



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΛΙΝΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ**

**ΜΙΧΑΗΛ ΜΙΧΑΗΛ
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΙΑΤΡΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ

ΑΝΑΡΤΗΤΟ
Αθήνα, 11/11/2015
Αριθμός Πρωτοκόλλου: 10/81.2001
ΠΡΟΣΚΛΗΣΗ ΕΚΔΟΣΗΣ ΕΡΓΟΥ
Ο Υπουργός Παιδείας, Έρευνας και Θρησκευμάτων, έχοντας υπόψη το Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2, και έχοντας λάβει υπόψη τις προτάσεις της Επιτροπής Ερευνών, προκηρύσσει την παρούσα πρόσκληση για την εκπόνηση και έκδοση έργου με τίτλο:

ΕΡΓΟ: «ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΛΕΨΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ»

Ο ενδιαφερόμενος υποψήφιος πρέπει να είναι κάτοχος διδακτορικού τίτλου και να έχει υποβάλει πρόταση για την απόκτηση διδακτορικού τίτλου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πρόταση πρέπει να υποβληθεί στην Επιτροπή Ερευνών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέχρι την 15/11/2015.

Ο ενδιαφερόμενος υποψήφιος πρέπει να είναι κάτοχος διδακτορικού τίτλου και να έχει υποβάλει πρόταση για την απόκτηση διδακτορικού τίτλου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πρόταση πρέπει να υποβληθεί στην Επιτροπή Ερευνών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέχρι την 15/11/2015.

Ο ενδιαφερόμενος υποψήφιος πρέπει να είναι κάτοχος διδακτορικού τίτλου και να έχει υποβάλει πρόταση για την απόκτηση διδακτορικού τίτλου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πρόταση πρέπει να υποβληθεί στην Επιτροπή Ερευνών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέχρι την 15/11/2015.

Ο ενδιαφερόμενος υποψήφιος πρέπει να είναι κάτοχος διδακτορικού τίτλου και να έχει υποβάλει πρόταση για την απόκτηση διδακτορικού τίτλου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πρόταση πρέπει να υποβληθεί στην Επιτροπή Ερευνών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέχρι την 15/11/2015.

Ο ενδιαφερόμενος υποψήφιος πρέπει να είναι κάτοχος διδακτορικού τίτλου και να έχει υποβάλει πρόταση για την απόκτηση διδακτορικού τίτλου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πρόταση πρέπει να υποβληθεί στην Επιτροπή Ερευνών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέχρι την 15/11/2015.

«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 αιτήσεως: 12.12.2000

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 09. 01. 2001

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

Επιβλέπουσα

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Μέλη

Νίκη Ι. Αγκάντη: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Δημήτριος Στεφάνου: Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής.

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 25. 01. 2001

Διορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 567^α/29.11.2005

Μέλη

Νίκη Ι. Αγκάντη

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Στεφάνου

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νικόλαος Παυλίδης

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νικόλαος Σοφικίτης

Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννάκης Δημήτριος

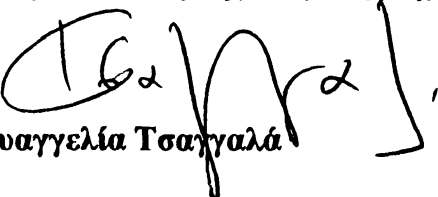
Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 14.12.2005

Βαθμός Διατριβής "Άριστα".

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής


Ευαγγελία Τσαγαλά



**Στη μνήμη
του Πατέρα μου**

**Στη μνήμη του ξαδέρφου μου,
Γιαννάκη Γερολέμου**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

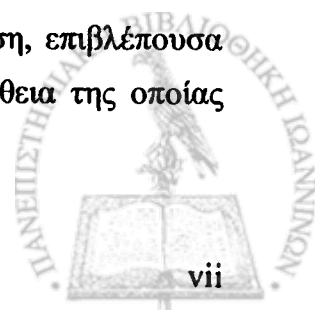
Όσον αφορά τον καρκίνο, δεν υπάρχει αμφισβήτηση, ότι η πρόληψη είναι πολυτιμότερη της θεραπείας. Παρόλα αυτά, ο καρκίνος πάντα θα υπάρχει σαν νόσος οπότε καλό είναι να βρούμε μια καλή θεραπεία! Πρόσφατα διάβασα κάτι που μου έκανε εντύπωση, ίσως γιατί πρώτη φορά το διάβασα ή πρώτη φορά συνειδητοποίησα αυτό που διάβασα. Όλοι μας ξέρουμε ότι τα λεμφώματα Hodgkin έχουν πολύ καλή πρόγνωση. Όμως η αλήθεια είναι λίγο διαφορετική. Τα λεμφώματα αυτά έχουν 5ετή επιβίωση 5 %, ενώ με θεραπεία αυτή ανέρχεται στα 75 % !. Νομίζω ότι οι αριθμοί μιλάνε μόνοι τους για την αξία της συγκεκριμένης θεραπείας.

Ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιοαγγειακές παθήσεις ενώ το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης είναι έβδομο σε συχνότητα στις Η.Π.Α. και ευθύνεται για το 3% των θανάτων από κακοήθεια.

Η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας, τα τελευταία χρόνια, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της γνώσης μας για τον καρκίνο με αποτέλεσμα να έχουμε καθημερινά νέα φάρμακα για την αντιμετώπισή του. Το κεφάλαιο της αγγειογένεσης, ειδικά της νεοπλασματικής, αποτελεί ένα συναρπαστικό πεδίο της σύγχρονης ιατρικής έρευνας που παρουσιάζει καλλάζουσα ανάπτυξη κατά τα τελευταία 10-15 χρόνια. Η διαπλοκή σύνθετων μηχανισμών, όπως η ογκογένεση, η αγγειογένεση, η απόπτωση, η μετάσταση κ.α, αλλά και οι ορατές διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές των νέων ερευνητικών δεδομένων, καθιστούν προφανή τη σημασία της μελέτης αυτής. Ο μηχανισμός φαίνεται σχετικά κατανοητός σε διάφορα πειραματόζωα, ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό και μάλιστα ο μηχανισμός της καρκινογένεσης φαίνεται να είναι εξαιρετικά πολύπλοκος. Δεν είναι καθόλου τυχαίο, παράγοντες όπου αρχικά θεωρήθηκαν επαγωγείς της αγγειογένεσης μεταγενέστερα θεωρήθηκαν καταστολείς, ενώ νεότερες γνώσεις που έρχονται στο φως μας δείχνουν τους παράγοντες αυτούς να έχουν έναν περισσότερο περίπλοκο τρόπο δράσης. Ελπίζω η έρευνα αυτή να αποτελέσει τουλάχιστο ένα λιθαράκι στη γνώση αυτού του οικοδομήματος που χτίζεται τις τελευταίες 4 δεκαετίες περίπου και λέγεται μηχανισμός αγγειογένεσης.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Βασιλική Μαλάμου Μήτση, επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, με τις υποδείξεις, τη στήριξη και τη βοήθεια της οποίας έφερα εις πέρας το έργο αυτό.



Την Καθηγήτη Παθολογικής Ανατομικής και Διευθνή του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κυρία Νίκη Αγνάντη που με στήριξε τόσο στην ειδικότητά μου όσο και στη διατριβή μου. Με τίμησε αφού με θεώρησε άξιο να φέρω εις πέρας τη διατριβή αυτή.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Αναπληρωτή Καθηγήτη Παθολογικής Ανατομικής κύριο Δημήτριο Στεφάνου ο οποίος από την πρώτη στιγμή μου υπέδειξε ότι η πόρτα του είναι ανοικτή για ότη βοήθεια χρειαστώ και δεν διαψεύστηκε ποτέ. Το γεγονός ότι ακολούθησα την ειδικότητα της Κυτταρολογίας με αποτέλεσμα να είμαι 7 χρόνια στο εργαστήριο αυτό πιστεύω ότι αποτελεί ένδειξη της επιρροής που έχω από τους καθηγητές μου αυτούς.

Να ευχαριστήσω επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής Καθηγήτη Παθολογίας-Ογκολογίας, κύριο Νικόλαο Παυλίδης, τον Καθηγήτη Ουρολογίας, κύριο Νικόλαο Σοφικίτης, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Μπάη Μαρία και τέλος τον Επίκουρο Καθηγήτη Ουρολογίας, κύριο Γιαννάκη Δημήτριο οι οποίοι με τιμούν με τον τρόπο αυτό.

Επίσης να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια Διευθνήτρια κυρία Έλλη Ιωακείμ με την οποία ξεκινήσαμε τη μελέτη του καρκίνου στην ουροδόχου κύστης από το 1999, όπου είχαμε μια εξαιρετική συνεργασία. Να αναφέρω επίσης ότι τα κλινικά στοιχεία της μελέτης αυτής προέρχονται από περιστατικά που παρακολουθεί ο Διευθνήτης της Ουρολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Χατζηκώνστα κύριος Νίκος Σταυρόπουλος. Δεν μπορώ να μην αναφέρω ότι σε ένα από τα πρώτα ραντεβού που είχα μαζί του, στο εξωτερικό Ιατρείο της Ουρολογικής Κλινικής μπήκα αμέσως μετά από έναν ασθενή και μου έκανε εντύπωση ότι συμπλήρωνε την πορεία του ασθενούς στον υπολογιστή που είχε μαζί του.

Να ευχαριστήσω την Διευθνήτρια του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του ίδιου Νοσοκομείου κυρία Στέλλα Στεφανάκη-Νίκου η οποία πρόθυμα μας παραχώρησε το υλικό για την μελέτη αυτή.

Τέλος ευχαριστίες οφείλω στο φίλο μου Νικόλαο Μοσχόπουλο ειδικευόμενο Γενικής Ιατρικής του Νοσοκομείου Άγιος Αντρέας Πάτρας, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε στην επιμέλεια του κειμένου και την μηχανογραφική υποστήριξη.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Εισαγωγή	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εμβρυολογία ουροδόχου κύστεως	3
2. Ανατομία-Ιστολογία ουροδόχου κύστεως	4
3. Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως	7
3.1. Συχνότητα	7
3.2. Προδιαθεσικοί παράγοντες	8
3.3. Κλινική συμπτωματολογία	9
3.4. Ιστολογική ταξινόμηση	10
3.5. Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης	11
3.6. Σταδιοποίηση των όγκων της ουροδόχου κύστεως	13
3.7. Προγνωστικοί παράγοντες	15
4. Αγγειογένεση	19
4.1. Ορισμός και παθογενετικοί μηχανισμοί αγγειογένεσης	19
4.2. Εκτίμηση του βαθμού αγγειογένεσης	21
4.3. Αγγειογενετικοί παράγοντες που μελετήθηκαν	24
4.3.α. Αγγειακός Ενδοθηλιακός αυξητικός Παράγοντας (VEGF)	26
4.3.β. Παράγοντας επάγων την υποξία 1 και 2 (HIF-1/HIF-2)	29
4.3.γ. Αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας/ Φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP)	31
4.3.δ. Θρομβοσπονδίνη-1 και -2 (TSP-1, TSP-2)	33
4.4. Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες	36
4.4.α. Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF)	36
4.4.β. Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs)	37
4.4.γ. Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου	39
4.4.δ. Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF/Scatter factor)	40
4.4.ε. Ιντεκρίνες	41
4.4.στ. Νιτρικά οξείδια (NO)	42
4.4.ζ. Αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την ινσουλίνη (IGF)	43
4.4.η. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)	43
4.4.θ. Αγγειοποιητίνη και υποδοχείς Tie	44
4.4.ι. Αγγειογενίνη	45
4.4.ια. Κυκλοοξυγενάση (COX)	45
4.4.ιβ. Midkine	46



4.4.ιγ.	eIF4E	46
4.4.ιδ.	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β)	46
4.4.ιε.	Ιντερλευκίνες	47
4.4.ιστ	Ιντερφερόνες	48
4.4.ιζ.	Ιστικοί καταστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs)	49
4.4.ιη.	Αγγειοστατίνη	49
4.4.ιθ.	Ενδοστατίνη	50
4.4.κ.	Σωματοστατίνη	50

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.	Σκοπός της μελέτης	55
2.	Υλικό και μέθοδος	56
2.1.	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου	61
2.2.	Στατιστική Ανάλυση	61
3.	Αποτελέσματα (έκφραση του αντιγόνου, ποιοτική εκτίμηση ποσοτική εκτίμηση και στατιστική ανάλυση)	62
3.1.α.	Η έκφραση του αντιγόνου CD34, εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης	62
3.1.β.	Η έκφραση του αντιγόνου VEGF	68
3.1.γ.	Η έκφραση του αντιγόνου HIF-1α	72
3.1.δ	Η έκφραση του αντιγόνου HIF-2α	75
3.1.ε.	Η έκφραση του αντιγόνου PD-ECGF/TP	80
3.1.ζ.	Η έκφραση του αντιγόνου Θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1)	87
3.1.στ.	Η έκφραση των αντιγόνων Ki-67 και PCNA	91
4.	Συζήτηση	95
5.	Συμπεράσματα	113
6.	Περίληψη	116
7.	Abstract	118
8.	Βιβλιογραφία	121



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αγγειογένεση αποτελεί θέμα μελέτης από το 1970 περίπου, για χιλιάδες ερευνητές. Πρώτη πολύ σημαντική παρατήρηση στην ιστορία της μελέτης της αγγειογένεσης έγινε από τον Folkman το 1971, ο οποίος πρώτος περιέγραψε ότι οι όγκοι όσο και οι μεταστάσεις πρέπει να αποκτήσουν τη δυνατότητα παροχής αίματος για να μεγαλώσουν πέραν του μεγέθους των 2-3 mm³. Ακολούθησαν χιλιάδες μελέτες τόσο σε φυσιολογικούς όσο και νεοπλασματικούς ιστούς ανθρώπων αλλά και σε πειραματόζωα. Οι μελέτες αυτές μας έδειξαν πόσο πολύπλοκος είναι ο μηχανισμός αυτός και ότι έχει σημαντικές διαφορές στους διάφορους οργανισμούς.

Το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης είναι ένα συχνό νεόπλασμα με κάποιες ιδιαιτερότητες, αφού μελέτες σε γενετικό επίπεδο μας δείχνουν ότι έχει δύο διαφορετικές οδούς (μεταλλάξεις) προέλευσης. Επίσης η ιδιαιτερότητά του, ότι είναι θηλώδες με ινοαγγειακούς άξονες, που δυσκολεύουν τη μελέτη και εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τους πλέον γνωστούς αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον παράγοντα επάγοντα την υποξία-1α και -2α (HIF-1α/HIF-2α), τον αιμοπεταλιακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα/ Φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP), και τη θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), όπου για την τελευταία μέχρι και σήμερα υπάρχουν αντιφατικές απόψεις για τη δράση της στο μηχανισμό αυτό. Η έκφραση των παραγόντων αυτών συσχετίστηκε με την αγγειακή πυκνότητα, την αυξητική δραστηριότητα του νεοπλάσματος καθώς επίσης και με γνωστές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των παραγόντων αυτών στο ουροθηλιακό καρκίνωμα του ανθρώπου σκοπό έχει να αποτελέσει τη βάση για νέες μελέτες δημιουργίας φαρμάκων που να μπορούν να καταστείλουν το μηχανισμό, αυτό αφού όπως φαίνεται ίσως αποτελεί την αχίλλειο πτέρνα για τον καρκίνο.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

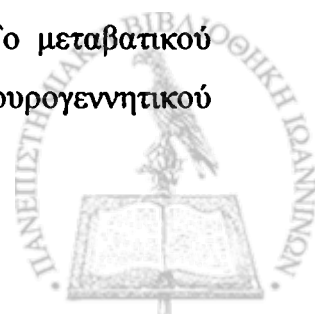
1. Εμβρυολογία ουροδόχου κύστεως

Η ουροδόχος κύστη προέρχεται από την αμάρα και τους μεσонеφρικούς πόρους. Η πρωτογενής αμάρα χωρίζεται με το ουρο-ορθικό διάφραγμα στον ουρογεννητικό σωλήνα και στο ορθό. Ο ουρογεννητικός σωλήνας βρίσκεται στο οπίσθιο τοίχωμα του εμβρυϊκού κοιλώματος, και χωρίζεται σε τρεις περιοχές [1].

- A) την κρανιακή ή κυστική
- B) την μέση ή πυελική
- Γ) την ουραία ή φαλλική

Η κρανιακή ή κυστική περιοχή του ουρογεννητικού σωλήνα έρχεται σε επαφή με τους μεσонеφρικούς πόρους και τον αλλαντοειδή υμένα, απ' τον οποίο θα σχηματιστεί η ουροδόχος κύστη. Από τη μέση ή πυελική περιοχή σχηματίζονται, στον μεν άνδρα, η προστατική μοίρα της ουρήθρας, το επιθήλιο, η υμενώδης μοίρα της ουρήθρας και οι βολβουρηθραίοι αδένες, στη δε γυναίκα, η υμενώδης μοίρα της ουρήθρας και τμήμα του κόλπου. Τέλος από το ουραίο τμήμα του ουρογεννητικού σωλήνα σχηματίζεται η σηραγγώδης μοίρα της ουρήθρας στον άνδρα και ο πρόδρομος του κολεού στη γυναίκα.

Έτσι το κυρίως τμήμα της ουροδόχου κύστεως σχηματίζεται από το κρανιακό άκρο του ουρογεννητικού σωλήνα το οποίο έρχεται σε επαφή με τον αλλαντοειδή υμένα. Μετά τη γέννηση ο αλλαντοειδής υμένας εκφυλίζεται σχηματίζοντας τον ουραχό και, τέλος, τον μέσο ομφαλοκυστικό σύνδεσμο, ο οποίος εκτείνεται από τον θόλο της ουροδόχου κύστεως έως τον ομφαλό [1]. Το κυστικό τρίγωνο σχηματίζεται από το σημείο επαφής του κρανιακού άκρου με τους μεσонеφρικούς πόρους. Καθώς η κύστη αναπτύσσεται και διογκώνεται, οι μεσонеφρικοί πόροι ενσωματώνονται στο τοίχωμα της κύστεως παρασύροντας μαζί και τους ουρητήρες. Περαιτέρω ανάπτυξη οδηγεί σε σχηματισμό των ουρητηρικών στομίων και τελικά οι ουρητήρες καταλήγουν στη βάση της κύστεως αμφοτερόπλευρα, ενώ οι μεσонеφρικοί πόροι ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την προστατική μοίρα της ουρήθρας και τους σπερματικούς πόρους στον άνδρα, ενώ στη γυναίκα εκφυλίζονται. Το μεταβατικό τύπου επιθήλιο της ουροδόχου κύστεως προέρχεται από το ενδόδερμα του ουρογεννητικού



σωλήνα, το χόριο και ο μυϊκός ιστός προέρχονται από το γειτονικό σπλαχνικό μεσέγγυμα [2], ενώ το κυστικό τρίγωνο αρχικά έχει μεσοδερμικής προέλευσης επιθήλιο λόγω του σχηματισμού του από τους μεσονεφρικούς πόρους και τους ουρητήρες και ακολούθως αντικαθίσταται ακολούθως από ενδοδερμικής προέλευσης επιθήλιο [1].

2. Ανατομία-Ιστολογία ουροδόχου κύστεως

Στον ενήλικο, η κενή περιεχομένου ουροδόχος κύστη καταλαμβάνει τον προσθιοπλάγιο χώρο της ελάσσονος πυέλου. Όταν είναι γεμάτη διογκώνεται για να φτάσει έως και το ύψος του ομφαλού. Κείται ελεύθερη εντός του ινολιπώδους ιστού της πυέλου σε όλη την περίμετρο της, πλην του αυχένα, ο οποίος στους άντρες καθηλώνεται από τον ηβοπροστατικό σύνδεσμο και στις γυναίκες από τον ηβοκυστικό [3,4]. Στη στήριξή της συμβάλλουν επίσης οι ομφαλοκυστικοί σύνδεσμοι (ο μέσος που αποτελεί υπόλειμμα του ουραχού, και οι δύο πλάγιοι, υπολείμματα των δυο ομφαλικών αρτηριών του εμβρύου) το περιτόναιο, η προκυστική περιτονία, το περικύστιο και τα αγγεία. Έτσι, ενώ ο αυχένας είναι σταθεροποιημένος, η υπόλοιπη κύστη έχει τη δυνατότητα να διογκώνεται και να παίρνει ωοειδές σχήμα όταν είναι γεμάτη.

Κενή περιεχομένου, η κύστη έχει σχήμα τετραεδρικής ανάστροφης πυραμίδας [3] με δύο προσθιοπλάγιες επιφάνειες, τη βάση (οπίσθια) και την άνω επιφάνεια. Μόνο η τελευταία επιφάνεια επενδύεται από περιτόναιο. Στην οπίσθια επιφάνεια, γνωστή και ως βάση της κύστεως, στους άντρες εντοπίζεται το ορθό, οι σπερματοδόχες κύστεις, καθώς και οι λήκυθοι των σπερματοδόχων πόρων, ενώ στις γυναίκες ο κόλπος και ο τράχηλος της μήτρας. Προς τα άνω, η ουροδόχος κύστη έρχεται σε επαφή με το σιγμοειδές κόλον στους άντρες, ενώ στις γυναίκες και με το σώμα της μήτρας. Οι δύο προσθιοπλάγιες επιφάνειες έρχονται σε επαφή με την περιτονία του ανεκκτήρα μυός του πρωκτού. Το πρόσθιο και ανώτερο σημείο της κύστεως είναι γνωστό ως κορυφή ή θόλος. Σ' αυτό το σημείο ενώνονται οι δύο προσθιοπλάγιες και η άνω επιφάνεια (εδώ εντοπίζονται τα καρκινώματα του ουραχού). Το τρίγωνο εντοπίζεται στη βάση της κύστεως έχει σχήμα τριγωνικό με την κορυφή να αντιστοιχεί στο έσω στόμιο της ουρήθρας και η βάση να αφορίζεται από την ενδοτοιχωματική πορεία των δυο ουρητήρων. Η ενδοτοιχωματική πορεία των ουρητήρων



προκαλεί μια υπέγερση του βλεννογόνου, το ουρητηρικό όγκωμα, στα δύο άκρα του οποίου αναγνωρίζουμε τα στόμια των ουρητήρων, τα οποία απέχουν μεταξύ τους περίπου 2,5 εκ. σε κενή κύστη και 5 εκ. σε γεμάτη. Ο μυϊκός χιτώνας της περιοχής αποτελείται από την επιμήκη μυϊκή στοιβάδα των ουρητήρων και τον εξωστήρα μυ της κύστεως, ενώ το ενδοκυστικό τμήμα των ουρητήρων περιβάλλεται από ινομυϊκό έλυτρο, το έλυτρο του Waldeyer. Το κατώτατο σημείο της κύστεως λέγεται αυχένος και είναι το σημείο όπου συγκλίνουν η οπίσθια και οι δύο προσθιοπλάγιες επιφάνειες. Στους άντρες το σημείο αυτό εξωτερικά συνορεύει με τον προστάτη αδένα που βρίσκεται ακριβώς από κάτω. Εδώ διαπλέκονται οι μύες του τριγώνου (έσω επιμήκης μυς του ουρητήρα και το έλυτρο του Waldeyer), ο εξωστήρας μυς της κύστεως και οι μύες της ουρήθρας, σχηματίζοντας τον έσω σφικτήρα στους άντρες (κυκλοτερής διάταξη των μυϊκών ινών). Στις γυναίκες οι μυϊκές ίνες έχουν επιμήκη φορά και έτσι δεν σχηματίζουν σφικτήρα.

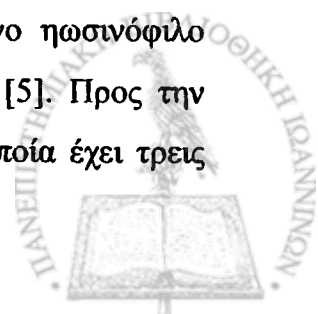
Τα αγγεία: Οι αρτηρίες της ουροδόχου κύστεως είναι δύο σε κάθε πλάγιο, η άνω κυστική (κλάδος της ομφαλικής) και η κάτω κυστική (κλάδος της έσω λαγόνιας) [3,6]. Οι κυστικές φλέβες εκβάλλουν στην έσω λαγόνια φλέβα.

Τα λεμφαγγεία εκβάλλουν στα πρόσθια και στα πλάγια κυστικά λεμφογάγγλια, μερικά δε στα έσω λαγόνια.

Νεύρωση: Το συμπαθητικό (κλάδοι των $\Theta_{11}-O_2$) νευρώνει τους μύς του τριγώνου και τον έσω σφικτήρα, αυξάνοντας τον τόνο των σφικτήρων και αναστέλλοντας τον τόνο του εξωστήρα, ενώ οι παρασυμπαθητικές ίνες I_2-I_4 δρούν αντίθετα.

Ιστολογία: Η ουροδόχος κύστη επενδύεται από μεταβατικού τύπου επιθήλιο. Σε κενή περιεχομένου κύστη ο βλεννογόνος σχηματίζει πτυχώσεις και τα κύτταρα είναι υποστρόγγυλα, με την ελεύθερη επιφάνειά τους σε σχήμα θόλου. Όταν η κύστη είναι πλήρης, οι πτυχώσεις εξαφανίζονται, τα δε κύτταρα αποπλατύνονται. Το επιθήλιο έχει πάχος 6-7 κύτταρων και χωρίζεται σε τρία επίπεδα: α) τα επιφανειακά κύτταρα, τα οποία έρχονται σε επαφή με το περιεχόμενο της κύστεως (ούρα), β) τα ενδιάμεσου τύπου κύτταρα, και γ) τα βασικά κύτταρα, τα οποία εδράζονται στη βασική μεμβράνη. Όταν η κύστη είναι διατεταμένη τότε το επιθήλιο έχει πάχος 2-3 αποπλατυσμένων κυττάρων.

Τα επιφανειακά κύτταρα, ή κύτταρα-ομπρέλα όπως αλλιώς λέγονται, είναι μεγάλα, συχνά ελλειπτικού σχήματος. Είναι δυνατόν να είναι διπύρρηνα, με άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, και πυρήνα που θυμίζει αναγεννητικού τύπου αλλοιώσεις [5]. Προς την πλευρά της κοιλότητας επενδύονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία έχει τρεις

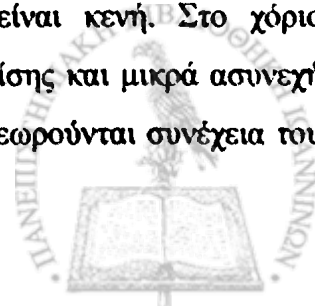


στοιβάδες, δύο πλούσιες σε ηλεκτρόνια και μία κεντρική στυλπή. Αυτή έχει ανομοιόμορφο πάχος, γι' αυτό λέγεται και ασύμμετρη μεμβράνη.

Τα ενδιάμεσου τύπου κύτταρα ή πυραμοειδή έχουν πάχος έως και πέντε στοίχους. Είναι μέτρια επιμηκυσμένα, με τον επιμήκη άξονα κάθετο στην βασική μεμβράνη κατά την ηρεμία, και παράλληλο όταν η κύστη είναι διατεταμένη. Έχουν ωσειδή πυρήνα με λεπτοκοκκιώδη χρωματίνη και υποσημαινόμενο πυρήνιο. Υπάρχουν σαφή κυτταροπλασματικά όρια. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσώματα.

Τέλος, στη βάση αναγνωρίζεται ένας στοίχος κυβικών έως αποπλατυσμένων κυττάρων, τα οποία είναι μικρά, με λίγο κυτταρόπλασμα, εδράζονται επί της βασικής μεμβράνης και απαρτίζουν τη **βασική στοιβάδα**. Το ουροθήλιο κατά θέσεις καταδύεται στο υποκείμενο χόριο για να σχηματίσει τους αδένες του Brunh οι οποίοι με την πάροδο του χρόνου χάνουν την συνέχεια τους με το υπερκείμενο επιθήλιο και διατείνονται κυστικά. Το επιθήλιο μπορεί να μεταπλασθεί προς πλακώδες (στην περιοχή του τριγώνου συχνότερα ή σε εκκολπώματα της κύστεως). Η πλακώδης μετάπλαση στις γυναίκες εντοπίζεται στην περιοχή του τριγώνου, έχει άφθονο γλυκογόνο, δεν κερατινοποιείται και μοιάζει με εξωτραχηλικό επιθήλιο. Οπουδήποτε αλλού, καθώς και στο ανδρικό φύλο, η πλακώδης μετάπλαση μπορεί να είναι κερατινοποιούμενου τύπου με έντονη παρακεράτωση ή με σχηματισμό κοκκιώδους στοιβάδας [6]. Άλλος τύπος μετάπλασης είναι η αδενικού τύπου, κατά την οποία αναγνωρίζονται υψηλά κυλινδρικά κύτταρα όπως στο λεπτό έντερο, καλυκοειδή, ή ακόμα και κύτταρα Paneth. Αυτός ο τύπος είναι συχνότερος σε αδενική κυστίτιδα, χρόνια φλεγμονή ή ερεθισμό, καθώς και σε εκτροπή της κύστεως. Το νεφρογενές αδένωμα είναι μεταπλαστική αλλοίωση από κυβικά η δίκην «παπουτσόπροκα» (hobnail) κύτταρα με διαυγές ή ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και μικρό πυρήνα, τα οποία σχηματίζουν θηλές ή σωλήνια. Τα σωλήνια καταδύονται στο χόριο, ενώ περιβάλλονται από υαλοειδοποιημένη βασική μεμβράνη [7].

Το χόριο βρίσκεται μεταξύ βασικής μεμβράνης και μυϊκού χιτώνα και αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό με πλούσιο αγγειακό δίκτυο, λεμφαγγεία, νευρικές απολήξεις και λίγες ελαστικές ίνες [8,9,10]. Μπορούμε να το διαιρέσουμε σε δύο επίπεδα: το επιτολής, το οποίο αποτελείται από πυκνό κολλαγόνο συνδετικό ιστό, και το εν τω βάθει, το οποίο αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό, κολλαγόνες και ελαστικές ίνες. Το εν τω βάθει είναι χαλαρό στοιχείο που βοηθά στον σχηματισμό πτυχών όταν η κύστη είναι κενή. Στο χόριο αναγνωρίζονται μέσου μεγέθους αρτηρίες και φλέβες. Υπάρχουν επίσης και μικρά ασυνεχή τμήματα λείων μυϊκών ινών, συχνά κοντά σε αγγεία, τα οποία δεν θεωρούνται συνέχεια του



μυϊκού χιτώνα [11,12], και σπάνια συνέχονται με αυτόν [12]. Ωστόσο, ενίοτε βρίσκονται σε συνέχεια μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια τυπική βλεννογόνια μυϊκή στοιβάδα. Αξίζει να επισημάνουμε τη σημαντικότητα και δυσκολία της αναγνώρισης αυτών στο βιοπτικό υλικό και της διαφορικής διάγνωσης τους από ίνες μυϊκού χιτώνα, καθώς και της διήθησης τους ή όχι από το νεόπλασμα. Στο χόριο δεν υπάρχουν αδένες, πλην της περιοχής γύρω από το έσω στόμιο της ουρήθρας όπου βρίσκουμε βλεννοεκκριτικούς αδένες.

Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από τρεις στοιβάδες λείων μυϊκών ινών, οι οποίες διαπλέκονται μεταξύ τους, πλην της περιοχής του αυχένα όπου ξεχωρίζουν σε τρεις στοίχους, έσω και έξω επιμήκη και ένα μέσο κυκλοτερή. Έτσι, σε εγκάρσια διατομή βλέπουμε δεμάτια μυϊκών ινών τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από μικρή ποσότητα ινώδους συνδετικού ιστού, ο οποίος περιέχει αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία και νεύρα. Σπάνια αναγνωρίζουμε παραγάγγλια. Για λόγους σταδιοποίησης χωρίζουμε τον μυϊκό χιτώνα σε επιπολής και εν τω βάθει (pT2 και pT3a). Η εκτίμηση του βάθους διήθησης γίνεται επί του συνολικού πάχους αυτού, επειδή λόγω της μορφολογίας του δεν υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα ανατομικά σημεία να μας βοηθούν. Τέλος, στην περιοχή του έσω στομίου της ουρήθρας, η μέση (κυκλοτερής) στοιβάδα, σχηματίζει τον έσω σφιγκτήρα.

Ο υπορογόσιος χιτώνας αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό, αποτελούμενο από κολλαγόνο, ενώ περιέχει και ελαστικές ίνες. Μόνο η άνω επιφάνεια της κύστεως επενδύεται από ορογόνο, ενώ η υπόλοιπη από ινολιπάδη ιστό.

3. Καρκίνος της ουροδόχου κύστεως

3.1 Συχνότητα

Στις Η.Π.Α. ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως αποτελεί το έβδομο σε συχνότητα κακόηθες νεόπλασμα του ανθρώπινου σώματος και ευθύνεται για το 3% των θανάτων από κακοήθεια [13,14]. Κατά το έτος 2003 αναμένονταν 57.000 νέα περιστατικά (42.000 άντρες και 15.000 γυναίκες), ποσοστό 28,5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό (23 άντρες και 5,5 γυναίκες). Επίσης αναμένονταν 12.500 θάνατοι από καρκίνο της ουροδόχου κύστεως (8.500 άντρες και 4.000 γυναίκες), ποσοστό 6 περιπτώσεις ανά 100.000 (4 άντρες και 2 γυναίκες).

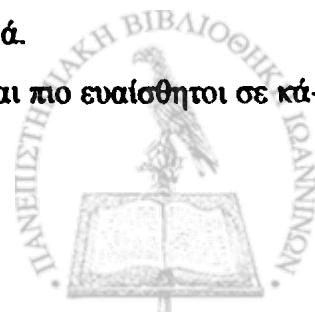
Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η επίπτωση της νόσου είναι λίγο μικρότερη: 21,5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό (18 άντρες και 3,5 γυναίκες). Η θνησιμότητα ανέρχεται στους 5 θανάτους ανά 100.000 (3,5 άντρες και 1,5 γυναίκες).



3.2 Προδιαθεσικοί παράγοντες

Ως παράγοντες κινδύνου για την νόσο, θεωρούνται:

- 1) **Το κάπνισμα:** Ενοχοποιούνται οι β-Ναφθυλαμίνες όπως και οι Νιτροζαμίνες. Αποτελεί τον πιο σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα και γίνεται πιο επικίνδυνο όταν συνδυάζεται με επαγγελματική έκθεση [15].
- 2) **Η επαγγελματική έκθεση:** Έχουν ενοχοποιηθεί οι αρωματικές αμίνες (εργοστάσια κατασκευής ή επεξεργασίας ελαστικών, δέρματος, υφασμάτων, χρωμάτων, αλουμινίου, τυπογραφεία, αναθυμιάσεις υγρών καυσίμων, κομμωτήρια, κ.α. [13,15,16]).
- 3) **Φυλή:** Οι λευκοί της Αμερικής έχουν διπλάσιο κίνδυνο σε σχέση με τους μαύρους.
- 4) **Ηλικία:** Ο κίνδυνος αυξάνει με την ηλικία, με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 65-70 έτη. Μόνο το 1% των κακοήθων νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως προσβάλλει ηλικίες κάτω των 40 ετών.
- 5) **Φύλο:** Είναι τέσσερις φορές συχνότερος στους άντρες παρά στις γυναίκες. Εδώ πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι οι άντρες είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό καπνιστές, καθώς επίσης και το ότι εκτίθενται σε επαγγελματικό κίνδυνο σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τις γυναίκες.
- 6) **Χρόνιες φλεγμονές της κύστεως:** Τόσο οι χρόνιες φλεγμονές, όσο ο χρόνιος ερεθισμός του βλεννογόνου (λίθοι, μακροχρόνια χρήση ουροκαθετήρα) έχουν ενοχοποιηθεί για το καρκίνωμα της κύστεως. Συνηθέστερο δε σε τέτοιες περιπτώσεις είναι το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. Από τα παράσιτα αναφέρονται το *Schistosoma hematobium* [14], το οποίο συναντάται συχνά στη Βόρειο Αφρική (Αίγυπτο).
- 7) **Ιστορικό καρκινώματος ουροδόχου κύστεως:** Συχνή είναι η εμφάνιση δεύτερου νεοπλασματος είτε στην κύστη είτε σε άλλη θέση, όπως στον ουρητήρα ή στην ουρήθρα.
- 8) **Συγγενείς ανωμαλίες της περιοχής:** Υπολείμματα του ουραχού ενοχοποιούνται για λιγότερο από το 0,5% των νεοπλασμάτων της κύστεως, και συγκεκριμένα για αδenoκαρκινώματα. Αποτελούν όμως το 1/3 των αδenoκαρκινωμάτων της περιοχής. Άλλη συγγενής ανωμαλία που αυξάνει τον κίνδυνο, λιγότερο συχνή όμως, είναι η εκτροφή της κύστεως.
- 9) **Διαιτητικοί παράγοντες:** Τροφές πλούσιες σε λιπαρά, έλλειψη βιταμίνης Α όπως και το χλωριωμένο νερό.
- 10) **Φάρμακα:** (κυκλοφωσφαμίδη, φαινακετίνη).
- 11) **Άλλα:** Μεταβολίτες της ουρίας, ορμόνες, καυσαέρια, αλκοόλ, κ.ά.
- 12) **Γενετικοί παράγοντες:** Ορισμένοι άνθρωποι πιστεύεται ότι είναι πιο ευαίσθητοι σε κάποιους από τους προαναφερθέντες παράγοντες.



3.3 Κλινική Συμπτωματολογία

Η κλινική συμπτωματολογία ποικίλει από περιοχή σε περιοχή [17]. Για παράδειγμα σε περιοχές όπου ενδημεί το Sch. Hematobium, ο συχνότερος ιστολογικός τύπος είναι το καρκίνωμα εκ πλακωδών επιθηλίων, το οποίο είναι επιθετικό νεόπλασμα διηθητικά αναπτυσσόμενο, έτσι κλινικά ο ασθενής έρχεται με αιματουρία και ιστορικό που ταιριάζει με χρόνια κυστίτιδα. Σ' αυτές τις περιοχές το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως ίσως αποτελεί το συχνότερο αίτιο θανάτου από όλες τις κακοήθειες. Στην Αμερική αποτελεί μόνο το 4 % έως 10 % τών κακοηθειών [18]. Σε νεαρές ηλικίες κάτω των 40 ετών είναι σπάνιο, λιγότερο του 1% και συνήθως είναι χαμηλού βαθμού κακοηθείας, μη διηθητικό, εκ μεταβατικού επιθηλίου [19] καρκίνωμα.

Η συμπτωματολογία είναι πιο έντονη στα χαμηλής διαφοροποίησης και διηθητικά νεοπλάσματα, όπως ανώδυνη μακροσκοπική αιματουρία ή και βαριά αιματουρία από διήθηση κάποιου αγγείου με ή χωρίς άλλα υποκειμενικά ενοχλήματα. Λόγω της μείωσης της χωρητικότητας της ουροδόχου κύστεως είτε γιατί το νεόπλασμα είναι εξωφυτικό και καταλαμβάνει κάποιο χώρο ή είτε γιατί έχει διηθητική ανάπτυξη οπότε το τοίχωμα της κύστεως χάνει την ελαστικότητα και διατασιμότητα του, αλλά και λόγω συνοδού κυστίτιδας που μπορεί να συνυπάρχει με το νεόπλασμα, μπορεί να προκαλούν δυσουρία ή καυσαλγία κατά την ούρηση, συχνουρία, νυκτουρία και επιτακτική ούρηση. Σε προχωρημένα διηθητικά νεοπλάσματα ίσως έχουμε συμπτωματολογία από απόφραξη των ουρητηρικών στομιών (πόνος κατά την οσφυϊκή χώρα λόγω υδρονέφρωσης) αλλά και λόγω διήθησης γειτονικών οργάνων, αγγείων, νεύρων και λεμφαγγείων.

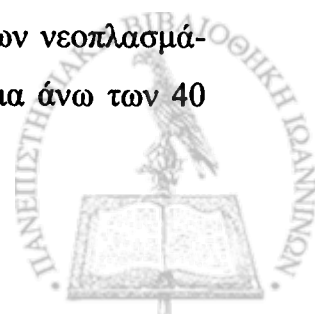
Γενική συμπτωματολογία όπως αδυναμία, αναιμία, ανορεξία και απώλεια βάρους παρατηρείται σε προχωρημένη νόσο.

Στα θηλώδη μη διηθητικά καρκινώματα συχνά έχουμε διαλείπουσα μακροσκοπική αιματουρία, δυσουρία ή και υπερηβικό πόνο [19].

Τα σαρκώματα συχνά ανιχνεύονται σαν ψηλαφητή υπερηβική μάζα [19].

Οι ασθενείς είναι δυνατόν να εμφανίζουν συμπτωματολογία για λίγους μήνες ή κάποια χρόνια μέχρι να επισκεφθούν κάποιο γιατρό [19], δεδομένου ότι ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοηθείας ουροθηλιακό νεόπλασμα μπορούν να ζήσουν μία σχεδόν φυσιολογική ζωή.

Δυσουρία ή και εικόνα κυστίτιδας αποτελούν τα πρώτα συμπτώματα των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως οπότε σε εμμένουσα συμπτωματολογία σε άτομα άνω των 40



ετών πρέπει να γίνεται διερεύνηση για αποκλεισμό νεοπλάσματος του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος.

3.4 Ιστολογική ταξινόμηση

Τα τελευταία χρόνια έχουν μεταβληθεί σημαντικά οι γνώσεις μας για τις αλλοιώσεις της ουροδόχου κύστεως, τόσο τις νεοπλασματικές όσο και τις μη νεοπλασματικές. Αυτό οδήγησε στη δημιουργία νέων ταξινομήσεων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Επιγραμματικά αναφέρουμε την Ash/Brodgers, την WHO '73 (World Health Organization) [23], του Bergkvist, του Murphy '94, την WHO/ISUP '98 (World Health Organization/ International Society of Urologic Pathologist) [21] τελευταία την WHO '99 [22] αλλά και αρκετές άλλες προτεινόμενες κατά καιρούς. Ως σημαντικότερες μπορούν να θεωρηθούν η ταξινόμηση του Murphy το 1994 [14] και της WHO/ISUP '98.

Η πιο πρόσφατη ιστολογική ταξινόμηση των αλλοιώσεων της ουροδόχου κύστεως είναι της WHO'99 η οποία έχει ως εξής [21,22].

	(Κωδικός)
1. Επιθηλιακοί όγκοι της ουροδόχου κύστεως	
1.1. Καλοήθεις όγκοι της ουροδόχου κύστεως	
1.1.α. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) θήλωμα	8121/0
1.1.β. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) θήλωμα, ανάστροφου τύπου	8121/0
1.1.γ. Θήλωμα εκ πλακωδών επιθηλίων	8052/0
1.1.δ. Λαχνωτό Αδένωμα	8261/0
1.2. Θηλώδες ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) νεόπλασμα χαμηλούκακόηθους δυναμικού	8130/1
1.3. Κακοήθειες	
1.3.1. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα	8120/3
1.3.1.α. Θηλώδες ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα (Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας I-II-III)	8130/3
1.3.1.β. Διθητικό ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα (Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας I-II-III)	8120/3
1.3.1.γ. Ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα in situ (ενδοεπιθηλιακό)	8120/2
1.3.1.δ. Ατυπία/ Δυσπλασία	4000
1.3.1.ε. Άλλοι τύποι ουροθηλιακών καρκινωμάτων	
1.3.2. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων	8070/3
1.3.2.1. Ακροχορδον καρκίνωμα	8051/3
1.3.3. Αδενοκαρκίνωμα	8140/3
1.3.4. Καρκίνωμα ουραχού	8010/3
1.3.5. Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα	8310/3
1.3.6. Μικροκυτταρικού τύπου καρκίνωμα	8041/3
1.3.7. Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	8020/3



2.	Μη επιθηλιακής προέλευσης όγκοι	
3.	Μεσεγχυματικής προέλευσης όγκοι	
3.1.	Παραγαγγλίωμα	8680/1
3.2.	Νεοπλάσματα αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού	
3.3.	Καρκινোসάρκωμα	8980/3
3.4.	Κακόηθες μελάνωμα	8720/3
4.	Μεταστατικοί όγκοι και διήθηση από νεοπλάσματα γειτονικών ιστών	
5.	Μη ταξινομούμενοι όγκοι	
6.	Ανωμαλίες επιθηλίου	
6.1.	Υπερπλασία	72000
6.1.1	Επίπεδη ουροθηλιακή (εκ μεταβατικού επιθηλίου) υπερπλασία	72000
6.1.2.	Θηλώδης ουροθηλιακή (εκ μεταβατικού επιθηλίου) υπερπλασία	72050
6.2.	Αντιδραστική ατυπία	
6.3.	Ατυπία ακαθόριστης σημαντικότητας	
6.4.	Αδένια von Brunn	76060
6.5.	Κυστική κυστίτιδα	73370
6.6.	Αδενικού τύπου μετάπλαση	73300
6.7.	Νεφρογενές αδένωμα	73380
6.8.	Πλακώδους τύπου μετάπλαση	73220
6.9.	Αλλοιώσεις επίδρασης θεραπείας	

3.5 Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης

Καρκίνωμα in situ (υψηλού βαθμού ενδοουροθηλιακή νεοπλασία)

Το καρκίνωμα in situ είναι μια επίπεδη αλλοίωση με κυτταρολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια των θηλωδών καρκινωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας. Χαρακτηρίζεται από κύτταρα με μεγάλους, βαθυχρωματικούς και ανώμαλους πυρήνες όπως και αυξημένο αριθμό πυρηνοκινησιών που εντοπίζονται σε όλο το πάχος της ενδοεπιθηλιακής ανάπτυξης. Η κλασσική μορφή του in situ Ca αφορά όλο το πάχος του ουροθηλίου αλλά μπορεί να εμφανιστεί με άλλες παραλλαγές όπως α) Παζετοειδής ανάπτυξη με παρουσία διάσπαρτων μεμονωμένων άτυπων κυττάρων, ή ομάδων κυττάρων σε φυσιολογικό ουροθήλιο, β) Εκτεταμένη απόπτωση του δυσπλαστικού ουροθηλίου με παραμονή λίγων άτυπων κυττάρων που υποδηλώνουν την παρουσία του καρκινώματος (clinging carcinoma in situ), γ) Παρουσία άτυπων κυττάρων μόνο στη βάση ή μόνο στις επιφανειακές στιβάδες του ουροθηλίου.

Θηλώδη νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού

Αποτελούν θηλώδεις αλλοιώσεις του ουροθηλίου με φυσιολογική διάταξη των νεοπλασματικών κυττάρων, μικρή ατυπία πυρήνων και ποικίλο πάχος ουροθηλίου. Παρουσιάζουν



μικρό αριθμό μιτώσεων οι οποίες, σε αντίθεση με το θηλώδες καρκίνωμα ιστολογικού βαθμού κακοήθειας I (grade I), εντοπίζονται μόνο στα κατώτερα στρώματα της αλλοίωσης. Αποτελούν το 25% περίπου των θηλωδών νεοπλασμάτων του ουροθηλίου, συχνά υποτροπιάζουν, ή εξελίσσονται σε καρκινώματα (10-20%), τα οποία σε ένα ποσοστό 5% θα οδηγήσει τελικά στο θάνατο [24].

Θηλώδες καρκίνωμα grade I

Τα grade I θηλώδη νεοπλάσματα του ουροθηλίου αποτελούν μια καλά δομημένη θηλώδη αλλοίωση του ουροθηλίου, η οποία ιστολογικά αναγνωρίζεται εύκολα και στη μικρή μεγέθυνση [21]. Σε αντίθεση με τα θηλώδη νεοπλάσματα χαμηλού κακοήθους δυναμικού, βρίσκουμε μεμονωμένα κύτταρα με πολυμορφία και βαθυχρωμία των πυρήνων καθώς επίσης έστω και λίγες μιτώσεις κυττάρων στα επιπολής τμήματα του ουροθηλίου. Τα grade I καρκινώματα υποτροπιάζουν συχνά, διηθούν το τοίχωμα, και σε ένα μικρό σχετικά ποσοστό 5% προκαλούν το θάνατο του ασθενή [24].

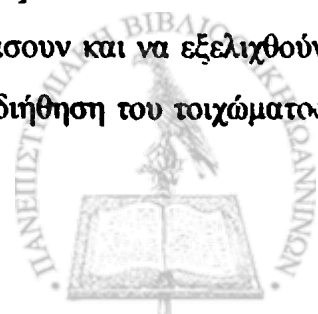
Θηλώδες καρκίνωμα grade II

Τα grade II θηλώδη νεοπλάσματα του ουροθηλίου παρουσιάζουν ενδιάμεση πυρηνική αναπλασία και δομική αναρχία κυττάρων. Ξεχωρίζουν από τα grade I καρκινώματα, λόγω της εκτεταμένης απώλειας της αρχιτεκτονικής δομής με διατήρηση ωστόσο μερικών στοιχείων οργάνωσης, όπως την πολικότητα και την ομοιομορφία των πυρήνων. Αντίθετα αυτά τα στοιχεία δεν αναγνωρίζονται στα grade III καρκινώματα [21].

Θηλώδες καρκίνωμα grade III

Τα grade III θηλώδη νεοπλάσματα του ουροθηλίου χαρακτηρίζονται από έντονη δομική αναρχία η οποία είναι εμφανής και στη μικρή μεγέθυνση. Αυτή προκύπτει τόσο από ανωμαλίες της αρχιτεκτονικής δομής όσο και της μορφολογίας των κυττάρων. Παρατηρείται τάση των νεοπλασματικών κυττάρων να συρρέουν μεταξύ τους χάνοντας τη διάχυτη και ομοιόμορφη κατανομή και την πολικότητα που παρουσιάζουν τα grade II καρκινώματα [21]. Κυτταρολογικά παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα κυτταρολογικού πολυμορφισμού με παρουσία στις ακραίες θέσεις του φάσματος έντονα αναπλαστικών κυττάρων [21].

Αυτά τα καρκινώματα έχουν μεγάλη πιθανότητα να υποτροπιάσουν και να εξελιχθούν 15-40% [21], ή να συνδυάζονται από την πρώτη τους εμφάνιση με διήθηση του τοιχώματος



της ουροδόχου κύστεως. Συχνά συνδυάζονται με *in situ* καρκίνωμα σε γειτονικές θέσεις του βλεννογόνου.

Διηθητικό ουροθηλιακό (εκ μεταβατικού επιθηλίου) καρκίνωμα (Grades I-II-III)

Όπως και τα θηλώδη καρκινώματα, τα διηθητικά καρκινώματα διαβαθμίζονται σε τρεις βαθμούς κακοήθειας (grade I έως III) σύμφωνα με το βαθμό της πυρηνικής τους αναπλασίας

3.6 Σταδιοποίηση των όγκων της ουροδόχου κύστεως

Η Σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως γίνεται με βάση το TNM σύστημα από την AJCC/UICC (American Joint Commission on Cancer /International Union Against Cancer) όπως αυτό προσδιορίστηκε το 1997 [25].

Παθολογοανατομική σταδιοποίηση με βάση το TNM σύστημα:

- Tx: Πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
- T0: Δεν υπάρχει κανένα στοιχείο για πρωτοπαθή όγκο
- Ta: Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα (*in situ*-θηλώδες)
- Tis: Ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (*in situ*-επίπεδος όγκος)
- T1: Ο όγκος διηθεί το χόριο*
- T2: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα
- T2a: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα, περιορίζεται στο έσω ήμισυ
- T2b: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα, διηθεί και το έξω ήμισυ
- T3: Ο όγκος διηθεί τον περικυστικό ινολιπώδη ιστό
- T3a: Ο όγκος διηθεί τον περικυστικό ινολιπώδη ιστό, μικροσκοπικά
- T3b: Ο όγκος διηθεί τον περικυστικό ινολιπώδη ιστό, μακροσκοπικά
- T4: Ο όγκος διηθεί κάποιο από τα ακόλουθα όργανα: προστάτη αδένα, μήτρα, κόλπο, πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα
- T4a: Ο όγκος διηθεί τον προστάτη αδένα, ή την μήτρα ή τον κόλπο
- T4b: Ο όγκος διηθεί το πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα

* Αρκετοί ερευνητές βρήκαν ότι ο διαχωρισμός του σταδίου pT1 σε pT1a, pT1b, pT1c, έχοντας ως σημείο αναφοράς τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα (pT1a: πάνω από την βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, pT1b επί της βλεννογόνιας μυϊκής και pT1c κάτω από την βλεννογόνια μυϊκή) έχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία [26,27]. Όχι σπάνια η δυνατότητα της εκτίμησης της διήθησης ή όχι της βλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας είναι δύσκολη ή και αδύνατη. Έτσι η επιτροπή ταξινόμησης της WHO/ISUP '98 θεώρησε την υποταξινόμηση αυτή ως προαιρετική [26].



Επιχώριοι λεμφαδένες

Nx: Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν

N0: Δεν υπάρχουν μεταστάσεις επιχώριων λεμφαδένων.

N1: Μετάσταση σε ένα λεμφαδένα, μικρότερο των 2 εκ.

N2: Μετάσταση σε ένα λεμφαδένα, μεγαλύτερο των 2 και μικρότερο των 5 εκ, ή πολλαπλές λεμφαδενικές μεταστάσεις μικρότερες των 5 εκ.

N3: Μετάσταση σε έναν ή περισσότερους λεμφαδένες μεγαλύτερους των 5 εκ.

Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Mx: Απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν.

M0: Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις.

M1: Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων.

Έτσι η σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως διαμορφώνεται ως εξής:

Πίνακας Α1

Στάδιο 0a	Ta	N0	M0
Στάδιο 0is	Tis	N0	M0
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο II	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
Στάδιο III	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
Στάδιο IV	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
	Any T	N1,2,3	M0
	Any T	Any N	M1



3.7 Προγνωστικοί παράγοντες

Τα στατιστικά δεδομένα, σήμερα υποδηλώνουν ότι το 80% των επιφανειακών, μη διηθητικά αναπτυσσόμενων καρκινωμάτων θα υποτροπιάσουν, ενώ το 25% αυτών θα είναι πιο επιθετικά (βαθμός διαφοροποίησης-στάδιο) κατά την υποτροπή [28]. Το 10% αυτών των καρκινωμάτων θα υποτροπιάσουν με διήθηση του μυϊκού χιτώνα [29]. Τα περισσότερα από τα T1 καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως είναι υψηλού βαθμού κακοηθείας και το 30-50% αυτών κατά την υποτροπή είναι πιο επιθετικά (βαθμός διαφοροποίησης) [30,31]. Τα περισσότερα από τα pTa καρκινώματα είναι χαμηλού βαθμού κακοηθείας, συχνά δε υποτροπιάζουν, αλλά μόνο το 5% αυτών υποτροπιάζουν με διηθητική ανάπτυξη [30]. Τα υψηλού βαθμού κακοηθείας pTa έχουν 10-15% μεγαλύτερο κίνδυνο για υποτροπή από ότι τα χαμηλού βαθμού, αλλά λιγότερο από ότι τα pT1 [32]. Το 50% περίπου των ασθενών που εμφανίζουν διήθηση του μυϊκού χιτώνα θα δώσουν και μεταστατική νόσο.

Το ιδανικό θα ήταν να μπορούσαμε με κάποιο τρόπο να προβλέψουμε όλα αυτά αλλά και άλλα πολλά, όπως π.χ. ποιοι ασθενείς θα ανταποκριθούν σε μια θεραπεία, ή ποιοι ασθενείς θα υποτροπιάσουν με ένα πιο επιθετικό νεόπλασμα έτσι ώστε να κάνουμε μια πιο ριζική και πιο αποτελεσματική θεραπεία σε κάθε περίπτωση, π.χ. κυστεκτομή κ.τ.λ.

Όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω είναι ιστοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες. Αυτοί είναι οι πρώτοι που μελετήθηκαν όπως έχει συμβεί και σε κάθε άλλο νεοπλασματικό ιστό. Να αναφέρω εδώ ότι η μελέτη αυτών και η συσχέτιση τους με την πρόγνωση οδήγησε σε τροποποιήσεις των ιστοπαθολογικών ταξινομήσεων. Για παράδειγμα κάποια από τα νεοπλάσματα του ουροθηλίου που παλιότερα περιλαμβάνονταν στον όρο «μαλθακά θηλώματα» και θεωρούνταν καλοήθεις αλλοιώσεις, βρέθηκε να έχουν διαφορετική, πιο επιθετική συμπεριφορά, οπότε στις επόμενες ταξινομήσεις είτε εντάχθηκαν στην κατηγορία του θηλώδους ουροθηλιακού νεοπλάσματος χαμηλού κακοήθους δυναμικού είτε και σαν ουροθηλιακά καρκινώματα βαθμού κακοηθείας I. Πέραν των ιστοπαθολογικών προγνωστικών παραγόντων με την ανάπτυξη διάφορων σύγχρονων τεχνικών όπως η ανοσοϊστοχημεία, αλλά και μοριακές τεχνικές όπως ο *in situ* υβριδισμός, η PCR και άλλες, μας οδήγησαν στην εκτίμηση διάφορων βιολογικών παραγόντων και συσχέτιση τους με την πρόγνωση. Έτσι υπάρχει μια πληθώρα μελετών πάνω σε αυτούς τους παράγοντες που όχι σπάνια τα αποτελέσματα έρχονται σε διαφωνία μεταξύ τους.



Πολύ σωστά οι Murphy και συνεργάτες [33] κατατάσσουν τους προγνωστικούς παράγοντες στις πιο κάτω ομάδες:

- 1^η: Προγνωστικοί παράγοντες αποδεκτοί από όλους, με επαρκή στοιχεία στη βιβλιογραφία.
- 2^η: Παράγοντες που είναι πιθανό να συσχετίζονται με το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως. Για τους παράγοντες αυτούς δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία στη βιβλιογραφία, ή υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις, όσον αφορά τη συσχέτισή τους με το εν λόγω καρκίνωμα.
- 3^η: Παράγοντες αμφιβόλου αξίας, λόγω ανεπαρκών στοιχείων συσχέτισης, ή λόγω αποκλεισμού τους από πολλές μελέτες.

1) **Στάδιο νόσου:** Έως σήμερα θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας. Τα προτεινόμενα κατά καιρούς συστήματα σταδιοποίησης στηρίζονται στη διαφορά πρόγνωσης που έχουν οι ασθενείς ανάλογα με το βάθος διήθησης [34-36].

2) **Διήθηση λεμφαδένων:** Αυτός ο παράγοντας εντάσσεται στη σταδιοποίηση και αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα [35,37-39].

3) **Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης:** Όπως και οι λεμφαδενικές μεταστάσεις, έτσι και ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης συνδέεται με το στάδιο της νόσου, αφού διήθηση του μυϊκού χιτώνα έχουμε πολύ συχνά στο grade III, ενώ το grade I σπάνια έχει διηθητική ανάπτυξη. Παρόλα αυτά θεωρείται ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας όπως αποδεικνύεται από πολλές μελέτες [30,37,40-42].

4) **Τύπος νεοπλασματος:** Είναι γνωστό ότι κάποιοι τύποι νεοπλασμάτων, π.χ. μικροκυτταρικού τύπου καρκίνωμα, αδenoκαρκίνωμα ή καρκινοσάρκωμα, έχουν χειρότερη πρόγνωση [43-45].

5) **Διήθηση του προστάτη αδένου:** Η διήθηση του προστάτη αδένου εντάσσεται στη σταδιοποίηση της νόσου. Μπορεί να γίνει είτε κατά συνέχεια ιστού είτε όχι, με πολύ πιο επιβαρημένη πρόγνωση στην πρώτη περίπτωση [46,47].

6) **Ηλικία Ασθενούς:** Τα νεοπλάσματα που εμφανίζονται τις πρώτες δύο δεκαετίες της ζωής συνήθως είναι καλής διαφοροποίησης, οπότε έχουν πολύ καλή πρόγνωση [48-50].

7) **Εντόπιση:** Τα νεοπλάσματα τα οποία εντοπίζονται στον αυχένα της ουροδόχου κύστεως έχουν χειρότερη πρόγνωση. Αυτά που εντοπίζονται στο θόλο της κύστεως είναι ανώτερης



διαφοροποίησης, σε αντίθεση με αυτά που εντοπίζονται στα πλάγια τοιχώματα της κύστεως [51].

8) **Εναπομείνασες υπολειμματικές αλλοιώσεις στην κύστη:** Η παρουσία πολυεστιακού νεοπλάσματος ή *in situ* καρκινώματος σε άλλη θέση, επιβαρύνουν την πρόγνωση του ασθενούς [52-55].

9) **Διήθηση αγγείων:** Παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων εντός αιμοφόρων αγγείων ή λεμφαγγείων, αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα [35,38,56].

10) **Θετική κυτταρολογική εξέταση ούρων μετά από θεραπεία:** Εάν μετά από χημειοθεραπεία γνωστού καρκινώματος κύστεως, έχουμε θετική κυτταρολογική εξέταση ούρων, έστω και εάν ενδοσκοπικά αυτό δεν επιβεβαιώνεται, αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου [57], ενώ αρνητική κυτταρολογική εξέταση μετά από χημειοθεραπεία αποτελεί καλό προγνωστικό παράγοντα [58].

11) **Πλοειδία του DNA:** Η αναγνώριση πλοειδίας του DNA με διάφορες τεχνικές που έχουμε στη διάθεση μας, π.χ. κυτταρομετρία ροής, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα [59-62].

12) **Μορφομετρικές ανωμαλίες** [63,64].

13) **Ο τύπος των ορίων του νεοπλάσματος:** Τα νεοπλάσματα που έχουν την τάση να ωθούν στο όριο τους το υγιές, και η συνύπαρξη λεμφαγγειακής αντίδρασης έχουν καλύτερη πρόγνωση [65].

Με την αύξηση της γνώσης μας σε επίπεδο μοριακής βιολογίας ανακαλύφθηκαν αρκετοί μοριακοί δείκτες οι οποίοι λιγότερο ή περισσότερο συσχετίζονται με την πρόγνωση του ουροθηλιακού καρκινώματος όπως:

14) **Αντιγόνα που συσχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων:** Οι δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 και PCNA βρέθηκαν να συσχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου [66,71].

15) **Γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (p53, Rb, p21, p27):** Η πυρηνική υπερέκφραση του γονιδίου αυτού συσχετίσθηκε με την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση [66-71]. Τα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστεως που εκφράζουν το γονίδιο Rb έχουν πιο επιθετική συμπεριφορά από τα άλλα, αλλά δεν είναι βέβαιο εάν αυτό αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα [72,73]. Η έκφραση των πρωτεϊνών p21^{WAF1/Cip1} και p27^{Kip1} συσχετίσθηκαν με το βαθμό διαφοροποίησης και την επιβίωση των ασθενών.



- 16) **Η αγγειογένεση όσο και η έκφραση πρωτεϊνών ρυθμιστών** (αναστολείς ή επαγωγείς) της αγγειογένεσης (FGF, EGF, VEGF, ιντερλευκίνη-8, ιντερφερόνες 1 και 2, θρομβοσπονδίνη-1, αγγειοτενσίνη κ.α.) έχουν συσχετιστεί με διάφορους προγνωστικούς παράγοντες. Με την υποτροπή της νόσου συσχετίστηκε ο παράγοντας VEGF ενώ αντίστροφη συσχέτιση είχε η TSP-1. Με την επιβίωση συσχετίστηκε ο παράγοντας VEGF, οι MMPs και η TSP-1. Με το στάδιο της νόσου ο VEGF, ο PD-ECGF, ο HIF-2α, ο Cox-2 και οι MMPs ενώ με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης ο HIF-2α, ο PD-ECGF και οι MMPs [66,74-81].
- 17) **Αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα** του νεοπλάσματος αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα [82-84]. Δείκτες όπως ο bcl-2, bax και σουρβιβίνη έχουν συσχετισθεί με την υποτροπή της νόσου ενώ ο Fas με την επιβίωση [68,85-88].
- 18) **Η έκφραση των αντιγόνων ομάδων αίματος ABO:** Βρέθηκε ότι τα ουροθηλιακά νεοπλάσματα εκφράζουν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος, στοιχείο που μειώνεται η εξαφανίζεται στα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης [28,90-92]. Η απώλεια έκφρασης αυτών συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση.
- 19) **Η έκφραση του αντιγόνου T138** (tumor associated antigen) συσχετίζεται με μετάσταση της νόσου [93].
- 20) **Τα ογκογονίδια c-H-ras, c-myc, c-erb-2, και mdm-2** συσχετίστηκαν με την επιβίωση, την υποτροπή, το βαθμό διαφοροποίησης και με μετάσταση της νόσου [94-102].
- 21) **Τα μόρια που σχετίζονται με την συνοχή των κυττάρων** (μόρια προσκόλλησης) όπως οι καδερίνες και οι ιντεκρίνες, το CD44 συσχετίστηκαν με την επιβίωση των ασθενών αλλά και με την μετάσταση της νόσου [103-106].
- 22) **Οι πρωτεάσες του εξωκυττάρου στρώματος** όπως λαμινίνη, καθεψίνη-D, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (UP-A). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του εξωκυττάρου στρώματος έχουν συσχετιστεί είτε με την επιβίωση είτε με την μετάσταση [107 -112].
- 23) **Άλλοι παράγοντες** όπως ο EGFR με την υποτροπή και την πρόγνωση [113,114].



4 Αγγειογένεση

4.1 Ορισμός και παθογενετικοί μηχανισμοί αγγειογένεσης

Όλοι οι πολυκυττάριοι οργανισμοί έχουν την ανάγκη ενός συστήματος που να δίνει τη δυνατότητα πρόσληψης οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών από τους ιστούς, και αποβολής διοξειδίου του άνθρακα και μεταβολικών προϊόντων. Τη δυνατότητα αυτή της ανταλλαγής αερίων και θρεπτικών ουσιών, την παρέχει στον οργανισμό το κυκλοφορικό σύστημα. Έχει διαπιστωθεί ότι όταν ένα κύτταρο απέχει πέραν των 100-200 μm από περιοχή όπου περνούν ερυθρά αιμοσφαίρια υποοξυγονώνεται. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα μεγάλα αγγεία σχηματίζονται de novo από το μεσέγγυμα, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως γένεση του αγγειακού συστήματος (vasculogenesis). Μετά από αυτό σχηματίζονται, διακλαδιζόμενοι μικρότεροι κλάδοι από τα υπάρχοντα αγγεία μέσω της αγγειογένεσης (angiogenesis), ενώ τα υπάρχοντα αγγεία ωριμάζουν και διακλαδίζονται μέσω της αγγειογενούς αναδιαμόρφωσης. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί ανάπτυξης των αγγείων. Αυτοί περιλαμβάνουν τη βλάστηση αγγείων και σχηματισμό γεφυρών (μηχανισμός εξαρτώμενος από την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων), καθώς επίσης και τον εγκολεασμό των νεοσχηματιζόμενων αγγείων στα αρχικά [115]. Μια πιο πρόσφατη θεωρία λέει ότι η πηγή των νέων αγγείων είναι αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα [116,117] τα οποία μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών [118] και εγκαθίστανται σε περιοχές ενεργούς αγγειογένεσης. Η θεωρία αυτή έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα μετά από ισχαιμία του μυοκαρδίου ή τραυματισμό [116]. Μια άλλη θεωρία, όχι και τόσο σαφής, είναι η «αγγειακή μίμηση». Σύμφωνα με αυτήν, τα αγγεία σχηματίζονται όχι από ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά από κύτταρα του όγκου, τα οποία οργανώνονται για να σχηματίσουν τελικά αυλό [119].

Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική διαδικασία κατά την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη του ενδομητρίου κατά τον εμμηνορρησιακό κύκλο όπως και κατά την επούλωση των ιστών μετά από τραυματισμό. Επίσης φαίνεται ότι εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και υποξία, π.χ. ψωρίαση, ενδομητρίωση, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ρευματοειδής αρθρίτιδα, ηπατίτιδα, άσθμα, και νεοπλασία [120]. Τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία στις προαναφερθείσες νόσους εμφανίζουν αρκετές διαφορές από τα ώριμα αγγεία [120]. Έτσι, σε αντίθεση με το φυσιολογικό αγγειακό δίκτυο, έχουμε ένα αποδιοργανωμένο και ανώμαλο δίκτυο με περιοχές υποξίας και οξέωσης του ιστού. Η ενδοθηλιακή μεμβράνη των αγγείων αυτών είναι πιο διαπερατή απ' ότι στα



κανονικά αγγεία. Επιπρόσθετα, οι μεσοκυττάρειες γέφυρες δεν είναι τόσο σφικτές, και η βασική μεμβράνη είναι ατελής, στοιχεία που βοηθούν την έξοδο από τα αγγεία εξωκυττάριου υλικού και μεταβολιτών [121]. Τα νεοσχηματισθέντα αγγεία εμφανίζουν διαφορές στους επιφανειακούς δείκτες και στα μόρια προσκόλλησης σε σχέση με τα ώριμα αγγεία, π.χ. τα αντιγόνα flt-1, KDR (το οποίο είναι υποδοχέας του VEGF), Tie-1, Tie-2 (τα όποια είναι υποδοχείς της αγγειοπουτίνης), $\alpha_v\beta_3$ -ιντεκρίνες, κ.ά. [122].

Κάτω από κανονικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία, διατηρώντας έναν μη-αγγειογενή φαινότυπο. Αυτό οφείλεται στη διατήρηση μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ πληθώρας παραγόντων που επάγουν ή καταστέλλουν την αγγειογένεση. Σε περίπτωση που αυξηθούν οι επαγωγείς της αγγειογένεσης, τότε αυξάνει η αγγειογένεση. Εκλυτικοί παράγοντες αυτής της παρέκκλισης της ισορροπίας μπορεί να είναι το μεταβολικό stress, η υποξία, η μεταβολική οξέωση, η υπογλυκαιμία, η μηχανική πίεση η οφειλόμενη στην αύξηση του ιστού, και τέλος η ενεργοποίηση των κυττάρων μετά από φλεγμονώδη ή ανοσολογικής αρχής ερεθισμό. Γενετικές μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν άμεσα την ισορροπία αγγειογενετικών παραγόντων. Μια σημαντική γνώση στην έρευνα του καρκίνου την αποκτήσαμε από τον Folkman [123] το 1971, ο οποίος περιέγραψε πρώτος ότι οι όγκοι όσο και οι μεταστάσεις πρέπει να αποκτήσουν τη δυνατότητα παροχής αίματος για να μεγαλώσουν πέραν του μεγέθους των 2-3 mm³. Αυτό επιβεβαιώθηκε το 1990 [124] όπου αποδείχτηκε ότι οι όγκοι δεν μπορούν να μεγαλώσουν πέραν των 2-3 mm³ σε ανάγγειες συνθήκες π.χ. κερατοειδής χιτώνας ή πρόσθιος θάλαμος του οφθαλμού. Όμως όταν το νεόπλασμα ή η μετάσταση αποκτήσει νεοαγγειογένεση τότε εμφανίζει ταχεία ανάπτυξη. Το 1996 ο Pezzella μαζί τους συνεργάτες του διαπίστωσε ότι νεοπλάσματα που αναπτύσσονται σε ιστούς με πλούσια αιμάτωση π.χ. πνεύμονας ή ήπαρ ίσως να μην έχουν την ανάγκη νέων αγγείων για να αναπτυχθούν. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα με κυψελιδικό πρότυπο ανάπτυξης, όπου τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται εντός των κυψελίδων αφήνοντας ανέπαφη την κυψελιδική μεμβράνη, δεν αναπτύσσουν δεσμοπλαστικό στρώμα ή νέα αγγεία αλλά τρέφονται από το υπάρχον, πλούσιο τριχοειδικό δίκτυο[125].



4.2 Εκτίμηση του βαθμού αγγειογένεσης

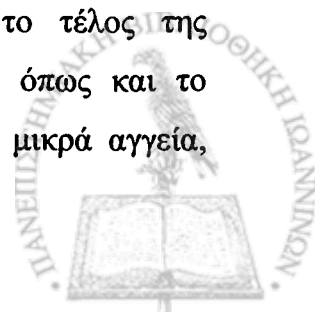
Ένα ιστολογικό μέτρο του βαθμού της αγγειογένεσης είναι η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD). Αυτή συνήθως εκτιμάται με έναν από τους δύο πιο κάτω τρόπους: α) Με τον μέσο όρο του αριθμού των αγγείων σε τυχαία επιλεγμένες περιοχές, ο οποίος καλείται **μέσος όρος αγγειακής πυκνότητας**, ή β) με τον μέσο όρο της πυκνότητας των αγγείων στις πλέον αγγειοβριθείς περιοχές, στις οποίες καθιερώθηκε ο όρος **“θερμές περιοχές”** (hot spots). Και οι δύο τρόποι, όπως έχει αποδειχθεί, έχουν και θετικά αλλά και αρνητικά στοιχεία, με πιο σημαντικό το σφάλμα δειγματοληψίας [126]. Οι διαφορές αποτελεσμάτων από διάφορους μελετητές έγιναν αιτία αμφισβήτησης των δύο τρόπων αξιολόγησης της αγγειακής πυκνότητας, με επικράτηση της εκτίμησης των **“θερμών περιοχών”** από τους πιο πολλούς.

Αρκετοί μελετητές έχουν ασχοληθεί με την εκτίμηση της ενδοογκικής αγγειακής πυκνότητας και κατά καιρούς προτάθηκαν διάφορες τεχνικές. Στην πραγματικότητα όμως υπάρχουν τρεις τρόποι εκτίμησης της αγγειακής πυκνότητας και πάρα πολλές παραλλαγές των δύο πρώτων τεχνικών, καθώς και εξελίξεις όσον αφορά την τρίτη που θα περιγράψουμε πιο κάτω, δηλαδή αυτή που γίνεται με την χρήση υπολογιστή.

Όλες οι τεχνικές έχουν μια κοινή διαδικασία που περιλαμβάνει [127]:

- 1) Επεξεργασία του ιστού: Κοινές τομές παραφίνης ή τομές κρουστάτη.
- 2) Ανοσοϊστοχημική χρώση: Παράγοντες VIII, CD31, CD105, CD34, CD36, PAL-E, UEA, BMA120-BW200, EN-4, TEC-11, E9, EN7/44, 4A11, H4/18 και FB5 [128-138].
- 3) Επιλογή του πεδίου εκτίμησης της αγγειογένεσης μικροσκοπικά, από τον παρατηρητή.
- 4) Καταμέτρηση των μικροαγγείων.
- 5) Στατιστική ανάλυση.

Όσον αφορά την επεξεργασία του ιστού (τομές παραφίνης ή κρουστάτη), εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το αντίσωμα που θα χρησιμοποιήσουμε για να αναδείξουμε τα αγγεία. Τα αντισώματα TEC-11 [135], E9 [137,138], EN7/44 [133,134,141], 4A11 [133,134], H4/18 [133,134] και FB5 [133,134] εκφράζονται από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις νεοπλάσματος ή φλεγμονής, με βασικό μειονέκτημα ότι απαιτούν τομές κρουστάτη. Τα υπόλοιπα αντισώματα εκφράζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων με ποικίλη ευαισθησία και ειδικότητα, τόσο σε τομές κρουστάτη όσο και παραφίνης. Ο παράγοντας VIII [133,134] χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον ως και το τέλος της προηγούμενης δεκαετίας. Έχει σχετικά μικρή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως και το αντίσωμα UEA [129]. Το CD36 [127,132-134] εκφράζεται έντονα από τα μικρά αγγεία,



ασθενώς από τα μεγάλα, αλλά και από τα μονοκύτταρα όπως και τα αιμοπετάλια. Το CD34 [139,130,131] εκφράζονται κυρίως από τα μικρά, και λιγότερο τα μεγάλα αγγεία, με βασικό μειονέκτημα έναντι του CD31 [128] ότι εκφράζεται και από τα λεμφαγγεία. Είναι πλέον αποδεκτό, με κριτήριο την ευαισθησία και την ειδικότητα, ότι καλύτερος ενδοθηλιακός δείκτης είναι το CD31 με δεύτερο καλύτερο το CD34, ενώ ακολουθούν ο παράγοντας VIII και το BW200 [132,134]. Παρότι στα νεοπλάσματα δεν έχουμε σχηματισμό λεμφαγγείων [140], εντούτοις τα προϋπάρχοντα φυσιολογικά λεμφαγγεία του ιστού μας αλλοιώνουν τα αποτελέσματα σε κάποιο βαθμό.

Το τρίτο σκέλος περιλαμβάνει την εκτίμηση του πεδίου. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από την τεχνική που θα χρησιμοποιήσουμε, από το αν θα γίνει από έναν ή περισσότερους παρατηρητές, εάν θα βρούμε τα «θερμά σημεία», ή εάν η τεχνική καταμέτρησης θα γίνει από υπολογιστή οπότε εμείς θα πρέπει να του δώσουμε τα όρια του νεοπλάσματος.

Η πρώτη τεχνική εκτίμησης της αγγειακής πυκνότητας αναπτύχθηκε από τον Chalkley το 1943 [141]. Σε αυτή τη μέθοδο αρχικά γίνεται σάρωση του υλικού σε μικρή μεγέθυνση (40x και 100x), έτσι ώστε να εντοπισθούν οι «θερμές περιοχές». Ακολουθώντας με μεγέθυνση (200-250x με οπτικό πεδίο 0,155 mm²) και με τοποθέτηση δικτυωτού πλέγματος στον προσοφθάλμιο φακό (με 25 κουκίδες τυχαία τοποθετημένες), πραγματοποιείται νέα σάρωση, έτσι ώστε όσο το δυνατόν περισσότερες κουκίδες να συμπίπτουν με αυλούς αγγείων. Αυτό επαναλαμβάνεται 3-5 φορές. Έτσι, αντί της μέτρησης αγγείων, γίνεται καταμέτρηση κουκίδων που συμπίπτουν με αγγεία. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από πολλούς ερευνητές σε καρκινώματα μαστού κυρίως.

Το 1991 ο Weidner μαζί με τους συνεργάτες του πρότειναν μία νέα τεχνική [142]: Αρχικά και εδώ σαρώνεται το υλικό με μικρή μεγέθυνση (40x και 100x) έτσι ώστε να εντοπισθούν οι «θερμές περιοχές». Ακολουθώντας, με μεγέθυνση 400x, που αντιστοιχεί σε 0,74 mm², εκτιμούμε ότι έχει χρωματισθεί, περιλαμβανομένων τόσο των μικροαγγείων, όσο και μεμονωμένων κυττάρων που δεν έρχονται σε επαφή με αγγεία, τα οποία στην πραγματικότητα είναι είτε μεμονωμένα ενδοθηλιακά, είτε νεοπλασματικά, ή και στρωματικά κύτταρα που απλώς εκφράζουν το αντίσωμα. Όλα αυτά εκτιμούνται σαν αγγεία, δηλαδή δεν είναι απαραίτητο να αναγνωρισθεί αυλός ή ενδοαυλικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Η εκτίμηση γινόταν από δυο ανεξάρτητους παρατηρητές και όπου υπήρχε μεγάλη διαφωνία (>25%) επαναλαμβανόταν από τρίτο. Η συγκεκριμένη τεχνική όταν προτάθηκε, πραγματοποιούνταν με τη χρήση του παράγοντα VIII.



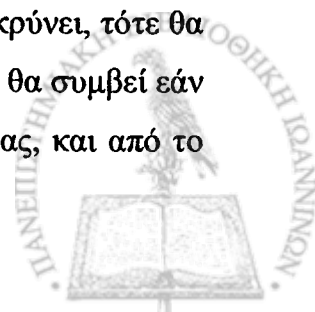
Τέλος, θα αναφερθούμε στην πολυπαραγοντική ανάλυση εικόνων μέσω υπολογιστή. Απαραίτητα εργαλεία για τη μέθοδο αυτή είναι το μικροσκόπιο, μια κάμερα που στέλνει την εικόνα στον υπολογιστή, αλλά και το κατάλληλο πρόγραμμα που εξελίσσεται συνεχώς για όσο το δυνατό πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Εδώ, το μόνο που έχει να κάνει ο παρατηρητής, είναι να θέσει τα όρια του νεοπλάσματος. Στη συνέχεια ο υπολογιστής θα χωρίσει το νεόπλασμα σε πολύ μικρά τετράγωνα διαστήματα, στα οποία γίνεται καταμέτρηση του αριθμού των αγγείων (έως κάποια διάμετρο που εμείς θέτουμε σαν όριο), του συνολικού εμβαδού του αυλού των αγγείων και της συνολικής περιμέτρου των αγγείων. Αφού γίνει αυτή η καταμέτρηση, ο υπολογιστής προσθέτει τις πληροφορίες από τα γειτονικά τετράγωνα, έως κάποιο εμβαδόν που εμείς θέτουμε στο πρόγραμμα, και, με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς, βρίσκει τα «θερμά σημεία».

Αυτές είναι οι βασικές μέθοδοι καταμέτρησης των αγγείων, οι οποίες τροποποιήθηκαν ή εξελίχθηκαν από πάρα πολλούς ερευνητές, με πιο μεγάλο όνομα στο χώρο τον Fox [143], ο οποίος συνδύασε την μέθοδο Chalkley με μια αυτοματοποίηση μέσω υπολογιστή. Ο Eberhard το 2000 πρότεινε μια νέα μέθοδο, στην οποία πραγματοποιείται διπλή χρώση, μία για να αναδείξει τα ενδοθηλιακά κύτταρα (με CD34) και μία που αναδεικνύει πόσα από αυτά βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού (με Ki67 ή PCNA). Έτσι, συνδύασε την αγγειακή πυκνότητα με δυο άλλες παραμέτρους που τις ονόμασε «δείκτη αγγειακού πολλαπλασιασμού» και «δείκτη πολλαπλασιασμού νεοπλασματικών ως προς ενδοθηλιακά κύτταρα» [144].

Γενικά πρέπει να αναφέρουμε ότι οι διάφορες μελέτες που έγιναν στα πλαίσια της σύγκρισης των διαφόρων μεθόδων μεταξύ τους, οδήγησαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1) Εάν μετρήσουμε πολλά «θερμά σημεία» για να βγάλουμε τον μέσο όρο, τότε αυτός είναι μικρότερος απ' ότι εάν μετρήσουμε λίγα. Δυο προβλήματα προκύπτουν: Πρώτον, κάποιες αλλοιώσεις είναι πολύ μικρές, π.χ. *in situ* καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως, οπότε πρέπει να τις αποκλείσουμε από την μελέτη και, δεύτερον, κάποια περιστατικά μπορεί να έχουν μόνο ένα ή δύο «θερμά σημεία» οπότε με την καταμέτρηση άλλων τριών θέσεων (ή επτά, όπως προτείνεται από κάποιους), αυτά, ενώ αρχικά είχαν μια ψηλή αγγειοβρίθεια τελικά να βρεθούν με μια πολύ χαμηλή τιμή. Δηλαδή κινδυνεύουμε να «παγώσουμε» τα «θερμά σημεία» [127]. Οι περισσότεροι μελετητές πάντως μετρούν 3-5 «θερμά σημεία».

2) Εάν το εμβαδόν του οπτικού πεδίου που μετράμε σαν «θερμό σημείο» μικρύνει, τότε θα αυξηθεί η αγγειακή πυκνότητα ανά mm^2 έως και δυο φορές [145]. Το αντίθετο θα συμβεί εάν το μεγαλώσουμε. Είναι προφανές ότι θα έχουμε αλλαγή στα αποτελέσματα μας, και από το



γεγονός ότι κάποια περιστατικά έχουν μόνο ένα ή δύο «θερμά σημεία» που καταλαμβάνουν πολύ μικρή έκταση, ενώ κάποια άλλα έχουν πολλά που καταλαμβάνουν μεγαλύτερη έκταση το κάθε ένα. Η προτεινόμενη έκταση από πολλούς συγγραφείς είναι μεταξύ 0,61-0,15 mm² που αντιστοιχεί σε μεγέθυνση 200x ή 400x [127].

3) Η ανεύρεση και καταμέτρηση των θερμών σημείων από ειδικευόμενο ή ειδικευμένο παθολογοανατόμο έχει πολύ καλή στατιστική συσχέτιση στο αποτέλεσμα, της τάξεως του $P < 0,0001$ [127].

4) Τις περισσότερες φορές τα «θερμά σημεία» εντοπίζονται στην περιφέρεια του καρκινώματος, εκεί δηλαδή που έρχεται σε επαφή με τον υγιή ιστό [127].

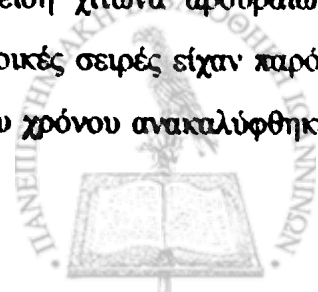
5) Περιοχές με φλεγμονώδη διήθηση εμφανίζουν εντόνως αυξημένη νεοαγγειογένεση και καλό είναι να αποφεύγουμε την εκτίμησή τους σαν «θερμά σημεία» [146].

Το καρκίνωμα του μαστού, και κατά δεύτερο λόγω του πνεύμονα, αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης, όσον αφορά την μικροαγγειακή πυκνότητα, από τους περισσότερους ερευνητές [147]. Η μελέτη των ουροθηλιακών καρκινωμάτων βρήκε ένα μεγάλο, αλλά όχι ανυπέρβλητο πρόβλημα, τους ινοαγγειακούς άξονες που παρατηρούνται στα χαμηλής κακοηθείας καρκινώματα του μεταβατικού επιθηλίου. Η πλούσια αγγείωση των θηλών σε αυτά, και η εξαφάνισή τους στα υψηλού βαθμού κακοηθείας, αποτέλεσε την αιτία για την οποία κάποιες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τον βαθμό διαφοροποίησης του καρκινώματος και της αγγειακής πυκνότητας [78]. Για τον προαναφερόμενο λόγο, άλλοι ερευνητές αναγκάστηκαν να εξειδικεύσουν την μελέτη τους, διακρίνοντας τα επιφανειακά [148] από τα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα [149].

Η αγγειακή πυκνότητα είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση του ασθενούς [74,78,146,149] και σε λιγότερες μελέτες με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης του ουροθηλιακού καρκινώματος [75].

4.3. Αγγειογενετικοί παράγοντες

Το 1980 οι Chodak και συνεργάτες παρατήρησαν ότι τα ούρα ασθενούς με καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως προκαλούσαν νεοαγγειογένεση στον κερατοειδή χιτώνα αρουραίων [150], και ότι τα δείγματα όγκων ουροδόχου κύστεως και οι κυτταρικές σειρές είχαν παρόμοια επίδραση στην ίριδα κουνελιών [151,152]. Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύφθηκε



ότι η αγγειογένεση εξαρτάται από δυο ομάδες ουσιών, εκ των οποίων οι μεν επάγουν, οι δε καταστέλλουν την αγγειογένεση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μια ισορροπία των δύο, η οποία διαταράσσεται κατά την καρκινογένεση. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρουμε τους εκλυτικούς και κατασταλτικούς παράγοντες της αγγειογένεσης:

Πίνακας Α2

Εκλυτικοί παράγοντες αγγειογένεσης
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), Παράγοντας επάγων την υποξία 1 και 2 (HIF-1/HIF-2), Αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας/ Φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP), Θρομβοσπονδίνη-1 και -2 (TSP-1, TSP-2), Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF), Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), Ενεργοποιητές του Πλασμινογόνου, Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF/ Scatter factor), Ιντεκρίνες, Νιτρικά οξείδια (NO ⁻), Αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την Ινσουλίνη (IGF), Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), Αγγειοποιητίνη και υποδοχείς Tie, Αγγειογενίνη, Κυκλοοξυγενάση (COX), Midkine, eIF4E, Pleitropin, Granulocyte colony-stimulating factor, Platelet activating factor, Προλιφερίνη, Substance P, Lactate, Erucamide, Fibrin Προσταγλανδίνες E1 και E2

Κατασταλτικοί παράγοντες αγγειογένεσης
Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β), Θρομβοσπονδίνη-1 και -2 (TSP-1, TSP-2), Ιντερλευκίνες, Ιντερφερόνες, Ιστικοί καταστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs), Αγγειοστατίνη, Ενδοστατίνη, Σωματοστατίνη, Κορτιζόνη



4.3.α. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), περιγράφηκε πρώτη φορά το 1983 από τον Senger σαν αυξητικός παράγοντας σε καρκίνωμα δέρματος γουρουνιού με το όνομα VPF. Το 1989 δύο ανεξάρτητοι ερευνητές, ο Ferrara και ο Leung, απομόνωσαν ένα επαγωγέα της αγγειογένεσης σε κύτταρα βλεννογόνων βοοειδών [153]. Αυτός ονομάστηκε VEGF, και εκ των υστέρων αποδείχτηκε να είναι ο ίδιος με τον VPF. Ο παράγοντας αυτός βρέθηκε να είναι σημαντικός στη διαδικασία της αγγειογένεσης, τόσο στο έμβρυο όσο και στον ενήλικα [154]. Το 1993 συσχετίστηκε με το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως [155]. Ο VEGF ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που έχουν αρκετά κοινή δομή, στην οποία ανήκουν και ο PlGF placenta growth factor (πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας), ο VEGF-B, ο VEGF-C, ο VEGF-D, και ο VEGF-E. Ο VEGF έχει πέντε υπότυπους, 121, 145, 165, 189 και 206 αμινοξέων, οι οποίοι προέρχονται από το ίδιο γονίδιο [156]. Για να δράσουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας VEGF πρέπει να συνδεθούν με τους μεμβρανικούς υποδοχείς Flt-1 (VEGFR-1) και Flk-1/KDR (VEGFR-2) ή τον Flt-4 (VEGFR-3). Οι υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2 αναγνωρίστηκαν στην επιφάνεια ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών (αρτηριακών) κυττάρων, ενώ ο VEGFR-3 σε ενδοθηλιακά κύτταρα λεμφαγγείων και άλλων κυττάρων. Βρέθηκε ότι ο PlGF και ο VEGF-B συνδέονται μόνο με τον υποδοχέα Flt-1 (VEGFR-1), ενώ οι VEGF-C και -D μόνο με τον υποδοχέα Flt-4 (VEGFR-3). Οι VEGF -C και -D φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και στη λεμφαγγειογένεση. Επαγωγείς του γονιδίου του VEGF είναι η υποξία, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, μεταλλάξεις, η μετάλλαξη του p53 γονιδίου, τα οιστρογόνα, η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, ογκογονίδια, τα νιτρικά οξειδία (NO⁻), κ.ά. Από τους πέντε υπότυπους του VEGF, οι VEGF₁₂₁ και VEGF₁₆₅ είναι οι πιο συνηθισμένοι, τόσο σε υγιείς, όσο και σε νεοπλασματικούς ιστούς. Ο VEGF₁₆₅ έχει μεγαλύτερο μήκος από τον VEGF₁₂₁ κατά 44 αμινοξέα. Με το επιπλέον αυτό τμήμα στο μόριό του έχει τη δυνατότητα να ενώνεται με την ηπαρίνη ή άλλα συγγενή στοιχεία του στρώματος, με την επιφάνεια του κυττάρου και την νευροπλίνη-1. Η σύνδεση του VEGF₁₆₅ με την νευροπλίνη-1 επάγει τον υποδοχέα Flk-1/KDR (VEGFR-2), κατά δέκα φορές [157]. Μεγαλύτερη σχέση με την ηπαρίνη έχουν οι VEGF₁₈₅ και VEGF₂₀₆, σε σχέση με τους άλλους τρεις [156]. Ο VEGF μπορεί να αυξήσει τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνοντας τη δραστηριότητα των κυστεοειδών και κενοτοποειδών οργανιδίων, τα οποία εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα μικρών αγγείων και διευκολύνουν τη μεταφορά μεταβολιτών μεταξύ της ενδοαυλικής και της εξωαυλικής κυτταροπλασματικής μεμβράνης [158]. Εναλλακτικοί τρόποι δράσης του VEGF στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων είναι μέσω της κινάσης MAP

(Ras/Raf/MAPK οδός) μέσω μιας αντίδρασης καταρράκτη, στην οποία συμμετέχει το σύμπλεγμα καδερίνης – κατενίνης. Σε αυτήν έχουμε διάσπαση των μεσοκυττάρων σημείων επαφής [159,160]. Πρόσφατα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι ο VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων, ενεργοποιώντας τις οδούς που εξαρτώνται από τις PI3K/Akt (PKB), eNOS και PLC/DAG/PKC. (Σχεδ. 1)

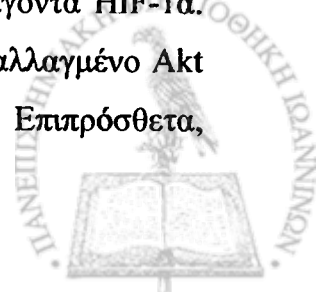
Η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων οδηγεί σε εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και σε σχηματισμό εξωκυττάριας ουσίας, η οποία ευνοεί τη μετανάστευση ενδοθηλιακών και στρώματικών κυττάρων.

Ο VEGF είναι ειδικός αυξητικός παράγοντας για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αφού ενωθεί με τους υποδοχείς VEGFR-1 και -2 προάγει τον σχηματισμό δεύτερου μηνύματος μέσω υδρόλυσης της ινοσιτόλης. Η ινοσιτόλη επάγει τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων παρουσία μορίων όπως η ηπαρίνη και καταλήγει στην ενεργοποίηση της MAP κινάσης, ενεργοποιώντας τελικά τον πολλαπλασιασμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα [161,162].

Ο VEGF επάγει ένα σύστημα πρωτεόλυσης, το οποίο συμμετέχει στη δόμηση στοιχείων της εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία είναι απαραίτητα για την αγγειογένεση. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι διεγείρει την παραγωγή ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) και ιστικού τύπου (tPA), τον καταστολέα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) [163,164], πρωτεολυτικά ένζυμα, τον ιστικό παράγοντα και την κολλαγονάση τύπου IV [156]. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου ενεργοποιούν το πλασμινογόνο μετατρέποντάς το σε πλασμίνη. Η πλασμίνη μπορεί να διασπάσει τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Στην προσπάθεια επανασχηματισμού της βασικής μεμβράνης, ο uPA ενώνεται με το uPAR. Η ένωση αυτή ενεργοποιεί πάλι τις MAP κινάσες [165], και έτσι ο uPA συντείνει στη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Επιπλέον, ο VEGF ασκεί αγγειογενετική δράση μέσω των $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, και $\alpha_v\beta_3$ ιντεκρινών, οι οποίες επάγουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αναδόμηση του στρώματος. Άλλο επίπεδο δράσης του VEGF είναι η καταστολή των p53, p21^{WAF1/Cip1}, p16, p27^{Kip1}, και της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax, επιτυγχάνοντας την παρατεταμένη δράση των οδών PI3k/Akt, p42/p44 MAP κινάσης, bcl-2, A1 και σουρβιβίνης [166-170] (σχέδιο 2).

Αναφέρεται ότι η p42/p44 MAP κινάση προάγει την έκφραση της VEGF ενεργοποιώντας την AP-2/Sp1 (activator protein-2) και αυτή με την σειρά της τον παράγοντα HIF-1α. Φαρμακολογική παρεμπόδιση της μεταγραφής του PI3K ή μεταγραφή με μεταλλαγμένο Akt καταργεί την αντιαποπτωτική δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπρόσθετα,



στην οδό του PI3K/Akt, η οδός του ras μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη δράση του VEGF. Δηλαδή η αρνητική επίδραση του H-rasV12 οδηγεί σε καταστολή ανάπτυξης του όγκου που χαρακτηρίζεται από μαζική απόπτωση των νεοπλασματικών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης η επαγωγή της απόπτωσης δεν επιτρέπει την έκφραση του VEGF. Έτσι, για να έχουμε έκφρασή του πρέπει να έχουμε άθικτο το γονίδιο ras [171]. Άλλα ογκογονίδια τα οποία επηρεάζουν την έκφραση του VEGF είναι το raf, fos, src, κ.ά. [156]. Επίσης ο VEGF μέσω του υποδοχέα KDR/Flt-1 (VEGFR-1) καταστέλλει την έκφραση της Akt – κινάσης, η οποία με τη σειρά της καταστέλλει την κινάση PI3 που μπλοκάρει την απόπτωση [172,173], επάγει την αύξηση του ενδοθηλίου [174], και αυξάνει την έκφραση του παράγοντα HIF. Ο παράγοντας HIF, με την σειρά του επάγει την έκφραση του VEGF [175]. Ο VEGF μέσω της ενεργοποίησης του Akt ενεργοποιεί την συνθετάση NOS. Η τελευταία επάγει το σχηματισμό νιτρικών οξειδίων (NO) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι οποίες προάγουν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [176,177]. Επίσης ο VEGF επάγει την αντιαπόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης MAPK/ERK αλλά και μέσω της καταστολής της stress activated protein kinase/ c-jun amino-terminal kinase (SAPK/JNK) οδού [178]. Αναφέρεται ακόμη, η ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt, όχι μόνο δρα κατά της απόπτωσης, αλλά επάγει και τη δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της NOS [179].

Η έκφραση του VEGF mRNA είναι μεγαλύτερη στις περιοχές με μεγάλη υποξία και, ως εκ τούτου, σε περιοχές νέκρωσης ενός όγκου. Αυτό οφείλεται κατά πρώτον στο ότι σε καταστάσεις υποξίας οι παράγοντες HIF-1α και HIF-2α μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με τον παράγοντα HIF-β επάγουν το VEGF γονίδιο [157], και, κατά δεύτερον στο ότι έχουμε ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt [175,180]. Προφανώς, σε ένα επιθετικό νεόπλασμα, όπου έχουμε αρκετές περιοχές υποξίας αλλά και νέκρωσης, έχουμε αύξηση των VEGF, bFGF, IL-8, TNF-α, TGF-β κ.ά. Όλα αυτά, μέσω διαφόρων μηχανισμών, απελευθερώνουν πρωτεΐνες του πλάσματος. Παράγεται ινική, προάγεται ο πολλαπλασιασμός του ενδοθηλίου, προάγεται η αγγειογένεση και η ινωδύλωση λόγω της συνεχούς αύξησης του όγκου και, τέλος, λόγω της κακής αιμάτωσης του όγκου, επάγεται η υποξία, με το σχηματισμό ενός φαύλου κύκλου (Σχεδ. 1). Ένας μέτα-μεταγραφικός παράγοντας του VEGF φαίνεται να είναι ο elf-4e, ο οποίος σε περίπτωση διηθητικής ανάπτυξης του νεοπλάσματος δεκαπενταπλασιάζεται, με αποτέλεσμα να αυξάνει η μεταγραφή του mRNA. Βρέθηκε ότι αυξημένη έκφραση αυτού του παράγοντα συσχετίζεται με κακή πρόγνωση [181]. Το ογκογονίδιο c-myc βρέθηκε ότι επάγει τον παράγοντα elf-4e [182]. Μια άλλη σημαντική



γνώση που έχει αποκτηθεί με την μελέτη του VEGF, είναι ότι αυτός εκφράζεται από τα λεμφοκύτταρα σε περιπτώσεις φλεγμονώδους διήθησης του καρκινώματος ουροδόχου κύστεως, εξηγώντας έτσι τη χειρότερη πρόγνωση που έχουν τα ουροθηλιακά καρκινώματα όταν αυτά εμφανίζουν φλεγμονώδη διήθηση [183]. Σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως η έκφραση του VEGF βρέθηκε να συσχετίζεται με την υποτροπή της νόσου, το στάδιο και την επιβίωση [184,185], ενώ σε αρκετές μελέτες που έχουν γίνει έως σήμερα δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την αγγειακή πυκνότητα [154]. Η μόνη συσχέτιση που βρέθηκε είναι μεταξύ του mRNA του VEGF και της MVD αλλά όχι της πρωτεΐνης [185].

4.3.β. Παράγοντας επάγων την υποξία 1 και 2 (HIF-1/HIF-2):

Κατά την ανάπτυξη του όγκου, λόγω αυξημένων απαιτήσεων του νεοπλασματικού ιστού σε οξυγόνο και θρεπτικά υλικά, αλλά και λόγω της κακής αιμάτωσης, αναπτύσσεται ένα περιβάλλον φτωχό σε οξυγόνο και γλυκόζη και με χαμηλό pH. Λόγω της υποξίας έχουμε μείωση της εξαρτώμενης οξυγενάσης 2- γλουταρόλης αλλά και ενεργοποίηση διαφόρων άλλων οδών που οδηγούν στην επαγωγή του παράγοντα του επάγοντος την υποξία (HIF). Ο παράγοντας αυτός βρέθηκε να έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αγγειογένεση, στην παραγωγή ερυθροποιητίνης, στην ενεργοποίηση της γλυκολυτικής οδού, στη σύνθεση κατεχολαμινών, στη ρύθμιση του pH και στο μεταβολισμό του σιδήρου [187,188]. Αλλά, και πέραν της ογκογόνου δράσεως έχει και αντιογκογόνο δράση μέσω άλλων οδών [188]. Έχουν απομονωθεί δύο υπότυποι του παράγοντα του επάγοντος την υποξία, ο HIF-α και ο HIF-β. Και οι δύο υπότυποι έχουν από τρία ισομερή: HIF-1α, HIF-2α και HIF-3α, και αντίστοιχα για τον HIF-β. Οι παράγοντες αυτοί ανήκουν σε μια μεγαλύτερη οικογένεια πρωτεϊνών, τις bHLH/PAS πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν σημαντικούς μηχανισμούς κατά την εμβρυογένεση αλλά και στην υπόλοιπη ζωή του οργανισμού [187]. Έχει διαπιστωθεί σε πειράματα με ποντίκια, ότι απώλεια του HIF-1α οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του VEGF, οδηγώντας το ποντίκι σε εμβρυϊκό θάνατο λόγω υποξίας [189]. Αναστολή του HIF-1 μέσω αποκλεισμού του HIF-1β οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη εμφυτεύματος καρκίνου όπως και της αγγειογένεσης αυτού, ή θάνατο του εμβρύου σε πειράματα με κύηση σε ποντίκια [190,191].

Ο HIF-2α έχει κατά 48% ομολογία με το HIF-1α. Παρ'ότι τον συναντούμε πιο συχνά στους ιστούς, εν τούτοις γνωρίζουμε λιγότερα για τον ρόλο του και το μηχανισμό δράσης του στην καρκινογένεση, απ' όσα γνωρίζουμε για τον HIF-1α [192].



Ο παράγοντας HIF-α φαίνεται να ρυθμίζεται από την συγκέντρωση οξυγόνου στα κύτταρα, εμπλέκοντας δύο μηχανισμούς, πρώτον με τα επίπεδα των πρωτεϊνών και δεύτερον με την μεταγραφή του γονιδίου. Εκτός από τον HIF-α που παράγεται κατά τη μεταγραφή του γονιδίου, παράγεται και άλλο μόριο το οποίο ασκεί αρνητική ρυθμιστική επίδραση στη μεταγραφή [193]. Ο ρυθμός αύξησης ή μείωσης του HIF-α κατά την αύξηση ή μείωση της οξυγόνωσης του ιστού αντίστοιχα, είναι δραματικός [194]. Ενδιάμεσο μόριο που ελέγχει τα επίπεδα οξυγόνου και ενημερώνει- συνδέεται με τον παράγοντα HIF-α είναι μία διοξυγενάση, η οποία συνδέεται τόσο με τον HIF-1α, όσο και με τον HIF-2α [195]. Πρόσφατα βρέθηκε και άλλο μόριο που κάνει την ίδια δουλειά με την διοξυγενάση. Πρόκειται για μια ασπαραγίνη, της οποίας η δράση, εκτός από τα επίπεδα οξυγόνου, επηρεάζεται και από τα επίπεδα σιδήρου [196].

Οι HIF-1α και HIF-2α, βρέθηκαν σε πολλές μελέτες να εκφράζονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος, ενώ ο HIF-2α εκφράζεται και από τα μακροφάγα κύτταρα [187]. Σε αρκετά νεοπλάσματα παρατηρείται υπερέκφραση του HIF-α σε περιοχές γύρω από νέκρωση, γεγονός που οφείλεται στην υποξία στην περιοχή. Σε άλλα νεοπλάσματα βρέθηκε να έχει ομοιογενή κατανομή π.χ. στο νεφρικό καρκίνωμα, στο οποίο η έκφραση του εν λόγω παράγοντα πιστεύεται ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου pVHL (von Hippel Lindau protein) [198]. Η έκφραση των παραγόντων αυτών συσχετίστηκε τόσο με τον παράγοντα VEGF όσο και με τον PDGF [174,175,199].

Ο HIF επάγεται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, αλλά και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες [200,201]. Η απώλεια του γονιδίου pVHL (το οποίο είναι ένα επικρατές γονίδιο), προκαλεί ένα αγγειακό σύνδρομο και οφείλεται στην παρατεταμένη δράση αυξητικών παραγόντων. Περιγράφηκε εδώ και 100 χρόνια και συσχετίστηκε με το αιμαγγειοβλάστωμα και με το καρκίνωμα του νεφρού [202]. Βρέθηκε ότι στο σύνδρομο αυτό, λόγω της απώλειας του γονιδίου, έχουμε σταθερά επίπεδα του παράγοντα HIF σε καταστάσεις υποξίας, δηλαδή η έκφραση του παράγοντα αυτού συσχετίζεται άμεσα με το εν λόγω γονίδιο [188]. Επίσης διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το PTEN και το p53 επηρεάζουν τον παράγοντα HIF. Το γονίδιο PTEN βρέθηκε ότι απενεργοποιείται σε διάφορα νεοπλάσματα όπως στο γλοιοβλάστωμα και στο καρκίνωμα του μαστού και του προστάτη [203]. Πιστεύεται ότι επιδρά στον παράγοντα HIF μέσω της οδού pI 3-AKT [204]. Το p53 δρα σε πολλά επίπεδα, οδηγώντας σε απόπτωση των κυττάρων και μείωση της έκφρασης του παράγοντα HIF. Απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου αυτού συχνά οδηγεί σε ογκογένεση [205]. Σε

καρκινώματα παχέος εντέρου με απώλεια έκφρασης του p53 γονιδίου, βρέθηκε συσχέτιση με την αυξημένη έκφραση του HIF παράγοντα, την αυξημένη αγγειογένεση αλλά και με αυξημένη έκφραση του παράγοντα VEGF [206]. Αρκετά ογκογόνα γονίδια συσχετίστηκαν με την οδό του HIF, για τα οποία πιστεύεται ότι δρουν μέσω της οδού p42/p44 MAP κινάσης [207]. Αυξητικοί παράγοντες που δρουν επαγωγικά στον παράγοντα HIF είναι η αγγειοτενσίνη II, ο EGF, η ινσουλίνη, ο αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την ινσουλίνη (IGF)1 και 2, ο PDGF, ο VEGF και η θρομβίνη [174,204,207]. Ο παράγοντας HIF μαζί με τους παράγοντες IGF-1 και 2 φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα φαύλο κύκλο, όπου ο IGF-1 επάγει τον HIF-1α αυτός τον IGF-2 που και αυτός με την σειρά του τον IGF-1 [207].

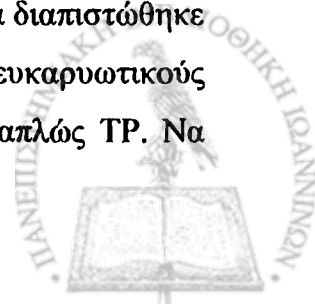
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο παράγοντας HIF-α επάγει τους υποδοχείς VEGF 1, 2 και tie. Επίσης προκαλεί επαγωγή της γλυκολυτικής και όχι της οξειδωτικής οδού μέσω επαγωγής αρκετών γονιδίων της οδού αυτής [208].

Σε in vitro μελέτες καρκινωμάτων ουροδόχου κύστεως βρέθηκε σε καταστάσεις υποξίας, αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνών HIF-1α και HIF-2α, όχι όμως και των αντίστοιχων mRNAs, γεγονός που θέτει τον προβληματισμό ότι η έκφραση του γονιδίου και η μεταγραφή του ακολουθούν διαφορετικές οδούς [209,210]. Η έκφραση των HIF-1α και HIF-2α συσχετίστηκε με έντονη αύξηση του VEGF [187,209].

Σε μερικές μελέτες η υπερέκφραση του παράγοντα HIF-2α σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο της νόσου, και με περιοχές νέκρωσης, ενώ είχε αντίστροφη συσχέτιση με την αγγειακή πυκνότητα [187,210].

4.3.γ. Αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας/ Φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP):

Η PD-ECGF/TP είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο το οποίο καταλύει την φωσφορυλίωση της θυμιδίνης (TdR) σε θυμίνη και σε 2- δεοξυριβόζη-1-φωσφατάση (2-dR-1-P) επάγοντας την αγγειογένεση [211]. Περιγράφηκε από τους Friedkin και συνεργάτες το 1954 [212], ενώ απομονώθηκε στα μέσα του 1970 από την E. Coli και τη σαλμονέλα [214]. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς ονομάστηκε αρχικά ECGF και στους ευκαρυωτικούς TP με το μόριο να έχει μήκος 45 και 47 kDa αντίστοιχα [215,216], ενώ αρκετά αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα δύο αυτά μόρια έκαναν την ίδια λειτουργία σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς με αποτέλεσμα να δοθεί ένα κοινό όνομα το PD-ECGF/TP ή απλώς TP. Να



σημειώσουμε ότι ο όρος αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας δεν πρέπει να συγχέεται με τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων.

Η PD-ECGF/TP έχει πρωτεύοντα ρόλο στον καταβολισμό των πυριμιδινών καταλύοντας, τόσο τη φωσφορυλίωση της θυμιδίνης, όσο και της δεοξουριδίνης και των αναλόγων της (εκτός της δεοξυκυτιδίνης) σε θυμίνη και 2-δεοξυριβόζη-1-φωσφατάση (2-dR-1-P) [217], η οποία, μετά από μια σειρά αντιδράσεων, εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό [218]. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της γλοίας και είναι ταυτόσημη με την γλοιιστατίνη [219]. Μέχρι και σήμερα, μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για το πώς δρα στην αγγειογένεση, και ποιο μόριο ακριβώς είναι αυτό που επάγει την αγγειογένεση. Αρχικά πιστεύονταν ότι ήταν η PD-ECGF/TP, ενώ πιο σύγχρονοι συγγραφείς κάνουν υποθέσεις για την 2-dR-1-P [220] ή για την 2dR (2-δεοξυριβόζη) που είναι ο επόμενος μεταβολίτης της 2-dR-1-P [221]. Υψηλά επίπεδα TP έχουν αναφερθεί σε καρκινώματα προστάτη, μαστού, ωοθήκης, εντέρου, στομάχου, ουροδόχου κύστεως, οισοφάγου και παγκρέατος [222-228] αλλά και σε άλλες καταστάσεις που συνοδεύονται με αγγειογένεση, δηλαδή χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η αθηροσκλήρυνση, όπου αυξάνουν τα αγγεία των αγγείων (vasa vasorum) [230-232]. Από το 1970 είναι γνωστό ότι η PD-ECGF/TP αυξάνει στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο [233].

Οι Brown και συνεργάτες [234] ανακάλυψαν ότι η αύξηση των επιπέδων της TP στο κύτταρο αυξάνει τα επίπεδα της ιντερλευκίνης (IL-8), του VEGF και των μεταλλοπρωτεϊνών της μεσοκυττάρου ουσίας (MMP-1). Η ιντερλευκίνη-8 είναι ένας ισχυρός χημειοτακτικός παράγοντας που προάγει τη διηθητική ανάπτυξη στο ουροθηλιακό καρκίνωμα [235]. Έχει βρεθεί ότι το mRNA της TP αυξάνει ιδιαίτερα σε διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, 33 φορές περισσότερο απ' ό,τι σε επιφανειακούς όγκους, και 260 φορές απ' ό,τι στο φυσιολογικό ουροθήλιο [227,229].

Επαγωγείς του γονιδίου της φωσφορυλάσης της θυμιδίνης είναι η κινάση της πρωτεΐνης A, η οποία επάγεται από το cAMP αλλά και από την κινάση της πρωτεΐνης C (PKC) [236,237]. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνωσης όπως και το χαμηλό pH βρέθηκε να επάγουν την έκφραση της PD-ECGF/TP [245], όπως επίσης και οι κυτοκίνες (ιντερλευκίνη-1, ιντερφερόνη-α και -γ) [239] και ο παράγοντας TNF α. Η ιντερφερόνη-α (κυτοκίνη) παρότι προκαλεί αύξηση κατά 5 φορές των επιπέδων της PD-ECGF/TP, εντούτοις προκαλεί οκταπλασιασμό της δραστηριότητας του ενζύμου αυτού, οπότε εκτός από την δράση που έχει στο γονίδιο της



PD-ECGF/TP, φαίνεται να δρα και στο ίδιο το mRNA [240]. Σε καρκίνωμα μαστού βρέθηκε ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης της PD-ECGF/TP με τον παράγοντα VEGF [241].

Καταστολείς της PD-ECGF/TP είναι ο ειδικός καταστολέας της φωσφορυλάσης της θυμιδίνης (TPI) [242], η 6-αμινο-5-χλωροουρακίλη [243], η 5-φλουοροουρακίλη, τα οποία είναι ομόλογα των νουκλεϊνικών οξέων και χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία [244].

Σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της αύξησης της PD-ECGF/TP με το φυσιολογικό ουροθήλιο [245], με το ιστολογικό βαθμό κακοηθείας [227,245-247], με το στάδιο [245-248], όπως και με την υποτροπή της νόσου [227,246]. Κατά άλλους συνδέεται με την αγγειακή πυκνότητα [228], κατά άλλους όμως όχι [247,248]. -

Σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο, η PD-ECGF/TP εκφράζεται από κάποιους μη νεοπλασματικούς ιστούς όπως κύτταρα γλοίας, κάποια επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του στρώματος, αλλά και από τα μακροφάγα κύτταρα που συνοδεύουν το νεόπλασμα. Αυξημένη έκφραση παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων, ενίοτε δε και στον πυρήνα [221,246,249].

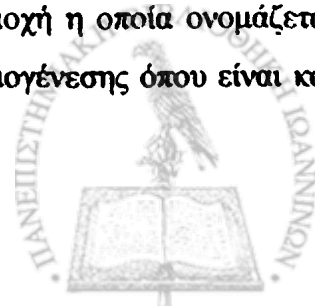
4.3.δ. Θρομβοσπονδίνη-1 και -2 (TSP-1, TSP-2):

Οι θρομβοσπονδίνες ανήκουν σε μία οικογένεια εξωκυττάρων γλυκοπρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κύτταρο-κυτταρική και κύτταρο-στρωματική επικοινωνία. Σ' αυτή την οικογένεια αναγνωρίστηκαν 5 πρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικά γονίδια. Αυτές εκφράζονται είτε κατά την εμβρυϊκή είτε κατά την ενήλικη ζωή, ενώ κάθε ιστός εκφράζει τουλάχιστον μία από αυτές. Η TSP-1 περιγράφηκε πρώτη το 1971, αποτελεί κύριο συστατικό των αιμοπεταλίων του αίματος ενώ ανιχνεύτηκε επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, στους ινοβλάστες, στις λείες μυϊκές ίνες, στα κερατινοκύτταρα, στα μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα [250]. Φαίνεται να δρα στην επιφάνεια των κυττάρων φέρνοντας σε επαφή μεμβρανικές πρωτεΐνες και κυτοκίνες που ρυθμίζουν εξωκυττάρια μεσεγγυματικές δομές όπως και τον φαινότυπο των κυττάρων. Μέσω αυτών φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική συνοχή, τη μεταφορά και τη μεταγραφή μηνυμάτων. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες είναι οι ιντεκρίνες α3β1, ανβ3 και αIIbβ3 [251], η CD47, η CD36, οι πρωτεογλυκάνες, ο TGF-β, και ο PDGF [252]. Σε πειράματα με κύτταρα μολυσμένα με τον ιό HPV-16, τα επίπεδα της TSP-1 επηρεάστηκαν από τα επίπεδα των πρωτεϊνών VEGF και FGF-2 [253], ενώ σε άλλα πειράματα τα



αποτελέσματα περί συσχέτισης του TSP-2 με τον παράγοντα VEGF είναι αντιφατικά [254,255]. Οι θρομβοσπονδίνες ανάλογα με τη μοριακή τους δομή φαίνεται να χωρίζονται σε TSP -1, -2, -3, -4 και -5. Η θρομβοσπονδίνη-1 αποτελείται από επαναλαμβανόμενα τμήματα αμινικών ή καρβοξυλικών ομάδων τα οποία χωρίζονται σε τρεις τύπους: τον τύπο 1, τον τύπο 2 και τύπο 3. Ο τύπος -1 παρατηρείται σε διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Σε ένα συγκεκριμένο σημείο αυτού ενώνεται το CD36 [256]. Παρόμοια δομή έχει και η TSP-2 [257]. Βρέθηκε ότι τόσο η TSP-1 όσο και η TSP-2 παίζουν κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση με την ένωσή τους με τον παράγοντα TGFβ, ενώ η TSP-2 παίζει επιπλέον σημαντικό ρόλο στη δόμηση των κολλαγόνων ινών του δέρματος [258]. Η TSP-1 συσχετίστηκε επίσης με τις ιντεκρίνες α3β1, ανβ3 και αΠβ3 [251] όπως και με άλλα μόρια [259].

Παρότι οι TSP-1 και -2 εκφράζονται κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών οργανισμών, σε πειράματα με μεταλλαγμένα ποντίκια με ομόζυγο απώλεια των αντίστοιχων γονιδίων δεν εμφανίσθηκαν σημαντικές ανωμαλίες. Παρατηρήθηκε πνευμονία τις πρώτες 4-10 εβδομάδες της ζωής με παρόμοια ιστολογική εικόνα όπως και σε περίπτωση απώλειας έκφρασης της TGFβ [260]. Σε άλλο πείραμα με απώλεια έκφρασης του γονιδίου TSP-2 σε ποντίκια, αναγνωρίστηκαν διαταραχές του συνδετικού ιστού, διαταραχές της σχέσης μεταξύ των ινοβλαστών, αύξημένη παραγωγή οστίτη ιστού στον αυλό των μακρών οστών, διαταραχές της αγγειογένεσης, αύξηση της αγγειακής πυκνότητας σε διάφορους ιστούς και αιμορραγική διάθεση [258]. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι τόσο η TSP-1 όσο και η TSP-2 καταστέλλουν την αγγειογένεση [258,260-263] σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Υπερέκφραση των TSP-1, -2 από κύτταρα που εμφυτεύτηκαν σε νεοπλάσματα σε ποντίκια, προκάλεσε αναστολή τόσο της αγγειογένεσης όσο και της αύξησης του μεγέθους του νεοπλάσματος [255,264-266]. Συσχέτιση έγινε με τη μείωση του αριθμού των μεγάλων αγγείων [265], με το στρώμα που περιβάλλει τον όγκο [264], αλλά και με την πλήρη εξαφάνιση του επιδερμοειδούς ανθρώπινου καρκινώματος από κύτταρα A431 [255]. Σε κάποιους ιστούς, όπως τον κερατοειδή χιτώνα, η TSP-1 καταστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό την αγγειογένεση και τη μετανάστευση κυττάρων απ' ό,τι η TSP-2 [267], ενώ από άλλους ερευνητές θεωρείται ότι εκτός από την αγγειοκατασταλτική δράση έχει και αγγειογενετική, μέσω άλλων οδών [268]. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ο τύπος 1 των επαναλαμβανόμενων τμημάτων των μορίων των TSP-1 και -2, και ειδικότερα μια περιοχή η οποία ονομάζεται TSR, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της αγγειογένεσης όπου είναι και το σημείο που ενώνεται η πρωτεΐνη CD36 [262].



Άλλες έρευνες έδειξαν ότι η TSP-1 και ο TGFβ ενώνονται σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα που ενώνεται με την μεμβράνη των μακροφάγων κυττάρων μέσω του CD36 [269] αλλά και με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών μέσω του ίδιου παράγοντα [251]. Επίσης βρέθηκε ότι η TSP-1 δεν είναι ο κύριος ενεργοποιητής του TGFβ [270] και ότι χρειάζονται 500 μόρια TSP-1 για κάθε μόριο TGFβ [271].

Η TSP-1 έχει μια άλλη περιοχή στο μόριο της που δεν φαίνεται να υπάρχει στο μόριο της TSP-2. Στην περιοχή αυτή ενώνεται με το CD47 και έχει αντιαγγειογόνο δράση [263]. Η αγγειογενετική δράση της TSP-1 φαίνεται να γίνεται μέσω της ρυθμιστικής δράσης που έχει σε πρωτεολυτικά ένζυμα του εξωκυττάρου στρώματος. Αυτά με τη βοήθεια και των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) προκαλούν αποδόμηση του εξωκυττάρου στρώματος πυροδοτώντας τόσο αγγειογενετικούς μηχανισμούς αλλά και την διηθητική ανάπτυξη από το νεόπλασμα. Η μεταλλοπρωτεϊνάση που αυξάνει από την επίδραση της TSP-1 είναι η MMP-9, ενώ οι MMP-1 και -3 δεν φαίνεται να επηρεάζονται [272]. Συχνό εύρημα σε καρκινώματα είναι η μετάλλαξη του κατασταλτικού γονιδίου p53 (wild type). Η μετάλλαξη αυτή συνδέεται με ταυτόχρονη μείωση της TSP-1, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα FGF2 και επαγωγή της αγγειογένεσης, ενώ η TSP-2 παραμένει αμετάβλητη [273]. Άλλα ογκογονίδια που συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της TSP-1 είναι το ras, το v-src, το v-myc και το c-jun [251].

Άλλο επίπεδο δράσης της TSP-1 είναι η μείωση της μεταναστευτικότητας των κυττάρων και η επαγωγή της απόπτωσης [274]. Η TSP-1 προκαλεί φωσφορυλίωση της PI3-K, και αυτή της FAK πρωτεΐνης, μηχανισμός που επηρεάζεται από καταστολείς των κινασών ERK1/2 και από το p38MAPK, και οδηγεί στην αύξηση της μεταναστευτικότητας των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Σε άλλες μελέτες βρέθηκε διφασική δράση από την TSP-1 στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου σε χαμηλά επίπεδα TSP-1 αυξάνει η μεταναστευτικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, άρα και η αγγειογένεση, ενώ σε υψηλά επίπεδα TSP-1 αναστέλλεται η μεταναστευτικότητα των ενδοθηλιακών με αποτέλεσμα αναστολή της αγγειογένεσης [275]. Μέσω του CD36 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων η TSP-1 φαίνεται να προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης p59^{fun}, της κασπάσης 3 και του p38MAPK προκαλώντας απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (σχεδιάγραμμα 3) [274]. Παράγοντες που καταστέλλουν το p38MAPK και την κασπάση 3 προκαλούν αναστολή της απόπτωσης της επαγόμενης από την TSP-1. Η κασπάση 3 μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση του p38MAPK, μηχανισμός που μας κάνει να



υποθέτουμε ότι η κασπάση 3 λειτουργεί τόσο σαν επαγωγέας όσο και σαν καταστολέας της p38MAPK μέσω διαφορετικών οδών [274].

Σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο σε νεοπλασματικούς ιστούς η TSP-1 εκφράζεται από το στρώμα, ενώ είναι ασθενής ή χάνεται η έκφρασή της από τα νεοπλασματικά κύτταρα [251]. Ειδικότερα, σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως ανιχνεύτηκε έκφραση της TSP-1 σε περιαγγειακές περιοχές, στο σημείο επαφής επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων, στο στρώμα όπως και στα νεοπλασματικά κύτταρα [276].

Στον ορό η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε αυξημένη κατά δύο έως και τρεις φορές στο πλάσμα καρκινοπαθών ασθενών [277].

Σε καρκινώματα ουροδόχου κύστεως, μείωση της έκφρασης της TSP-1 είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την p53 μετάλλαξη, με συχνότερη υποτροπή της νόσου, αύξηση της αγγειακής πυκνότητας, όπως και με μείωση του μέσου χρόνου επιβίωσης [79].

4.4. Άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες

4.4.α. Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF).

Η μελέτη του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα ξεκίνησε από τον Chodak [278] το 1986, και μαζί με τον aFGF, με τον οποίο είναι κατά 55% ομόλογοι, αλλά και άλλους 20 και πλέον παράγοντες, εντάσσονται στην κατηγορία των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων [156,279]. Έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης, που περιλαμβάνει ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, και τη διαφοροποίηση διαφόρων τύπων κυττάρων μεσοδερμικής και εξωδερμικής προέλευσης, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα νεφρού, επινεφριδίων, υπόφυσης, ΚΝΣ, επινεφριδίων, θύμου κ.ά. [280].

Παρότι ενώνονται με τους ίδιους κυτταρικούς υποδοχείς, ο bFGF έχει τριάντα έως εκατό φορές πιο ισχυρή βιολογική δράση από τον aFGF, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να παρουσιάζει μικρό επιστημονικό ενδιαφέρον σε αντίθεση με τον bFGF [281]. Έχουν περιγραφεί πέντε ισομερή του bFGF 18, 22, 22.5, 24 και 34 KD, τα οποία προέρχονται από το ίδιο γονίδιο [282]. Υπάρχουν 4 τύποι υποδοχέων στα κύτταρα για τον bFGF, οι FGFR -1 έως -4, που αναγνωρίστηκαν στην κυτταρική μεμβράνη διαφόρων κυττάρων [283]. Κατά τους Pardo και συνεργάτες, ο bFGF επάγει την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-XL και bcl-2, μέσω της οδού της MEK/ERK [284] (Σχεδ. 2). Ο bFGF προκαλεί τόσο την αύξηση της έκφρασης του VEGF mRNA στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων, όσο και την αύξηση των

υποδοχέων VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επάγει επίσης τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και την κολλαγονάση που καταστρέφει τη βασική μεμβράνη [156]. Ο bFGF προκαλεί απελευθέρωση των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (MMP) με αποτέλεσμα αποδόμηση και αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας, επάγοντας έτσι τη μεταναστευτικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων [286] (σχήμα 2). Η ένωση του bFGF με τους υποδοχείς του οδηγεί, μέσω της ενεργοποίησής της κινάσης της τυροσίνης, σε μια αντίδραση-καταρράκτη, με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ενδιάμεσοι ρυθμιστές στη δράση του bFGF είναι διάφορα ένζυμα όπως η ηπαρίναση, η πλασμίνη, η καθεψίνη D και η ουροκινάση [287].

Οι υποδοχείς FGFR1 και FGFR2 σχετίζονται με την αγγειογένεση, ενώ ο FGFR3 με την ανάπτυξη του σκελετού. Ένωση και ενεργοποίηση του bFGF με τον υποδοχέα FGFR1 μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, στους οποίους όπως φαίνεται σημαντικό ρόλο παίζει η ηπαρίνη [288]. Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγεται από τον bFGF, ο οποίος παράγεται από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα [285] και δρα στις μεσοκυττάριας γέφυρες μειώνοντας τις δυνάμεις προσκόλλησης μεταξύ αυτών.

Αύξηση του bFGF παρατηρήθηκε τόσο σε καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως, (4-10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στο φυσιολογικό ουροθήλιο), όσο και σε άλλες κακοήθειες, αλλά και στην υπερπλασία του προστάτη [289-292].

4.4.β. Μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs):

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ αυτών και στην αγγειογένεση. Έως σήμερα έχουν απομονωθεί 20 ένζυμα αυτής της οικογένειας τα οποία χωρίζονται σε 4 ομάδες:

- τις διάμεσες κολλαγονάσες (MMP-1, -8 και -13) που διασπούν το διάμεσο κολλαγόνο (τύπου I, II, III, VII και X),
- τις ζελατινάσες (MMP-2 και -9) που και αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση του κολλαγόνου και της λαμινίνης,
- τις στρωμελυσίνες (MMP-3, -7, -10, -11 και -12) που διασπούν τόσο τους περισσότερους τύπους κολλαγόνου όσο την ινονεκτίνη, τη λαμινίνη, την ελαστίνη, τη ζελατίνη, την ινική αλλά και ένα τμήμα του μορίου των πρωτεογλυκανών,

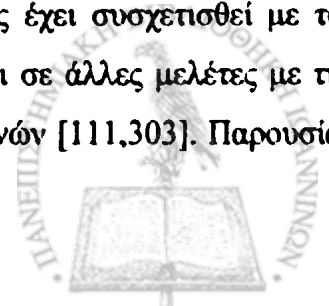


• και τις έξι μεμβρανικές μεταλλοπρωτεΐνάσες MT1-MMP έως και MT6-MMP, οι οποίες διασπών κάποιους τύπους κολλαγόνου, την ινονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη, τη ζελατίνη και τις πρωτεογλυκάνες [293,294]. Ο μεγάλος αριθμός τους, οι πολλαπλοί μηχανισμοί που εμπλέκονται, η πολυπλοκότητα των μηχανισμών αυτών, αλλά και η αλληλεπίδραση αυτών μας κάνουν να γνωρίζουμε ελάχιστα πράγματα για αυτές. Κατά την ανάπτυξη των αγγείων παρατηρείται παραγωγή διαφόρων πρωτεολυτικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μεταξύ των οποίων και μεταλλοπρωτεϊνάσων, ικανών να προκαλέσουν πρωτεόλυση κάποιων ουσιών του εξωκυττάριου στρώματος. Η αποδόμηση του εξωκυττάριου στρώματος βοηθά στην αύξηση της μεταναστευτικότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων επι πλέον επάγει την απελευθέρωση διαφόρων αγγειογενετικών ουσιών από αυτό [295]. Ο μηχανισμός παραγωγής, η μεταγραφή του γονιδίου, η έκκριση και ενεργοποίηση του μορίου των MMPs ρυθμίζεται από πολύπλοκους μηχανισμούς. Φαίνεται ότι παράγονται από λίγους τύπους κυττάρων τα οποία τις παράγουν και τις απελευθερώνουν ταχέως στο εξωκυττάριο στρώμα, ενώ τα φλεγμονώδη κύτταρα έχουν αρκετά αποθέματα αυτών των μορίων στο κυτταρόπλασμά τους. Επαγωγή αυτών προκαλούν τόσο επαγωγικές ουσίες του νεοπλάσματος όσο και αγγειογενετικές ουσίες όπως ο bFGF, ο VEGF, η πλασμίνη, ο PDECGF/TP, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) και το ιστικού τύπου πλασμινογόνο, αλλά και προϊόντα ογκογονιδίων [234,286,296-298]. Η έκφραση των MMPs επάγεται από το p38MAPK [299]. Αντίθετα οι TIMPs (TIMP-1,-2,-3,-4) έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τις MMPs [300]. Άλλο ένα αποδεικτικό στοιχείο για τη λεπτή ισορροπία του μηχανισμού της αγγειογένεσης είναι ότι κατά την εμβρυογένεση έχουμε ταυτόχρονη παραγωγή MMPs και TIMPs.

Όμως, εκτός από την επαγωγή της αγγειογένεσης, πιστεύεται ότι οι MMP-3, -7, -9, -12 επάγουν την έκκριση αγγειοστατίνης από το πλασμινογόνο [301], μηχανισμός που καταστέλλει την αγγειογένεση.

Η MMP-2 βρέθηκε ότι απενεργοποιείται αφού ενωθεί με την θρομβοσπονδίνη-2 και μία λιποπρωτεΐνη σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο [302]. Αν και έχει μια άμεση δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η κύρια δράση της φαίνεται να είναι η επαγωγή άλλων αγγειογενετικών παραγόντων.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως αφορούν την MMP-2 και την MMP-9. Η έκφρασή τους έχει συσχετισθεί με το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης της νόσου [111,303,304] και σε άλλες μελέτες με τη διηθητική ανάπτυξη του νεοπλάσματος και την επιβίωση των ασθενών [111,303]. Παρουσία

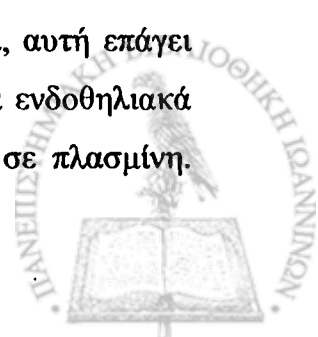


της MMP-9 στα ούρα παρατηρείται σε ουροθηλιακό καρκίνωμα [111], ενώ παρουσία της MMP-1 στα ούρα συσχετίστηκε με το στάδιο και το βαθμό διαφοροποίησης [305].

4.4.γ. Ενεργοποιητές του Πλασμινογόνου:

Το σύστημα των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου περιλαμβάνει τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) και ιστικού τύπου (tPA), τους καταστολείς τους (PAI -1 και -2), τους μεμβρανικούς υποδοχείς αυτών (uPAR), και τέλος το πλασμινογόνο (Plg) το οποίο ενεργοποιείται σε πλασμίνη (Plm) [306]. Το ενζυμικό αυτό σύστημα μπορεί να αποδομήσει ουσιαστικά του εξωκυττάριου στρώματος ή να ενεργοποιήσει διάφορους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, αγγειογένεση, φλεγμονή, αύξηση του όγκου αλλά και σε άλλους μηχανισμούς, όπως η διηθητική ανάπτυξη ή μετάσταση της νόσου [307,308]. Από όλο το σύνολο των πρωτεολυτικών μορίων φαίνεται ότι αυτό είναι το πιο σημαντικό, επειδή ενεργοποιεί το αδρανές προένζυμο πλασμινογόνο στο ενεργό ένζυμο πλασμίνη, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την ινική σε ινωδογόνο, τον παράγοντα V σε Va, τον παράγοντα VIII σε VIIIa, αρκετούς αυξητικούς παράγοντες όπως τον bFGF, τον VEGF, τον HGF, τον IGF, τον EGF και τον TGF-β, αλλά και στοιχεία του εξωκυττάριου στρώματος όπως τις μεταλλοπρωτεϊνάσες του εξωκυττάριου στρώματος [309,306]. Όπως προαναφέραμε, υπάρχουν δύο ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, ο ιστικού τύπου (tPA), και ο τύπου ουροκινάσης (uPA). Αυτοί προέρχονται από δύο διαφορετικά γονίδια, αλλά τα προϊόντα τους δρουν με τον ίδιο τρόπο στο πλασμινογόνο και έχουν κοινούς αναστολείς (PAI-1,-2) [310,311]. Η μόνη διαφορά που βρέθηκε σε αυτούς τους δύο παράγοντες είναι ότι ο uPA συσχετίζεται με τη μετανάστευση των κυττάρων (φλεγμονή, επανόρθωση, αγγειογένεση, μετάσταση), ενώ ο tPA όταν χρειάζεται η ινωδόλυση για τη διατήρηση ενός αγγείου ανοικτού [307]. Χωρίς τη δράση των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και ειδικά του uPA ο μηχανισμός της αγγειογένεσης δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί.

Η υποξία αποτελεί το αρχικό έναυσμα για την πυροδότηση μιας σειράς αντιδράσεων που πολλές φαίνεται να αλληλοεπάγονται μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να έχουμε μια αντίδραση καταρράκτη, με τελικό αποτέλεσμα την αγγειογένεση. Έτσι, όταν ένα νεόπλασμα αναπτύσσεται τα κεντρικότερα σημεία αυτού ολοένα αποστασιοποιούνται από τους γειτονικούς ιστούς από όπου αιματώνονται με αποτέλεσμα να επέλθει υποξία, αυτή επάγει τόσο τους υποδοχείς του VEGF όσο και τους υποδοχείς της ουροκινάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα [312,163]. Ο uPA ενεργοποιεί το πλασμινογόνο μετατρέποντάς το σε πλασμίνη.

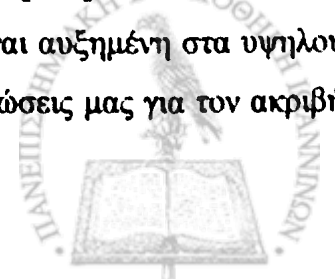


Αυτή ενεργοποιεί μεταξύ άλλων τις μεταλλοπρωτεΐνάσες του εξωκυττάρου στρώματος, όλους τους αυξητικούς παράγοντες που προαναφέραμε (bFGF, VEGF, HGF, IGF, EGF και TGF-β), την οδό της MAP κινάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τη φωσφορυλίωση των προσκολλητικών πρωτεϊνών (σχεδ. 2) [297,313]. Ακολουθεί η διάσπαση της βασικής μεμβράνης (ινονεκτίνης και λαμινίνης) και η διάσπαση διαφόρων ουσιών του εξωκυττάρου στρώματος, με συνέπεια την επαγωγή της μετανάστευσης και της διηθητικής ανάπτυξης του νεοπλάσματος. Ο uPA ενεργοποιεί την κινάση της πρωτεΐνης C (PKC) μέσω της αποδόμησης του στρώματος [309]. Ο VEGF και ο bFGF επάγουν τους μεμβρανικούς υποδοχείς uPAR και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αλλά συμβαίνει και το αντίστροφο, δηλαδή αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων uPAR επάγει τους VEGF και bFGF [163,164,306]. Έτσι ενώ ο uPA συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση της νόσου, ο παράγοντας tPA συσχετίστηκε με καλή πρόγνωση, τόσο στο μελάνωμα όσο και στον καρκίνο του μαστού [314].

Ο καταστολέας PAI δρα σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο στην επιφάνεια του κυττάρου μαζί με την ουροκινάση του πλασμινογόνου και τον υποδοχέα της (uPAR-uPA-PAI), το οποίο αναγνωρίζεται και ενώνεται με μια λιποπρωτεΐνη, την LRP, και γρήγορα φαγοκυτταρώνεται από το ίδιο το κύτταρο, ενώ ο υποδοχέας uPAR ανακυκλώνεται, για να ξαναεμφανιστεί στην επιφάνεια του κυττάρου [315]. Η δράση των καταστολέων PAI φαίνεται να είναι πολύ πιο πολύπλοκη. Αυτοί καταστέλλουν την αγγειοστατίνη με αποτέλεσμα την επαγωγή της αγγειογένεσης [316]. Παρατεταμένη δράση των uPA χωρίς τη δράση των καταστολέων PAI βρέθηκε να οδηγεί σε αιμαγγείωμα, και όχι σε σχηματισμό ωριμότερων μορφών αγγείων με αυλό [317,318]. Ο VEGF-C και ο TGF-β επάγουν τον καταστολέα PAI-1 [317,319,320], και παρότι σε κάποια πειράματα με ποντίκια φαίνεται να καταστέλλει την αγγειογένεση [321], εντούτοις σε καρκινώματα μαστού στον άνθρωπο φάνηκε ότι αυξημένη έκφραση uPA και PAI συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, εύρημα που οδηγεί στην υπόθεση ότι με κάποιον τρόπο οι uPA και PAI επάγουν την αγγειογένεση [322].

4.4.δ. Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF/Scatter factor):

Ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας και ο υποδοχέας του στην κινάση της τυροσίνης, έχουν συσχετισθεί με τα περισσότερα καρκινώματα, και μάλιστα ως επαγωγείς της αγγειογένεσης αλλά και με κακή πρόγνωση και μετάσταση της νόσου [323]. Ο HGF είναι μια κυτταροκίνη η οποία παράγεται από το στρώμα και βρέθηκε να είναι αυξημένη στα υψηλού βαθμού κακοηθείας διηθητικά καρκινώματα [324]. Δυστυχώς οι γνώσεις μας για τον ακριβή



μηχανισμό δράσης αυτού δεν είναι ικανοποιητικές. Από πειράματα σε ποντίκια βρέθηκε ότι επάγει τον παράγοντα VEGF, και κατ' επέκταση την αγγειογένεση, μέσω των οδών p44/42 MAPK, PI3/Akt και Stat3, ενώ καταστέλλει την θρομβοσπονδίνη-1, και, όπως αποδείχτηκε στο ίδιο πείραμα, επάγει την αγγειογένεση με αυτόν τον μηχανισμό μέσω της οδού του p44/42 MAPK [325]. Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι μέσω της PI3/Akt προκαλεί ενεργοποίηση, τόσο του HIF-1 όσο και των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA), ενώ, όπως προαναφέραμε, ο uPA είναι ενεργοποιητής του HGF, δηλαδή έχουμε την εμπλοκή αυτών των μορίων σε ένα φαύλο κύκλο. Επίσης βρέθηκε ότι ο HGF προκαλεί καταστολή του αναστολέα του uPA, του PAI, με αποτέλεσμα πάλι την επαγωγή της αγγειογένεσης [313,317].

4.4.ε. Ιντεκρίνες:

Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες φέρνουν σε επικοινωνία το κύτταρο (την ακτίνη του κυτταροσκελετού δια μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος πρωτεϊνών) με το εξωκυττάριο στρώμα και με τα γειτονικά κύτταρα. Το μόριό τους αποτελείται από δύο τμήματα, το α- και το β-. Έχουν απομονωθεί 8 διαφορετικά β- και 18 α- τμήματα, ενώ σήμερα είναι γνωστές 24 διαφορετικές ιντεκρίνες [326]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων εκφράζουν τις α1β1, α2β1, α3β1, α6β1, α6β4, α5β1, ανβ3 και ανβ5 ιντεκρίνες. Οι α1β1 και α2β1 είναι υποδοχείς κολλαγόνου και λαμινίνης. Οι α3β1, α6β1, α6β4, είναι υποδοχείς λαμινίνης ενώ η α3β1 ενώνεται με πλίνη και θρομβοσπονδίνη. Οι α5β1, ανβ3 και ανβ5 ενώνονται με το εξωκυττάριο στρώμα μέσω ενός τμήματος RGD (αργινίνη-γλυκίνη- ασπαραγίνη). Η α5β1 ενώνεται κυρίως με ινονεκτίνη, η ανβ5 με βιτρονεκτίνη και η ανβ3 με βιτρονεκτίνη, ινονεκτίνη, παράγοντα Willebrand (VIII), θρομβοσπονδίνη, λαμινίνη, Del-1, και καταβολίτες του κολλαγόνου [326,327].

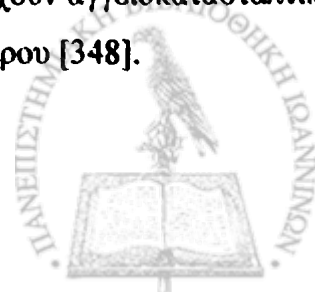
Η σχέση τους με την αγγειογένεση ανακαλύφθηκε μόλις το 1994 [328]. Οι πληροφορίες που έχουμε για τις ιντεκρίνες είναι κυρίως από πειράματα σε ποντίκια ή χοριοαλλαντοειδικές μεμβράνες. Αυτές που έχουν β1 τμήμα στο μόριό τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Η α5β1 ενώνεται με την αγγειοποιητίνη χωρίς να επηρεάζεται από τον υποδοχέα της, τον Tie-2, με αποτέλεσμα να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [329]. Αυτές που έχουν α5 τμήμα στο μόριό τους επάγουν την αγγειογένεση μέσω οδού ανεξάρτητης του VEGF [330]. Η ενδοστατίνη καταστέλλει την αγγειογένεση μέσω της α5β1 και αν- ιντεκρινών [331]. Ο VEGF δρα μέσω των α1β1, α2β1 και ανβ3. Σε διάφορα πειράματα, όπου με διάφορες τεχνικές, με χρήση αντισωμάτων, επετεύχθη διακοπή αυτής της



οδού, είχαμε μείωση της αγγειογένεσης κατά 90% [166,332]. Η $\alpha 1\beta 1$ επάγει τις MMP7 και MMP9, οι οποίες αναστέλλουν με την σειρά τους την παραγωγή αγγειοστατίνης [333]. Η $\alpha 3\beta 1$ με τη λαμινίνη επάγουν το σχηματισμό αυλών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα από οδό ανεξάρτητη του FGF [334]. Οι ανβ3 και ανβ5 εμπλέκονται σε επαγωγικές οδούς της αγγειογένεσης [335]. Η πρώτη εμπλέκεται σε οδό εξαρτώμενη του VEGF και η δεύτερη του bFGF [336]. Η ανβ3 επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και το σχηματισμό αυλών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ βρέθηκε ότι πολλά μόρια μπορούν να επηρεάσουν αυτό το μηχανισμό θετικά (VEGFR-2, PDGFb, IGFR, βιτρονεκτίνη, θρομβίνη, καταβολίτες του κολλαγόνου, αγγειοποιητίνη κ.ά) ή αρνητικά (θρομβοσπονδίνη-1 και-2, MMP2, αγγειοστατίνη, ενδοστατίνη, τουμστατίνη-καταβολίτης του κολλαγόνου IV) [166,251,326].

4.4.στ. Νιτρικά οξείδια (NO⁻):

Τα νιτρικά οξείδια είναι ελεύθερες ρίζες οι οποίες συντίθενται από L-αργινίνη με τη βοήθεια της συνθετάσης νιτρικών οξειδίων (NOS). Αυτές εμπλέκονται σε πολλούς μηχανισμούς, διαδραματίζοντας ρόλο νευροδιαβιβαστών, αγγειοδιασταλτικών παραγόντων και κυτταροτοξικών ουσιών εκκρινόμενων από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Επίσης αναστέλλουν την απόπτωση και επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [337,338]. Υπάρχουν τρεις τύποι NOS, οι επαγωγείς (iNOS) και οι νευροδιαβιβαστές των ενδοθηλίων (eNOS) και των νευρώνων (nNOS) [339]. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι εμπλέκονται στην αγγειογένεση και μάλιστα παίζουν σημαντικό ρόλο. Οι VEGF, TGF- β και bFGF επάγουν την έκφραση της eNOS σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφάλιο λώρο (HUVEC) [176,177,340-342], όπως συμβαίνει και με την INF- γ , την IL-1 β , τον TNF- α και το οξειδωτικό stress [343]. Η ενεργοποίηση της eNOS γίνεται μέσω της PI3/Akt και MAPK/ERK οδού, η οποία οδηγεί στην παραγωγή NO⁻ [344]. Αξιοσημείωτο εύρημα που δείχνει τη σημαντικότητα των NO⁻ είναι ότι εάν καταστειλούμε τη NOS μέσω ενός ανταγωνιστή αυτής, τον L-NAME τότε έχουμε καταστολή της αγγειογένεσης, μέσω της αύξησης ενός αγγειοκατασταλτικού παράγοντα της αγγειοστατίνης [345]. Μηχανισμοί δράσης των νιτρικών οξειδίων είναι η επαγωγή της ανβ3 η οποία επάγει τον Del-1, γνωστό επαγωγέα της αγγειογένεσης [346], επάγει τους παράγοντες VEGF και bFGF όπου μέσω αυτών επάγει τον uPA [347], την IL-8 (επαγωγέας της αγγειογένεσης) μέσω της επαγωγής της IFN- γ και IL-1 β , και καταστέλλει τις IP-10 και MIG, οι οποίες έχουν αγγειοκατασταλτική δράση σε πειράματα από DLD-1 κύτταρα καρκινώματος παχέος εντέρου [348].



4.4.ζ. Αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την Ινσουλίνη (IGF):

Ο IGF συντίθεται σχεδόν από όλους τους τύπους των κυττάρων και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για αρκετούς μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων και για το μηχανισμό της αγγειογένεσης [349]. Ο κυτταρικός υποδοχέας αυτού είναι ο IGF-1R (receptor), ενώ μεταφέρεται στο αίμα συνδεδεμένος με τις πρωτεΐνες IGFBPs (binding proteins). Αποτελεί προϊόν του γονιδίου IGF-1. Παράγεται τόσο από το ήπαρ όσο και από άλλους ιστούς. Όμως από το ήπαρ διοχετεύεται στην κυκλοφορία συνδεδεμένος με τις IGFBPs, ενώ στους άλλους ιστούς δρα είτε μόνο τοπικά ή και στους γειτονικούς ιστούς. Ο IGF-1R βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου, και όταν ενωθεί με τον IGF, τότε το τμήμα αυτού που βρίσκεται ενδοκυττάρια ενεργοποιεί μια κινάση της τυροσίνης [349], φωσφορυλιώνει την Shc, ακολούθως τους υποδοχείς ινσουλίνης IRS-1,-2,-3 και -4 [350], τον πυρηνικό παράγοντα -κΒ, το PI3K, το Akt, και το MAPK [351,352]. Αυτά έχουν επίδραση στην κυτταρική αύξηση, στη διαφοροποίηση, στη μετανάστευση, αλλά και στην αγγειογένεση [349,353,354].

Οι IGFBPs είναι 6 στο σύνολό τους. Εκτός από μεταφορικό μέσο και αποθηκευτικό χώρο, αποτελούν και καταστολέα της δράσης του IGF [358]. Η έκφραση των IGFBPs από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζεται από τους παράγοντες PDGF, FGF και TGF-β [356]. Πειραματικά βρέθηκε ότι καταστολείς του IGF είναι ο παράγοντας TNF-α, η θρομβίνη, τα οιστρογόνα, ο TGF-β και ο VEGF, ενώ οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ο bFGF και ο uPA φαίνεται να το επάγουν [313,357-360]. Η αγγειοτενσίνη II, όπως και ο παράγοντας PDGF, κατ' άλλους προκαλεί επαγωγή [360], ενώ κατ' άλλους καταστολή [351] του IGF, [362,363]. Ο IGF-1 επάγει τον HIF-1α, αυτός τον IGF-2, και ο τελευταίος με τη σειρά του τον IGF-1 (206).

4.4.η. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF):

Ο παράγοντας EGF παράγεται κυρίως στους νεφρούς και εμπλέκεται σε πολλούς μηχανισμούς, όπως την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [364], σε πολλές νεφρικές λειτουργίες [364] και την αγγειογένεση [365]. Παρότι η συσχέτιση του παράγοντα αυτού με την αγγειογένεση δεν έχει μελετηθεί πολύ, εντούτοις ο μεμβρανικός υποδοχέας αυτού, ο EGFR, έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Έτσι ο EGFR ανήκει στην οικογένεια των erbB μεμβρανικών υποδοχέων, στην οποία ανήκουν οι EGFR (ή HER1 ή erbB1), ο erbB2 (ή HER2neu ή c-erb-2), ο erbB3 (ή HER3) και ο erbB4 (ή HER4) [366,367]. Ο EGFR βρέθηκε να εκφράζεται σε αρκετά νεοπλασμάτα, όπως το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, το καρκίνωμα του μαστού, στομάχου, οισοφάγου, νεφρού, ουροθηλίου και αρκετά



άλλα [368]. Η ενεργοποίηση του EGFR σε έναν νεοπλασματικό ιστό επάγει τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διηθητική ανάπτυξη και μετάσταση της νόσου, ενώ καταστέλλει την απόπτωση [366,369]. Ενεργοποίηση του EGFR γίνεται όχι μόνο από τον EGF, αλλά και από τον TGF- α και την amphiregulin [366]. Αφού ενεργοποιηθεί, τότε μέσω της κινάσης της τυροσίνης ενεργοποιεί μια σειρά αντιδράσεων, όπως την Ras/Raf/MAPK οδό [370], την PI3K και την Akt πρωτεϊνική κινάση [371,372]. Η τελευταία συσχετίζεται με μηχανισμούς απόπτωσης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και έκφρασης διαφόρων γονιδίων [366].

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση του EGFR υποδοχέα έγινε με το προχωρημένο στάδιο της νόσου, την πρόγνωση, την επιβίωση και την κακή ανταπόκριση στη θεραπεία σε μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα [373].

Έχει αποδειχθεί, επίσης, η στατιστική συσχέτιση του EGF με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και με το στάδιο της νόσου σε ουροθηλιακό καρκίνωμα [374].

4.4.θ. Αγγειοποιητίνη και υποδοχείς Tie:

Το 1992 ανακαλύφθηκαν οι υποδοχείς Tie -1 και -2 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και ακολούθως ανακαλύφθηκαν οι αγγειοποιητίνες, εκ των οποίων η Ang-2 ανακαλύφθηκε μόλις το 1997. Σήμερα είναι γνωστές 4 αγγειοποιητίνες, οι Ang -1,-2,-3 και -4, από τις οποίες μόνο οι πρώτες δυο έχουν μελετηθεί σε κάποιο ικανοποιητικό βαθμό, έτσι ώστε να μπορούμε να πούμε ότι γνωρίζουμε κάτι για το μηχανισμό δράσης τους [163].

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η αγγειοποιητίνη -1 (Ang1) και η αγγειοποιητίνη-2 (Ang2) δρουν ως επαγωγείς αλλά και καταστολείς της αγγειογένεσης, ανάλογα με την αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση τους μέσω του υποδοχέα Tie2 [375]. Σε in vivo πειράματα βρέθηκε ότι όταν συνυπάρχει ο παράγοντας VEGF-A, η Ang2 προκαλεί αύξηση της διαμέτρου των αγγείων, αναδόμηση της βασικής μεμβράνης, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα όμως, όταν έχουμε μείωση του παράγοντα VEGF, τότε η ίδια Ang2 προκαλεί θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων και καταστολή της αγγειογένεσης [375]. Αναφέρεται ότι η Ang1 επάγει τη φωσφορυλίωση της Tie2 και της υποομάδας PI 3 κινάσης, και αυξάνει τη δράση της PI 3 κινάσης, με αποτέλεσμα ο υποδοχέας Tie2, η PI 3 κινάση, και το Akt να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δράση της Ang1 για την αύξηση της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [376]. Άλλως, η Ang1 προκαλεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της οδού Akt/σουρβιβίνης, ενεργοποιώντας την Akt και επάγοντας τις σουρβιβίνες, οι οποίες έχουν αποπτωτική δράση [377,378], αλλά

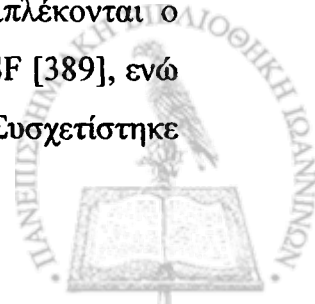
δεν έχει καμία δράση στην έκφραση της bcl-2 και XIAP [378]. Η αύξηση της μεταναστευτικής δράσης της Ang1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της PI 3 κινάσης. Αύξηση της πλασμίνης, της MMP-2 και μείωση της TIMP-2 από την Ang1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η PI 3 καταστέλλει την Ang1. Η Ang2 εμποδίζει την επαγωγική δράση της Ang1 στην αυτοφωσφορυλίωση της Tie2, έτσι ώστε να ελέγχει την εκτεταμένη αύξηση και επέκταση των αγγείων. Τέλος, σε πολλές μελέτες βρέθηκε ότι τα επίπεδα της Ang-1 είναι σταθερά με μικρές αυξομειώσεις, σε αντίθεση με την Ang-2, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Ang-2 ελέγχει τις ισορροπίες [379].

4.4.ι. Αγγειογενίνη:

Πρόκειται για έναν αγγειογενετικό παράγοντα, για τον τρόπο δράσης του οποίου γνωρίζουμε ελάχιστα. Ο υποδοχέας αυτής στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι μια πρωτεΐνη του τύπου της ακτίνης των λείων μυϊκών ινών [380] που με την ένωσή της με την αγγειογενίνη ενεργοποιούν την uPA [381], η οποία με την σειρά της προάγει τη διηθητική ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων [382]. Προάγει επίσης τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ σε *in vitro* πειράματα φαίνεται ότι δρα μέσω της Erk 1/2 MAP κινάσης [383].

4.4.ια. Κυκλοοξυγενάση (COX):

Οι κυκλοοξυγενάσες-1 και -2 (COX-1, COX-2) παράγουν προσταγλανδίνες από αραχιδονικό οξύ. Η COX-1 παράγεται από πολλούς ιστούς και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς, ενώ η COX-2 επάγεται σε συνθήκες φλεγμονής, νεοπλασίας ή ενεργοποίησης των μηχανισμών ανοσίας [384]. Η έρευνα γύρω από την COX-2 άρχισε στις αρχές του 1990, με τη διερεύνηση της παρατήρησης ότι άτομα που λάμβαναν επί μακρό χρονικό διάστημα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη είχαν μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος παχέος εντέρου. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι τα NSAIDs καταστέλλουν την αγγειογένεση, καταστέλλοντας την δράση των COX-1 και COX-2 [385-387]. Η έρευνα γύρω από την Κυκλοοξυγενάση και την αγγειογένεση έγινε κυρίως σε καρκινώματα παχέος εντέρου, και λιγότερο σε καρκινώματα στομάχου, μαστού και ουροδόχου κύστεως. Συσχετίστηκε με την επαγωγή της αγγειογένεσης, με μηχανισμούς όπου εμπλέκονται ο VEGF [387,388], η iNOS [388], η MMP-2 μαζί με τον uPA [387], και ο HGF/SF [389], ενώ η έκφρασή της συσχετίζεται άμεσα με την αγγειακή πυκνότητα (MVD) [388]. Συσχετίστηκε



επίσης με τη διηθητική ανάπτυξη, με λεμφαδενικές μεταστάσεις, κ.ά. [384]. Ο τρόπος δράσης αυτών σε μοριακό επίπεδο παραμένει άγνωστος.

4.4.ιβ. Midkine:

Η Midkine παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται σε διάφορους μηχανισμούς όπως κυτταρική αύξηση, αγγειογένεση, μετανάστευση κυττάρων και απόπτωση [390]. Παρότι απομονώθηκε στα τέλη του 1980, εντούτοις λίγα είναι γνωστά για τον τρόπο δράσης της. Είναι ένας αυξητικός παράγοντας που συνδέεται με την ηπαρίνη, ενώ στο μηχανισμό της αγγειογένεσης και μετανάστευσης των κυττάρων εμπλέκεται η MAP κινάση (Erk1 και Erk2), η PI 3 κινάση, η κινάση της πρωτεΐνης C, ενώ έχει συνεργική δράση με τον παράγοντα PDGF [391] με την βοήθεια κάποιας ιντεκρίνης β1 [392]. Τέλος, στο μηχανισμό της αγγειογένεσης φαίνεται να έχει στενή σχέση με την IL8 [390].

4.4.ιγ. eIF4E:

Ο παράγοντας αυτός εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη βιολογική συμπεριφορά αλλά και στην αγγειογένεση διαφόρων νεοπλασματικών ιστών [181]. Σε αρκετές μελέτες έχει συσχετισθεί με την έκφραση του παράγοντα VEGF [181,393]. Πιστεύεται ότι εμπλέκεται στο ρυθμιστικό μηχανισμό έκφρασης του τελευταίου, ενώ σε άλλη μελέτη συσχετίστηκε με τον bFGF [393].

4.4.ιδ. Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β):

Ο TGF-β είναι πολυπεπτίδιο το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, τη συνοχή μεταξύ των κυττάρων, την αγγειογένεση, όπως και λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Τόσο ο μηχανισμός όσο και οι οδοί δράσης του TGF στην αγγειογένεση δεν είναι απόλυτα γνωστοί, και ο κύριος λόγος είναι ο πολύπλοκος τρόπος δράσης του. Ο TGF-β δρα μέσω των υποδοχέων TGF-β τύπου I ή ALK1 και II ή ALK5 σαν μεσολαβητής στις οδούς p38MAPK, ERK και των πρωτεϊνών Smad [394]. Η ALK1 εκφράζεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ η ALK5 από διάφορους ιστούς. Ο ALK5 εμπλέκεται στη ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας, καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ ο ALK1 επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [395]. Η ενδογλίνη, ένας υποδοχέας του TGF-β, ο οποίος εκφράζεται από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, επάγεται από τον ALK1, ενώ φαίνεται να καταστέλλει την οδό TGF-β/ALK5. Έτσι έχουμε έναν έμμεσο μηχανισμό

καταστολής της αρνητικής αγγειογενετικής δράσης του ALK5 από τον ALK1 [396]. Τα επίπεδα του TGF-β mRNA εξαρτώνται από τα επίπεδα της ALK-5, ανεξάρτητα από τις οδούς p38MAPK και ERK [394]. Αντίθετα, η αύξηση του mRNA της ινονεκτίνης από τον TGF-β απαιτεί τη δράση της οδού p38MAPK. Η αύξηση των mRNA του PAI-1 (Αναστολέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου), ενός καταστολέα της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και της TSP-1, απαιτεί σίγουρα την οδό του ALK5, ίσως και την οδό p38MAPK [394]. Ο ALK1 επάγει το γονίδιο Id1, το οποίο συσχετίζεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης, και αυτό με την σειρά του καταστέλλει την TSP-1, σε αντίθεση με τον ALK5 [396]. Ο TGF-β εκκρίνεται από τα περισσότερα κύτταρα σε μη ενεργό μορφή, τα οποία ενεργοποιούνται από πρωτεάσες όπως η πλασμίνη και η καθεψίνη D, από την ουρία αλλά και από το περιβάλλον με χαμηλό pH [397,398]. Έχει βρεθεί ότι ο VEGF αυξάνει την επίδραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PA) στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και ότι η πλασμίνη ενεργοποιεί τον TGF-β [399,400], ο οποίος μειώνει την έκφραση του FLK-1, και έτσι έχουμε αρνητική ρυθμιστική επίδραση του VEGF/Flk-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα [401]. Αυτό υπονοεί ότι υπάρχει και άλλος αυτόνομος ρυθμιστικός μηχανισμός του VEGF στην αγγειογένεση [400]. Επίσης βρέθηκε ότι καταστέλλει τις κυκλίνες, και ότι με μια σειρά μηχανισμών προκαλεί φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb και καθλώνει τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου [402]. Τα επίπεδα του TGF-β φαίνεται να επηρεάζονται από τα επίπεδα των MMP-2, uPA και IGFBNs, όπου η αύξηση των MMP-2 και uPA προκαλεί αύξηση της TGF-β [313,356]. Παρ' ότι σε χαμηλά επίπεδα ο TGF-β επάγοντας τους παράγοντες VEGF και bFGF, επάγει την μεταναστευτικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη διηθητική ανάπτυξη από το νεόπλασμα, σε υψηλά επίπεδα έχει ακριβώς αντίθετη δράση [403].

4.4.ιε. Ιντερλευκίνες:

Η IL-4 καταστέλλει την αγγειογένεση, η οποία επάγεται από το bFGF σε κερατοειδή χιτώνα κουνελιού, μπλοκάροντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [404]. Η IL-1α η οποία εκκρίνεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα, επάγει την αγγειογένεση μέσω της επαγωγής διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF, της IL-8, και του bFGF [405]. Η IL-12 καταστέλλει την έκφραση του VEGF mRNA, του bFGF, και του MMP-9 mRNA [406], ενώ επάγει την INF-γ [407]. Επιπρόσθετα επάγει την απόπτωση, ενώ καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και τη νέκρωση του όγκου, μειώνοντας έτσι την αγγειακή πυκνότητα [407]. Τέλος η καταστολή της



αγγειογένεσης από την IL-10 οφείλεται στην κατασταλτική δράση που έχει σε VEGF, IL-1β, TNF-α, IL-6 και MMP-9 [408].

Το mRNA της IL-8 αυξάνεται στο νεοπλασματικό ιστό και η έκφρασή του συσχετίζεται με τη νεοαγγειογένεση, την πορεία της νόσου και την επιβίωση. Η υποξία επάγει την IL-8 μέσω της Akt και p38MAPK οδού, και αυτή με την σειρά της την MMP-2 επάγοντας έτσι την αγγειογένεση [409]. Τέλος η NO και ο PDECGF/TP επάγουν την IL-8 (επαγωγέας της αγγειογένεσης) μέσω της επαγωγής της IFN-γ και IL-1β [234,343,348].

4.4.ιστ. Ιντερφερόνες:

Οι ιντερφερόνες (INF-α, -β και-γ) είναι γλυκοπρωτεΐνες, εκ των οποίων, στον ανθρώπινο οργανισμό, οι INF-α/β παράγονται από κύτταρα προσβεβλημένα από ιό και η INF-γ από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα όπως και NK κύτταρα [410]. Ο τρόπος ενεργοποίησής τους έχει ως εξής. Αρχικά έχουμε τη σύνδεση της INF α, ή β, ή γ με τον υποδοχέα της (INF-R). Ακολουθεί φωσφορυλίωση των κινασών Janus TYK2 και JAK1. Αυτές ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες STAT-1α και STAT-2. Το p48, το STAT-1α και το STAT-2 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, το ISGF3, το οποίο ενώνεται με τον υποδοχέα ISRE, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων ανάλογα με την INF που ενεργοποίησε το μηχανισμό [411]. Οι INF-α/β καταστέλλουν την έκφραση των MMP-2 και -9 (επαγωγείς της αγγειογένεσης), αλλά και διάφορες άλλες πρωτεΐνες σε διάφορα καρκινώματα [412-415]. Επίσης σε διάφορες μελέτες φαίνεται να καταστέλλουν την IL-8 στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως [412,413], αλλά και το bFGF, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και την πρωτεΐνη σε διάφορα νεοπλάσματα, μειώνοντας την αγγειακή πυκνότητα και αυξάνοντας την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [412-414,416]. Οι INF-β/γ καταστέλλουν τις MMP-1,-2,-9,-13, τις στρωμελυσίνες, τις κυκλίνες A και D, το c-myc ενώ έχουν ήπια κατασταλτική δράση τόσο στο mRNA του VEGF όσο και στο mRNA του bFGF [417,418]. Η ιντερφερόνη-α (κυτοκίνη) παρότι προκαλεί αύξηση κατά 5 φορές των επιπέδων της PD-ECGF/TP, εντούτοις προκαλεί οκταπλασιασμό της δραστηρότητας του ενζύμου αυτού, οπότε, εκτός από τη δράση που έχει στο γονίδιο της PD-ECGF/TP, φαίνεται να δρα και στο ίδιο το mRNA [239,240]. Η INF-γ επάγει τη NOS σε καλλιέργειες κυττάρων HUVEC [340]. Παρόλα αυτά, στην κλινική πράξη η χορήγηση INF δεν έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε συμπαγείς όγκους στον άνθρωπο.



4.4.ιζ. Ιστικοί καταστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs):

Σήμερα είναι γνωστοί τέσσερις καταστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, οι TIMP-1, -2, -3 και -4 [300]. Αυτοί εκφράζονται από πολλούς τύπους κυττάρων. Είναι φυσικοί καταστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών με πρωτεολυτική δράση [300]. Διαφέρουν μεταξύ τους στο είδος των κυττάρων στα οποία εντοπίζονται, στο επίπεδο στο οποίο δρουν, και στο είδος των μεταλλοπρωτεϊνών που καταστέλλουν. Εκτός από την καταστολή της αγγειογένεσης, βρέθηκε ότι εμπλέκονται σε αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς [419], επάγουν την κυτταρική ωρίμανση φυσιολογικών κυττάρων όπως χονδροκυττάρων, λεμφοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων κ.λ.π. αλλά και νεοπλασματικών π.χ. σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, οστεοσάρκωμα ή καρκίνωμα μαστού [419-421]. Κάτω από κάποιες συνθήκες βρέθηκε να συσχετίζεται με την καταστολή, και κάτω από άλλες με την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μεταξύ άλλων στα ενδοθηλιακά και στα καρκινικά κύτταρα [422]. Επίσης φαίνεται να έχουν κάποια δράση στην έκκριση στεροειδών ορμονών, στην αιμοποίηση όπως και στην εμβρυογένεση [419].

Η δράση τους στο μηχανισμό της αγγειογένεσης επάγεται από τους αυξητικούς παράγοντες (bFGF, PDGF, EGF) από τις ιντερλευκίνες-6 και -1, όπως και από την ερυθροποιητίνη [419,423]. Οι TIMPs καταστέλλουν την αγγειογένεση σε διάφορα επίπεδα, μεταξύ άλλων καταστέλλοντας τις MMPs και τον παράγοντα bFGF [424].

4.4.ιη. Αγγειοστατίνη:

Η αγγειοστατίνη είναι προϊόν αποδόμησης του πλασμινογόνου. Αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς καταστολείς της αγγειογένεσης μαζί με την ενδοστατίνη και τη σωματοστατίνη. Επίσης καταστέλλει την αύξηση του όγκου και τη μετανάστευση των νεοπλασματικών και ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ επάγει την απόπτωση [425,426]. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων φλεβικών ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC) βρέθηκε ότι η καταστολή της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται μέσω οδών απόπτωσης, τόσο επάγοντας το p53 όσο και ασκώντας ρυθμιστική επίδραση στο FasL και c-Flip [425]. Άλλος μηχανισμός δράσης της αγγειοστατίνης, είναι η ένωση του μορίου της με τις α/β υποομάδες της ATP συνθετάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα αυτή να καταστέλλει τον μεταβολισμό του ATP και τελικά να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [427]. Επιβεβαίωση αυτού του τρόπου δράσης αποτέλεσε ένα πείραμα που έγινε πρόσφατα σε ποντικούς: Χορηγήθηκαν ραδιενεργά σεσημασμένες αγγειοστατίνη και ενδοστατίνη, και ως αποτέλεσμα



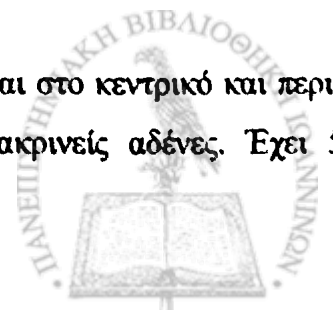
παρατηρήθηκε καταστολή των VEGF και FGF, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν αυτές σε καμία από τις γνωστές οδούς αγγειογένεσης, δηλαδή στην PLC/DAG/PKC, Akt, p44/42 MAPK και p38MAPK [428]. Τέλος, η αγγειοστατίνη καταστέλλει τη δράση του HGF, αφού καταστέλλει τη σύνδεση αυτού με τον υποδοχέα του c-met [429], ενώ παρεμποδίζει τη λειτουργία της ανβ3 και καταστέλλει τη δράση του πλασμινογόνου στο εξωκυττάριο στρώμα [326,430,431].

4.4.ιθ. Ενδοστατίνη:

Η ενδοστατίνη απομονώθηκε αρχικά στο αιμαγγειοενδοθηλίωμα, ως παράγοντας που προκαλούσε καταστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, της αγγειογένεσης όπως και της αύξησης του νεοπλάσματος. Η ενδοστατίνη αποτελεί προϊόν αποδόμησης του κολλαγόνου XVIII [432]. Οι μηχανισμοί δράσης της έχουν ως εξής: Μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση του KDR/Flk-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF [433]. Επάγει τους παράγοντες ERK, p38MAPK και p125^{Fak}, οι οποίοι καταστέλλουν τον KDR/Flk-1, ενώ επάγει και τη θρομβοσπονδίνη-1. Η ενδοστατίνη φαίνεται να μειώνει τη μεταναστευτικότητα των ενδοθηλιακών κύτταρων, μειώνοντας τη φωσφορυλίωση που προκαλεί ο VEGF στον παράγοντα NOS [434], καθώς επίσης και με την δέσμευση των α_v , α_5 και β_3 ιντεκρινών [432,331]. Άλλος τρόπος δράσης είναι η ανταγωνιστική δράση που έχει συνδεδεμένη στην επιφάνεια των κυττάρων με τον παράγοντα bFGF, μειώνοντας τη μιτογόνο δράση του τελευταίου [435]. Ο ενδοθηλιακός πολλαπλασιασμός καταστέλλεται επίσης μέσω της επαγωγικής δράσης της ενδοστατίνης στο νευροπεπτίδιο Y και στην μομπεσίνη. Καταστέλλει επίσης το μεμβρανικό τύπο του MMP (MT1-MMP), τις MMP-9, MMP-13 και MMP-2 [436], τον HIF1- α έμμεσα, αφού καταστέλλει τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης αυτού, τον c-jun/Fos, τον Ets και τον EGFR [432]. Επιπλέον μέσω των οδών p38MAPK και JNK καταστέλλει τον TNF- α . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή του NF- κ B, ο οποίος είναι αυξητικός παράγοντας, αλλά πιθανότατα εμπλέκεται και στην αγγειογένεση, αφού καταστέλλει την iNOS και την COX-2. Ασκεί άμεση αρνητική δράση στους αγγειογενετικούς παράγοντες εφρίνη B1 και B2 [432]. Επιπρόσθετα η ενδοστατίνη καταστέλλει τους υποδοχείς 1 και 2 της θρομβίνης, η οποία είναι επαγωγέας του VEGF καθώς και τον παράγοντα vWF [432] (Σχεδιάγραμμα 3).

4.4.κ. Σωματοστατίνη:

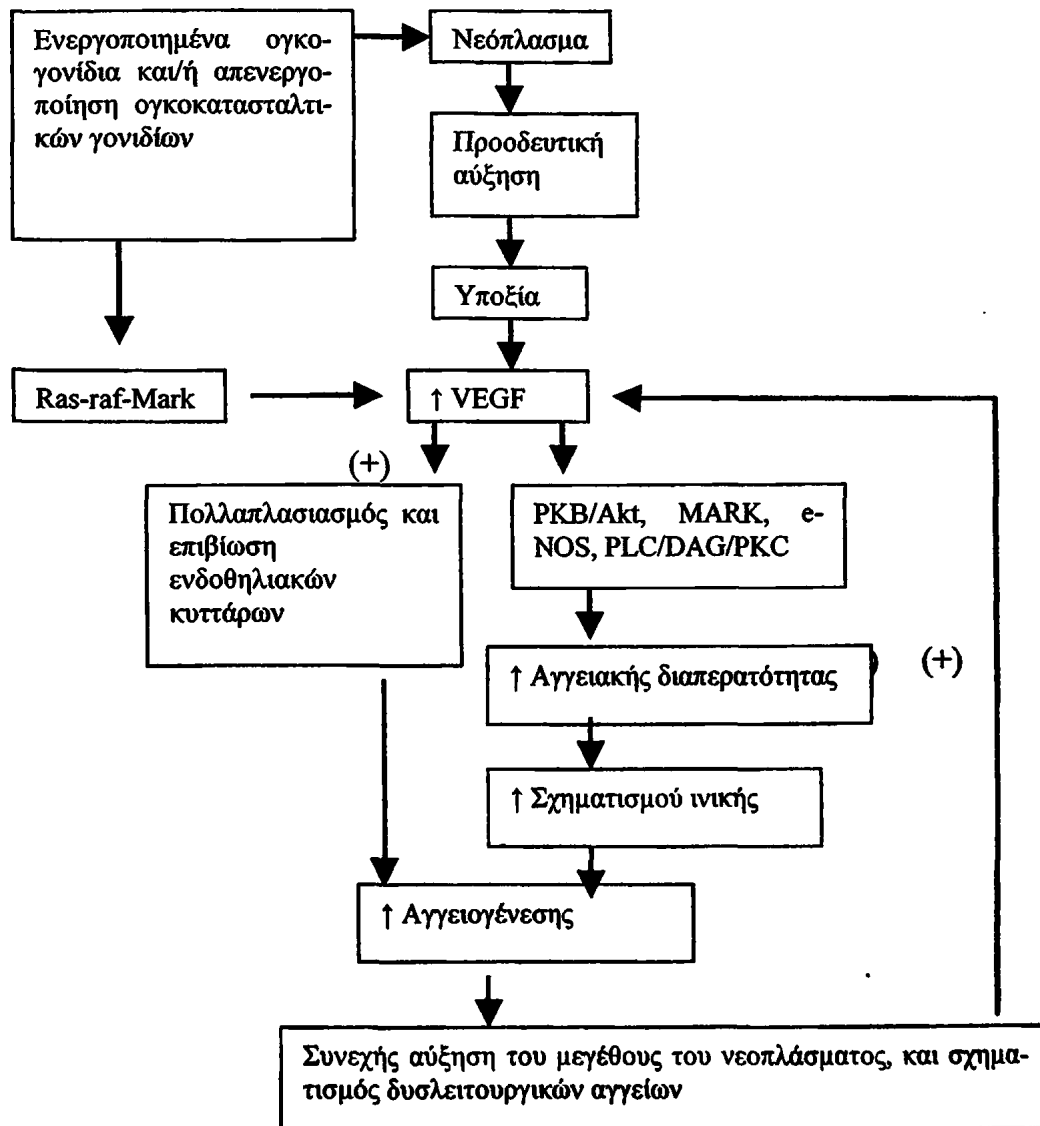
Η σωματοστατίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο το οποίο εντοπίζεται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, σε ενδοκρινείς, αυτοκρινείς και παρακρινείς αδένες. Έχει 5



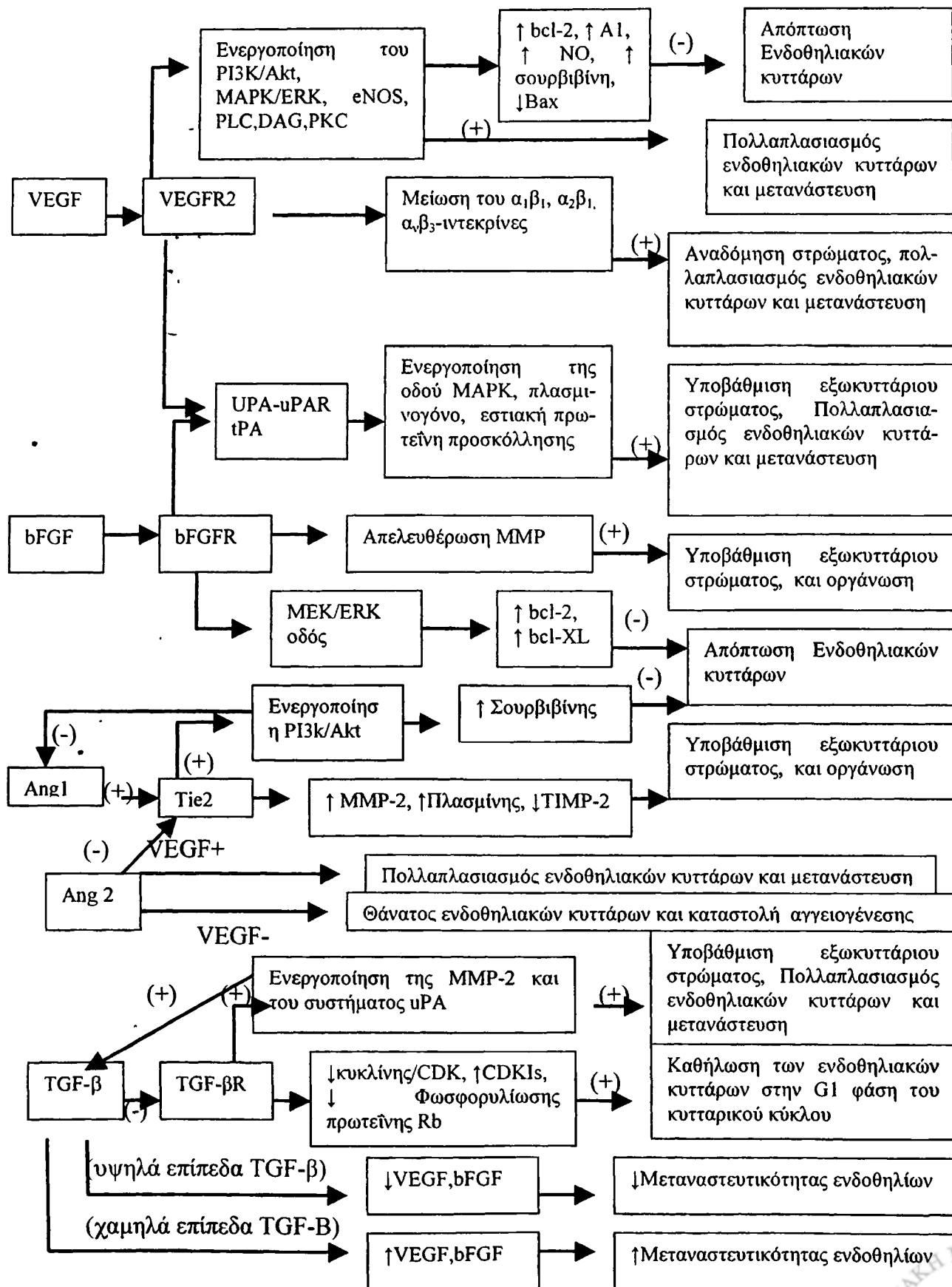
διαφορετικούς υποδοχείς, τους SSTR1-SSTR5, στις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες και οι οποίοι αφού ενωθούν με την σωματοστατίνη, ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς, διαφορετικούς εν μέρει, ανάλογα με τον υποδοχέα που ενεργοποιείται κάθε φορά [437]. Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν αρκετές βιοχημικές αντιδράσεις, όπως τη MAPK Erk1/2 οδό (από τους SSTR1 και SSTR4 και τη φωσφατάση της τυροσίνης) και την PKC οδό (από τον SSTR2) [438]. Επιπλέον ο SSTR4 ενεργοποιεί τη STAT3 [439], ενώ ο SSTR5 καταστέλλει τη MAPK Erk1/2 οδό μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης G [440]. Αρκετοί ερευνητές έδειξαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν βρέθηκαν υποδοχείς SSTR σε νεοπλασματικούς ιστούς νευροενδοκρινικής φύσεως, αλλά και σε άλλα μη νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα, όπως καρκινώματα μαστού, πνεύμονα, ουροδόχου κύστεως, κ.λπ. [437]. Συχνότερα εκφράζεται ο SSTR2, ακολούθως ο -5 και πιο σπάνια οι -1, -3 και -4 [441]. Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης εμπλέκονται σε πολλούς μηχανισμούς, όπως καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συνοχή των κυττάρων μεταξύ τους, μετανάστευση, διηθητική ανάπτυξη, απόπτωση και αγγειογένεση [437]. Άλλο ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι τα αγγεία του νεοπλασματικού ιστού που προέρχονται από νεοαγγειογένεση, εκφράζουν τον υποδοχέα SSTR2, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά αγγεία [442]. Στο μηχανισμό της αγγειογένεσης, ο SSTR3 καταστέλλει την αγγειογένεση καταστέλλοντας την e-NOS [443]. Ο SSTR2 σε πειράματα με ποντίκια καταστέλλει την MMP2 [444], τόσο το mRNA όσο και την πρωτεΐνη VEGF [445], τον EGF, τον bFGF [446], τον PDGF και τον IGF [447].



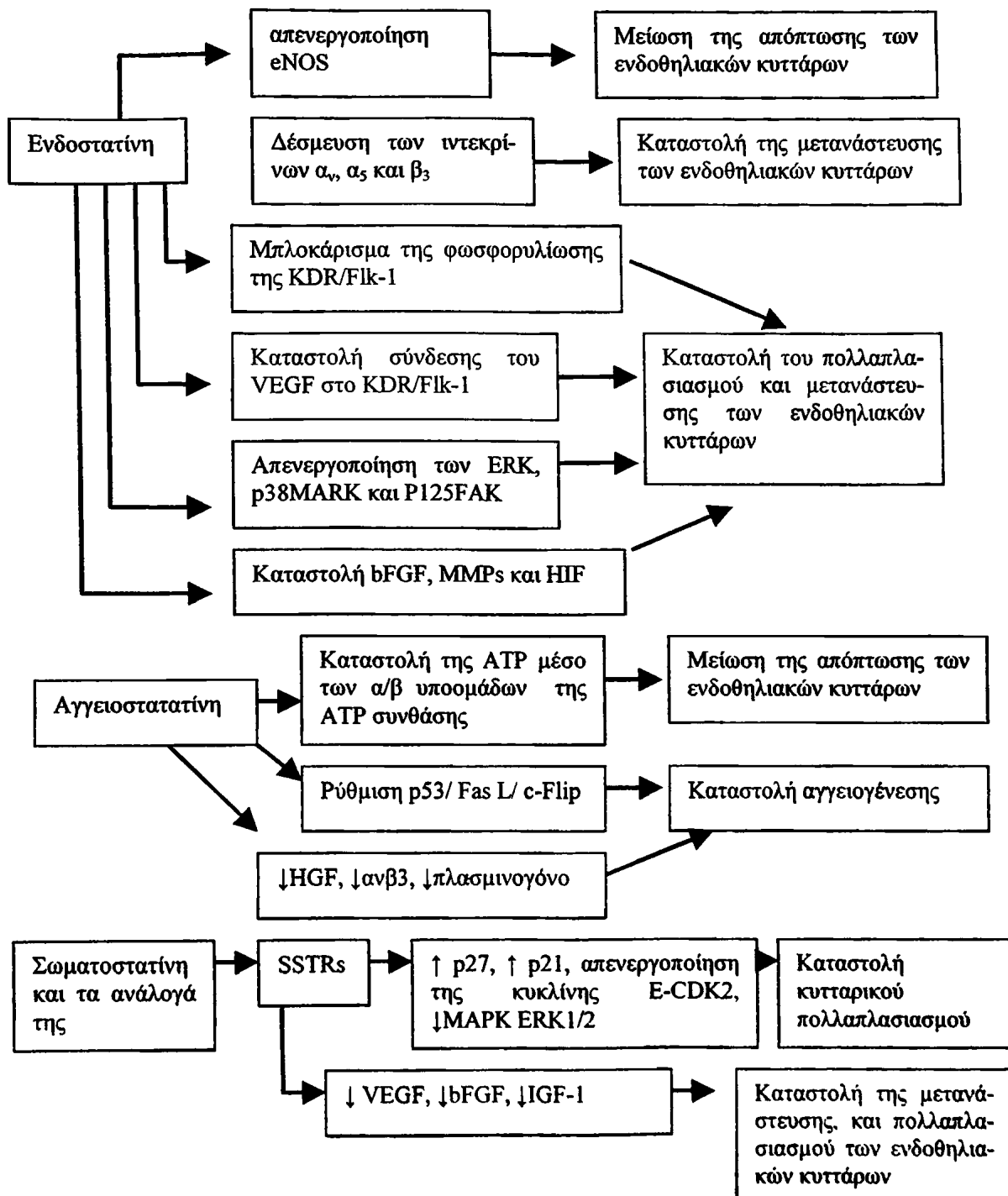
Σχεδιάγραμμα 1



Σχεδιάγραμμα 2



Σχεδιάγραμμα 3



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Έναυσμα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης από τον συγγραφέα, αποτέλεσε η συνειδητοποίηση της πολυτιμότητας της γνώσης που μας έδωσε ο Folkman [123] το 1971: ότι δηλαδή τα νεοπλάσματα, για να μεγαλώσουν πέραν των 2-3 mm³ πρέπει να εξασφαλίσουν παροχή αίματος μέσω νεόπλαστου αγγειακού δικτύου (νεοαγγειογένεση), γεγονός το οποίο θεωρείται από τους μελετητές ως «Αχίλλειος πτέρνα» του μηχανισμού της καρκινογένεσης, αφού προσδίδει ελπίδες για την ανεύρεση προοπτικών παρέμβασης στην εξέλιξη των εν λόγω νεοπλασιών.

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι:

1) Η εκτίμηση της αγγειακής πυκνότητας σε καρκινώματα ουροδόχου κύστης, με ανάδειξη των αγγείων μέσω της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CD34, καθώς επίσης και η πιθανή συσχέτιση αυτής με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο, την πρόγνωση, και με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες.

2) Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των παρακάτω αντιγόνων (επαγωγείς και καταστολείς της αγγειογένεσης), τα οποία εμπλέκονται στο μηχανισμό της αγγειογένεσης (όπως αποδείχθηκε από διάφορα πειραματικά μοντέλα, αλλά και από τη μελέτη διαφόρων νεοπλασμάτων του ανθρώπινου οργανισμού):

αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF),

παράγοντας επάγων την υποξία 1α και 2α (HIF-1α/HIF-2α),

αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας/ Φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP), και

θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1).

3) Η συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, με γνώμονα ιστοπαθολογικές και κλινικές παραμέτρους: βαθμός κακοηθείας, στάδιο νόσου, πρώτη εμφάνιση του νεοπλάσματος ή υποτροπή, μονήρης ή πολυεστιακή εντόπιση, συνύπαρξη ενδοεπιθηλιακού (in situ) καρκινώματος, πορεία της νόσου, δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 και PCNA.

4) Η συσχέτιση μεταξύ τους για την πιθανή εμπλοκή τους στον πολύπλοκο μηχανισμό της αγγειογένεσης και την ανάδειξη πιθανής προγνωστικής αξίας.



2. Υλικό και μέθοδος

Το υλικό μας αποτέλεσαν 149 καρκινώματα ουροδόχου κύστης, τα οποία εξαιρέθηκαν κατά τη χρονική περίοδο Μάιος 1997- Αύγουστος 2000 στην Ουρολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα Ιωαννίνων και διαγνώστηκαν ιστολογικά στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του ίδιου Νοσοκομείου. Όλα τα νεοπλάσματα ήταν εκ μεταβατικού επιθηλίου, ενώ η ιστολογική διαφοροποίηση εκτιμήθηκε με βάση την ταξινόμηση WHO 1999 [22], και η σταδιοποίηση έγινε κατά το σύστημα TNM, όπως προσδιορίστηκε το 1997 από την AJCC/UICC [25]. Από το υλικό που μελετήσαμε, 3 από τα δείγματα (ποσοστό 2%) ήταν από παρασκευάσματα ολικής κυστεκτομής, ενώ 146 από αυτά (ποσοστό 98%) ήταν βιοπτικό υλικό από διουρηθρική αφαίρεση του νεοπλάσματος. Είκοσι επτά από τα περιστατικά αντιστοιχούσαν σε γυναίκες, ενώ 115 σε άντρες (ποσοστό 12,8% και 87,2% αντίστοιχα) (Πίνακας B1). Οι ασθενείς κατά τη διάγνωση είχαν ηλικίες από 27 έως 89 έτη, με μέσο όρο ηλικίας 66,8 έτη. Η ιστολογική ταξινόμηση έδειξε ότι 5 από το σύνολο των ουροθηλιακών καρκινωμάτων ήταν grade I, 76 grade II και 61 grade III (ποσοστά 3,5%, 53,5% και 43% αντίστοιχα) (Πίνακας B). Η κλινική σταδιοποίηση της νόσου έδειξε ότι 72 εξ αυτών ήταν pT_a, 55 pT₁ και 15 pT₂₋₄ (ποσοστά 50%, 38,7% και 10,6% αντίστοιχα) (Πίνακας B3). Σε 21 περιπτώσεις διαπιστώθηκε και θέση *in situ* καρκινώματος (Πίνακας B4). Πολυεστιακή εντόπιση του νεοπλάσματος διαπιστώθηκε σε ποσοστό 47,1% (66 εκ των περιστατικών), ενώ στο 52,9% (σε 74 δηλαδή περιπτώσεις) η εντόπιση ήταν μονήρης (Πίνακας B5). Στη μελέτη καταγράφηκαν επίσης η ιστολογικώς αποδεικνυόμενη υποτροπή και η εξέλιξη (διήθηση του μυϊκού χιτώνα) της νόσου. Κατά την παρακολούθηση των ασθενών (βλέπε πιο κάτω) υποτροπή της νόσου παρατηρήθηκε σε 25 περιπτώσεις, ποσοστό 17,6%, ενώ δεν παρατηρήθηκε υποτροπή στις 116, ποσοστό 82,4% (Πίνακας B6). Εξέλιξη της νόσου παρατηρήθηκε σε 8 περιστατικά (ποσοστό 5,3%). Το χρονικό διάστημα που εμφανίστηκε υποτροπή της νόσου μετά τη θεραπεία ήταν από 3 έως 68 μήνες μετά τη θεραπεία με μέσο όρο 12 μήνες. Οκτώ εξ αυτών εξελίχθηκαν σε διηθητικά καρκινώματα, ενώ 113 έμειναν όπως εμφανίστηκαν αρχικά (ποσοστά 5,4% και 75,8% αντίστοιχα). Εξέλιξη της νόσου είχαμε σε χρονικό διάστημα 3 έως 69 μήνες αργότερα με μέσο όρο 31 μήνες. (Πίνακας B7).



Πίνακας Β1-φύλο

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	γυναίκες	27	18.1
	Άντρες	115	77.2
εκτός		7	4.7
σύνολο		149	100

Πίνακας Β2- ιστολογική ταξινόμηση

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	1.00	5	3.4
	2.00	76	51.0
	3.00	61	40.9
	σύνολο	142	95.3
εκτός	σύστημα	7	4.7
σύνολο		149	100.0

Πίνακας Β3-σταδιοποίηση

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	Pa	72	48.3
	P1	55	36.9
	P2-4	15	10.1
	σύνολο	142	95.3
	εκτός	σύστημα	7
σύνολο		149	100.0

Πίνακας Β4-in situ ή όχι καρκίνωμα

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	απουσία in situ	121	81.2
	Συν/ξη in situ	21	14.1
	σύνολο	142	95.3
εκτός	σύστημα	7	4.7
σύνολο		149	100.0

Πίνακας Β5-πολυεστιακή ή μονοεστιακή νόσος

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	μονοεστιακή	74	49.7
	πολυεστιακή	66	44.3
	σύνολο	140	94.0
εκτός	σύστημα	9	6.0
σύνολο		149	100.0

Πίνακας Β6-υποτροπή

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	.00	1	.7
	πρωτοπαθή	116	77.9
	υποτροπή	25	16.8
	σύνολο	142	95.3
εκτός	σύστημα	7	4.7
σύνολο		149	100.0



Πίνακας Β7-εξέλιξη σε διηθητικό

		Συχνότητα	Επί της εκατό
ισχύοντα	Χωρίς	105	70.5
	εξέλιξη	8	5.4
	σύνολο	113	75.8
εκτός	σύστημα	36	24.2
σύνολο		149	100.0

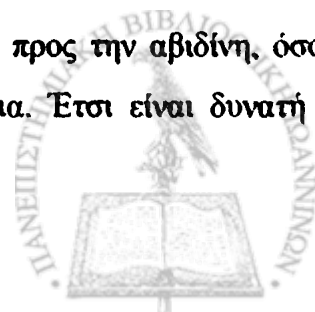
Από τα 149 περιστατικά της παρούσας μελέτης τα 127 ήταν επιφανειακά καρκινώματα (pTa, pT1). Από τα 127 τα 106 διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες. Η 1^η ομάδα αντιμετωπίστηκε μόνο με διουρηθρική αφαίρεση (42 ασθενείς) ενώ στη 2^η έγινε επιπρόσθετη χορήγηση ιντερφερόνης-γ, 0.7 mg εβδομαδιαίως για 8 εβδομάδες (64 ασθενείς).

Υπήρξε τακτική κλινική παρακολούθηση των ασθενών αυτών με κλινική εξέταση, βιοχημικό έλεγχο, ακτινογραφία θώρακα και κυστεοσκόπηση, στους 3, 6, 9 και 12 μήνες κατά το πρώτο έτος, και κάθε 6 μήνες τα επόμενα έτη, με μέσο χρόνο παρακολούθησης 38,6 μήνες.

Η παρασκευή των υλικών έγινε βάσει της προτεινόμενης μεθόδου από το εργαστήριο Ackerman [197], το οποίο, όπως αναφέρει, στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στο εγχειρίδιο Gross Room Manual του παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Νοσοκομείου Barnest του St. Louis. Η μονιμοποίηση των υλικών έγινε σε διάλυμα φορμόλης 10%. Από τα παρασκευάσματα ολικής κυστεκτομής ελήφθησαν τουλάχιστον τρεις τομές από την περιοχή του νεοπλάσματος, οι οποίες κατάλαμβάναν όλο το πάχος του τοιχώματος της κύστης. Ελήφθησαν επίσης τομές και από οποιοσδήποτε άλλες θέσεις ήταν ύποπτες για δυσπλασία, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ή και δεύτερη εντόπιση νεοπλάσματος, καθώς και από τον αυχένα, το κυστικό τρίγωνο και όλες τις άλλες περιοχές που προϋποθέτει το πρωτόκολλο. Το βιοπτικό υλικό από διουρηθρική αφαίρεση επεξεργάστηκε εξ ολοκλήρου, με εγκλεισμό σε block παραφίνης και ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης. Ακολούθησε μικροσκοπική εκτίμηση, ενώ στα περιστατικά που υπήρχε αμφιβολία διηθητικής ανάπτυξης ακολούθησε περαιτέρω ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική διερεύνηση.

Ακολούθησε επιλογή αντιπροσωπευτικής τομής από το κάθε περιστατικό και πάρθηκαν τομές 3-5 μm από τους αντίστοιχους κύβους παραφίνης, όπου έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση με τη μέθοδο του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης.

Η εν λόγω τεχνική βασίζεται στην υψηλή συγγένεια της βιοτίνης προς την αβιδίνη, όσον αφορά τη δέσμευση της υπεροξειδάσης στο πρωταρχικό αντίσωμα. Έτσι είναι δυνατή η



εύκολη αναγνώριση με το κοινό μικροσκόπιο της έκφρασης του μελετώμενου αντιγόνου σε τομές παραφίνης, εφόσον προστεθεί ένας ιστοχημικά γνωστός δείκτης/αντίσωμα έναντι του άγνωστου αντιγόνου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ της αβιδίνης και της βιοτίνης. Αρχικά προστίθεται το πρωταρχικό αντίσωμα, ειδικό για την αναγνώριση του αντιγόνου που ανιχνεύουμε. Κατόπιν προστίθεται το δευτερεύον αντίσωμα, που φέρει βιοτίνη και έχει την ικανότητα πρόσδεσης στο πρωτεύον, πρωταρχικό αντίσωμα. Τέλος προστίθεται ένα σύμπλοκο υπεροξειδάσης- αβιδίνης- βιοτίνης. Οι ελεύθερες θέσεις της αβιδίνης προσδένονται στη βιοτίνη του δευτερεύοντος αντισώματος. Τα πρωταρχικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, η προέλευση και η αραίωση τους φαίνονται στον πίνακα Β8.

Πίνακας Β8. Χρησιμοποιούμενα αντισώματα, προέλευση, κλώνος, αραίωση, χρόνος επώασης

Αντίσωμα	Προέλευση	Κλώνος	Αραίωση	Χρόνος Επώασης
CD34	Novocastra	QBEnd/10	1:50	1 ώρα
VEGF	Neomarker	JH121	1:50	1 ώρα/ με φούρνο μικροκυμάτων
PD-ECGF/TP	Neomarker	P-GF.44C	1:800	Ολονύκτιο/ με φούρνο μικροκυμάτων
TSP-1 (A6.1)	DBS	A6.1	1:30	30 λεπτά/ με φούρνο μικροκυμάτων
HIF-1α	Santa Cruz Biotechnology	sc-13515 (28b)	1:150	Ολονύκτιο/ με φούρνο μικροκυμάτων (αλκαλικό pH)
HIF-2α	Abcam	Ab8365	1:3000	Ολονύκτιο/ με φούρνο μικροκυμάτων (αλκαλικό pH)



Ki-67	Dako	MIB-1 (M0722)	1:10	1 ώρα
PCNA	Dako	M0879	1:50	1 ώρα

Αναλυτική περιγραφή της μεθόδου αβιδίνης-βιοτίνης:

- Τομές παραφίνης πάχους 3-5 μm , τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοκρασίας 55-60° C κατά την διάρκεια της προηγούμενης νύκτας, για να αποπαραφινωθούν.
- Αποπεράτωση της αποπαραφίνωσης με εμβύθιση των τομών σε ξυλόλη θερμοκρασίας 55-60° C για 20 λεπτά.
- Τοποθέτηση σε ξυλόλη θερμοκρασίας δωματίου για 10 λεπτά.
- Τοποθετούμε τα πλακάκια σε μίγμα ξυλόλης και αλκοόλης 100% για 2 λεπτά.
- Περνάμε τα πλακάκια σε απόλυτη αιθανόλη (100%) για 1 λεπτό.
- Συνεχίζουμε την κατιούσα ενυδάτωση διαδοχικά με: αιθανόλη 96%, αιθανόλη 96% και τέλος σε αποσταγμένο νερό (DW) *.
- Τοποθετούμε τα πλακίδια μέσα σε διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης (500 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου - H_2O_2 - 30% σε 50 ml μεθανόλης) 30 λεπτά στον αναδευτήρα.
- Εκτύλιξη, 3 φορές σε αποσταγμένο νερό (DW).
- Εκτύλιξη με διάλυμα TBS για 10 λεπτά (TBS: 20g NaCl, 1,5g Tris σε 2,5lt dH_2O και pH 7,6).
- Ενσταλάζουμε 2-3 σταγόνες πρωταρχικού αντισώματος (primary antibody), στην αραιώση, την οποία έχουμε σταντάρει, έτσι ώστε να καλύψει πλήρως την τομή, και το αφήνουμε να δράσει όσο χρόνο καθορίζει το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος.
- Εκτύλιξη με διάλυμα TBS για 10 λεπτά.
- Προστίθενται δύο σταγόνες Envision Kit. Επώαση για 30 λεπτά.
- Εκτύλιξη με διάλυμα TBS για 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε 4-5 σταγόνες (100 μl) από το διάλυμα του χρωμογόνου (DAB) και το επώαζουμε, έως ότου ο ιστός αποκτήσει σκούρο καφέ χρώμα (5-15 λεπτά).
- Εκτύλιξη με διάλυμα αποσταγμένου νερού (DW) για 10 λεπτά.
- Χρώση με αιματοξυλίνη (Harris) 10% για 2 λεπτά.
- Εκτύλιξη με νερό βρύσης για 1 λεπτό.



- Εμβάπτιση των πλακιδίων διαδοχικά σε διαλύματα αιθανόλης 96%, 96%, 100%, 100%, ξυλόλης και ξυλόλης (ανιούσα οδός).
- Επικάλυψη των πλακιδίων με καλυπτρίδες.

* Σε περιπτώσεις που η κλασική μέθοδος δεν αποδίδει, χρησιμοποιούμε κάποιες παραλλαγές της μεθόδου αυτής, όπως διαφορετικό χρόνο επώασης, ή χρήση φούρνου μικροκυμάτων (350W για 30 λεπτά), πριν το στάδιο της εμβύθισης των τομών σε απόλυτη μεθανόλη αναμεμιγμένη με H_2O_2 , που έχει σκοπό τη δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης.

2.1. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου

Η εκτίμηση των πλακιδίων έγινε με μικροσκόπιο Olympus BH2, με φακούς της ίδιας εταιρείας, D plan 40x, 100x, 200x και 400x.

Η αξιολόγηση κάθε χρώσης έγινε τυφλά, από δύο παθολογοανατόμους.

2.2. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Superior Performance Software System- έκδοση 11.5). Οι διάφοροι ανοσοϊστοχημικοί παράγοντες και τα κλινικά στοιχεία (ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης, στάδιο νόσου, υποτροπή, καθώς και η εξέλιξη του νεοπλασματος σε διηθητικό κ.λ.π.) αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους με το χ^2 test. Οι συσχετίσεις της έκφρασης των διαφόρων βιολογικών δεικτών που μελετήθηκαν έγιναν με μονοπαραγοντική (log rank test) και πολυπαραγοντική (Cox proportional hazards) μέθοδο ανάλυσης. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν $p \leq 0,05$ και λίαν σημαντικά όταν $p \leq 0,001$. Ο χρόνος ελεύθερης νόσου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier.



3. Αποτελέσματα

3.1.α. Η έκφραση του αντιγόνου CD34 για την εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης:

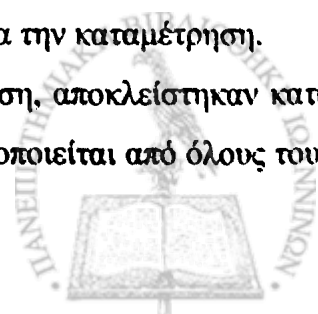
Για την εκτίμηση του νεοαγγειακού δικτύου ακολουθήθηκαν πρωτόκολλα κοινής αποδοχής για τη μελέτη της νεοαγγειογένεσης συμπαγών νεοπλασμάτων [78, 127, 142, 148]. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο που ανέπτυξε ο Weidner και οι συνεργάτες του το 1991 [142], ελαφρά τροποποιημένη, σύμφωνα με τις ιδιαίτερες απαιτήσεις της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, για την ανάδειξη του αγγειακού δικτύου χρησιμοποιήσαμε τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη CD34, ο οποίος θεωρείται, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ως ο πλέον αξιόπιστος (ή δεύτερος σε αξιοπιστία κατά άλλους) δείκτης, αφού εκφράζεται κυρίως από μικρά και λιγότερο από μεγάλα αγγεία, με βασικό μειονέκτημα αυτού έναντι του CD31, ότι ο πρώτος εκφράζεται και από το λεμφαγγειακό δίκτυο. Έχει όμως το πλεονέκτημα ότι εκφράζεται από μικρότερο πληθυσμό κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος (αρχέγονα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος), ενώ το CD31 εκφράζεται και από μεγακαρυοκύτταρα, αιμοπετάλια, ενίοτε δε από πλασματοκύτταρα, από Β λεμφοκύτταρα του μανδύα, περιφερικά T λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα [75, 127, 128, 130, 131, 139, 140].

Ποιοτική εκτίμηση: Το αντιγόνο εκφράστηκε τόσο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και από κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος.

Εσωτερικός μάρτυρας δεν χρειάστηκε, αφού τα περισσότερα αγγεία είναι εμφανή με την αιματοξυλίνη που χρησιμοποιούμε στη μέθοδο αβιδίνης-βιοτίνης, οπότε εάν ήταν πλήρως αρνητικό το πλακίδιο, ενώ ήταν εμφανή αγγεία με την αιματοξυλίνη, επαναλαμβάνονταν η χρώση.

Ποσοτική εκτίμηση: Η πυκνότητα της νεοαγγειογένεσης εκτιμήθηκε με προσεκτική μελέτη κάθε πλακιδίου σε μικρότερη μεγέθυνση (40x), προκειμένου να επισημανθούν οι περιοχές με το μεγαλύτερο αριθμό μικρών αγγείων («θερμές περιοχές - hot spots»). Εντοπιζόταν η πιο θερμή περιοχή και ακολούθως χρησιμοποιούνταν μεγαλύτερη μεγέθυνση (400x), στην οποία πραγματοποιούνταν καταμέτρηση των αγγείων. Αυτό επαναλαμβάνονταν άλλες 2 φορές τουλάχιστον, ή όπου υπήρχε αμφιβολία περισσότερες, τελικά όμως στη μελέτη, λαμβάνονταν υπόψη πάντοτε τα τρία πιο αγγειοβριθή σημεία κάθε περιστατικού για την καταμέτρηση.

Περιοχές με έντονη φλεγμονή, αιμορραγική διήθηση ή νέκρωση, αποκλείστηκαν κατά το δυνατόν από την επιλογή της καταμέτρησης (τακτική που χρησιμοποιείται από όλους τους



ερευνητές), και επιλέχθηκαν περιοχές που έρχονταν σε επαφή με την lamina propria του νεοπλασματος (μέθοδος παρόμοια με αυτήν που χρησιμοποίησε ο Dinney και οι συνεργάτες του για πρώτη φορά το 1998 [148]).

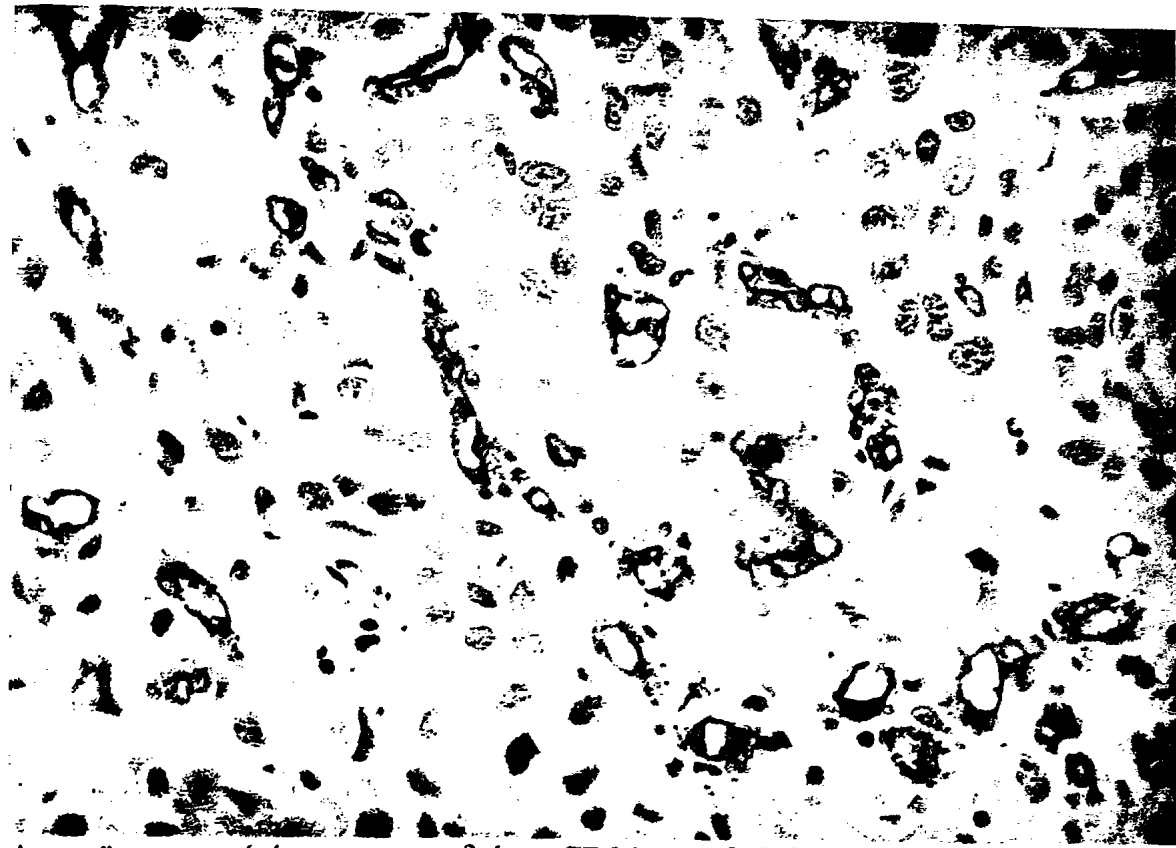
Αναγνωρίστηκε και επισημάνθηκε ως αγγείο, ο,τιδήποτε είχε χρωσθεί, περιλαμβανομένων, τόσο των μικροαγγείων με αυλό (το μέγεθος του οποίου να μην υπερβαίνει σε χωρητικότητα τα 8 ερυθρά αιμοσφαίρια), αλλά και μεμονωμένων κυττάρων που δεν έρχονταν σε επαφή με αγγεία, τα οποία στην πραγματικότητα ήταν είτε μεμονωμένα ενδοθηλιακά, είτε νεοπλασματικά ή στρωματικά κύτταρα που απλώς εξέφραζαν το αντίσωμα. Όλα αυτά εκτιμήθηκαν ως αγγεία. Δηλαδή δεν θεωρήθηκε απαραίτητο να αναγνωριστεί αυλός ή ενδοαυλικά έμμορφα στοιχεία του αίματος. Μεμονωμένα ερυθρά ή λευκά αιμοσφαίρια, ή αθροίσεις έμμορφων στοιχείων ή ινικής, χωρίς την εμφανή παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, δεν εκλήφθηκαν ως αγγεία και δεν συμπεριλήφθηκαν στη μέτρηση. Η εκτίμηση γινόταν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και όπου υπήρχε μεγάλη διαφωνία (>25%) επαναλαμβανόταν από τρίτο μελετητή.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι για τη μελέτη της αγγειακής πυκνότητας αρχικά χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοϊστοχημικός δείκτης, Παράγων VIII, ο οποίος εν συνεχεία απορρίφθηκε, γιατί δεν εκφραζόταν από όλα τα μικρά αγγεία. Ακολούθως η ανάδειξη και μέτρηση των αγγείων έγινε με τον παράγοντα CD34 εκτιμώντας πέντε θέσεις ως θερμά σημεία, και τελικά καταλήξαμε στην καταμέτρηση των τριών πιο θερμών περιοχών.

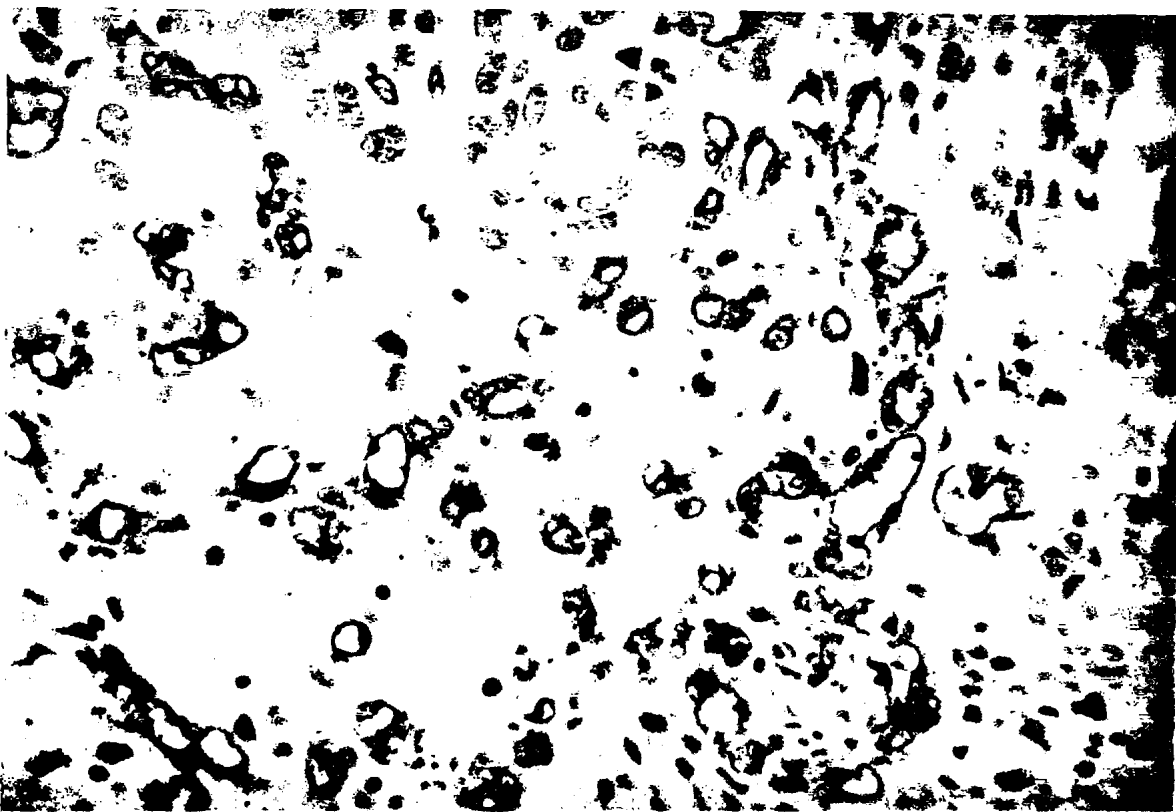
Ιδιαίτερη εντύπωση προξένησε η έκφραση του αντιγόνου από επιθηλιακά νεοπλασματικά κύτταρα, σε λίγα όμως περιστατικά (3 από τα 112 που εκτιμήθηκαν, ποσοστό 2,68%).

Αποτελέσματα -Στατιστική ανάλυση: Από το σύνολο των 149 περιστατικών που μελετήσαμε, εκτιμήσαμε την μικροαγγειακή πυκνότητα στα 112 από αυτά. Ο απόλυτος αριθμός των αγγείων ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης (400x) κυμάνθηκε από 4 έως 58,4 με μέσο όρο 18,6. Η στατιστική συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικά στοιχεία έδειξε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση της MVD στα ουροθηλιακά καρκινώματα ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (grade) II με III της τάξεως $p=0,004$ (Σχήμα Β1). Δεν βρέθηκε αξιόλογη στατιστική διαφορά μεταξύ των άλλων συνδυασμών, δηλαδή του ιστολογικού grade I με II και I με III.



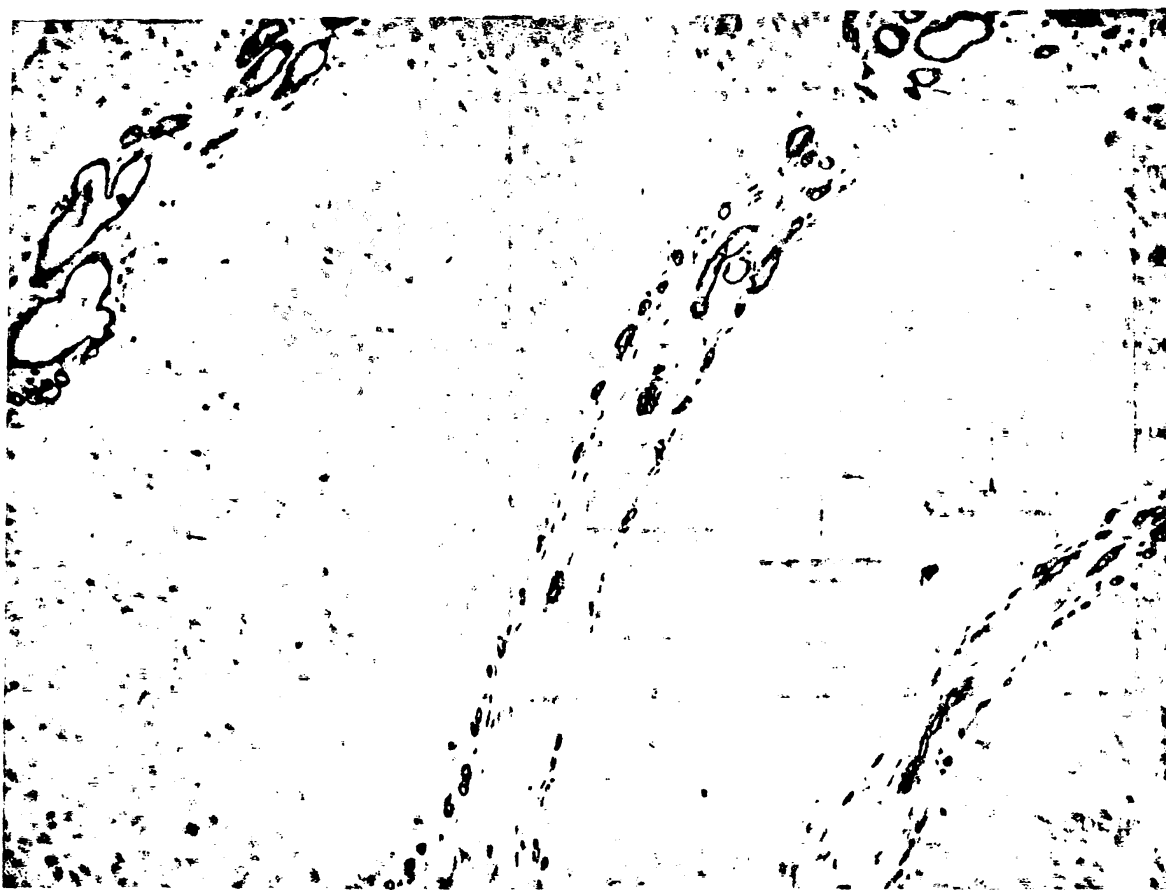


Ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη CD34 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)



Ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη CD34 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)





Ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη CD34 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

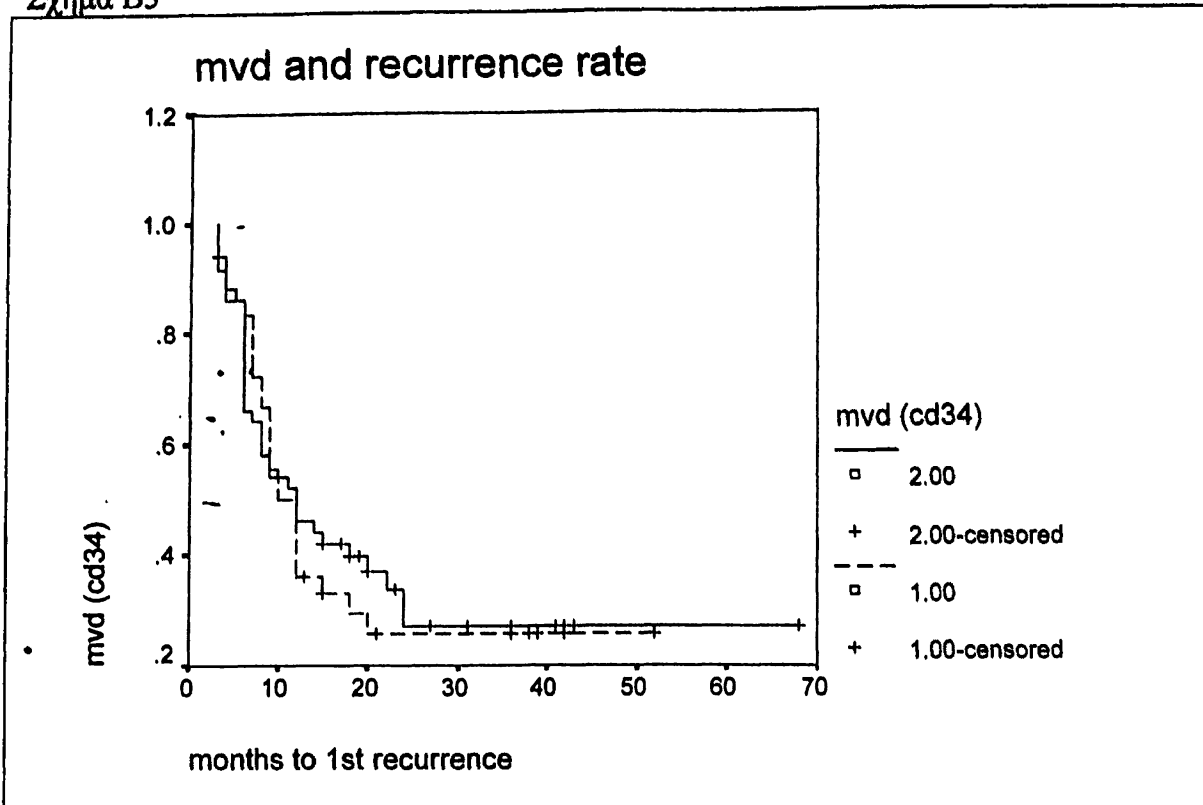
Η συσχέτιση της MVD μεταξύ διαφορετικού σταδίου νόσου έδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ pTα και pT1 ($p=0,004$), στατιστικώς λίαν σημαντική μεταξύ pTα και pT2-4 ($p < 0,001$), και, τέλος, σημαντική μεταξύ pT1 και pT2-4 ($p=0,002$). Η έκφραση της MVD σε σχέση με το στάδιο της νόσου φαίνεται στο σχήμα B2.

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της μικροαγγειακής πυκνότητας με πολυεστιακή εντόπιση της νόσου ($p=0,012$). Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα είχαμε με τις άλλες κλινικές παραμέτρους που μελετήσαμε, δηλαδή την εξέλιξη (progression) της νόσου σε διηθητικό, τη συνύπαρξη *in situ* καρκινώματος ή όχι, και την ηλικία των ασθενών.

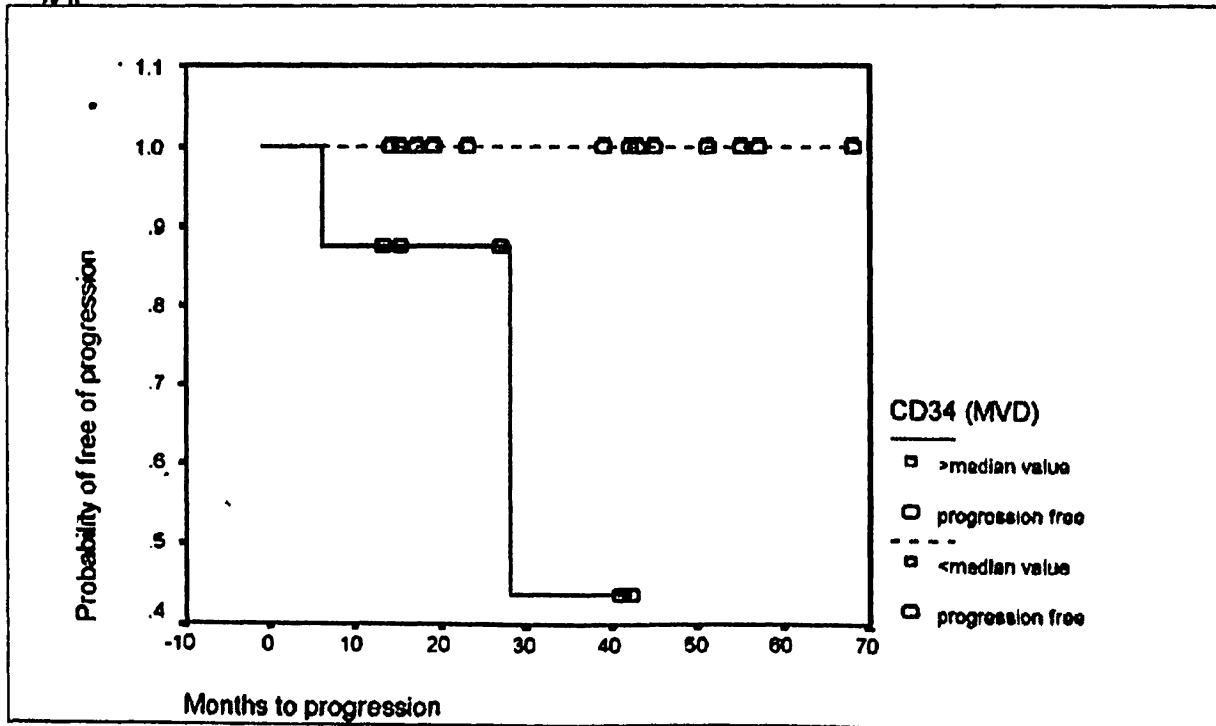
Η μελέτη της υποτροπής της νόσου ανάλογα με την μικροαγγειακή πυκνότητα δεν έδειξε αξιόλογα αποτελέσματα (καμπύλη Kaplan-Meier, σχήμα B3), ενώ η μελέτη σε 103 από το σύνολο των επιφανειακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης έδειξε σημαντική διαφορά στην εξέλιξη των grade III καρκινωμάτων σε διηθητικά τα οποία είχαν αγγειακή πυκνότητα πάνω από το μέσο όρο ($p=0,0068$) (σχήμα B4).



Σχήμα Β3



Σχήμα Β4



Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε στα επιφανειακά καρκινώματα μεταξύ της MVD και του VEGF παράγοντα ($p=0,0019$).



Η συσχέτιση της MVD με τον παράγοντα επάγοντα την υποξία 1α (HIF-1α) ήταν στατιστικώς λίκαν σημαντική ($p=0,001$). Επίσης στατιστικώς λίκαν σημαντική συσχέτιση της MVD διαπιστώθηκε με τον αιμοπεταλιακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα/ φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP) στην έκφραση των πυρήνων του νεοπλάσματος PD-ECGF/TP_n ($p<0,001$), του κυτταροπλάσματος PD-ECGF/TP_c ($p<0,001$) αλλά και του στρώματος PD-ECGF/TP_{str} ($p<0,001$). Στατιστικώς σημαντική επίσης ήταν η σχέση της MVD με την έκφραση της Θρομβοσπονδίνης ($p=0,006$). Τέλος, στατιστικώς λίκαν σημαντική ήταν η συσχέτιση και με τους δύο δείκτες πολλαπλασιασμού, Ki-67 ($p<0,001$) και PCNA ($p<0,001$).

3.1.β. Η έκφραση του αντιγόνου VEGF:

Ο κλώνος του αντιγόνου VEGF που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη ήταν ο JH121 της εταιρίας «Neomarkers», ο οποίος αναδεικνύει τον υπότυπο VEGF₁₂₁. Ο τελευταίος, όπως αναφέραμε στο γενικό μέρος, μαζί με τον VEGF₁₆₅ είναι οι συχνότεροι τύποι VEGF που συναντούμε σε νεοπλασματικούς ιστούς. Έχει βρεθεί σε διάφορες μοριακές μελέτες ότι ο υπότυπος αυτός αποτελεί το 75% του συνόλου του mRNA του VEGF σε καρκινώματα ουροδόχου κύστης [126,154,185,228].

Ποιοτική εκτίμηση: Η έκφραση του παράγοντα VEGF ήταν κυτταροπλασματική, καθώς και στην κυτταρική επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων, ενώ εσωτερικό μάρτυρα αποτέλεσαν φλεγμονώδη κύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα/ ιστιοκύτταρα [156,183]. Παρά το γεγονός ότι το αντίσωμα αυτό εκφράζεται και από το στρώμα σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρεία, στην δική μας μελέτη δεν παρατηρήθηκε.

Ποσοτική εκτίμηση: Για την εκτίμηση του παράγοντα VEGF χρησιμοποιήσαμε συνδυασμό δύο παραμέτρων, της έντασης και έκτασης της έκφρασης του αντιγόνου. Πρόκειται για μία μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές από το 1995 [449]. Ως προς την ένταση της χρώσης οι περιπτώσεις κατατάχθηκαν σε 5 κατηγορίες-διαβαθμίσεις:

0 = Αρνητική χρώση: τα κύτταρα δεν εμφανίζουν οποιαδήποτε χρωστικότητα.

1 = Ασθενώς θετική χρώση.

2 = Μέτρια θετική χρώση.

3 = Έντονη θετική χρώση.

4 = Πολύ έντονα θετική χρώση.



Ως προς την έκταση της έκφρασης του αντιγόνου από τα νεοπλασματικά κύτταρα, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 ομάδες, ανάλογα με το % ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων.

0 = 0%

1 = 1-25%

2 = 26-50%

3 = 51-75%

4 = 76-100%

Το άθροισμα της ποσοτικής και ποιοτικής έκφρασης του δείκτη κυμαίνεται από μηδέν (το ελάχιστο) έως οκτώ (το μέγιστο). Αυτό ακολούθως το κατατάξαμε σε 4 ομάδες:

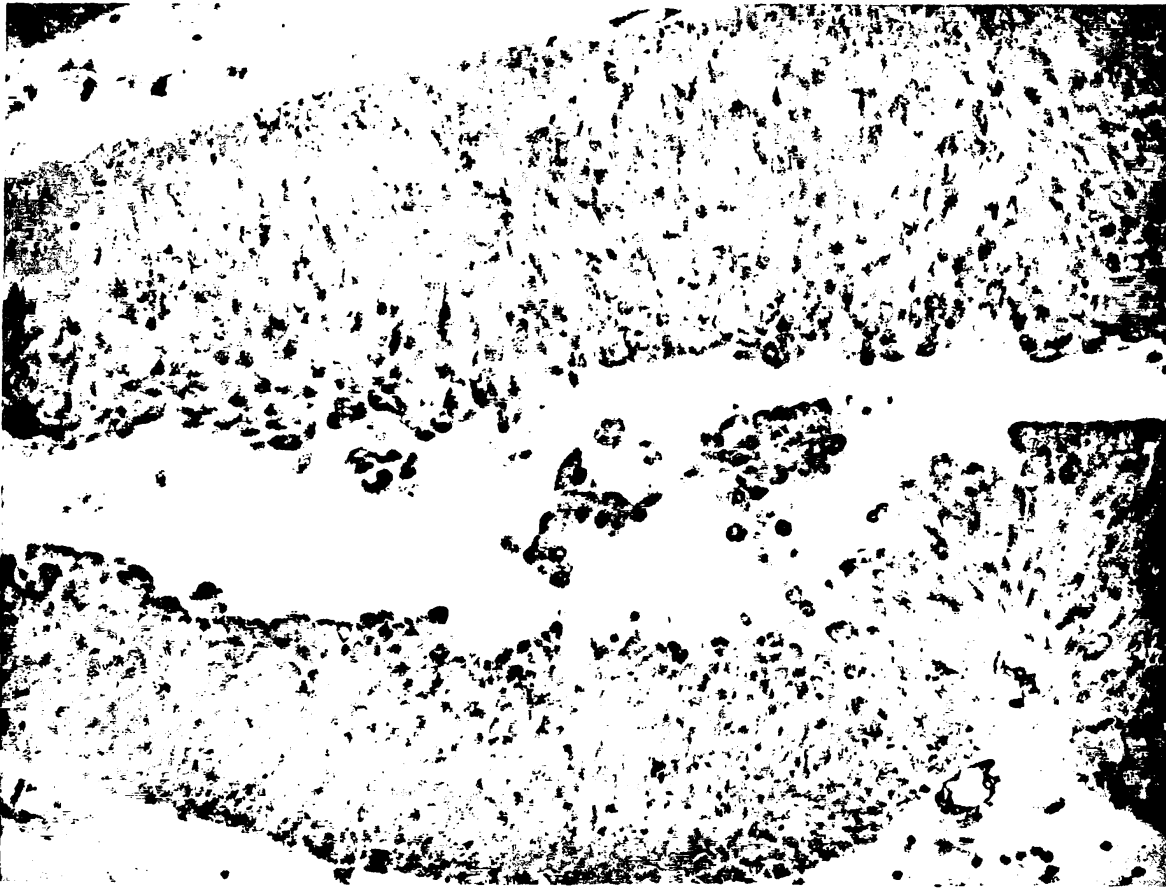
(-) Αρνητικό, άθροισμα 0.

(+) Ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 1-2.

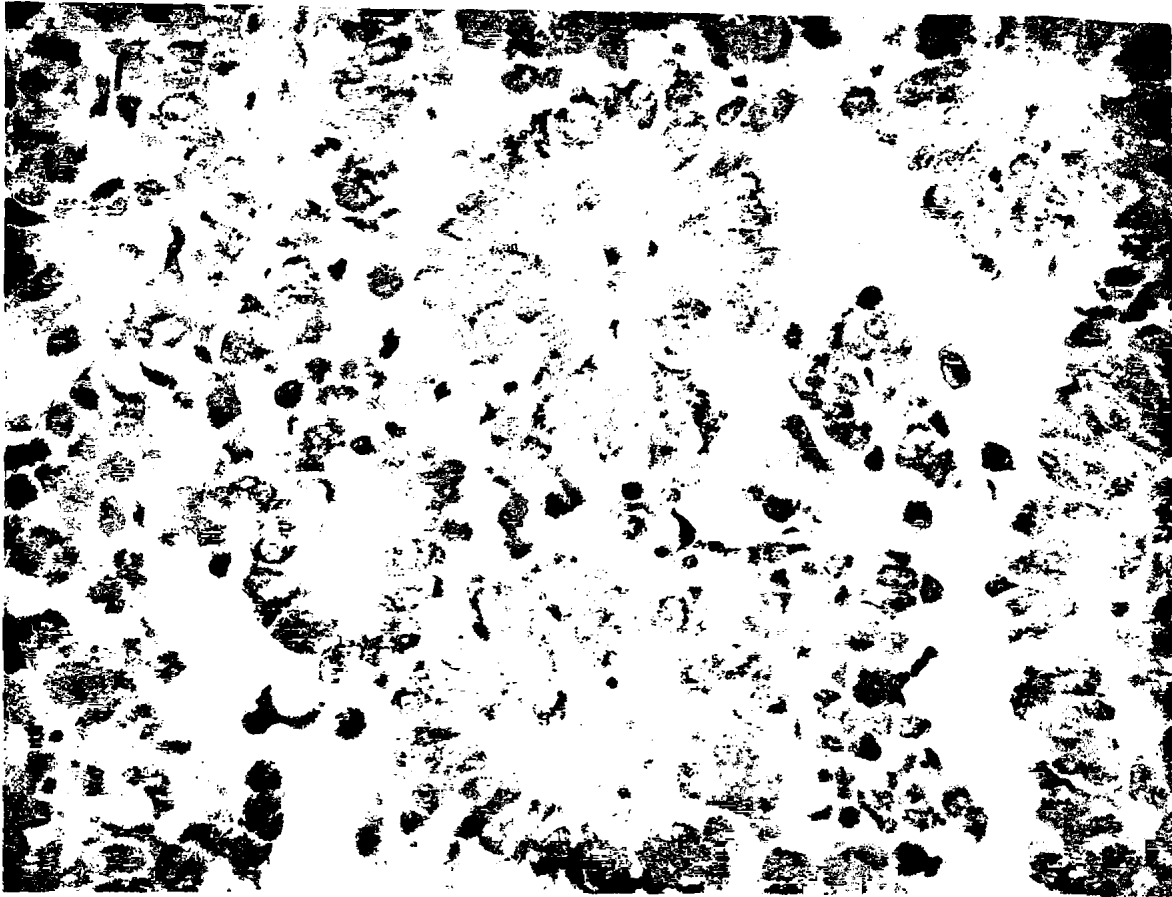
(++) Μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 3-4.

(+++) Έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 5-8.

Στην παρούσα μελέτη θεωρήσαμε θετικά όσα είχαν δύο ή τρεις σταυρούς.



Έντονη κυτταροπλασματική έκφραση του δείκτη VEGF σε ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

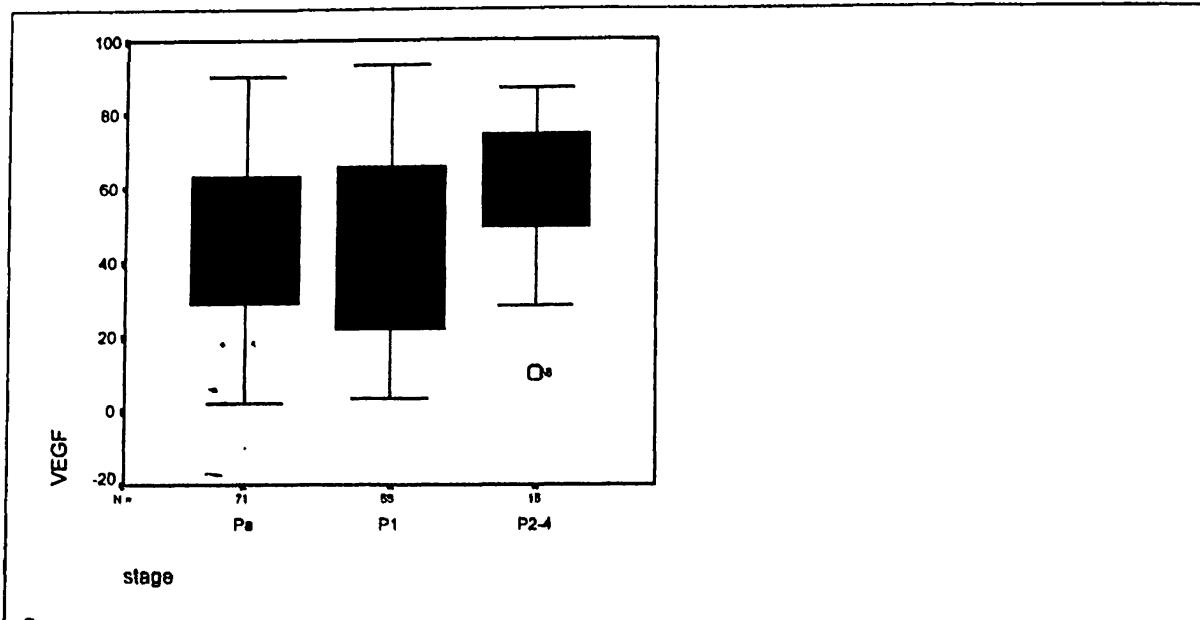


Κυτταροπλασματική έκφραση του δείκτη VEGF σε ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)

Αποτελέσματα -Στατιστική ανάλυση: Από το σύνολο των 149 περιστατικών θεωρήσαμε ως αξιόπιστη τη χρώση στα 141. Από αυτά τα 119 ήταν θετικά, ενώ τα 22 αρνητικά (ποσοστά 84,4% και 15,6% αντίστοιχα). Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση όσον αφορά την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) παρατηρήθηκε με το στάδιο της νόσου. Διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των σταδίων της νόσου pTα και pT1 ($p=0,042$), καθώς επίσης μεταξύ των pTα και pT2-4 ($p=0,044$). Μεταξύ των σταδίων pT1 και pT2-4 η συσχέτιση ήταν της τάξεως $p=0,08$ (στατιστικώς μη σημαντική). Στο σχήμα B5 φαίνεται ο μέσος όρος της έκφρασης του παράγοντα στα διάφορα στάδια της νόσου. Στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση βρέθηκε με το μέγεθος του νεοπλασματος (μεγαλύτερα ή μικρότερα των 3 εκατοστών) με $p=0,001$. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF με τη μικροαγγειακή πυκνότητα, αλλά και με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους, όπως τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης των καρκινωμάτων, την πολυεστιακότητα, τη συνύπαρξη ή όχι καρκινώματος *in situ*, την εξέλιξη (progression) ή την υποτροπή του νεοπλασματος και με την ηλικία των ασθενών.

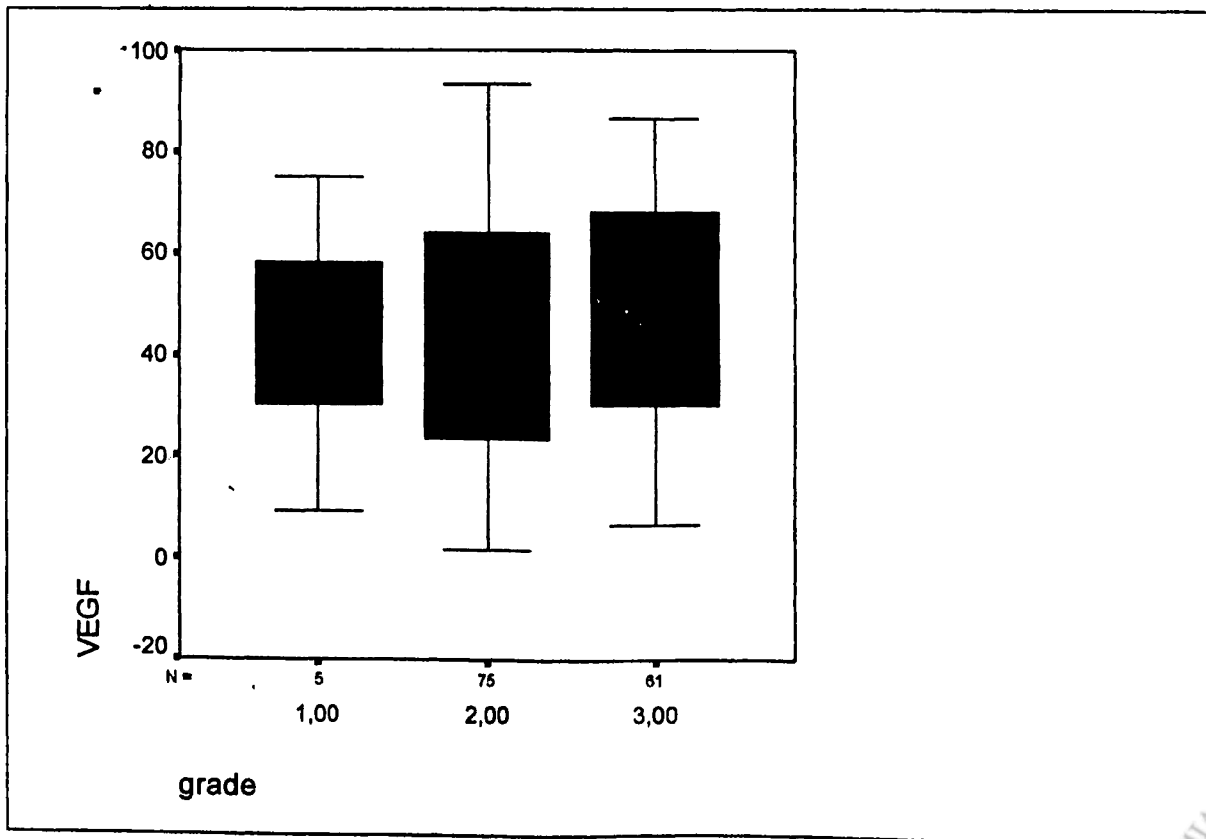


Σχήμα Β5



Στο σχήμα Β6 φαίνεται ο μέσος όρος έκφρασης του παράγοντα σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος.

Σχήμα Β6



Όσον αφορά τους άλλους παράγοντες που μελετήσαμε, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF με τη στρωματική έκφραση του PD-ECGF/TP_{str} ($p=0,024$), όπως επίσης και με την στρωματική έκφραση της TSP-1_{str} ($p=0,001$) καθώς και με το δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA ($p=0,002$). Κατά την μελέτη των 127 επιφανειακών καρκινωμάτων, που περιλαμβάνονταν στο υλικό μας, διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της MVD και της έκφρασης του παράγοντα VEGF ($p=0,0019$).

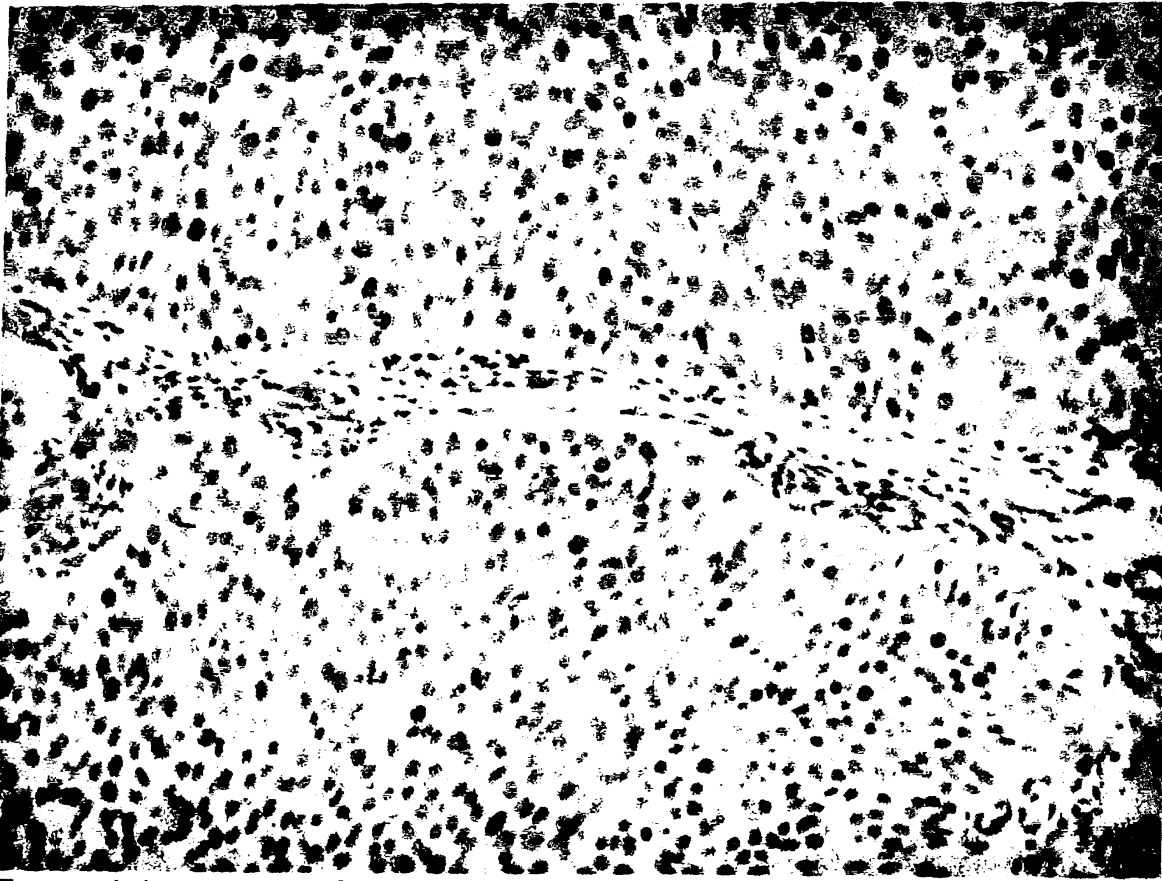
3.1.γ. Η έκφραση του αντιγόνου HIF-1α :

Για την ανάδειξη του παράγοντα επάγοντος την υποξία-1α (HIF-1α) χρησιμοποιήσαμε το μονοκλωνικό αντίσωμα της Santa Cruz, sc-13515 (28b). Απ'ό,τι φαίνεται στη βιβλιογραφία ο εν λόγω κλώνος δεν έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο. Ωστόσο διαπιστώνεται ότι σε κάποια νεοπλάσματα εκφράζεται αμιγώς από τους πυρήνες, ενώ σε κάποια άλλα εκφράζεται επιπλέον και από το κυτταρόπλασμα [187]. Περιστασιακό εύρημα ήταν η έκφρασή του από τα μακροφάγα που συνυπήρχαν στο νεόπλασμα. Πάντως δεν αναφέρεται προηγούμενη μελέτη του κλώνου αυτού σε καρκίνωμα ουροδόχου κύστης.

Ποιοτική εκτίμηση: Το αντίσωμα εκφράστηκε αποκλειστικά από πυρήνες νεοπλασματικών κυττάρων, αλλά και από τα μακροφάγα που συνυπήρχαν στο υλικό σε ορισμένα μόνο εκ των νεοπλασμάτων.

Ποσοτική εκτίμηση: Η αξιολόγηση των πλακιδίων έγινε ως ακολούθως: Εκτιμήσαμε το ποσοστό των πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων που εξέφρασαν την εν λόγω πρωτεΐνη σε κάθε περιστατικό. Ανάλογα με το ποσοστό των πυρήνων που είχαν θετική έκφραση κατατάχτηκαν σε τέσσερις ομάδες: **Αρνητικά (-)** όταν η έκφραση ήταν μικρότερη του 1% του συνόλου των πυρήνων, **μικρή έκφραση (+)** όταν η έκφραση κυμαινόταν από 1-10%, **μέτριου βαθμού έκφραση (++)** όταν είχαμε 10-50% θετικούς πυρήνες, και τέλος **ικανού βαθμού έκφραση (+++)**, όταν η έκφραση ήταν μεγαλύτερη του 50%. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα κατατάξαμε σε δύο ομάδες, αυτά που είχαν έκφραση < 10% και > 10% του συνόλου των πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων.





Πυρηνική έκφραση του δείκτη HIF-1a σε ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)



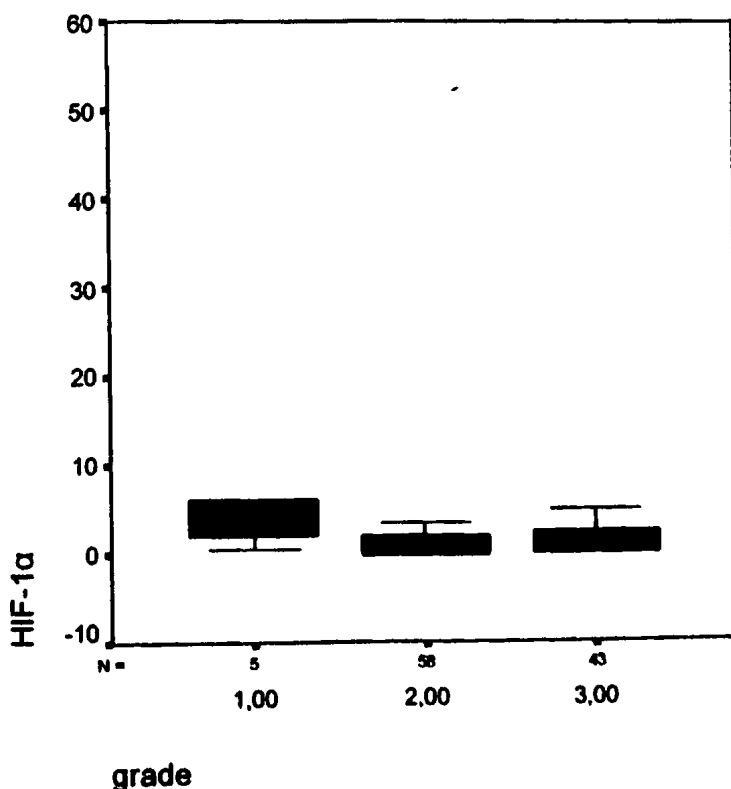
Πυρηνική έκφραση του παράγοντα HIF-1α σε ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

Αποτελέσματα- Στατιστική ανάλυση: Η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση του παράγοντα αυτού έγινε σε 112 από τα περιστατικά, με έκφραση να κυμαίνεται από 0% έως και 50%.

Από το σύνολο των 149 περιστατικών θεωρήσαμε ως αξιόπιστη την έκφραση της χρώσης στα 112. Από αυτά τα 52/112 είχαν μικρή έκφραση (<10% θετικά νεοπλασματικά κύτταρα) ποσοστό 46,4%, 10/112 είχαν μετρίου βαθμού θετική έκφραση (10-50% θετικά νεοπλασματικά κύτταρα) ποσοστό 8,9%, 2/112 -ποσοστό 1,8%- ήταν έντονα θετικά (>50% θετικά νεοπλασματικά κύτταρα), ενώ 48/112 -ποσοστό 42,9%- ήταν αρνητικά (<1% θετικά νεοπλασματικά κύτταρα) για την ανίχνευση του HIF-1α αντιγόνου.

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση υπήρξε μεταξύ της έκφρασης του HIF-1α και του ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης grade I με II ($p=0,021$), ενώ λίγο πιο πάνω από το όριο ήταν η συσχέτιση μεταξύ του grade I με III ($p=0,065$) (Σχήμα B7). Αξιόλογη στατιστική συσχέτιση μεταξύ του ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης grade II με III και των διαφόρων σταδίων της νόσου δεν διαπιστώθηκε.

Σχήμα B7



Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε στα νεοπλάσματα που συνυπήρχε in situ καρκίνωμα ($p=0,006$) αλλά και σε αυτά που εξελίχθηκαν σε διηθητικά (progression) ($p=0,048$). Στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτιση της έκφρασης του παράγοντα HIF-1α με τη μικροαγγειακή πυκνότητα ($p=0,017$) και με την στρωματική έκφραση του παράγοντα PD-ECGF/TPstr ($p=0,029$). Στατιστικώς σημαντική επίσης ήταν η συσχέτιση και με τους δύο δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0,023$) και PCNA ($p=0,002$).

3.1.δ. Η έκφραση του αντιγόνου HIF-2α :

Χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα ab8365 της Abcam, το οποίο προέρχεται από επίμυ. Μόνο τρεις αναφορές υπάρχουν από την κατασκευάστρια εταιρεία, για χρήση του εν λόγω αντισώματος, στις οποίες η έκφραση ήταν κυτταροπλασματική ή και πυρηνική, ανάλογα με το νεόπλασμα (μαστός και οισοφάγος), χωρίς να γίνεται καμία αναφορά για τον τρόπο έκφρασής του σε ουροθηλιακό καρκίνωμα. Αναφέρεται επίσης ότι παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση σε περιοχές υποξίας του νεοπλάσματος. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικός μάρτυρας τα μακροφάγα κύτταρα που διηθούν τον όγκο [187,192,448].

Ποιοτική εκτίμηση: Η έκφραση που παρατηρήθηκε στο ουροθηλιακό καρκίνωμα ήταν κυρίως κυτταροπλασματική HIF-2α_c. Σε λίγα περιστατικά διαπιστώθηκε έκφραση και από τους πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων, ενώ έκφραση συνυπήρχε και από τα κύτταρα του στρώματος HIF-2α_{str}, από λείες μυϊκές ίνες και από μακροφάγα. Σαφή επίταση της χρώσης είχαμε σε περιοχές του νεοπλασματικού ιστού γειτνιάζουσες νέκρωσης, εύρημα που αναφέρεται και στη βιβλιογραφία [187,209].

Ποσοτική εκτίμηση: Η εκτίμηση της έκφρασης του αντισώματος από το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων αξιολογήθηκε όπως και στις άλλες προαναφερθείσες χρώσεις στις οποίες διαπιστώθηκε έκφραση από το κυτταρόπλασμα (VEGF, PD-ECGF/TP_c και TSP-1_c) [449]. Ως προς την ένταση της χρώσης, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 κατηγορίες-διαβαθμίσεις (0=αρνητικό, 1= ασθενώς θετική χρώση, 2= μέτρια θετική χρώση, 3= έντονη θετική χρώση και 4= πολύ έντονα θετική χρώση). Ως προς την έκταση της έκφρασης του αντιγόνου από τα νεοπλασματικά κύτταρα, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 ομάδες ανάλογα με το % ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (0=0%, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75% και 4=76-100%). Τέλος, το άθροισμα αυτών το χωρίσαμε σε 4 ομάδες:

(-) Αρνητική, άθροισμα 0



- (+) Ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 1-2
 (++) Μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 3-4
 (+++) Έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 5-8.

Η εκτίμηση του εξωκυττάριου στρώματος έγινε ως ακολούθως:

Αρνητική: καθόλου έκφραση

Θετική: έκφραση σε αντιπροσωπευτική περιοχή του στρώματος, που ανάλογα με την ένταση της έκφρασης χαρακτηρίστηκε ως +, ++ και +++, για την ασθενή, μέτρια και έντονη έκφραση αντίστοιχα [450].

Αποτελέσματα- Στατιστική ανάλυση: Ο παράγοντας HIF-2α εκτιμήθηκε στα 144 περιστατικά που μελετήσαμε. Κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε όλα τα περιστατικά. Από αυτά τα 9/144 είχαν μικρή έκφραση (ποσοστό 6,3%), 46/144 είχαν μετρίου βαθμού θετική έκφραση (ποσοστό 31,9%) ενώ 89/144 ήταν έντονα θετικά (ποσοστό 61,8%). Έκφραση από τα κύτταρα του υποκείμενου στρώματος διαπιστώθηκε σε 77 περιστατικά (ποσοστό 53,5%).

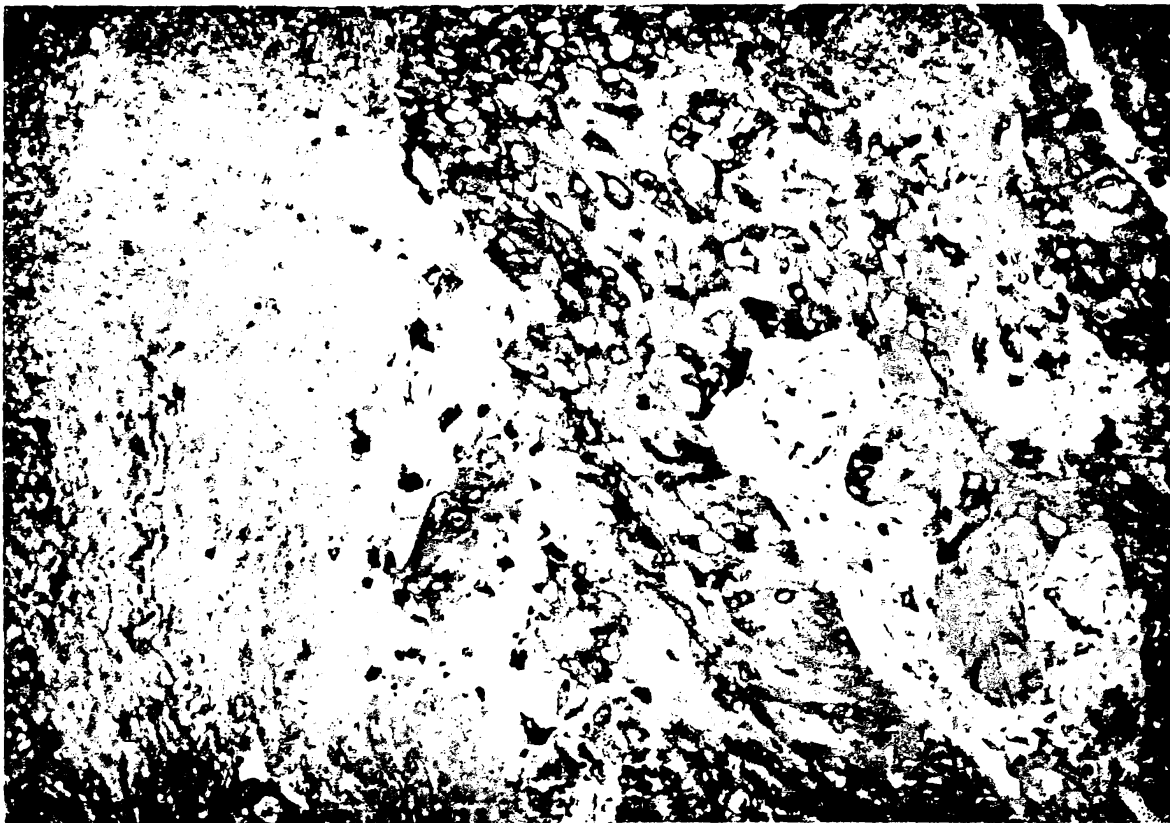
Η κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2α_c δεν συσχετίστηκε με κανένα από τα κλινικά δεδομένα που είχαμε στη διάθεσή μας. Ωστόσο υπήρξε στατιστικώς λίκαν σημαντική συσχέτιση με την έκφραση του HIF-2α_{str} (p<0,001) αλλά και με την MVD (p=0,052). Στατιστικώς σημαντική ήταν η σχέση με την έκφραση όλων των μορφών έκφρασης του αιμοπεταλιακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Έτσι είχαμε συσχέτιση με το PD-ECGF/TP_c (p=0,006), PD-ECGF/TP_n (p=0,016) και PD-ECGF/TP_{str} (p=0,002).

Με βάση τα κλινικά δεδομένα που είχαμε στη διάθεσή μας, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του παράγοντα HIF-2α_{str} βρέθηκε μεταξύ των σταδίων pT1 και pT2-4, με αύξηση της έκφρασης στα διηθητικά καρκινώματα pT2-4 (p=0,05 η οποία είναι οριακή τιμή). Με τους ανοσοϊστοχημικούς παράγοντες της μελέτης βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του HIF-2α_{str} με την PD-ECGF/TP_{str} (p=0,015). Στατιστικώς λίκαν σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-2α_c (p<0,001). Τέλος, στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτιση με την TSP-1_c (p=0,034).





Ποικίλης έντασης, σε μεγάλη έκταση, κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2α σε διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα. Εσωτερικός μάρτυρας τα αφρώδη μακροφάγα κύτταρα του υποκείμενου στρώματος (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)



Έντονη, εκτεταμένη κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2α σε διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα. Επίταση της χρώσης σε περιοχή γειτνιάζουσα νέκρωσης (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

Για τη στατιστική μελέτη της σχέσης του παράγοντα HIF-2a χωρίσαμε τα περιστατικά σε δύο επιμέρους ομάδες: Σε αυτά που είχαν έκφραση σε ποσοστό $< 50\%$ ή $> 50\%$. Το αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα Β9. Καμπύλη επιβίωσης τόσο για τον παράγοντα HIF-1a όσο και για τον παράγοντα HIF-2a με ανάλυση καμπύλης Kaplan-Meier φαίνονται στα σχήματα Β8 και Β9, όπου ο παράγοντας HIF-1a συσχετίζεται με την εξέλιξη του νεοπλασματος με διήθηση του μυϊκού χιτώνα, ενώ ο παράγοντας HIF-2a με υποτροπή της νόσου.

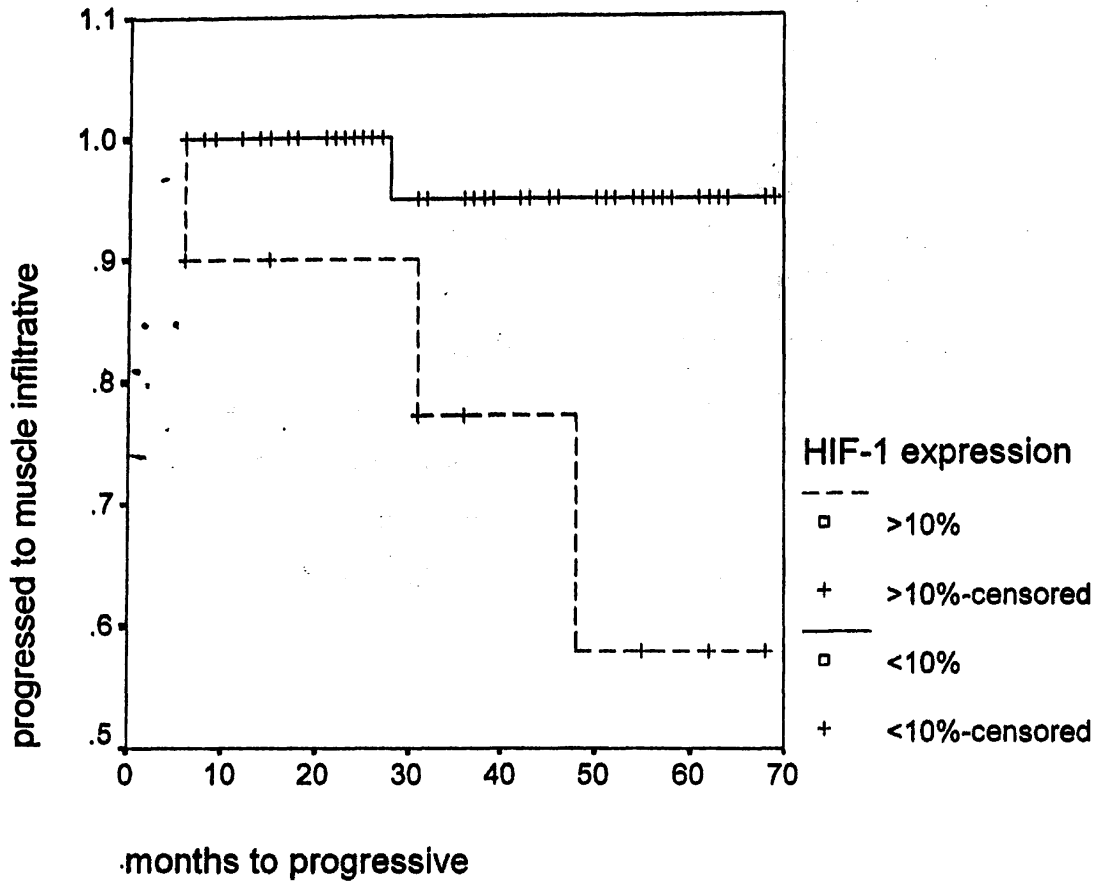
Πίνακας Β9. Έκφραση των παραγόντων HIF-1a και HIF-2a και συσχέτιση με τα κλινικά και ιστολογικά δεδομένα.

	HIF-1a		HIF-2a νεόπλασμα και στρώμα				p value
	<10	>10	<50	>50	(-)	(+)	
Grade							
2	4	1	2	3	2	3	p=0.021, NS,
3	4		47		38		
3	36	7	23	35	24	34	NS
Στάδιο							
Pa	55	3	25	47	34	38	NS, NS,
P1	7		23	30	26		p=0.05
P2-4	10	2	6	8	3	11	
Μέγεθος							
<3cm	52	7	25	51	42		NS, NS, NS
>3cm	27	2	17	21	16	22	
Πολυεστιακότητα							
μονήρης	50	7	29	43	30	42	NS, Ns, NS
πολλαπλές	44	5	24	41	33	32	
In situ							
Όχι in situ	83	6	44	75	53	66	p=0.006, NS,
In situ	11	6	10	10	11	9	NS

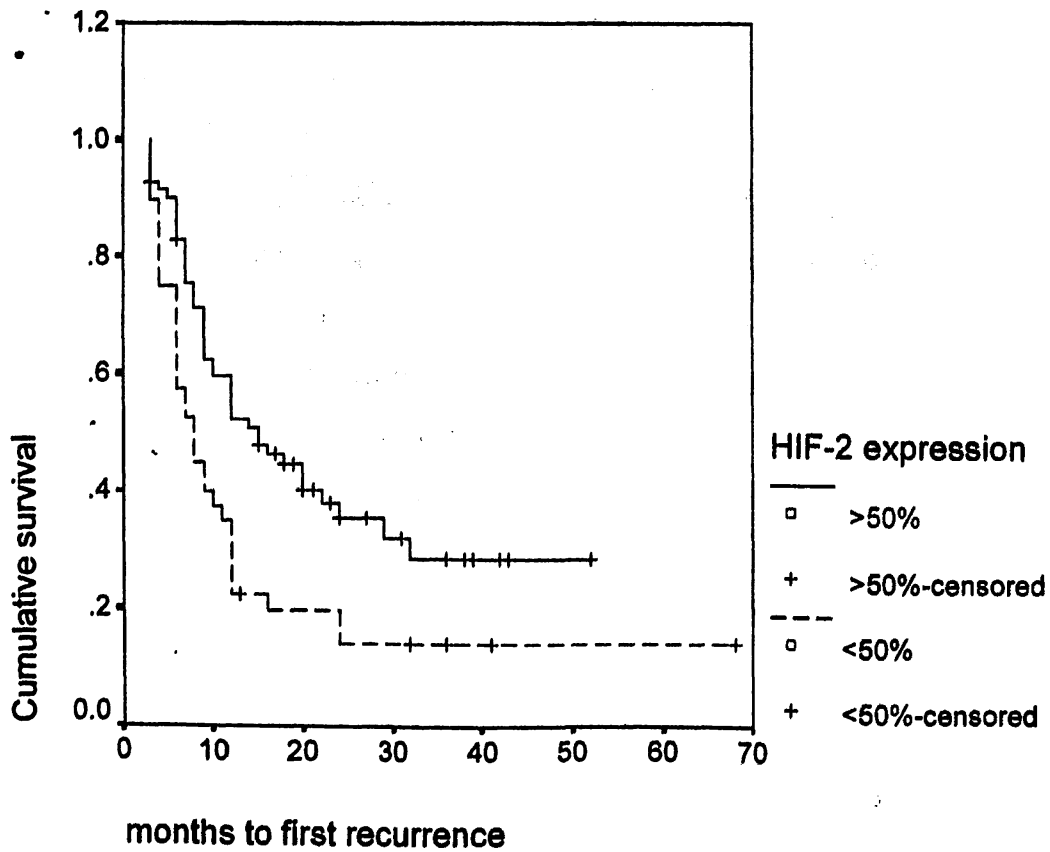
NS, στατιστικά μη σημαντικό



Σχήμα Β8



Σχήμα Β9



3.1.ε. Η έκφραση του αντιγόνου PD-ECGF/TP:

Για την έκφραση του αντιγόνου PD-ECGF/TP χρησιμοποιήσαμε τον κλώνο P-GF.44C της εταιρείας «Neomarkers». Ήταν ήδη γνωστό από την εταιρεία ότι το εν λόγω αντίσωμα εκφράζεται τόσο από τον πυρήνα, όσο και από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων ορισμένων νεοπλασμάτων. Επίσης μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στα μακροφάγα κύτταρα αλλά και σε κύτταρα του στρώματος, της γλοίας, καθώς και σε κάποια κάποια φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα [221,223-227,245-248].

Ποιοτική εκτίμηση: Η έκφραση του PD-ECGF/TP ήταν κυτταροπλασματική και πυρηνική στα νεοπλασματικά κύτταρα, έκφραση όμως παρατηρήθηκε και από τα κύτταρα του στρώματος. Η αξιολόγηση της χρώσης έγινε χωριστά στα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα, τόσο στο κυτταρόπλασμα (PD-ECGF/TP_c) όσο και στους πυρήνες (PD-ECGF/TP_n), αλλά και στα κύτταρα του στρώματος (PD-ECGF/TP_{str}). Αξιόπιστο εσωτερικό μάρτυρα αποτέλεσαν τα μακροφάγα κύτταρα.

Έκφραση του αντιγόνου παρατηρήθηκε επίσης από πλασματοκύτταρα, μακροφάγα/ ι-σπιοκύτταρα, λείες μυϊκές ίνες και ινοβλάστες. Σε μερικά περιστατικά ανιχνεύθηκε και σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Τέλος παρατηρήθηκε μικρή έκφραση από το φυσιολογικό ουροθήλιο.

Σαν εσωτερικός μάρτυρας για την εκτίμηση της ποιοτικής και ποσοτικής έκφρασης της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν τα μακροφάγα αλλά και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα.

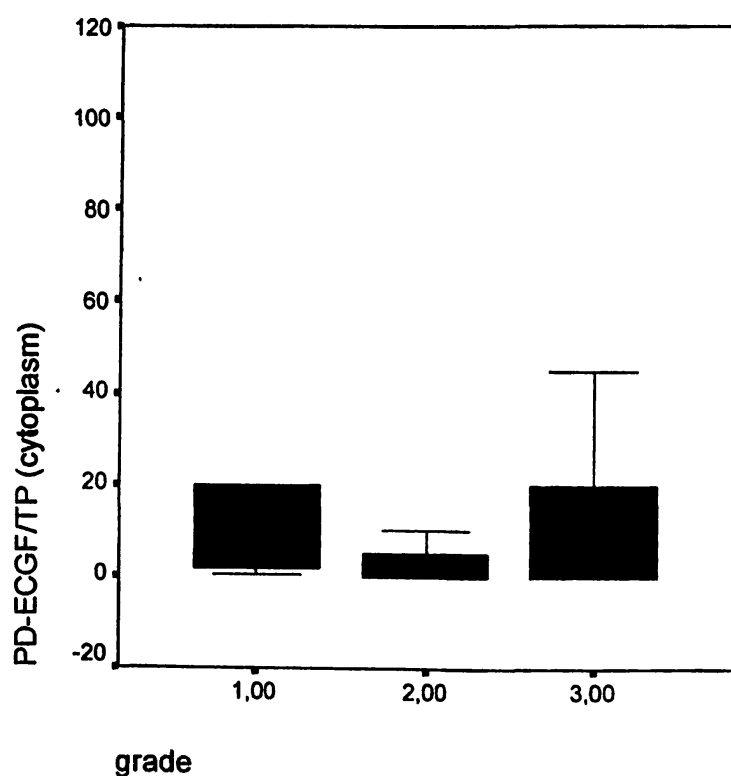
Ποσοτική εκτίμηση: Η έκφραση της χρώσης θεωρήθηκε ικανοποιητική σε 144 περιστατικά από τα 149 που μελετήσαμε συνολικά. Η κυτταροπλασματική έκφραση του αντιγόνου εκτιμήθηκε, όπως και ο παράγοντας VEGF που αναφέραμε πιο πάνω, δηλαδή λαμβάνοντας υπόψη την ένταση αλλά και την έκταση της έκφρασης [449]. Ως προς την ένταση της χρώσης, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 κατηγορίες-διαβαθμίσεις: 0=αρνητικό, 1=ασθενώς θετική χρώση, 2= μέτρια θετική χρώση, 3= έντονη θετική χρώση και 4= πολύ έντονα θετική χρώση). Ως προς την έκταση της έκφρασης του αντιγόνου από τα νεοπλασματικά κύτταρα, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 ομάδες ανάλογα με το % ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (0=0%, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75% και 4=76-100%). Τέλος το άθροισμα αυτών το χωρίσαμε σε 4 ομάδες:

- (-) Αρνητική, άθροισμα 0
- (+) Ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 1-2
- (++) Μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 3-4
- (+++) Έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 5-8

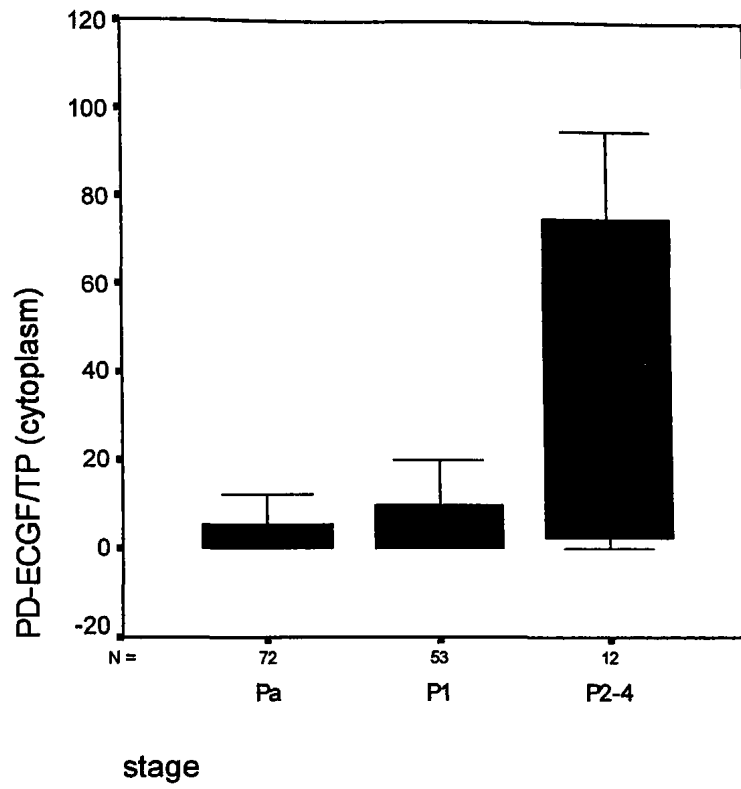


σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την έκφραση της πρωτεΐνης από το στρώμα TSP-1_{str} ($p=0,014$), αλλά και με την κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2 α_c ($p=0,006$), όχι όμως και με την στρωματική έκφραση του HIF-2 α_{str} . Τέλος, στατιστικώς σημαντική ήταν και η συσχέτισή του με τους δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0,03$) και PCNA ($p=0,027$). Η στατιστική επεξεργασία της έκφρασης του αντιγόνου στους πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων PD-ECGF/TP_n έδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των σταδίων pTα με pT2-4 ($p=0,006$) και pT1 με pT2-4 ($p=0,059$), όχι όμως μεταξύ των σταδίων pTα με pT1 (σχήμα B12). Επίσης σημαντική ήταν η συσχέτιση της πυρηνικής έκφρασης στα νεοπλάσματα που συνυπήρχε ή όχι in situ καρκίνωμα ($p=0,003$).

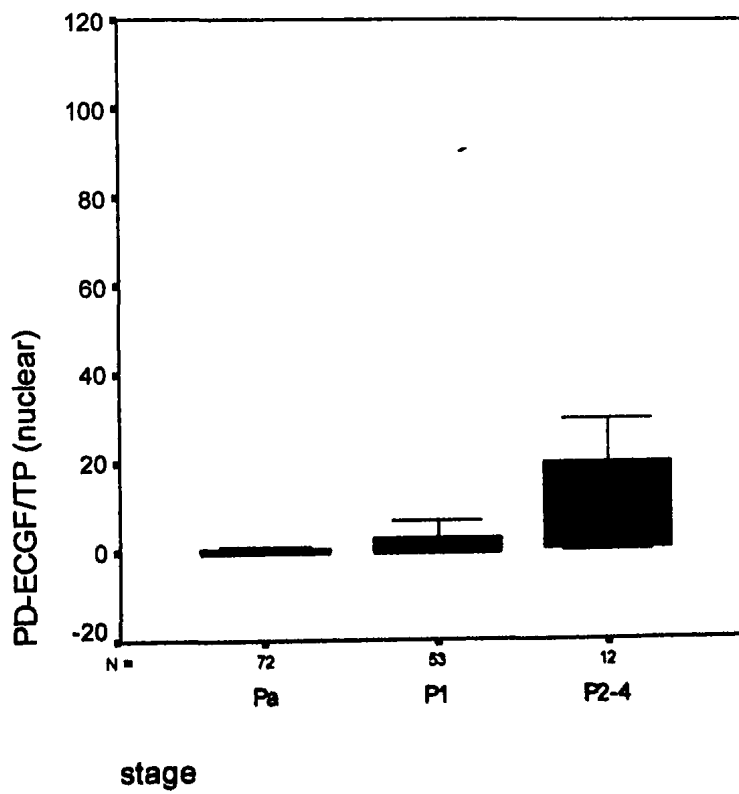
Σχήμα B10



Σχήμα B11

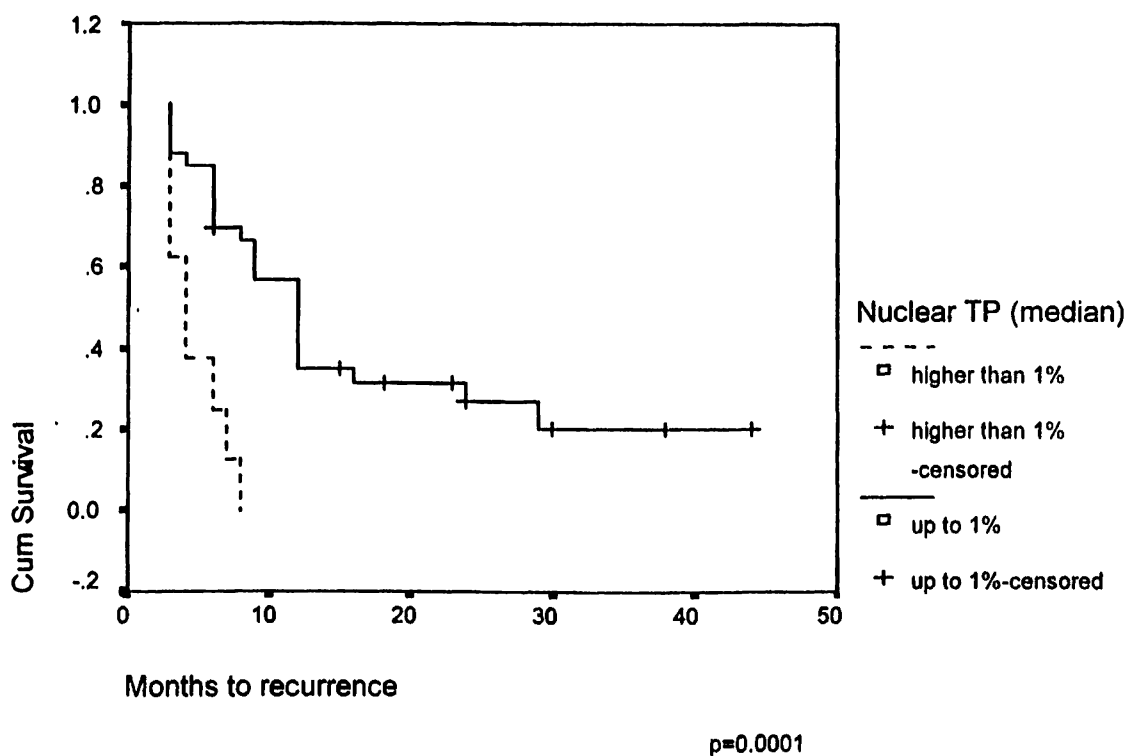


Σχήμα B12



Στατιστικώς λιλαν σημαντική συσχέτιση της PD-ECGF/TP_n παρατηρήθηκε επίσης με το μέγεθος του νεοπλάσματος (p<0,001). Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της PD-ECGF/TP_n διαπιστώθηκε επίσης στην ομάδα των ασθενών που έγινε διουρηθρική αφαίρεση του νεοπλάσματος (TUR) με την υποτροπή νόσου. Σε μελέτη των 127 επιφανειακών καρκινωμάτων με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση βρέθηκε η πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου, όπως φαίνεται στην καμπύλη Kaplan-Meier του σχήματος B13, με στατιστικώς λιλαν σημαντική συσχέτιση (p=0,0001).

Σχήμα B13



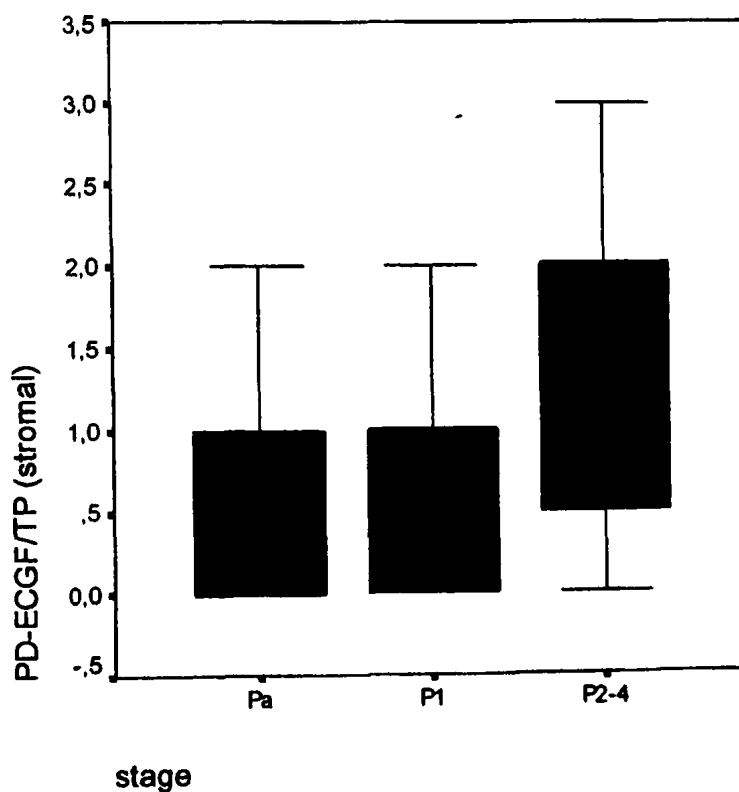
Δεν βρήκαμε άλλη συσχέτιση με τις λοιπές κλινικές παραμέτρους. Στατιστικώς λιλαν σημαντική ήταν η συσχέτιση του PD-ECGF/TP_n με τη μικροαγγειακή πυκνότητα (p<0,001) αλλά και με την κυτταροπλασματική PD-ECGF/TP_c και στρωματική έκφραση του ίδιου αντιγόνου PD-ECGF/TP_{str} (p<0,001). Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε με τον παράγοντα HIF-2α_c (p=0,016). Στατιστικώς μη σημαντική ήταν η σχέση του με τη στρωματική έκφραση της Θρομβοσπονδίνης TSP-1_{str} (p=0,07).

Η έκφραση του αιμοπεταλιακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα/ φωσφορυλάση της θυμιδίνης από το στρώμα (PD-ECGF/TP_{str}), έδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση



μεταξύ των ιστολογικών grade II με III ($p=0,022$) σταδίων pTa με pT1 ($p=0,049$) και pT1 με pT2-4 ($p=0,011$) (Σχήμα B14). Στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η συσχέτιση μεταξύ των σταδίων pTa με pT2-4 ($p<0,001$). Δεν διαπιστώθηκε άλλη αξιόλογη συσχέτιση με τις άλλες κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους. Στατιστικώς σημαντική ήταν η σχέση της έκφρασης του PD-ECGF/TP_{str} με τον παράγοντα VEGF ($p=0,024$). Στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η σχέση του PD-ECGF/TP_{str} με την MVD ($p<0,001$), την κυτταροπλασματική PD-ECGF/TP_c ($p<0,001$) και την πυρηνική PD-ECGF/TP_n ($p<0,001$) έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης. Επίσης στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτισή της PD-ECGF/TP_{str} με τον παράγοντα HIF-1α ($p=0,029$), την κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-2α_c ($p=0,002$) αλλά και με τη στρωματική έκφραση του HIF-2α_{str} ($p=0,015$). Τέλος στατιστικώς σημαντική ήταν η σχέση της έκφρασης της PD-ECGF/TP_{str} με το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0,002$) ενώ στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η σχέση της με το δεύτερο δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA ($p<0,001$).

Σχήμα B14



3.1.ζ. Η έκφραση του αντιγόνου Θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1):

Υπάρχουν αρκετοί κλώνοι θρομβοσπονδίνης εμπορικά διαθέσιμοι, συγγενείς της TSP-1, κάποιοι εκ των οποίων παρασκευάζονται από πειραματόζωα, όπως είναι οι κλώνοι A4.1, A6.1, A2.5, B5.2, HB8432, ή και από ανθρώπινα αιμοπετάλια όπως ο Ab-8 με μήκος μορίου 450 kDa. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε τον κλώνο A6.1 της εταιρίας DBS, ο οποίος εκφράζεται από εκκριτικά κοκκία, τη συσκευή Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων, αλλά και από το εξωκυττάριο στρώμα.

Ποιοτική εκτίμηση: Η TSP-1 παρουσίασε κοκκιώδη κυτταροπλασματική έκφραση στα νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ εκφράστηκε επίσης και από τα κύτταρα του στρώματος. Η αξιολόγηση της έγινε τόσο στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων TSP-1_c, όσο και στα κύτταρα του στρώματος TSP-1_{str}.

Παρατηρήθηκε αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης στα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, και λιγότερο στα ενδιάμεσου βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα. Σε αρκετά περιστατικά διαπιστώθηκε απώλεια της έκφρασης αυτής. Η στρωματική έκφραση της TSP-1 ήταν μικρή και σπανίως μέτρια, ενώ ικανού βαθμού έκφραση παρατηρήθηκε μόνο σε λίγα εκ των περιστατικών. Αυξημένη έκφραση της χρώσης διαπιστώθηκε σε περιαγγειακές θέσεις, αλλά και σε θέσεις όπου το νεόπλασμα ερχόταν σε επαφή με το στρώμα.

Έκφραση της πρωτεΐνης αναφέρεται επίσης από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λείες μυϊκές ίνες, κύτταρα πλακώδους επιθηλίου, μακροφάγα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Εσωτερικό μάρτυρα της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής αποτέλεσαν τα αφρώδη μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα. Σε ένα περιστατικό είχαμε έκφραση του αντιγόνου και από το ενδοθήλιο των αγγείων.

Ποσοτική εκτίμηση: Από το σύνολο των 149 περιστατικών εκτιμήσαμε την έκφραση της TSP στα 148. Η εκτίμηση της κυτταροπλασματικής έκφρασης έγινε όπως και στις περιπτώσεις των άλλων κυτταροπλασματικών χρώσεων VEGF και PD-ECGF/TP_c που περιγράφηκαν πιο πάνω [449]. Ως προς την ένταση της χρώσης οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 κατηγορίες-διαβαθμίσεις: 0=αρνητική, 1= ασθενώς θετική χρώση, 2= μέτρια θετική χρώση, 3= έντονη θετική χρώση και 4= πολύ έντονα θετική χρώση. Ως προς την έκταση της έκφρασης του αντιγόνου από τα νεοπλασματικά κύτταρα, οι περιπτώσεις κατατάχτηκαν σε 5 ομάδες ανάλογα με το % ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (0=0%, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75% και 4=76-100%). Τέλος το άθροισμα αυτών το χωρίσαμε σε 4 ομάδες:



(-) Αρνητική, άθροισμα 0

(+) Ασθενής ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 1-2

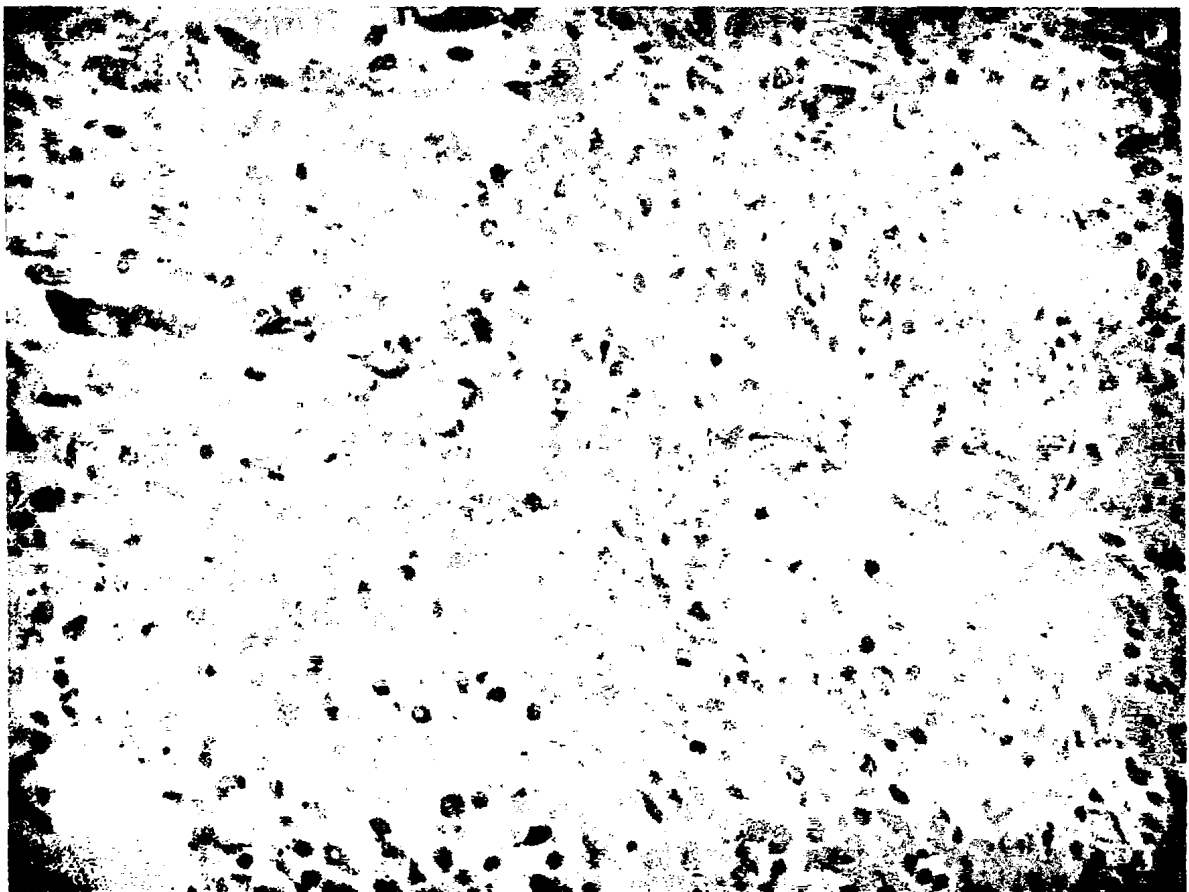
(++) Μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 3-4

(+++) Έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση, άθροισμα 5-8.

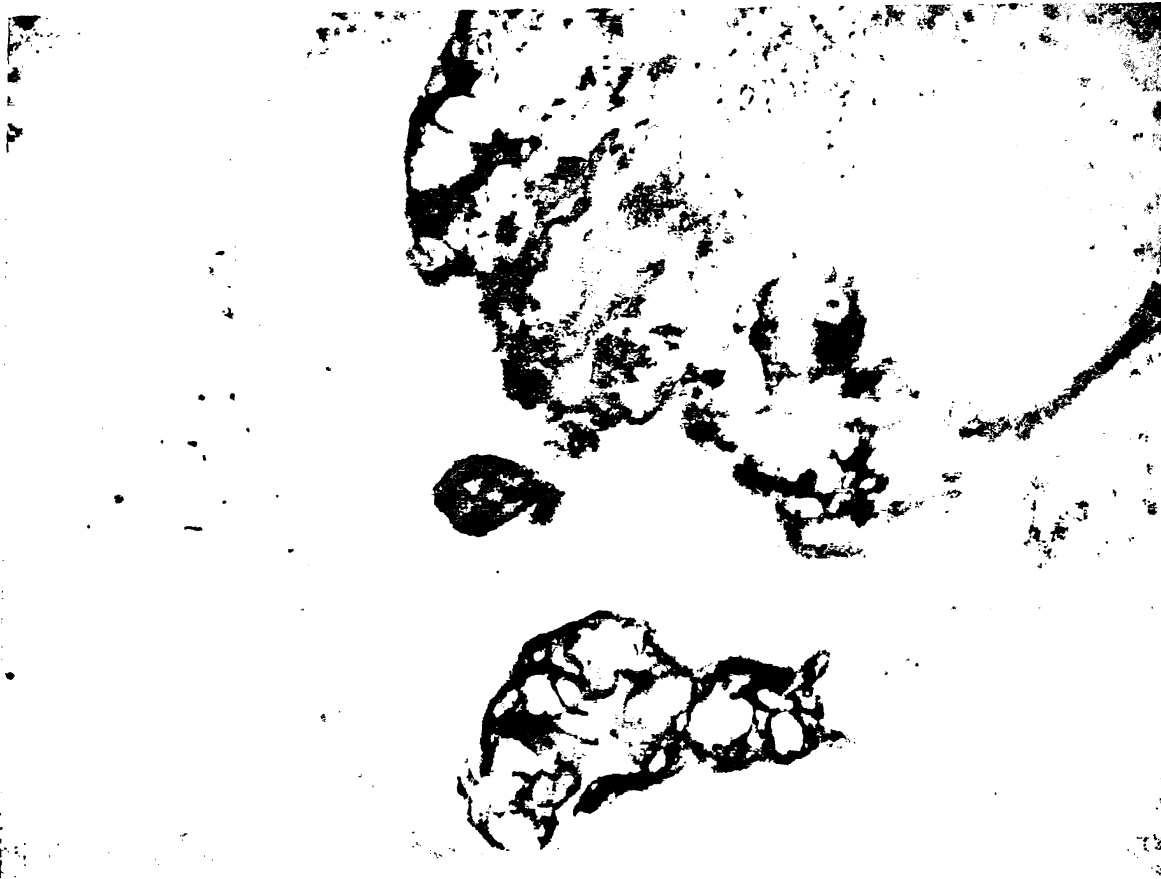
Η έκφραση του αντιγόνου από το στρώμα εκτιμήθηκε όπως και στην περίπτωση του PD-ECGF/TP_{str}.

Αρνητική: καθόλου έκφραση

Θετική: έκφραση σε αντιπροσωπευτική περιοχή του στρώματος, που ανάλογα με την ένταση της έκφρασης χαρακτηρίστηκε ως +, ++ και +++, για την ασθενή, μέτρια και έντονη έκφραση αντίστοιχα [450].



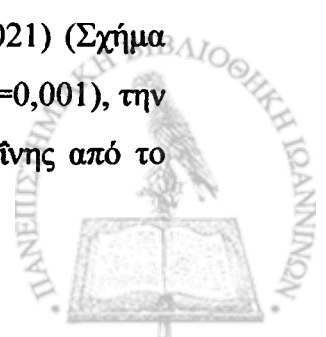
Μέτριου βαθμού κυτταροπλασματική έκφραση της TSP-1 σε διηθητικό ουροθηλιακό καρκίωμα. (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)



Αμιγώς στρωματική έκφραση της TSP-1 σε ουροθηλιακό καρκίνωμα. (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)

Αποτελέσματα- Στατιστική ανάλυση: Κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης (TSP-1_c) παρατηρήθηκε σε ποσοστό 50% επί του συνόλου των νεοπλασμάτων και στρωματική (TSP-1_{str}) στο 44,9%.

Η στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων της έκφρασης της TSP-1_c έδειξε έντονη και μέτριου βαθμού έκφραση στα 10 από τα 148 περιστατικά (ποσοστό 6,2%). Μικρή κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε 64 εκ των 148 περιπτώσεων (ποσοστό 43,2%). Τέλος απώλεια έκφρασης διαπιστώθηκε στο 50%, δηλαδή στα 74 από τα 148 περιστατικά που μελετήσαμε. Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της TSP-1_c παρατηρήθηκε μεταξύ των καρκινωμάτων χαμηλής και μέτριας διαφοροποίησης grade II-III ($p=0,038$), όπου τα χαμηλής διαφοροποίησης είχαν μικρότερη έκφραση από τα μέτριας διαφοροποίησης νεοπλάσματα. Στατιστικώς σημαντική ήταν η μείωση της έκφρασης στο στάδιο pT1 σε σχέση με τα στάδια της νόσου pTa ($p=0,005$) και pT2-4 ($p=0,021$) (Σχήμα B15). Η θετική έκφραση της TSP-1_c συσχετίσθηκε με την αγγειακή πυκνότητα ($p=0,001$), την έκφραση του παράγοντα HIF-2 α_{str} ($p=0,034$) αλλά και την έκφραση της πρωτεΐνης από το

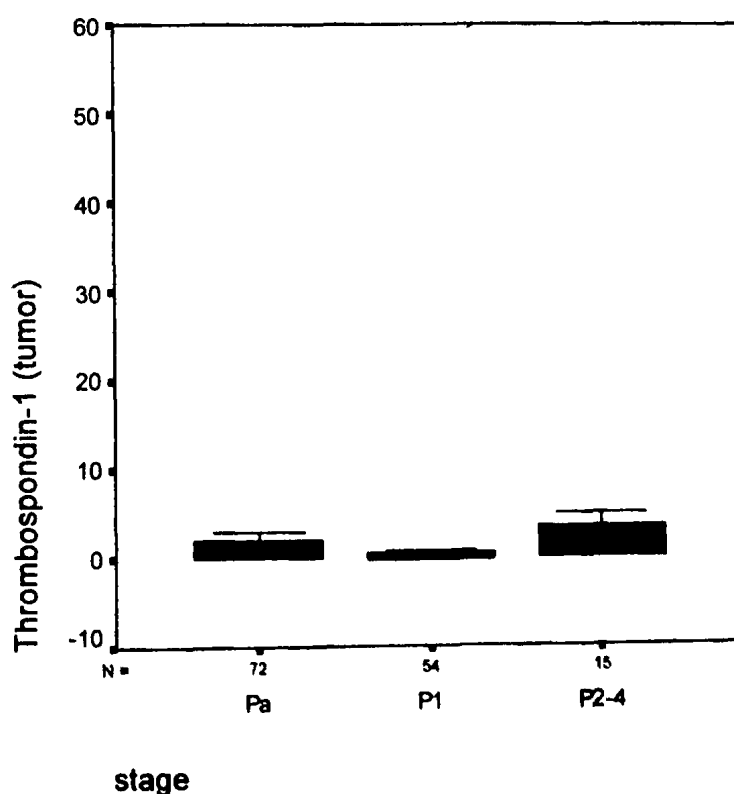


στρώμα TSP-1_{str} ($p=0,038$). Τέλος, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τους δείκτες πολλαπλασιασμού υπήρξε μόνο με το δείκτη Ki-67 ($p=0,048$).

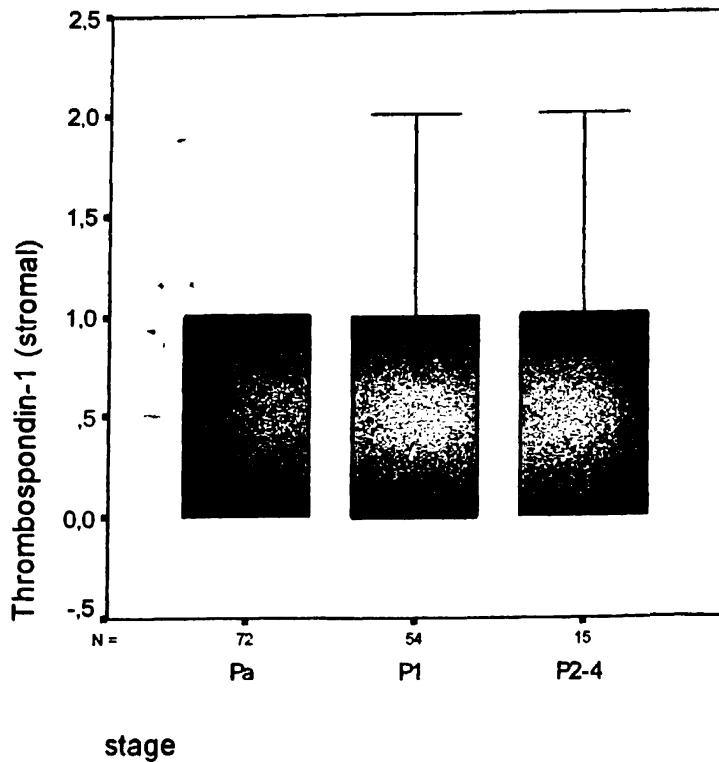
Έντονη και μετρίου βαθμού έκφραση της TSP-1_{str} από τα κύτταρα του στρώματος μειώθηκε σε 11 από τα 147 περιστατικά (ποσοστό 7,5%). Μικρή έκφραση παρατηρήθηκε στα 55 από τα 147 (ποσοστό 37,4%), ενώ απουσία έκφρασης σε 81 περιστατικά (ποσοστό 55,1% επί του συνόλου). Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τις κλινικές παραμέτρους έδειξε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση στην έκφραση της TSP-1_{str} μεταξύ των σταδίων pT_a και pT₂₋₄ ($p=0,033$), καθώς και μεταξύ pT₁ και pT₂₋₄ ($p=0,013$) (Σχήμα B16).

Αντίστροφη συσχέτιση διαπιστώθηκε επίσης με το μέγεθος του όγκου ($p=0,021$), όπου νεοπλασμάτα διαμέτρου μεγαλύτερης των 3 εκατοστών παρουσίαζαν μικρότερη έκφραση από αυτά που ήταν μικρότερα των 3 εκατοστών. Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση σημειώθηκε και με την ηλικία των ασθενών ($p=0,047$). Επίσης στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε με τη μικροαγγειακή πυκνότητα MVD ($p=0,031$), με την έκφραση του παράγοντα VEGF ($p=0,001$), της PD-ECGF/TP_c ($p=0,014$) ενώ με την PD-ECGF/TP_n ($p=0,07$) δεν ήταν σημαντική. Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση υπήρξε και με το TSP-1_c ($p=0,038$), ενώ οριακή ήταν η συσχέτιση με το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0,052$).

Σχήμα B15



Σχήμα Β16



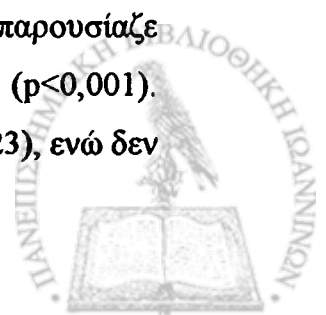
3.1.στ. Η έκφραση των αντιγόνων Ki-67 και PCNA :

Για την ανάδειξη του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 χρησιμοποιήσαμε τον κλώνο MIB-1 της Dako και για το PCNA τον κλώνο Pc-10 (M0879), επίσης της Dako. Πρόκειται για πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται στις ενεργείς φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G_1 , S, G_2 , και M) αλλά όχι στη φάση ηρεμίας (G_0).

Ποιοτική εκτίμηση: Η έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67 και PCNA είναι αμιγώς πυρηνική. Είναι γνωστό ότι η ένταση της έκφρασης ποικίλλει ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Επίσης μπορεί να εκφράζεται από οποιοδήποτε κύτταρο εκτός των νεοπλασματικών, το οποίο βρίσκεται σε φάση πολλαπλασιασμού.

Ποσοτική εκτίμηση: Εκτιμήσαμε το ποσοστό των κυττάρων επί τοις εκατό, τα οποία εμφάνιζαν έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών από τον πυρήνα τους σε σχέση με το σύνολο των νεοπλασματικών κυττάρων σε κάθε νεόπλασμα, ανεξάρτητα από την ένταση της χρωστικότητας.

Αποτελέσματα- Στατιστική ανάλυση: Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 παρουσίαζε στατιστικώς λiαν σημαντική συσχέτιση με τη μικροαγγειακή πυκνότητα ($p < 0,001$). Στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την έκφραση του HIF-1 α ($p = 0,023$), ενώ δεν



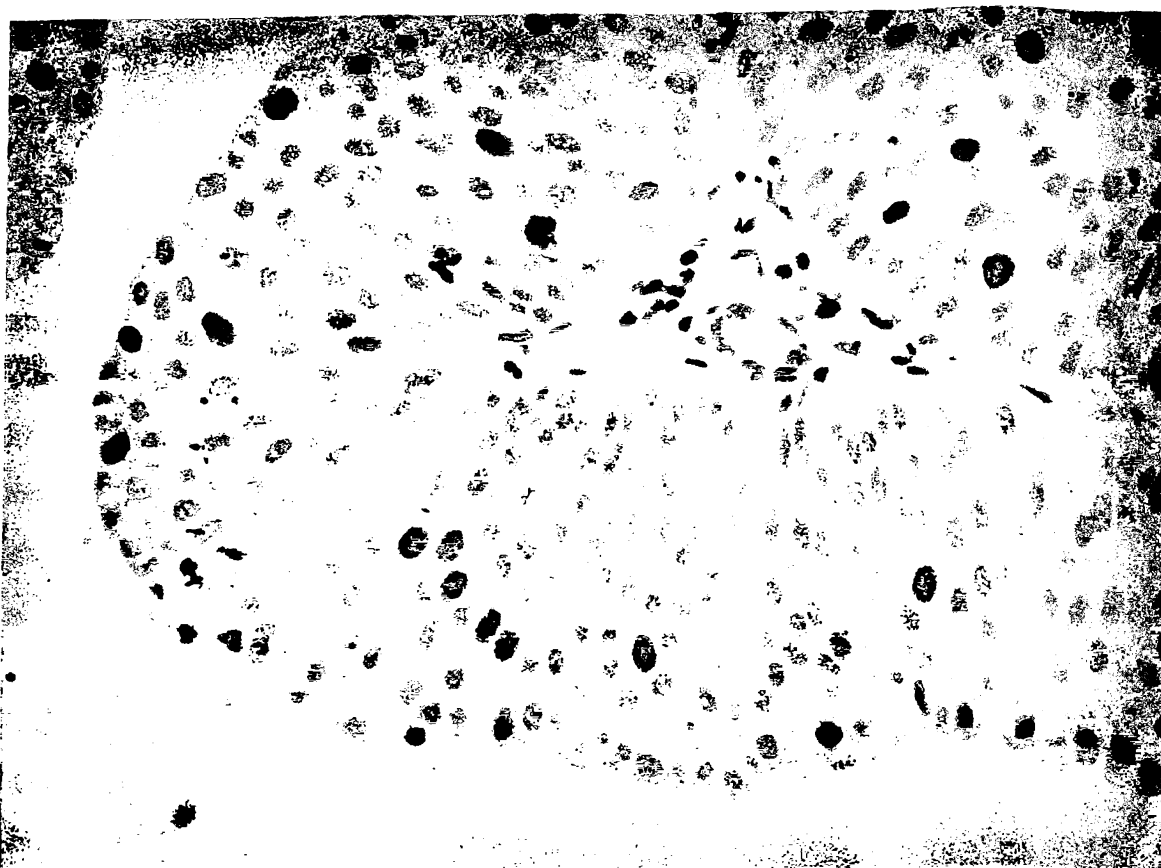
εμφάνισε καμία συσχέτιση τόσο με την κυτταροπλασματική όσο και με την στρωματική έκφραση του HIF-2α. Στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την πυρηνική έκφραση του αιμοπεταλιακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα PD-ECGF/TP_n (p=0,017), την κυτταροπλασματική PD-ECGF/TP_c (p=0,023) αλλά και τη στρωματική PD-ECGF/TP_{str} (p=0,002). Οριακά στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτιση της έκφρασής του με την κυτταροπλασματική έκφραση του TSP-1_c (p=0,048) ενώ σχεδόν οριακή συσχέτιση εμφάνισε με τη στρωματική έκφραση του TSP-1_{str} (p=0,052). Τέλος στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η συσχέτιση με τον άλλο δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA (p<0,001).

Ο δείκτης πολλαπλασιασμού PCNA παρουσίαζε στατιστικώς λίαν σημαντική συσχέτιση με τη μικροαγγειακή πυκνότητα (p<0,001). Στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την έκφραση του HIF-1α (p=0,002), ενώ δεν εμφάνισε καμία συσχέτιση, τόσο με την κυτταροπλασματική όσο και με την στρωματική έκφραση του HIF-2α. Στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτισή του με την έκφραση του αιμοπεταλιακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα από τους πυρήνες PD-ECGF/TP_n (p=0,031), το κυτταροπλάσμα PD-ECGF/TP_c (p=0,03) αλλά και το στρώμα PD-ECGF/TP_{str} (p<0,001), όπου στο τελευταίο ήταν στατιστικώς λίαν σημαντική. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτισή του με την έκφραση της TSP-1. Τέλος, στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η συσχέτιση με τον άλλο δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA (p<0,001).

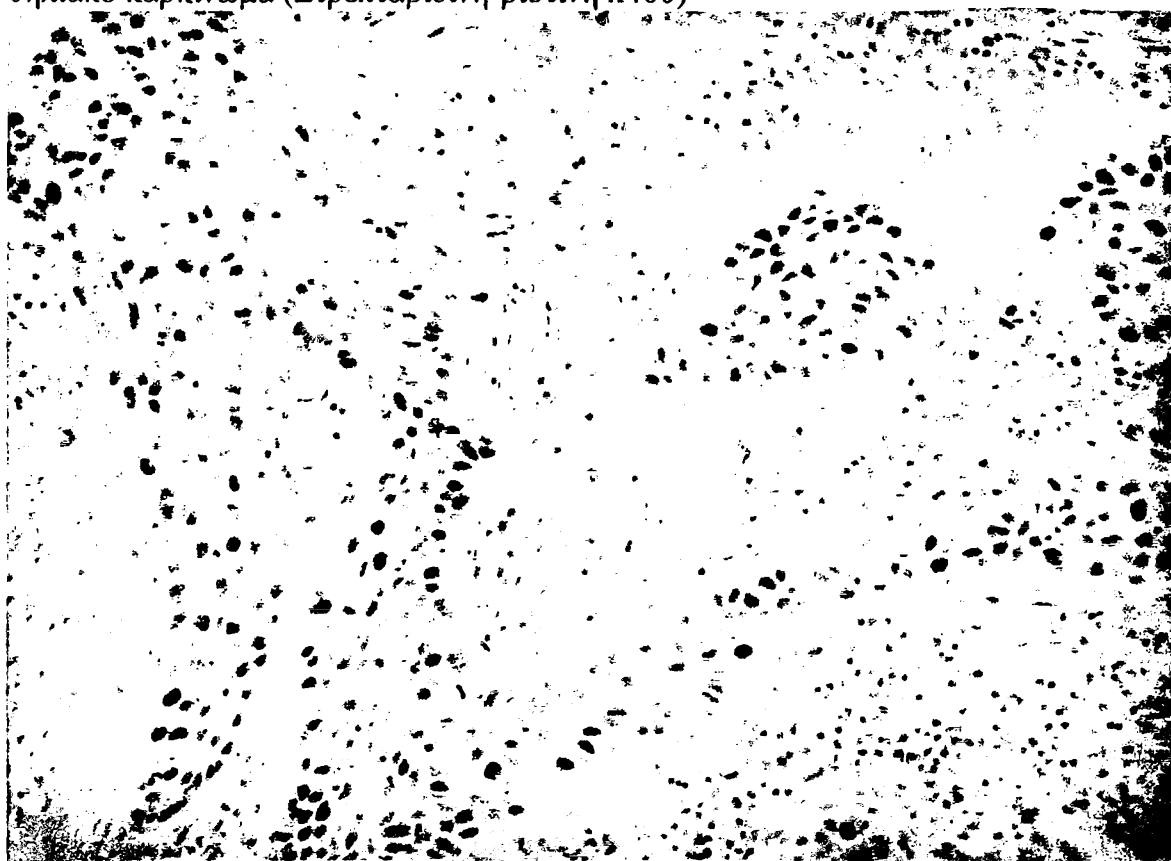


Ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σε θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

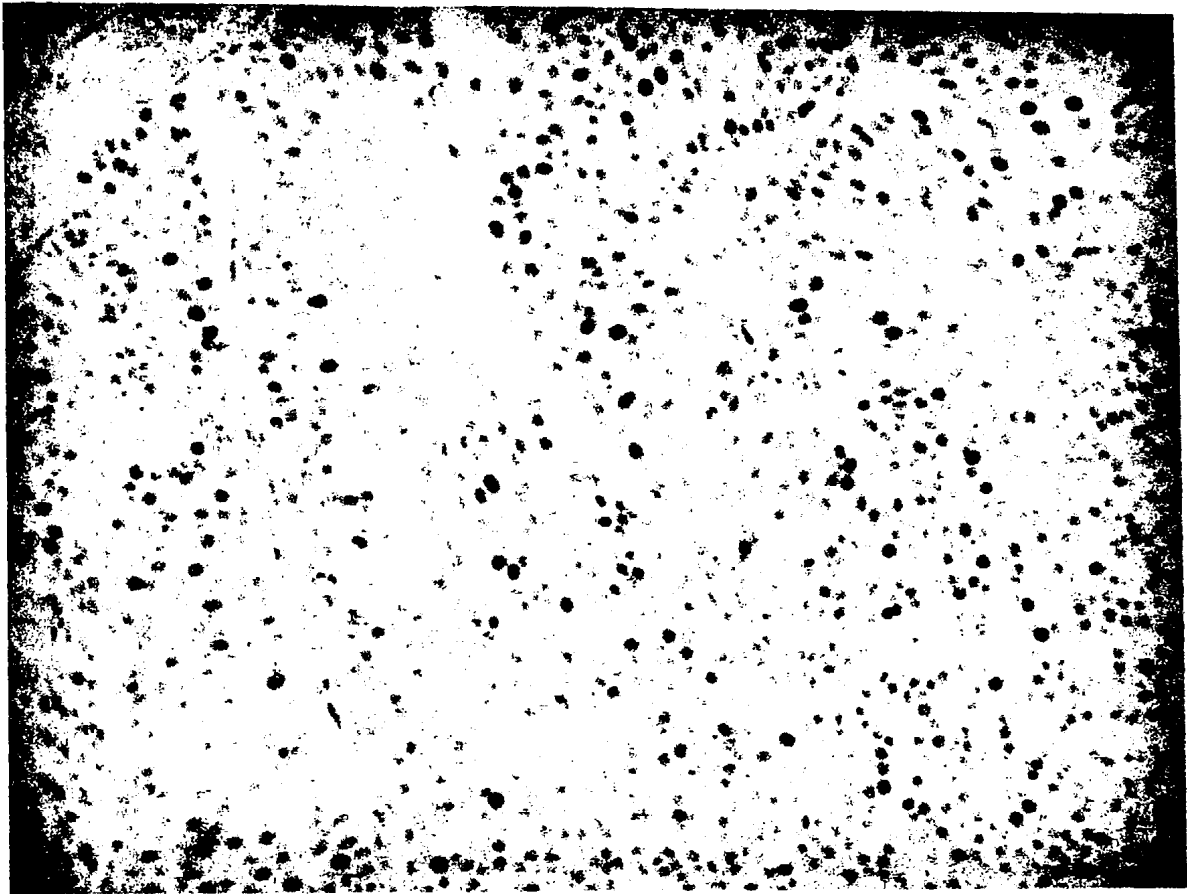




Ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σε Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x400)



Αυξημένη ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA σε διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)



Αυξημένη ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA σε συροθηλιακό καρκίνωμα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη x200)

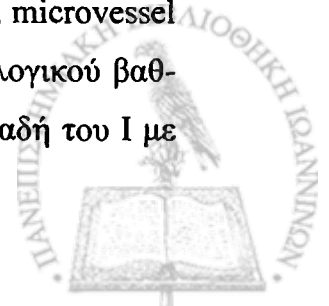
4. Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή εκτιμήθηκαν μερικοί από τους σημαντικότερους, με τις γνώσεις που έχουμε σήμερα, αγγειογενετικοί παράγοντες. Αυτοί συσχετίστηκαν τόσο με τη μικροαγγειακή πυκνότητα, όσο και με τους δείκτες πολλαπλασιασμού αλλά και με κλινικές παραμέτρους (βαθμό κακοηθείας, στάδιο νόσου, πρώτη εμφάνιση του νεοπλασματος ή υποτροπή, μονήρη ή πολυεστιακή εντόπιση, συνύπαρξη ενδοεπιθηλιακού-in situ καρκινώματος και πορεία της νόσου), αφού είχαμε τη δυνατότητα παρακολούθησης των ασθενών αυτών από τους κλινικούς συναδέλφους με τους οποίους συνεργαστήκαμε για τη μελέτη αυτή.

Εάν ανατρέξουμε στη διεθνή βιβλιογραφία, θα δούμε περισσότερες από είκοσι χιλιάδες δημοσιεύσεις, με θέμα την αγγειογένεση. Τα όργανα που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι ο πνεύμονας, ο μαστός, το δέρμα, το ήπαρ, οι νεφροί, το γυναικείο γεννητικό σύστημα, ο στόμαχος, και λιγότερο η ουροδόχος κύστη, ο θυρεοειδής αδένας κ.ά. Απ' ό,τι φαίνεται από την τρέχουσα βιβλιογραφία, σημαντικότεροι αγγειογενετικοί παράγοντες είναι ο VEGF, ο bFGF, οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες, ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, ο παράγοντας επάγων την υποξία -1 και -2, ο PD-ECGF/TP και άλλοι οι οποίοι αναφέρθηκαν πιο πάνω στο γενικό μέρος. Η επιλογή των αγγειογενετικών παραγόντων της παρούσας μελέτης έγινε με βάση το βαθμό στον οποίο έχουν μελετηθεί αλλά και από τα έως σήμερα θετικά αποτελέσματα όσον αφορά το βαθμό εμπλοκής τους στο μηχανισμό της αγγειογένεσης σε καρκινώματα της ουροδόχου κύστης. Ο μηχανισμός της αγγειογένεσης, όπως αναφέραμε και στο γενικό μέρος, είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός στον οποίο εμπλέκονται πολλοί παράγοντες αλλά και άλλοι μηχανισμοί. Ενεργοποιείται από πολλές πλάγιες οδούς και επιπλέον υπάρχουν αρκετές ελλείψεις γνώσης και ερωτηματικά για το πώς ακριβώς λειτουργεί ο μηχανισμός αυτός στον ανθρώπινο οργανισμό, και ειδικότερα στην καρκινογένεση. Ο βαθμός της άγνοιάς μας επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι αρκετά φάρμακα που δρουν ως καταστολείς της αγγειογένεσης σε διάφορα πειραματικά μοντέλα δεν έχουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα και στον ανθρώπινο οργανισμό.

MVD

Στη δική μας μελέτη διαπιστώσαμε ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD, microvessel density) παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση στα καρκινώματα ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (grade) II με III, όχι όμως μεταξύ των άλλων συνδυασμών δηλαδή του I με



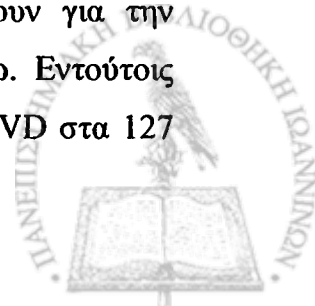
το II ή του I με το III. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλα καρκινώματα που έχουν μελετηθεί στον ανθρώπινο οργανισμό. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται από όλους τους συγγραφείς που έχουν ασχοληθεί με το συγκεκριμένο θέμα στην ιδιομορφία του ουροθηλιακού καρκινώματος, με τους πλούσιους σε αγγεία ινοαγγειακούς άξονες και την πυκνή διάταξη αυτών. Οι άξονες αυτοί επενδύονται από μικρότερο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα, σε αντίθεση με τα καρκινώματα grade II, όπου διατηρείται εν μέρει η αρχιτεκτονική των θηλών αλλά οι ινοαγγειακοί άξονες επενδύονται από πολύ περισσότερα νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτό επηρεάζει την αναλογία αγγείων ανά οπτικό πεδίο, με αποτέλεσμα να μην έχουμε αναλογική αύξηση της αγγειογένεσης καθώς προχωράμε από τα χαμηλού στα υψηλού βαθμού κακοηθείας, όπως συμβαίνει στα κακοήθη νεοπλάσματα τα προερχόμενα από άλλους επιθηλιακούς ιστούς [74,149,192]. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι στο καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου βαθμού κακοηθείας grade III υπάρχει μια αύξηση του αριθμού των αγγείων σε σχέση με το grade II, αποτέλεσμα σύμφωνο και με εκείνα άλλων ερευνητών [75,451,453], ενώ, αντίθετα, σε ορισμένες μελέτες, τα grade II διαπιστώνονται με μεγαλύτερη αγγειοβρίθεια από τα grade III [78]. Στατιστικώς σημαντική ή και λίαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της νόσου, όπως μεταξύ των pTα και pT1, μεταξύ pTα και pT2-4 αλλά και μεταξύ pT1 και pT2-4. Τα αποτελέσματα αυτά μας βρίσκουν σύμφωνους με άλλους συγγραφείς [146,192,451], ωστόσο υπάρχουν και μελέτες στις οποίες δεν διαπιστώθηκε τέτοια συσχέτιση, μεταξύ των οποίων και μία μεγάλη μελέτη του Bochner, ενός από τους σημαντικότερους μελετητές της αγγειογένεσης της ουροδόχου κύστης, με 161 περιστατικά ολικής κυστεκτομής. Συγκεκριμένα, στις τελευταίες αυτές μελέτες δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της MVD με το στάδιο ή με το ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης της νόσου [74,75,78,149]. Συνάγεται, συνεπώς, το συμπέρασμα ότι υπάρχει μεγάλη ασυμφωνία μεταξύ των μελετητών που ασχολήθηκαν με την αγγειογένεση στην ουροδόχο κύστη. Οι διαφορές στα αποτελέσματα που υπάρχουν μεταξύ των συγγραφέων θα μπορούσαν να αποδοθούν στις διαφορές της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, όπως π.χ. διαφορετικός δείκτης για την ανάδειξη των αγγείων (παράγων VIII, CD31, CD34), καθορισμός διαφορετικής μέγιστης διαμέτρου αγγείων που περιλαμβάνονται στην καταμέτρηση, εκτίμηση της αγγειακής πυκνότητας σε τυχαίες θέσεις και όχι σε θερμά σημεία σε ορισμένες μελέτες. κ.λ.π.

Συσχέτιση επίσης βρέθηκε με τα νεοπλάσματα που είχαν πολυεστιακή εντόπιση. Από όσα γνωρίζουμε από μελέτες μοριακής γενετικής, το 99% των πολυεστιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης προέρχονται από κοινό νεοπλασματικό κλόνο [452]. Κάποιες διαφορίες

σε αυτό το θέμα υπάρχουν για τα ενδοεπιθηλιακά νεοπλάσματα και τις δυσπλασίες του επιθηλίου. Όμως στα διηθητικά καρκινώματα είναι σαφή τα αποτελέσματα. Εάν υποθέσουμε ότι αρχικά στις δυσπλασίες και στα ενδοεπιθηλιακά νεοπλάσματα υπάρχουν αρκετοί κλώνοι, πιστεύεται ότι στα πολυεστιακά νεοπλάσματα διασπείρεται ο πιο επιθετικός κλώνος. Το γεγονός ότι στη δική μας μελέτη διαπιστώθηκε στατιστική συσχέτιση των νεοπλασμάτων αυτών με την MVD, ίσως ερμηνεύεται από την υπόθεση ότι στα νεοπλάσματα αυτά έχει διασπαρθεί ο πιο επιθετικός κλώνος, οπότε το κοινό στοιχείο που έχουν μεταξύ τους, είναι ότι πρόκειται για επιθετικά νεοπλάσματα. Η πολυεστιακότητα της νόσου έχει αναφερθεί από πολλούς συγγραφείς ως σχετιζόμενη με κακή πρόγνωση [30,186].

Χωρίσαμε τα 103 από το σύνολο των 127 επιφανειακών καρκινωμάτων στα οποία εκτιμήθηκε ο παράγοντας CD34, σε δύο ομάδες, ανάλογα με την MVD: α) Σε αυτά που είχαν α) άνω του μέσου όρου και β) κάτω του μέσου όρου αγγεία ανά οπτικό πεδίο. Βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εξέλιξη σε διηθητικό (διήθηση του μυϊκού χιτώνα) στα grade III καρκινώματα. Παρότι η MVD δεν φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, εντούτοις μας βοηθάει να προβλέψουμε σε ποιους ασθενείς υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εξέλιξης της νόσου. Έτσι μπορεί να αποτελέσει σημαντική κλινική πληροφορία για περαιτέρω εκτίμηση της αναγκαιότητας για επιθετικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτής της ομάδας ασθενών. Στο ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα κατέληξε και ο Ozer το 1999, σε μια μικρή μελέτη με 20 καρκινώματα ουροδόχου κύστης pT1G3. Σχετική εν μέρει ήταν και η μελέτη των Dickinson και συν. Οι τελευταίοι μελέτησαν 45 διηθητικά καρκινώματα ουροδόχου κύστης βαθμού κακοηθείας grade II και III, αφού τα χώρισαν σε δύο ομάδες: αυτά με μικρή αγγειακή πυκνότητα (με μέσο όρο κάτω των 21 αγγείων/HPF, HPF=οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης) και αυτά με μεγάλη αγγειακή πυκνότητα (ίση ή άνω των 21 αγγείων/HPF). Στην πρώτη ομάδα διαπιστώθηκε μέσος όρος επιβίωσης 1011 ημέρες, ενώ στη δεύτερη 267 ημέρες [77,146,149]. Η μικροαγγειαγγειακή πυκνότητα φαίνεται να συσχετίζεται με την πρόγνωση των ασθενών και σε άλλα κακοήγη νεοπλάσματα, όπως π.χ. κακόηθες μελάνωμα, καρκινώματα πνεύμονα, προστάτη και μαστού [75].

Η έλλειψη συσχέτισης της MVD με τον παράγοντα VEGF ήταν κάτι το αναμενόμενο, δεδομένου ότι σε διάφορες ανασκοπήσεις ή μελέτες που περιλάμβαναν αυτές τις παραμέτρους, κανένας από τους ερευνητές δεν βρήκε τέτοια συσχέτιση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα [126,154]. Αυτό ερμηνεύεται από κάποιες θεωρίες που υπάρχουν για την έκφραση του VEGF και VEGF mRNA στις οποίες αναφερόμαστε πιο κάτω. Εντούτοις υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF και της MVD στα 127



επιφανειακά καρκινώματα που περιλαμβάνονταν στη μελέτη μας ($p=0,0019$). Αυτό αποδεικνύει ότι και στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης ο παράγοντας VEGF δρα ως επαγωγέας της αγγειογένεσης. Μεγαλύτερη, όμως, περιπλοκότητα υπάρχει στα διηθητικά καρκινώματα, όπου εμπλέκονται άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι θα αναφερθούν παρακάτω.

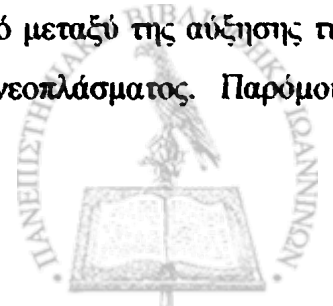
Συσχέτιση επίσης διαπιστώθηκε με τον παράγοντα HIF-1α, ο οποίος, όπως φαίνεται από πολλές μελέτες (βλέπε πιο κάτω), αποτελεί γνωστό επαγωγέα της αγγειογένεσης, αλλά φαίνεται να συσχετίζεται και άμεσα με την αγγειακή πυκνότητα, σε καρκινώματα τόσο του ενδομητρίου όσο και της ουροδόχου κύστης [453,454].

Λίγες μελέτες υπάρχουν στις οποίες να αναδεικνύεται συσχέτιση της MVD με τον παράγοντα HIF-2α. Σε μία εξ αυτών φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση [210], ενώ σε μια άλλη δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση [188]. Στην δεύτερη αυτή περίπτωση, οι συγγραφείς αποδίδουν την απουσία στατιστικά σημαντικής συσχέτισης αποκλειστικά στην ιδιαιτερότητα του ουροθηλιακού καρκινώματος, λόγω της ύπαρξης των αγγειοβριθών ινοαγγειακών αξόνων. Παρότι η δική μας έρευνα συμφωνεί με την τελευταία από τις προαναφερθείσες μελέτες, εντούτοις πιστεύουμε ότι η ερμηνεία που δίδεται ίσως να μην είναι πλήρως ικανοποιητική.

Η MVD συσχετίστηκε επίσης με τον παράγοντα PD-ECGF/TP σε όλες τις μορφές έκφρασής του, κυτταροπλασματική, πυρηνική, αλλά και στρωματική για την οποία αναφέρουμε εκτενώς πιο κάτω. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι υπάρχουν μόνο δύο μελέτες που ασχολούνται με αυτό το θέμα, όπου σε καμιά από αυτές δεν σημειώθηκε συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών [229,248].

Διαπιστώθηκε στατιστικώς οριακή συσχέτιση της MVD με την έκφραση της TSP-1 από τα νεοπλασματικά κύτταρα ($p=0,05$) αλλά καμία συσχέτιση με την έκφραση αυτής από το υποκείμενο στρώμα. Σε αυτό θα αναφερθούμε εκτενέστερα πιο κάτω, αφού ο ρόλος της TSP-1 στην αγγειογένεση είναι συγκεκριμένος [79,276,455,456].

Συσχέτιση βρέθηκε και με τους δύο δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 και PCNA. Αντίστοιχα ευρήματα βρέθηκαν και σε άλλες μελέτες σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, όπου η μικροαγγειακή πυκνότητα συσχετίστηκε με το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 [458]. Πιστεύουμε ότι η συσχέτιση που βρέθηκε, τόσο στη δική μας μελέτη όσο και σε πολλές άλλες, μεταξύ της MVD και παραμέτρων όπως ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης του νεοπλάσματος ή το στάδιο της νόσου, αντιπροσωπεύει συσχετισμό μεταξύ της αύξησης της μικροαγγειακής πυκνότητας και επιθετικού φαινότυπου του νεοπλάσματος. Παρόμοια συσχέτιση έχει βρεθεί και σε άλλους νεοπλασματικούς ιστούς [75].



VEGF

Ο πρώτος, και σημαντικότερος κατά πολλούς, αγγειογενετικός παράγοντας που έχει μελετηθεί, όχι μόνο στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης αλλά και σε όλους τους νεοπλασματικούς ιστούς, είναι ο VEGF. Μετά το πείραμα του Chodak το 1981, στο οποίο παρατήρησε ότι τα ούρα ασθενούς με καρκίνωμα ουροδόχου κύστης προκαλούσαν νεοαγγειογένεση στον κερατοειδή χιτώνα αρουραίων [150], ο πρώτος παράγοντας που απομονώθηκε από τα ούρα αυτών των ασθενών δεκατρία χρόνια αργότερα, το 1994, ήταν ο VEGF [459].

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, για τη μελέτη της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF χρησιμοποιήσαμε τον υπότυπο VEGF₁₂₁. Αυτό δεν είναι τυχαίο, αφού έχει βρεθεί σε διάφορες μοριακές μελέτες ότι ο υπότυπος αυτός αποτελεί το 75% του συνόλου του VEGF που εκφράζεται στα καρκινώματα της ουροδόχου κύστης. [126,154,185,228].

Κατά τη μελέτη του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) βρήκαμε στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των σταδίων της νόσου pTα και pT1 ($p=0,042$), καθώς επίσης και μεταξύ των pTα και pT2-4 ($p=0,044$). Ποσοτικές μελέτες που έχουν γίνει με το mRNA του VEGF έδειξαν μεγαλύτερη έκφραση στο στάδιο pT1 από ότι στο στάδιο pT2-4, και πολύ μικρότερη έκφραση στο φυσιολογικό ουροθήλιο [154,228]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν αυξημένη μεν στο στάδιο pT1, αλλά ελαφρώς μεγαλύτερη στο pT2-4 [460,461], εύρημα που συμφωνεί και με τα δικά μας αποτελέσματα. Κατά άλλους, τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF είναι κατά μέσο όρο στα ίδια επίπεδα σε επιφανειακά και διηθητικά καρκινώματα [462]. Η επικρατέστερη προτεινόμενη εξήγηση είναι ότι παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή mRNA στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης, αλλά η πρωτεΐνη στα στάδια αυτά δεν είναι σταθεροποιημένη ως μόριο, καταστρέφεται δηλαδή με κάποιο μηχανισμό. Ο μηχανισμός αυτός πιθανολογείται ότι καταστέλλεται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου [154]. Παρόμοιος μηχανισμός φαίνεται να ισχύει και για άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως π.χ. ο bFGF [154]. Κατά τον O'Brien και συν. υπάρχουν δύο διαφορετικές οδοί αγγειογένεσης στην ουροδόχο κύστη, όπου το σημείο απενεργοποίησης της πρώτης και ενεργοποίησης της δεύτερης είναι η διήθηση του μυϊκού χιτώνα από το καρκίνωμα. Βέβαια και στις δύο οδούς εμπλέκεται ο VEGF και άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες με διαφορετικό ρόλο σε κάθε περίπτωση [228]. Παρατήρηση που ακολούθησε τη θεωρία αυτή είναι η εύρεση διαφορετικών μεταλλάξεων χρωμοσωμάτων σε επιφανειακό ή διηθητικό καρκίνωμα αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι τα επιφανειακά ουροθηλιακά



καρκινώματα έχουν την μετάλλαξη 9p ή 9q στο χρωμόσωμα 9, ενώ τα διθητικά, όπως και τα *in situ*, έχουν την 17p [228,463,464]. Άλλη μία παρατήρηση που πρέπει να επισημάνουμε, είναι η μειωμένη έκφραση του mRNA του VEGF σε περιοχές γειτνιαζουσες νέκρωσης, όπου ως γνωστόν ενεργοποιούνται άλλοι αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο HIF. Αυτή είναι μια παρατήρηση που μάλλον έρχεται να στηρίζει ακόμη περισσότερο τη θεωρία του O'Brien περί διαφορετικών οδών αγγειογένεσης. Τόσο τα δικά μας αποτελέσματα, όσο και αυτά άλλων ερευνητών που ασχολήθηκαν με την αγγειογένεση στην ουροδόχο κύστη, έρχονται σε αντίθεση με την σχέση του VEGF σε άλλα συμπαγή νεοπλάσματα. Ενώ σε άλλους νεοπλασματικούς ιστούς ο VEGF φαίνεται να παίζει πρωτεύοντα ρόλο. Στο μηχανισμό της αγγειογένεσης στην ουροδόχο κύστη πιθανώς αυτό να μην ισχύει. Το πλέον μελετημένο όργανο αποτελεί ο μαστός, όπου η έκφραση του VEGF βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα σε καρκινώματα μαστού με λεμφαδενικές μεταστάσεις [465]. Είναι γεγονός ότι δεν βρήκαμε συσχέτιση της πρωτεΐνης VEGF με την MVD, τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, την υποτροπή αλλά και την εξέλιξη της νόσου, σε αντίθεση με άλλες μοριακές μελέτες, στις οποίες παρατηρήθηκε στατιστικώς λίκαν σημαντική συσχέτιση του mRNA του VEGF με αυτές τις παραμέτρους [185]. Πάντως, ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες με τον παράγοντα VEGF στη ουροδόχο κύστη, σε καμία δεν αναφέρεται συσχέτισή του με την MVD.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μελέτης των διθητικών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, κατά την εκτίμηση των 127 επιφανειακών καρκινωμάτων διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα VEGF και της MVD. Το αποτέλεσμα αυτό, εκτός του γεγονότος ότι μας δείχνει ότι ο παράγοντας VEGF δρα ως επαγωγέας της αγγειογένεσης στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, στηρίζει ακόμη περισσότερο τη θεωρία του O'Brien περί διαφορετικών οδών αγγειογένεσης. Η απουσία συσχέτισης με την πολυεστιακότητα της νόσου και τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης μας βρίσκει σύμφωνους με άλλους συγγραφείς [30,126,186].

Σε πειράματα με αρουραίους διαπιστώθηκε ότι απώλεια του γονιδίου HIF οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του παράγοντα VEGF, με αποτέλεσμα το πειραματόζωο να οδηγείται σε εμβρυϊκό θάνατο [188]. Η σχέση του HIF με τον παράγοντα VEGF έχει αποδειχθεί και σε μοριακό επίπεδο. Βρέθηκε ότι ο παράγοντας HIF ενεργοποιεί το γονίδιο του VEGF μέσω του HRE (Hypoxia response element) [155,157]. Παρ'όλα αυτά στην δική μας μελέτη δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά τα αποδίδουμε περισσότερο στον δευτερεύοντα ρόλο που φαίνεται να παίζει ο VEGF στην

αγγειογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος με αποτέλεσμα η μικρή επίδραση που έχει στον πολύπλοκο μηχανισμό της αγγειογένεσης να συγκαλύπτεται από τους άλλους παράγοντες.

Σε καρκινώματα μαστού, διαπιστώθηκε ότι τόσο ο VEGF όσο και ο PD-ECGF/TP αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες, χωρίς να συσχετίζονται μεταξύ τους [466]. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες στις οποίες βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών σε διάφορους καρκινωμάτωδεις ιστούς, όπως στα καρκινώματα ενδομητρίου, τραχήλου μήτρας και στομάχου [467,468,469]. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ VEGF και PD-ECGF/TP_{str}. Σε γυναικολογικούς καρκίνους (ενδομητρίου και ωοθηκών) ο συνδυασμός των δύο αυτών αγγειογενετικών παραγόντων παρατηρήθηκε να έχει συνεργικό αποτέλεσμα στην αγγειογένεση των νεοπλασμάτων αυτών, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα νεοπλάσματα, τα οποία εξέφραζαν ένα ή κανένα από αυτούς [467]. Επίσης τα νεοπλάσματα αυτά είχαν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με τους αντιμεταβολίτες 5-φλουοροουρακίλη και μεθοτρεξάτη (CMF), αφού τα φάρμακα αυτά καταστέλλουν την παραγωγή PD-ECGF/TP. Τα φάρμακα αυτά είναι ομόλογα των νουκλεϊνικών οξέων και χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία [244,465]. Σε άλλη μελέτη με καρκινώματα μαστού, περιστατικά με χαμηλά επίπεδα VEGF και υψηλά επίπεδα PD-ECGF/TP είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με CMF [466], ενώ ο συνδυασμός υψηλών επιπέδων VEGF και PD-ECGF/TP σε πολυπαραγοντική ανάλυση φαίνεται να σχετίζεται με μικρό χρόνο υποτροπής της νόσου [470]. Δεν είναι γνωστό εάν αυτοί οι δύο παράγοντες ρυθμίζονται από κάποιο κοινό τρίτο παράγοντα, ή ο ένας επηρεάζει τον άλλο, δηλαδή ο VEGF την PD-ECGF/TP ή αντίστροφα. Ελάχιστες είναι οι μελέτες που έχουν γίνει για τη διερεύνηση της συσχέτισης των εν λόγω παραγόντων. Το μόνο που βρέθηκε όσον αφορά τη συσχέτιση αυτών είναι από μία έρευνα που έγινε πρόσφατα με καλλιέργειες κυττάρων, όπου παρατηρήθηκε η PD-ECGF/TP να επάγει την έκκριση του VEGF [234]. Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα και σε μία δεύτερη μελέτη. Σε μια μελέτη με τεχνική PCR σε καρκινώματα ουροδόχου κύστης, δεν βρέθηκε συσχέτιση της PD-ECGF/TP με τον παράγοντα VEGF, παρότι βρήκαν και τους δυο παράγοντες να αυξάνονται σε διηθητικά καρκινώματα [471].

Αναμενόμενη είναι η συσχέτιση του VEGF με το αυξητικό δυναμικό (αυξητική δραστηριότητα) του καρκινώματος, όπως φαίνεται από την σχέση του με τον δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA ($p=0,002$), αφού πρόκειται για επαγωγή της αγγειογένεσης, παρότι στην ουροδόχο κύστη φαίνεται ότι ο μηχανισμός δράσης του VEGF είναι πολύπλοκος. Ο μηχανισμός με τον οποίο το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος συσχετίζεται με την αγγειογένεση



είναι άγνωστος. Στη βιβλιογραφία συναντούμε σπάνιες μελέτες που να αναφέρονται στη συσχέτιση των δυο αυτών δεικτών πολλαπλασιασμού με κάποιο αγγειογενετικό παράγοντα. Εντούτοις σχεδόν πάντα υπάρχει συσχέτιση [457]. Η πιο απλή εξήγηση που προτείνεται είναι ότι τα νεοπλάσματα με μεγάλο αυξητικό δυναμικό υπερπαράγουν αγγειογενετικούς παράγοντες, ως εκ τούτου έχουν και αυξημένη MVD. Βέβαια εύλογος είναι ο προβληματισμός μας, εάν τα νεοπλάσματα με υψηλό αυξητικό δυναμικό έχουν αυξημένη παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων, ή η υπερπαραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα από το νεόπλασμα.

HIF-1α

Η μελέτη του παράγοντα HIF-1α αποτέλεσε ιδιαίτερη πρόκληση για εμάς, αφού μόνο τρεις δημοσιεύσεις υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την έκφραση αυτού του παράγοντα σε ουροθηλιακό καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου, αλλά καμία με τον κλώνο που χρησιμοποιήσαμε εμείς [209,451,453]. Να επισημάνουμε ότι μόνο οι δύο από αυτές ήταν με ανοσοϊστοχημική αναγνώριση του παράγοντα, ενώ η άλλη με RNA ανάλυση, ενώ υπάρχει και μία τέταρτη μελέτη που έγινε σε αδενοκαρκινώματα ουροδόχου κύστης [187]. Ο παράγοντας αυτός έχει μελετηθεί σε διάφορους νεοπλασματικούς ιστούς, μεταξύ των οποίων τα καρκινώματα του μαστού, του ήπατος, του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του οισοφάγου κ.α. [187,193,448]. Στο καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου, στις μελέτες των Theodoropoulos και συν. [451,453], καθώς και στη δική μας, έκφραση αναγνωρίστηκε μόνο από τους πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων, ενώ παρατηρήθηκε επίταση της έκφρασης σε περιοχές υποξίας, χαρακτηριστικό και του παράγοντα HIF-2α. Μικρή έκφραση, αλλά όχι σταθερή (για άγνωστο λόγο) είχαμε από τα μακροφάγα/ιστιοκύτταρα τα οποία συνόδευαν το νεόπλασμα. Η έκφραση από τα μακροφάγα ήταν σταθερό εύρημα για τον παράγοντα HIF-2α, όχι όμως και για τον HIF-1α [187,477]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχει στατιστική συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1α με τον παράγοντα VEGF σε διάφορους καρκινωμάτωσης ιστούς. Όπως έχει αποδειχτεί από τον Forsythe το 1996, αλλά και από άλλους, ο παράγοντας HIF-1α εμπλέκεται στη μεταγραφή του VEGF [187,189,208,209,472]. Συσχέτιση του με την πρόγνωση της νόσου και την MVD βρέθηκε στη μελέτη του καρκινώματος του ενδομητρίου και της ουροδόχου κύστης [451,453,454]. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ιστολογικών βαθμών κακοηθείας I και II. Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στα νεοπλάσματα βαθμού κακοηθείας I σε σχέση με τα βαθμού κακοηθείας II αλλά και αύξηση

της έκφρασης στα νεοπλάσματα βαθμού κακοηθείας III σε σχέση με τα βαθμού κακοηθείας II. Βέβαιη είναι η εμπλοκή του παράγοντα αυτού στην αγγειογένεση και μάλιστα ως επαγωγέα αυτής, αφού η συσχέτιση με την MVD είναι στατιστικώς σημαντική, εύρημα που μας βρίσκει σύμφωνους με την ομάδα του Theodoropoulos και συν. [453]. Σ' αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση του παράγοντα HIF-1α τόσο με την MVD, όσο και με τον παράγοντα VEGF αλλά και το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σε 140 επιφανειακά καρκινώματα ουροδόχου κύστης. Στατιστική συσχέτιση του HIF-1α με την MVD βρέθηκε σε μελέτες άλλων νεοπλασματικών ιστών όπως καρκίνωμα ωοθήκης, παχέος εντέρου και ηπατοκυτταρικό καρκινώμα. Σε αυτές τις μελέτες ο παράγοντας HIF-1α συσχετίστηκε και με τον παράγοντα VEGF [473,474,475]. Το γεγονός ότι στη δική μας μελέτη δεν βρήκαμε συσχέτιση με τον παράγοντα VEGF, όπως έχει γίνει σε άλλα καρκινώματα, ίσως συσχετίζεται με τον ιδιόμορφο τρόπο έκφρασης του παράγοντα αυτού σε ουροθηλιακά καρκινώματα. Ο O'Brien πρότεινε με την θεωρία του για δυο διαφορετικές οδούς αγγειογένεσης, όπου εξηγεί ότι ο ρόλος του VEGF στα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα είναι διαφορετικός από ότι στα επιφανειακά, μηχανισμός δηλαδή διαφορετικός από εκείνους σε άλλους καρκινωμάτωδεις ιστούς. Να σημειώσουμε εδώ ότι η ομάδα του Theodoropoulos βρήκε θετική στατιστική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα VEGF και της MVD, μόνο στην πρώτη μελέτη το 2004 όπου περιελάμβανε και διηθητικά καρκινώματα [451] ενώ την επόμενη χρονιά, 2005, η μελέτη στα επιφανειακά καρκινώματα δεν έδειξε κάποια συσχέτιση [453]. Αυξημένη έκφραση του HIF-1α παρατηρήθηκε και στα περιστατικά που συνυπήρχε *in situ* καρκίνωμα, εύρημα που ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι αποτελούν μια ξεχωριστή οντότητα αφού είναι γνωστό ότι προέρχονται από διαφορετική μετάλλαξη. Η μετάλλαξη 17p παρατηρείται τόσο στα *in situ* όσο και στα διηθητικά καρκινώματα, ενώ, όπως προαναφέραμε, τα επιφανειακά καρκινώματα εμφανίζουν τη μετάλλαξη 9p ή 9q στο χρωμόσωμα 9 [228,463,464]. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω ότι συσχέτιση παρατηρήθηκε και με τα καρκινώματα τα οποία εξελίχθηκαν σε διηθητικά, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι η έκφραση του HIF-1α στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη επιθετικότερης βιολογικής συμπεριφοράς του νεοπλάσματος.

Να σημειώσουμε εδώ ότι συσχέτιση με την παρουσία *in situ* καρκινώματος βρέθηκε και με τον παράγοντα PD-ECGF/TP (βλέπε πιο κάτω). Συνέχεια αυτής της συσχέτισης ίσως αποτελεί η συσχέτιση της έκφρασης του παράγοντα HIF-1α με τον PD-ECGF/TP. Πολύτιμες γνώσεις σχετικές με την συσχέτιση αυτή μας δίνει μια σχετικά πρόσφατη μελέτη από την Ιαπωνία, όπου σε πειράματα με καλλιέργειες κυττάρων HL-60 έγινε παρατήρηση διαφόρων



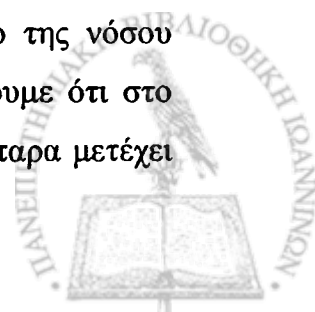
παραγόντων που εμπλέκονται τόσο σε μηχανισμούς απόπτωσης όσο και αγγειογένεσης. Μεταξύ αυτών μελετήθηκε η σχέση του παράγοντα HIF-1α με τον μεταβολίτη του PD-ECGF/TP, τη 2-δεοξυριβόζη-1-φωσφατάση (2-dR-1-P). Έτσι κάτω από συνθήκες υποξίας βρήκαν μια άμεση συσχέτιση αυτών, αφού η χορήγηση 2-dR-1-P υπό συνθήκες υποξίας και μόνο προκαλούσε μείωση των επιπέδων HIF-1α [476]. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η 2-dR-1-P επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και όχι του mRNA του HIF-1α. Παρότι ο μηχανισμός που συνδέει τους δυο αυτούς παράγοντες είναι άγνωστος, εντούτοις αποτελεί μια ένδειξη της σχέσης που έχουν στο μηχανισμό της αγγειογένεσης, αφού όπως αποδείχθηκε σε άλλο πείραμα, ο παράγοντας 2-dR-1-P είναι καταστολέας του PD-ECGF/TP [243]. Σε άλλη μελέτη με καλλιέργεια κυττάρων από τον Richard βρέθηκε επαγωγή του παράγοντα HIF-1α από διάφορους επαγωγείς της αγγειογένεσης, μεταξύ άλλων και της PD-ECGF/TP [193]. Βάσει αυτών, η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση που βρήκαμε μεταξύ των παραγόντων PD-ECGF/TP_{str} και HIF-1α ($p=0,029$) οφείλεται σε επαγωγική δράση που έχει ο πρώτος στον δεύτερο. Συσχέτιση των παραγόντων αυτών βρέθηκε και σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα, όπου συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ του HIF-1α, του HIF-2α και του PD-ECGF/TP [477]. Σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα έρχεται μια μελέτη καρκινωμάτων ενδομητρίου, όπου βρέθηκε συσχέτιση του HIF-1α με τον παράγοντα VEGF, αλλά όχι με τον PD-ECGF/TP [454]. Τέλος ο HIF-1α φαίνεται να αποτελεί δείκτη δυσμενούς βιολογικής συμπεριφοράς, αφού συσχετίζεται με το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος.

HIF-2α

Λίγες μελέτες υπάρχουν με τον παράγοντα HIF-2α στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, όσες περίπου και με τον HIF-1α. Σχετικά με το μηχανισμό δράσης του γνωρίζουμε πολύ λιγότερα από ότι για τον παράγοντα HIF-1α. Από ότι αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι χαρακτηριστική η έκφραση του παράγοντα αυτού σε περιοχές υποξίας-νέκρωσης, ενώ εκφράζεται τόσο από τα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και από το υποκείμενο στρώμα [187,210,478], ενώ κατά άλλους εκφράζεται μόνο από το υποκείμενο στρώμα, τα μακροφάγα κύτταρα και σε περιοχές γειτνιαζουσες νέκρωσης, όπου έχουμε επίταση της ιστικής υποξίας [188,210]. Εσωτερικός μάρτυρας, από ό,τι αναφέρεται, είναι τα μακροφάγα που συνοδεύουν το νεόπλασμα, σε αντίθεση με τον παράγοντα HIF-1α. Επισημαίνεται ότι η έκφραση στα μακροφάγα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα είναι κυτταροπλασματική και πολύ πιο έντονη από ότι στα νεοπλασματικά κύτταρα [187,188,478]. Να σημειωθεί ότι έχουν γίνει

μελέτες οι οποίες ασχολήθηκαν ειδικά με την έκφραση του παράγοντα αυτού από τα μακροφάγα και με τον πιθανό ρόλο που έχουν στο μηχανισμό της αγγειογένεσης, αλλά και στην πρόγνωση του νεοπλασματος. Ως γνωστό, ένα κεφάλαιο που απασχολεί αρκετούς ερευνητές είναι ο ρόλος της φλεγμονώδους διήθησης στο νεόπλασμα [187,188]. Από ό,τι φαίνεται σε διάφορες μελέτες, υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης του HIF-2α παράγοντα με τον παράγοντα VEGF [187,188,205-208]. Σε πειράματα στην ουροδόχο κύστη, κατά άλλους οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να έχουν θετική [188] και κατ' άλλους αντίστροφη συσχέτιση [210]. Μελέτες σε καρκινώματα ουροδόχου κύστης έδειξαν στατιστική συσχέτιση του παράγοντα με τον βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλασματος [188,210], το στάδιο της νόσου [188,210], περιοχές νέκρωσης [188,210], όπως διαπιστώθηκε και με την MVD [210]. Σε μία εργασία φαίνεται να έχει μεγαλύτερη έκφραση στα επιφανειακά καρκινώματα από ό,τι στα διηθητικά [209], και σε μια άλλη δεν φαίνεται να έχει συσχέτιση με τη MVD [188]. Τέλος υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι η έκφραση του HIF-2α δεν συσχετίζεται με κλινικές παραμέτρους, την έκφραση του VEGF ή την MVD, παρά μόνο μεταξύ επιφανειακών και διηθητικών καρκινωμάτων [478]. Η εν λόγω μελέτη έρχεται από το Τόκυο, από τους Guangbin και συνεργάτες, οι οποίοι από ό,τι φαίνεται έχουν μελετήσει αρκετά τον παράγοντα αυτόν, αφού έχουν άλλες 10 δημοσιεύσεις τουλάχιστον με αυτό τον παράγοντα σε διάφορους καρκινωμάτωδεις ιστούς.

.Στη δική μας μελέτη, η κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2α_c δεν συσχετίστηκε με καμία από τις κλινικές παραμέτρους της μελέτης αυτής, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουμε, ενώ μας βρίσκει σύμφωνους μόνο με τους Guangbin και συν. [478], οι οποίοι δεν βρήκαν συσχέτιση με καμία από τις κλινικές παραμέτρους. Επίσης δεν βρήκαμε συσχέτιση με τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα στην έκφραση του παράγοντα από το στρώμα, πλην μίας οριακής συσχέτισης μεταξύ των σταδίων της νόσου pT1 και pT2-4. Η αδυναμία συσχέτισής του με τον VEGF μας βρίσκει σύμφωνους με τον Jones και συν. [209]. Παρόλα αυτά η σχέση μεταξύ των δύο μορφών έκφρασης του παράγοντα HIF-2α, από το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων και από τα κύτταρα του στρώματος, ήταν στατιστικώς λίαν σημαντική. Παρατηρήσαμε ότι η χαμηλή κυτταροπλασματική έκφραση συσχετίστηκε με πρόωμη υποτροπή της νόσου. Σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του παράγοντα HIF-2α από τα κύτταρα του στρώματος, με προχωρημένο στάδιο της νόσου [188,210]. Λαμβάνοντας υπόψη την παρατήρηση αυτή, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στο ουροθηλιακό καρκίνωμα η πρωτεΐνη που παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα μετέχει



διαφορετικά στο μηχανισμό της αγγειογένεσης από την πρωτεΐνη του στρώματος. Παρατηρήσαμε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης HIF-2 α_c με την MVD ($p=0,052$) όπου, όπως αναφέραμε πιο πάνω, τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας [210], ενώ άλλοι διαφωνούν [188,478]. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν η συσχέτιση της έκφρασης του παράγοντα HIF-2 α_{str} από το στρώμα, με την έκφραση του παράγοντα PD-ECGF/TP $_{str}$ από το υποκείμενο στρώμα. Η κυτταροπλασματική έκφραση του παράγοντα HIF-2 α_c συσχετίστηκε με όλες τις μορφές έκφρασης του παράγοντα PD-ECGF/TP, κυτταροπλασματική, πυρηνική και από το στρώμα. Η σχέση φαίνεται να είναι πολύ σημαντική και με αυτήν συμφωνούν και άλλοι μελετητές. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε μελέτη καρκινωμάτων ενδομητρίου, όπου βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων HIF-2 α με τον PD-ECGF/TP και HIF-1 α με τον παράγοντα VEGF, αλλά όχι μεταξύ του HIF-1 α και του PD-ECGF/TP [454]. Στην εν λόγω μελέτη, λαμβάνοντας υπόψη άλλη μια παρατήρηση, ότι στο φυσιολογικό ενδομήτριο οι παράγοντες HIF-1 α και HIF-2 α επάγονται σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται στην αγγειογένεση μέσω διαφορετικών μηχανισμών [454]. Συσχέτιση των παραγόντων HIF και PD-ECGF/TP βρέθηκε και σε μία μελέτη σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα [477]. Δεν υπάρχουν μελέτες που να φαίνεται ποιος παράγοντας επάγει ποιόν, εντούτοις όλα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, ότι δηλαδή υπάρχει μία σχέση μεταξύ των HIF-2 α και PD-ECGF/TP. Τέλος, στατιστικώς σημαντική ήταν η συσχέτιση του HIF-2 α με την TSP-1 c ($p=0,034$), η οποία σχολιάζεται πιο κάτω.

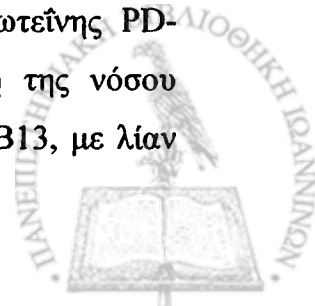
Να αναφέρουμε ότι, ο παράγοντας HIF2 α δεν συσχετίστηκε με το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος παρότι είναι επαγωγέας της αγγειογένεσης.



PD-ECGF/TP

Σε δύο μελέτες που έχει κάνει ο O'Brien, με διαφορετική τεχνική κάθε φορά, για τη σχέση της PD-ECGF/TP με το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, έχει βρει αύξηση της έκφρασής της σε σχέση με το φυσιολογικό ουροθήλιο x8 έως και x40 στα επιφανειακά καρκινώματα και x15 έως και x260 στα διηθητικά καρκινώματα [228,229]. Η επίταση της έκφρασης του PD-ECGF/TP κατά τη διήθηση του μυϊκού χιτώνα έχει βρεθεί και σε άλλους καρκινωμάτωσης ιστούς, όπως στο καρκίνωμα εκ πλακωδών επιθηλίων του οισοφάγου και στο αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου [225,247]. Η έκφρασή της σε ουροθηλιακά καρκινώματα συσχετίστηκε με επιθετικό φαινότυπο του νεοπλάσματος, δηλαδή με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, το στάδιο της νόσου, τη διηθητική ανάπτυξη του νεοπλάσματος, τη συνύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων αλλά και την τάση υποτροπής [227,229,246,247,471]. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί προγνωστικό παράγοντα σε άλλους καρκινωμάτωσης ιστούς, όπως στο καρκίνωμα μαστού, που είναι το πλέον μελετημένο όργανο. Εκεί βρέθηκε ότι ασθενείς με αυξημένη έκφραση του παράγοντα αυτού έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με 5-φλουοροουρακίλη και μεθοτρεξάτη (CMF) [466]. Όπως αναφέραμε στο γενικό μέρος, ο παράγοντας PD-ECGF/TP αποτελεί στόχο κυτταροτοξικών αντιμεταβολικών φαρμάκων, όπως τα ανάλογα της 5-φλουοροουρακίλης και η μεθοτρεξάτη [244].

Τα δικά μας αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Δηλαδή στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της κυτταροπλασματικής, της πυρηνικής αλλά και της στρωματικής έκφρασης του PD-ECGF/TP με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας II και III, μεταξύ των διαφορετικών σταδίων της νόσου όπως pT_a με pT₂₋₄ αλλά και pT₁ με pT₂₋₄, με το μέγεθος του όγκου όπως αναφέραμε και πιο πάνω, αλλά και με επιθετικό φαινότυπο. Δηλαδή έχουμε αύξηση της έκφρασης, της παραγωγής και δράσης του παράγοντα PD-ECGF/TP από την αρχή της καρκινογένεσης (in situ καρκίνωμα) η οποία επιτείνεται όσο το νεόπλασμα διηθεί, αλλά και όσο πιο χαμηλής διαφοροποίησης είναι. Με την υποτροπή της νόσου βρέθηκε στατιστική συσχέτιση με την πυρηνική έκφραση του παράγοντα, γεγονός αλληλένδετο, κατά την άποψή μας, με τα προαναφερθέντα περί της σχέσης της με επιθετικού φαινοτύπου νεοπλάσματα. Πολύ σημαντικό εύρημα κατά την μελέτη των επιφανειακών καρκινωμάτων που περιλαμβάνονταν στο υλικό μας, με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση, αποτέλεσε το ότι η πυρηνική έκφραση της πρωτεΐνης PD-ECGF/TP_n αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου (υποτροπή νόσου), όπως φαίνεται στην καμπύλη Kaplan-Meier του σχήματος B13, με λίαν

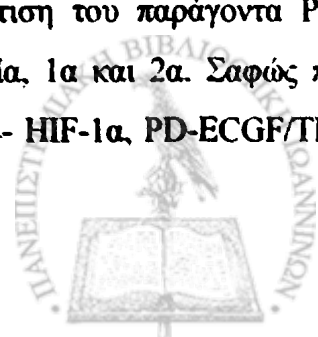


στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p=0,0001$). Η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του PD-ECGF/TP_n με την συνύπαρξη καρκινώματος *in situ*, ίσως μπορεί να εξηγηθεί με τα ευρήματα που διαπιστώθηκαν κατά τη διερεύνηση των μεταλλάξεων του DNA, που αναφέρονται και πιο πάνω. Δηλαδή ότι τα καρκινώματα *in situ* έχουν κοινή μετάλλαξη με τα διηθητικά καρκινώματα, ενώ έχουν διαφορετική από τα επιφανειακά καρκινώματα [228,463,464].

Στατιστικώς λίαν σημαντική ήταν η συσχέτιση όλων των μορφών έκφρασης του με την μικροαγγειακή πυκνότητα MVD. Αυτό το εύρημα μας, απ' ό,τι γνωρίζουμε, αναφέρεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Δύο άλλες μελέτες έχουν ασχοληθεί με το συγκεκριμένο θέμα, των οποίων τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με τα δικά μας [248]. Οι O'Brien και συν. βρήκαν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα PD-ECGF/TP και της MVD [229], ενώ οι Li και συν. δεν βρήκαν καμία συσχέτιση [248]. Σημαντικό είναι να γνωρίζουμε ότι σε πολλές άλλες μελέτες που ασχολήθηκαν με την έκφραση αυτού του παράγοντα σε άλλους νεοπλασματικούς ιστούς όπως στο μαστό, τον οισοφάγο, την ωοθήκη και το νεφρό βρέθηκε θετική στατιστική συσχέτιση της έκφρασής του με την MVD [225,479,480,481]. Είναι γνωστό ότι ο PD-ECGF/TP είναι ένας αγγειογενετικός παράγοντας, ο οποίος συσχετίστηκε από άλλους συγγραφείς με την MVD σε άλλα όργανα, γεγονός το οποίο μας κάνει να υποθέτουμε ότι η διαφορά στα αποτελέσματα με τους συγγραφείς που ασχολήθηκαν με την ουροδόχο κύστη ίσως οφείλεται σε θέμα τεχνικής της καταμέτρησης των αγγείων. Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι ο παράγοντας αυτός συνδέεται με την αγγειακή πυκνότητα αλλά και γενικότερα με την αγγειογένεση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα.

Η στατιστική συσχέτισή του με διάφορους δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης και το μέγεθος του νεοπλάσματος, το στάδιο και την υποτροπή της νόσου, υποδηλώνουν μια σχέση του παράγοντα αυτού με επιθετική συμπεριφορά. Λογικό επακόλουθο φαίνεται να είναι και το εύρημα μας, της στατιστικής σημαντικής συσχέτισης του παράγοντα PD-ECGF/TP από το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και από το στρώμα με τους δείκτες πολλαπλασιασμού Ki-67 και PCNA. Παρόμοια συσχέτιση μεταξύ PD-ECGF/TP και Ki-67 βρέθηκε σε μια μελέτη με καρκινώματα τραχήλου μήτρας [482].

Όπως αναφέραμε εκτενώς πιο πάνω, διαπιστώθηκε συσχέτιση του παράγοντα PD-ECGF/TP και με τους δύο παράγοντες τους επάγοντες την υποξία, 1α και 2α. Σαφώς πιο σημαντική είναι η συσχέτισή του με τον HIF-2α (PD-ECGF/TP_{str}- HIF-1α, PD-ECGF/TP_c- HIF-2α_c, PD-ECGF/TP_n- HIF-2α_c και PD-ECGF/TP_{str}- HIF-2α_c).



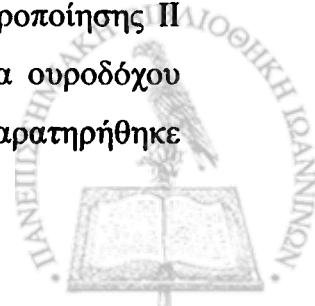
Η έκφραση του PD-ECGF/TP_{str} συσχετίστηκε επίσης με τον παράγοντα VEGF, το οποίο σχολιάστηκε πιο πάνω.

Η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της PD-ECGF/TP_c με την TSP-1_{str} σχολιάζεται πιο κάτω.

TSP-1

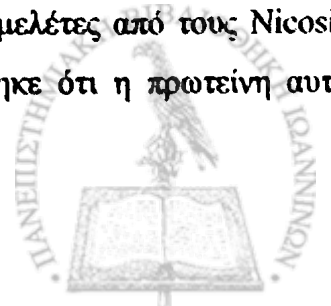
Εάν ανατρέξουμε στη βιβλιογραφία θα βρούμε μόνο τρεις δημοσιεύσεις για την έκφραση της TSP-1 στην ουροδόχο κύστη, δύο από τον Grossfeld και συνεργάτες και μία από τον Goddard και συνεργάτες [79,276,483]. Από αυτές η του Grossfeld και συν. το 1996, αναφέρουν απλώς ότι κατάφεραν να δουν έκφραση της πρωτεΐνης TSP-1 σε ουροθηλιακό καρκίνωμα [483], ενώ το 1997 είχαν εντυπωσιακά αποτελέσματα σε μελέτη 163 περιπτώσεων ολικής κυστεκτομής [79]. Στην τελευταία αναφέρεται ότι η TSP-1 αποτελεί καταστολέα της αγγειογένεσης αλλά και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου, αφού, όπου διαπιστώθηκε μικρή έκφραση, οι ασθενείς είχαν πολύ χειρότερη πορεία, με συχνότερες υποτροπές αλλά και μικρότερο μέσο χρόνο επιβίωσης. Το 2002 όμως ο Goddard και συνεργάτες έκαναν μια μελέτη σε 220 περιπτώσεις καρκινώματος ουροδόχου κύστης [276]. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε στατιστική συσχέτιση της έκφρασης της TSP-1 με την ηλικία, το στάδιο της νόσου, τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος, την υποτροπή και την μείωση του μέσου χρόνου επιβίωσης, ενώ χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης συσχετίστηκαν με αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα. Να τονίσουμε ότι στην εν λόγω μελέτη τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν εκτιμώντας μόνο την περιαγγειακή έκφραση της πρωτεΐνης. [276]. Σε δύο παλαιότερες μελέτες από τους Nicosia και Ben Ezra σε καλλιέργειες κυττάρων αρουραίων και κερατοειδείς χιτώνες κουνελιών, η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να συσχετίζεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης [455,456]. Σε πρόσφατες μελέτες με μοριακές τεχνικές δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα της TSP-1 σε ουροθηλιακό καρκίνωμα, παρά μόνο αύξηση του παράγοντα VEGF [484].

Κατά τη μελέτη της έκφρασης της TSP-1 από το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων (TSP-1_c), στη δική μας μελέτη, είδαμε μια μικρή συσχέτιση της TSP-1_c από τα χαμηλής και μέτριας διαφοροποίησης καρκινώματα (ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης II και III). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν τόσο σε μελέτες με καρκινώματα ουροδόχου κύστης αλλά και με άλλα καρκινώματα όπως θυρεοειδούς αδένος κ.α [79,485]. Παρατηρήθηκε



μια μείωση της έκφρασής της κατά το στάδιο pT1, το οποίο όμως συνδέθηκε στατιστικώς με τα στάδια της νόσου pTa και pT2-4. Ακόμα πιο ενδιαφέροντα είναι τα αποτελέσματα της έκφρασής της από το στρώμα (TSP-1_{str}), όπου βρέθηκε σημαντική αντίστροφη συσχέτιση στην έκφρασή της μεταξύ των σταδίων pTa με pT2-4 και pT1 με pT2-4. Αντίστροφη συσχέτιση της TSP-1_{str} βρέθηκε επίσης και με το μέγεθος του όγκου. Εάν προσέξουμε τα σχεδιαγράμματα B15 και B16, θα δούμε ότι κατά τα στάδια της νόσου pTa, pT1 και pT2-4 έχουμε αρχικά μια αυξημένη έκφραση της TSP-1 τόσο από το νεόπλασμα όσο και από το στρώμα, ακολουθεί μείωση της έκφρασης κατά το στάδιο pT1 και τέλος αύξηση κατά τη διήθηση του μυϊκού χιτώνα. Σημαντικό είναι ότι όλος αυτός ο μηχανισμός έχει μια σημαντική στατιστική συσχέτιση. Αυτά μας δείχνουν μια σχέση της TSP-1_c και TSP-1_{str} με την εξέλιξη της νόσου που συμφωνεί με την μελέτη του Goddard, ο οποίος βρήκε συσχέτιση της έκφρασης της TSP-1 τόσο με τα ιστολογικά grade, πράγμα που δεν φάνηκε σε εμάς, όσο και με τα στάδια της νόσου [276]. Αυτό συσχετίζεται με τον «προστατευτικό» ή αγγειοκατασταλτικό ρόλο που φαίνεται να έχει η πρωτεΐνη στην ουροδόχο κύστη. Η αντίστροφη συσχέτιση που βρέθηκε όσον αφορά το μέγεθος του όγκου, παρότι δεν αναφέρεται από τους άλλους συγγραφείς κάτι παρόμοιο, θα μπορούσε να εξηγηθεί στα πλαίσια του προστατευτικού ρόλου της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται από τη σχέση της με τις προαναφερθείσες ευνοϊκές παραμέτρους.

Σε αντίθεση με τις μελέτες των Grossfeld και Goddard, δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση με την υποτροπή ή την εξέλιξη σε διηθητικό καρκίνωμα (διήθηση του μυϊκού χιτώνα). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες, όπως χρήση διαφορετικών αντισωμάτων, σε δυσκολίες στην εκτίμηση του υλικού, ή άλλους παράγοντες. Η στατιστικώς λίκαν σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της TSP-1 από το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων και η οριακή συσχέτιση της έκφρασης της από το στρώμα με την αγγειακή πυκνότητα, αποτελεί στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της εμπλοκής της στο μηχανισμό της αγγειογένεσης. Για το ρόλο της TSP-1 στην αγγειογένεση, όπως αναφέραμε και στο γενικό μέρος, υπάρχουν πολλές απόψεις, με επικρατέστερη την κατασταλτική δράση της στο μηχανισμό της αγγειογένεσης [255,258,260-266,276]. Ο Grossfeld και συνεργάτες είχαν βρει αντίστροφη συσχέτιση της έκφρασης της TSP-1 με την μικροαγγειακή πυκνότητα [79], όπως και ο Goddard. Στην τελευταία μελέτη, όπως αναφέραμε και πιο πάνω ελήφθη υπόψη μόνο η περιαγγειακή έκφραση της πρωτεΐνης [276]. Σε δύο παλαιότερες μελέτες από τους Nicosia και Ben Ezra σε πειραματόζωα (κουνέλια και αρουραίους) φάνηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή συσχετίζεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης [455,456].



Υπάρχουν μερικές πρόσφατες μελέτες που τα αποτελέσματά τους συνηγορούν για δύο τρόπους δράσης της TSP-1 στην αγγειογένεση. Σε αυτές φαίνεται ότι η TSP-1 σε χαμηλά επίπεδα έχει επαγωγική δράση, ενώ σε υψηλά επίπεδα κατασταλτική [268,272,275], ή ότι στα αρχικά στάδια της ισχαιμίας ο VEGF καταστέλλει την έκφραση της TSP-1, ενώ σε όψιμη φάση δρα ακριβώς αντίθετα [486,488].

Στη δική μας μελέτη διαπιστώσαμε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της TSP-1^{str} με την έκφραση του παράγοντα VEGF. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν στην διάθεσή μας για αυτή τη συσχέτιση είναι περιορισμένα. Οι Tokunaga και Kazuno αναφέρουν έλλειψη σχέσης της TSP-1 και -2 με τον VEGF σε νεοπλάσματα γλοιακής προέλευσης [487], ενώ ο Bequet-Romeo σε πειράματα με κύτταρα μολυσμένα με τον ιό HPV-16, βρήκε τα επίπεδα της TSP-1 να επηρεάζονται από τα επίπεδα των πρωτεϊνών VEGF και FGF-2 [253]. Άλλοι ερευνητές, όπως ο Iruela-Arispe και συν., σε πειραματικά μοντέλα βρήκαν την TSP-1 να καταστέλλει την αγγειογενετική δράση του VEGF [488]. Σε δυο άλλες πειραματικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι ο VEGF επάγει τη διφασική έκφραση της TSP-1 με αρνητική παλίνδρομη δράση στην TSP-1 στην αρχική φάση, και επαγωγική στην όψιμη φάση, σε *in vivo* πειράματα με κερατοειδείς χιτώνες και εγκεφάλους πειραματόζωων, στους οποίους προκάλεσαν τεχνικά ισχαιμία. Σε αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι τα επίπεδα της TSP-1 επηρεάζονται άμεσα από τον παράγοντα VEGF, θετικά η αρνητικά, ανάλογα με τη φάση της αγγειογένεσης, που στα πειράματα αυτά φαίνεται να είναι λίγες ημέρες μετά την ενεργοποίηση του μηχανισμού [486,488]. Ίσως η συσχέτιση που βρήκαμε εμείς με τους δύο αυτούς παράγοντες να αποτελεί επιβεβαίωση της σχέσης της TSP-1 με τον παράγοντα VEGF. Εάν αποδεχθούμε τη θεωρία περί διφασικής δράσης του VEGF στην TSP-1, δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα εάν οι περιπτώσεις τις δικής μας μελέτης βρίσκονται στην αρχική η στην όψιμη φάση αφού λογικά στις κακοήθειες έχουμε μια παρατεινόμενη ισχαιμία τουλάχιστον σε κεντρικές θέσεις του νεοπλάσματος.

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των TSP-1^{str} και PD-ECGF/TP_c. Σε διερεύνηση της βιβλιογραφίας βρήκαμε μόνο δύο μελέτες (καμία σε καρκινώματα ουροδόχου κύστης), όπου αναφέρονται αυτοί οι δύο παράγοντες. Και στις δύο μελέτες η PD-ECGF/TP συσχετίζεται με την επαγωγή της αγγειογένεσης, ενώ η TSP-1 με την καταστολή της αγγειογένεσης [487,489]. Από τις δύο αυτές μελέτες μόνο σε μια βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων. Στη μελέτη αυτή που έγινε σε 67 περιπτώσεις χολαγγειοκαρκινωμάτων διαπιστώθηκε σαφώς χειρότερη πρόγνωση στους ασθενείς που είχαν θετική έκφραση τόσο στην PD-ECGF/TP όσο και στην TSP-1 [489]. Όπως φαίνεται



απο τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα η δική μας μελέτη είναι η πρώτη που βρίσκει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών.

Από ό,τι γνωρίζουμε, μόνο μια μελέτη υπάρχει έως τώρα που έχει γίνει με τους παράγοντες HIF και TSP-1, χρησιμοποιώντας την τεχνική του *in situ* υβριδισμού. Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε συσχέτιση του παράγοντα VEGF με τον HIF-1α, αλλά καμία συσχέτιση μεταξύ HIF και TSP-1 [490]. Στη δική μας μελέτη παρατηρήσαμε συσχέτιση μεταξύ TSP-1_c και HIF-2α_{str}. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα ευρήματά μας της στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης της TSP-1 με τους άλλους γνωστούς αγγειογενετικούς παράγοντες που περιλαμβάνονταν στη δική μας μελέτη, όπως τον VEGF, την PD-ECGF/TP_c και τον HIF-2α αλλά και με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, μπορούν να εξηγηθούν από τις πρόσφατες επικρατέστερες θεωρίες. Είτε δηλαδή τη θεωρία για τους δύο τρόπους δράσης της TSP-1, ότι σε χαμηλά επίπεδα έχει επαγωγική δράση ενώ σε υψηλά επίπεδα κατασταλτική [268,272,275], ή από τη θεωρία ότι στα αρχικά στάδια ισχαιμίας ο VEGF καταστέλλει την έκφραση της TSP-1, ενώ σε όψιμη φάση δρα ακριβώς αντίθετα [486,488]. Όπως είδαμε πιο πάνω, τόσο και από την δική μας μελέτη όσο και από άλλες, η έκφραση του παράγοντα VEGF συσχετίζεται με τους άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες.

Συμπερασματικά, από τη δική μας μελέτη φαίνεται ότι η TSP-1 δεν αποτελεί δείκτη για την πρόβλεψη υποτροπής στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης ούτε για τη διήθηση του μυϊκού χιτώνα από το νεόπλασμα. Όμως η μείωση της έκφρασης αυτής συσχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο από το νεόπλασμα. Η στρωματική έκφραση της TSP-1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση μαζί με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, αφού φαίνεται να έχει θετική συσχέτιση με αρκετούς από αυτούς.



5. Συμπεράσματα

01. Η έλλειψη συσχέτισης της MVD με τον παράγοντα VEGF στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης ίσως αποτελεί την πρώτη παρατήρηση και διαπίστωση τόσο άλλων μελετών στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης, όσο και τις δικής μας, που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μελετών σε άλλους νεοπλασματικούς ιστούς.
02. Η μη συσχέτιση του VEGF με τη μικροαγγειακή πυκνότητα υποδηλώνει την μη άμεση τουλάχιστον εμπλοκή του στη διεργασία της αγγειογένεσης. Τόσο τα δικά μας αποτελέσματα όσο και σχεδόν όλων των άλλων ερευνητών δείχνουν ότι ο παράγοντας VEGF δρα διαφορετικά στα επιφανειακά από ό,τι στα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα.
03. Από τα ευρήματα της μελέτης μας φαίνεται ότι η έκφραση του VEGF δεν αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη της εξέλιξης και της υποτροπής των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης. Ενώ σε άλλους νεοπλασματικούς ιστούς ο VEGF φαίνεται να παίζει πρωτεύοντα ρόλο στο μηχανισμό της αγγειογένεσης, στην ουροδόχο κύστη πιθανώς αυτό να μην ισχύει. Τόσο τα δικά μας αποτελέσματα, όσο και των άλλων ερευνητών, δείχνουν τον παράγοντα VEGF να παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην αγγειογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος.
04. Η διαφορά του ρόλου που έχει ο παράγοντας VEGF στα επιφανειακά καρκινώματα (στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την MVD) και στα διηθητικά (μη συσχέτιση με την MVD) συνηγορεί υπέρ της θεωρίας του O'Brien περί διαφορετικών οδών αγγειογένεσης, μεταξύ των διηθητικών και μη καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης.
05. Συσχέτιση της MVD με τα νεοπλάσματα που είχαν πολυεστιακή εντόπιση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τη γνώση που έχουμε από μελέτες μοριακής γενετικής που βρίσκουν το 99% των πολυεστιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης να είναι μονοκλωνικής προέλευσης. Μια εξήγηση είναι στα νεοπλάσματα αυτά να έχει διασπαρθεί ο πιο επιθετικός κλώνος, οπότε το κοινό στοιχείο που έχουν είναι ότι πρόκειται για επιθετικά νεοπλάσματα.
06. Όσον αφορά στη μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας στα επιφανειακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης, παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση με την εξέλιξη σε διήθηση του μυϊκού χιτώνα στα νεοπλάσματα που είχαν περισσότερη από το μέσο όρο μικροαγγειακή πυκνότητα, ιστολογικού grade III. Με αυτή την παρατήρηση μπορούμε να προβλέψουμε μια ομάδα ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου.



07. Βέβαιη είναι η εμπλοκή του παράγοντα HIF-1α στην αγγειογένεση και μάλιστα ως επαγωγέα αυτής, αφού φάνηκε να έχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση τόσο με την MVD όσο και με την PDECGF/TP, γνωστό αγγειογενετικό παράγοντα.
08. Ο παράγοντας HIF-1α εμμέσως συσχετίζεται με τα επιθετικά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης, αφού στην καμπύλη Kaplan-Meier φαίνεται να συσχετίζεται με τα καρκινώματα τα οποία εξελίχθηκαν σε διηθητικά.
09. Παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση του HIF-1α, του PD-ECGF/TP_n με τη συνύπαρξη in situ καρκινώματος. Αυτό ίσως εξηγείται απο το γεγονός ότι τα νεοπλάσματα που συνυπάρχει θέση in situ καρκινώματος αποτελούν μια ξεχωριστή οντότητα, αφού είναι γνωστό ότι προέρχονται από διαφορετική μετάλλαξη.
10. Στη δική μας μελέτη αποδεικνύεται να ισχύει η παρατήρηση άλλων ερευνητών σε in vivo πειράματα, περί επαγωγικής δράσης του παράγοντα PD-ECGF/TP στον HIF-1α και HIF-2α.
11. Παρατηρήθηκε ότι η χαμηλή κυτταροπλασματική έκφραση HIF-2α συσχετίζεται με πρόωμη υποτροπή της νόσου.
12. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματά μας αναφορικά με την έκφραση του παράγοντα HIF-2α, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη HIF-2α που παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα λειτουργεί διαφορετικά στο μηχανισμό της αγγειογένεσης απ' ό, τι αυτή που παράγεται από το υποκείμενο στρώμα στο ουροθηλιακό καρκίνωμα.
13. Η πυρηνική έκφραση της PD-ECGF/TP_n αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου.
14. Η στατιστική συσχέτιση του PD-ECGF/TP με διάφορους δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, το μέγεθος του νεοπλάσματος, το στάδιο, το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος αλλά και με την υποτροπή της νόσου και τη συνύπαρξη in situ καρκινώματος, υποδηλώνουν μια σχέση του παράγοντα αυτού με επιθετική συμπεριφορά
15. Η στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση της TSP-1 με την εξέλιξη της νόσου και το μέγεθος του όγκου αποδίδεται στον «προστατευτικό» ή αγγειοκατασταλτικό ρόλο που φαίνεται να έχει η πρωτεΐνη αυτή στην ουροδόχο κύστη σε κάποιο βαθμό.
16. Η στατιστικώς σημαντική συσχέτισή της TSP-1 με άλλους γνωστούς επαγωγείς της αγγειογένεσης, όπως οι παράγοντες VEGF, PD-ECGF/TP_e και HIF-2α, αλλά και το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος, συνηγορεί υπέρ της επαγωγικής δράσης της πρωτεΐνης αυτής στην καρκινογένεση. Σε αντίθεση με αυτό είναι η αντίστροφη συσχέτιση της

έκφρασης της TSP-1 μεταξύ μη διηθητικών και διηθητικών καρκινωμάτων όπως επίσης η αντίστροφη συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου. Τα εύρηματα αυτά είναι συμβατά και με τις δύο θεωρίες που υπάρχουν για τον τρόπο δράσης της TSP-1: Σύμφωνα με την πρώτη πιστεύεται ότι η TSP-1 σε χαμηλά επίπεδα έχει επαγωγική δράση ενώ σε υψηλά επίπεδα κατισταλτική. Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία πιστεύεται ότι υπάρχει διφασική δράση του παράγοντα VEGF στην TSP-1. Κατά αυτήν στα αρχικά στάδια ισχαιμίας ο VEGF καταστέλλει την έκφραση της TSP-1 ενώ σε όψιμη φάση δρα ακριβώς αντίθετα.

17. Στη δική μας μελέτη η TSP-1 φαίνεται να μην αποτελεί δείκτη για την πρόβλεψη υποτροπής στο καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης ούτε για την εξέλιξή του σε διηθητικό με διήθηση του μυϊκού χιτώνα. Όμως η μείωση της έκφρασης αυτής συσχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο από το νεόπλασμα. Η στρωματική έκφραση της TSP-1 φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην αγγειογένεση μαζί με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες.
18. Τέλος τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, τα οποία συνηγορούν υπέρ της διαφορετικής προέλευσης του επιφανειακού από το διηθητικό και το *in situ* ουροθηλιακό καρκίνωμα (διαφορετικές μεταλλάξεις), είναι:
 - I. Η διαφορά σχέσης MVD και VEGF στα επιφανειακά και διηθητικά καρκινώματα.
 - II. Η συσχέτιση του HIF-1α με τη συνύπαρξη *in situ* καρκινώματος.
 - III. Η διαφορά της σχέσης PD-ECGF/TP στα επιφανειακά και διηθητικά καρκινώματα όπως και η συσχέτισή του με παρουσία ή όχι *in situ* καρκινώματος.



6. Περίληψη

Το υλικό μας αποτέλεσαν 149 καρκινώματα ουροδόχου κύστης εκ μεταβατικού επιθηλίου. Αυτά συλλέχθηκαν από το Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα κατά τη χρονική περίοδο 1997-2000. Υπήρξε τακτική κλινική παρακολούθηση στους 3, 6, 9 και 12 μήνες κατά το πρώτο έτος και κάθε 6 μήνες τα επόμενα έτη, με μέσο όρο παρακολούθησης 38,6 μήνες.

Κάθε παρασκεύασμα μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα φορμόλης 10%. Ελήφθησαν τομές από κύβους παραφίνης, έγινε χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης και διαγνώσθηκαν με βάση την ταξινόμηση WHO 1999. Η σταδιοποίηση έγινε κατά το σύστημα TNM, όπως προσδιορίστηκε το 1997 από την AJCC/UICC (American Joint Commission on Cancer /International Union Against Cancer).

Το καρκίνωμα εκ μεταβατικού επιθηλίου είναι πέμπτο σε συχνότητα στις Η.Π.Α. Τόσο η ανάπτυξη όσο και η μετάσταση του νεοπλάσματος εξαρτώνται από την παροχή αίματος, η οποία επιτυγχάνεται με τον μηχανισμό της αγγειογένεσης. Εάν θα δημιουργηθούν ή όχι νέα αγγεία, εξαρτάται από την ισορροπία αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του νεοπλάσματος. Σήμερα μας είναι γνωστοί αρκετοί επαγωγείς και καταστολείς της αγγειογένεσης.

Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση της αγγειακής πυκνότητας με ανάδειξη των αγγείων μέσω της ανοσοϊστοχημικής χρώσης CD34. Επίσης η ανοσοϊστοχημική μελέτη των επαγωγέων της αγγειογένεσης: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), παράγοντας επάγων την υποξία 1α και 2α (HIF-1α/HIF-2α), αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας/ φωσφορυλάση της θυμιδίνης (PD-ECGF/TP), αλλά και της θρομβοσπονδίνης-1 (TSP-1) η οποία έχει αμφιλεγόμενη δράση στο μηχανισμό της αγγειογένεσης. Συσχετίσαμε την έκφραση αυτών με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (βαθμός κακοηθείας, στάδιο νόσου, πρώτη εμφάνιση του νεοπλάσματος ή υποτροπή, μονήρης ή πολυεστιακή εντόπιση, συνύπαρξη ενδοεπιθηλιακού καρκινώματος και εξέλιξη της νόσου με διήθηση του μυϊκού χιτώνα

Παρατηρήθηκε έλλειψη συσχέτισης της MVD με τον παράγοντα VEGF που μας βρίσκει σύμφωνους με τη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτό υποδηλώνει ότι ο παράγοντας VEGF παίζει δευτερεύοντα ρόλο στο μηχανισμό της αγγειογένεσης του ουροθηλιακού καρκινώματος. Διαπιστώσαμε διαφορά στην έκφραση επιφανειακών και διθητικών καρκινωμάτων αποτελεσμα που μας βρίσκει σύμφωνους με την θεωρία του O'Brien περί δύο διαφορετικών οδών

καρκινογένεσης στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. Επίσης διαπιστώθηκε συσχέτιση της MVD με τα νεοπλάσματα που είχαν πολυεστιακή εντόπιση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τη γνώση που έχουμε από μελέτες μοριακής γενετικής που βρίσκουν το 99% των πολυεστιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης να είναι μονοκλωνικής προέλευσης. Στη μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας στα επιφανειακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης, παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση με την εξέλιξη σε διήθηση του μυϊκού χιτώνα στα νεοπλάσματα που είχαν περισσότερη από το μέσο όρο μικροαγγειακή πυκνότητα, ιστολογικού grade III. Με αυτή την παρατήρηση μπορούμε να προβλέψουμε μια ομάδα ασθενών με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Βέβαιο είναι, τόσο ο παράγοντας HIF-1α, όσο και ο PD-ECGF/TP αποτελούν σημαντικούς επαγωγείς της αγγειογένεσης στο ουροθηλιακό καρκίνωμα λόγω των στατιστικώς σημαντικών συσχετίσεων που βρέθηκαν στη μελέτη αυτή με τον τελευταίο να συσχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά από το νεόπλασμα. Στη δική μας μελέτη φαίνεται να ισχύει η παρατήρηση άλλων ερευνητών σε *in vivo* πειράματα, περί επαγωγικής δράσης του παράγοντα PD-ECGF/TP στον HIF-1α και HIF-2α.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η χαμηλή κυτταροπλασματική έκφραση HIF-2α συσχετίζεται με πρόωμη υποτροπή της νόσου. Επιπλέον η πυρηνική έκφραση της PD-ECGF/TP_n φάνηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου.

Η στατιστικώς σημαντική αντίστροφη συσχέτιση της TSP-1 με την εξέλιξη της νόσου και το μέγεθος του όγκου αποδίδεται στον αγγειοκατασταλτικό ρόλο που φαίνεται να έχει η πρωτεΐνη αυτή στην ουροδόχο κύστη, ενώ η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της TSP-1 με άλλους γνωστούς επαγωγείς της αγγειογένεσης, όπως οι παράγοντες VEGF, PD-ECGF/TP_c και HIF-2α, αλλά και το αυξητικό δυναμικό του νεοπλάσματος συνηγορούν υπέρ της επαγωγικής δράσης της πρωτεΐνης αυτής στην καρκινογένεση. Νεότερες θεωρίες προτείνουν ότι η TSP-1 έχει διπλή δράση στο μηχανισμό της αγγειογένεσης, τόσο κατασταλτική όσο και επαγωγική, η οποία επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα.



7. Abstract

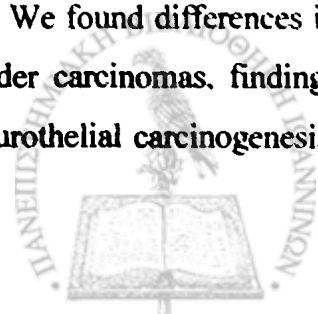
We studied the tissue from primary bladder tumours, 149 urothelial carcinomas, resected between May 1997 and August 2000. These were collected from the Department of Pathology, Hatzikosta General Hospital of Ioannina. Follow-up cystoscopies and biochemical profile, chest radiography, and a physical examination were performed at 3, 6, 9 and 12 months after TURBT, for the first year, and every 6 months thereafter. The mean time of follow up was 38,6 months.

Immediately after excision, specimens were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin wax, cut at 4 μ m, and stained with hematoxylin and eosin for routine light microscopy. Histological grading and staging were performed in accordance with the guidelines of the AJCC/UICC (American Joint Commission on Cancer /International Union Against Cancer).

Transitional cell carcinoma (TCC) is the fifth most common carcinoma in U.S.A. Tumor growth and metastasis depend on the development of a local blood supply during the process of angiogenesis. Whether or not vessels develop, is determined by the balance between inhibitors of angiogenesis and angiogenic stimuli present within a given tissue microenvironment. There are too many angiogenic, stimulators and inhibitors involved in human tumor angiogenesis.

The purpose of the present study was to investigate the immunohistochemical expression of the most known angiogenic factors and to elucidate their role in tumor growth. The most known factors involved in human bladder carcinogenesis include vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factors (HIF-1 α and HIF-2 α), platelet-derived growth factor (PD-ECGF/TP) as well as angiogenic inhibitors like thrombospondin-1 (TSP-1). We compared their expression with clinicopathological features (grade, stage, concurrent in situ carcinoma, multifocality, recurrence rate, progression to muscle infiltrating disease), in an attempt to clarify their prognostic value. We also assessed the possible relation of their expression with microvessel density (MVD), assessed by CD34 immunostaining.

The results of the present study showed no relationship between MVD and VEGF expression. We suggest that there is a different pathway of VEGF activation in bladder cancer than in other neoplastic tissues, where VEGF is a major stimulator. We found differences in the expression of VEGF between superficial and infiltrating bladder carcinomas, findings consistent with the theory of O'Brien about two different ways of urothelial carcinogenesis.



We also found a relationship between MVD and multifocality being known that 99% of multifocal carcinomas have monoclonal origin. Progression free survival curves of categorized microvessel density (up to and higher than median value) differed significantly only in grade III patients. HIF-1 α correlated with MVD and PDECGF/TP. Higher HIF-1 α expression was noted in cases with concurrent in situ component as well as in the cases that progressed to muscle infiltrate disease. All these correlations indicate that HIF-1 α overexpression could be associated with more aggressive behavior of bladder cancer. A positive relationship of HIF-1 α expression with PD-ECGF/TP was observed, according to the previous studies. Nuclear PD-ECGF/TP expression was correlated with a recurrence-free rate both in univariate and multivariate analysis and was found to be as an independent prognostic factor for recurrence.

In addition, a marginal correlation of tumour TSP-1 expression with MVD and a strong relationship of stromal TSP-1 expression with tumour VEGF, PD-ECGF/TP_c and HIF-2 α expression were noted suggesting its contribution in the regulation of tumour angiogenesis. Furthermore, an inverse relationship of tumour and stromal TSP-1 with tumour stage was found, suggesting the protective effect of TSP-1 expression in bladder cancer. Last theories about TSP-1, suggest that it may stimulate or inhibit angiogenesis under different circumstances. Our results are in agreement with these theories.

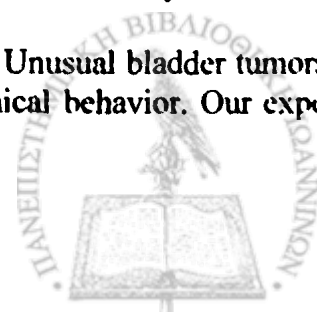


8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

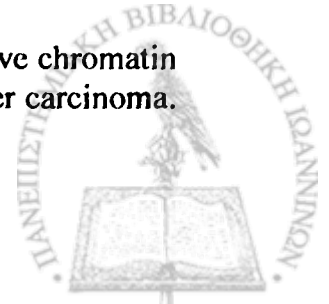
1. Sadler T.W. Medical Embryology, 6th ed Baltimore: Williams & Wilkins; 1990: 300-302
2. Moore K.L. The developing human, 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998: 315-316
3. Moore K.L. The perineum and pelvis clinically oriented anatomy, 2nd ed., Baltimore: Williams & Wilkins; 1985: 298-387
4. Tanagho EA. «Anatomy of the lower urinary tract» in Walsh P.C., Gittes R.F., Perlmutter A.D., Stamey T.A., eds. Campbell's Urology, 5th ed., Philadelphia: W.B. Saunders: 1986: 46-58
5. Kern W.H. Bibbo M., "Urinary Tract" in Bibbo M., ed. Comprehensive Cytopathology, 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders. 1991: 445-476.
6. Tannenbaum M. Inflammatory proliferative lesion of the urinary bladder: squamous metaplasia, Urology 1976;7:428-9.
7. Baharan B.S., Tiamson E.M., Wenk R.E., Berker B.W., Hamamoto G. Nephrogenic adenomas of the urinary bladder and urethra, Hum Pathol 1981 Oct;12(10):907-16.
8. Bulger R.E. "The urinary system" Weiss L. ed. in: Cell and tissue biology, 6th ed., Baltimore: Urban & Schwarzenberg. 1988: 844-848
9. Koss L.G. "Tumors of the urinary bladder" in Atlas of tumor pathology, Fascicle II, 2nd series. Washington, 1985; DC:AFIP.
10. Fawcett D.W. "The urinary system" in: A textbook of histology. 12th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1994; 758-764.
11. Dixon JS, Gosling JA. Histology and fine structure of the muscularis mucosa of the human urinary bladder. J Anat. 1983;136:265-71.
12. Ro JY Ayala AG, EL-Nagger A Muscularis mucosa of urinary bladder: importance for staging and treatment. Am J Surg. pathol. 1987;11:668-73.
13. Kroft Sh, Oyasau R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. Lab Invest. 1994;71:158-74.
14. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM. Tumors of the Kidney, Bladder, and related Structures. 3rd ed. Rosai J, ed. Atlas of tumor Pathology. Vol 11. Bethesda MD: Armed Forces Institute of Pathology: 1994.
15. Hicks RM, Chowanec J. The importance of synergy between weak carcinogens in the induction of bladder cancer in experimental animals and humans. Cancer Res. 1977;37:2943-9.
16. Silverman DT, Hartge P, Morrison AS, et al. Epidemiology of bladder cancer. Hematol Oncol Clin North Am. 1992;6:1-30.
17. Wynder EL, Goldsmith R. The epidemiology of bladder cancer: a second look. Cancer. 1977;40:1246-68.
18. Parker CC, Huddart RA. Management of invasive bladder cancer. Br J Hosp Med. 1996;56:213-8.
19. Fitzpatrick JM, Reda M. Bladder carcinoma in patients 40 years old or less. J Urol. 1986;135:53-4.
20. Droller MJ. Bladder cancer. Curr Probl Surg. 1981;18:205-79.
21. Epstein JL, Amin MB, Reuter Vr, et al. The bladder consensus conference Committee. The World Health Organization/International Society of urological Pathology Consensus classification of Urothelial (Transitional cell). Neoplasm's of the Urinary Bladder. Am J Surg Pathol. 1998;22: 1435-1448.
22. World health Organization (1999). Histological typing of urinary bladder tumors. International histological classification of tumors, no. 10, 2nd ed, Geneva.



23. World health Organization (1973). Histological typing of urinary bladder tumors. International histological classification of tumors, no. 10. Geneva.
24. Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. Clinical and biological implications. *Cancer*. 1999;86:2102-8.
25. Urinary Bladder in: AJCC, Cancer Staging Manual, 5th ed, Lippincot- Raven Press.1997;38:242-246.
26. Younes M, Sussman J, True Ld. The usefulness of the level of the muscularis mucosa in the staging of invasive transitional carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. 1990;66:543-8.
27. Holmang S, Heldnen H, Anderson C, et al. The importance of the depth of invasion in stage T1 bladder cancer a prospective cohort study. *J Urol*. 1997;157:800-3;
28. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J. Urol*. 1998;160:645-59.
29. Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol*. 2000;163:60-2.
30. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, et al. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J. Urol*. 1983;130:1083-6.
31. Leblanc B, Duclos AJ, Benard F, et al. Long-term follow up of initial Ta grade 1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol*. 1999;162:1946-50.
32. Althausen AF, Prout GR and Daly JJ. Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J. Urol*.1976;116:575-80.
33. William MM. Urological pathology, 2nd ed, W.B. Saunders Company: 1997.
34. Lipponen PK, Eskelinen M, Jauhiainen K, et al. Clinical Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder. *Urol int* 1993;50:192-7.
35. Knap MM, Lundbeck F, Overgaard J. Prognostic factors, pattern of recurrence and survival in a Danish bladder cancer cohort treated with radical cystectomy. *Acta Oncol*. 2003;42:160-8.
36. Larsson P, Wijkstrom H, Thorstenson A, et al. A population-based study of 538 patients with newly detected urinary bladder neoplasms followed during 5 years. *Scand J Urol Nephrology*. 2003;37:195-201.
37. Cordonnier JJ. Cystectomy for carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1968;99:172-3.
38. Hara S, Miyake H, Fujisawa M, et al. Prognostic variables in patients who have undergone radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Jpn J Clin Oncol*. 2001;31:399-402.
39. Knap MM, Lundbeck F, Overgaard J. The role of pelvic lymph node dissection as a predictive and prognostic factor in bladder cancer. *Eur J Cancer*. 2003;39:604-13.
40. Gilbert HA, Logan JL, Kagan AR, et al. The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population on the basis of histological grading. *J Urol*. 1978;119:488-92.
41. Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM. Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer*. 1987;60:2766-74.
42. Busto Catanon L, Sanchez Merino JM, et al. Clinical prognostic factors in superficial cancer of the urinary bladder. *Arch Esp Urol*. 2001;54:131-8.
43. Varo Solis C, Soto Delgado M, Hens Perez A, et al. Primary nontransitional neoplasms of the bladder. *Actas Urol Esp*. 1999;23:587-95.
44. Kanat O, Evrensel T, Adim SB, et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic study of five cases. *Tumori*. 2003;89:328-30.
45. Queipo Zaragoza JA, Chicote Perez F, Borrell Palanca A, et al. Unusual bladder tumors: primary epidermoid carcinoma, adenocarcinoma, and sarcoma. Clinical behavior. Our experience. *Actas Urol Esp*. 2003;27:123-31.



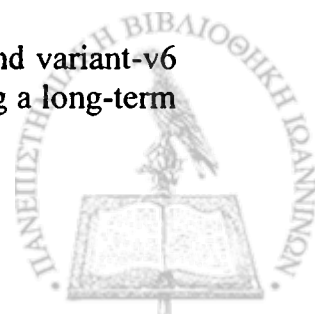
46. Pagano F, Bassi P, Ferrante GL, et al. Is stage pT4a (D1) reliable in assessing transitional cell carcinoma involvement of the prostate in patients with a concurrent bladder cancer? A necessary distinction for contiguous or noncontiguous involvement. *J Urol.* 1996;155:244-7.
47. Njinou Ngninkeu B, Lorge F, Moulin P, et al. Transitional cell carcinoma involving the prostate: a clinicopathological retrospective study of 76 cases. *J Urol.* 2003; 169:149-52.
48. Javadpour N, Mostofi FK. Primary epithelial tumors of the bladder in the first two decades of life. *J Urol.* 1969;101:706-10.
49. Ikemoto I, Shimomura T, Yamada H, et al. Retrospective analysis of uroepithelial malignancies detected in the renal pelvis and ureter over the past decade at the Jikei University Hospital. *Hinyokika Kiyo.* 2003;49:451-6.
50. Blanchard JM, Graziana JP, Bonnal JL, et al. Bladder tumor in young patients: a series of 26 cases. Comparison with a review of the literature. *Prog Urol.* 2003;13: 227-33.
51. Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, et al. Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer.* 1990;66:1630-5.
52. Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, et al. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol.* 1983;129:730-3.
53. Frazier HA, Robertson JE, Dodge RK, et al. The value of pathologic factors in predicting cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate. *Cancer.* 1993;71:3993-4001.
54. Wolf H, Hojgaard K. Prognostic factors in local surgical treatment of invasive bladder cancer, with special reference to the presence of urothelial dysplasia. *Cancer.* 1983;51:1710-5.
55. Zieger K, Olsen PR, Wolf H, et al. Long term follow-up of superficial invasive bladder carcinoma with or without concomitant epithelial atypia recurrence and progression. *Scand J Urol Nephrology.* 2002;36:52-9.
56. Heney NM, Proppe K, Prout GR Jr, et al. Invasive bladder cancer: tumor configuration, lymphatic invasion and survival. *J Urol.* 1983;130:895-7.
57. Herr HW, Badalament RA, Amato DA, et al. Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J Urol.* 1989;141:22-9.
58. Soloway MS, Murphy WM, Johnson DE, et al. Initial evaluation and response criteria for patients with superficial bladder cancer. Report of a workshop. *Br J Urol.* 1990;66:380-5.
59. Al-Abadi H, Nagel R. Deoxyribonucleic acid content and survival rates of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1994;151:37-42.
60. Blomjous EC, Schipper NW, Baak JP, et al. The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1989;91:243-8.
61. Turkolmez K, Baltaci S, Beduk Y, et al. DNA ploidy and S-phase fraction as predictive factors of response and outcome following neoadjuvant methotrexate, vinblastine, epirubicin and cisplatin (M-VEC) chemotherapy for invasive bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 2002;36:46-51.
62. Cianciulli AM, Bovani R, Leonardo F, et al. Interphase cytogenetics of bladder cancer progression: relationship between aneusomy, DNA ploidy pattern, histopathology, and clinical outcome. *Int J Clin Lab Res.* 2000;30:5-11.
63. Ozer E, Yorukoglu K, Mungan MU, et al. Prognostic significance of nuclear morphometry in superficial bladder cancer. *Anal Quant Cytology Histology.* 2001;23:251-6.
64. van Velthoven R, Petein M, Oosterlinck W, et al. Identification by quantitative chromatin pattern analysis of patients at risk for recurrence of superficial transitional bladder carcinoma. *J Urol.* 2000;164:2134-7.



65. Sarma KP. The role of lymphoid reaction in bladder cancer. *J Urol*. 1970;104:843-9.
66. Lorenzo Gomez MF, Schroeder G. The role of tumor markers in prognosing transitional bladder cancer. *Actas Urol Esp*. 2003;27:501-12.
67. Bol MG, Baak JP, van Diermen B, et al. Proliferation markers and DNA content analysis in urinary bladder TaT1 urothelial cell carcinomas: identification of subgroups with low and high stage progression risks. *J Clin Pathol* 2003;56:447-52.
68. Plastiras D, Moutzouris G, Barbatis C, et al. Can p53 nuclear over-expression, Bcl-2 accumulation and PCNA status be of prognostic significance in high-risk superficial and invasive bladder tumours? *Eur J Surg Oncol*. 1999;25:61-5.
69. Rodriguez Alonso A, Pita Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, et al. Multivariate analysis of recurrence and progression in stage T1 transitional-cell carcinoma of the bladder. Prognostic value of p53 and Ki67. *Actas Urol Esp*. 2003;27:132-41.
70. Ong F, Moonen LM, Gallee MP, et al. Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for Bcl-2 and p53. *Radiotherapy Oncol*. 2001;61:169-75.
71. Moonen L, Ong F, Gallee M, et al. Apoptosis, proliferation and p53, cyclin D1, and retinoblastoma gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;49:1305-10.
72. Pollack A, Czerniak B, Zagars GK, et al. Retinoblastoma protein expression and radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997;39:687-95.
73. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, et al. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res*. 1998;58:1090-4.
74. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J. Natl. Cancer Inst*. 1995;87:1603-12.
75. Chaudhary R, Bromley M, Clarke NW, et al. Prognostic relevance of micro-vessel density in cancer of the urinary bladder. *Anticancer Res*. 1999;19:3479-84.
76. Philp EA, Stephenson TJ and Reed MW. Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br. J. Urol*. 1996;77:352-7.
77. Ozer E, Mungan MU, Tuna B, et al. Prognostic significance of angiogenesis and immunoreactivity of cathepsin D and type IV collagen in high-grade stage T1 primary bladder cancer. *Urology*. 1999;54:50-5.
78. Hawke CK, Delahunt B. and Davidson PJ. Microvessel density as a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol*. 1998;81:585-90.
79. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst*. 1997;89:219-27.
80. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer*. 2003;39:881-90.
81. Santos L, Costa C, Pereira S, et al. Neovascularisation is a prognostic factor of early recurrence in T1/G2 urothelial bladder tumours. *Ann Oncol*. 2003;14:1419-24.
82. Le Bret T, Watson RW, Molinie V, et al. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*. 2003;98:970-7.
83. Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol*. 2003;14:85-90
84. Mizutani Y, Hongo F, Sato N, et al. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer*. 2001;92:287-93.



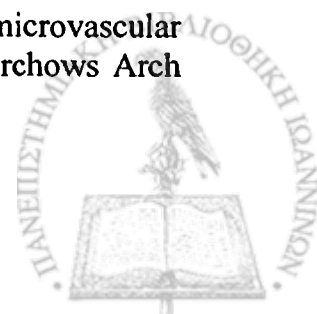
85. Gazzaniga P, Gradilone A, Vercillo R, et al. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low grade urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer.* 1996;69:100-4.
86. Lee SH, Lee JY, Park WS, et al. Transitional cell carcinoma expresses high levels of Fas ligand in vivo. *BJU Int.* 1999;83:698-702.
87. Lee SH, Shin MS, Park WS, et al. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. *Cancer Res.* 1999;59:3068-72.
88. Mizutani Y, Yoshida O. and Bonavida B. Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer. *J. Urol.* 1998;160:571-6.
89. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, et al. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *New Engl. J. Med.* 1999;341:452-3.
90. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, et al. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. *Clin Chem.* 2000;46:595-605.
91. Juhl BR, Hartzel SH, Hainau B. Lewis a antigen in transitional cell tumors of the urinary bladder. *Cancer.* 1986;58:222-8.
92. Orntoft TF, Nielsen MJ, Wolf H, et al. Blood group ABO and Lewis antigen expression during neoplastic progression of human urothelium. Immunohistochemical study of type 1 chain structures. *Cancer.* 1987;60:2641-8.
93. Fradet Y, Tardif M, Bourget L, et al. Clinical cancer progression in urinary bladder tumors evaluated by multiparameter flow cytometry with monoclonal antibodies. Laval University Urology Group. *Cancer Res.* 1990;50:432-7.
94. Fontana D, Bellina M, Scoffone C, et al. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *Eur. Urol.* 1996;29:470-6.
95. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, et al. Detection of c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 1990;81:1198-201.
96. Lipponen PK. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J. Pathol.* 1995; 175:203-10.
97. Sato K, Moriyama M, Mori S, et al. An immunohistologic evaluation of c-erb-B2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer.* 1992;70:2493-8.
98. Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, et al. Expression of c-erb-2 gene product in urinary bladder cancer. *J. Urol.* 1991;145:423-7.
99. Mellon K, Lunec J, Wright C, et al. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J. Urol.* 1996;155:321-6.
100. Underwood M, Bartlett J, Reeves J, et al. C-erb-B2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res.* 1995;55:2422-30.
101. Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994;86:1325-30.
102. Shiina H, Igawa M, Nagami H, et al. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer.* 1996;78:1762-74.
103. Binguier PP, Umbas R, Schaafsma HE, et al. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res.* 1993;53:3241-5.
104. Lipponen PK. and Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1995;121:303-8.
105. Grossman HB, Lee C, Bromberg J, et al. Expression of the alpha6 beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncol. Rep.* 2000;7:13-6.
106. Lipponen P, Aaltoma S, Kosma VM, et al. Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J. Pathol.* 1998;186:157-64.



107. Mungan U, Kirkali G, Celebi I, et al. Significance of serum laminin P1 values in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 1996;48:496-500.
108. Lipponen PK . Expression of cathepsin D in transitional cell bladder tumours. *J. Pathol*. 1996;178:59-64.
109. Dickinson AJ, Fox SB, Newcomb PV, et al. An immunohistochemical and prognostic evaluation of cathepsin D expression in 105 bladder carcinomas. *J. Urol*. 1995; 154:237-41.
110. Hasui Y, Marutsuka K, Asada Y, et al. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology*. 1996;47:34-7.
111. Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J. Urol*. 1999; 161:1359-63.
112. Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res*. 1996;56:1654-9.
113. Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*. 1990;50:2530-7.
114. Neal DE, Marsh C, Bennett MK, et al. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet*. 1985;1 :366-8.
115. Burri PH. and Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anatomical Record*. 1990;228:35-45.
116. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
117. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal Neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo Journal*. 1999;18:3964-72.
118. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105:71-7.
119. Folberg R, Hendrix MJ. and Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 2000;156:361-81.
120. Carmeliet P. and Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.
121. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1999;237:97-132.
122. Kiselev SM, Lutsenko SV, Severin SE, et al. Tumor angiogenesis inhibitors. *Biochemistry (Moscow)*. 2003;68:497-513.
123. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *North England Journal of Medicine*. 1971;285:1182-6.
124. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82:4-6.
125. Pezzella F, Pastorino U, Tagliaboue E, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am j Pathology* 1997;151:1417-23.
126. Streeter EII, Harris AL. Angiogenesis in bladder cancer--prognostic marker and target for future therapy. *Surg Oncol* 2002;11:85-100.
127. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB. et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer*. 1996;32A:2474-84.



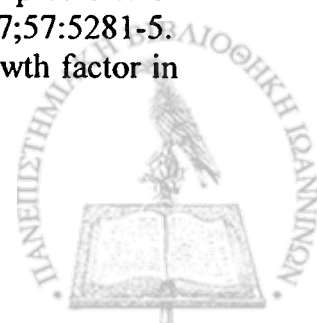
128. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, et al. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990;43:752-7.
129. Holthofer H, Virtanen I, Kariniemi AL, et al. Ulex europaeus I Lectin as marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 1982;47:60-6.
130. Schlingemann RO, Rietveld FJR, de Waal RMW et al. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* 1990;62:690-6.
131. Miettinen M, Lindenmayer AE and Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34 and BNH9 antibody to H- and Y-antigens—evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol* 1994;7:82-90.
132. Alles JW and Bosslet K. Immunohistochemical and immunochemical characterization of a new endothelial cell-specific antigen. *J Histochem Cytochem* 1986;34:209-14.
133. Augustin HG, Kozian DH and Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* 1994; 16:901-6.
134. Ruitter DJ, Schlingemann RO, Rietveld FJR, et al. Monoclonal antibody-defined human endothelial antigens as vascular markers. *J Invest Dermatol* 1989;93:25S-32S.
135. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995;1:1623-34.
136. Cotran RS, Gimbrone MA, Bevilacqua MP, et al. Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med* 1986;164:661-6.
137. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer* 1993;54:363-70.
138. Kumar P, Wang JM and Bernabeu C. CD 105 and angiogenesis. *J Pathol* 1996; 178:363-6.
139. Offersen BV, Borre M, Sorensen FB, et al. Comparison of methods of microvascular staining and quantification in prostate carcinoma: relevance to prognosis. *APMIS* 2002;110:177-85.
140. Van Netten JP, Cann SA and van der Westhuizen NG. Angiogenesis and tumour growth. *N Engl J Med* 1996;334:920-1.
141. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. Natl. Cancer Inst.* 1943; 4:47-53.
142. 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.
143. 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;177:275-83.
144. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-93.
145. Vermeulen PB, Libura M, Libura J, et al. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:165-72.
146. Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Kavantzias N, et al. Morphometric microvascular characteristics predict prognosis in superficial and invasive bladder cancer. *Virchows Arch* 2001;438:603-11.



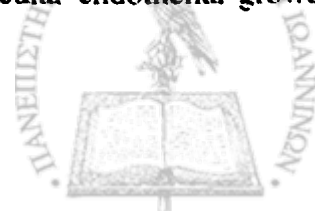
147. Jones A, Fujiyama C. Angiogenesis in urological malignancy: prognostic indicator and therapeutic target. *BJU Int* 1999;83:535-55
148. Dinney CP, Babkowski RC, Antelo M, et al. Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1998;160:1285-90.
149. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, et al. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994;74:762-6.
150. Chodak GW, Scheiner CJ, and Zetter BR. Urine from patients with transitional-cell carcinoma stimulates migration of capillary endothelial cells. *North England Journal of Medicine*. 1981;305:869-74.
151. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, et al. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Annals of Surgery*. 1980; 192:762-71.
152. Chodak GW, and Summerhayes I. Detection of angiogenesis activity in malignant bladder tissue and cells. *Journal of Urology*. 1984;132:1032-5.
153. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol*. 2000;35:227-31.
154. Crew JP. Vascular Endothelial growth Factor: An important Angiogenic Mediator in Bladder Cancer. *Eur Urol* 1999;35:2-8.
155. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *American Journal of Pathology*. 1993;143:1255-62.
156. Lutsenko SV, Kiselev SM, Severin SE. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2003;68:286-300.
157. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function*. 2001;26:25-35.
158. Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, et al. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 1992;67:596-607.
159. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, et al. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111:1853-65.
160. Kevil CG, Payne DK, Mire E, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 1998;273:15099-103.
161. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-66.
162. Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, et al. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:545-8.
163. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:9709-16.
164. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:902-6.
165. Tang H, Kerins DM, Hao Q, et al. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273:18268-72.
166. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-95.
167. Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* 1997 May 1;14(17):2025-32.



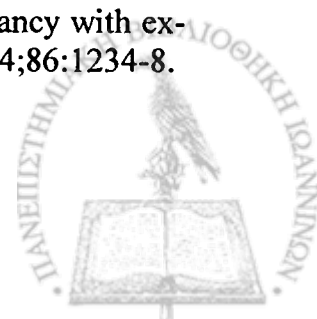
168. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and *Al* in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.
169. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336-43.
170. Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1997;420:28-32.
171. Chin L In L, Tam A, Pomerantz J, et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999;400:468-72.
172. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999;401:33-4.
173. Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 1999; 274:16349-54.
174. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, et al. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 2000;86:892-6.
175. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997;90:3322-31.
176. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
177. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597-601.
178. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 1999;247:495-504.
179. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2000;477:258-62.
180. Buchler P, Reber HA, Buchler M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2003;26:56-64.
181. Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, et al. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *British Journal of Cancer*. 2000; 82:161-6.
182. Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, et al. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proceedings of the National Academic Science USA*. 1993; 90:6175-8.
183. Sanchez de la Muela P, Rosell D, Aguera L, et al. Multivariate analysis of progression in superficial bladder cancer. *Br J Urol*. 1993;71:284-9.
184. Roberts JE, Zudaire JJ, Brian JM. Multivariate analysis of progression in superficial bladder cancer. *Br J Urol* 1993; 71: 284.
185. Crew JP, O'Brien T, Bradburn, et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Research*. 1997;57:5281-5.
186. Chow NH, Liu HS, Chan SH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in primary superficial bladder cancer. *Anticancer Res*. 1999;19:4593-7.



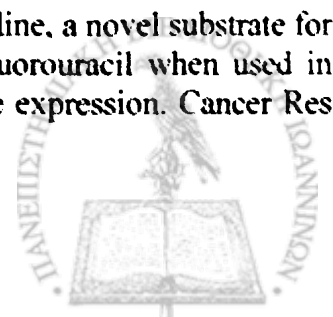
187. Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000;157:411-21.
188. Onita T, Ji PG, Xuam JM, et al. Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial per-ARNT-Sim domain protein-1/Hypoxia-inducible factor-2a. Correlates with tumor progression, vascularization and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clinical Cancer research.* 2002;8:471-80.
189. Ryan HE, Lo J. and Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo Journal.* 1998;17:3005-15.
190. 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. *Proceedings of the National Academic Science USA.* 1997;94:8104-9.
191. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, et al. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature.* 1997; 386:403-7.
192. Blancher C, Moore JW, Talks KL, et al. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Research.* 2000; 60:7106-13.
193. Acker T, Plate KH. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med.* 2002;80:562-75.
194. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4748-53.
195. O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, et al. Oxygen-regulated transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 1999;274:2060-71.
196. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002;295:858-61.
197. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th ed st. louis: mosby; 1996: 2633.
198. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399:271-5.
199. Smits A, Funa K. Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol.* 1998;13:511-20.
200. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:293-9.
201. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35:71-103.
202. Yang H, Kaelin WG Jr. Molecular pathogenesis of the von Hippel-Lindau hereditary cancer syndrome: implications for oxygen sensing. *Cell Growth Differ.* 2001; 12:447-55.
203. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275:1943-7.
204. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumour angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000;60:1541-5.
205. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000;14:34-44.
206. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth



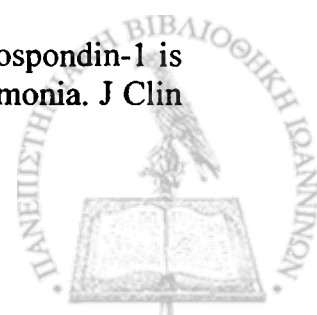
- factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 1997;57:5328-35.
207. Feldser D, Agani F, Iyer NV, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999;59:3915-8.
208. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 1998;12:149-62.
209. Jones A, Fujiyama C, Blanche C, et al. Relation of vascular endothelial growth factor production to expression and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and hypoxia-inducible factor-2 α in human bladder tumors and cell lines. *Clinical Cancer Research.* 2001;7:1263-72.
210. Ji P, Xuan JM, Onita T, et al. Correlation study showing no concordance between EPAS-1/HIF-2 α mRNA and protein expression in transitional cell cancer of the bladder. *Urology.* 2003;61:851-7.
211. De Bruin M, Smid K, Laan AC, et al. Rapid disappearance of deoxyribose-1-phosphate in platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase overexpressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:675-9
212. Friedkin M, Roberts DW. The enzymatic synthesis of nucleosides. II. Thymidine and related pyrimidine nucleosides. *J Biol Chem* 1954;207:257-66.
213. Voytek P. Purification of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* and its photoinactivation in the presence of thymine, thymidine, and some halogenated analogs. *Biol Chem* 1975;250:3660-5.
214. Blank JG, Hoffee PA. Purification and properties of thymidine phosphorylase from *Salmonella typhimurium*. *Arch Biochem Biophys* 1975;168:259-65.
215. Walter MR, Cook WJ, Cole LB, et al. Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 1990;265:14016-22.
216. Kubilus J, Lee LD, Baden HP. Purification of thymidine phosphorylase from human amniocorion. *Biochim Biophys Acta* 1978;527:221-8.
217. Krenitsky TA, Kozalka GW, Tuttle JV. Purine nucleoside synthesis, an efficient method employing nucleoside phosphorylases. *Biochemistry* 1981;20:3615-21.
218. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, et al. An angiogenic role for the neurokinin B and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57:1814-9.
219. Asai K, Nakanishi K, Isobe I, et al. Neurotrophic action of gliostatin on cortical neurons. Identity of gliostatin and platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 1992;267:20311-6.
220. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 1998;334:1-8.
221. Hotchkiss KA, Ashton AW, Klein RS, et al. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer Res* 2003;63:527-33.
222. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-9.
223. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG. Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 1999;187:285-90.
224. Reynolds K, Farzaneh F, Collins WP, et al. Association of ovarian malignancy with expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1234-8.



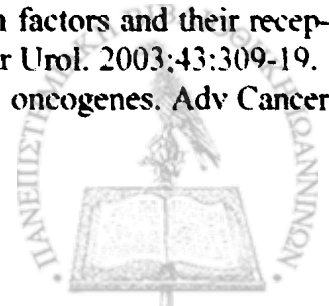
225. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1110-7.
226. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:884-8.
227. Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder carcinoma. *Cancer* 1997 Mar 15;79(6):1190-4.
228. O'Brien T., Cranston D, Fuggle S, et al. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Research*. 1995 Feb 1;55(3):510-3.
229. O'Brien TS, Fox SB, Dickinson AJ, et al. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers. *Cancer Research*. 1996;56:4799-804.
230. Takeuchi M, Otsuka T, Matsui N, et al. Aberrant production of gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1994;37:662-72.
231. Creamer D, Jaggar R, Allen M, et al. Overexpression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 1997;137:851-5.
232. Ignatescu MC, Gharehbaghi-Schnell E, Hassan A, et al. Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: In vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2340-7.
233. Pauly JL, Schuller MG, Zelcer AA, et al. Identification and comparative analysis of thymidine phosphorylase in the plasma of healthy subjects and cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1587-90.
234. Brown NS, Jones A, Fujiyama C, et al. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Research*. 2000;60:6298-302.
235. Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Research* 2000;60:2290-9.
236. Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, et al. Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:21137-41.
237. Matsukawa K, Moriyama A, Kawai Y, et al. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:71-82.
237. Matsukawa K, Moriyama A, Kawai Y, et al. Tissue distribution of human gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) and its drug-induced expression. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:71-82.
238. Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R, et al. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57:570-2.
239. Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, et al. Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 1993;32:333-8.
240. Schwartz EL, Baptiste N, Megati S, et al. 5-Ethoxy-2'-deoxyuridine, a novel substrate for thymidine phosphorylase, potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil when used in combination with interferon, an inducer of thymidine phosphorylase expression. *Cancer Res* 1995;55:3543-50.



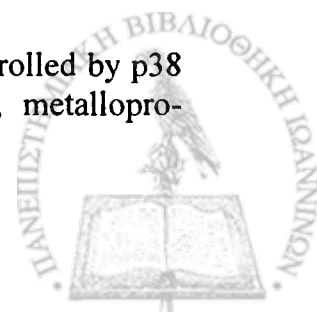
241. Brown LF, Harrist TJ, Yeo KT, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J Invest Dermatol* 1995;104:744-9.
242. Fukushima M, Suzuki N, Emura T, Yano S, Kazuno H, Tada Y, Yamada Y, Asao T. Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1227-36.
243. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, et al. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1994;368:198.
244. Griffiths L, Stratford IJ. Platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase in tumour growth and response to therapy. *Br J Cancer* 1997;76:689-93.
245. Hirano Y, Kageyama S, Ushiyama T, et al. Thymidine phosphorylase activity in transitional cell cancer: relation to histological parameters and chemosensitivity to fluorouracil-related drugs. *Anticancer Res* 2000;20:4315-8.
246. Sawase K, Nomata K, Kanetake H, et al. The expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in human bladder cancer. *Cancer Lett* 1998;130:35-41.
247. Arima J, Imazono Y, Takebayashi Y, et al. Expression of thymidine phosphorylase as an indicator of poor prognosis for patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 2000;88:1131-8.
248. Li S, Nomata K, Sawase K, et al. Prognostic significance of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in stage pT1 G3 bladder cancer. *Int J Urol* 2001;8:478-82.
249. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1995;176:183-90.
250. Di Pietro LA. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS*. 1997;79:295-314.
251. De Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, et al. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med*. 2001;7:401-7.
252. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Current option in cell Biology*. 2000;12:634-40.
253. Bequet-Romeo M, Lopez-Ocejo O. Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positive for HPV-16 oncoproteins. *Biochim Biophys Res Commun*. 2000;277:55-61.
254. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, et al. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J*. 2001;20:2631-40.
255. Streit M, Riccardi L, Velasco P, et al. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:14888-93.
256. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, et al. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*. 1992;80:1105-15.
257. Adams JC and Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn*. 2000; 218:280-99.
258. Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density and a bleeding disorder. *J Cell Biol*. 1998; 140:419-30.
259. Krutzsch HC, Choe BJ, Sipes JM, et al. Identification of an alpha(3)beta(1) integrin recognition sequence in thrombospondin-1. *J Biol Chem*. 1999;274:24080-6.
260. Lawler J, Sunday M, Thibert V, et al. H. Rayburn and Hynes RO. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest*. 1998;101:982-92.



261. Kyriakides TR, Leach KJ, Hoffman AS, et al. Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:4449-54.
262. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, et al. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* 1993;122:497-511.
263. Taraboletti G. Thrombospondin-1: an inhibitor of angiogenesis. *Haemostasis.* 2001;31:1:23-4.
264. Bleuel K, Popp S, Fusenig NE, et al. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:2065-70.
265. Streit M., Velasco P, Brown LF, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999;155:441-52.
266. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, et al. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential and angiogenesis. *Cancer Res.* 1994;54:6504-11.
267. Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, et al. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:326-32.
268. Pazouki S, Pendleton N, Heerkens E, et al. Biphasic effect of thrombospondin-1 (TSP-1) in the regulation of angiogenesis in human breast carcinoma. *Biochem Soc Trans* 1996;24:368.
269. Yehualaesht T, O'Connor R, Green-Johnson J, et al. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol* 1999;155:841-51.
270. Abdelouahed M, Ludlow A, Brunner G, et al. Activation of platelet transforming growth factor-beta 1 in the absence of thrombospondin-1. *J Biol Chem.* 2000;275:17933-6.
271. Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S and Hook M. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell.* 1992;3:181-8.
272. Qian X, Wang TN, Rothman VL, et al. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1997;235:403-12.
273. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994;265:1582-4.
274. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* 2000; 6:41-8.
275. Motegi K, Harada K, Pazouki S, et al. Evidence of a bi-phasic effect of thrombospondin-1 on angiogenesis. *Histochem J.* 2002;34:411-21.
276. Goddard JC, Sutton CD, Jones JL, et al. Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;42: 464-8.
277. Tuszynski GP, Smith M, Rothman VL, et al. Thrombospondin levels in patients with malignancy. *Thromb Haemost.* 1992;67:607-11.
278. Chodak GW, Shing Y, Borge M, et al. Presence of heparin binding growth factor in mouse bladder tumors and urine from mice with bladder cancer. *Cancer Research.* 1986;46:5507-10.
279. Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, et al. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications. *Eur Urol.* 2003;43:309-19.
280. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992;59:115-65.



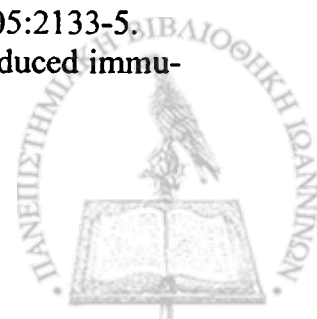
281. Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology*. 2000;55:800-6.
282. Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, et al. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 1999;98:641-50.
283. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:201-7.
284. Pardo OE, Arcaro A, Salerno G, et al. Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:12040-6.
285. Sato Y, Rifkin DB. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1199-205.
286. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977;14:53-65.
287. Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, et al. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry*. 1989;28:1737-43.
288. Allen LE. and Maher PA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in an invasive bladder carcinoma cell line. *Journal of Cellular Physiology*. 1993;155:368-75.
289. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, et al. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *Journal of National Cancer Institute*. 1994;86:356-61.
290. Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM, et al. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Research*. 1988;48: 2083-2088.
291. O'Brien TS, Smith K, Cranston D, et al. Urinary basic fibroblast growth factor in patients with bladder cancer and benign prostatic hypertrophy. *British Journal of Urology*. 1995;76:311-4.
292. Chopin DK, Caruelle JP, Colombel M, et al. Increased immunodetection of acidic fibroblast growth factor in bladder cancer, detectable in urine. *Journal of Urology*. 1993;150:1126-30.
293. Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ, et al. Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry* 1996;35:13056-63.
294. Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 1999;107: 137-43.
295. Rifkin DB, Mazziari R, Munger JS, et al. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 1999;107:80-5.
296. Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, et al. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene* 1997;14:1995-8.
297. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, et al. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 522-31.
298. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1996;169:522-31.
299. Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, et al. Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol* 1997;158:3165-73.



300. Henriet P, Blavier L, Declerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 1999;107:111-9.
301. Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:269-85.
302. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 2001;276:8403-8.
303. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Research*. 2000;20:2009-13.
304. Bianco FJ, Gervasi DC, Tiguert R, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clinical Cancer Research*. 1998;4:3011-6.
305. Nutt JE, Mellon JK, Qureshi K, et al. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours. *British Journal of Cancer*. 1998;78:215-20.
306. Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis*. 1999;3:15-32.
307. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 1991;88:1067-72.
308. Saksela O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1985;823:35-65.
309. Parfyonova YV, Plekhanova OS, Tkachuk VA. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67:119-34.
310. Manchanda N, Schwartz BS. Interaction of single-chain urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem*. 1995;270:20032-5.
311. Reinartz J, Schaefer B, Bechtel MJ, et al. Plasminogen activator inhibitor type-2 (PAI-2) in human keratinocytes regulates pericellular urokinase-type plasminogen activator. *Exp Cell Res*. 1996;223:91-101.
312. Graham CH, Fitzpatrick TE, McCrae KR. Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. *Blood*. 1998;91:3300-7.
313. Ishikawa H, Satoh H, Kamma H, et al. The effect of TNP-470 on cell proliferation and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in human lung cancer cell lines. *J Exp Ther Oncol*. 1996;1:390-6.
314. Merchan JR, Chan B, Kale S, et al. In vitro and in vivo induction of antiangiogenic activity by plasminogen activators and captopril. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:388-99.
315. Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, et al. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J*. 1997;16:2610-20.
316. O'Mahony CA, Albo D, Tuszynski GP, et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibits generation of angiostatin by human pancreatic cancer cells. *Surgery*. 1998;124:388-93.
317. Tacchini L, Matteucci E, De Ponti C, et al. Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1. *Exp Cell Res*. 2003;290:391-401.
318. Dubois-Stringfellow N, Jonczyk A, Bautch VL. Perturbations in the fibrinolytic pathway abolish cyst formation but not capillary-like organization of cultured murine endothelial cells. *Blood*. 1994;83:3206-17.
319. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol*. 1998;177:439-52.



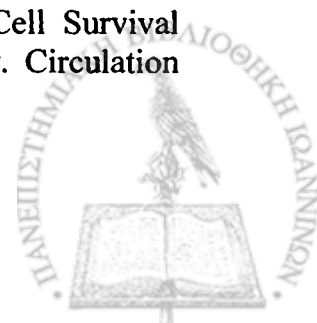
320. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4167-71.
321. Bajou K, Noel A, Gerard RD, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*. 1998;4:923-8.
322. Foekens JA, Look MP, Peters HA, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:751-6.
323. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:289-300.
324. Joseph A, Weiss GH, Jin L, et al. Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*. 1995;87:372-7.
325. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12718-23.
326. Hodivala-Dilke KM, Reynolds AR, Reynolds LE. Integrins in angiogenesis: multitalented molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res*. 2003;314:131-44.
327. Albelda SM, Daise M, Levine EM, et al. Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1989;83:1992-2002.
328. Enenstein J, Kramer RH. Confocal microscopic analysis of integrin expression on the microvasculature and its sprouts in the neonatal foreskin. *J Invest Dermatol*. 1994;103:381-6.
329. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, et al. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem*. 2001;276:26516-25.
330. Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin alpha v beta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha 5 beta 1 and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2000;275:33920-8.
331. Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1024-9.
332. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, et al. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13612-7.
333. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, et al. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2202-7.
334. Kanda S, Tomasini-Johansson B, Klint P, et al. Signaling via fibroblast growth factor receptor-1 is dependent on extracellular matrix in capillary endothelial cell differentiation. *Exp Cell Res*. 1999;248:203-13.
335. Drake CJ, Cheresh DA, Little CD. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci*. 1995;108:2655-61.
336. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 1995;270:1500-2.
337. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.
338. Cooke JP, Losordo DW. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*. 2002;105:2133-5.
339. Lejeune P, Lagadec P, Onier N, et al. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J Immunol*. 1994;152:5077-83.



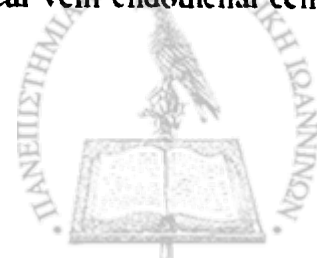
340. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, et al. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998;274:1054-8.
341. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, et al. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1255-61.
342. Wu HM, Yuan Y, McCarthy M, et al. Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1996;271:1087-93.
343. Xu W The role of nitric oxide in cancer., Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res*. 2002;12:311-20.
344. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13:2905-27.
345. Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, et al. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation*. 2002;105:2185-91.
346. Murohara T, Asahara T, Takahashi T. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration: endogenous nitric oxide maintains integrin $\alpha v\beta 3$ expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1156-61.
347. Ziche M, Parenti A, Ledda F, et al. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res*. 1997;80:845-52.
348. Hellmuth M, Paulukat J, Ninic R, et al. Nitric oxide differentially regulates pro- and anti-angiogenic markers in DLD-1 colon carcinoma cells. *FEBS Lett*. 2004;563:98-102.
349. Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:435-44.
350. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, et al. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol*. 2001;21:26-38.
351. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, et al. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*. 1995;16:143-63.
352. Liu W, Liu Y, Lowe Jr WL Jr. The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology*. 2001;142:1710-9.
353. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, et al. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J*. 1999;46:59-62.
354. Kondo T, Vicent D, Suzuma K, et al. Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest*. 2003;111:1835-42.
355. Sakai K, Busby WH Jr, Clarke JB, et al. Tissue transglutaminase facilitates the polymerization of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and leads to loss of IGFBP-1's ability to inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated protein synthesis. *J Biol Chem*. 2001;276:8740-5.
356. Anwar A, Zahid AA, Phillips L, et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 expression is decreased by angiotensin II and thrombin in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:370-6.
357. Rao GN, Delafontaine P, Runge MS. Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995;270:27871-5.
358. Anwar A, Zahid AA, Scheidegger KJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation* 2002;105:1220-5.



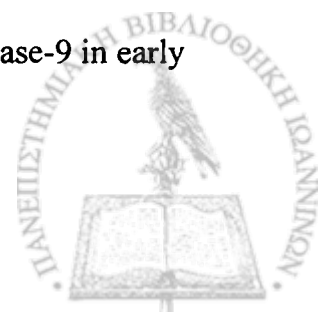
359. Scheidegger KJ, Cenni B, Picard D, et al. Estradiol decreases IGF-1 and IGF-1 receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. Mechanisms for its atheroprotective effects. *J Biol Chem.* 2000;275:38921-8.
360. Delafontaine P, Ku L. Reactive oxygen species stimulate insulin-like growth factor I synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1997;33:216-22.
361. Gustafsson T, Andersson P, Chen Y, et al. Interaction of angiotensin II and the insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1999;277:499-507.
362. Giannella-Neto D, Kamyar A, Sharifi B, et al. Platelet-derived growth factor isoforms decrease insulin-like growth factor I gene expression in rat vascular smooth muscle cells and selectively stimulate the biosynthesis of insulin-like growth factor binding protein 4. *Circ Res.* 1992;71:646-56.
363. Bornfeldt KE, Arnqvist HJ, Norstedt G. Regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth factors in cultured vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol.* 1990;125:381-6.
364. Han HJ, Park JY, Lee YJ, et al. Epidermal growth factor inhibits 14C-methyl-d-glucopyranoside uptake in renal proximal tubule cells: Involvement of PLC/PKC, p44/42 MAPK, and cPLA2. *Journal of Cellular Physiology.* 2004;2:206-216.
365. Kausch I, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;41:15-29.
366. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist.* 2002;7:2-8.
367. Lee CM, Lee RJ, Hammond E, et al. Expression of HER2neu (c-erbB2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in carcinoma of the cervix: correlation with clinical characteristics and prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57:192-3.
368. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;19:183-232.
369. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist.* 2002;7:31-9.
370. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997;410:83-6.
371. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995;376:599-602.
372. Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6845-57.
373. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1850-5.
374. Lipponen P. and Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *British Journal of Cancer.* 1994;69:1120-5.
375. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11205-10.
376. Kim I, Kim HG, So JN, et al. Angiopoietin-1 Regulates Endothelial Cell Survival Through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. *Circulation Research* 2000;86:24-9.



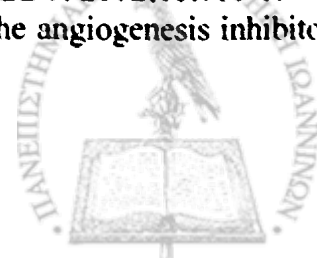
377. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 2000;275:9102-5.
378. Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, et al. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res* 2002;64:135-47.
379. Simon CS, Peter WM. Angiopoietins: Microvascular modulators with potential roles in glomerular pathophysiology. *J NEPHROLOGY* 2003;16:168-78.
380. Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, et al. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:1217-21.
381. Hu GF, Riordan JF. Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197:682-7.
382. Hu G, Riordan JF, Vallee BL. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:12096-100.
383. Liu S, Yu D, Xu ZP, et al. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:305-10.
384. Shirahama T, Arima J, Akiba S, et al. Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. 2001;92:188-93.
385. Kubba AK. Non steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: is there a way forward? *Eur J Cancer*. 1999;35:892-901.
386. Gridley G, McLaughlin JK, Ekblom A, et al. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:307-11.
387. Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299:886-90.
388. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, et al. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:2694-704.
389. Sengupta S, Sellers LA, Cindrova T, et al. Cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. *Cancer Res*. 2003;63:8351-9.
390. Sumi Y, Muramatsu H, Takei Y, et al. Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J Cell Sci*. 2002; 115:2659-67.
391. Qi M, Ikematsu S, Maeda N, et al. Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta, Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2001;276:15868-75.
392. Sakai T, de la Pena JM, Mosher DF. Synergism among lysophosphatidic acid, beta1A integrins, and epidermal growth factor or platelet-derived growth factor in mediation of cell migration. *J Biol Chem*. 1999;274:15480-6.
393. Nathan CA, Franklin S, Abreo FW, et al. Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis. *Laryngoscope*. 1999;109:1253-8.
394. Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, et al. Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 2002;62:58-64.
395. Goumans M.-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-B type I receptors. *EMBO J* 2002;21:1743-53.
396. Ota T, Fujii M, Sugizaki T, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-B in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 2002;193:299-318.



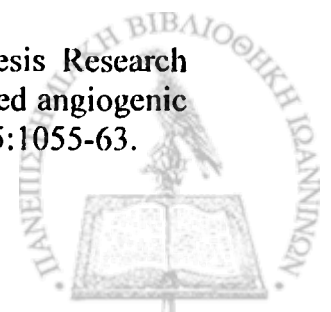
397. Lawrence DA, Pircher R, Jullien P. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*.1985;133:1026-34.
398. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast - conditioned medium. *J Cell Biol* 1988;106:1659-65.
399. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, et al. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 1990;110:1361-7.
400. Sato Y, Tsuboi R, Lyons RM, et al. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Bio* 1990;111:757-63.
401. Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:11500-5.
402. Sherr CJ. Cancer cell cycle. *Science* 1996;14: 309-18.
403. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:301-7.
404. Volpert OV, Fong T, Koch AE, et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1039-46.
405. Torisu H, Ono M, Kiryu H, et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma. *Int J Cancer* 2000;85:182-8.
406. Oshikawa K, Rakhmilevich AL, Shi F, et al. Interleukin 12 gene transfer into skin distant from the tumor site elicits antimetastatic effects equivalent to local gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001;12:149-60.
407. Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin-12. *Cancer Res* 2000;60:1111-6.
408. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:697-703.
409. Xu L, Pathak PS, Fukumura D. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:701-7.
410. Ma Z, Qin H, Benveniste EN. Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *J Immunol*. 2001;167:5150-9.
411. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994; 264:1415-21.
412. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, et al. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis - related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999;5:2726-34.
413. Izawa JI, Sweeney P, Perrotte P, et al. Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human bladder cancer growing in athymic mice by interferon-beta gene therapy results partially from various antiangiogenic effects including endothelial cell apoptosis. *Clin Cancer Res* 2002;8:1258-70.
414. Ozawa S, Shinohara H, Kanayama HO, et al. Suppression of angiogenesis and therapy of human colon cancer liver metastasis by systemic administration of interferon-alpha. *Neoplasia* 2001;3:154-64.
415. Bauvois B, Dumont J, Mathiot C, et al. Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: suppression by interferons. *Leukemia* 2002;16:791-8.



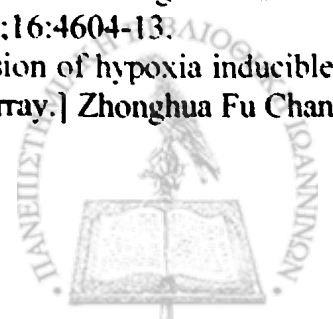
416. Marler JJ, Rubin JB, Trede NS, et al. Successful antiangiogenic therapy of giant cell angioblastoma with interferon alfa 2b: report of 2 cases. *Pediatrics* 2002;109:E37.
417. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, et al. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 2000;19:2619-27.
418. Sasamura H, Takahashi A, Miyao N, et al. Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86:768-73.
419. Lambert E, Dasse E, Haye B, et al. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49:187-98.
420. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, et al. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*. 1992;298:29-32.
421. Fata JE, Leco KJ, Moorehead RA, et al. Timp-1 is important for epithelial proliferation and branching morphogenesis during mouse' mammary development. *Dev Biol*. 1999;211:238-54.
422. Bello L, Lucini V, Carrabba G, et al. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res*. 2001;61:8730-6.
423. Kadri Z, Petitfrere E, Boudot C, et al. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ*. 2000;11:573-80.
424. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, et al. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol*. 1994;160:194-202.
425. Chen YH, Wu HL, Chen CK, et al. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:804-10.
426. 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;79:315-28.
427. Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, et al. Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6656-61.
428. Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, et al. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett*. 2003;536:19-24.
429. Wajih N, Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood*. 2003;101:1857-63.
430. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:39562-8.
431. 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.
432. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell*. 2004;13:649-63.
433. Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Fik-1. *J Biol Chem* 2002;277:27872-9.
434. Urbich C, Reissner A, Chavakis E, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J*. 2002;16:706-8.
435. Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 angstrom resolution. *EMBO J* 1998;17:1656-64.



436. Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9, and -13. *J Biol Chem*. 2003;278:22404-11.
437. Dasgupta P. Somatostatin analogues: Multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2004;102:61-85.
438. Patel PC, Barrie R, Hill N, et al. Postreceptor signal transduction mechanisms involved in octreotide-induced inhibition of angiogenesis. *Surgery*. 1994;116:1148-52.
439. Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP, et al. Activated G protein-coupled receptor induces tyrosine phosphorylation of STAT3 and agonist-selective serine phosphorylation via sustained stimulation of mitogen-activated protein kinase. Resultant effects on cell proliferation. *J Biol Chem*. 1999;274:16423-30.
440. Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, et al. Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9343-8.
441. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999;20:157-98.
442. Reubi JC. A somatostatin analogue inhibits chondrosarcoma and insulinoma tumour growth. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985;109:108-14.
443. Florio T, Morini M, Villa V, et al. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*. 2003;144:1574-84.
444. Wang C, Tang C. [Inhibition of human gastric cancer metastasis by ocreotide in vitro and in vivo]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002;82:19-22.
445. Li HH, Wang XC, Lu JR, et al. [Effects of short-term treatment of somatostatin on angiogenesis of gastric carcinoma]. *Ai Zheng*. 2003;22:990-3.
446. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, et al. Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells. *Int J Cancer*. 2001;92:545-50.
447. Pollak MN, Schally AV. Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998;217:143-52.
- Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*, 8th ed. St. Louis: Mosby; 1996: 2633.
448. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res*. 2001;61:1830-2.
449. Lee IJ, Park KR, Lee KK, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 54:768-79
450. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, et al. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. *Hum Pathol*. 1993;24:463-8.
451. Theodoropoulos VE, Lazaris ACh, Sofras F, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *Eur Urol*. 2004;46:200-8.
452. Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, et al. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int J Cancer*. 2002;101:1-6.
453. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1 α overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU Int*. 2005;95:425-31.
454. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, et al. Tumor and Angiogenesis Research Group. Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer*. 2002;95:1055-63.



455. Nicosia RF, Tuszynski GP. Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 1994;124:183-93.
456. BenEzra D, Griffin BW, Maftzir G, et al. Thrombospondin and in vivo angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor or lipopolysaccharide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:3601-8.
457. van Triest B, Pinedo HM, Blaauwgeers JL, et al. Prognostic role of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor, and proliferation markers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1063-72.
458. Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumour cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol.* 1995;6:59-64.
459. Messing EM, Murphy-Brooks N. Recovery of epidermal growth factor in voided urine of patients with bladder cancer. *Urology.* 1994;44:502-6.
460. Wang S, Xia T, Zhang Z, et al. Expression of VEGF and tumor angiogenesis in bladder cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2000;38:34-6.
461. Tiguert R, Lessard A, So A, Fradet Y. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2002;20:190-5.
462. Asahi H, Koshida K, Hori O, et al. Immunohistochemical detection of the 150-kDa oxygen-regulated protein in bladder cancer. *BJU Int.* 2002;90:462-6.
463. Orlow I, Lianes P, Lacombe L, et al. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res.* 1994;54:2848-51.
464. Knowles MA, Elder PA, Williamson M, et al. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res.* 1994;54:531-8.
465. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;37:97-114.
466. Gasparini G, Toi M, Miceli R, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am.* 1999;5:101-11.
467. Abbas MM, Evans JJ, Sykes PH, et al. Modulation of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in normal human endometrial stromal cells. *Fertil Steril.* 2004;82:1048-53.
468. Fujiwaki R, Hata K, Iida K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in progression of cervical cancer: correlation with thymidine phosphorylase expression, angiogenesis, tumor cell proliferation, and apoptosis. *Anticancer Res.* 2000; 20:1317-22.
469. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, et al. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncol Res.* 2000;12:33-41
470. Toi M, Gion M, Biganzoli E, et al. Co-determination of the angiogenic factors thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in node-negative breast cancer: prognostic implications. *Angiogenesis.* 1997;1:71-83.
471. Li N, Kanda K, Fukumori T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder cancer. *Urol Oncol.* 2000;6:10-15.
472. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-13.
473. Luo J, Peng ZL, Yang KX, et al. [Relation between the expression of hypoxia inducible factor-1alpha and angiogenesis in ovarian cancer using tissue microarray.] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2005;40:38-41.



474. Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1705-8.
475. Jiang CQ, Fan LF, Liu ZS, et al. Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117:1541-6.
476. Ikeda R, Furukawa T, Kitazono M, et al. Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by 2-deoxy-D-ribose. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291:806-12.
477. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer*. 2001;85:881-90.
478. Xia G, Kageyama Y, Hayashi T, et al. Positive expression of HIF-2alpha/EPAS1 in invasive bladder cancer. *Urology*. 2002;59:774-8.
479. Toi M, Hoshina S, Taniguchi T, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1995;64:79-82.
480. Tsukagoshi S, Saga Y, Suzuki N, et al. Thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis regulated by thymidine phosphorylase inhibitor in human ovarian cancer cells in vivo. *Int J Oncol*. 2003;22:961-7.
481. Imazano Y, Takebayashi Y, Nishiyama K, et al. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *Clin Oncol*. 1997;15:2570-8.
482. Fujiwaki R, Hata K, Iida K, Maede Y, Koike M, Miyazaki K. Thymidine phosphorylase expression in progression of cervical cancer: correlation with microvessel count, proliferating cell nuclear antigen, and apoptosis. *J Clin Pathol*. 1999;52:598-603.
483. Grossfeld GD, Shi SR, Ginsberg DA, et al. Immunohistochemical detection of thrombospondin-1 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem*. 1996;44:761-6.
484. Reiher FK, Ivanovich M, Huang H, Smith ND, Bouck NP, Campbell SC. The role of hypoxia and p53 in the regulation of angiogenesis in bladder cancer. *J Urol*. 2001;165:2075-81.
485. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol*. 1999;155:1967-76.
486. Suzuma K, Takagi H, Otani A, et al. Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol*. 1999;154:343-54.
487. Gasparini G, Toi M, Biganzoli E, et al. Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin D, hormone receptors and prognosis. *Oncology*. 2001;60:72-80.
488. Lin TN, Kim GM, Chen JJ, et al. Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 2003;34:177-86.
489. Aishima S, Taguchi K, Sugimachi K, et al. The role of thymidine phosphorylase and thrombospondin-1 in angiogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2002;10:47-56.
490. Brat DJ, Kaur B, Van Meir EG. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors. *Front Biosci*. 2003;8:100-16.

