την κλινική σταδιοποίηση TNM.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ TNM	5-ΕΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗ
IA T1N0M0	61%
IB T2N0M0	38%
IIA T1N1M0	34%
IIIB T2N1M0 T3N0M0	24% 22%
IIIA T3N1M0 T1-2-3N2M0	9% 13%
IIIB T4N0-1-2M0 T1-2-3N3M0	7% 3%
IV	1%

Πίνακας 8: Συσχετισμός ποσοστών 5ετούς επιβίωσης με την κλινική σταδιοποίηση TNM



ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Εισαγωγή

Το κυκλοφορικό σύστημα επιτελεί σημαντικό ρόλο στην επιβίωση κάθε πολυκύτταρου οργανισμού, δεδομένου ότι μέσω αυτού πραγματοποιείται η πρόσληψη οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών από τους ιστούς και η αποβολή διοξειδίου του άνθρακα και μεταβολικών προϊόντων. Βασική προϋπόθεση για την επιτέλεση των παραπάνω λειτουργιών είναι τα κύτταρα να μην απέχουν απόσταση μεγαλύτερη από 200μm από τα πλησιέστερα τριχοειδή⁹⁹.

Η δημιουργία του αγγειακού συστήματος διενεργείται μέσω τριών διαδικασιών.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, πραγματοποιείται μία διαφοροποίηση των εμβρυϊκών μεσεγγυματικών κυττάρων (πρόκειται για τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα ή αγγειοβλάστες) σε ενδοθηλιακά κύτταρα, συντελώντας έτσι σε μία *de novo* «γένεση του αγγειακού συστήματος» («*vasculogenesis*»)¹⁰⁰. Ο όρος αγγειογένεση («*angiogenesis*») αναφέρεται στο σχηματισμό νέων αγγείων τα οποία εκφύονται από προϋπάρχοντα μικρά αγγεία τόσο σε εμβρυϊκό ιστό όσο και σε ιστό ενηλίκων και ωριμάζουν μέσω της αγγειογενούς αναδιαμόρφωσης¹⁰¹. Ο όρος αρτηριογένεση («*arteriogenesis*») χαρακτηρίζει τον ταχύ πολλαπλασιασμό προϋπαρχόντων παράπλευρων αγγείων¹⁰². Στον Πίνακα 9 εκτίθενται συνοπτικά τα βασικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης.

Η ανάπτυξη νέων αγγείων αποτελεί μία βασική διαδικασία τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπως προαναφέρθηκε, όσο και κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης ζωής για φυσιολογικές διαδικασίες αναδόμησης όπως επούλωση τραυμάτων, ανάπλαση ιστού μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, και ενδομήτριες αλλαγές κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου στις γυναίκες¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Παρόλα αυτά, η παθολογική ανάπτυξη νέων αγγείων εμπλέκεται σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός



ερυθηματώδης λύκος, η ψωρίαση, η αθηροσκλήρωση, οι παραγωγικές αμφιβληστροειδοπάθειες, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, κ.α¹⁰³⁻¹⁰⁹. Η κύρια όμως ομάδα νοσημάτων στην οποία επικεντρώνεται η έρευνα για την αγγειογένεση είναι τα κακοήθη νεοπλάσματα^{99,106,107}. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η νεοπλασματική αγγειογένεση δεν αποτελεί προνόμιο των συμπαγών όγκων όπως αρχικά πιστευόταν, καθώς έχει παρατηρηθεί και σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως οι λευχαιμίες^{110,112} και το πολλαπλούν μυέλωμα^{111,113}. Τα νεοπλάσματα αυτά επάγουν την αγγειογένεση στο μυελό των οστών για να υποστηρίξουν την ανάπτυξή τους¹¹⁰⁻¹¹³.

ΣΤΑΔΙΟ	ΒΑΣΙΚΑ ΓΕΓΟΝΟΤΑ
Ενεργοποίηση ενδοθηλιακών και περιθηλιακών κυττάρων	Μορφολογικές αλλαγές των ενδοθηλιακών κυττάρων με σκοπό τον πολλαπλασιασμό, την τοπική αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειοδιαπερατότητα, συσσώρευση εξωαγγειακού ινώδους
Αποδόμηση βασικής μεμβράνης	Το αγγειογενετικό ερέθισμα συντελεί στην πρωτεολυτική αποδόμηση της αγγειακής βασικής μεμβράνης
Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων	Χημειοτακτικοί παράγοντες (παραγόμενοι από ινοβλάστες, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια) προκαλούν μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων
Πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων	Τοπικά παραγόμενα μιτογόνα προκαλούν σύνθεση DNA στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μιτώσεις
Διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων	Ο πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων ελαττώνεται και επανέρχεται η κυτταροκυτταρική επαφή και διαμορφώνονται αυλοί
Επαναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης	Επιτυγχάνεται ωρίμανση των αγγείων μέσω επαναδιαμόρφωσης της βασικής μεμβράνης η οποία συντίθεται από ενδοθηλιακά κύτταρα και περιθηλιακά κύτταρα
Ωρίμανση αγγειακού δικτύου και σταθεροποίηση	Αγγειακή αναμόρφωση μέσω σταθεροποίησης και υποχώρησης της διαδικασίας

Πίνακας 9: Συνοπτική περιγραφή των βασικών γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε κάθε στάδιο της αγγειογένεσης^{100,101,114,115}



Νεοαγγειογένεση και ανάπτυξη όγκων

Η ιδέα της εξάρτησης των κακοηθών νεοπλασμάτων από το αγγειακό τους δίκτυο χρονολογείται από τις αρχές του περασμένου αιώνα^{107,116}.

Η στενή σχέση μεταξύ αγγειογένεσης και ανάπτυξης των όγκων οδήγησε στη διαμόρφωση της άποψης περί «αγγειογενούς μεταστροφής» (angiogenic switch), η οποία αποτελεί ένα ουσιαστικό βήμα στην αρχική φάση ανάπτυξης του όγκου όπου προκαλείται αγγειογένεση με σκοπό την εξάπλωσή του^{105,107}.

Πραγματικά, η αγγειογενής μεταστροφή σχετίζεται ξεκάθαρα με την ανάπτυξη του όγκου σε ποντίκια με πολυεπίπεδη καρκινογένεση¹¹⁷.

Εύλογα γεννάται το ερώτημα πώς τα καρκινικά κύτταρα πυροδοτούν την αγγειογενή μεταστροφή.

Μελέτες που αφορούσαν σε γλοιοβλάστωμα ανθρώπων και σε γλοίωμα μυών έδειξαν ότι η υποξία αποτελεί αιτία έκφρασης του ρυθμιστή της αγγειογένεσης ήτοι του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor) και κατά συνέπεια της αγγειογένεσης, θεμελιώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ακόλουθο κοινώς πλέον αποδεκτό μοντέλο: ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων προκαλεί τη δημιουργία υποξικών περιοχών εντός της καρκινικής μάζας, και τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές «εξαναγκάζονται» να εκφράσουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα με την επακόλουθη ενεργοποίηση της νεοαγγειογένεσης^{118,119}.

Η αναγνώριση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (HIF-1, hypoxia inducible factor) ως μεταγραφικού παράγοντα υπεύθυνου για την ενεργοποίηση του VEGF σε καταστάσεις υποξίας, παρείχε περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης¹²⁰⁻¹²².

Παρά το γεγονός ότι η προκαλούμενη από την υποξία ενεργοποίηση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα έχει αποδειχτεί από διάφορες μελέτες^{120,123-125}, πιστεύεται ότι η



υποξία ενεργοποιεί την νεοπλασματική αγγειογένεση έμμεσα. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα που αναπτύσσονται σε υποξικές συνθήκες απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες πεπτιδίων, όπως τον παραγόμενο εξ αιμοπεταλίων αυξητικό παράγοντα PDGF (platelet derived growth factor) και τους ινοβλαστικούς αυξητικούς παράγοντες FGFs (fibroblast growth factors), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων¹²⁶⁻¹³¹. Επί προσθέτως, ο VEGF παράγεται από νεοπλασματικά στρωματικά κύτταρα *in vivo*¹³² υποδηλώνοντας τη συνεργασία μεταξύ στρωματικών και καρκινικών κυττάρων στην πρόκληση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.

Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος του VEGF (για τον οποίο γίνεται εκτενέστερη αναφορά σε ακόλουθες σελίδες) στην ανάπτυξη των όγκων έχει αποδειχτεί, υπάρχει ένας ικανός αριθμός αποδεικτικών στοιχείων που καταδεικνύει την εμπλοκή και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων στην νεοπλασματική αγγειογένεση¹³³.

Μεταξύ αυτών, οι FGF1 και FGF2 μελετήθηκαν εκτενώς. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την έλλειψη ακολουθιών σημάτων για έκκριση, οι FGF1 και FGF2 αποβάλλονται ειδικά από τα καρκινικά κύτταρα προφανώς μέσω μίας εναλλακτικής οδού αποβολής¹³⁴.

Επιπλέον, η αποβολή FGF1 και FGF2 φαίνεται να σχετίζεται με την μεταστροφή στην νεοαγγειογένεση σε ποντίκια που έπασχαν από ινοσάρκωμα και καρκίνωμα β-κυττάρων, αντίστοιχα, αυξάνοντας την πιθανότητα εμπλοκής των παραπάνω ουσιών στην έναρξη της νεοπλασματικής αγγειογένεσης^{134,135}.

Έχει αναφερθεί επανειλημμένως ότι η προκαλούμενη εξ ογκογονιδίων κυτταρική μεταμόρφωση συνοδεύεται από την αυξημένη έκφραση πεπτιδικών παραγόντων οι οποίοι είναι σε θέση να προκαλέσουν αγγειογένεση¹³⁶.

Παρόλα αυτά, οι μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση του ρόλου που παίζουν τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στην αγγειοποίηση νεοπλασμάτων αντιπροσωπεύουν ένα νέο τομέα στο φάσμα της αντικαρκινικής έρευνας.



Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως του *ras* έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή του VEGF γεγονός που καταδεικνύει ότι μία από τις βασικές λειτουργίες των ογκογονιδίων είναι η συμβολή τους στη διαμόρφωση του αγγειογενετικού φαινότυπου των κακοηθών νεοπλασμάτων^{122,137}. Για τον παραπάνω λόγο, η πρόκληση αγγειογένεσης λόγω αυξημένης παραγωγής VEGF αποτελεί απαραίτητη αλλά όχι επαρκή συνθήκη για την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* και την κατ'επέκταση δημιουργία όγκων^{138,139}.

Η ογκογονιδιακά εξαρτώμενη πρόκληση αγγειογένεσης δεν περιορίζεται στα ογκογονίδια *ras*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης από την τυροσινική κινάση *src* κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των γλοιωμάτων,¹⁴⁰ ενώ πολλά άλλα κλασσικά ογκογονίδια ενεργοποιούν την παραγωγή μορίων, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν αγγειογένεση¹⁴¹. Τέλος, έχει αποδειχτεί ότι το ογκογονίδιο *H-ras* ελαττώνει τη δραστηριότητα των TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) μέσω μίας οδού μεταβίβασης σημάτων διαφορετικής από αυτήν που προκαλεί αύξηση της παραγωγής του VEGF¹⁴². Για τον παραπάνω λόγο, τα ογκογονίδια θα μπορούσαν να διαταράξουν την αγγειογενετική ισορροπία όχι μόνο ενεργοποιώντας τους αγγειογενετικούς διεγέρτες αλλά και αποδυναμώνοντας τους ενδογενείς αγγειογενετικούς αποκλειστές.

Παρόλα αυτά τίθεται το εύλογο ερώτημα αν είναι αληθές και το αντίστροφο, δηλαδή αν η αγγειογένεση προάγει ενεργά την ανάπτυξη του όγκου.

Μία πρώτη απάντηση στην παραπάνω ερώτηση δόθηκε από πειράματα που βασίστηκαν σε ένα μοντέλο πολυσταδιακής δερματικής αγγειογένεσης (HaCaT).

Πειραματικές μεταβολές στην έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του -και κατά συνέπεια στην έκταση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης- συσχετίστηκαν με το βαθμό κακοήθειας του όγκου, υποδηλώνοντας μία άμεση εμπλοκή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στην δημιουργία ενός επιθετικού κακόηθους φαινοτύπου¹⁴³.



Αν η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της εκ των ογκογονιδίων εξαρτώμενης αγγειογένεσης, μπορεί να εικαστεί ότι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι σε θέση να εμποδίσουν την νεοαγγειοποίηση.

Οι Bouck και συνεργάτες ανέφεραν ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 καταστέλλει την αγγειογένεση ενισχύοντας την έκφραση του αναστολέα της αγγειογένεσης TSP-1¹⁴⁴.

Αντίθετα, πολλά πειράματα σε διαφορετικούς τύπους όγκων έδειξαν ότι κατά αναλογία με την απώλεια του p53, η απώλεια της έκφρασης του TSP-1 σχετίζεται με το βαθμό κυτταρικής μετάπλασης και ανάπτυξης του όγκου. Έχουν βρεθεί και άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία επηρεάζουν την νεοπλασματική αγγειογένεση.

Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση του ογκογονιδίου PTEN στο καρκίνωμα του προστάτη ενισχύει την νεοπλασματική αγγειογένεση με ένα μηχανισμό που σχετίζεται με τις θρομβοσπονδίνες (TSP)¹⁴⁵. Επί προσθέτως, το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου von Hippel-Lindau του οποίου η απενεργοποίηση προκαλεί ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αγγειοβριθείς όγκους, καταστέλλει την αγγειογένεση¹⁴⁶.

Αναμφίβολα υπάρχουν ακόμα άγνωστοι ογκοκαταστολείς που σχετίζονται με την ρύθμιση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης οι οποίοι έπονται να ανακαλυφθούν. Μέσα στο παραπάνω πλαίσιο, γενετικές μελέτες σε ποντίκια με καρκίνωμα παγκρέατος πρόσφατα αποκάλυψαν ότι η απώλεια της θέσης ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου συμπίπτει με την έναρξη της νεοπλασματικής αγγειογένεσης¹⁴⁷.

Ρυθμιστές της αγγειογένεσης

Ενισχυτικοί παράγοντες

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πολλές χημικές ενώσεις οι οποίες προκαλούν αγγειογένεση σε πειραματικές μελέτες *in vitro* και σε πειραματόζωα *in vivo*. Η πλειοψηφία των



αγγειογενετικών παραγόντων που διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική αγγειογένεση είναι οι κλασσικοί πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες^{148,149}. Συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το αρτιότερα μελετημένο παράδειγμα είναι αυτό της οικογένειας του αγγειακού αυξητικού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF) η οποία αποτελείται από τέσσερα μέλη (VEGF A, B, C, D)^{106, 149}. Συνδέονται με τρεις διαφορετικούς ειδικούς ενδοθηλιακούς υποδοχείς του VEGF (VEGF 1-3) με διαφορετική χημική συγγένεια^{106,148}. Ο λειτουργικός ρόλος του VEGF στην φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση θα αναφερθεί εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες είναι ο όξινος και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF1 και FGF2 αντίστοιχα)^{150,151}. Παρόλα αυτά, εφόσον οι FGF1 και FGF2 επιφέρουν πλειόμορφα αποτελέσματα στοχεύοντας σε τέσσερις διαφορετικούς υποδοχείς (FGFR1-4) σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, ο ακριβής ρόλος τους στην *in vivo* αγγειογένεση παραμένει δυσδιάκριτος¹⁵⁰.

Ενδιαφέρουσα εμφανίζεται η ύπαρξη διαρκώς αυξανόμενων στοιχείων που αφορούν στην ενδεχόμενη συνεργασία μεταξύ του VEGF και των FGFs τόσο κατά τη διάρκεια της *in vivo* όσο και της *in vitro* αγγειογένεσης, γεγονός που είναι συμβατό με την παρατήρηση ότι ο FGF2 αυξάνει την έκφραση του VEGF¹⁵² και του υποδοχέα του VEGFR-2¹⁵³.

Μία νεότερη οικογένεια αγγειογενετικών παραγόντων, οι αγγειοποιητίνες, αποτελούν τους συνδέσμους για τον ενδοθηλιακό υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης Tie-2¹⁴⁹. Ο ρόλος των αγγειοποιητινών και των υποδοχέων τους στην αγγειογένεση έχει αποδειχτεί σε γενετικά μεταλλαγμένους μύες. Μείωση της αγγειοποιητίνης ή της λειτουργίας του Tie-2 σε μύες και υπερέκφραση των αγγειοποιητινών σε αμφιγενείς μύες απέδειξε ότι το σύστημα της αγγειοποιητίνης επιτελεί κρίσιμο ρόλο στην επακόλουθη αναδιαμόρφωση και σταθεροποίηση του αναπτυσσόμενου αγγειακού δικτύου¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Οι αγγειοποιητίνες και οι υποδοχείς τους είναι



τελικά απαραίτητες για τη νεοπλασματική αγγειογένεση εφόσον η έκφραση μίας διαλυτής μορφής του υποδοχέα του Tie-2 συνετέλεσε στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε πειράματα μεταμόσχευσης νεοπλασμάτων¹⁵⁷.

Τα μέλη της οικογένειας χημειοκινών CXC τα οποία περιέχουν αλληλουχία Glu-Leu-Arg, όπως η ιντερλευκίνη 8, επιτελούν αγγειογενετική δραστηριότητα. Προέρχονται κυρίως από μακροφάγα και δεν έχει διευκρινιστεί αν δρουν απευθείας στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, οι CXC χημειοκίνες οι οποίες στερούνται την αλληλουχία Glu-Leu-Arg όπως ο platelet factor 4 (PF4), η interferon γ -induced protein 10 (IP10) ή gro β είναι αναστολείς της αγγειογένεσης όπως θα αναλύσουμε παρακάτω. Άλλοι κλασσικοί αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ο TGF α (transforming growth factor alpha) και ο PDGF BB platelet derived growth factor BB. Άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες όπως η πλειοτροπίνη, η αγγειογενίνη, η αγγειοτροπίνη, ο PAF (platelet activating factor) κ.ά μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό, μετανάστευση ή μορφογένεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁴¹.

Κάποιοι αγγειογενετικοί παράγοντες οι οποίοι είναι σε θέση να προκαλούν αγγειογένεση in vivo (π.χ tumor necrosis factor alpha TNF α , transforming growth factor beta TGF β), δεν αντιδρούν απευθείας με ενδοθηλιακά κύτταρα. Φαίνεται να προσελκύουν περισσότερο άλλους τύπους κυττάρων (π.χ μακροφάγα) στον τόπο πραγματοποίησης της αγγειογένεσης και προκαλούν την παραγωγή και απελευθέρωση αληθινών αγγειογενετικών παραγόντων¹⁴⁵.

Εκτός των πεπτιδικών αγγειογενετικών παραγόντων, πολλές άλλες χημικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους ενισχύουν την αγγειογένεση. Παραδείγματα αυτών αποτελούν οι προσταγλαδίνες E1 και E2, η νικοτιναμίδη, και σχετικές ουσίες όπως αδενοσίνη, σύμπλοκα χαλκού (Cu-Gly-His-Lys), κυτταροπλασμίνη, και ηπαρίνη¹⁵⁸. Ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι απόλυτα κατανοητός αλλά μπορεί να είναι έμμεσος και πολύπλοκος και αναμένεται να



αποδειχτεί. Στον πίνακα 10 αναφέρονται συγκεντρωτικά όλοι οι διεγερτικοί παράγοντες της αγγειογένεσης.

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (μόρια προσκόλλησης)	ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ (μηχανισμοί)
VEGF, VEGF-B, -C, -D, -E	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilin-1
PIGF	VEGFR-1, neuropilin-1
Angiopoietin-1, angiopoietin-2	TIE2/TEK
PD-ECGF (thymidine phosphorylase)	?
aFGF (FGF-1) bFGF (FGF-2)	FGFR-1, FGFR-2
EGF/TGF- α	EGFR
HGF	Met
PDGF-BB	PDGFR
G-CSF	G-CSFR
GM-CSF	GM-CSFR
Angiogenin	170-kDa ειδική δεσμευτική πρωτεΐνη
Sselectin	Sialyl Lewis X
sVCAM-1	Integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)
ELR-CXC chemokine (IL-8, ENAP-78 κ.ά)	CXCR-2
PAF	PAFR
FASligand	FAS
Osteopontin	Integrin $\alpha \nu \beta 3$ (αυξημένη παραγωγή ELR-CXC-chemokines από μακροφάγα)
MIF	(αυξημένη παραγωγή ELR-CXC-chemokines από μακροφάγα)
MMPs	Αυξημένη αποδόμηση εξωκυττάριας ουσίας
Pas	Αυξημένη αποδόμηση εξωκυττάριας ουσίας
(PECAM-1 (CD31))	Αυξημένη δημιουργία τριχοειδικών αυλών
VE-cadherin	Αυξημένη δημιουργία τριχοειδικών αυλών
Προϊόντα μαστοκυττάρων (τρομπάση, χυμάση)	Αυξημένη δημιουργία τριχοειδικών αυλών

Πίνακας 10: Συγκεντρωτική κατάταξη των ενεργοποιητών της αγγειογένεσης και του τρόπου δράσης τους.



VEGF: vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, R:receptor, υποδοχέας, PIGF: placenta growth factor, TIE2/TEK: tunica interna endothelial cell kinase, PD-ECGF: platelet derived endothelial cell growth factor, aFGF και bFGF: acidic και basic fibroblast growth factor, EGF: epidermal growth factor, TGF: transforming growth factor, HGF: hepatocyte growth factor, PDGF: platelet derived growth factor, G-CSF και GM-CSF: granulocyte και granulocyte macrophage-colony stimulating factor, s: soluble, VCAM:vascular endothelial adhesion molecule, VLA: very late activated antigen, ELR: glutamate (E)-Leucine (L)-Arginine (R) motif, IL: interleukin, ENAP:epithelial-neutrophil activating peptide, PAF:platelet activating factor, MIF: macrophage migration inhibition maffactor, MMPs: matrix metalloproteases, ECM: extracellular matrix, Pas: plasminogen activators; PECAM: platelet, endothelial cell adhesion molecule, VE: vascular endothelial

Ανασταλτικοί παράγοντες αγγειογένεσης

Οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες μορίων με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί εμπλοκής τους στην αγγειογένεση να ποικίλουν. Επί προσθέτως, ορισμένοι αναστολείς δρουν ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ άλλοι μπορούν να επιδρούν σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Αντίστοιχα παραδείγματα τέτοιων πλειοτροπικών αγγειογενετικών αναστολέων είναι κάποιες κυτοκίνες όπως η interferon α και η ιντερλευκίνη 12¹⁵⁹ καθώς και μερικές χημειοκίνες όπως η gto β¹⁶⁰ και IP-10¹⁶¹.

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και η εισβολή τους στην εξωκυττάρια ουσία αποτελούν βασικά βήματα στην αγγειογενετική διαδικασία μέσα στα ευρύτερα πλαίσια των πρωτεολυτικών διαδικασιών που επιτελούνται. Για τον παραπάνω λόγο, οι φυσικοί αναστολείς των πρωτεολυτικών ενζύμων αναμένεται να αναστείλουν την νεοαγγειοποίηση. Πράγματι, όλα τα μέλη της οικογένειας των αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs) εμφανίζουν αντιαγγειογενετική δραστηριότητα^{162,163}. Εκτός από την αναστολή της αποδόμησης και εισβολής της εξωκυττάριας ουσίας, οι TIMPs αναστέλλουν απευθείας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁶⁴.



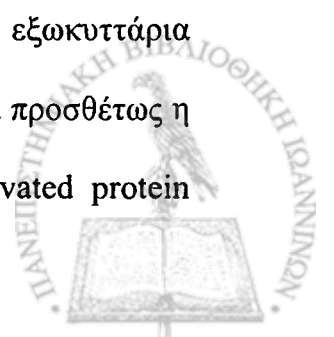
Έχει αναφερθεί ότι πολλά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, πρωτεολυτικά ή μη, αναστέλλουν την αγγειογένεση. Μεταξύ αυτών, η ινονεκτίνη (τα μέσω της ηπαρίνης συνδεόμενα μέρη της) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁶⁵.

Μεταξύ των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) έχει εκτενώς χαρακτηριστεί ως αναστολέας της αγγειογένεσης. Η TSP-1 επηρεάζει πολλές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων, μεταξύ των οποίων τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, την κυτταρική αλληλεπίδραση και την μορφογένεση¹⁶⁶. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι περισσότερες δράσεις της TSP-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οφείλονται στην δημιουργία δεσμού της με το CD36, ένα υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, που εκφράζεται στα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁶⁷.

Άλλες μελέτες κατέδειξαν ότι τεμάχια πλασμινογόνου και κολλαγόνου XVIII εμπλέκονται στις δραστηριότητες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης^{168,169}.

Έχει αποδειχτεί ότι οι πρωτογενείς όγκοι ενεργοποιούν πρωτεολυτικές διαδικασίες οι οποίες διασπών το πλασμινογόνο και κολλαγόνο XVIII, και ότι τα πρωτεολυτικά παράγωγα (αγγειστατίνη-38kD και ενδοστατίνη- 20kD) παρεμποδίζουν την αγγείωση δευτεροπαθών όγκων ή απομακρυσμένων μεταστάσεων. Μετά την αφαίρεση πρωτοπαθών όγκων, τα επίπεδα αγγειοστατίνης και ενδοστατίνης στον ορό μειώνονται συντελώντας στην ανάπτυξη μεταστάσεων. Αντιθέτως, η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη στην κεκαθαρμένη τους μορφή, αναστέλλουν την αγγειογένεση και κατά συνέπεια την ανάπτυξη του όγκου σε πειράματα μεταμόσχευσης νεοπλασμάτων σε μύες.

Η αγγειοστατίνη αναστέλλει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων κυρίως μέσω της ένωσής της με ΑΤΡάση της κυτταρικής επιφάνειας¹⁷⁰. Η αγγειοστατίνη επίσης αναστέλλει την ενεργοποίηση πλασμινογόνου από την εξωκυττάρια ουσία, και επιφέρει ελάττωση της εισβολής των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁷¹. Επί προσθέτως η αγγειοστατίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση της οδού MAPK (mitogen-activated protein



kinase) με την ενεργοποίηση της τυροσινικής φωσφατάσης¹⁷² ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι προκαλεί απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων^{173,174}.

Τις περισσότερες φορές η ενδοστατίνη δρα μαζί με την αγγειοστατίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα στα επίπεδα της αναστολής του προκαλούμενου από αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμού¹⁶⁸, της μετανάστευσης¹⁷⁵ καθώς και της πρόκλησης απόπτωσης¹⁷⁶. Παρόλα αυτά, ο τρόπος δράσης της πρέπει να αναλυθεί και να αποσαφηνιστεί περαιτέρω πριν την θεώρηση της πιθανής θεραπευτικής χρήσης της σε κλινικές δοκιμές. Ο πίνακας 11 αναφέρει συνοπτικά τους παράγοντες που αναστέλλουν την αγγειογένεση.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ
Angiostatin	Αναστολή της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων και της απόπτωσης
Endostatin	Αναστολή του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων
Prolactin-16kD fragment	Αναστολή μεταβίβασης του σήματος του VEGF και Bfgf
Thrombospondin-1	Αναστολή του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετανάστευσης
Thrombospondin-2	Αναστολή της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων
TIMPs	Αναστολή της πρωτεόλυσης της βασικής μεμβράνης
PAI-1, PAI-2	Αναστολή της πρωτεόλυσης της βασικής μεμβράνης
TGF-β	Αναστολή του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετανάστευσης
TNF-α (σε υψηλή συγκέντρωση)	Αναστολή του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων



IFN- α	Αύξηση της παραγωγής του IP-10 και μείωση της παραγωγής του bFGF
IFN- β	Αύξηση της παραγωγής του IP-10 και μείωση της παραγωγής του bFGF
IFN- γ	Αύξηση της παραγωγής του IP-10 και MIG και μείωση της παραγωγής της IL-8 Gro, και ENAP-78
IL-1	Αναστολή του πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων και μείωση της δράσης των bFGF υποδοχέων
IL-10;	Μείωση της παραγωγής του VEGF από τα μακροφάγα;
IL-12	Πρόκληση παραγωγής IFN- γ
Μη ELR-CXC chemokines (PF-4, IP-10, MIG)	Αναστολή της δράσης του VEGF, bFGF, IL-8 Gro και ENAP-78

Πίνακας 11: Συγκεντρωτική αναφορά των παραγόντων που αναστέλλουν την αγγειογένεση. TIMPs: tissue inhibitor of matrix metalloproteases, PAI: plasminogen activator Inhibitor, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, IFN: Intefferon, IL: interleukin, IP, IFN-inducible protein, bFGF: basic fibroblast growth factor, ENAP: epithelial-neurophil activating peptide, Gro: growth related oncogene, ELR: glutamate (E)-Leucine (L)-Arginine (R) motif, PF-4: platelet factor-4, MIG: monokine induced by IFN.

Αξιολόγηση της αγγειογένεσης και μετρήσεις μικροαγγείων στα καρκινώματα των πνευμόνων

Επιλογή αντισώματος

Η συνειδητοποίηση της σημασίας της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στην έκφραση της επιθετικής συμπεριφοράς των κακοηθών νεοπλασμάτων κατέστησε εμφανή την ανάγκη της ποσοτικής μέτρησής της¹⁷⁷. Η ανακάλυψη ειδικών αντισωμάτων κατά των ενδοθηλιακών



κυττάρων ικανοποίησε την παραπάνω ανάγκη καθώς η χρήση της ανοσοϊστοχημείας οδήγησε στη χρώση και ανάδειξη αγγείων σε ιστολογικές τομές νεοπλασμάτων.

Τα κύρια αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη των αγγείων με ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές παραφίνης είναι το CD31, το CD34 και το αντίσωμα κατά του von Willebrand Factor (vWF), η ευαισθησία και ειδικότητα των οποίων, όπως έχει διαπιστωθεί σήμερα, απέχει από το τέλειο¹⁷⁸⁻¹⁸³. Οι προαναφερόμενοι δείκτες αντιδρούν με την ίδια ένταση τόσο με τα νεοπλασματικά νεοαγγεία όσο και με τα φυσιολογικά που βρίσκονται στον υγιή ιστό που περιβάλλει το νεόπλασμα. Για τους παραπάνω λόγους έχει προταθεί η χρήση άλλων δεικτών ή η ταυτόχρονη χρήση ενός συμβατικού αντισώματος (κυρίως του CD34) με ένα δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όπως το ki-67), ώστε να αναδεικνύονται νεοαγγεία σε φάση πολλαπλασιασμού^{179,183,184}.

Μη ενδοθηλιακοί δείκτες, όπως η α-ακτίνη, που στρέφονται κατά των περικυττάρων (τοιχωματικά κύτταρα αγγείων) χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη αγγείων^{179,185}. Άλλοι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί, αν και όχι ευρέως, είναι το CD36, το TEC-11, το E9, το FB5, το BW200¹⁷⁹. Τα TEC-11, FB5 και E9 δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε δείγματα μονιμοποιημένα σε παραφίνη παρά μόνο σε τομές κρουστάτη.

Μέθοδοι καταμέτρησης

Η αγγειογένεση αξιολογείται έμμεσα σε κακοήθη νεοπλάσματα μέσω της μέτρησης μικροαγγείων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ο Weidner και οι συνεργάτες του πρότειναν μία τεχνική καταμέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Η συγκεκριμένη μέθοδος συνίσταται σε ανοσοϊστοχημική χρώση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων με τη χρήση αντισωμάτων. Στις τομές του νεοπλάσματος αναγνωρίζονται υπό χαμηλή μεγέθυνση (x40 και x100) οι περιοχές της ανοσοϊστοχημικά κεχρωσμένης ιστολογικής τομής



με την υψηλότερη συγκέντρωση αγγείων εντός του όγκου («θερμές περιοχές – hot spots»). Προς αποφυγή σφαλμάτων προτείνεται η επιλογή 3-5 θερμών περιοχών (η καταμέτρηση σε περισσότερες μειώνει την μικροαγγειακή πυκνότητα)¹⁸⁷ οι οποίες καλό είναι να μη βρίσκονται σε περιοχές έντονης φλεγμονής¹⁸⁶. Η παραπάνω αξιολόγηση και επιλογή γίνεται από δύο ή περισσότερους ανεξάρτητους παρατηρητές. Στη συνέχεια, σε μεγάλη μεγέθυνση (x400) ακολουθεί η καταμέτρηση αγγείων και γίνεται υπολογισμός της μικροαγγειακής πυκνότητας ως ο αριθμός αγγείων ανά οπτικό πεδίο. Ο ορισμός αυτός ισχύει και σήμερα, παρόλο που έχουν προταθεί και περιγραφεί αρκετές τροποποιήσεις της μεθόδου¹⁸⁹. Προκειμένου τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών να είναι συγκρίσιμα, είναι απαραίτητο να δίνεται κάθε φορά το εμβαδόν του οπτικού πεδίου στο οποίο έγινε η καταμέτρηση και ο αριθμός των θερμών περιοχών.

Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η υποκειμενική εκτίμηση διά οφθαλμών του εξεταστή και η μέθοδος Chalkley¹⁹⁰⁻¹⁹², οι οποίες στοχεύουν στην επίλυση ενός σημαντικού προβλήματος της τεχνικής του Weidner. Πρόκειται για το δίλημμα αν δύο παρακείμενες και εφαιπτόμενες δομές που βάφονται ανοσοϊστοχημικά με ένα ενδοθηλιακό δείκτη, θα καταμετρηθούν ως ένα ή ως δύο αγγεία.

Τη μέθοδο Chalkley εισήγαγαν το 1994 οι Fox και συνεργάτες βασίζοντάς την στη χρήση ειδικού βαθμονομημένου δικτυωτού πλέγματος στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου («grid»)^{190,193}. Πρόκειται για ένα κύκλο με 25 τυχαία τοποθετημένα σημεία ο οποίος προβάλλεται σε μία θερμή περιοχή και περιστρέφεται για να συμπεριλάβει όσο το δυνατόν περισσότερα αγγεία σε περιοχή με εμβαδόν 0,155 mm² και υπό μεγέθυνση x250. Ο μέσος όρος τριών μετρήσεων κατά Chalkley αντιστοιχεί στον όγκο. Η μέτρηση κατά Chalkley παρουσιάστηκε ως ένα υποκατάστατο μέτρησης της περιοχής των αγγείων¹⁹⁰. Παρόλα αυτά, θεωρείται πιο σωστή η παρουσία της μέτρησης ως άμεσα σχετιζόμενης με τον αριθμό και την περιοχή των αγγείων.



Πρέπει να αναφερθεί, ότι τόσο η κατά Weidner όσο και η κατά Chalkley μέθοδος έχουν σημαντική διακύμανση αποτελεσμάτων μεταξύ των παρατηρητών ως προς την επιλογή των θερμών περιοχών στις οποίες θα γίνει η καταμέτρηση, γεγονός που αυξάνει το συστηματικό σφάλμα των τεχνικών αυτών.

Έχουν προταθεί και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης των αγγείων χωρίς όμως να εφαρμόζονται ευρέως λόγω του αυξημένου κόστους του απαιτούμενου εξοπλισμού και των τεχνικών δυσκολιών που παρουσιάζουν¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Η μικροαγγειακή πυκνότητα στα καρκινώματα των πνευμόνων

Η σχέση της μικροαγγειακής πυκνότητας με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την κλινική έκβαση ασθενών με καρκίνωμα πνεύμονα έχει εξεταστεί από πολύ μικρό αριθμό μελετών¹⁹⁷⁻²¹⁰ εκ των οποίων οι περισσότερες αναφέρονται σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα. Όσον αφορά στα μικροκυτταρικά καρκινώματα των πνευμόνων οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι ελάχιστες^{199,207,209,210} λόγω της μικρής συχνότητας του εν λόγω ιστολογικού τύπου αλλά και των γενικότερων ιδιαιτεροτήτων του πνευμονικού ιστού.

Ορισμένες από τις παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα σχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα υποτροπών της νόσου και χειρότερη επιβίωση^{198,200,201,203,207,209} ενώ άλλες δεν επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις αυτές^{197,202,204-206,210}. Όλες οι προαναφερόμενες μελέτες εμφανίζουν τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω με αποτέλεσμα να κρίνεται επιτακτική η ανάγκη πραγματοποίησης επιπλέον μελετών οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη όχι μόνο τα μειονεκτήματα αλλά και τον σχεδιασμό των προηγούμενων μελετών ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγησή τους ως ενιαίο σύνολο.

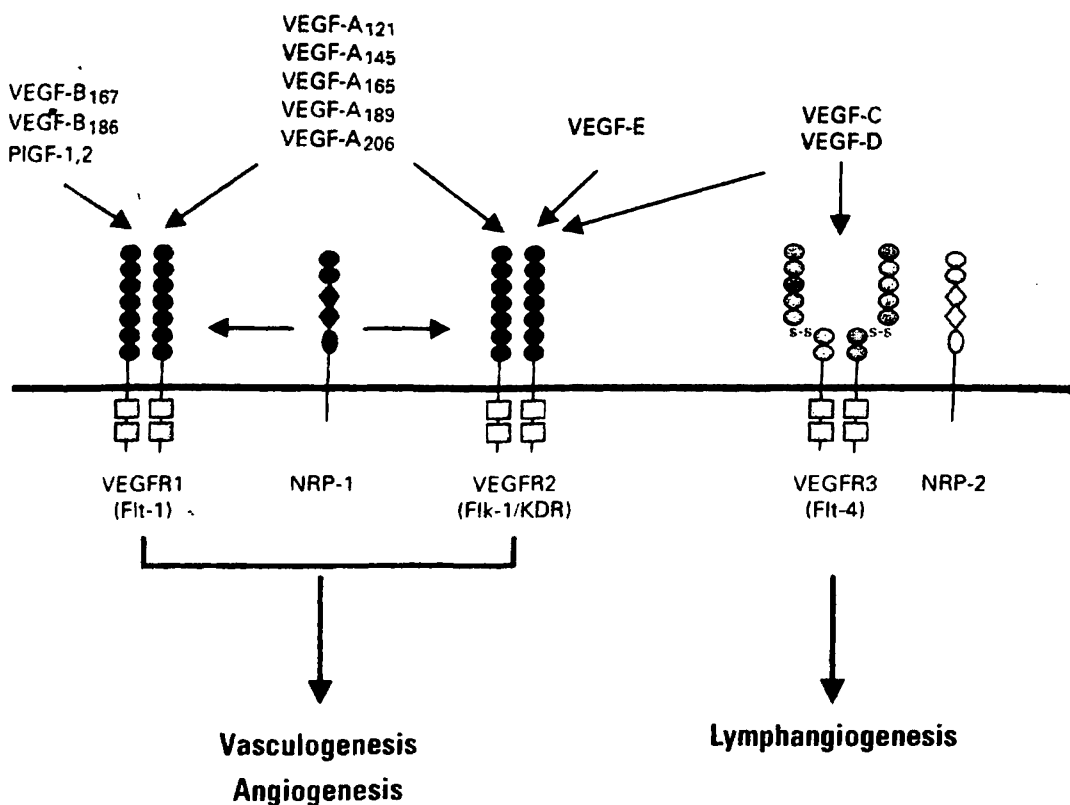


Η οικογένεια του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF).

Πρωτεϊνική δομή και βιολογικές δράσεις

Δεκαετίες έρευνας που αφορούσαν στη μοριακή βάση της αγγειογένεσης αναγνώρισαν έναν ικανό αριθμό οδών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων που προάγουν την νεοαγγειογένεση. Μία από τις βασικότερες οδούς που εμπλέκονται στην παραπάνω διαδικασία είναι αυτή της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF).

Η οικογένεια του VEGF αποτελείται από έξι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες αναφέρονται ως VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και PlGF-1 και PlGF-2 (placenta growth factor, αυξητικός παράγοντας του πλακούντα) (Εικόνα 8)²¹¹⁻²¹³.



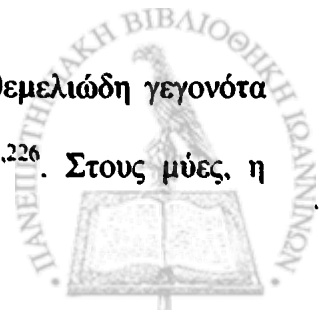
Εικόνα 8: Η δεσμευτική ικανότητα των διαφόρων μελών της οικογένειας VEGF και των υποδοχέων τους.

Ο VEGF-A (αναφέρεται συνήθως στη βιβλιογραφία ως VEGF) αναγνωρίστηκε αρχικά το 1983 από τους Senger και συνεργάτες²¹⁴ ως ένας παράγοντας έκλυσης της αγγειακής διαπερατότητας εκκρινόμενος από νεοπλασματικά κύτταρα. Ως εκ τούτου ονομάστηκε αρχικά αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας (VPF, vascular permeability factor). Το 1989, οι Ferrara και Henzel απομόνωσαν και ταυτοποίησαν τον VEGF-A ως μιτογόνο παράγοντα ειδικό για το ενδοθήλιο²¹⁵.

Ο VEGF-A είναι μία ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη 45-kDa με ευρύ φάσμα αγγειογενετικής δράσης. Το γονίδιο του VEGF-A υποβάλλεται σε εναλλακτικό διχασμό και σχηματίζει ώριμες ισομορφές με 121, 165, 189 και 206 αμινοξέα^{212,213}.

Επί προσθέτως, έχουν αναγνωριστεί και κάποιες λιγότερο συχνές μορφές (VEGF₁₄₅ και VEGF₁₈₃)²¹⁶. Ο VEGF₁₂₁ εκκρίνεται ελεύθερα σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες ισομορφές (VEGF₁₈₉ και VEGF₂₀₆) οι οποίες περιορίζονται στην εξωκυττάρια ουσία και απαιτούν τον κατατεμαχισμό των πρωτεασών για να ενεργοποιηθούν²¹⁷. Ο VEGF₁₆₅ υπάρχει τόσο σε διαλυτή μορφή όσο και σε συνδεδεμένη με την εξωκυττάρια ουσία²¹⁸. Οι συνδεδεμένοι με την εξωκυττάρια ουσία τύποι των VEGF-A, VEGF-C και VEGF-D, απελευθερώνονται σε διαχυόμενη μορφή μέσω του κατατεμαχισμού της πλασμίνης στο C-τερματικό, η οποία δημιουργεί μία βιοενεργή ουσία^{219,220}. Εναλλακτικά, ο VEGF μπορεί να απελευθερωθεί από την εξωκυττάρια ουσία μέσω της MMP-9 για να ξεκινήσει την «αγγειογενετική μεταστροφή»²²¹. Ο VEGF₁₆₅ αποτελεί την κυριότερη ισομορφή και υπερεκφράζεται από πληθώρα ανθρώπινων συμπαγών όγκων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι τρόποι έκφρασης συγκεκριμένων ισομορφών του VEGF είναι ειδικοί προς συγκεκριμένους ιστούς, υπονοώντας ότι οι ισομορφές αυτές διαδραματίζουν καθορισμένο ρόλο τόσο στην αγγειογένεση όσο και στην νεοαγγειογένεση²²²⁻²²⁴.

Έχει αποδειχτεί *in vivo* ότι η έκφρασή του σχετίζεται προσωρινά με θεμελιώδη γεγονότα τόσο της φυσιολογικής όσο και της νεοπλασματικής αγγειογένεσης^{225,226}. Στους μύες, η



ομόζυγη ή ετερόζυγη διαγραφή του γονιδίου του VEGF είναι εμβρυϊκά θανάσιμη δεδομένου ότι επιφέρει διαταραχές της αγγειογένεσης και καρδιαγγειακές ανωμαλίες. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την συμβολή του VEGF στη διαδικασία της ανάπτυξης^{227,228}. Ο VEGF-A συμβάλλει εξίσου σημαντικά σε μετεμβρυϊκές διεργασίες που σχετίζονται με αυξημένη αγγειογένεση όπως επούλωση τραυμάτων, ωορρηξία, έμμηνος ρύση, διατήρηση αρτηριακής πίεσης και εγκυμοσύνη²²⁹. Επιπλέον, ο VEGF-A έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις που ενέχουν αυξημένη αγγειογένεση όπως η αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η διαβητική αμφιβληστροϊδοπάθεια κ.α²¹¹.

Μύες οι οποίοι στερούνται των VEGF-B και PlGF δεν εμφανίζουν διαταραχές της εμβρυϊκής αγγειογένεσης ή αναπτυξιακές ανωμαλίες υποδηλώνοντας ότι ο ρόλος τους (PlGF, VEGF-B) μπορεί να είναι πλεονάζων²³⁰.

Οι VEGF-C και VEGF-D επιτελούν ουσιαστικούς ρόλους κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της μετεμβρυϊκής λεμφαγγειογένεσης. Η ομόζυγη διαγραφή του γονιδίου του VEGF-C στους μύες είναι εμβρυϊκά θανάσιμη ενώ η ετερόζυγη διαγραφή επιφέρει μετεμβρυϊκές διαταραχές της ανάπτυξης του λεμφικού συστήματος²³¹. Και οι δύο παράγοντες (VEGF-C, VEGF-D) εμπλέκονται στη διαδικασία ανάπτυξης νέων αγγείων, ιδίως σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη κακοηθών όγκων. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος τους στην νεοαγγειογένεση παραμένει ασαφής επί του παρόντος.

Ο VEGF-E δεν συναντάται στα θηλαστικά αλλά αποτελεί μία ιογενή πρωτεΐνη κωδικοποιούμενη από τον PARAPOX VIRUS Orf²³², ο οποίος χρησιμοποιεί τον υποδοχέα Flt-1 και διαθέτει μιτογενή δραστηριότητα χωρίς να φέρει την δεσμευτική της ηπαρίνης πρωτεΐνη ("Heparin Binding Protein").

Ο VEGF-E παρουσιάζει την ίδια αλληλουχία με τον VEGF-A σε ποσοστό 22% και δεν συνδέεται με την ηπαρίνη, κατ' αναλογία με τον VEGF₁₂₁.



Οι υποδοχείς του VEGF

Οι σύνδεσμοι του VEGF πραγματοποιούν την αγγειογενετική τους δραστηριότητα μέσω διαφορετικών υποδοχέων. Αρχικά, είχαν αναγνωριστεί δύο υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα οι οποίοι ονομάστηκαν VEGFR-1 (γνωστό και ως Flt-1) και VEGFR-2 (γνωστό και KDR- καντερίνη και το ομόλογό του Flk-1 στους μύες)²³³⁻²³⁵. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ακόμα ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης, ο VEGFR-3 (γνωστός και ως Flt-4) ο οποίος φαίνεται να εμπλέκεται στη διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης^{236,237}.

Όλες οι ισομορφές του VEGF-A συνδέονται τόσο με τον VEGFR-1 όσο και με τον VEGFR-2 ενώ οι PlGF-1 και PlGF-2 καθώς και ο VEGF-B συνδέονται ειδικά με τον VEGFR-1²³⁸⁻²⁴⁰.

Ειδικά ο VEGF-E συνδέεται με το VEGFR-2²⁴¹ ενώ οι VEGF-C και VEGF-D συνδέονται τόσο με τον VEGFR-3 όσο και με τον VEGFR-2^{242,243}. Έχει αποδειχτεί ότι τα κακοήθη νεοπλάσματα είναι σε θέση να εκφράζουν ταυτόχρονα πολλούς συνδέσμους του VEGF ενώ η έκφραση των υποδοχέων του VEGF ποικίλει σε συγκεκριμένα ενδοθηλιακά κυτταρικά στρώματα. Ο VEGFR-2 εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ οι VEGFR-1 και VEGFR-3 εκφράζονται επιλεκτικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα συγκεκριμένων αγγειακών στρωμάτων.

Υποδοχέας VEGFR-1

Ο VEGFR-1 είναι υποδοχέας του VEGF-A²⁴⁴ και έχει τη μοναδική ικανότητα σύνδεσης με τον VEGF-B²³⁸ και τον PlGF²³⁹. Ο VEGFR-1 κατέχει σημαντική θέση στην διαδικασία της φυσιολογικής και της αναπτυξιακής αγγειογένεσης. Οι μύες οι οποίοι στερούνται τον παραπάνω υποδοχέα πεθαίνουν κατά την διάρκεια της ενδομήτριας ζωής μεταξύ της 8^{ης} και 9^{ης} ημέρας λόγω υπέρμετρου αιμαγγειοβλαστικού πολλαπλασιασμού και πλημμελούς



οργάνωσης των αγγειακών δομών²⁴⁵. Παρά τον σημαντικό του ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης, η ακριβής λειτουργία του VEGFR-1 στην διαδικασία της αγγειογένεσης αλλά και σε άλλες διαδικασίες (π.χ αιμοποίηση) δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Μία πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Autiero και συνεργάτες²⁴⁶ έδειξε ότι η ενεργοποίηση του VEGFR-1 από τον PlGF έχει ως αποτέλεσμα την τρανσφωσφορυλίωση του VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν ταυτόχρονα και τους δύο υποδοχείς. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι κατά την διάρκεια παθολογικών διαδικασιών όπως η ογκογένεση, ο VEGFR-1 αποτελεί έναν πιθανό θετικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης²⁴⁷. Ως εκ τούτου, υποδηλώνεται ότι η λειτουργία του VEGFR-1 διαφοροποιείται με βάση τα στάδια της ανάπτυξης, τις διάφορες φάσεις φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων αλλά και τον τύπο του κυττάρου στο οποίο εκφράζεται.

Υποδοχέας VEGF-R2

Ο VEGFR-2 ρυθμίζει την πλειοψηφία των διεργασιών του VEGF-A στην αγγειογένεση μεταξύ των οποίων η μικροαγγειακή διαπερατότητα²¹⁷, ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, η μετανάστευση και η επιβίωση^{248,249}. Η σημασία του VEGFR-2 στην αγγειογένεση καταδεικνύεται από το γεγονός ότι οι ετερόζυγα και ομόζυγα στερούμενοι τον εν λόγω υποδοχέα μύες, πεθαίνουν κατά την ενδομήτρια ζωή λόγω διαταραχών διαμόρφωσης και ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου²⁵⁰.

Η ειδική ενεργοποίηση του VEGFR-2 από τον VEGF-E έδειξε ικανή ενδοθηλιακή κυτταρική δραστηριότητα *in vitro* και *in vivo*, ενισχύοντας την άποψη ότι η ενεργοποίηση του VEGFR-2 και μόνο μπορεί να προκαλέσει την αγγειογένεση²³². Η ενεργοποίηση του VEGFR-2 μπορεί να επηρεαστεί θετικά ή αρνητικά από την ταυτόχρονη έκφραση και ενεργοποίηση του VEGFR-1.



Neuropilins (NP1, NP2)

Η Neuropilin-1 αναγνωρίστηκε αρχικά ως μία γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας (130-140 kDa) η οποία αποτελούσε υποδοχέα των semaphoring/collapsins, μίας μεγάλης οικογένειας εκκρινόμενων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που χρησιμεύουν ως απωθητικά καθοδηγητικά σήματα στην νευρωνική ανάπτυξη²⁵¹⁻²⁵³.

Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι τα NP1 και NP2 χρησιμεύουν και ως συν-υποδοχείς του VEGF, υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο τους στην αγγειογένεση^{254,255}. Η NP1 διαφέρει από τους υποδοχείς VEGFR-1, -2, -3 δεδομένου ότι δεν διαθέτει ενδοκυτταρικό τομέα προώθησης σημάτων και η δραστηριότητά της πιθανόν ενεργοποιείται σαν συνυποδοχέας των VEGFR-1 και VEGFR-2^{254,256}. Η σύνδεση των ισομορφών του VEGF-A και των άλλων μελών της οικογένειας του VEGF με τη NP1 είναι εξαιρετικά ειδική. Ως εκ τούτου, η NP1 συνδέεται με τον VEGF₁₆₅ και τον PlGF-2 αλλά όχι με τον VEGF₁₂₁^{254,255}. Η NP2 συνδέεται με τους VEGF₁₆₅ και VEGF-C²⁵⁷.

Βιολογικές δράσεις του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Ο VEGF αποτελεί έναν από τους ικανότερους παράγοντες πρόκλησης αγγειακής διαπερατότητας (συγκεκριμένα θεωρείται 50.000 φορές ισχυρότερος από την ισταμίνη)²¹⁷. Η αυξημένη διαπερατότητα των νεοπλασματικών αγγείων θεωρείται ότι οφείλεται στην έκφραση του VEGF από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Επιπλέον, ο VEGF επιφέρει πληθώρα αλλαγών στο αγγειακό ενδοθήλιο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως μεταβολές στην μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων και του κυτταρικού σκελετού καθώς και ενεργοποίηση της μετανάστευσης και ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων^{217,258-260}.



Ο VEGF βρέθηκε αρχικά ότι δρα ως παράγοντας επιβίωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς²⁶¹ ενώ πρόσφατα αποδείχτηκε ότι προάγει την επιβίωση σε διάφορα μοντέλα ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro²¹¹.

Επί προσθέτως, αποτελεί μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ ταυτόχρονα παράγει ένζυμα και πρωτεΐνες που συντελούν στη διαδικασία της αποδόμησης. Στον Πίνακα 12, αναφέρονται συνοπτικά οι λειτουργίες του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
Πολλαπλασιασμός	Ενεργοποίηση των εκ των μιτογόνων ενεργοποιούμενων πρωτεϊνικών κινασών
Διαπερατότητα	Αγγειοκυστικά οργανίδια, ενδοθηλιακές θυριδοποιήσεις, διάνοιξη συνδέσμων μεταξύ όμορων ενδοθηλιακών κυττάρων
Διήθηση	Πρόκληση των μεταλλοπρωτεϊνικών Ura, uPAR, TTPA
Μετανάστευση	Ενεργοποίηση του FAK, p38, νιτρικού οξειδίου
Επιβίωση	Πρόκληση P113/Akt, Bcl2, A1, survivin, XIAP ή FAK
Ενεργοποίηση	Ενίσχυση έκφρασης της ιντεγκρίνης, διαφοροποιήσεις στον κυτταρικό σκελετό

Πίνακας 12: Συνοπτική αναφορά των λειτουργιών του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Συντομεύσεις: VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia inducible factor; IGF-IR, insulin-like growth factor-I receptor; COX-2, cyclooxygenase-2; EGFR, epidermal growth factor receptor; AP-1, activator protein-1; IL-1B, interleukin-1B; SP-1, specificity protein-1; IL-6, interleukin-6; NF- κ B, nuclear factor kappa B; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor.



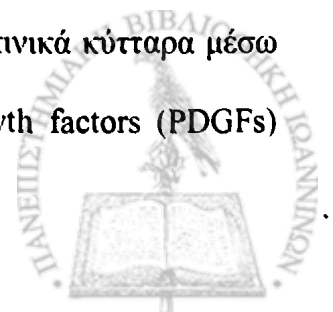
Ρυθμιστικοί παράγοντες του VEGF και της έκφρασής του

Υποξία

Η υποξία θεωρείται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης του VEGF (Πίνακας 12). Μελέτες έδειξαν ότι ο HIF-1 (hypoxia inducible factor) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της υποξικής απάντησης και ότι τα παράγωγα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου von Hippel Lindau (vHL) κατέχουν εξίσου σημαντική θέση^{211,262,263}. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παροχής οξυγόνου, ο HIF-1^α αποδομείται ταχέως μέσω της ubiquitin-proteosome οδού, η οποία ρυθμίζεται από τα παράγωγα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου vHL²⁶²⁻²⁶⁴. Σε συνθήκες υποξίας, ή επί απουσίας ή μετάλλαξης του vHL, ο HIF-1^α διμερίζεται με τον HIF-1^β και το συγκεκριμένο σύμπλοκο μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον προαγωγό του VEGF, συντελώντας σε αυξημένη αντιγραφή του VEGF.

Αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων στα νεοπλασματικά κύτταρα και κατά συνέπεια ενισχύουν έμμεσα την αγγειογένεση. Η σημασία του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor EGFR; ErbB1) και του συστήματος HER-2/neu (ErbB2) στην ρύθμιση του VEGF και της αγγειογένεσης έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες περιπτώσεις, όπως καρκίνος παχέος εντέρου²⁶⁵, παγκρέατος²⁶⁶, στομάχου²⁶⁷ και πνεύμονα (μη μικροκυτταρικό)²⁶⁸. Ο υποδοχέας του insulin like growth factor-I (IGF-IR) εκφράζεται συχνά σε πλήθος κακοηθών νεοπλασμάτων και έχει σχετιστεί με επιθετικότητα της νόσου και δημιουργία μεταστάσεων^{269,270}. Ο hepatocyte growth factor μπορεί να προκαλέσει έκφραση του VEGF τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα μέσω ενεργοποίησης του c-MET²⁷¹. Η οικογένεια των platelet derived growth factors (PDGFs)



προάγει την αγγειογένεση *in vivo* μέσω της ρύθμισης της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων^{272,273} ενώ την τελευταία δεκαετία έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτιση της υπερέκφρασης του COX-2 (cyclooxygenase) και της αυξημένης αγγειογένεσης (αυξημένη έκφραση VEGF) και ανάπτυξης του όγκου σε διάφορους συμπαγείς όγκους όπως στομάχου²⁷⁴, παχέος εντέρου²⁷⁵, προστάτου²⁷⁶, μαστού²⁷⁷.

Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια

Το ογκογονίδιο c-*Src* εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης του VEGF και προάγει την νεοαγγειογένεση σε αναπτυσσόμενους όγκους¹²⁴. Ομοίως, το ογκογονίδιο BCR-ABL κατέχει σημαντική θέση στην μοριακή παθογένεση των λευχαιμιών οι οποίες θεωρούνται εξαρτώμενες από την αγγειογένεση²⁷⁸.

Η έκφραση των μεταλλαγμένων Ras ογκογονιδίων ανιχνεύεται ιδιαίτερα συχνά στις ανθρώπινες νεοπλασίες και η πρόκληση της έκφρασης του VEGF από μεταλλαγμένα H- ή K-ras ογκογονίδια αναφέρεται σε καρκίνο παγκρέατος²⁷⁹ και σε μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα²⁸⁰. Στον Πίνακα 12 αναφέρονται συγκεντρωτικά οι ρυθμιστικοί παράγοντες της έκφρασης του VEGF στα καρκινικά κύτταρα.

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ/ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	ΟΔΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ/ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ, ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ, ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ, ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ/ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ
Ras	Src	Υποξία
Src	Beta catenin	Χαμηλό pH
PTEN	HIF	IGF-IR
p53	COX-2	EGFR



Vhl	AP-1	IL-1B
Wnt	SP-1	IL-6
Rb	NF-Kb	c-MET
HER-2	Bcl-2	PDGFR
c-jun	Akt/PKB	
c-fos		
MDM2		
E2a-Pbx1		
PML-RARa		
RhoC		
Elf-4E		
NOX-1		

Πίνακας 12: Παράγοντες ρύθμισης της έκφρασης του VEGF στα καρκινικά κύτταρα. Ορισμένες από τις παραπάνω κατηγορίες μπορεί να αλληλοκαλύπτονται.

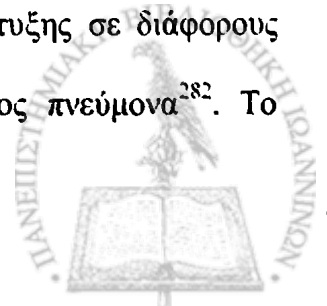
Συντομογραφίες: VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia inducible factor; IGF-IR, insulin-like growth factor-I receptor; COX-2, cyclooxygenase-2; EGFR, epidermal growth factor receptor; AP-1, activator protein-1; IL-1B, interleukin-1B; SP-1, specificity protein-1; IL-6, interleukin-6; NF- κ B, nuclear factor kappa B; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor.

Θεραπευτικές προοπτικές

Η κατανόηση του ουσιαστικού ρόλου του VEGF στην νεοπλασματική αγγειογένεση οδήγησε στην παραγωγή φαρμάκων με σκοπό την αναστολή της δράσης του και επομένως την βελτίωση της επιβίωσης των καρκινοπαθών.

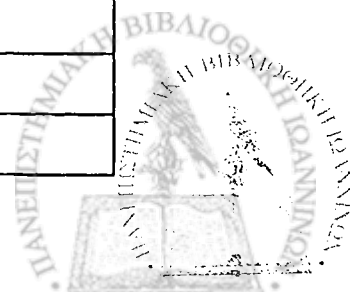
Ο πιο εξελιγμένος κλινικά στοχευμένος αντιαγγειογενετικός παράγοντας είναι το bevacizumab (Avastin, Roche, Basel, Switzerland; Genentech, Inc., South San Francisco, CA)²⁸¹, που αποτελεί ένα ανασυνδισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF.

Προκλινικές μελέτες με το bevacizumab έδειξαν αναστολή της ανάπτυξης σε διάφορους όγκους, συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος πνεύμονα²⁸². Το



bevacizumab σε συνδυασμό με την 5-φθοροουρακίλη έχει πρόσφατα εγκριθεί στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες ως θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατικά καρκινώματα παχέος εντέρου και στις Ηνωμένες Πολιτείες ως θεραπεία πρώτης γραμμής για εκτεταμένο μη πλακώδες μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Ο Πίνακας 12 αναφέρει τους αναστολείς της αγγειογένεσης για τα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνευμόνων που βρίσκονται σε κλινική εξέλιξη.

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	ΣΤΑΔΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
Bevacizumab	Anti-VEGF αντίσωμα	Σύνδεσμοι του VEGF	Φάση III
Sorafenib	TKI	Raf-1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-h, Flt-3, c-Kit	Φάση III
Sunitinib	TKI	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, Flt-3, PDGFR-a, PDGFR-h, c-Kit	Φάση II
Vatalanib	TKI	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-h, c-Kit, c-Fms	Φάση II
AMG 706	Αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, c-Kit, c-Ret	Φάση II
CP-547,632	TKI	VEGFR2	Φάση II
AZD2171	TKI	VEGFR2	Φάση II-III



AEE788	TKI	VEGFR1, VEGFR2, EGFR, HER2	Φάση I/II
ZD6474	TKI	VEGFR2, VEGFR3, EGFR	Φάση II

Πίνακας 12: Αναστολείς αγγειογένεσης σε κλινική ανάπτυξη για τα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνευμόνων.



ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Εισαγωγή

Το λεμφικό αγγειακό δίκτυο διατηρεί την ομοιόσταση των ιστών και την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της καθοδήγησης των λευκοκυττάρων και των ενεργοποιημένων κυττάρων παρουσίασης των αντιγόνων (antigen presenting cells) προς τους λεμφαδένες. Επίσης, το λεμφικό σύστημα σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου καθότι τα καρκινικά κύτταρα συχνά διασκορπίζονται από τον αρχικό όγκο μέσω των λεμφικών τριχοειδών²⁸³. Η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία και στους τοπικούς λεμφαδένες αποτελεί βασικό κριτήριο για την σταδιοποίηση πολλών νεοπλασμάτων στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα, και χρησιμοποιείται ως δραστικό στοιχείο σε θεραπευτικές παρεμβάσεις²⁸⁴. Παρά το γεγονός ότι η κλινική συνάφεια της εμπλοκής των λεμφαδένων αποτελεί ένα γνωστό γεγονός, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται μέσω των λεμφαγγείων δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Συγκεκριμένα, η έλλειψη δεικτών ειδικών προς τα λεμφαγγεία αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα προς την κατεύθυνση αυτή. Την τελευταία δεκαετία, σημειώθηκε ιδιαίτερη πρόοδος στον τομέα αυτό, μέσω της αναγνώρισης ειδικών δεικτών για τα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα όπως ο VEGFR-3, το LYVE-1 (υποδοχέας του χυαλουρονικού) ή η ποδοπλανίνη²⁸⁵. Η διαθεσιμότητα των δεικτών αυτών επέτρεψε την ποσοτικοποίηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας σε βιοψίες όγκων και την απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων για *in vitro* μελέτες.



Λεμφαγγειογένεση και καρκίνος-Μοριακοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί

Παρά το γεγονός ότι η αιμαγγειογενής δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων διαπιστώθηκε πριν δεκαετίες²⁸⁶, πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι οι όγκοι μπορούν να προκαλέσουν αγγειογένεση μέσω της παραγωγής προ-λεμφαγγειογενών παραγόντων όπως ο VEGF-C²⁸⁵.

Οι πληροφορίες που έχουν συγκεντρωθεί ως τώρα σχετικά με τους μηχανισμούς που σχετίζονται με την ρύθμιση της ανάπτυξης των λεμφαγγείων αποδεικνύουν ότι υπάρχουν αλληλοεπικαλυπτόμενοι μηχανισμοί μεταξύ αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης. Ο κύριος ρυθμιστικός μηχανισμός ειδικά για τα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ο άξονας που σχηματίζεται από τον VEGFR-3 (γνωστό και ως Flt-4) και τους συνδέσμους του (VEGF-C και VEGFC-D).

Ο VEGFR-3 ήταν ο πρώτος λεμφαγγειακός ενδοθηλιακός δείκτης που ανακαλύφθηκε και δείχνει υψηλή δομική ομολογία με τον VEGFR-2, ο οποίος σχετίζεται πιο άμεσα με την αγγειογένεση²³⁶. Η σύνδεση του VEGFR-3 με τους συνδέσμους του προκαλεί αυτοφωσφορullίωση της τυροσίνης και επιστράτευση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών οι οποίες προάγουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, την μετανάστευση και την επιβίωση²⁸⁷. Για τον παραπάνω λόγο, η έκφραση και ενεργοποίηση της οδού του VEGFC-D/VEGFR-3 φαίνεται να αποτελεί ένα βασικό μοριακό σύνδεσμο μεταξύ καρκίνου και λεμφαγγειογένεσης, καθιστώντας τον ικανό στόχο για την παρεμπόδιση της μεταστατικής διασποράς των συμπαγών όγκων.

Παρόλα αυτά, πρόσφατα δημοσιευμένα στοιχεία δείχνουν ότι η κατάσταση είναι αρκετά πιο πολύπλοκη. Η αναγνώριση των συνυποδοχέων για τους VEGF-C και VEGF-D όπως οι neuropilin-2²⁸⁸ ή οι β1 και α9 integrins, υποδηλώνει την ύπαρξη πολυπλοκότερων οδών²⁸⁹.



Πρόσφατες μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι ο αγγειογενετικός παράγοντας VEGF-A μπορεί να προκαλέσει και λεμφαγγειογένεση και να προάγει την μετάσταση των όγκων²⁹⁰. Επιπλέον, άλλοι αυξητικοί παράγοντες όπως η αγγειοποιητίνη, ο fibroblast growth factor 2, ο platelet-derived growth factor B, και ο hepatocyte growth factor²⁹¹ ενεργοποιούν την ανάπτυξη των λεμφαγγείων, υποδηλώνοντας ότι ουσιαστικά έχουμε εντοπίσει μόνο την κορυφή μίας πολύπλοκης ρυθμιστικής διαδικασίας.

Από τη μία πλευρά, διάφορα ευρήματα καταδεικνύουν ότι τα λειτουργικά λεμφαγγεία που βρίσκονται εντός του ορίου του όγκου είναι επαρκή για την πρόκληση λεμφογενούς μετάστασης²⁹². Από την άλλη, πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν την ύπαρξη ενδοογκικών λεμφαγγείων και δηλώνουν την συσχέτισή τους με φτωχή επιβίωση²⁹³.

Το ερώτημα περί ενδο- έναντι περιογκικής εντόπισης είναι ενδιαφέρον κατά την αξιολόγηση όγκων που προέρχονται από όργανα, όπως ο πνεύμονας, με ετερογενή λεμφαγγειακή διασπορά. Στον πνεύμονα, το λεμφικό αγγειακό δίκτυο εκτείνεται μέχρι τα βρογχιόλια αλλά όχι ως τις κύψελίδες²⁹⁴.

Η λεμφαγγειογένεση στον καρκίνο του πνεύμονα

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα των VEGF-C και VEGF-D mRNA πρωτεϊνών αυξάνονται σε μικροκυτταρικά καρκινώματα των πνευμόνων²⁹⁵. Η αξιολόγηση της έκφρασης των VEGF-C, VEGF-D και VEGFR3 στα κλινικοπαθολογικά δείγματα έδειξε ότι συχνά υπερεκφράζονται σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνευμόνων. Η παρούσα έκφραση σχετίζεται με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης²⁹⁶. Επιπλέον, ο καθορισμός των επιπέδων του VEGF-C στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα των πνευμόνων έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης λεμφαγγειακής μετάστασης και η αξιολόγησή του σε συνδυασμό με την αξονική τομογραφία έχει προταθεί ως ένας συμπληρωματικός τρόπος σταδιοποίησης λεμφαδένων²⁹⁷.



Παρά την ύπαρξη αποδείξεων σχετικά με την παρουσία ενός ενεργού δικτύου πολλαπλασιασμού λεμφαγγείων στην περίπτωση των αδενοκαρκινωμάτων πνεύμονα, εξακολουθεί να παραμένει ένας μεγάλος αριθμός ερωτήσεων σχετικά με την λεμφαγγειογένεση στα καρκινώματα των πνευμόνων. Μεταξύ αυτών, συμπεριλαμβάνεται η ύπαρξη ενδοογκικών λεμφαγγείων²⁹⁸ ή η ύπαρξη μίας απλής συσχέτισης μεταξύ του ετερογενούς λεμφαγγειακού δικτύου και της συχνότητας μεταστατικής διασποράς. Τέλος, δεν είναι ακόμα σαφές ως πιο σημείο αλλάζει η συσχέτιση της λεμφαγγειακής ανάπτυξης στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα των πνευμόνων με βάση τον ιστολογικό τύπο, το μέγεθος του όγκου ή την τοπογραφικά ανατομική του θέση στον πνεύμονα.

Αναστολή της λεμφαγγειογένεσης

Διάφορες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα σε προκλινικές και κλινικές μελέτες σχετικά με το θεραπευτικό στόχο της νεοπλασματικής ανάπτυξης λεμφαγγείων. Μερικές εξ αυτών χρησιμοποίησαν ειδικά αντισώματα κατά των VEGF-C, VEGF-D ή VEGFR3 με σκοπό να εξουδετερώσουν τη δραστηριότητά τους²⁹⁹. Εναλλακτικά, έχουν αναπτυχθεί διαλυτές μορφές του υποδοχέα VEGFR3 και χρησιμοποιούνται σε προκλινικές μελέτες²⁹⁹. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της διαλυτής μορφής του VEGFR-3 στον καρκίνο του πνεύμονα σε πειραματόζωα ελάττωσε τα λεμφαγγεία των όγκων και την επίπτωση μεταστάσεων σε φρουρούς λεμφαδένες³⁰⁰. Επιπλέον, ορισμένοι μικρομοριακοί αναστολείς της δραστηριότητας της VEGFR2 κινάσης για τους οποίους έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν και την δραστηριότητα της VEGFR3 κινάσης, δοκιμάζονται προσεχώς σε κλινικές μελέτες. Παραδείγματα των αναστολέων αυτών αποτελούν οι BAY 43-9006 (sorafenib), PTK787/ZK222584 (Vatalanib), CEP-7055 και indolinones όπως MAE87 και MAZ51.22



Το πιθανό κλινικό όφελος από την στοχευμένη θεραπεία κατά της λεμφαγγειογένεσης μοιάζει να είναι πολλά υποσχόμενο. Μπορεί να ληφθεί υπόψιν ακόμα και ένας συνδυασμός θεραπειάς με σκοπό την αναστολή τόσο της αγγειογένεσης όσο και της λεμφαγγειογένεσης. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα ύπαρξης σοβαρών παρενεργειών, κυρίως στην αιμοποίηση και σε οιδήματα ιστών, αποτελεί ισχυρό λόγο για την ιδιαίτερα προσεκτική δράση σε σχέση με την εισαγωγή και εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πράξη.

CD 105 και λεμφαγγειογένεση

Η υπόθεση ότι το CD105 μπορεί να σχετίζεται με την νεοπλασματική λεμφαγγειογένεση αναπτύχθηκε μετά από παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες ο συγκεκριμένος δείκτης εμφάνισε αυξημένη έκφραση στο ενδοθήλιο διαφόρων νεοπλασματικών ιστών σε σχέση με αυτά των υγιών ιστών³⁰¹⁻³⁰³. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά εργαστήρια με την χρήση διαφόρων αντισωμάτων κατά του CD105, αποκάλυψαν αυξημένη έκφραση του αντισώματος σε μεγάλο εύρος νεοπλασματικών ενδοθηλίων συμπεριλαμβανομένων όγκων του παχέος εντέρου, του μαστού, του εγκεφάλου και του τραχήλου μήτρας. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν πιθανή ανάμειξη του CD105 στην νεοπλασματική λεμφαγγειογένεση³⁰²⁻³⁰⁶. Οι διαφορές σχετικά με την ένταση της χρώσης στα διάφορα δείγματα μπορούν να ερμηνευτούν με διάφορους τρόπους, όπως τα κριτήρια σταδιοποίησης, ο θετικός και αρνητικός έλεγχος που χρησιμοποιήθηκε (control) καθώς και ο προσδιορισμός του υγιούς ιστού. Παρόλα αυτά, όλα τα δείγματα έδειξαν αυξημένη έκφραση του CD105 στο νεοπλασματικό ενδοθήλιο σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την σημασία του ρόλου του CD105 στη λεμφαγγειογένεση προέρχονται από μύες. Πλήρης έλλειψη του CD105 συνδέεται με πολλαπλά λεμφαγγειακά και καρδιολογικά προβλήματα τα οποία από νωρίς (πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο) οδηγούν στο θάνατο^{307,308}.



Μοριακά χαρακτηριστικά του CD105

Πρωτεϊνική δομή

Το CD105 (Ενδογλίνη) εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ως μία 180kDa ομοδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη^{309,310}. Οι εξωτερικές δομές της ενώνονται με δεσμό υψηλής συγγένειας (50nM) με τις ισομορφές TGF-₁ και -3³¹¹. Οι διαμεμβρανικές και οι ενδοκυττάρειες δομές του CD105 εμφανίζουν παρεμφερή αλληλουχία σε ποσοστό 71% με τη βήτα-γλυκάνη (betaglytan)³¹¹. Το γονίδιο που ρυθμίζει την παραγωγή και έκφραση του CD105 στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9q34, αναγνωρίζεται με ανοσοφθορισμό και *in situ* υβριδισμό ενώ η περιοχή κωδικοποίησης του περιέχει 14 εξόνια^{312,313}. Έχουν αναγνωριστεί δύο διαφορετικές ισομορφές (L και S) του CD105 οι οποίες συνδέονται με το TGF και διαφέρουν ως προς τη σύσταση αμινοξέων των κυτταροπλασματικών απολήξεών τους. Το L-CD105 αποτελείται από 633 αμινοξέα εκ των οποίων 47 βρίσκονται στην κυτταροπλασματική απόληξη σε αντίθεση με το S-CD105 που αποτελείται από 600 αμινοξέα εκ των οποίων μόλις 14 βρίσκονται στην κυτταροπλασματική απόληξη³¹⁴. Το CD105 φωσφορυλιώνεται διαρκώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα, κυρίως σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το μέγεθος της φωσφορυλίωσης του L-CD105 είναι οκτώ φορές μεγαλύτερο από αυτό του S-CD105³¹⁵.

Μηχανισμός δράσης

Το φάσμα των γνώσεων σχετικά με τον μηχανισμό δράσης του CD105 είναι περιορισμένο^{316,317}. Η εικόνα που έχουμε περιπλέκεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι οι διαφορετικοί υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με το CD105 ανήκουν στην οικογένεια των σερινικών/θρεονινικών κινασών (serine/threonine kinases).



Σύμφωνα με μία άποψη, το CD105 δρα στα πλαίσια της ικανότητάς του να παρουσιάζει συνδέσμους, γεγονός που αντιφάσκει με την γνωστή του ικανότητα να αναστέλλει την διαδικασία εκπομπής σήματος από το TGF, εκτός και αν παρουσιάζεται σε ένα μη λειτουργικό δρόμο και τελικά απενεργοποιεί τους υποδοχείς του TGF. Πρόσφατη πρόοδος σχετικά με το θέμα διαφώτισε την αλληλεπίδραση μεταξύ CD105 και των υποδοχέων εκπομπής σημάτων. Η πλήρης μορφή του CD105 μπορεί να δεσμευτεί με τους υποδοχείς TGF-RI και TGF-RII εν τη απουσία του TGF ενώ η αλληλεπίδραση CD105/TGF-RI είναι διαφορετική από αυτή μεταξύ CD105/TGF-RII.

CD105 και πρόγνωση σε νεοπλασίες

Η χρήση διαγνωστικών μέσων με βάση το CD105 μπορεί να επιτελέσει ένα σημαντικό ρόλο στην κλινική αντιμετώπιση καρκινοπαθών ασθενών. Τομείς με πιθανές προοπτικές περιλαμβάνουν αυτόν της διάγνωσης, της επανεξέτασης (follow-up), της πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία, της πρόγνωσης. Τα αδρά επίπεδα CD105 μπορεί να καταστούν χρήσιμα σαν δείκτες της προόδου της νόσου αλλά και για τον προσδιορισμό ασθενών με πιθανότητα υποτροπής και εμφάνισης μεταστάσεων. Σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, τα επίπεδα CD105 αυξήθηκαν σημαντικά στο πλάσμα τους σε σχέση με αυτό των υγιών ατόμων. Ιδιαίτερα σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε σε αυτούς τους ασθενείς που επακολούθως εμφάνισαν απομακρυσμένες μεταστάσεις³¹⁸. Οι Takahashi και συνεργάτες³¹⁹ επιβεβαίωσαν τα παραπάνω ευρήματα σε ασθενείς με κολο-ορθικό καρκίνο, καρκίνο μαστού κ.ά.

Ασθενείς με μεταστατική νόσο παρουσίασαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του CD105 σε σχέση με ασθενείς χωρίς μεταστάσεις και υγιή άτομα από την ομάδα ελέγχου. Η χημειοθεραπεία μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του CD105 στον ορό.



Η λεμφαγγειακή πυκνότητα αναφέρθηκε ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα σε διάφορες ανθρώπινες νεοπλασίες, όπου αύξησή της σχετίστηκε με μικρότερα συνολικά ποσοστά επιβίωσης καθώς και με μικρότερα χρονικά διαστήματα ελεύθερα υποτροπών^{186,187,320}. Από όσα είναι γνωστά και μετά από ενδελεχή έρευνα στη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς η έκφραση του CD105 σε σχέση με την πρόγνωση στα καρκινώματα των πνευμόνων.



Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης σε δείγματα μικροκυτταρικών και μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων πνεύμονα, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην διερεύνηση της τυχόν προγνωστικής αξίας που διαθέτει η ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των κύριων παραγόντων που ελέγχουν τις παραπάνω διεργασίες, ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν:

1. Η έκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα μικροκυτταρικών (ΜΚΠ) και μη μικροκυτταρικών νεοπλασμάτων (μηΜΚΠ) πνεύμονα και η συσχέτισή της με διαθέσιμες κλινικές παραμέτρους (στάδιο νόσου, παρουσία μεταστάσεων, επιβίωση) και δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία). Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ΜΚΠ και των μη ΜΚΠ αλλά και με αυτά των ήδη δημοσιευμένων μελετών.
2. Η έκφραση των υποδοχέων VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1 του VEGF στα ΜΚΠ και μη ΜΚΠ και η συσχέτισή τους με την έκφραση του VEGF, τις κλινικές παραμέτρους και τα δημογραφικά στοιχεία
3. Η έκφραση του CD105 με υπολογισμό της ενδοογκικής λεμφαγγειακής μικροαγγειακής πυκνότητας (Intratumoral Lymphatic Microvessel Density- ILMVD ή ΛΠ). Επίσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση της παραπάνω έκφρασης της λεμφαγγειογένεσης με την αγγειογένεση (έκφραση VEGF, VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1). Διερευνήθηκε επίσης η προγνωστική αξία του CD105 ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών και συσχετίστηκε με την αντίστοιχη προγνωστική αξία της αγγειογένεσης.



4. Η ανίχνευση λεμφαγγειακής προσβολής μέσω της ύπαρξης νεοπλασματικών εμβόλων εντός των λεμφαγγείων, η συσχέτισή της με τη λεμφαγγειακή πυκνότητα (ILMVD ή ΛΠ) και την κλινική έκβαση των ασθενών.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή δείγματος

Πραγματοποιήθηκε αναδρομική μελέτη σειράς σε 146 ασθενείς της Πνευμονολογικής Κλινικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Π.Γ.Ν.Ι), οι οποίοι είχαν διαγνωσθεί με καρκίνωμα πνεύμονα, κατά το χρονικό διάστημα 2002-2005. Από το αρχείο δειγμάτων ασθενών του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Π.Π.Γ.Ν.Ι αναζητήθηκαν τα μονιμοποιημένα δείγματα νεοπλασμάτων πνεύμονα των παραπάνω ασθενών. Τα προς εξέταση δείγματα αποτελούνταν από βιοπτικά υλικά, λοβεκτομές και πνευμονεκτομές, είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και είχαν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης. Ο τελικός αριθμός του δείγματος αφορούσε σε 96 μη ΜΚΠ και 50 ΜΚΠ.

Επειδή για τον κάθε ασθενή υπήρχαν αρχειοθετημένα πέραν του ενός κύβοι παραφίνης, ακολούθησε προσεκτική αξιολόγηση όλων των αρχειοθετημένων τομών που ήταν χρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, ώστε να επιλεγεί ο ένας και καταλληλότερος κύβος για κάθε ασθενή.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε εκείνο το τμήμα του νεοπλάσματος στο οποίο ήταν εμφανής τόσο η εντός του όγκου περιοχή, όσο και ο περίξ αυτού φυσιολογικός ιστός. Κύβοι που παρουσίαζαν τμήματα του όγκου με μεγάλες περιοχές νέκρωσης ή/και έντονης φλεγμονής, απορρίφθηκαν. Οι τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση του βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης του κάθε νεοπλάσματος.

Από τον κάθε κύβο παραφίνης κόπηκαν σε μικροτόμο συνεχείς τομές πάχους 2μm η καθεμία και τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια (superfrost) για την τέλεση των ανοσοϊστοχημικών



χρώσεων. Η σειρά των τομών καταγράφηκε προσεκτικά, ώστε αυτές να είναι πάντα συνεχόμενες.

Ασθενείς - Κλινικοπαθολογικά δεδομένα - Επιβίωση

Κλινικές πληροφορίες για τους ασθενείς, τα δείγματα των οποίων επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν από τους ιατρικούς φακέλους των ασθενών αυτών από το αρχείο της Πνευμονολογικής Κλινικής του Π.Π.Γ.Ν.Ι.

Αναφορικά με όλους τους ασθενείς μελετήθηκαν οι ιατρικοί φάκελοι, οι ακτινογραφίες θώρακος, οι αξονικές τομογραφίες, μαγνητικές τομογραφίες εγκεφάλου, σπινθηρογραφήματα οστών, και τα πρακτικά του χειρουργείου, όπου αυτό πραγματοποιήθηκε.

Καταγράφηκε το φύλο, η ηλικία, η σταδιοποίηση της νόσου, η ύπαρξη μεταστάσεων σε σχέση με το παρεμβαλλόμενο χρονικό διάστημα από τη διάγνωση, η επιβίωση (μόνο στα ΜΚΠ λόγω πληρότητας του αρχείου της Κλινικής) και το είδος θεραπείας που έλαβε ο κάθε ασθενής.

Η σταδιοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση τα κριτήρια κατά AJCC 2002 (American Joint Committee on Cancer) και κατά ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)^{85,86,67}.

Η παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών μετά τη διάγνωση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο τακτικών εξωτερικών ιατρείων, και τηλεφωνικής επικοινωνίας.

Οι πληροφορίες καταχωρήθηκαν σε αρχείο επεξεργασίας δεδομένων με αριθμητική κωδικοποίηση και μόνον, ώστε να μη μπορεί να αποκαλυφθεί η ταυτότητα του κάθε ασθενούς.



Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε διαδοχικές τομές παραφίνης πάχους 2μm με την χρήση του EnVision System (DAKO, Glostrup, Denmark).

Συνοπτικά, οι τομές αποπαραφινώθηκαν και αφυδατώθηκαν. Ακολούθησε τοποθέτηση σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH=6), εν συνεχεία είσοδος στο φούρνο μικροκυμάτων στα 300W για 15 λεπτά δύο φορές, και κατόπιν παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η ενδογενής υπεροξειδάση απενεργοποιήθηκε με επώαση σε υπεροξείδιο του υδρογόνου 3% για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, έγινε πλύση με απεσταγμένο νερό και 10λεπτη πλύση με διάλυμα TBS (tris-buffer-saline) (DAKO). Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν VEGF (Neomarkers, Fremont, California, USA) διάλυση 1/50), VEGF-R1-Flt1 (DBS, California, USA, διάλυση 1/30), VEGF-R2-Flk1 (DBS, California, USA, διάλυση 1/30) και CD105 (DBS, California, USA, διάλυση 1/30) σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες (Πίνακας 13). Ακολούθησε δεύτερη 10λεπτη πλύση με διάλυμα TBS και κατόπιν εφαρμόστηκε το δευτεροταγές μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των VEGF, VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1 και CD105 για 30 λεπτά (Envision Kit, DAKO). Πραγματοποιήθηκε επανάληψη της 10λεπτης πλύσης με TBS και έπειτα εφαρμογή χρωμογόνου DAB (3'-diaminobenzidine) (Envision Kit, DAKO) επί 2-3 λεπτά με ταυτόχρονο μικροσκοπικό έλεγχο. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με αντίθετη χρώση με αιματοξυλίνη 10%, πλύση με τρεχούμενο νερό, αφυδάτωση και παρασκευή του μικροσκοπικού παθολογοανατομικού παρασκευάσματος.



Αντίσωμα	Προέλευση	Antigen Retrieval	Αραίωση	Επώαση
VEGF	Neomarkers, Fremont, California, USA	Citrate buffer	1/50	24 ώρες, θερμοκρασία δωματίου
VEGF-R1-FIt1	DBS, California, USA	Citrate buffer	1/30	24 ώρες, θερμοκρασία δωματίου
VEGF-R2-Flk1	DBS, California, USA	Citrate buffer	1/30	24 ώρες, θερμοκρασία δωματίου
CD105	DBS, California, USA	Citrate buffer	1/30	24 ώρες, θερμοκρασία δωματίου

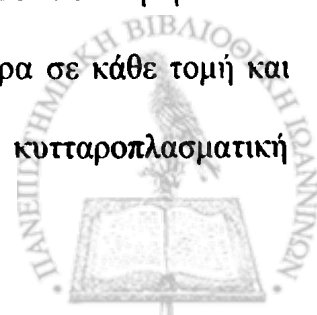
Πίνακας 13: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

Αξιολόγηση της έκφρασης των VEGF, VEGF-R1-FIt1, VEGF-R2-Flk1 και CD105

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών έγινε σε όλες τις περιπτώσεις από δύο ανεξάρτητους και έμπειρους ερευνητές οι οποίοι δε γνώριζαν εκ των προτέρων τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα και τις εκβάσεις των ασθενών (blind).

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των τομών με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου διπλής κεφαλής.

Η πρώτη αξιολόγηση αφορούσε στο μοτίβο έκφρασης του VEGF και των δύο υποδοχέων του, VEGF-R1-FIt1 και VEGF-R2-Flk1. Η έκφρασή τους ποσοτικοποιήθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα. Καταμετρήθηκαν 1000 νεοπλασματικά κύτταρα σε κάθε τομή και καταγράφηκε το ποσοστό των κυττάρων που παρουσίαζαν θετική κυτταροπλασματική



ανοσοϊστοχημική χρώση με VEGF, VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1, στην περίπτωση του VEGF ανεξαρτήτως της έντασής της. Φλεγμονώδη κύτταρα με θετική χρώση εξαιρέθηκαν από την καταμέτρηση.

Το κατώφλιο 25% χρησιμοποιήθηκε για να διαχωρίσει τα νεοπλάσματα που υπερέκφραζαν ή υποέκφραζαν τον VEGF και τους υποδοχείς του. Οι τιμές κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: 0% θετικά κύτταρα αντιστοιχούν σε απουσία έκφρασης του VEGF, 1-24% θετικά κύτταρα αντιστοιχούν σε ασθενή έκφραση και $\geq 25\%$ σε υψηλή. Αυτό το cut-off χρησιμοποιήθηκε από την πλειοψηφία των μελετών που εξέτασαν στο παρελθόν την έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του σε δείγματα ασθενών με καρκινώματα πνεύμονα^{198,199,201,321}.

Για την έκφραση των υποδοχέων του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε επιπροσθέτως και η ημιποσοτική κλίμακα με βάση την οποία: -, καμία έκφραση, +, ασθενής έκφραση, ++ υψηλή έκφραση²⁰¹.

Αναφορικά με το CD105, σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα εντοπίστηκαν με χαμηλή μεγέθυνση οι τρεις πιο αγγειοβριθείς περιοχές (“hot spots”) για την ποσοτικοποίηση της λεμφαγγειογένεσης (μικροσκόπιο τύπου Olympus BX-51, μεγέθυνση x40). Ακολούθησε μέτρηση των λεμφαγγείων ανά περιοχή με μεγέθυνση x200 και εν συνεχεία καταγράφηκε η μέση τιμή των τριών προεπιλεγμένων περιοχών ως λεμφαγγειακή πυκνότητα (ΛΠ). Τα λεμφαγγεία έπρεπε να είναι διακριτά μεταξύ τους προκειμένου να διασαφηνιστεί η οντότητά τους και να συμπεριληφθούν στη μέτρηση^{186-188,322}. Δεν αξιολογήθηκαν περιοχές νέκρωσης ή φλεγμονής¹⁸⁶.

$\Lambda\text{Π} \leq 25$ αντιστοιχεί σε ασθενή έκφραση και $\Lambda\text{Π} > 25$ αντιστοιχεί σε υψηλή έκφραση του CD105. Η λεμφαγγειακή προσβολή αξιολογήθηκε επί προσθέτως με την αναγνώριση νεοπλασματικών εμβόλων εντός των επισημειωμένων με CD105 καρκινικών κυττάρων.



Οι δύο εξεταστές συμφώνησαν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% για την αξιολόγηση τόσο του VEGF και των δύο υποδοχέων του όσο και του CD105 και της λεμφαγγειακής προσβολής.

Στατιστική επεξεργασία

Η επεξεργασία και η στατιστική ανάλυση των εμπειρικών δεδομένων, έγινε με την χρήση του λογισμικού πακέτου SPSS 13.0 για Windows (Statistical Package for Social Sciences, Inc, Chicago, IL, USA).

Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε τα εξής:

A) Στατιστικός έλεγχος χ^2 και ακριβής έλεγχος Fisher στις περιπτώσεις όπου ήταν αναγκαίος. Οι έλεγχοι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των συσχετίσεων μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών.

B) Στατιστικός έλεγχος t (t-test) για την πραγματοποίηση συγκρίσεων μεταξύ συνεχών μεταβλητών στις επιμέρους κατηγορίες όταν οι συνεχείς μεταβλητές ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Γ) Μέθοδος επιβίωσης Kaplan-Meier που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συνάρτησης επιβίωσης. Πρόκειται για μια μέθοδο που λαμβάνει υπόψη της τους ακριβείς χρόνους επιβίωσης για κάθε ασθενή.

Δ) Στατιστικός έλεγχος log-rank για τη σύγκριση των συναρτήσεων επιβίωσης.

Το χρησιμοποιούμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p), σε όλες τις στατιστικές δοκιμασίες, ορίστηκε στο 0,05.

Πρέπει να τονισθεί ότι όλες οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν είχαν αποφασιστεί εκ των προτέρων κατά την οργάνωση του πρωτοκόλλου καθενός από τους στόχους που προαναφέρθηκαν στην αντίστοιχη ενότητα. Post hoc αναλύσεις δεν πραγματοποιήθηκαν ποτέ.



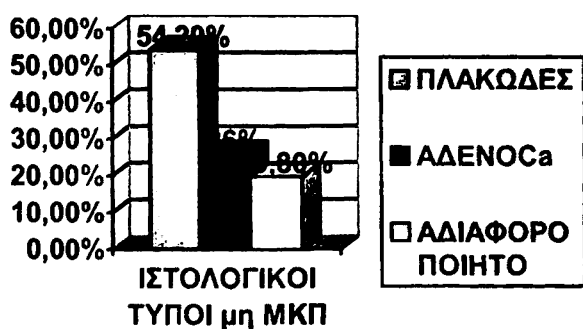
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ομάδα των μελετούμενων ιστολογικών παρασκευασμάτων αποτελούνταν από 146 καρκινώματα πνευμόνων εκ των οποίων 96 ήταν μη ΜΚΠ (65,75%) και 50 ΜΚΠ (34,25%) (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Ποσοστά των δύο βασικών ιστολογικών τύπων καρκινωμάτων πνεύμονα στο μελετούμενο δείγμα ιστολογικών παρασκευασμάτων.

Τα 96 μη ΜΚΠ ταξινομήθηκαν ιστολογικά σε επιμέρους κατηγορίες με τα ακόλουθα ποσοστά: 54, 2 % (52/96) πλακώδη, 26% (25/96) αδενοκαρκινώματα και 19, 8% (19/96) αδιαφοροποίητα (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία αναλογία των επιμέρους ιστολογικών τύπων των μη ΜΚΠ στο συνολικό δείγμα αυτών.



Το πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα ήταν το πιο συχνά απαντώμενο και βρέθηκε στο 53,8% των γυναικών και στο 54,2% των ανδρών ασθενών. Δεν διαπιστώθηκε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ του φύλου των ασθενών και του επιμέρους ιστολογικού τύπου των μη ΜΚΠ ($p>0,05$).

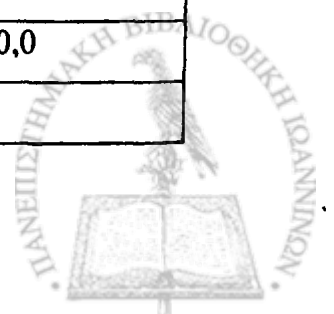
Τα 146 παρασκευάσματα αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 87, 7% σε άνδρες και 12, 3% σε γυναίκες ασθενείς, με μέση τιμή ηλικίας επί του συνόλου τα 64, 1 έτη (ηλικιακό εύρος 48-80). Ως προς τα μη ΜΚΠ μόνο, οι γυναίκες ασθενείς αντιστοιχούσαν στο 13,5% του δείγματος και οι άνδρες στο υπόλοιπο 86,5% (Πίνακας 14). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 61,5 έτη (ηλικιακό εύρος 49-83 έτη). Η ομάδα των ΜΚΠ (50 άτομα), αποτελείται από 45 άνδρες (90%) και 5 γυναίκες (10%) με μέση τιμή ηλικίας τα 64,3 έτη (ηλικιακό εύρος 48-80) (Πίνακας 15). Η μέση ηλικία των ανδρών που προσεβλήθησαν από τη νόσο ήταν 64,49 έτη και των γυναικών 64,94 έτη.

	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΕΓΚΥΡΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	13	13,5	13,5	13,5
ΑΝΔΡΕΣ	83	86,5	86,5	100,0
ΣΥΝΟΛΟ	96	100,0	100,0	

Πίνακας 14: Συχνότητα προσβολής των δύο φύλων από μη ΜΚΠ.

	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ	ΕΓΚΥΡΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	5	10,0	10,0	10,0
ΑΝΔΡΕΣ	45	90,0	90,0	100,0
ΣΥΝΟΛΟ	50	100,0	100,0	

Πίνακας 15: Συχνότητα προσβολής των δύο φύλων από ΜΚΠ.



Όσον αφορά στην θεραπεία, το 19,8% των ασθενών με μη ΜΚΠ υποβλήθηκε σε χειρουργική επέμβαση, το 86,5% σε χημειοθεραπεία και το 29,2% σε ακτινοθεραπεία.

Όλοι οι ασθενείς που διεγνώσθησαν με ΜΚΠ υπεβλήθησαν σε επικουρική χημειοθεραπεία, το 30% σε ακτινοθεραπεία και μόλις 4% χειρουργήθηκαν για διαγνωστικούς λόγους.

Διεγχειρητική θεραπεία δεν πραγματοποιήθηκε σε κανένα ασθενή (Πίνακας 16).

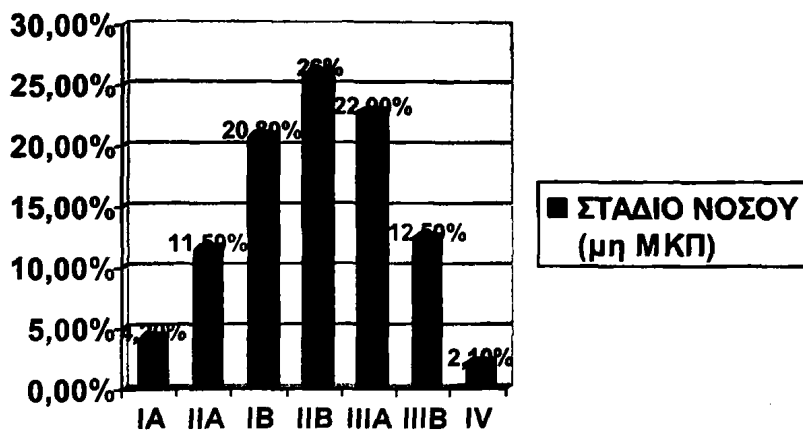
	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ
Μη ΜΚΠ	19,8% (19/96)	86,5% (83/96)	29,2% (28/96)
ΜΚΠ	4% (2/50)	100% (50/50)	30% (15/50)

Πίνακας 16: Θεραπευτική αντιμετώπιση περιστατικών με μη ΜΚΠ και ΜΚΠ.

Οι ασθενείς που διεγνώσθησαν με μη ΜΚΠ σταδιοποιήθηκαν με βάση τα κριτήρια κατά AJCC 2002 (American Joint Committee on Cancer) και κατά ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)^{85,86,67} ακολούθως: 4,2%(4/96) στάδιο IA, 11,50%(11/96) στάδιο IB, 20,80%(20/96) στάδιο IIA, 26%(25/96) στάδιο IIB, 22,9%(22/96) στάδιο IIIA, 12,50%(12/96) στάδιο IIIB, 2,10%(2/96) στάδιο IV (Διάγραμμα 5). Εξ όλων αυτών, 65,6% (63/96) εμφάνισε μετάσταση σε όργανα στόχους (επινεφρίδια, εγκέφαλος, ήπαρ, οστά).

Όσον αφορά στους ασθενείς με ΜΚΠ, 50% (25/50) ανήκαν σε περιορισμένο στάδιο της νόσου και 50% σε εκτεταμένο στάδιο.





Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα σταδιοποίησης ασθενών με μη ΜΚΠ, με βάση τα κριτήρια κατά AJCC 2002 και κατά ΠΟΥ.

Μη ΜΚΠ- Έκφραση Αντισωμάτων και συσχέτιση αυτών με κλινικές παραμέτρους

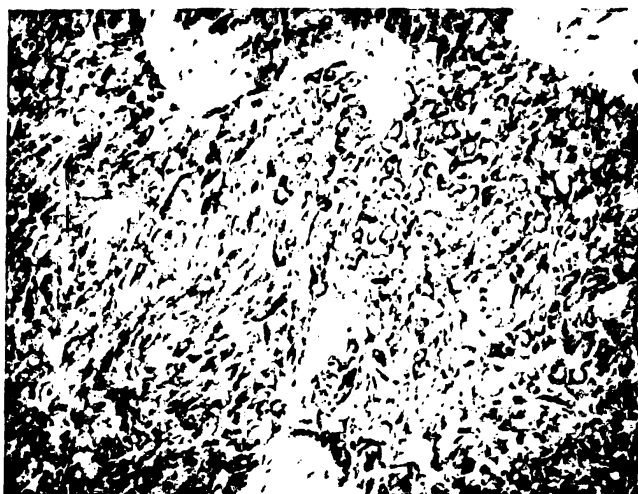
Έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και των υποδοχέων του VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1

Το 25% (24/96) των ιστολογικών παρασκευασμάτων δεν εμφάνισε έκφραση του VEGF, 50% (48/96) εμφάνισε ασθενή και 25% (24/96) υψηλή (Εικόνα 9). Σχετικά με τους υποδοχείς του VEGF, 11,5% των παρασκευασμάτων δεν εξέφρασαν καθόλου το VEGF-R2-Flk1, 41,7% το εξέφρασαν ασθενώς και 46,9% υψηλά (Εικόνα 10) ενώ το VEGF-R1-Flt1 δεν εκφράστηκε καθόλου στο 18,8% των παρασκευασμάτων και εκφράστηκε ασθενώς στο 37,5% και υψηλά στο 43,7% (Εικόνα 11) (Πίνακας 17).

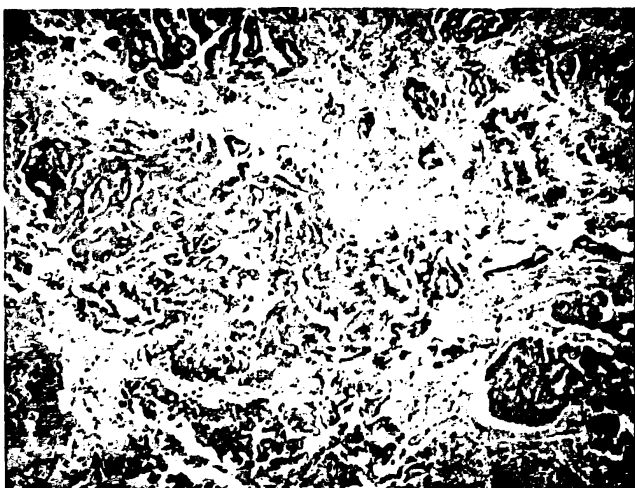


	ΑΠΟΥΣΙΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	ΑΣΘΕΝΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗ	ΥΨΗΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	ΣΥΝΟΛΟ
VEGF	25%	50%	25%	100%
VEGF-R1-Flt1	18,8%	37,5%	43,7%	100%
VEGF-R2- Flk1	11,5%	41,7%	46,9%	100%

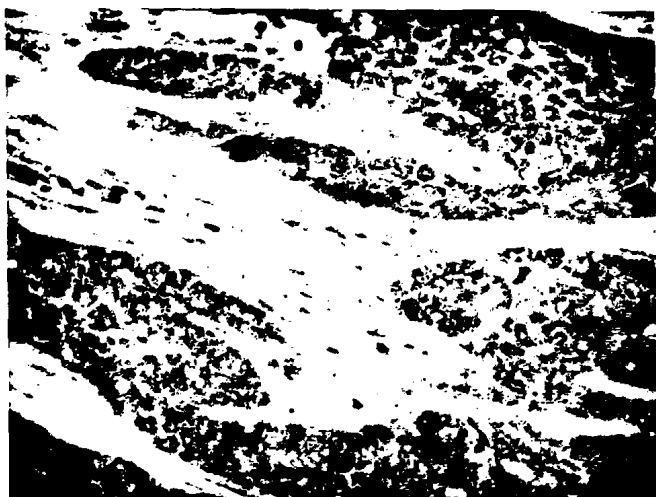
Πίνακας 17: Συχνότητα έκφρασης του VEGF και των δύο υποδοχέων του στα εξεταζόμενα μη ΜΚΠ.



Εικόνα 9: Μη ΜΚΠ (χρώση DABx400) με αυξημένη έκφραση του VEGF



Εικόνα 10: Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα με υψηλή έκφραση VEGF-R2-Flk1



Εικόνα 11: Μη ΜΚΠ (πλακώδες) με υψηλή έκφραση VEGF-R1-Flt1

Βρέθηκε σημαντική στατιστική σχέση μεταξύ της έκφρασης του VEGF και του υποδοχέα του VEGF-R1-Flt1 ($p=0,016$, $\chi^2= 12,15$) με βάση την οποία το 54,2% των ασθενών με υψηλή έκφραση VEGF εμφάνισε ταυτόχρονη υψηλή έκφραση VEGF-R1-Flt1 (Πίνακας 18).

			VEGF-R1-Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	4	14	6	24
		% εντός VEGF	16,7%	58,3%	25,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	4,2%	14,6%	6,3%	25,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	13	12	23	48
		% εντός VEGF	27,1%	25,0%	47,9%	100,0%
		% εκ συνόλου	13,5%	12,5%	24,0%	50,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	1	10	13	24
		% εντός VEGF	4,2%	41,7%	54,2%	100,0%
		% εκ συνόλου	1,0%	10,4%	13,5%	25,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	18	36	42	96
		% εντός VEGF	18,8%	37,5%	43,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	18,8%	37,5%	43,8%	100,0%

Πίνακας 18: Παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF και της έκφρασης του ενός εκ των δύο εξεταζόμενων υποδοχέων του, του VEGF-R1-Flt1.



Δεν συνέβη το ίδιο με τον άλλο υπό εξέταση υποδοχέα του VEGF, τον VEGF-R2-FIk1 ($p=0,161$, $\chi^2=6,56$) (Πίνακας 19).

Η έκφραση του VEGF δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των διαθέσιμων ιστολογικών παρασκευασμάτων (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες, αδιαφοροποίητο) ($\chi^2=1,69$, $p=0,79$) (Πίνακας 20).

			VEGF-R2-FIk1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	2	11	11	24
		% εντός VEGF	8,3%	45,8%	45,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	2,1%	11,5%	11,5%	25,0%
	Χαμηλή	Μέτρηση	8	22	18	48
		% εντός VEGF	16,7%	45,8%	37,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	8,3%	22,9%	18,8%	50,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	1	7	16	24
		% εντός VEGF	4,2%	29,2%	66,7%	100,0%
		% εκ συνόλου	1,0%	7,3%	16,7%	25,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	11	40	45	96
		% εντός VEGF	11,5%	41,7%	46,9%	100,0%
		% εκ συνόλου	11,5%	41,7%	46,9%	100,0%

Πίνακας 19: Η έκφραση του VEGF δεν συσχετίζεται σημαντικά με αυτή του υποδοχέα του, VEGF-R2-FIk1.

			ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ μη ΜΚΠ			ΣΥΝΟΛΟ
			ΠΛΑΚΩΔΕΣ	ΑΔΕΝΟCa	ΑΔΙΑΔΟΡΟ ΠΟΙΗΤΟ	
VEGF	Απουσία έκφρασης	Μέτρηση	15	4	5	24
		% εντός VEGF	62,5%	16,7%	20,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	15,6%	4,2%	5,2%	25,0%
	Ασθενής έκφραση	Μέτρηση	24	14	10	48
		% εντός VEGF	50,0%	29,2%	20,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	25,0%	14,6%	10,4%	50,0%
	Υψηλή έκφραση	Μέτρηση	13	7	4	24
		% εντός VEGF	54,2%	29,2%	16,7%	100,0%
		% εκ συνόλου	13,5%	7,3%	4,2%	25,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	52	25	19	96
		% εντός VEGF	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%

Πίνακας 20: Η έκφραση του VEGF δεν συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μη ΜΚΠ.



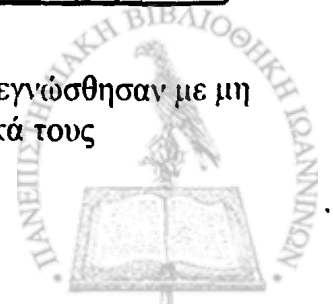
Η έκφραση του VEGF δεν εμφάνισε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση τόσο με τα διαθέσιμα δημογραφικά στοιχεία δηλαδή φύλο ($\chi^2=0,267$ και $p=0,87$) (Πίνακας 21) και ηλικία ($p=0,19$, ANOVA test) όσο και με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους δηλαδή παρουσία μεταστάσεων ($\chi^2= 2,35$ και $p= 0,3$) (Πίνακας 22) και στάδιο νόσου ($\chi^2= 12$ και $p= 0,775$) (Πίνακας 23).

		VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
		μη έκφραση	ασθενής	υψηλή	
ΦΥΛΟ	ΓΥΝΑΙΚΕΣ Μέτρηση	3	6	4	13
	% εντός φύλου	23,1%	46,2%	30,8%	100,0%
	% εκ συνόλου	3,1%	6,3%	4,2%	13,5%
ΑΝΔΡΕΣ	Μέτρηση	21	42	20	83
	% εντός φύλου	25,3%	50,6%	24,1%	100,0%
	% εκ συνόλου	21,9%	43,8%	20,8%	86,5%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	24	48	24	96
	% εντός φύλου	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%

Πίνακας 21: Η έκφραση του VEGF δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με το φύλο των ασθενών που διεγνώσθησαν με μη ΜΚΠ.

		VEGF			Total
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
Μετάσταση	Απουσία Μέτρηση	6	20	7	33
	% εντός μετάστασης	18,2%	60,6%	21,2%	100,0%
	% εκ συνόλου	6,3%	20,8%	7,3%	34,4%
Παρουσία	Μέτρηση	18	28	17	63
	% εντός μετάστασης	28,6%	44,4%	27,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	18,8%	29,2%	17,7%	65,6%
Σύνολο	Μέτρηση	24	48	24	96
	% εντός μετάστασης	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%

Πίνακας 22: Η παρουσία ή απουσία μεταστάσεων στους ασθενείς που διεγνώσθησαν με μη ΜΚΠ δε σχετίστηκε σημαντικά με την έκφραση του VEGF στα ιστολογικά τους παρασκευάσματα.



		VEGF			Σύνολο
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
Μη ΜΚΠ 7 ΣΤΑΔΙΑ	Μέτρηση	2	2		4
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	50,0%	50,0%		100,0%
	% εκ συνόλου	2,1%	2,1%		4,2%
IB	Μέτρηση	1	7	3	11
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	9,1%	63,6%	27,3%	100,0%
	% εκ συνόλου	1,0%	7,3%	3,1%	11,5%
IIA	Μέτρηση	4	10	6	20
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	20,0%	50,0%	30,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	4,2%	10,4%	6,3%	20,8%
IIB	Μέτρηση	7	13	5	25
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	28,0%	52,0%	20,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	7,3%	13,5%	5,2%	26,0%
IIIA	Μέτρηση	7	11	4	22
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	31,8%	50,0%	18,2%	100,0%
	% εκ συνόλου	7,3%	11,5%	4,2%	22,9%
IIIB	Μέτρηση	3	4	5	12
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	25,0%	33,3%	41,7%	100,0%
	% εκ συνόλου	3,1%	4,2%	5,2%	12,5%
IV	Μέτρηση		1	1	2
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ		50,0%	50,0%	100,0%
	% εκ συνόλου		1,0%	1,0%	2,1%
Total	Μέτρηση	24	48	24	96
	% εντός 7 σταδίων των μη ΜΚΠ	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%

Πίνακας 23: Απουσία ύπαρξης σημαντικής στατιστικής συσχέτισης παρατηρήθηκε και μεταξύ της αγγειογένεσης (έκφραση του VEGF) και του σταδίου της νόσου.

Ο υποδοχέας VEGF-R1-Flt1 δεν εμφάνισε στατιστική συσχέτιση με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μη ΜΚΠ (πλακώδες, αδενοκαρκίνωμα, αδιαφοροποίητο) ($\chi^2=1,2$ και $p=0,87$) (Πίνακας 24).



			Ιστολογικοί τύποι μη ΜΚΠ			ΣΥΝΟΛΟ
			Πλακώδες	ΑδενοCa	Αδιαφοροποίητο	
Flt1	Μη έκφραση	Μέτρηση	11	4	3	18
		% εντός Flt1	61,1%	22,2%	16,7%	100,0%
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	21,2%	16,0%	15,8%	18,8%
		% εκ συνόλου	11,5%	4,2%	3,1%	18,8%
	Ασθενής	Μέτρηση	20	8	8	36
		% εντός Flt1	55,6%	22,2%	22,2%	100,0%
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	38,5%	32,0%	42,1%	37,5%
		% εκ συνόλου	20,8%	8,3%	8,3%	37,5%
	Υψηλή	Μέτρηση	21	13	8	42
		% εντός Flt1	50,0%	31,0%	19,0%	100,0%
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	40,4%	52,0%	42,1%	43,8%
		% εκ συνόλου	21,9%	13,5%	8,3%	43,8%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	52	25	19	96	
	% εντός Flt1	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%	
	% εντός τύπων μη ΜΚΠ	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%	

Πίνακας 24: Η έκφραση του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 δεν σχετίστηκε με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μη ΜΚΠ.

Αντίθετα, εμφάνισε στατιστική συσχέτιση με το φύλο των ασθενών εκφραζόμενος περισσότερο στους άνδρες ($p=0,035$, $\chi^2= 6,72$) δεδομένου ότι το 76,2% (32/42) των ιστολογικών παρασκευασμάτων που υπερέκφρασαν τον υποδοχέα αντιστοιχούσε σε άνδρες. (Πίνακας 25). Η στατιστική συσχέτιση που διαπιστώθηκε μεταξύ του VEGF-R1-Flt1 και της ηλικίας των ασθενών ήταν σημαντική στο επίπεδο 0,10 αλλά όχι στο επίπεδο 0,05 ($p=0,12$, $df=2$, ANOVA test).



			ΦΥΛΟ		ΣΥΝΟΛΟ
			ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΔΡΕΣ	
Flt1	Μη έκφραση	Μέτρηση	1	17	18
		% εντός Flt1	5,6%	94,4%	100,0%
	Χαμηλή	Μέτρηση	2	34	36
		% εντός Flt1	5,6%	94,4%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	10	32	42
		% εντός Flt1	23,8%	76,2%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	13	83	96
		% εντός Flt1	13,5%	86,5%	100,0%

• **Πίνακας 25:** Η έκφραση του VEGF-R1-Flt1 συσχετίζεται με το φύλο των ασθενών και συγκεκριμένα είναι μεγαλύτερη στους άνδρες.

Κατά αναλογία με τον VEGF, ο ίδιος υποδοχέας δεν εμφάνισε σημαντική στατιστική συσχέτιση με την παρουσία μεταστάσεων σε βασικά όργανα στόχους (ήπαρ, επινεφρίδια, εγκέφαλος, οστά) ($\chi^2=2,39$ και $p=0,31$) (Πίνακας 26) αλλά εμφάνισε συσχέτιση με το στάδιο της νόσου, σε αντίθεση με τον VEGF ($p=0,026$, $\chi^2=23,181$) (Πίνακας 27).

			ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Flt1	Μη έκφραση	Μέτρηση	9	9	18
		% εντός Flt1	50,0%	50,0%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	11	25	36
		% εντός Flt1	30,6%	69,4%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	13	29	42
		% εντός Flt1	31,0%	69,0%	100,0%
Total		Μέτρηση	33	63	96
		% εντός Flt1	34,4%	65,6%	100,0%

Πίνακας 26: Ο υποδοχέας VEGF-R1-Flt1 δε σχετίζεται με την παρουσία μεταστάσεων στους ασθενείς με μη ΜΚΠ.

Συγκεκριμένα, ποσοστό 50% (11/22) των ασθενών σταδίου IIIA και 50% των ασθενών του σταδίου IIIB (6/12) εμφάνισαν υψηλή έκφραση του υποδοχέα. Τα αντίστοιχα ποσοστά για



ασθενείς του σταδίου ΙΙΑ ήταν 45% (9/20) και του σταδίου ΙΙΒ ήταν 40% (10/25). Αντίθετα τα ποσοστά έκφρασης του υποδοχέα σε αρχικά στάδια της νόσου ήταν χαμηλότερα δεδομένου ότι το 75% των ασθενών σταδίου ΙΑ (3/4) και το 45,5% σταδίου ΙΒ (5/11) δεν εξέφρασαν τον υποδοχέα.

		Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
7 ΣΤΑΔΙΑ ΙΑ Μη ΜΚΠ	Μέτρηση	3	1		4
	% εντός των 7σταδίων	75,0%	25,0%		100,0%
	% εντός Flt1	16,7%	2,8%		4,2%
ΙΒ	Μέτρηση	3	2	6	11
	% εντός των 7σταδίων	27,3%	18,2%	54,5%	100,0%
	% εντός Flt1	16,7%	5,6%	14,3%	11,5%
ΙΙΑ	Μέτρηση	6	5	9	20
	% εντός των 7σταδίων	30,0%	25,0%	45,0%	100,0%
	% εντός Flt1	33,3%	13,9%	21,4%	20,8%
ΙΙΒ	Μέτρηση	1	14	10	25
	% εντός των 7σταδίων	4,0%	56,0%	40,0%	100,0%
	% εντός Flt1	5,6%	38,9%	23,8%	26,0%
ΙΙΙΑ	Μέτρηση	4	7	11	22
	% εντός των 7σταδίων	18,2%	31,8%	50,0%	100,0%
	% εντός Flt1	22,2%	19,4%	26,2%	22,9%
ΙΙΙΒ	Μέτρηση		6	6	12
	% εντός των 7σταδίων		50,0%	50,0%	100,0%
	% εντός Flt1		16,7%	14,3%	12,5%
ΙV	Μέτρηση	1	1		2
	% εντός των 7σταδίων	50,0%	50,0%		100,0%
	% εντός Flt1	5,6%	2,8%		2,1%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	18	36	42	96
	% εντός των 7σταδίων	18,8%	37,5%	43,8%	100,0%
	% εντός Flt1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Πίνακας 27: Η έκφραση του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 παρατηρήθηκε πιο αυξημένη στα προχωρημένα στάδια της νόσου σε σχέση με τα αρχικά.



Όσον αφορά στον υποδοχέα VEGF-R2-Flk1 εμφάνισε σημαντική σχέση με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μη ΜΚΠ στο επίπεδο 0,10 αλλά όχι όμως στο επίπεδο 0,05 ($p=0,093$ και $\chi^2=7,96$). Το 44,4% των ασθενών (20/45) που εμφάνισαν υψηλή έκφραση του υποδοχέα είχαν διαγνωσθεί με πλακώδες καρκίνωμα, το 37,8% (17/45) με αδενοκαρκίνωμα και το υπόλοιπο 17,8% (8/45) με αδιαφοροποίητο. Το 63,6% (7/11) των ασθενών που δεν εξέφρασαν καθόλου τον υποδοχέα στο ιστολογικό τους παρασκεύασμα είχε διαγνωσθεί με πλακώδες καρκίνωμα, το 27,3% (3/11) με αδενοκαρκίνωμα και το υπόλοιπο 9,1% (1/11) με αδιαφοροποίητο. Τα στοιχεία φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 28.

			ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ μη ΜΚΠ			ΣΥΝΟΛΟ
			ΠΛΑΚΩΔΕΣ	ΑΔΕΝΟCa	ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΟ	
Flk1	Μη έκφραση	Μέτρηση	7	3	1	11
		% εντός Flk1	63,6%	27,3%	9,1%	100,0%
		% εντός κατηγοριών μη ΜΚΠ	13,5%	12,0%	5,3%	11,5%
		% εκ συνόλου	7,3%	3,1%	1,0%	11,5%
	Ασθενής	Μέτρηση	25	5	10	40
		% εντός Flk1	62,5%	12,5%	25,0%	100,0%
		% εντός κατηγοριών μη ΜΚΠ	48,1%	20,0%	52,6%	41,7%
		% εκ συνόλου	26,0%	5,2%	10,4%	41,7%
	Υψηλή	Μέτρηση	20	17	8	45
% εντός Flk1		44,4%	37,8%	17,8%	100,0%	
% εντός κατηγοριών μη ΜΚΠ		38,5%	68,0%	42,1%	46,9%	
	% εκ συνόλου	20,8%	17,7%	8,3%	46,9%	
Total	Μέτρηση	52	25	19	96	
	% εντός Flk1	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%	
	% εντός κατηγοριών μη ΜΚΠ	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	54,2%	26,0%	19,8%	100,0%	

Πίνακας 28: Η έκφραση του υποδοχέα VEGF-R2-Flk1 εμφανίζει σημαντική στατιστική συσχέτιση με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μη ΜΚΠ στο επίπεδο 0,10 αλλά όχι στο επίπεδο 0,05.



Ο ίδιος υποδοχέας δεν σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με κανένα από τα διαθέσιμα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών δηλαδή το φύλο ($p=0,29$ και $\chi^2=2,45$) (Πίνακας 29) και την ηλικία ($p=0,39$ και $df=2$, ANOVA test) εμφανίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο αντίστοιχη συμπεριφορά με τον VEGF. Το 87,5% των ασθενών (35/40) που εμφάνισαν χαμηλή έκφραση του υποδοχέα και το 82,2% (37/45) αυτών που τον υπερέκφρασαν ήταν άνδρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα ιστολογικά παρασκευάσματα που δεν εξέφρασαν καθόλου τον μελετούμενο υποδοχέα αντιστοιχούσαν επίσης σε άνδρες ασθενείς.

			ΦΥΛΟ		ΣΥΝΟΛΟ
			ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΔΡΕΣ	
Flk1	Μη έκφραση	Μέτρηση % εντός Flk1		11 100,0%	11 100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση % εντός Flk1	5 12,5%	35 87,5%	40 100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση % εντός Flk1	8 17,8%	37 82,2%	45 100,0%
Total		Μέτρηση % εντός Flk1	13 13,5%	83 86,5%	96 100,0%

Πίνακας 29: Παρουσίαση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων συσχέτισης του φύλου των ασθενών με μη ΜΚΠ και της έκφρασης του υποδοχέα VEGF-R2-Flk1.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, ο VEGF-R2-Flk1 σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους και πιο συγκεκριμένα με την παρουσία μεταστάσεων ($p=0,021$ και $\chi^2=7,68$) σε απομακρυσμένα όργανα στόχους (ήπαρ, επινεφρίδια, οστά, εγκέφαλος) καθώς και με το στάδιο της νόσου ($p=0,005$ και $\chi^2=28,59$).

Συγκεκριμένα, 77,8% (35/45) των ασθενών που παρουσίασαν μεταστατική εστία, εμφάνισαν υψηλή έκφραση του υποδοχέα στο ιστολογικό τους παρασκεύασμα. Επίσης το 60% (24/40) των ασθενών με χαμηλή έκφραση του υποδοχέα εμφάνισαν μετάσταση ενώ η πλειοψηφία



των ασθενών που δεν εξέφρασαν τον υποδοχέα (63,6% δηλαδή 7/11) δεν παρουσίασαν μεταστατική εστία. Στον πίνακα 30 παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

			ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΟ
			απουσία	παρουσία	
Flk1	Μη έκφραση	Μέτρηση	7	4	11
		% εντός Flk1	63,6%	36,4%	100,0%
		% εκ συνόλου	7,3%	4,2%	11,5%
	Ασθενής	Μέτρηση	16	24	40
		% εντός Flk1	40,0%	60,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	16,7%	25,0%	41,7%
	Υψηλή	Μέτρηση	10	35	45
		% εντός Flk1	22,2%	77,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	10,4%	36,5%	46,9%
Total	Μέτρηση	33	63	96	
	% εντός Flk1	34,4%	65,6%	100,0%	
	% εκ συνόλου	34,4%	65,6%	100,0%	

Πίνακας 30: Η έκφραση του VEGF-R2-FLK1 σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την παρουσία μεταστάσεων σε ασθενείς με μη ΜΚΠ.

Ποσοστό 63,6% (14/22) των ασθενών σταδίου IIIA και 66,7% (8/12) των ασθενών σταδίου IIIB εμφάνισαν υψηλή έκφραση του VEGF-R2-Flk1. Το 48% (12/25) των ασθενών σταδίου IIB υπερέκφρασαν τον υποδοχέα ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς σταδίου IIA ανήρθε στο 45% (9/20). Το 81,8% των ασθενών σταδίου IB παρουσίασε ασθενή ή καθόλου έκφραση του υποδοχέα ενώ κανένας ασθενής σταδίου IA δεν παρουσίασε υψηλή έκφραση του VEGF-R2-Flk1. Αναλυτικά αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 31.

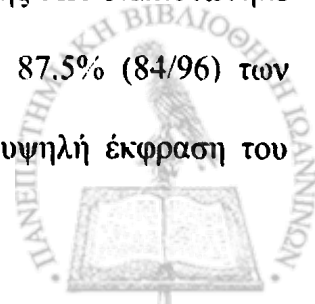


		VEGF-R2-FIk1			ΣΥΝΟΛΟ
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
7 ΣΤΑΔΙΑ ΙΑ μη ΜΚΠ	Μέτρηση	2	2		4
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	50,0%	50,0%		100,0%
	% εκ συνόλου	2,1%	2,1%		4,2%
IB	Μέτρηση	1	8	2	11
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	9,1%	72,7%	18,2%	100,0%
	% εκ συνόλου	1,0%	8,3%	2,1%	11,5%
IIA	Μέτρηση	6	5	9	20
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	30,0%	25,0%	45,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	6,3%	5,2%	9,4%	20,8%
IIB	Μέτρηση	1	12	12	25
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	4,0%	48,0%	48,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	1,0%	12,5%	12,5%	26,0%
IIIA	Μέτρηση	1	7	14	22
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	4,5%	31,8%	63,6%	100,0%
	% εκ συνόλου	1,0%	7,3%	14,6%	22,9%
IIIB	Μέτρηση		4	8	12
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ		33,3%	66,7%	100,0%
	% εκ συνόλου		4,2%	8,3%	12,5%
IV	Μέτρηση		2		2
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ		100,0%		100,0%
	% εκ συνόλου		2,1%		2,1%
Total	Μέτρηση	11	40	45	96
	% εντός των 7 σταδίων μη ΜΚΠ	11,5%	41,7%	46,9%	100,0%
	% εκ συνόλου	11,5%	41,7%	46,9%	100,0%

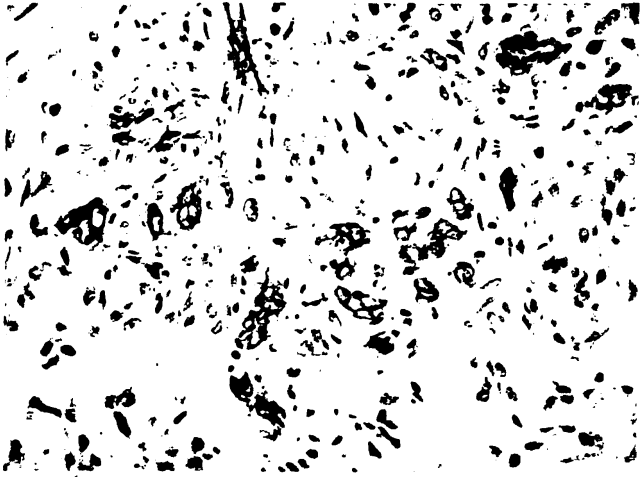
Πίνακας 31: Η έκφραση του VEGF-R2-FIk1 στα ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενών με μη ΜΚΠ συσχετίστηκε σημαντικά με το στάδιο της νόσου τους.

CD105 (Ενδογλίνη) και λεμφαγγειακή προσβολή στα μη ΜΚΠ

Η έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα μη ΜΚΠ μέσω υπολογισμού της ΛΠ διαπιστώθηκε σε όλα τα υπό εξέταση ιστολογικά παρασκευάσματα. Συγκεκριμένα, 87,5% (84/96) των ιστολογικών παρασκευασμάτων εμφάνισαν υψηλή ΛΠ (>25) δηλαδή υψηλή έκφραση του



CD105 (Εικόνα 12) ενώ τα υπόλοιπα εμφάνισαν χαμηλή ΛΠ (≤ 25). Λεμφαγγειακή προσβολή ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 30,2% (29/96) των μη ΜΚΠ ενώ τα υπόλοιπα δεν εμφάνισαν αντίστοιχο εύρημα.



Εικόνα 12: Μη ΜΚΠ με αύξηση της λεμφαγγειακής μικροαγγειακής πυκνότητάς του (ΛΠ>25) δηλαδή αυξημένη έκφραση CD105.

Η έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα μη ΜΚΠ μέσω υπολογισμού της ΛΠ δεν συσχετίστηκε με την αντίστοιχη έκφραση της αγγειογένεσης (έκφραση VEGF) ($p=0,467$ και $\chi^2=1,524$). Παρατηρήθηκε μία ανομοιογένεια ως προς την έκφραση των δύο διαδικασιών. Χαρακτηριστικά το 91,7% (22/24) των ιστολογικών παρασκευασμάτων που δεν εξέφρασαν τον VEGF εμφάνισαν ταυτόχρονα υψηλή έκφραση CD105. Επίσης 83,3% (40/48) των ιστολογικών παρασκευασμάτων με ασθενή έκφραση του VEGF εμφάνισαν ταυτόχρονα υψηλή έκφραση CD105 (Πίνακας 32).

			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	22	2	24
		% εντός VEGF	91,7%	8,3%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	40	8	48
		% εντός VEGF	83,3%	16,7%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	22	2	24
		% εντός VEGF	91,7%	8,3%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	84	12	96
		% εντός VEGF	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 32: Η έκφραση του CD105 δεν συσχετίστηκε με την έκφραση του VEGF στα μη ΜΚΠ.

Κατά αναλογία με τα παραπάνω, η έκφραση του CD105 δεν συσχετίστηκε με την έκφραση των δύο μελετούμενων υποδοχέων του VEGF, των VEGF-R1-Flt1 ($p=0,58$ και $\chi^2=1,09$) και VEGF-R2-Flk1 ($p=0,37$ και $\chi^2=1,959$) (Πίνακες 33, 34). Ποσοστό 77,8% (14/18) των ιστολογικών παρασκευασμάτων που δεν εξέφρασαν καθόλου τον υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 εμφάνισαν υψηλή έκφραση του CD105 (δηλαδή υψηλή ΛΠ) και το 88,9% (32/36) των παρασκευασμάτων με ασθενή έκφραση του υποδοχέα εμφάνισαν επίσης υψηλή ΛΠ.

Αντίστοιχα, το 77,8% (14/18) των παρασκευασμάτων με απουσία έκφρασης VEGF-R2-Flk1 παρουσίασαν υψηλή ΛΠ και το 88,9% (32/36) αυτών με ασθενή έκφραση του υποδοχέα εμφάνισαν επίσης υψηλή ΛΠ.



			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
Flt1	Μη έκφραση	Μέτρηση	14	4	18
		% εντός Flt1	77,8%	22,2%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	32	4	36
% εντός Flt1		88,9%	11,1%	100,0%	
	Υψηλή	Μέτρηση	38	4	42
		% εντός Flt1	90,5%	9,5%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	84	12	96
		% εντός Flt1	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 33: Η έκφραση του CD105 δεν παρουσίασε συσχέτιση με την έκφραση του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1.

			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
Flk1	Μη έκφραση	Μέτρηση	14	4	18
		% εντός Flk1	77,8%	22,2%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	32	4	36
% εντός Flk1		88,9%	11,1%	100,0%	
	Υψηλή	Μέτρηση	38	4	42
		% εντός Flk1	90,5%	9,5%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	84	12	96
		% εντός Flk1	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 34: Η έκφραση του CD105 δεν συσχετίστηκε στατιστικά με την έκφραση του υποδοχέα VEGF-R2-Flk1.

Σε συνέχεια με όλα τα παραπάνω, η ΛΠ συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τη λεμφαγγειακή προσβολή στα μη ΜΚΠ στο επίπεδο 0,10 και όχι στο επίπεδο 0,05 ($p=0,09$ και $\chi^2= 3,11$) (Πίνακας 35). Το 83,6% (56/67) των μη ΜΚΠ στα οποία δεν ανιχνεύτηκε λεμφαγγειακή προσβολή παρουσίασαν υψηλή ΛΠ και στο 96,6% (28/29) των μη ΜΚΠ που ανιχνεύτηκε λεμφαγγειακή προσβολή υπήρχε ομοίως υψηλή ΛΠ.



		Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
		Υψηλή	Ασθενής	
Λεμφ. Προσβ (ΛΠ)	Απουσία Μέτρηση % εντός ΛΠ	56 83,6%	11 16,4%	67 100,0%
	Παρουσία Μέτρηση % εντός ΛΠ	28 96,6%	1 3,4%	29 100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		84 87,5%	12 12,5%	96 100,0%

Πίνακας 35: Η έκφραση του CD105 δεν συσχετίστηκε με την παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής στα μη ΜΚΠ στο επίπεδο 0,05 αλλά στο επίπεδο 0,10.

Η ΛΠ δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους των μελετούμενων μη ΜΚΠ (πλακώδες, αδenoκαρκίνωμα, αδιαφοροποίητο) ($p=0,7$ και $\chi^2=0,69$) (Πίνακας 36).

			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
Ιστολογικοί τύποι μη ΜΚΠ	Πλακώδες	Μέτρηση	45	7	52
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	86,5%	13,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	46,9%	7,3%	54,2%
ΑδενοCa		Μέτρηση	23	2	25
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	92,0%	8,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	24,0%	2,1%	26,0%
Αδιαφοροποίητο		Μέτρηση	16	3	19
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	84,2%	15,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	16,7%	3,1%	19,8%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	84	12	96
		% εντός τύπων μη ΜΚΠ	87,5%	12,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 36: Παρατηρήθηκε απουσία στατιστικής συσχέτισης μεταξύ της ΛΠ και των επιμέρους ιστολογικών τύπων των μη ΜΚΠ.



Η ΛΠ (έκφραση CD105) συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την ηλικία των ασθενών με μη ΜΚΠ ($p=0,04$, $df=1$, ANOVA test). Η μέση ηλικία εκείνων που είχαν υψηλή έκφραση CD105 ($\Lambda\Pi>25$) ήταν 63,3 έτη και ήταν μικρότερη από εκείνους που είχαν χαμηλή έκφραση CD105 και που ήταν 68,8 έτη.

Αντίθετα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στο φύλο και την έκφραση του CD105 ($p=0,67$ και $\chi^2=0,11$) (Πίνακας 37). Ποσοστό 84,6% (11/13) των γυναικών και 88% (73/80) των ανδρών παρουσίασαν $\Lambda\Pi>25$.

			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
ΦΥΛΟ	Γυναίκες	Μέτρηση	11	2	13
		% εντός φύλου	84,6%	15,4%	100,0%
		% εκ συνόλου	11,5%	2,1%	13,5%
Ανδρες	Μέτρηση	Μέτρηση	73	10	83
		% εντός φύλου	88,0%	12,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	76,0%	10,4%	86,5%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	Μέτρηση	84	12	96
		% εντός φύλου	87,5%	12,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 37: Η ΛΠ δεν συσχετίστηκε με το φύλο των ασθενών με μη ΜΚΠ.

Βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην ΛΠ και την ύπαρξη μεταστάσεων ($p=0,003$ και $\chi^2=10,03$) σε απομακρυσμένα όργανα (ήπαρ, επινεφρίδια, εγκέφαλος, οστά) και πιο συγκεκριμένα, το 71,4% (60/84) των ασθενών με υψηλή ΛΠ (υψηλή έκφραση CD105) εμφάνισαν μετάσταση ενώ το 75% (9/12) των ασθενών με ασθενή ΛΠ δεν εμφάνισαν μετάσταση (Πίνακας 38).



		Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
		Υψηλή	Χαμηλή	
Μετάσταση	Απουσία Μέτρηση	24	9	33
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	28,6%	75,0%	34,4%
	% εκ συνόλου	25,0%	9,4%	34,4%
	απουσία Μέτρηση	60	3	63
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	71,4%	25,0%	65,6%
	% εκ συνόλου	62,5%	3,1%	65,6%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	84	12	96
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	100,0%	100,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 38: Η έκφραση του CD105 παρουσίασε σημαντική στατιστική συσχέτιση με την παρουσία μεταστάσεων σε ασθενείς με μη ΜΚΠ.

Η ΛΠ σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το στάδιο της νόσου ($\chi^2=19,5$, $p=0,003$). Το 47,6% των ασθενών με υψηλή έκφραση του CD105 ανήκαν στο στάδιο II (συγκεκριμένα 19% στο στάδιο IIA και 28,6% στο στάδιο IIB) και 38,1% στο στάδιο III της νόσου (23,8% στάδιο IIIA και 14,3% στάδιο IIIB) ενώ 41,7% των ασθενών με χαμηλή έκφραση του CD105 ανήκαν στο στάδιο I (Πίνακας 39).

Όσον αφορά στην παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής δεν εμφάνισε καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση τόσο με την ΛΠ όπως ήδη προαναφέρθηκε όσο και με τους εξεταζόμενους αγγειογενετικούς δείκτες VEGF ($p=0,62$ και $\chi^2=0,93$), VEGF-R1-Flt1 ($p=0,38$ και $\chi^2=1,93$) και VEGF-R2-Flk1 ($p=0,14$ και $\chi^2=3,93$) (Πίνακες 40-42).



		Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
		Υψηλή	Ασθενής	
7 ΣΤΑΔΙΑ ΙΑ μη ΜΚΠ	Μέτρηση	1	3	4
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	1,2%	25,0%	4,2%
	% εκ συνόλου	1,0%	3,1%	4,2%
IB	Μέτρηση	9	2	11
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	10,7%	16,7%	11,5%
	% εκ συνόλου	9,4%	2,1%	11,5%
IIA	Μέτρηση	16	4	20
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	19,0%	33,3%	20,8%
	% εκ συνόλου	16,7%	4,2%	20,8%
IIB	Μέτρηση	24	1	25
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	28,6%	8,3%	26,0%
	% εκ συνόλου	25,0%	1,0%	26,0%
IIIA	Μέτρηση	20	2	22
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	23,8%	16,7%	22,9%
	% εκ συνόλου	20,8%	2,1%	22,9%
IIIB	Μέτρηση	12		12
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	14,3%		12,5%
	% εκ συνόλου	12,5%		12,5%
IV	Μέτρηση	2		2
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	2,4%		2,1%
	% εκ συνόλου	2,1%		2,1%
Total	Μέτρηση	84	12	96
	% εντός των 2 κατηγοριών CD105	100,0%	100,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	87,5%	12,5%	100,0%

Πίνακας 39: Η ΛΠ συσχετίστηκε σημαντικά με το στάδιο της νόσου των ασθενών με μη ΜΚΠ.



			ΛΕΜΦ.ΠΡΟΣΒΟΛΗ		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	15	9	24
		% εντός VEGF	62,5%	37,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	15,6%	9,4%	25,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	34	14	48
		% εντός VEGF	70,8%	29,2%	100,0%
		% εκ συνόλου	35,4%	14,6%	50,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	18	6	24
		% εντός VEGF	75,0%	25,0%	100,0%
		% επί συνόλου	18,8%	6,3%	25,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	67	29	96	
	% εντός VEGF	69,8%	30,2%	100,0%	
	% εκ συνόλου	69,8%	30,2%	100,0%	

Πίνακας 40: Καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση δεν διαπιστώθηκε μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και έκφρασης VEGF.

			Λεμφ.προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Flt1	Μη έκφραση	Μέτρηση	15	3	18
		% εντός Flt1	83,3%	16,7%	100,0%
		% εκ συνόλου	15,6%	3,1%	18,8%
	Ασθενής	Μέτρηση	24	12	36
		% εντός Flt1	66,7%	33,3%	100,0%
		% εκ συνόλου	25,0%	12,5%	37,5%
	Υψηλή	Μέτρηση	28	14	42
		% εντός Flt1	66,7%	33,3%	100,0%
		% εκ συνόλου	29,2%	14,6%	43,8%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	67	29	96	
	% εντός Flt1	69,8%	30,2%	100,0%	
	% εκ συνόλου	69,8%	30,2%	100,0%	

Πίνακας 41: Απουσία σημαντικής στατιστικής συσχέτισης διαπιστώθηκε μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και έκφρασης VEGFR1-Flt1.



			Λεμφ.προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Fik1	Μη έκφραση	Μέτρηση	9	2	11
		% εντός Fik1	81,8%	18,2%	100,0%
		% εκ συνόλου	9,4%	2,1%	11,5%
	Ασθενής έκφραση	Μέτρηση	31	9	40
		% εντός Fik1	77,5%	22,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	32,3%	9,4%	41,7%
	Υψηλή έκφραση	Μέτρηση	27	18	45
		% εντός Fik1	60,0%	40,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	28,1%	18,8%	46,9%
Total	Μέτρηση	67	29	96	
	% εντός Fik1	69,8%	30,2%	100,0%	
	% εκ συνόλου	69,8%	30,2%	100,0%	

Πίνακας 42: Παρατηρήθηκε απουσία σημαντικής στατιστικής συσχέτισης μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και έκφρασης VEGF-R2-Fik1.

Διερευνήθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας λεμφαγγειακής προσβολής και των επιμέρους ιστολογικών τύπων των μη ΜΚΠ και βρέθηκε αρνητική ($p=0,91$ και $\chi^2=0,18$) (Πίνακας 43).

			Λεμφ.προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Ιστολογικοί τύποι μη ΜΚΠ	Πλακώδες	Μέτρηση	36	16	52
		% εντός των ιστολογικών τύπων	69,2%	30,8%	100,0%
		% επί συνόλου	37,5%	16,7%	54,2%
	ΑδενοCa	Μέτρηση	17	8	25
		% εντός των ιστολογικών τύπων	68,0%	32,0%	100,0%
		% επί συνόλου	17,7%	8,3%	26,0%
	Αδιαφοροποίητο	Μέτρηση	14	5	19
		% εντός των ιστολογικών τύπων	73,7%	26,3%	100,0%
		% επί συνόλου	14,6%	5,2%	19,8%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	67	29	96	
	% εντός των ιστολογικών τύπων	69,8%	30,2%	100,0%	
	% επί συνόλου	69,8%	30,2%	100,0%	

Πίνακας 43: Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της παρουσίας λεμφαγγειακής προσβολής και των επιμέρους ιστολογικών τύπων των μη ΜΚΠ.



Ως προς την αξιολόγηση των διαθέσιμων δημογραφικών στοιχείων των ασθενών με μη ΜΚΠ, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας λεμφαγγειακής προσβολής και του φύλου των ασθενών ($p=0,2$ και $\chi^2=0,18$) (Πίνακας 44). Συγκεκριμένα το 89,6% (60/67) των ασθενών που δεν εμφάνισαν λεμφαγγειακή προσβολή στο ιστολογικό τους παρασκεύασμα και το 79,3% (23/29) αυτών που εμφάνισαν ήταν άνδρες.

	ΦΥΛΟ		ΣΥΝΟΛΟ
	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΔΡΕΣ	
Λεμφ. Απουσία Μέτρηση	7	60	67
Προσβολή (λπ)			
% εντός λπ	10,4%	89,6%	100,0%
% επί συνόλου	7,3%	62,5%	69,8%
Ταρουσία Μέτρηση	6	23	29
% εντός λπ	20,7%	79,3%	100,0%
% επί συνόλου	6,3%	24,0%	30,2%
ΣΥΝΟΛΟ Μέτρηση	13	83	96
% εντός λπ	13,5%	86,5%	100,0%
% επί συνόλου	13,5%	86,5%	100,0%

Πίνακας 44: Η λεμφαγγειακή προσβολή δεν συσχετίζεται με το φύλο των ασθενών με μη ΜΚΠ.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της λεμφαγγειακής προσβολής με την ηλικία ($t=-2,87$, $p=0,005$, ANOVA test). Η μέση ηλικία των ασθενών που εμφάνισαν λεμφαγγειακή προσβολή ήταν 60,72 έτη και αυτών που δεν εμφάνισαν ήταν 65,46 έτη.

Η ύπαρξη λεμφαγγειακής προσβολής συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την παρουσία μεταστάσεων ($p=0,00$ και $\chi^2=17,6$). Συγκεκριμένα το 96,6% (28/29) των ασθενών με μη ΜΚΠ που εμφάνισαν λεμφαγγειακή προσβολή στο ιστολογικό τους παρασκεύασμα παρουσίασαν μεταστατικές εστίες (Πίνακας 45).



	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΟ
	Απουσία	Παρουσία	
Λεμφ. Απουσία Μέτρηση	32	35	67
Προσβολή . . % εντός λπ	47,8%	52,2%	100,0%
(λπ) % εκ συνόλου	33,3%	36,5%	69,8%
yes Μέτρηση	1	28	29
% εντός λπ	3,4%	96,6%	100,0%
% εκ συνόλου	1,0%	29,2%	30,2%
ΣΥΝΟΛΟ Μέτρηση	33	63	96
% εντός λπ	34,4%	65,6%	100,0%
% εκ συνόλου	34,4%	65,6%	100,0%

Πίνακας 45: Η παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής στο ιστολογικό παρασκεύασμα ασθενών με μη ΜΚΠ συσχετίζεται στατιστικά με την παρουσία μεταστατικών εστιών σε αυτούς.

Επίσης, βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην λεμφαγγειακή προσβολή και το στάδιο της νόσου ($p=0,009$ και $\chi^2=17$). Το 62,1% (18/29) των ασθενών στον οποίων τα ιστολογικά παρασκευάσματα ανιχνεύτηκε λεμφαγγειακή προσβολή βρίσκονταν στο στάδιο ΙΙΙ (34,5% στάδιο ΙΙΙΑ και 27,6% στάδιο ΙΙΙΒ) της νόσου και το 31% στο στάδιο ΙΙ (9/29) (10,3% στάδιο ΙΙΑ και 20,7% στάδιο ΙΙΒ) ενώ το 20,9% (14/67) των ασθενών που δεν εμφάνισαν λεμφαγγειακή προσβολή βρίσκονταν στο στάδιο Ι (6% στάδιο ΙΑ και 14,9% στάδιο ΙΒ) και το 53,8% (36/67) στο στάδιο ΙΙ της νόσου (25,4% στάδιο ΙΙΑ και 28,4% στάδιο ΙΙΒ) (Πίνακας 46).



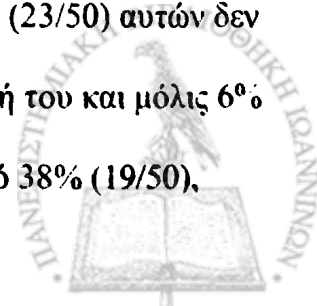
		Λεμφ.προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
		Απουσία	Παρουσία	
7 ΣΤΑΔΙΑ IA μη ΜΚΠ	Μέτρηση	4		4
	% εντός λπ	6,0%		4,2%
	% εκ συνόλου	4,2%		4,2%
IB	Μέτρηση	10	1	11
	% εντός λπ	14,9%	3,4%	11,5%
	% εκ συνόλου	10,4%	1,0%	11,5%
IIA	Μέτρηση	17	3	20
	% εντός λπ	25,4%	10,3%	20,8%
	% εκ συνόλου	17,7%	3,1%	20,8%
IIB	Μέτρηση	19	6	25
	% εντός λπ	28,4%	20,7%	26,0%
	% εκ συνόλου	19,8%	6,3%	26,0%
IIIA	Μέτρηση	12	10	22
	% εντός λπ	17,9%	34,5%	22,9%
	% εκ συνόλου	12,5%	10,4%	22,9%
IIIB	Μέτρηση	4	8	12
	% εντός λπ	6,0%	27,6%	12,5%
	% εκ συνόλου	4,2%	8,3%	12,5%
IV	Μέτρηση	1	1	2
	% εντός λπ	1,5%	3,4%	2,1%
	% εκ συνόλου	1,0%	1,0%	2,1%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	67	29	96
	% εντός λπ	100,0%	100,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	69,8%	30,2%	100,0%

Πίνακας 46: Η παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής στο ιστολογικό παρασκεύασμα ασθενών με μη ΜΚΠ συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με το στάδιο της νόσου τους.

ΜΚΠ- Έκφραση Αντισωμάτων και συσχέτιση αυτών με κλινικές παραμέτρους

Έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και των υποδοχέων του VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1

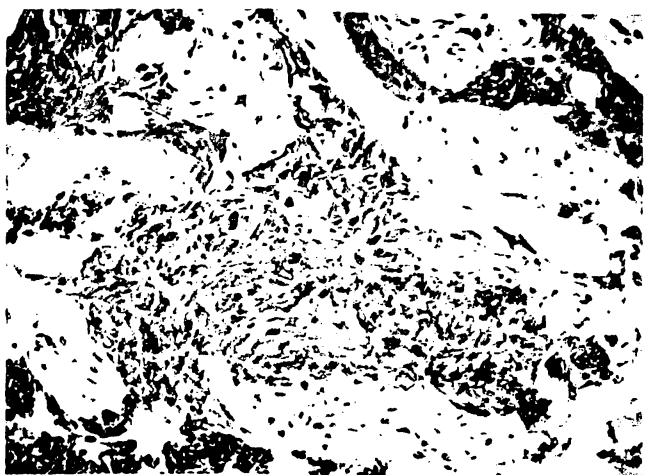
Από τα μελετούμενα ιστολογικά παρασκευάσματα ΜΚΠ ποσοστό 46% (23/50) αυτών δεν εξέφρασε τον παράγοντα VEGF, 48%(24/50) εμφάνισε ασθενή έκφρασή του και μόλις 6% (3/50) υψηλή. Ο υποδοχέας VEGF-R1-Flt1 δεν εκφράστηκε σε ποσοστό 38% (19/50),



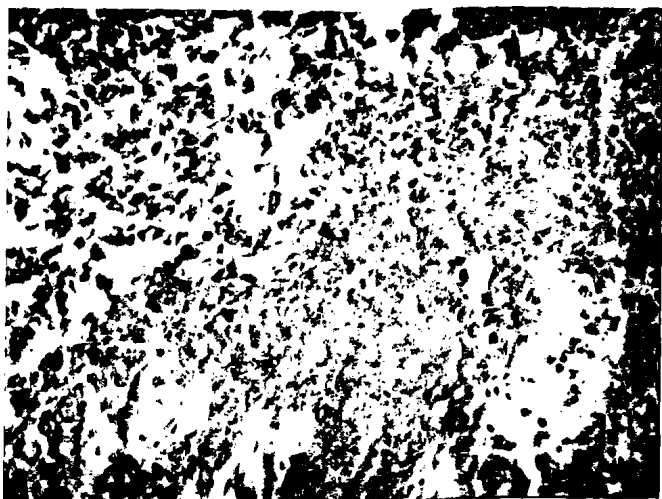
εμφάνισε ασθενή έκφραση σε ποσοστό 28% (14/50) και υψηλή έκφραση σε 34% (17/50) των παρασκευασμάτων. Σχετικά με τον υποδοχέα VEGF-R2-Flk1 τα ποσοστά έκφρασης διαφοροποιούνται σε σχέση με τα προηγούμενα, αφού δεν εκφράστηκε σε μόλις 12%(6/50) των παρασκευασμάτων, εκφράστηκε ασθενώς σε 48% (24/50) και υψηλά σε 40% (20/50) (Πίνακας 47) (Εικόνες 13-15).

	ΑΠΟΥΣΙΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	ΑΣΘΕΝΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗ	ΥΨΗΛΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	ΣΥΝΟΛΟ
VEGF	46%	48%	6%	100%
VEGF-R1-Flt1	38%	28%	34%	100%
VEGF-R2- Flk1	12%	48%	40%	100%

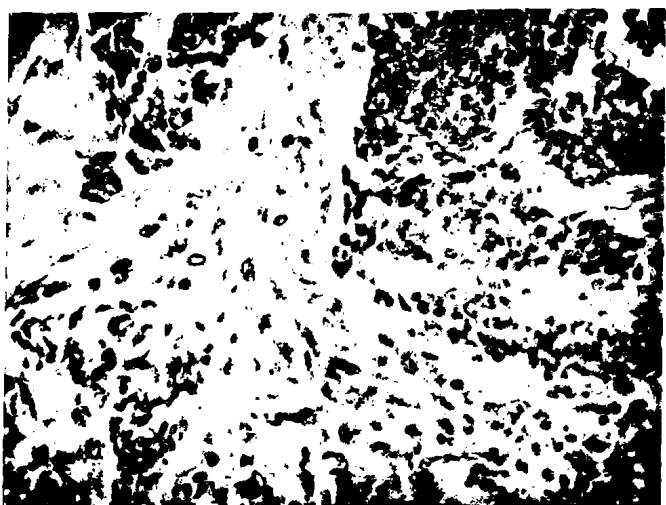
Πίνακας 47: Συχνότητα έκφρασης του VEGF και των δύο υποδοχέων του στα εξεταζόμενα ΜΚΠ.



Εικόνα 13: ΜΚΠ (χρώση DABx400) με ασθενή έκφραση του VEGF



Εικόνα 14: ΜΚΠ με ασθενή έκφραση του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1.



Εικόνα 15: ΜΚΠ με υψηλή έκφραση του υποδοχέα VEGF-R2-Flk1

Διερευνήθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ του VEGF και του τύπου του καρκινώματος πνεύμονα και ελέγχθηκε ως θετική ($\chi^2=12,78$, $df=2$, $p=0,002$). Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα έκφρασης του VEGF στις δύο βασικές ιστολογικές κατηγορίες (μη ΜΚΠ και ΜΚΠ) όπως αυτά παρατέθηκαν στους πίνακες 17 και 47, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του VEGF στα μη ΜΚΠ έναντι των ΜΚΠ γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι VEGF εμφανίζεται πιο ειδικός για τα μη ΜΚΠ. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι 24/27 καρκινώματα με αυξημένη έκφραση του VEGF ήταν μη ΜΚΠ



και μόλις 3/27 ήταν ΜΚΠ, ενώ από το σύνολο των ΜΚΠ το 46% εμφάνισε αρνητική έκφραση VEGF. Τα αποτελέσματα παρατίθενται συγκεντρωτικά στον πίνακα 48.

			Έκφραση VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΜΚΠ	Μέτρηση	23	24	3	50
		% εντός των 2 ιστολογ.κατηγοριών	46,0%	48,0%	6,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	17,1%	15,1%	2,1%	34,2%
	Μη ΜΚΠ	Μέτρηση	24	48	24	96
		% εντός των 2 ιστολογ.κατηγοριών	25,0%	50,0%	25,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	16,4%	32,9%	16,4%	65,8%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	49	70	27	146	
	% εντός των 2 ιστολογ.κατηγοριών	33,6%	47,9%	18,5%	100,0%	
	% εκ συνόλου	33,6%	47,9%	18,5%	100,0%	

Πίνακας 48: Ελέγχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ αγγειογένεσης (έκφραση VEGF) και βασικού ιστολογικού διαχωρισμού των καρκινωμάτων πνεύμονα.

Διαπιστώθηκε οριακή στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF και του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 ($\chi^2 = 9,15$, $df=4$, $p=0,057$) (Πίνακας 49). Ποσοστό 56,5% (13/23) των ιστολογικών παρασκευασμάτων που δεν εξέφρασαν τον VEGF δεν εξέφρασαν ούτε τον υποδοχέα του VEGF-R1-Flt1, ενώ 57,14% (8/14) των ιστολογικών παρασκευασμάτων με ασθενή έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα εμφάνισαν ταυτόχρονα ασθενή έκφραση του VEGF.



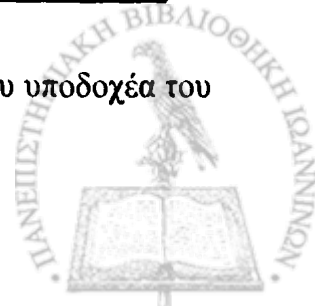
			VEGF-R1-Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	13	4	6	23
		Αναμεν. μέτρηση	8,7	6,4	7,8	23,0
		% εντός VEGF	56,5%	17,4%	26,1%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	5	8	11	24
		Αναμεν. μέτρηση	9,1	6,7	8,2	24,0
		% εντός VEGF	20,8%	33,3%	45,8%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	1	2	0	3
		Αναμεν. μέτρηση	1,1	,8	1,0	3,0
		% εντός VEGF	33,3%	66,7%	,0%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	19	14	17	50	
	Αναμεν. μέτρηση	19,0	14,0	17,0	50,0	
	% εντός VEGF	38,0%	28,0%	34,0%	100,0%	

Πίνακας 49: Παρατηρήθηκε οριακά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF και του υποδοχέα του VEGF-R1-Flt1 στα ιστολογικά παρασκευάσματα των ασθενών με ΜΚΠ.

Δεν παρατηρήθηκε το ίδιο μεταξύ του VEGF και του άλλου υποδοχέα του, VEGF-R2-Flk1 ($p=0,66$ και $\chi^2=2,39$). Τα αποτελέσματα παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 50.

			Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Ασθενής	Υψηλή	
VEGF	Απουσία έκφρασης	Μέτρηση	2	13	8	23
		Αναμεν. μέτρηση	2,8	11,0	9,2	23,0
		% εντός VEGF	8,7%	56,5%	34,8%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	4	10	10	24
		Αναμεν. μέτρηση	2,9	11,5	9,6	24,0
		% εντός VEGF	16,7%	41,7%	41,7%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	0	1	2	3
		Αναμεν. μέτρηση	,4	1,4	1,2	3,0
		% εντός VEGF	,0%	33,3%	66,7%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	6	24	20	50	
	Αναμεν. μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0	
	% εντός VEGF	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%	

Πίνακας 50: Η έκφραση του VEGF δε συσχετίστηκε με την έκφραση του υποδοχέα του VEGF-R2-Flk1 στα μελετούμενα ιστολογικά παρασκευάσματα ΜΚΠ.



Η έκφραση της αγγειογένεσης στα ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε με κανένα από τα διαθέσιμα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με ΜΚΠ δηλαδή το φύλο ($p=0,76$ και $\chi^2=0,54$) (Πίνακας 51) και την ηλικία τους ($p=0,76$, $df=2$, ANOVA test).

			VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
ΦΥΛΟ	Γυναίκες	Μέτρηση % εντός φύλου	2 40,0%	3 60,0%		5 100,0%
	Άνδρες	Μέτρηση % εντός φύλου	21 46,7%	21 46,7%	3 6,7%	45 100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση % εντός φύλου	23 46,0%	24 48,0%	3 6,0%	50 100,0%

Πίνακας 51: Το φύλο των ασθενών με ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε με την έκφραση του VEGF.

Κατά αναλογία με τα παραπάνω ευρήματα, η έκφραση της αγγειογένεσης στα μελετούμενα ΜΚΠ δεν εμφάνισε καμία συσχέτιση ούτε με τις διαθέσιμες κλινικές παραμέτρους δηλαδή την παρουσία μεταστατικών εστιών ($p=0,2$ και $\chi^2=3,19$) (Πίνακας 52), το στάδιο της νόσου ($p=0,18$ και $\chi^2=3,39$) (Πίνακας 53). Αντίστοιχα ευρήματα βρέθηκαν και στα μη ΜΚΠ, όπως προαναφέρθηκε, με αποτέλεσμα να αποδυναμώνεται η θέση του VEGF ως προγνωστικού παράγοντα στα καρκινώματα των πνευμόνων γενικότερα.

Η μέση επιβίωση των ασθενών με υψηλή έκφραση VEGF ήταν 8,33 μήνες (std. error 1,20), 95% CI [5,98; 10,69], με ασθενή έκφραση ήταν 10,83 μήνες (std. error 0,82), 95% CI [9,22; 12,45] και με απουσία έκφρασης ήταν 10,43 μήνες (std. error 1,08), 95% CI [8,32; 12,55] (Διάγραμμα 6).

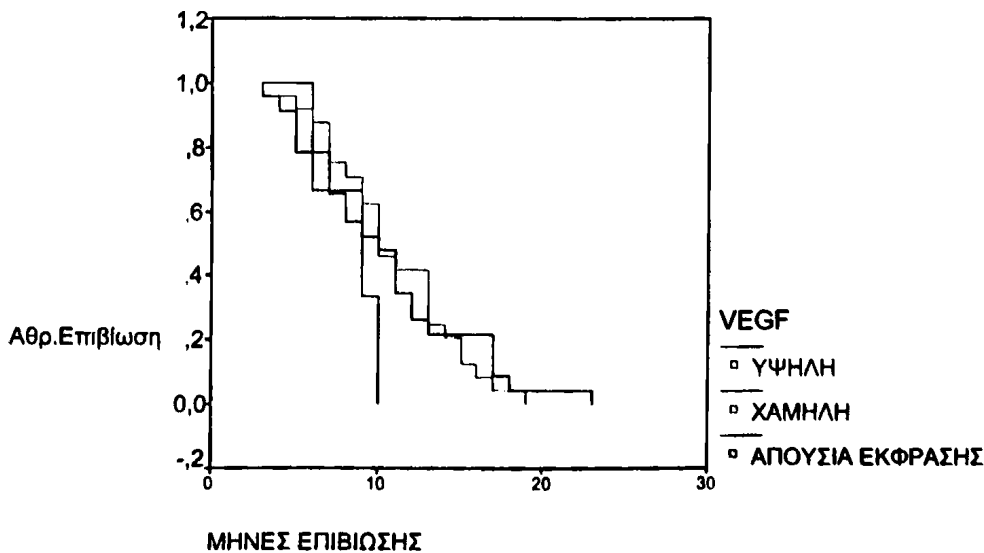


		VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
		Μη έκφραση	Χαμηλή	Υψηλή	
ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ	Απουσία Μέτρηση	5	5	2	12
	% εντός μετάστασης	41,7%	41,7%	16,7%	100,0%
	Παρουσία Μέτρηση	18	19	1	38
	% εντός μετάστασης	47,4%	50,0%	2,6%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	23	24	3	50
	% εντός μετάστασης	46,0%	48,0%	6,0%	100,0%

Πίνακας 52: Η έκφραση του VEGF στα ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε με την παρουσία μεταστατικών εστιών σε όργανα στόχους (εγκέφαλος, οστά, επινεφρίδια, ήπαρ).

		VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
ΣΤΑΔΙΟ	Εκτεταμένο Μέτρηση	13	12		25
	% εντός σταδίου	52,0%	48,0%		100,0%
	Περιορισμένο Μέτρηση	10	12	3	25
	% εντός σταδίου	40,0%	48,0%	12,0%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	23	24	3	50
	% εντός σταδίου	46,0%	48,0%	6,0%	100,0%

Πίνακας 53: Η έκφραση της αγγειογένεσης στα ιστολογικά παρασκευάσματα των ΜΚΠ που μελετήθηκαν δεν συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου των ασθενών.



Διάγραμμα 6: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με ΜΚΠ σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF. Οι 3 καμπύλες δε διαφέρουν σε στατιστικά μεγάλο βαθμό ($p > 0,05$).



Όσον αφορά στην έκφραση του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 συσχετίστηκε οριακά σημαντικά με την έκφραση του VEGF, όπως ήδη αναφέρθηκε, αλλά όχι με την έκφραση του άλλου μελετούμενου υποδοχέα VEGF-R2-Flk1 ($p=0,36$ και $\chi^2=4,38$) (Πίνακας 54).

			Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Ασθενής	Υψηλή	
Flt1	Απουσία έκφρασης	Μέτρηση	4	8	7	19
		Αναμ.μέτρηση	2,3	9,1	7,6	19,0
		% εντός Flt1	21,1%	42,1%	36,8%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	0	9	5	14
		Αναμ.μέτρηση	1,7	6,7	5,6	14,0
		% εντός Flt1	,0%	64,3%	35,7%	100,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	2	7	8	17
		Αναμ.μέτρηση	2,0	8,2	6,8	17,0
		% εντός Flt1	11,8%	41,2%	47,1%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	6	24	20	50	
	Αναμ.μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0	
	% εντός Flt1	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%	

Πίνακας 54: Καμία σημαντική στατιστική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των δύο υποδοχέων του VEGF στα ΜΚΠ.

Ο μελετούμενος υποδοχέας ακολουθώντας την συμπεριφορά του VEGF δεν συσχετίστηκε στατιστικά τόσο με τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών με ΜΚΠ δηλαδή το φύλο ($p=0,56$ και $\chi^2=1,5$) (Πίνακας 55) και την ηλικία ($p=0,27$ ANOVA test) όσο και με τις μελετούμενες κλινικές παραμέτρους δηλαδή την παρουσία μεταστάσεων ($p=0,81$ και $\chi^2=0,41$) (Πίνακας 56) και το στάδιο της νόσου ($p=0,65$ και $\chi^2=0,87$) (Πίνακας 57).



			Έκφραση VEGF-R1-Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
ΦΥΛΟ	Γυναίκες	Μέτρηση	3	1	1	5
		Αναμ.μέτρηση	1,9	1,4	1,7	5,0
		% εντός φύλου	60,0%	20,0%	20,0%	100,0%
	Άνδρες	Μέτρηση	16	13	16	45
		Αναμ.μέτρηση	17,1	12,6	15,3	45,0
		% εντός φύλου	35,6%	28,9%	35,6%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	19	14	17	50
		Αναμ.μέτρηση	19,0	14,0	17,0	50,0
		% εντός φύλου	38,0%	28,0%	34,0%	100,0%

Πίνακας 55: Η έκφραση του VEGF-R1-Flt1 δεν συσχετίστηκε με το φύλο των ασθενών που διεγνώσθησαν με ΜΚΠ.

		Έκφραση VEGF-R1Flt1			ΣΥΝΟΛΟ	
		Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή		
Μετάσταση	Απουσία	Μέτρηση	4	3	5	12
		Αναμ.μέτρηση	4,6	3,4	4,1	12,0
		% εντός μετάστασης	33,3%	25,0%	41,7%	100,0%
	Παρουσία	Μέτρηση	15	11	12	38
		Αναμ.μέτρηση	14,4	10,6	12,9	38,0
		% εντός μετάστασης	39,5%	28,9%	31,6%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	19	14	17	50
		Αναμ.μέτρηση	19,0	14,0	17,0	50,0
		% εντός μετάστασης	38,0%	28,0%	34,0%	100,0%

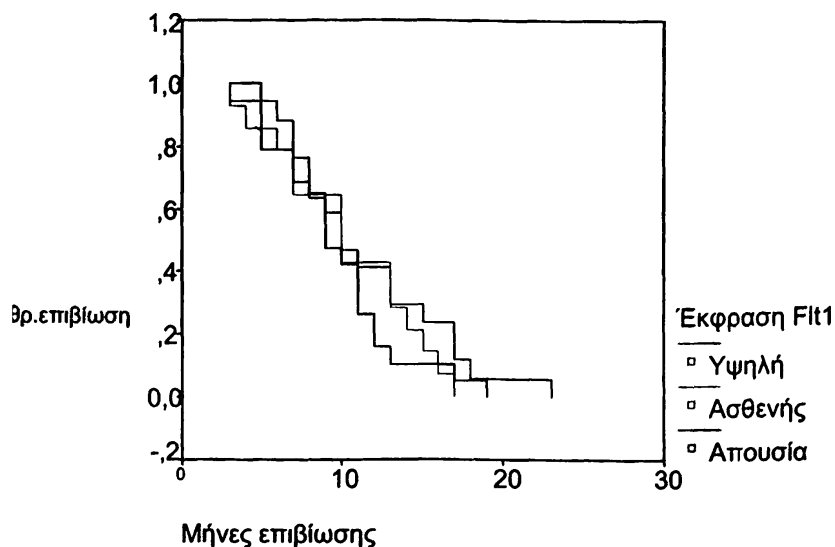
Πίνακας 56: Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF-R1-Flt1 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία μεταστάσεων στους ασθενείς.



			Έκφραση VEGF-R1Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
Στάδιο	Εκτεταμένο	Μέτρηση	10	8	7	25
		Αναμ.μέτρηση	9,5	7,0	8,5	25,0
		% εντός σταδίου	40,0%	32,0%	28,0%	100,0%
Περιορισμένο	Μέτρηση	Μέτρηση	9	6	10	25
		Αναμ.μέτρηση	9,5	7,0	8,5	25,0
		% εντός σταδίου	36,0%	24,0%	40,0%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	Μέτρηση	19	14	17	50
		Αναμ.μέτρηση	19,0	14,0	17,0	50,0
		% εντός σταδίου	38,0%	28,0%	34,0%	100,0%

Πίνακας 57: Δεν ελέγχθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του μελετούμενου υποδοχέα με το στάδιο της νόσου.

Η μέση επιβίωση των ασθενών με υψηλή έκφραση VEGF-R1-Flt1 ήταν 11,47 μήνες (std. error 1,26), 95% CI [9,01; 13,94], με ασθενή έκφραση ήταν 10,36 μήνες (std. error 1,20), 95% CI [8,01; 12,71] και με απουσία έκφρασης ήταν 9,74 μήνες (std. error 0,89), 95% CI [7,98; 11,49] (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με ΜΚΠ σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGFR1-Flt1. Οι 3 καμπύλες δεν διαφέρουν σε στατιστικά μεγάλο βαθμό ($p > 0,05$).



Όσον αφορά στον υποδοχέα VEGF-R2-Flk1, η έκφρασή του συσχετίστηκε με το φύλο των ασθενών που διεγνώσθησαν με ΜΚΠ ($p=0,03$ και $\chi^2=6,85$). Συγκεκριμένα, 60% των γυναικών (3/5) υπερέκφρασαν τον υποδοχέα έναντι 37,8% (17/45) των ανδρών (Πίνακας 58).

Δεν ίσχυσε το ίδιο για την ηλικία των ασθενών ($p=0,262$, $df=2$, ANOVA test).

			Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Ασθενής	Υψηλή	
ΦΥΛΟ	Γυναίκες	Μέτρηση	2	0	3	5
		Αναμ.μέτρηση	,6	2,4	2,0	5,0
		% εντός φύλου	40,0%	,0%	60,0%	100,0%
Ανδρες	Μέτρηση	Μέτρηση	4	24	17	45
		Αναμ.μέτρηση	5,4	21,6	18,0	45,0
		% εντός φύλου	8,9%	53,3%	37,8%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	Μέτρηση	6	24	20	50
		Αναμ.μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0
		% εντός φύλου	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%

Πίνακας 58: Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF-R2-Flk1 συσχετίστηκε σημαντικά με το φύλο των ασθενών με ΜΚΠ.

Δεν ελέγχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υποδοχέα και της παρουσίας μεταστάσεων ($p=0,16$ και $\chi^2=3,58$) (Πίνακας 59). Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα και του σταδίου της νόσου υπήρξε στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,10 αλλά όχι στο επίπεδο 0,05 ($p=0,09$ και $\chi^2=4,63$) (Πίνακας 60).



		Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
		Απουσία	Ασθενής	Υψηλή	
Μετάσταση	Απουσία Μέτρηση	2	8	2	12
	Αναμ.μέτρηση	1,4	5,8	4,8	12,0
	% εντός μετάστασης	16,7%	66,7%	16,7%	100,0%
Παρουσία	Μέτρηση	4	16	18	38
	Αναμ.μέτρηση	4,6	18,2	15,2	38,0
	% εντός μετάστασης	10,5%	42,1%	47,4%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	6	24	20	50
	Αναμ.μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0
	% εντός μετάστασης	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%

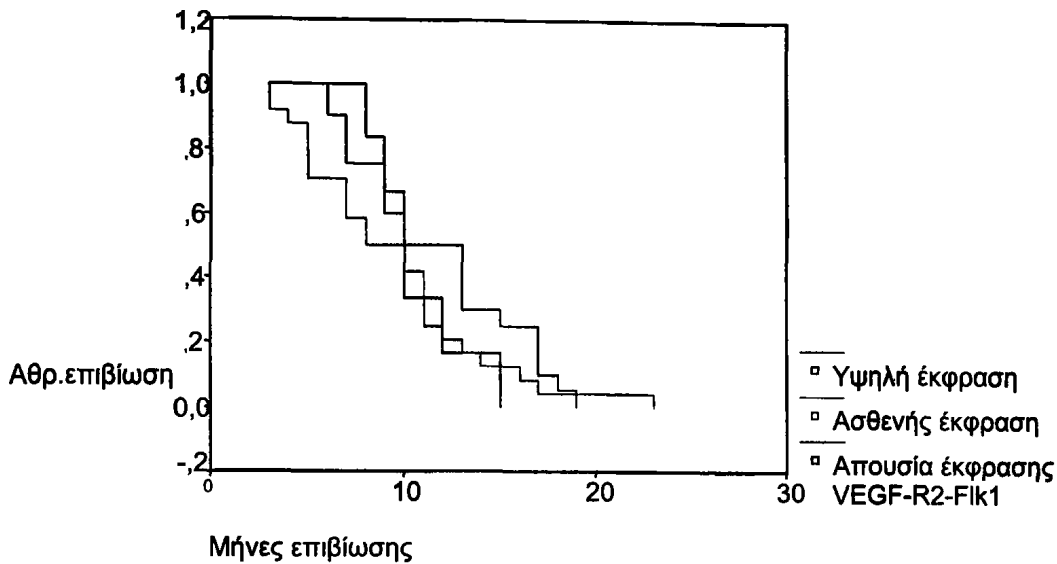
Πίνακας 59: Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF-R2-Flk1 δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την παρουσία μεταστατικών εστιών στους ασθενείς με ΜΚΠ.

		Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
		Απουσία	low	high	
Στάδιο Εκτεταμένο	Μέτρηση	5	13	7	25
	Αναμ.μέτρηση	3,0	12,0	10,0	25,0
	% εντός σταδίου	20,0%	52,0%	28,0%	100,0%
Περιορισμένο	Μέτρηση	1	11	13	25
	Αναμ.μέτρηση	3,0	12,0	10,0	25,0
	% εντός σταδίου	4,0%	44,0%	52,0%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	6	24	20	50
	Αναμ.μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0
	% εντός σταδίου	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%

Πίνακας 60: Η συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του υποδοχέα VEGF-R2-Flk1 και του σταδίου της νόσου ελέγχθηκε στατιστικά σημαντική μόνο στο επίπεδο 0,10.

Όσον αφορά στην μέση επιβίωση των ασθενών, αυτοί που εμφάνισαν υψηλή έκφραση VEGF-R2-Flk1 στο ιστολογικό τους παρασκεύασμα είχαν μέση επιβίωση 11,75 μήνες (std. error 0,96), 95% CI [9,86; 13,64], με ασθενή έκφραση ήταν 9,42 μήνες (std. error 1,00), 95% CI [7,46; 11,37] και με απουσία έκφρασης ήταν 10,67 μήνες (std. error 1,02), 95% CI [8,66; 12,67] (Διάγραμμα 8).

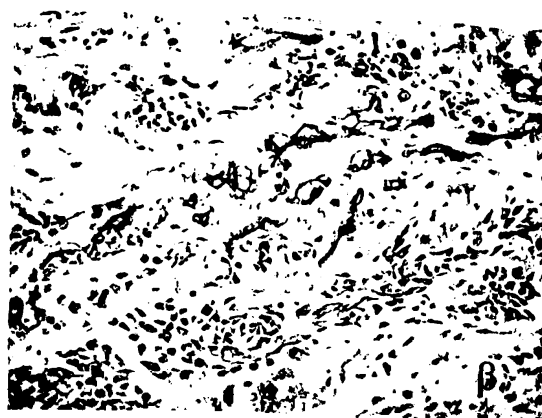
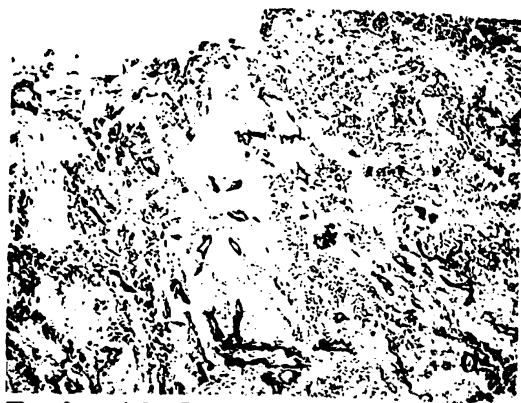




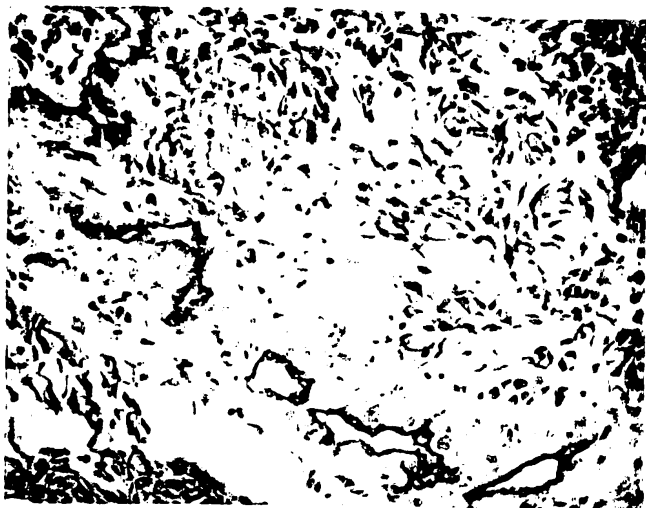
Διάγραμμα 8: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan Meier για την ολική επιβίωση των ασθενών με ΜΚΠ σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGFR2-FIk1. Οι 3 καμπύλες δε διαφέρουν σε στατιστικά μεγάλο βαθμό ($p > 0,05$)

CD105 (Ενδογλίνη) και λεμφαγγειακή προσβολή στα ΜΚΠ

Η έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα ΜΚΠ μέσω υπολογισμού της ΛΠ διαπιστώθηκε σε όλα τα υπό εξέταση ιστολογικά παρασκευάσματα. Συγκεκριμένα, 74% (37/50) των ιστολογικών παρασκευασμάτων εμφάνισαν υψηλή ΛΠ (>25) δηλαδή υψηλή έκφραση του CD105 (Εικόνα 16α,β) ενώ τα υπόλοιπα (13/50) εμφάνισαν χαμηλή ΛΠ (≤ 25) (Εικόνα 17). Λεμφαγγειακή προσβολή ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 22% (11/50) των ΜΚΠ ενώ τα υπόλοιπα (39/50) δεν εμφάνισαν αντίστοιχο εύρημα.



Εικόνα 16α,β: Ανοσοϊστοχημική χρώση DAB. ΜΚΠ με υψηλή έκφραση CD105 (ΛΠ>25).



Εικόνα 17: Χαμηλή έκφραση του CD105 (ΛΠ≤25) (DABx400).

Η έκφραση του CD105 εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής στα εξεταζόμενα ιστολογικά παρασκευάσματα ΜΚΠ ($p=0,02$ και $\chi^2=4,95$). Σε όλα τα ιστολογικά παρασκευάσματα στα οποία μετρήθηκε υψηλή ΛΠ ανιχνεύτηκε λεμφαγγειακή προσβολή (Πίνακας 61)

		Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
		Υψηλή	Ασθενής	
Λεμφ. Προσβ. (ΛΠ)	Απουσία Μέτρηση	26	13	39
	% εντός ΛΠ	66,7%	33,3%	100,0%
	% εκ συνόλου	52,0%	26,0%	78,0%
Παρουσία	Μέτρηση	11		11
	% εντός ΛΠ	100,0%		100,0%
	% εκ συνόλου	22,0%		22,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	37	13	50
	% εντός ΛΠ	74,0%	26,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	74,0%	26,0%	100,0%

Πίνακας 61: Η έκφραση του CD105 συσχετίστηκε σημαντικά με την παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής στα ΜΚΠ.

Η έκφραση του CD105 μέσω του υπολογισμού της ΛΠ συσχετίστηκε σημαντικά με τη βασική ιστολογική διάκριση των νεοπλασμάτων σε μη ΜΚΠ και σε ΜΚΠ ($p=0,04$ και $\chi^2=4,22$), και μάλιστα εκφράστηκε περισσότερο όχι μόνο στα μη ΜΚΠ αλλά και στα ΜΚΠ, στα οποία η έκφραση του VEGF ήταν χαμηλή, όπως προαναφέρθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Συγκεκριμένα, 37/50 (74%) ΜΚΠ και 84/96 (87,5%) μη ΜΚΠ εμφάνισαν υψηλή έκφραση CD105 (Πίνακας 62).

Η ΛΠ στα ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την έκφραση της αγγειογένεσης ($p=0,95$ και $\chi^2=0,09$), γεγονός αναμενόμενο και με βάση τα στοιχεία του πίνακα 62. Χαρακτηριστικά, 45,9% (17/37) των ιστολογικών παρασκευασμάτων με υψηλή ΛΠ δεν εξέφρασαν καθόλου τον VEGF ενώ μόλις 5,4% (2/37) των παρασκευασμάτων εξέφρασαν ταυτόχρονα υψηλά την αγγειογένεση και τη λεμφαγγειογένεση. Στον πίνακα 63 παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα.



			Έκφραση CD105		ΣΥΝΟΛΟ
			Υψηλή	Ασθενής	
Ιστολογική διάγνωση	ΜΚΠ	Μέτρηση	37	13	50
		% εντός ιστ.διάγνωσης	74,0%	26,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	25,3%	8,9%	34,2%
	Μη ΜΚΠ	Μέτρηση	84	12	96
		% εντός ιστ.διάγνωσης	87,5%	12,5%	100,0%
		% εκ συνόλου	57,5%	8,2%	65,8%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	121	25	146	
	% εντός ιστ.διάγνωσης	82,9%	17,1%	100,0%	
	% εκ συνόλου	82,9%	17,1%	100,0%	

Πίνακας 62: Η έκφραση του CD105 συσχετίστηκε σημαντικά με τον τύπο του νεοπλασματος πνεύμονα.

			Έκφραση VEGF			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
Έκφραση CD105	Υψηλή	Μέτρηση	17	18	2	37
		% εντός κατηγ. CD105	45,9%	48,6%	5,4%	100,0%
		% εκ συνόλου	34,0%	36,0%	4,0%	74,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	6	6	1	13
		% εντός κατηγ. CD105	46,2%	46,2%	7,7%	100,0%
		% εκ συνόλου	12,0%	12,0%	2,0%	26,0%
	ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	23	24	3	50
		% εντός κατηγ. CD105	46,0%	48,0%	6,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	46,0%	48,0%	6,0%	100,0%

Πίνακας 63: Δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στα ΜΚΠ.



Αντίστοιχα αρνητικά ήταν τα αποτελέσματα και από τον έλεγχο ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ CD105 και του υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 ($p=0,2$ και $\chi^2=3,2$) (Πίνακας 64) καθώς και του VEGF-R2-Flk1 ($p=0,81$ και $\chi^2=0,4$) (Πίνακας 65).

			Έκφραση VEGF-R1-Flt1			ΣΥΝΟΛΟ
			Μη έκφραση	Ασθενής	Υψηλή	
Έκφραση CD105	Υψηλή	Μέτρηση	16	11	10	37
		Αναμ.μέτρηση	14,1	10,4	12,6	37,0
		% εντός κατηγ. CD105	43,2%	29,7%	27,0%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	3	3	7	13
		Αναμ.μέτρηση	4,9	3,6	4,4	13,0
		% εντός κατηγ. CD105	23,1%	23,1%	53,8%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	19	14	17	50	
	Αναμ.μέτρηση	19,0	14,0	17,0	50,0	
	% εντός κατηγ. CD105	38,0%	28,0%	34,0%	100,0%	

Πίνακας 64: Κατά αναλογία με τον προηγούμενο πίνακα δε συσχετίστηκε η έκφραση του CD105 με τον υποδοχέα VEGF-R1-Flt1.

			Έκφραση VEGF-R2-Flk1			ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Ασθενής	Υψηλή	
Έκφραση CD105	Υψηλή	Μέτρηση	5	17	15	37
		Αναμ.μέτρηση	4,4	17,8	14,8	37,0
		% εντός κατηγ. CD105	13,5%	45,9%	40,5%	100,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	1	7	5	13
		Αναμ.μέτρηση	1,6	6,2	5,2	13,0
		% εντός κατηγ. CD105	7,7%	53,8%	38,5%	100,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	6	24	20	50	
	Αναμ.μέτρηση	6,0	24,0	20,0	50,0	
	% εντός κατηγ. CD105	12,0%	48,0%	40,0%	100,0%	

Πίνακας 65: Η έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε ούτε με τον άλλο υποδοχέα του VEGF, τον VEGF-R2-Flk1.



Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στο φύλο και την έκφραση του CD105

($p=0,3$, ακριβής έλεγχος Fisher) (Πίνακας 66).

		ΦΥΛΟ		ΣΥΝΟΛΟ
		Γυναίκες	Άνδρες	
Έκφραση CD105	Υψηλή Μέτρηση	5	32	37
	% εντός κατηγ. CD105	13,5%	86,5%	100,0%
	% εκ συνόλου	10,0%	64,0%	74,0%
Ασθενής Μέτρηση	Ασθενής Μέτρηση		13	13
	% εντός κατηγ. CD105		100,0%	100,0%
	% εκ συνόλου		26,0%	26,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	5	45	50
	% εντός κατηγ. CD105	10,0%	90,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	10,0%	90,0%	100,0%

Πίνακας 66: Το φύλο των ασθενών με ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε με την έκφραση της λεμφαγγειογένεσης στα ιστολογικά τους παρασκευάσματα.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του CD105 και της ηλικίας ($t=1,7$, $p=0,1$).

Πάντως, η μέση ηλικία εκείνων που είχαν υψηλή έκφραση CD105 (65,37 έτη) ήταν μεγαλύτερη από εκείνους που είχαν ασθενή έκφραση CD105 (61,23 έτη).

Η σχέση μεταξύ της ΛΠ και της παρουσίας μεταστάσεων είναι οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0,05$, ακριβής έλεγχος Fisher). Ποσοστό 83,8% (31/37) των ασθενών που υπερέκφρασαν το CD105 εμφάνισαν μεταστατικές εστίες (Πίνακας 67).



			ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Έκφραση CD105	Υψηλή	Μέτρηση	6	31	37
		% εντός κατηγ. CD105	16,2%	83,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	12,0%	62,0%	74,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	6	7	13
		% εντός κατηγ. CD105	46,2%	53,8%	100,0%
		% εκ συνόλου	12,0%	14,0%	26,0%
ΣΥΝΟΛΟ		Μέτρηση	12	38	50
		% εντός κατηγ. CD105	24,0%	76,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	24,0%	76,0%	100,0%

Πίνακας 67: Στατιστική συσχέτιση μεταξύ λεμφαγγειογένεσης και παρουσίας μεταστατικών εστιών σε ασθενείς με ΜΚΠ.

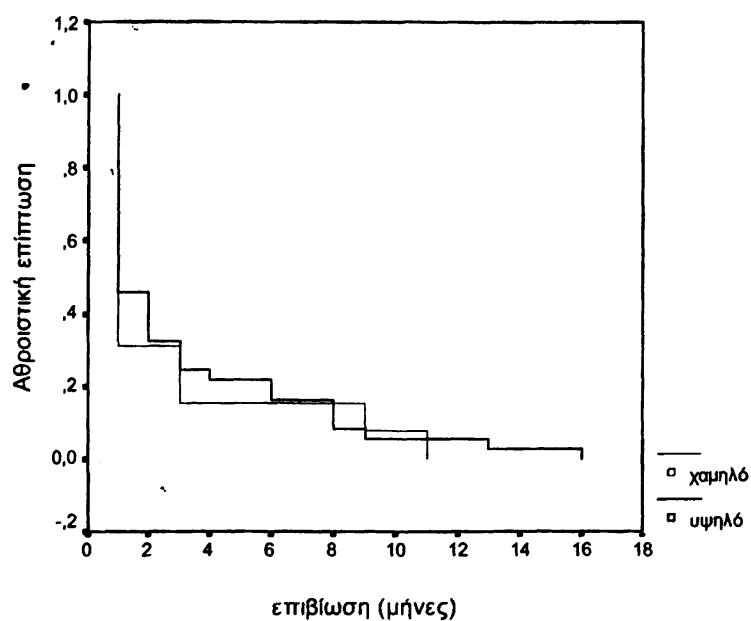
Η σχέση μεταξύ της έκφρασης του CD105 και του σταδίου της νόσου ελέγχθηκε ως στατιστικά σημαντική ($\chi^2=8,4$, $df=1$, $p=0,004$). Πιο συγκεκριμένα, το 62,2% (23/37) των ασθενών που εξέφρασαν υψηλά το CD105 (δηλαδή εμφάνισαν $\Lambda\Pi>25$) βρίσκονταν σε εκτεταμένο στάδιο της νόσου, ενώ μόλις το 15,4% (2/13) εκείνων που εξέφρασαν ασθενώς το CD105 (δηλαδή $\Lambda\Pi\leq 25$) ανήκαν στο περιορισμένο στάδιο της νόσου (Πίνακας 68).

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην έκφραση του CD105 και στην διάρκεια επιβίωσης ($\log\text{-rank}=0,12$, $p=0,72$). Πάντως, η μέση διάρκεια επιβίωσης για εκείνους με υψηλό CD105 ήταν $3,16\pm 0,6$ μήνες (μέσος \pm τυπικό σφάλμα), ενώ για εκείνους με χαμηλό ήταν χαμηλότερη ($2,69 \pm 0,93$) (Διάγραμμα 9).



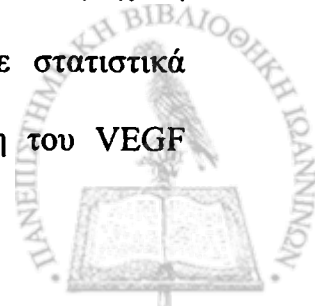
		ΣΤΑΔΙΟ		ΣΥΝΟΛΟ
		Εκτεταμένο	Περιορισμέ	
Έκφραση CD105	Υψηλή Μέτρηση	23	14	37
	% εντός κατηγ. CD105	62,2%	37,8%	100,0%
	% εκ συνόλου	46,0%	28,0%	74,0%
Ασθενής Μέτρηση	2	11	13	
	% εντός κατηγ. CD105	15,4%	84,6%	100,0%
	% εκ συνόλου	4,0%	22,0%	26,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	25	25	50
	% εντός κατηγ. CD105	50,0%	50,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	50,0%	50,0%	100,0%

Πίνακας 68: Η ΛΠ στα ιστολογικά παρασκευάσματα ΜΚΠ συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου των ασθενών.



Διάγραμμα 9: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier για τους μελετούμενους ασθενείς με χαμηλή και υψηλή λεμφαγγειακή πυκνότητα.

Κατά την μελέτη της λεμφαγγειακής προσβολής δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα σε αυτή και την αγγειογένεση στα ΜΚΠ. Έτσι, δεν ελέγχθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην λεμφαγγειακή προσβολή και την έκφραση του VEGF



($p=0,72$ και $\chi^2=0,63$) (Πίνακας 69) και των δύο υποδοχέων του, VEGF-R1-Flt1 ($p=0,43$ και $\chi^2=1,69$) (Πίνακας 70) και VEGF-R2-Flk1 ($p=0,29$ και $\chi^2=2,46$) (Πίνακας 71).

			Λεμφ. προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
VEGF	Μη έκφραση	Μέτρηση	19	4	23
		% εντός VEGF	82,6%	17,4%	100,0%
		% εκ συνόλου	38,0%	8,0%	46,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	18	6	24
		% εντός VEGF	75,0%	25,0%	100,0%
		% εκ συνόλου	36,0%	12,0%	48,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	2	1	3
		% εντός VEGF	66,7%	33,3%	100,0%
		% εκ συνόλου	4,0%	2,0%	6,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	39	11	50	
	% εντός VEGF	78,0%	22,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	78,0%	22,0%	100,0%	

Πίνακας 69: Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και έκφρασης του VEGF στα ΜΚΠ.

			Λεμφ. προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
FLT1	Μη έκφραση	Μέτρηση	13	6	19
		% εντός Flt1	68,4%	31,6%	100,0%
		% εκ συνόλου	26,0%	12,0%	38,0%
	Ασθενής	Μέτρηση	12	2	14
		% εντός Flt1	85,7%	14,3%	100,0%
		% εκ συνόλου	24,0%	4,0%	28,0%
	Υψηλή	Μέτρηση	14	3	17
		% εντός Flt1	82,4%	17,6%	100,0%
		% εκ συνόλου	28,0%	6,0%	34,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	39	11	50	
	% εντός Flt1	78,0%	22,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	78,0%	22,0%	100,0%	

Πίνακας 70: Η λεμφαγγειακή προσβολή δεν συσχετίστηκε ούτε με τον υποδοχέα VEGF-R1-Flt1 στα ΜΚΠ.



			Λεμφ.προσβολή		ΣΥΝΟΛΟ
			Απουσία	Παρουσία	
Fik1 Μη έκφραση	Μέτρηση	6		6	
	% εντός Fik1	100,0%		100,0%	
	% εκ συνόλου	12,0%		12,0%	
Ασθενής	Μέτρηση	17	7	24	
	% εντός Fik1	70,8%	29,2%	100,0%	
	% εκ συνόλου	34,0%	14,0%	48,0%	
Υψηλή	Μέτρηση	16	4	20	
	% εντός Fik1	80,0%	20,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	32,0%	8,0%	40,0%	
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	39	11	50	
	% εντός Fik1	78,0%	22,0%	100,0%	
	% εκ συνόλου	78,0%	22,0%	100,0%	

Πίνακας 71: Απουσία στατιστικής συσχέτισης παρατηρήθηκε και μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και του δεύτερου μελετούμενου υποδοχέα, του VEGF-R2-Fik1.

Δεν ελέγχθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής και το βασικό ιστολογικό διαχωρισμό του καρκινώματος πνεύμονα σε μικροκυτταρικό και μη μικροκυτταρικό ($p=0,19$ και $\chi^2=1,11$) (Πίνακας 72).

		ΙΣΤΟΛ.ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ		ΣΥΝΟΛΟ
		ΜΚΠ	Μη ΜΚΠ	
Λεμφ. Προσβ (λπ)	Απουσία	39	67	106
	Μέτρηση			
	% εντός λπ	36,8%	63,2%	100,0%
	% εκ συνόλου	26,7%	45,9%	72,6%
Παρουσία	Μέτρηση	11	29	40
	% εντός λπ	27,5%	72,5%	100,0%
	% εκ συνόλου	7,5%	19,9%	27,4%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	50	96	146
	% εντός λπ	34,2%	65,8%	100,0%
	% εκ συνόλου	34,2%	65,8%	100,0%

Πίνακας 72: Η παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής δεν συσχετίστηκε με το είδος του καρκινώματος (ΜΚΠ ή μη ΜΚΠ).



Επίσης η λεμφαγγειακή προσβολή δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το φύλο των ασθενών ($p=1$, ακριβής έλεγχος Fisher) (Πίνακας 73) ενώ κατά τον έλεγχο της σχέσης της με την ηλικία των ασθενών ευρέθη ότι η μέση ηλικία εκείνων που εμφάνισαν λεμφαγγειακή προσβολή ήταν $67,9 \pm 1,77$ έτη και ήταν μεγαλύτερη από εκείνων που δεν εμφάνισαν, η οποία ήταν $63,3 \pm 1,28$. Η σχέση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,10 αλλά όχι στο επίπεδο 0,05 ($t=1,8$, $p=0,08$).

		ΦΥΛΟ		ΣΥΝΟΛΟ
		Γυναίκες	Ανδρες	
Λεμφ. Προσβ (λπ)	Απουσία Μέτρηση	4	35	39
	% εντός λπ	10,3%	89,7%	100,0%
	% εκ συνόλου	8,0%	70,0%	78,0%
	Παρουσία Μέτρηση	1	10	11
	% εντός λπ	9,1%	90,9%	100,0%
	% εκ συνόλου	2,0%	20,0%	22,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	5	45	50
	% εντός λπ	10,0%	90,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	10,0%	90,0%	100,0%

Πίνακας 73: Η ανίχνευση λεμφαγγειακής προσβολής στα ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενών που διεγνώσθησαν με ΜΚΠ δεν συσχετίστηκε με το φύλο τους.

Ελέγχθηκε η σχέση της λεμφαγγειακής προσβολής με το στάδιο της νόσου και την ύπαρξη μεταστάσεων. Συγκεκριμένα, το 81,8% των ασθενών με λεμφαγγειακή προσβολή εμφάνισε μεταστάσεις ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς χωρίς λεμφαγγειακή προσβολή ήταν 74,4%, σχέση που όμως δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική ($\chi^2=0,26$, $p=0,6$) (Πίνακας 74). Σε αντίθεση με τη ΛΠ, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στη λεμφαγγειακή προσβολή και το στάδιο της νόσου ($p=0,73$, $\chi^2=0,18$) (Πίνακας 75).



		ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ		ΣΥΝΟΛΟ
		Απουσία	Παρουσία	
Λεμφ Προσβ (λπ)	Απουσία Μέτρηση	10	29	39
	% εντός λπ	25,6%	74,4%	100,0%
	% εκ συνόλου	20,0%	58,0%	78,0%
	Παρουσία Μέτρηση	2	9	11
	% εντός λπ	18,2%	81,8%	100,0%
	% εκ συνόλου	4,0%	18,0%	22,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	12	38	50
	% εντός λπ	24,0%	76,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	24,0%	76,0%	100,0%

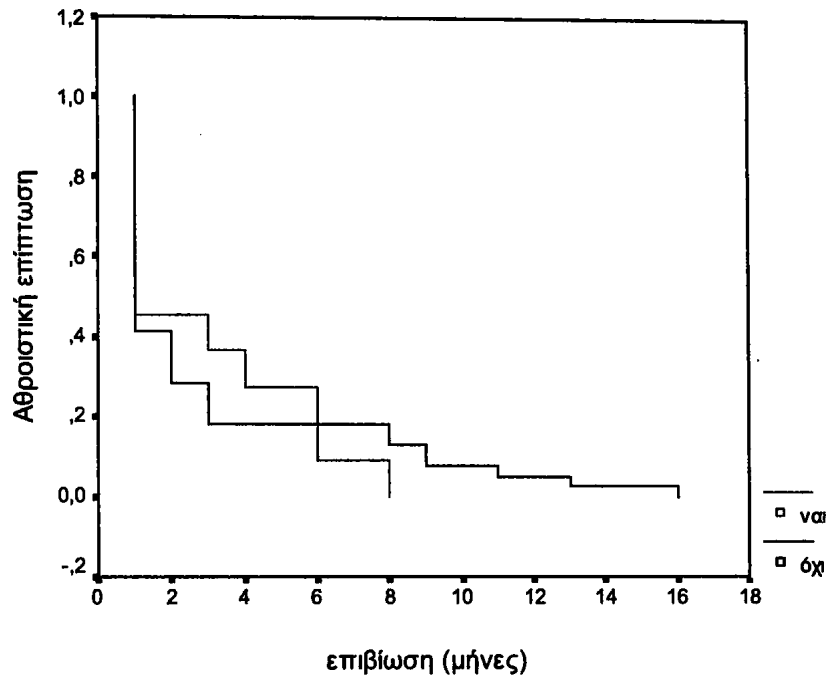
Πίνακας 74: Απουσία σημαντικής συσχέτισης μεταξύ λεμφαγγειακής προσβολής και μετάστασης στους ασθενείς με ΜΚΠ.

		ΣΤΑΔΙΟ		ΣΥΝΟΛΟ
		Εκτεταμένο	Περιορισμ	
Λεμφ Προσβ (λπ)	Απουσία Μέτρηση	19	20	39
	% εντός λπ	48,7%	51,3%	100,0%
	% εκ συνόλου	38,0%	40,0%	78,0%
	Παρουσία Μέτρηση	6	5	11
	% εντός λπ	54,5%	45,5%	100,0%
	% εκ συνόλου	12,0%	10,0%	22,0%
ΣΥΝΟΛΟ	Μέτρηση	25	25	50
	% εντός λπ	50,0%	50,0%	100,0%
	% εκ συνόλου	50,0%	50,0%	100,0%

Πίνακας 75: Η παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής δεν συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου των ασθενών με ΜΚΠ.

Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην λεμφαγγειακή προσβολή και την διάρκεια επιβίωσης ($\log\text{-rank}=0,06$, $p=0,8$). Η μέση επιβίωση εκείνων που είχαν προσβεβλημένα λεμφαγγεία ήταν 3,1 μήνες, ενώ για εκείνους που δεν είχαν η μέση επιβίωση ήταν 3 μήνες (Διάγραμμα 10).





Διάγραμμα 10: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier κατά την οποία η προσβολή λεμφαγγείων δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογένεση συνιστά ένα θεμελιώδες γεγονός τόσο στην διαδικασία ανάπτυξης όγκων όσο και στην μεταστατική διασπορά και αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος διάφορων σύγχρονων μελετών. Όγκοι με μέγεθος >2mm χρειάζονται τη δημιουργία νέων αγγείων για την περαιτέρω ανάπτυξή τους³²³.

Μία ευρεία ποικιλία πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων ανάπτυξης και εξωκυτταρικών ενζύμων, πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην πρόκληση της αγγειογένεσης³²⁴.

Η μικροαγγειακή πυκνότητα (ΜΠ) ως μέγεθος μέτρησης της αγγειογένεσης όγκων, αντιπροσωπεύει την νεοαγγειοποιητική ικανότητα του όγκου και αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για αυξημένα μεταστατικά δυναμικά και δυσμενή πρόγνωση στα ανθρώπινα καρκινώματα^{186,325-327}.

Αρκετές μελέτες κατέδειξαν τον σημαντικό ρόλο της αγγειογένεσης στην ανάπτυξη όγκων και την δημιουργία μεταστάσεων στα καρκινώματα του πνεύμονα, παχέος εντέρου, ορθού, μαστού καθώς και στα πλακώδη καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου^{198,199,204,328-330}.

Τα νεοπλασματικά μικροαγγεία διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ιστών και παρουσιάζονται με ανώμαλη μορφολογία, αυξημένη ευθραυστότητα και διαπερατότητα αλλά και υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού από αυτόν των φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁹⁹.

Μέσα στα παραπάνω πλαίσια, η νεοαγγειογένεση θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ακέραιο μέρος ενός πιο συγκροτημένου συστήματος σταδιοποίησης. Παρόλα αυτά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα τόσο των νεοπλασματικών όσο και των φυσιολογικών ιστών εμφανίζουν εξαιρετική ανομοιογένεια, με αποτέλεσμα τα πανενδοθηλιακά αντισώματα να μην μπορούν να χρωματίσουν ομοιογενώς όλα τα νεοπλασματικά αγγεία. Για παράδειγμα, αντισώματα κατά του CD34 και του παράγοντα von Willebrand (VW) αντιδρούν επαρκώς με τα ενδοθηλιακά



κύτταρα μεγάλων αιμοφόρων αγγείων ενώ η έκφρασή τους μειώνεται σημαντικά ή ακόμα και απουσιάζει από ορισμένα μικροαγγεία φυσιολογικών αλλά και νεοπλασματικών ιστών³³¹. Το γεγονός αυτό τα καθιστά ακατάλληλα για την απεικόνιση αγγείων που σχετίζονται με την νεοπλασματική εξεργασία και αναδεικνύει την ανάγκη εισαγωγής πιο αξιόπιστων δεικτών αγγειογένεσης.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) δρώντας ως ειδικός μιτογενετικός παράγοντας του ενδοθηλίου προκαλεί αγγειοποίηση στις περιοχές των ενεργά αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Πρόκειται για έναν από τους πιο ισχυρούς και ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων.

Η λεμφαγγειογένεση πιστεύεται ότι κατέχει εξίσου σημαντική θέση στην μεταστατική διασπορά καρκινικών κυττάρων δεδομένου ότι τα λεμφαγγεία αποτελούν αρχική οδό για την διασπορά των όγκων. Συγκεκριμένα, η μετάσταση των κακοηθών όγκων στους επιχώριους λεμφαδένες αποτελεί ένα από τα πρώιμα σημεία καρκινικής διασποράς σε ασθενείς και συσχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, η λεμφογενής μετάσταση αποτελεί την προεξάρχουσα οδό για καρκινική διασπορά^{332,333}.

Το CD105 (Ενδογλίνη) εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ως μία 180kDa ομοδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με τους μετατρεπτικούς παράγοντες ανάπτυξης β1 και β3^{309,310}. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα εργαστήρια με τη χρήση ποικίλων αντισωμάτων εναντίων του CD105 έδειξαν αυξημένη έκφραση σε μεγάλο εύρος καρκινικών ενδοθηλίων συμπεριλαμβανομένων καρκινωμάτων στο παχύ έντερο, μαστό, προστάτη και πνεύμονα σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς, υποδηλώνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την πιθανή σχέση του CD105 με την καρκινική λεμφαγγειογένεση^{301,302,306}.



Σε αντίθεση με το CD34 και τον παράγοντα VW, τα αντισώματα κατά του CD105 έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια προς τα «ενεργοποιημένα» ενδοθηλιακά κύτταρα και δεσμεύονται επιλεκτικά με τα αντίστοιχα «ενεργοποιημένα» των ιστών που συμμετέχουν στην λεμφαγγειογένεση³⁰³. Ως εκ τούτου, τα φυσιολογικά αγγεία που έχουν παγιδευτεί εντός των νεοπλασματικών ιστών μπορεί να μην χρωματιστούν από τα αντισώματα κατά του CD105 με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα ψευδώς θετικής χρώσης.

Παρά τα ήδη καθιερωμένα προγνωστικά κριτήρια για τις κλινικές περιπτώσεις των καρκινωμάτων των πνευμόνων (μη ΜΚΠ και ΜΚΠ), δεν είναι συχνά δυνατή η ύπαρξη μίας αξιόπιστης πρόγνωσης της κλινικής πορείας των ασθενών κατά την στιγμή της διάγνωσης.

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αφορά σε καρκινώματα των πνευμόνων διαφόρων κλινικών σταδίων ενασχολούμενη ταυτόχρονα με την έκφραση του παράγοντα VEGF και των δύο υποδοχέων του, VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1, την σύγκρισή τους με τον λεμφαγγειακό παράγοντα CD105 και την συσχέτιση όλων των παραπάνω παραγόντων με τις κλινικές παραμέτρους.

Συγκεκριμένα μελετήσαμε κάθε ένα από τους παραπάνω παράγοντες ξεχωριστά σε μη ΜΚΠ και ΜΚΠ, συγκρίναμε τη μεταξύ τους έκφραση και εν συνεχεία συσχετίσαμε τα αποτελέσματα με δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία) και κλινικές παραμέτρους (στάδιο νόσου, παρουσία μετάστασης, επιβίωσης) εξετάζοντας το ενδεχόμενο πιθανής χρήσης τους ως νέων προγνωστικών παραγόντων σε ασθενείς με καρκίνωμα πνεύμονα.

Ο VEGF εμφανίστηκε πιο ειδικός για τα μη ΜΚΠ αλλά παρόλα αυτά δεν συσχετίστηκε με το κλινικό στάδιο της νόσου, την παρουσία μεταστάσεων και τα δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία). Το γεγονός αυτό αναφέρθηκε ήδη βιβλιογραφικά²⁰⁴ και κατέρριψε τη χρησιμότητά του ως προγνωστικού παράγοντα. Στα ΜΚΠ ο VEGF διατήρησε το ίδιο πρότυπο συμπεριφοράς.



Βιβλιογραφικά, οι συγκεντρώσεις του VEGF στους ιστούς φαίνεται να αποτελούν προγνωστικό παράγοντα θνησιμότητας για τον καρκίνο του μαστού^{334,335}. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από άλλες μελέτες που αφορούσαν σε αμιγείς νεοπλασίες διαφόρων οργάνων συμπεριλαμβανομένων του πνεύμονα, προστάτη, παχέος εντέρου, οστών και μαλακών μορίων και παρουσιάζουν τον VEGF σαν έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για αντικαρκινική θεραπεία³³⁶⁻³⁴¹.

Σε μελέτη που αφορούσε σε πλακώδη καρκινώματα των πνευμόνων πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε τον VEGF όχι μόνο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα αλλά και συνδυαζόμενο με την παρουσία μεταστάσεων²⁰¹. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Τοϊ και συνεργάτες³⁴² και οι Maeda και συνεργάτες³⁴³ μελετώντας καρκινώματα άλλων οργάνων.

Οι Τοϊ και συνεργάτες ανέλυσαν 103 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και βρήκαν ότι το χρονικό διάστημα που ήταν ελεύθερο νόσου για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση VEGF ήταν σημαντικά μικρότερο από ότι για εκείνους με χαμηλή έκφραση του VEGF³⁴². Οι Maeda και συνεργάτες μελέτησαν 95 ασθενείς με γαστρικό καρκίνο που υπεβλήθησαν σε θεραπευτική εκτομή. Το ποσοστό επανεμφάνισης της νόσου ήταν 41,2% για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση VEGF και 19,7% για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση του παράγοντα. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της επιβίωσης σε σχέση με την αύξηση της έκφρασης του VEGF³⁴³.

Στα μη ΜΚΠ που συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας, διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση των δύο υποδοχέων, του VEGF-R1-Flt1 και του VEGF-R2-Flk1 με το κλινικό στάδιο της νόσου ενώ ο VEGF-R2-Flk1 συσχετίστηκε και με την παρουσία μεταστάσεων. Κατά τον παραπάνω τρόπο οι δύο υποδοχείς συμπεριφέρθηκαν αντιφατικά σε σχέση με τον VEGF ο οποίος δεν εμφάνισε καμία αντίστοιχη σημαντική συσχέτιση.



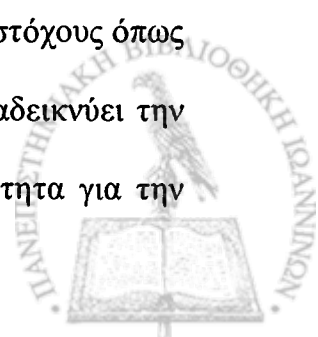
Η έκφραση του VEGF συσχετίστηκε με την έκφραση μόνο ενός εκ των δύο υποδοχέων του, του VEGF-R1-Flt1, γεγονός που έχει βρεθεί κι από άλλη μελέτη παρά το ότι αφορούσε σε μη MKΠ σταδίου I και II μόνο²⁰². Απαιτείται μεγαλύτερη διερεύνηση σε μοριακό επίπεδο για την διερεύνηση της συγκεκριμένης προτίμησης του VEGF. Το παραπάνω εύρημα υποδηλώνει μία αυτοκρινή λειτουργία του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα του, VEGF-R1-Flt1. Ο VEGF μπορεί να δρα ως αυξητικός παράγοντας για τα νεοπλασματικά κύτταρα. Στο επιθετικό καρκίνωμα μαστού, καταδείχτηκε ένα πιθανό αυτοκρινές κύκλωμα στα νεοπλασματικά κύτταρα διαμέσου των VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1³⁴⁴. Η σαφής ενίσχυση της έκφρασης των VEGF και των υποδοχέων του στην περιφέρεια των νεοπλασμάτων και στα διασπειρώμενα καρκινικά κύτταρα είναι σε συμφωνία με την λειτουργία του VEGF ως αυξητικού παράγοντα σε αυτοκρινές κύκλωμα συμβάλλοντας στην εξάπλωση της νόσου.

Τα MKΠ συνιστούν ένα διαφορετικό πρότυπο συμπεριφοράς και όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας δεν μπορούν να ενταχθούν μέσα στα παραπάνω πλαίσια των προαναφερόμενων μελετών^{201,342,343}.

Δεν ανευρέθησαν σε MKΠ μελέτες συσχέτισης των υποδοχέων του VEGF τόσο με τον ίδιο τον αγγειογενετικό παράγοντα (VEGF) όσο και με κλινικές παραμέτρους.

Στην δική μας μελέτη, ο συνδυασμός του VEGF με τους υποδοχείς του αλλά και με οποιαδήποτε από τις μελετούμενες κλινικές παραμέτρους δεν φάνηκε να ενισχύει την πιθανότητα χρήσης του ως προγνωστικού παράγοντα, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την μελέτη των Fontanini και συνεργατών²⁰⁹.

Στα μη MKΠ η έκφραση του CD105 (μέσω υπολογισμού της ΛΠ) συσχετίστηκε σημαντικά τόσο με το στάδιο της νόσου όσο και με την παρουσία μεταστάσεων σε όργανα στόχους όπως το ήπαρ, τα επινεφρίδια, ο εγκέφαλος, τα οστά. Το συγκεκριμένο εύρημα καταδεικνύει την εγκυρότητά του ως λεμφαγγειακού δείκτη και συνιστά μία σημαντική πιθανότητα για την



μελλοντική του χρήση ως προγνωστικού παράγοντα για την κλινική έκβαση ασθενών με μη ΜΚΠ.

Η λεμφαγγειακή προσβολή συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου και την εμφάνιση μεταστάσεων αλλά και την ηλικία, κατά απόλυτη αναλογία προς το CD105, συνιστώντας πιθανή την ταυτόχρονη χρήση του με το CD105 ως προγνωστικού παράγοντα.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με άλλες μελέτες οι οποίες αξιολόγησαν την προγνωστική σημασία της έκφρασης της Ενδογλίνης σε διάφορα νεοπλάσματα και κατέδειξαν την υπεροχή της έναντι άλλων παραγόντων. Οι Charpin και συνεργάτες και οι Dales JP και συνεργάτες ανέφεραν ότι η έκφραση του CD105 ενέχει προγνωστική αξία σε τομές παραφίνης νεοπλασμάτων μαστού ως προς τη συνολική επιβίωση ($p < 0.01$), ενώ η έκφραση του CD31 σε τομές παραφίνης δεν συσχετίστηκε εξίσου με τη συνολική επιβίωση των ασθενών^{345,346}.

Οι Mineo και συνεργάτες ανέφεραν την σημασία της έκφρασης των CD105, CD34 και VEGF στη νεοαγγειογένεση στα μη ΜΚΠ (σταδίων IB-IIA) και τη συσχέτισή τους με φτωχή επιβίωση αλλά το CD105 δεν επιλέχθηκε τελικά από το στατιστικό μοντέλο και αποκλείστηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση³⁴⁷. Το συγκεκριμένο εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Tanaka και συνεργατών, οι οποίοι βρήκαν ότι η έκφραση του CD105 ήταν ο καλύτερος δείκτης και ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας του ελεύθερου νόσου χρονικού διαστήματος στα μη ΜΚΠ¹⁸³. Μία πιθανή εξήγηση στη συγκεκριμένη αντίθεση θα μπορούσε να αποτελέσει η στενότερη σχέση του CD34 και της προσβολής των νεοπλασματικών αγγείων με τη μεταστατική διαδικασία σε σχέση με την ίδια τη νεοαγγειογένεση.

Στον ορθοκολικό καρκίνο, η έκφραση του CD105 συσχετίστηκε σημαντικά με το στάδιο και τη συνολικά φτωχή πρόγνωση^{348,349}. Ο καρκίνος του προστάτη φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο πρότυπο συμπεριφοράς³⁵⁰. Αντίθετα η Ενδογλίνη δεν παρείχε εξίσου σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες σε περιπτώσεις ηπατικών νεοπλασμάτων που μελετήθηκαν³⁵¹.



Βιβλιογραφικά δεν ανευρέθησαν στοιχεία που να αφορούσαν σε μελέτες έκφρασης του CD105 σε ΜΚΠ.

Στα ΜΚΠ τα αποτελέσματά μας αναφορικά με την έκφραση του CD105 κατέδειξαν επίσης σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ΛΠ και του σταδίου της νόσου αλλά και της ύπαρξης μεταστάσεων. Επίσης ελέγχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ΛΠ και της παρουσίας λεμφαγγειακής προσβολής. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν την εμπλοκή της λεμφαγγειογένεσης στην καρκινική διασπορά στα ΜΚΠ.

Η ΛΠ και η λεμφαγγειακή προσβολή δε συσχετίστηκαν σημαντικά με την επιβίωση των μελετούμενων ασθενών. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί στην εξατομικευμένη κατά κλινική περίπτωση χορήγηση των διαφόρων χημειοθεραπευτικών σχημάτων και στην υποβολή σε τροποποιημένη κατά περίπτωση ακτινοθεραπεία των ασθενών, η λεπτομερής αναφορά των οποίων δεν ανήκει στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Παρόλα τα παραπάνω ευρήματα, η ακριβής διαδικασία της άμεσης εμπλοκής του CD105 στη λεμφαγγειογένεση εξακολουθεί να παραμένει ασαφής. Τρέχουσες μελέτες επικεντρώνονται στην ανακάλυψη ενδοκυτταρικών μορίων που αντιδρούν με την Ενδογλίνη (CD105)³⁵².

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι η έκφραση του CD105 (μέσω της αξιολόγησης της ΛΠ) και η ανίχνευση της λεμφαγγειακής προσβολής είναι ικανές να επιτελέσουν ένα σημαντικό προγνωστικό ρόλο στο συνολικό πλαίσιο πρόγνωσης των καρκινωμάτων του πνεύμονα, μέσω της συσχέτισής τους με τις κλινικές παραμέτρους και την κλινική έκβαση των ασθενών.

Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με την προγνωστική αξία της Ενδογλίνης (CD105) θα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες σειρές νεοπλασμάτων του πνεύμονα και οι ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλονται σε κοινά προτυποποιημένα θεραπευτικά πρωτόκολλα πριν την ενσωμάτωση του CD105 στην καθημερινή κλινική πράξη.



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and accountability in the financial process.

Furthermore, it is noted that the records should be kept for a minimum of five years. This period allows for a thorough review in case of any disputes or audits. The document also mentions that the records should be organized in a clear and concise manner, making it easy to locate specific information when needed.

In addition, the document highlights the need for regular reconciliation of accounts. This involves comparing the internal records with the bank statements to identify any discrepancies. If any differences are found, they should be investigated immediately to determine the cause and correct the records accordingly.

The document concludes by stating that maintaining accurate financial records is essential for the success of any business. It provides a clear framework for how these records should be managed and maintained to ensure the integrity of the financial data.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής μας οδηγούν στα ακόλουθα συμπεράσματα και ταυτόχρονα σε νέα ερωτήματα και προοπτικές:

1. Ο VEGF εμφάνισε ισχυρότερη έκφραση στα μη ΜΚΠ έναντι των ΜΚΠ. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασαν και οι δύο υποδοχείς του VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1.
2. Η έκφραση του VEGF συσχετίστηκε “επιλεκτικά” με τον ένα εκ τους δύο υποδοχείς του, τον VEGF-R1-Flt1 υποδηλώνοντας μία πιθανή αυτοκρινή λειτουργία του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα αυτού.
3. Η αδυναμία συσχέτισης του VEGF τόσο με τα δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία) όσο και με τις κλινικές παραμέτρους που μελετήσαμε (στάδιο, παρουσία μεταστάσεων, επιβίωση) στο σύνολο των ασθενών μας, απέδειξε ότι στερείται προγνωστικής ικανότητας και στις δύο ιστολογικές κατηγορίες καρκινωμάτων των πνευμόνων (μικροκυτταρικά και μη μικροκυτταρικά).
4. Ενώ οι δύο υποδοχείς του VEGF εκφράστηκαν αντίστοιχα με αυτόν τόσο στα μη ΜΚΠ όσο και στα ΜΚΠ, διαφοροποίησαν τη θέση τους από αυτόν στη συσχέτιση με τις κλινικές παραμέτρους. Στα μη ΜΚΠ ο VEGF-R1-Flt1 συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου και ο VEGF-R2-Flk1 με το στάδιο και την παρουσία μεταστάσεων.
5. Το CD105 παρουσίασε υψηλή έκφραση και στις δύο βασικές κατηγορίες καρκινωμάτων του πνεύμονα, ιδίως στα ΜΚΠ, όπου το VEGF υστερούσε.
6. Διαπιστώθηκε άμεση συσχέτιση μεταξύ του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF και της λεμφαγγειογένεσης στα μη-ΜΚΠ.



7. Τα ΜΚΠ εμφάνισαν συγκριτικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF και αυξημένη λεμφαγγειογένεση (έκφραση CD105) συνιστώντας κατ'αυτόν τον τρόπο διαφορετικό πρότυπο συμπεριφοράς.
8. Η έκφραση του CD105, μέσω του υπολογισμού της ΛΠ, συσχετίστηκε σημαντικά όχι μόνο με την κλινική σταδιοποίηση αλλά και με την παρουσία μεταστατικών εστιών τόσο στα μη ΜΚΠ όσο και στα ΜΚΠ. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την πιθανότητα να αποτελέσει στο μέλλον έναν υποσχόμενο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την κλινική έκβαση των καρκινωμάτων των πνευμόνων.
9. Η λεμφαγγειακή προσβολή συσχετίστηκε με τις κλινικές παραμέτρους μόνο στα μη ΜΚΠ και η παρουσία της δεν αντιστοιχούσε πάντα σε υψηλή ΛΠ και στους δύο τύπους των καρκινωμάτων με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η χρήση της ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα παρά μόνο σε συνδυασμό με το CD105.
10. Κρίνεται απαραίτητη η εισαγωγή και η μετέπειτα ενσωμάτωση στην κλινική πράξη νέων προγνωστικών παραγόντων στα καρκινώματα των πνευμόνων με βάση τους οποίους κατά την παθολογοανατομική εκτίμηση και διάγνωση θα είναι εφικτός ο ανάλογος στοχευμένος θεραπευτικός προγραμματισμός σε κλινικό επίπεδο με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της κλινικής έκβασης των ασθενών.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογένεση στα κακοήθη νεοπλάσματα (νεοπλασματική αγγειογένεση) αποτελεί μία πολυσταδιακή διεργασία η οποία πυροδοτείται και ελέγχεται από τα καρκινικά κύτταρα, και αποσκοπεί στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου του νεοπλάσματος, ώστε ο όγκος να μπορεί να εκδηλώσει πλήρως το αυξητικό και μεταστατικό του δυναμικό. Κατά την νεοπλασματική αγγειογένεση, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) παράγεται τόσο από τα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και από στρωματικά φυσιολογικά τα οποία επιστρατεύονται για να υπηρετήσουν το σκοπό αυτό από τα καρκινικά. Ο VEGF εκδηλώνει τις δράσεις του συνδεδεμένος με δύο υποδοχείς, τον VEGF-R1-Flt1 και τον VEGF-R2-Flk1/KDR.

Η λεμφαγγειογένεση πιστεύεται ότι κατέχει σημαντική θέση στη μεταστατική διασπορά καρκινικών κυττάρων δεδομένου ότι τα λεμφαγγεία αποτελούν αρχική οδό για τη διασπορά των όγκων. Το CD105 (Ενδογλίνη) εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ως μία 180kDa ομοδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία πιστεύεται ότι θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη λεμφαγγειογένεση. Παρόλα αυτά η έκφρασή της στα λεμφαγγεία δεν έχει μελετηθεί επαρκώς σε ογκολογικά περιστατικά.

Η συσχέτιση της αγγειογένεσης με τη λεμφαγγειογένεση και την διασπορά καρκινικών κυττάρων στα καρκινώματα των πνευμόνων δεν είναι σαφής.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης σε δείγματα μικροκυτταρικών και μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων πνεύμονα, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη μεταξύ τους σύγκριση αλλά και στη διερεύνηση της τυχόν προγνωστικής αξίας που διαθέτει η ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των κύριων παραγόντων που ελέγχουν τις παραπάνω διεργασίες, ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών.

Μελετήθηκαν συνολικά 146 ιστολογικά δείγματα καρκινωμάτων πνεύμονα (96 μη ΜΚΠ και 50 ΜΚΠ) στα οποία πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση για τους παράγοντες



VEGF, VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1 και CD105, έγινε αξιολόγηση της έκφρασης των τριών πρώτων, υπολογισμός της λεμφαγγειακής πυκνότητας για τον τέταρτο καθώς και ανίχνευση της παρουσίας λεμφαγγειακής προσβολής. Ακολούθησε μελέτη των κλινικών παραμέτρων και συσχέτισή τους με τις παραπάνω μετρήσεις.

Ο VEGF εκφράστηκε περισσότερο στα μη ΜΚΠ σε σχέση με τα ΜΚΠ και αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασαν και οι δύο υποδοχείς του, VEGF-R1-Flt1 και VEGF-R2-Flk1. Το CD105 εκφράστηκε υψηλά και στους δύο βασικούς ιστολογικούς τύπους καρκινωμάτων πνεύμονα και κυρίως στα ΜΚΠ όπου ο VEGF υστερούσε.

Στο σύνολο των δειγμάτων, η έκφραση του VEGF συσχετίστηκε με την έκφραση ενός μόνο εκ των δύο υποδοχέων του, του VEGF-R1-Flt1.

Τόσο στα μη ΜΚΠ όσο και στα ΜΚΠ, ο VEGF δεν συσχετίστηκε καθόλου με τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών που μελετήθηκαν (φύλο, ηλικία) και τις διαθέσιμες κλινικές παραμέτρους (στάδιο νόσου, παρουσία μεταστατικών εστιών, επιβίωση). Ο υποδοχέας VEGF-R1-Flt1 συσχετίστηκε μόνο στα μη ΜΚΠ με το στάδιο της νόσου ενώ ο υποδοχέας VEGF-R2-Flk1 συσχετίστηκε στα μη ΜΚΠ με το κλινικό στάδιο και την παρουσία μεταστάσεων και στα ΜΚΠ μόνο με το κλινικό στάδιο.

Στα μη ΜΚΠ η έκφραση του CD105 (μέσω υπολογισμού της ΛΠ) συσχετίστηκε με την ηλικία των ασθενών, το στάδιο της νόσου και την παρουσία μεταστατικών εστιών σε όργανα στόχους (επινεφρίδια, ήπαρ, εγκέφαλος, οστά). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασε και στα ΜΚΠ όπου επίσης συσχετίστηκε με τις προαναφερόμενες κλινικές παραμέτρους (στάδιο, μετάσταση) όχι όμως και με την επιβίωση των ασθενών. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην εξατομικευμένη κατά κλινική περίπτωση χορήγηση χημειοθεραπευτικών σχημάτων και υποβολή σε ακτινοθεραπεία, η λεπτομερής αναφορά των οποίων δεν ανήκει στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.



Η παρουσία λεμφαγγειακής προσβολής ανιχνεύτηκε τόσο στα μη ΜΚΠ όσο και στα ΜΚΠ αλλά μόνο στα μη ΜΚΠ συσχετίστηκε με την παρουσία μεταστάσεων στους ασθενείς και με το κλινικό στάδιο της νόσου τους.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία της μελέτης μας κατέδειξαν ότι η αγγειογένεση εκφράζεται περισσότερο στα μη ΜΚΠ έναντι των ΜΚΠ ενώ η λεμφαγγειογένεση εκφράζεται και στις δύο κατηγορίες, ιδίως όμως στα ΜΚΠ. Ο VEGF στερείται προγνωστικής ικανότητας και στις δύο βασικές ιστολογικές κατηγορίες των καρκινωμάτων των πνευμόνων. Η συσχέτιση της έκφρασης του CD105 με τις κλινικές παραμέτρους τόσο στα μη ΜΚΠ όσο και στα ΜΚΠ, καθιστά δυνατή την πιθανότητα να αποτελέσει στο μέλλον έναν υποσχόμενο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την κλινική έκβαση των καρκινωμάτων των πνευμόνων.



ABSTRACT.

Tumor angiogenesis (formation of new vasculature) being currently a special point of interest in several experimental studies, constitutes a major event in tumor formation and metastatic spread being triggered and controlled by neoplastic cells.

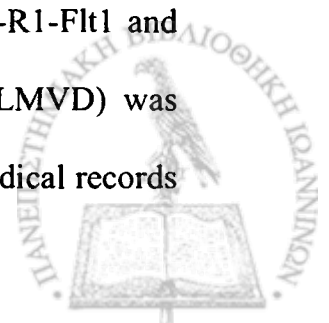
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a secretory glycoprotein acting as a specific endothelial mitogen and facilitating angiogenesis in actively developing cancer cell areas. It comprises one of the most important and specific angiogenetic factors and plays a pivotal role in tumor formation being mediated through VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1.

Lymphangiogenesis (formation of new lymphatic vessels) is considered to be of importance in the metastatic spread of cancer cells as lymphatic vessels constitute the initial route of spread in this procedure. CD 105 (Endoglin) is expressed on the cell surface as a 180 kDa homodimeric transmembrane protein and is believed to constitute a role in lymphangiogenesis but its expression in lymphatic vessels is less clear.

The association of angiogenesis with lymphangiogenesis and the metastatic spread of cancer cells in lung carcinomas still remains vague and has not been thoroughly studied.

The present study aims to evaluate angiogenesis and lymphangiogenesis in non small cell lung carcinomas (NSCLC) and small cell lung carcinomas (SCLC) and to detect their possible association by means of immunohistochemistry. We emphasized in investigating any prognostic impact of these procedures on patient outcome by associating the immunohistochemical findings with clinical and demographical data available.

A retrospective study was undertaken in 146 surgical lung specimens, 96 being NSCLC and 50 SCLC. Immunohistochemical staining for VEGF, VEGF-R1-Flt1, VEGF-R2-Flk1 and lymphangiogenetic factor CD105 was performed. Expression of VEGF, VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1 were assessed, intratumoral lymphatic microvessel density (ILMVD) was calculated and lymphatic invasion was detected (when existed). The patients' medical records



were thoroughly reviewed and clinical parameters were correlated with the immunohistochemical results as mentioned.

VEGF was higher expressed in NSCLC than in SCLC and its two receptors VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1 presented the same behavioural pattern.

CD105 was highly expressed in both histologic subtypes of lung carcinomas, mainly in SCLC where VEGF expression was diminished.

In all specimens, VEGF expression was only correlated with VEGF-R1-Flt1 expression and not with VEGF-R2-Flk1. Moreover, VEGF did not associate with the patients' demographical data (age, sex) and clinical parameters (clinical stage, presence of metastases, survival).

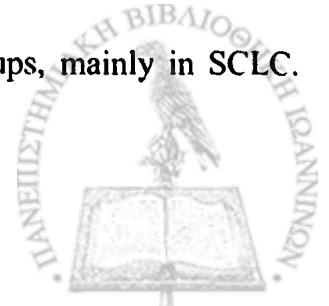
VEGF-R1-Flt1 receptor was only associated in NSCLC with the clinical stage while VEGF-R2-Flk1 receptor was associated in NSCLC with both the clinical stage and the presence of metastases while in SCLC was only associated with the stage of the disease.

In NSCLC, CD105 expression (by means of ILMVD assessment) was associated with the patients' age, the clinical stage and metastases in target organs (adrenal glands, liver, brain, bones). It maintained the same behavioral pattern in SCLC differing only in the lack of association with survival.

The present observation could be attributed to the use of chemotherapy and radiation according to the individuality of each clinical case and not on a massive basis, thus constituting a fact not being thoroughly examined in the present study as it does not comprise part of its aims.

Although lymphatic invasion was detected in both NSCLC and SCLC it was associated with clinical parameters only in NSCLC.

Our findings ascertain the fact that angiogenesis is higher expressed in NSCLC than in SCLC whereas lymphangiogenesis is expressed in both histological subgroups, mainly in SCLC.



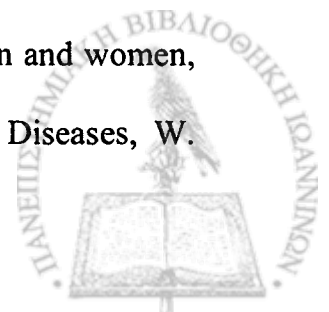
The inability of VEGF correlation with the clinical parameters proves that this angiogenic factor is devoid of prognostic value in lung neoplasms.

On the contrary, CD105 expression by means of assessing ILMVD and lymphatic invasion was strongly associated with clinical staging and metastasis, thus demonstrating its validity as a marker of lymphangiogenesis and constituting a strong possibility for its future utilization as a prognostic factor for patient outcome in lung neoplasms.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tyczyński JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe. *ENCR Cancer Fact Sheets*, vol.1, March 2000
2. Bray F, Sankila R, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe. *Eur J Cancer* 2002, 38:99-166.
3. <http://www.dep-iarc.fr>
4. Parkin DM , Whelan SL, Ferlay J, et al. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications, Lyon, 1997; 58.
5. Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91: 675–690.
6. Bonita R, & Mathers C. Global Health status at the beginning of the 21st century. In: Beaglehole, R. (ed), *Global Public Health: A New Era*. Oxford: Oxford University Press, 2003; 62
7. Beaglehole R and Bonita R. *Public Health at the Crossroads. Achievements and prospects*. Cambridge University Press, 2nd edition, 2004
8. Ράπτης Σ. Εσωτερική Παθολογία. Εκδόσεις Παρισιάνος, 1^η έκδοση, 1996; 484, τόμος Β
9. Hammond Cuyler E. The epidemiological approach to the etiology of cancer. *Cancer* March 1975, 35: 652-654
10. Wynder I.E. Etiology of lung cancer. Reflection on two decades of research. *Cancer* November 1972;30: 1332-1339
11. Haminontl, E. C.: Smoking in relation to the death rates of one million men and women, *In Epidemiological Approaches to the Study of Cancer and Other Chronic Diseases*, W.



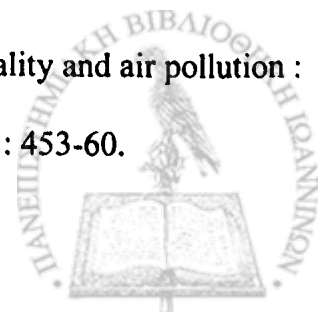
- Haenszel, Ed. Bethesda, Maryland, LJS. Public Health Service. National Cancer Institute Monograph, No. 19, 1966; 127-204.
12. U.S. Public Health Service: Smoking and Health. Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service. Washington, D.C., U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service Publication No. 1103, 1964; 387.
13. U.S. Public Health Service: The Health Consequences of Smoking. A report to the Surgeon General:1971. Washington, D.C.. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service. Publication No (HSM) 71-7513, 1972; 458
14. tVyndev E. L, Graham E. I: Tobacco smoking as a possible etiological factor in bronchiogenic carcinoma. A study of six hundred and eightyfour cases. *JAMA* 1950, 143:329-336
15. Escobedo LG, Peddicord JP. Smoking prevalence in US birth cohorts: The influence of gender and education. *Am J Public Health*. 1996;86:231-236.
16. Mucha L, Stephenson J, Morandi N, et al. Meta-Analysis of Disease Risk Associated with Smoking, by Gender and Intensity of Smoking. *Gender Medicine* 2006; 3:4; 279-291
17. Hecht S.S, Murphy S.E, Carmella S.G, et al. Effects of Reduced Cigarette Smoking on the Uptake of a Tobacco-Specific Lung Carcinogen. *J Natl Cancer I* 2004; 96:2;107-115
18. Luo J, Ye W, Zendeudel K, et al. Oral use of Swedish moist snuff (snus) and risk for cancer of the mouth, lung, and pancreas in male construction workers: a retrospective cohort study. *Lancet* 2007; 369: 2015–20
19. Hatsukami D.K, Lemmonds C, Zhang Y, et al. Evaluation of Carcinogen Exposure in People Who Used “Reduced Exposure” Tobacco Products. *J Natl Cancer I*. 2004; 96:11, p. 844-852



20. Gartner C.E, Hall W.D, Vos T, et al. Assessment of Swedish snus for tobacco harm reduction: an epidemiological modelling study. *Lancet* 2007; 369: 2010–14
21. http://en.wikipedia.org/wiki/Health_effects_of_tobacco_smoking
22. The Health Consequences of Involuntary Smoking. A Report of the Surgeon General. Washington, DC: US Department of Health and Human Services; 1986.
DHHS publication PHS 87-8398.
23. Current Intelligence Bulletin 54. Environmental Tobacco Smoke in the Workplace: Lung Cancer and Other Health Effects. Cincinnati, Ohio: National Institute for Occupational Safety and Health; 1991. DHHS (NIOSH) publication 91-108.
24. Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders. Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1992. EPA publication 600/6-90/006F.
25. Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke. Office of Environmental Health Assessment. Sacramento, Calif: California Environmental Protection Agency; September 1997.
26. The Health Effects of Passive Smoking. A Scientific Information Paper. Canberra, Australia: The National Health and Medical Research Council; 1997.
27. Poswillo D. Report of the Scientific Committee on Tobacco and Health. London, England: Great Britain Scientific Committee on Tobacco and Health, Department of Health; March 11, 1998.
28. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 83, Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon, France: IARC Press; 2004.
29. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315:980–988.



30. Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG, et al. Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *BMJ*. 1986;293:1217-1222.
31. Stayner L, Bena J, Sasco A.J, et al. Lung Cancer Risk and Workplace Exposure to Environmental Tobacco Smoke. *AMJ Public Health* March 2007;97:3, p.545-551
32. Zhong L, Goldberg M.S, Gao Y.T, et al. A case-control study of lung cancer and environmental tobacco smoke among nonsmoking women living in Shanghai, China. *Cancer Causes and Control* 1999;10: 607±616
33. Lee C.H, Ko Y.C, Goggins W, et al. Lifetime environmental exposure to tobacco smoke and primary lung cancer of non-smoking Taiwanese women. *Int J Epidemiol* 2000;29: 224-231
34. Coyle YM, Minahjuddin AT, Hynan LS, et al. An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas. *J Thorac Oncol*. 2006 Sep;1(7):654-61.
35. Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environmental Health* 2007;6:7, p.1-7
36. Isabella Annesi-Maesano, Dab W. Air pollution and the lung : epidemiological approach. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(6-7):589-94
37. Nerriere E, Zmirou-Navier D, Desqueyroux P, et al. Lung cancer risk assessment in relation with personal exposure to airborne particles in four french metropolitan areas. *J Occup Environ Med* 2005 ; 47 : 1211-7.
38. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 287 : 1132-41.
39. Filleul L, Rondeau V, Vandentorren S, et al. Twenty five year mortality and air pollution : results from the French PAARC survey. *Occup Environ Med* 2005 ; 62 : 453-60.



40. Krewski D, Burnett R, Jerret M, *et al.* Mortality and long term exposure to ambient air pollution : ongoing analyses based on the American cancer society cohort. *J Toxicol Environ Health* 2005 ; 68 : 1093-109.
41. Kabir Z, Bennett K, Clancy L. Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Ir Med J.* 2007;100(2):367-9.
42. Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* (2007), doi:10.1016/j.envpol.2007.06.012
43. Nawrot T.S, Nackaerts K, Hoet P.H.M, *et al.* Lung cancer mortality and fine particulate air pollution in Europe. *Int. J. Cancer* 2007: 120, 1825–1826
44. Beeson WL, Abbey DA, Knutsen SF. Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults: results from the AHSMOG study. *Environ Health Perspect* 1998;106: 813–23.
45. Dockery DW, Pope CA, Xu X, *et al.* An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 1993;329:1753–9.
46. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132–41.
47. Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, *et al.* Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002;360:1203–9.
48. Hwang SS, Lee JH, Jung GW, *et al.* Spatial analysis of air pollution and lung cancer incidence and mortality in 7 metropolitan cities in Korea. *J Prev Med Pub Health.* 2007;40(3):233-8
49. Järholm B, Silverman D. Lung cancer in heavy equipment operators and construction industry truck drivers with diesel exhaust exposure in the construction industry. *Occup Environ Med* 2003;60:516–520



50. Brueske-Hohlfeld I, Moehner M, Ahrens W, et al. Lung Cancer Risk in Male Workers Occupationally Exposed to Diesel Motor Emissions in Germany. *Am J Ind Med* 1999;36:405-414
51. Bardin-Mikolajczak A, Lissowska J, Zaridze, D et al. Occupation and risk of lung cancer in Central and Eastern Europe: the IARC multi-center case-control study. *Cancer Causes Control* 2007;18:645-654
52. Bruske-Hohlfeld I, Mohner M, Pohlabein H et al. Occupational Lung Cancer Risk for Men in Germany: Results from a Pooled Case-Control Study. *Am J Epidemiol* 2000;151:384-95.
53. Kreuzer M, Gerken M, Kreienbrock L, et al. Lung cancer in lifetime nonsmoking men - results of a case-control study in Germany. *Br J Cancer* 2001;84(1):134-40.
54. Jockel K, Ahrens W, Wichmann HE, et al. Occupational and environmental hazards associated with lung cancer. *Int J Epidemiol* 1992;21(2):202-213
55. Droste JH, Weyler JJ, Van Meerbeeck JP, et al. Occupational risk-factors of lung cancer: a hospital based case-control study. *Occup Environ Med* 1999;56:322-327
56. Benhamou S, Benhamou E, Flamant R. Occupational risk factors of lung cancer in a French case-control study. *Br J Ind Med* 1988;45:231-233
57. Matos E, Vilensky M, Mirabelli D, et al. Occupational exposures and lung cancer in Buenos Aires, Argentina. *J Occup Environ Med* 2000;42:653-659
58. Jockel K, Ahrens W, Jahn I et al. Occupational risk factors for lung cancer: a case-control study in West Germany. *Int J Epidemiol* 1998; 27:549-560
59. Bhatia R, Lopipero P, Smith AH. Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology* 1998;9:84-91.
60. Lipsett M, Campleman S. Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health* 1999;89:1009-17.



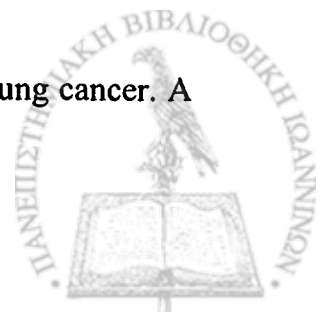
61. Ulvestad B, Kjaerheim K, Martinsen JI, et al. Cancer incidence among workers in the asbestos-cement producing industry in Norway. *Scand J Work Environ Health*. 2002;28(6):411-7.
62. Yano E, Wang Z.M, Wang X.R, et al. Cancer mortality among workers exposed to amphibole-free chrysotile asbestos. *Am J Epidemiol*. 2000;154(6):538-43
63. Perng DW, Perng RP, Kuo BI, et al. The variation of cell type distribution in lung cancer: a study of 10,910 cases at a medical center in Taiwan between 1970 and 1993. *Jpn J Clin Oncol*. 1996;26(4):229-33.
64. Wilde J, Matthäi C, Wilde J. Epidemiologic aspects of the histologic types of lung cancer. *Z Erkr Atmungsorgane*. 1990;175(1):9-19
65. Mary Wahbah, Nahal Boroumand, Claudia Castro, et al. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* 2007;11: 89– 96
66. Ν.Ι.Αγνάντη. Ειδική Παθολογική Ανατομική. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. 1^η έκδοση, 1999;91-97, τόμος Β
67. Brambilla E, Travis W.D, Colby T.V, et al. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059–1068
68. World Health Organization. Histological Typing of Lung Tumours. 2nd Edition, Geneva, World Health Organization, 1981
69. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):65-81, viii.
70. Brambilla E. Classification des cancers broncho-pulmonaires (OMS 1999). *Rev Mal Respir*, 2002, 19, 455-466.
71. Maggiore C, Mulè A, Fadda G, et al. Histological classification of lung cancer. *Rays*. 2004;29(4):353-5



72. Franklin W. Diagnosis of Lung Cancer : Pathology of Invasive and Preinvasive Neoplasia. *Chest* 2000;117;80-89
73. Stevens A, Lowe J. Pathology. Mosby. 1st edition. 1998; 181-187
74. Μ. Παπαδημητρίου. Εσωτερική Παθολογία. Εκδόσεις University Studio Press, 1^η έκδοση, 1998;514, τόμος Α
75. Ι. Χατζηγιάννης. Παθολογία. Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδη, 1^η έκδοση, 2002;275-276, τόμος Α
76. Allen R.Myers. Παθολογία. Εκδόσεις Χ.Ζεβελεκάκη. 1^η έκδοση, 1996;215, τόμος Α
77. Izbicki J.R, Passlick B, Hosch S.B et al. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non small cell lung cancer: significance of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:623-630
78. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997;111:1718-1723
79. Mountain CF. The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol.* 2000;18:106-115
80. Cotran R.S, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of the disease. W.B Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 6th Edition, 1999
81. Cox G, Steward P, O'Byrne K. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax* 1999; 54:169-179
82. Plate K.H. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Medicine* 2001;2(7): 151-152
83. Denoix PF. Enquete permanent dans les centers anticancereux. *Bull Inst Nat Hyg (Paris)* 1944 ;1 :1-69
84. International Union Against Cancer (UICC): The birth of TNM. UICC. *International Cancer News* 1988;9:1-4



85. Greene L.F, Page D.L, Fleming I.D, et al. AJCC Cancer Staging Handbook. Springer, 6th Edition, 2002;191-203
86. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997;111(6):1710-7
87. Silvestri G.A, Tanoue L.T, Margolis M.L, et al. The Noninvasive Staging of Non-small Cell Lung Cancer: The Guidelines. *Chest* 2003;123;147-156
88. Silvestri G.A, Detterbeck F.C, DeCamp M.M, et al. Invasive Staging: The Guidelines. *Chest* 2003;123;167-175
89. Alberts W.M. Lung Cancer Guidelines: Introduction. *Chest* 2003;123;1-2
90. Mathur P.N, Edell E, Sutedja T, et al. Treatment of Early Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003;123;176-180
91. Smythe W.R Treatment of Stage I Non-small Cell Lung Carcinoma. *Chest* 2003;123;181-187
92. Scott W.J, Howington J, Movsas B. Treatment of Stage II Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003;123;188-201
93. Robinson L.A, Wagner H, Ruckdeschel J.C. Treatment of Stage IIIA Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003;123;202-220
94. Jett J.R, Scott W.J, Rivera P.M, et al. Guidelines on Treatment of Stage IIIB Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003;123;221-225
95. Socinski M.A, Morris D.E, Masters G.A, et al. Chemotherapeutic Management of Stage IV Non-small Cell Lung Cancer *Chest* 2003;123;226-243
96. Detterbeck F.C, Jones D.R, Kernstine K.H, et al. Special Treatment Issues. *Chest* 2003;123;244-258
97. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Management of patients with lung cancer. A national clinical guideline. 1st edition, 2005;89.



98. Simon G.R, Wagner H. Small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003;123:259-271
99. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611
100. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91
101. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674
102. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. *News Physiol Sci* 1999;14:121-125
103. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447
104. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31
105. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-666
106. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25
107. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:795-803
108. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor, levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-450
109. Couffinhal T, Kearney M, Witzendichler B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997;150:1673-1685
110. Rajkumar SV, Mesa RA, Tefferi A. A review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematologic malignancies. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:33-47
111. Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. *Semin Oncol* 2001;28:560-564



112. Moehler TM, Neben K, Ho AD, et al. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol* 2001;80:695-705
113. Rajkumar SV, Kyle RA. Angiogenesis in multiple myeloma. *Semin Oncol* 2001;28:560-564
114. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-1155
115. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;48-50
116. Ide AG, Baker NH, Warren SL, et al. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 1939;42:891-899
117. Bergers G, Hanahan D, Coussens LM: Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 1998;42: 995–1002
118. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, et al. Overview of angiogenesis : Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 2001;28:94-104
119. Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 2000 ;6 Suppl 2 :S134-141
120. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 8104–9
121. Levy AP, Levy NS, Wegner S, et al. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biolo Chem* 1995;270:13333-13340
122. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-684



123. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, et al. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res* 1999; 59: 1592-8
124. Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem* 1998;273: 1052-7
125. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. *Br J Cancer* 1998; 77: 897-902
126. Monestiroli S, Mancuso P, Burlini A, et al. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:4341-4344
127. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967
128. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4606-4610
129. Frank S, Hubner G, Breier G, et al. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995;270:12607-12613
130. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:6271-6274
131. Cohen T, Nahari T, Cerem LW, et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741



132. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998;94: 715–725
133. Christofori G. The implication of angiogenesis on tumor invasiveness. *Angiogenesis* 1998;2: 21–23
134. Christofori G, Luef S. Novel forms of acidic fibroblast growth factor-1 are constitutively exported by tumor cell lines independent from conventional secretion and apoptosis. *Angiogenesis* 1997; 1: 55–70
135. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, et al. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991; 66: 1095–104
136. Kerbel RS, Vitoria-Petit A, Okada F, et al. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 1998;4: 286–95
137. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55: 4575–80
138. Shi YP, Ferrara N. Oncogenic ras fails to restore an *in vivo* tumorigenic phenotype in embryonic stem cells lacking vascular endothelial growth factor (VEGF). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254: 480–3
139. Okada F, Rak JW, Croix BS, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras upregulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 3609–14
140. Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, et al. Early induction of angiogenetic signals in gliomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Am J Pathol* 1999;154: 581–90



141. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996;69: 135-74
142. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, et al. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 861-6
143. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, et al. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med* 1997; 3: 1222-7
144. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59: 483-9
145. Giri D, Ittmann M. Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum Pathol* 1999;30: 419-24
146. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, et al. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1997;272: 27509-12
147. Parangi S, Dietrich W, Christofori G, et al. Tumor suppressor loci on mouse chromosomes 9 and 16 are lost at distinct stages of tumorigenesis in a transgenic model of islet cell carcinoma. *Cancer Res* 1995;55: 6071-6
148. Korpelainen EI, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10: 159-64
149. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes* 1999;13: 1055-66



150. Christofori G. The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In: Bicknell R, Lewis CE, Ferrara N (eds): Tumor Angiogenesis. Oxford University Press, 1997;201–37
151. Vlodavsky I, Christofori G. Fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In: Teicher BA (ed): Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy. Totowa, NJ, Humana Press, Inc., 1998;93–118
152. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries. An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;141: 1659–1673
153. Pepper MS, Mandriota SJ. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 241: 414–425
154. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87: 1171–1180
155. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376: 70–74
156. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55–60
157. Lin P, Buxton JA, Acheson A, et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 8829–8834
158. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267: 10931–10934
159. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, et al. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 87: 581–586, 1995



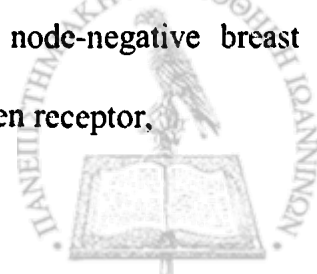
160. Cao Y, Chen C, Weatherbee JA, et al. Grobeta, a -C-X-C- chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. *J Exp Med* 1995;182: 2069-2077
161. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo*. *J Exp Med* 1995;182: 155-162
162. Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, et al. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 817-823
163. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, et al. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994;160: 194-202
164. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 1993;157: 351-358
165. Homandberg GA, Williams JE, Grant D, et al. Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1985; 120: 327-332
166. Dawson DW, Bouck NP. Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis. In: Teicher BA (ed): *Antiangiogenic Agents In Cancer Therapy*, Vol. 3. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 1999;185-203
167. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, et al. CD36 mediates the *in vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997;138:707-717
168. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88: 277-285
169. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79: 315-328



170. Moser TL, Stack MS, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 2811–2816
171. Stack MS; Gately S, Bafetti LM, et al. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 1999;340: 77–84
172. Redlitz A, Daum G, Sage EH. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J Vasc Res* 1999;36: 28–34
173. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5579–83
174. Lucas R, Holmgren L, Garcia I, et al. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 4730–41
175. Taddei L, Chiarugi P, Brogelli L, et al. Inhibitory effect of full-length human endostatin on *in vitro* angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 340–345
176. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 11721–11726
177. Brem S, Cotran r, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 1972;48:347-356
178. Vermeulen PB, Fox SB, Dirix LY, et al. Heterogeneity of vascularisation in invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2002;38:1951-1952
179. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 2002;38:1564-1579



180. Ahlgren J, Risberg B, Villman K, et al. Angiogenesis in invasive breast carcinoma- a prospective study of tumor heterogeneity. *Eur J Cancer* 2002;38:64-69
181. Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic makers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2004;17:197-203
182. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Ins.* 1994;86:386-388
183. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 2001;7:3410-3415
184. Fonsatti E, Maio M. Highlights on Endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* 2004;2:18
185. Eberhart S, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-1393. Erratum in *Cancer Res* 2000;60:3668
186. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8
187. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887
188. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-409
189. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, et al. Clinical application of antiangiogenic therapy : microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:883-893
190. Fox SB, Leek RD, Smith K, et al. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas—relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor,



and survival. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29:109–116.

191. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, et al. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995;177:275-283

192. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB, et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:139-146

193. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943, 4, 47–53.

194. Hannen EJ, van der Laak JA, Manni JJ, et al. Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasized and nonmetastasized squamous cell carcinomas of the tongue. *Head Neck* 2002;24:643-650.

195. Hannen EJ, van der Laak JA, Kerstens HM, et al. Quantification of tumor vascularity in squamous cell carcinoma of the tongue using CARD amplification, a systematic sampling technique, and true color image analysis. *Anal Cell Pathol* 2001;22:183-192

196. Vermeulen BP, Dirix LY, Libura J, et al. Correlation of the fractions of proliferating tumor and endothelial cells in breast and colorectal adenocarcinoma is independent of tumor histotype and microvessel density. *Microvasc Res* 1997;54:88-92

197. Offersen B.V, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, et al. Patterns of Angiogenesis in Non Small-Cell Lung Carcinoma. *Cancer* 2001;91:1500–9.

198. Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, et al. 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



199. Stefanou D, Batistatou A, Arkoumani E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in small-cell and non-small-cell lung carcinomas. *Histol Histopathol.* 2004;19(1):37-42.
200. Seto T, Higashiyama M, Hiroko F, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53: 91—96
201. Volm M, Kooma R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*1997: 74, 64-68
202. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non small cell lung carcinomas (NSCLCs). Correlation with angiogenesis and survival. *J. Pathol.*1999;188: 369-377
203. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non small cell lung cancer. *J. Pathol* 1996;179: 80-88
204. Baillie R, Carlile J, Pendleton N, et al. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* 2001;54;116-120
205. Yoo J, Jung JH, Lee MA, Seo KJ, et al. Immunohistochemical Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer: Correlation with Clinical Parameters and Prognosis. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 318-25
206. Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, et al. Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2007; 8: 488-99



207. Lucchia M, Mussia A, Fontanini G, et al. Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon. *Eur. J. Cardio Thorac* 2002;21 :1105–1110
208. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S et, al. Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41:2828–2835
209. Fontanini G, Faviana P, Lucchi M, et al. A high vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Br J Cancer*. 2002;86(4):558-63
210. Yamashita J, Ogawa M, Abe M, et al. Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase Concentrations Differ in Small Cell and Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 1999;116;206-211
211. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676
212. Houck K. The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814
213. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-11954
214. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219:983-985
215. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858
216. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22



217. 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;20:4368-4380
218. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al: The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271:7788-7795
219. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-1326
220. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, et al: Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003;198:863-868
221. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744
222. Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-543
223. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15-36
224. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, et al: VEGF receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003;28:488-494
225. Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, et al. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993;133:848-859



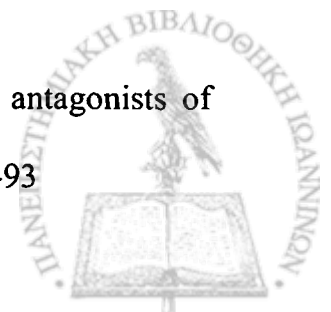
226. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, et al. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993;91:2235-2243
227. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439
228. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413-2422
229. Brown LF, Yeo KT, Berse B, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176:1375-1379
230. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-583
231. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74-80
232. Ogawa S, Oku A, Sawano A, et al. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-31282
233. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-524
234. Terman B. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1579-1586



235. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, et al. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9026-9030
236. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3566-3570
237. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000;156:1499-1504
238. Park J, Chen H, Winer J, et al: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-25654
239. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B(VEGFB) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11709-11714
240. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 2003;93:114-123
241. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003;94:751-756
242. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:548-553
243. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGFC, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-298



244. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991
245. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70
246. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9:936-943
247. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001;61:1207-1213
248. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001; 276:26969-26979
249. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846
250. Shalaby F. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66
251. Miao HQ, Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:29-37
252. Fuh G, Garcia C, de Vos A. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1. *J Biol Chem* 2000; 275:26690-26695
253. Takahashi T, Nakamura F, Jin Z, et al. Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1998;1:487-493



254. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-745
255. Soker S, Fidler H, Neufeld G, et al. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1996;271:5761-5767
256. Soker S. Neuropilin in the midst of cell migration and retraction. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:433-437
257. Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12677-12682
258. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1375-C1386
259. Eliceiri BP, Cheresch DA. Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:563-568
260. Eliceiri BP, Cheresch DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999;103:1227-1230
261. Alon T, Hemo I, Itin A, et al: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-1028
262. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10595-10599, 1996
263. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-275
264. Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:29-37



265. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:3739-3747
266. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000;6:1936-1948
267. Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2003;88:796-802
268. Yano S, Muguruma H, Sone S. Non-small cell lung cancer: 1) Molecular-target therapy. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 2003;92:318-323
269. Reinmuth N, Fan F, Liu W, et al. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 2002;82:1377-1389
270. Reinmuth N, Liu W, Fan F, et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3259-3269
271. Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D, et al. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: The case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation* 1998;97:381-390
272. Cao R, Brakenhielm E, Li X, et al: Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. *FASEB J* 2002;16:1575-1583



273. Guo P, Fang Q, Tao HQ, et al: Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen- independent tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2003;63:4684-4691
274. Joo YE, Rew JS, Seo YH, et al: Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol*2003;37:28-33
275. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716
276. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:687-694
277. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, et al. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:429-434
278. Dias S, Hattori K, Heissig B, et al: Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce longterm remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10857-10862
279. Konishi T, Huang CL, Adachi M, et al. The K-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers. *Int J Oncol* 2000;16:501-511
280. Ikeda N, Nakajima Y, Sho M, et al. The association of K-ras gene mutation and vascular endothelial growth factor gene expression in pancreatic carcinoma. *Cancer* 2001;92:488-499
281. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in



previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2184-2191

282. Herbst RS, Sandler AB. Non-small cell lung cancer and antiangiogenic therapy: what can be expected of bevacizumab? *Oncologist* 2004;9:19-26.

283. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, et al. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation *Trends Immunol* 2004;25:387-395.

284. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis: impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006;80:691-696.

285. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;438:946-953.

286. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18.

287. Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6865-6868

288. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;129:4797-4806.

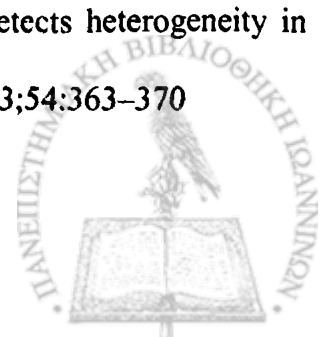
289. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J Biol Chem* 2005;280:4544-4552.

290. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005;201:1089-1099.

291. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:2167-2177.



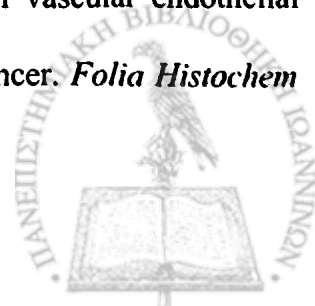
292. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883–1886.
293. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metast Rev* 2006;25:677–694.
294. Itoh H, Nakatsu M, Yoxtheimer LM, et al. Structural basis for pulmonary functional imaging. *Eur J Radiol* 2001;37:143–154.
295. Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, et al. Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer* 2004;46:11–19.
296. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, et al Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:7344–7353.
297. Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, et al Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest* 2004;126:342–346.
298. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:202–206.
299. Wissmann C, Detmar M. Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6865–6868.
300. He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:819–825.
301. Wang J. M, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int. J. Cancer* 1993;54:363–370



302. Burrows F. J, Derbyshire E. J, Tazzari P.L, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin. Cancer Res* 1995; 1:1623–1634
303. Kumar P, Wang J.M, Bernabeu C. CD105 and angiogenesis. *J. Pathol.*1996; 178:363–366
304. Bodey B, Bodey B, Siegel S.E, et al. Overexpression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res.*1998;18: 3621–3628
305. van der Kerkhof P.C, Rulo H.F, van Pelt J.P, et al. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm. Venereol.* 1998;78:19–21
306. Kumar S., Ghellal A., Li C, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.*1999;59:856–861
307. Bourdeau A, Faughnan M.E, Letarte M. Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000;10:279–285
308. Arthur H.M, Ure J, Smith A. J.H, et al. Endoglin, an ancillary TGF β receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.*2000; 217:42–53
309. Quackenbush E.J, Letarte M. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1985;134:1276–1285
310. Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 1988;141:1925–1933
311. Cheifetz S. Bellon T, Cales C, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*1992; 267: 19027–19030



312. Fernandez-Ruiz E, St.-Jacques S, Bellon T, et al. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-qter. *Cytogenet. Cell Genet.* 1993 ;64: 204–207
313. Pichuantes S, Vera S, Bourdeau A, et al. (1997) Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* 1997;50: 265–276
314. Bellon T, Corbi A, Lastres P, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 1993;23:2340–2345
315. Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, et al. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor- β -binding protein endoglin. *Biochem. J.* 1994;301: 765–768
316. de Caestecker M.P, Piek E, Roberts S.B. Role of transforming growth factor β signalling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92:1388–1402
317. Li C, Garland J.M, Kumar S. Re: Role of transforming growth factor β signalling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 555–556
318. Li C, Guo B, Wilson P, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 2000;89:122–126
319. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, et al. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 524–532
320. Tanigawa N, Amaya H, Matsumara M, et al. Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br. J. Cancer* 1997;75: 566–571
321. Dziadziuszko R, Chyczewsky L, Jassem E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor Flk-1 in non small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39:100-101



322. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification and in solid human tumours. *Brit J Cancer* 2006; 95:1611-1625
323. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Nat Cancer* 1990; 82: 4-6
324. Meert AP, Paesmans M, Martin B, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002;87:694-701
325. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996;77, 1722-1728
326. Sanz-Ortega J, Steinberg S.M, Moro M, et al. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p-53, c-erb-B2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol.Histopathol.* 2000;15, 455-462
327. Papamichael D. Prognostic role of angiogenesis in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2001;21, 4349-4353.
328. Georgiou L, Minopoulos G, Lirantzopoulos N, et al. Angiogenesis and p53 at the invading tumor edge: prognostic markers for colorectal cancer beyond stage. *J Surg Res* 2006; 131(1):118-23.
329. Meunier-Carpentier S, Dales J.P, Djemli A, et al. Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma. *Int J Oncology* 2005; 26: 977-984.
330. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, et al. 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.
331. Vermeulen BP, Gasparini G, Fox PB, et al. Quantification of angiogenesis in



solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A:2474-84

332. Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, et al. Clinical and pathologic features of invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer* 2004;11:169-174

333. Porter G.J. Patterns of metastatic breast carcinoma: influence of tumour histological grade. *Clin. Pathol.*2004;59:1094-1098

334. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, et al: Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:3121-3128

335. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, et al: Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer* 1999;81:727-732

336. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br.J.Cancer* 1996;73:931-934

337. Strohmeyer D, Strauss F, Rossing C, et al. Expression of bFGF, VEGF and c-met and their correlation with microvessel density and progression in prostate carcinoma. *Anticancer Res* 2004;24:1797-1804.

338. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3965-3968

339. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002;69:247-254.

340. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, et al. Vascular endothelial growth factor



expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:572-577

341. Pakos E, Goussia A, Tsekeris P, et al. Expression of vascular endothelial growth factors and its receptors, KDR/Flk-1, in soft tissue sarcomas. *Anticancer Res* 2005;25:3591-3596.

342. Tot M., Hoshina S., Takayanagi T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res*;1994: 85,1045–1049.

343. Maeda K, Chung Y.S, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer*;1996: 77: 858–863

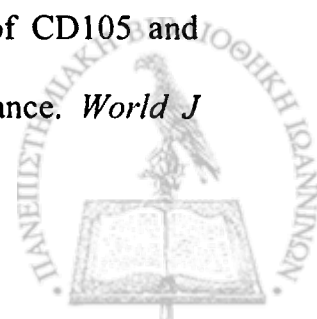
344. De Jong JS, Van Diest PJ, Van der Valk P, et al. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer.I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 1998; 184:44-52

345. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, et al. Tumour neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res*. Sep 1;10(17): 5815-19, 2004

346. Dales JP, Garcia S, Andrac L, et al. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol*. 24(5):1197-204, 2004.

347. Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34 and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non small cell lung cancer. *J. Clin. Path* 57:591-597, 2004

348. Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. *World J Gastroenterol*. 9(12):2866-9, 2003



349. Li C, Gardy R, Seon BK, et al. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer*. 88(9):1424-31, 2003.
350. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate*. 51(4):268-75, 2002.
351. Ho JW, Poon RT, Sun CK, et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol*. 11(2):176-81, 2005.
352. Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D. Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2006; 448(6):768-75.

