



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ “ΛΑΪΚΟ”**

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΘΕΜΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: «ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ**  
**ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ**  
**ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ»**

**ΚΟΥΦΟΣ Χ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

**ΙΑΤΡΟΣ**

Ειδικός Πνευμονολόγος – Φυματιολόγος

**ΑΘΗΝΑ 2015**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Νικόλαος Τσαβαρής**, Καθηγητής

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ

Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Αθανάσιος Γ. Τζιούφας**, Καθηγητής

Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Ευστράτιος Σ. Πατσούρης**, Καθηγητής

Τμήμα Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ημερομηνία αίτησης για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 25 Φεβρουαρίου 2004

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 8 Μαρτίου 2004

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 28 Μαρτίου 2004

## Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

”Ομνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὀμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

”Ορκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## ΝΕΟΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΠΟΛΟΣΗ

“Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την

τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.”

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**ΚΟΥΦΟΣ Χ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ**  
**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ – ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΟΣ**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	7
2. ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ .....	7
3. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ .....	7
4. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ .....	7
Εγκύκλιες σπουδές.....	7
Προπτυχιακή εκπαίδευση .....	8
Μεταπτυχιακή εκπαίδευση .....	8
Μετεκπαίδευση στο εξωτερικό.....	8
Ξένες Γλώσσες.....	9
5. ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ .....	9
6. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ .....	10
7. ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ .....	11
8. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ.....	11
9. ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ .....	12
10. ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ .....	12
11. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ .....	13
12. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ.....	16

## ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### 1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Νικόλαος Χ. Κουφός

Ημερομηνία γέννησης: 17/08/1978

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Διεύθυνση οικίας: Αιόλου 24, Βάρκιζα, Αθήνα

Τηλέφωνο επικοινωνίας: +302109656469

Κινητό τηλέφωνο: +306945596748

email: [koufos\\_nikos@hotmail.com](mailto:koufos_nikos@hotmail.com), nkoufos1@gmail.com

### 2. ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ

09/05/2005 - 09/05/2006: Ελληνική Αεροπορία. Για χρονική διάρκεια 10 μηνών υπηρέτησα ως ιατρός στο τμήμα ΓΕΑ του Εθνικού Υπουργείου Αμύνης, Αθήνα.

### 3. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

14/11/2003 – 28/02/2005: Ιατρική υπηρεσία υπαίθρου – Αγροτικός ιατρός. Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο “Γ. Χατζηκώστας”, Μεσολόγγι, Αιτωλοακαρνανία. Κατόπιν, ιατρός στο περιφερειακό ιατρείο Γαλατά και Περιθωρίου.

### 4. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Εγκύκλιες σπουδές:

- 1984-1996, Γυμνάσιο/Λύκειο, Αμερικάνικο Κολλέγιο Αθηνών, Ψυχικό.

### **Προπτυχιακή εκπαίδευση:**

- 1996-2002, Πτυχίο Ιατρικής, University of medicine and Pharmacology “GR.T.POPA”, Iasi, Romania. Grade: “Very Good”.
- 2003, Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος: Νομαρχία Αθηνών.

### **Μεταπτυχιακή εκπαίδευση:**

- Τίτλος Ειδίκευσης: 2012, Πνευμονολογία – Φυματιολογία. Α’ Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική κλινική, ΓΝΝΘΑ «Σωτηρία». Αρχικά υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή Χ. Ρούσσου, κατόπιν του Αναπληρωτή Καθηγητή Μ. Αλχανάτη και τέλος, ολοκλήρωση της ειδικότητας υπό την καθοδήγηση και εκπαίδευση του Καθηγητή Ν. Κουλούρη.
- Διδακτορική διατριβή – Θέμα: “Αγγειογενετικοί και ανοσολογικοί παράμετροι στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, πρό και μετά χημειοθεραπείας”, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας. Υπεύθυνοι τριμελούς επιτροπής: Καθηγητής Χ. Τζιούφας, Καθηγητής Ε. Πατσούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ν. Τσαβαρής.
- Μεταπτυχιακά προγράμματα: 2011, Ολοκλήρωση του προγράμματος Advanced Life Support (ALS) Course and Board examination, European Resuscitation Council.
- Μετεκπαίδευση στο εξωτερικό: 01/11/2011-30/06/2012, Εκπαίδευση στην Επεμβατική Πνευμονολογία και έρευνα στην Ενδοσκοπική και στη Διαθωρακική Υπερηχογραφία. «Sabbatical in Interventional Pulmonary research with EBUS and Thoracic Ultrasound training». Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, Massachusetts.
- United States Medical License – Educational Committee for Foreign Medical Graduates

United States Medical Licensing Examination® – STEP 1, Basic Science: Score 212



United States Medical Licensing Examination® – STEP 2, Clinical Knowledge:  
Score 231

- 01/09/2013–σήμερα: Πανεπιστημιακός Υπότροφος, Α' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική Αθηνών, Τμήμα Επεμβατικής Πνευμονολογίας ΓΝΝΘ «Σωτηρία». Διευθυντής Κλινικής: Καθηγητής Ν. Κουλούρης. Διευθυντής Μονάδος Επεμβατικής Πνευμονολογίας: Επικ. Καθηγητής Γ. Στρατάκος.

**Ξένες γλώσσες:** Αγγλικά, Ιταλικά, Γερμανικά, Ρουμάνικα.

## **5. ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

**1. 09-12/02/2013**, Εκπαιδευτής στο σεμινάριο «Ημέρες επεμβατικής Πνευμονολογίας και θωρακικής ενδοσκόπησης», ΓΝΝΘΑ «Σωτηρία».

**2. 01-03/06/2014**, Εκπαιδευτής στο πρόγραμμα εκπαίδευσης «Εισαγωγή στην Εύκαμπτη Βρογχοσκόπηση», World Association of Bronchoscopy and Interventional Pulmonology, ΓΝΝΘΑ «Σωτηρία».

### **Ομιλίες:**

- 1) CT Θώρακα/ μεσοθωρακίου, Σταδιοποίηση Ca πνεύμονα
- 2) Στένωση Τραχείας μετά διασωλήνωση και Τραχειομαλακία

### **Πρακτικά μαθήματα (Hands on courses):**

- 1) EBUS TBNA step by step (Ι.Λαμπαδίτης, Ν.Κουφός)
- 2) EBUS TBNA step by step (Μιχαηλίδου-Κουφός)

**3. 25-27/09/14**, Εκπαιδευτής στο ERS School on “Interventional Bronchoscopy”, Athens, Greece.

**4. 8-9/10/2014**, Εκπαιδευτής στο διεθνές σεμινάριο “Introduction of Bronchoscopy”, World Association of Bronchoscopy and Interventional Pulmonology, Bronchoscopy International, Moscow, Russia.

**5. 28-30/05/2015**, Εκπαιδευτής στο διεθνές σεμινάριο “Introduction of Bronchoscopy”, World Association of Bronchoscopy and Interventional Pulmonology, Bronchoscopy International, Cluj, Romania.

## 6. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Συμμετοχή σε κλινικά πρωτόκολλα/προγράμματα:

- 2009: Συμμετοχή σε πολυκεντρική μελέτη ασθενών με νόσο H1N1 (FLU). ΓΝΝΘΑ «Σωτηρία» (Υπεύθυνος μελέτης: Καθηγητής Ν. Κουλούρης)
- 2012: Μελέτη καρκινικών δεικτών EGFR, KRAS, EML4-ALK (tumor markers) σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα που υπεβλήθησαν σε ενδοβρογχική υπερηχοτομογραφία – κυτταρολογική βιοψία δια βελόνης (Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration – EBUS TBNA). Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, Massachusetts (Υπεύθυνος μελέτης: Carla Lamb, MD, Director of Interventional Pulmonary Department, Lahey Clinic).
- 2012: Μελέτη ασθενών που υπεβλήθησαν σε ενδοβρογχική υπερηχοτομογραφία – κυτταρολογική βιοψία δια βελόνης (Endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration – EBUS TBNA). Ανάλυση τεχνικών χαρακτηριστικών επεμβάσεων σε σχέση με την επιτυχή διαγνωστική προσπέλαση. Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, Massachusetts (Υπεύθυνος μελέτης: Carla Lamb, MD, Director of Interventional Pulmonary Department, Lahey Clinic).
- Τρέχουσα πειραματική μελέτη που αφορά τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον ορό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, πρό και μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας. ΓΝΑ «Λαϊκό», Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών. (Υπεύθυνος μελέτης: Αναπληρωτής Καθηγητής Ν. Τσαβαρής)
- Τρέχουσα πειραματική μελέτη που αφορά τους υποδοχείς αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον ιστό ανταποκρινόμενων και μή ανταποκρινόμενων ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. ΓΝΑ «Λαϊκό», Τμήμα Παθολογικής Φυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών. (Υπεύθυνος μελέτης: Αναπληρωτής Καθηγητής Ν. Τσαβαρής)

## **7. ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

18-21/10/2012, 3ο Βραβείο για e-poster presentation στο 21ο Ελληνικό Πνευμονολογικό Συνέδριο: “Incremental midazolam versus midazolam/fentanyl sedation during flexible bronchoscopy. Safety and tolerance in relation to the complexity of intervention.” Stratakos G, Kokkonouzis I, Moraitaki P, Emmanouil P, Koufos N, Stoubi E, Tsiboura D, Zikopoulou F, Sampsonas F, Alchanatis M, Koulouris N.

5-8/11/2014, Έπαινος για την εργασία που παρουσιάστηκε στο 23ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, με τίτλο: “Αλγόριθμος συνδυασμένης εφαρμογής συμβατικής και EBUS-TBNA στη διερεύνηση λεμφαδενικών διογκώσεων μεσοθωρακίου/πυλών”.

01/09/2013-01/09/2015. Πανεπιστημιακός Υπότροφος μέσω Ειδικών Λογαριασμού Κονδυλίων Έρευνας, με τίτλο «Επεμβατική Βρογχοσκόπηση, Ενδοσκοπικοί Υπέρηχοι», Α' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική, Τμήμα Επεμβατικής Πνευμονολογίας, ΓΝΘΑ «Σωτηρία»

23-25/04/2015: Προεδρεύων (chairman) στο «3<sup>rd</sup> European Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology “, Barcelona, Spain – Στην ενότητα «Laryngotracheal problems».

## **8. ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ**

I. Ελληνικές:

- Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών
- Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία

II. Διεθνείς:

- European Respiratory Society

- American Association for Bronchology and Interventional Pulmonology
- World Association of Bronchology and Interventional Pulmonology
- General Medical Council (U.K.)
- Educational Committee for Foreign Medical Graduates, USA

## **9. ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

Συμμετοχή στη μετάφραση του βιβλίου “Κλινική Φυματίωση”, Peter D. Davies, Peter Barnes, Stephen B. Gordon, 4<sup>th</sup> edition.

## **10. ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ (Hands-on-courses)**

### **I. Διεθνή (Αριθμός σεμιναρίων = 2)**

1. 08/06/2010, 4th Teaching Seminar for Pulmonary Diseases, ACCP/HTS, Αθήνα
2. 02-05/02/2011, Σεμινάριο Επεμβατικής Πνευμονολογίας, Α' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική κλινική, ΓΝΝΘΑ «Σωτηρία».

### **II. Παγκόσμια (Αριθμός σεμιναρίων = 7)**

1. 19/11/2011, State of the Art, Endobronchial Ultrasound TBNA, Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, University, Massachusetts.
2. 24/02/2012, Introduction to Interventional Pulmonology course, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard University, Boston, Massachusetts.
3. 27/03/2012, State of the Art Thoracic Ultrasound and Endobronchial Ultrasound TBNA, Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, Massachusetts.
4. 28-31/03/2012, Interventional Pulmonology, The 29th Year. Lahey Hospital & Medical Center, Burlington, Massachusetts.

5. 15-18/06/2012, 17th World Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology, Cleveland, Ohio.
6. 01-05/11/2012: European Respiratory Society School (ERS School), «Interventional Pulmonary Seminar», Sotiria Chest Hospital, Athens.
7. 27-30/04/2013: 2nd European Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology (ECBIP), Cesme – Izmir, Turkey.
8. 01-03/06/2014, Faculty Development Course and Introduction to Flexible Bronchoscopy, World Association of Bronchoscopy and Interventional Pulmonology, Athens, Greece
9. 25-27/09/2014, ERS School on “Interventional Bronchoscopy”, Athens, Greece
10. 08-09/10/2014, “Introduction to Flexible Bronchoscopy”, World Association of Bronchoscopy and Interventional Pulmonology, Moscow, Russia

## **11. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

### **I. Διεθνείς: (Αριθμός παρουσιάσεων = 4)**

1. 04/2008, 24<sup>ο</sup> Μεταπτυχιακό Σεμινάριο «Νεώτερα δεδομένα στην πνευμονολογία», Αθήνα. Προφορική παρουσίαση: Συστηματικές αυτοάνεες παθήσεις και πνεύμονες. Κουφός Ν., Παπαδάκη Γ., Αμαξιλάτη Δ., Κάβουρα Π., Μπακάκος Π.
2. 04/2008, 24<sup>ο</sup> Μεταπτυχιακό Σεμινάριο «Νεώτερα δεδομένα στην πνευμονολογία», Αθήνα. Προφορική παρουσίαση: Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση. Κουφός Ν., Μαρκοζάννης Ε., Πουλάκης Ν.
3. 24-27/11/2011, 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα. Προφορική παρουσίαση: Ταξινόμηση ευρημάτων στη Θωρακοσκόπηση: Σχετίζονται με την τελική παθολογία?, Εμμανουήλ Φ., Τριγκίδου Ρ., Χιώτης Δ., Στρατίκη Μ., Κοντογιάννη Κ., Κουφός Ν., Γεννηματά Σ., Ζακυνθινός Σ., Αλχανάτης Μ., Στρατάκος Γ..
4. 24-27/11/2011, 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα. Προφορική παρουσίαση: Όσιμη έκβαση ασθενών με καλοήγη στένωση τραχείας,

Στρατάκος Γ., Χιώτης Δ., Ζήσης Χ., Στρατίκη Μ., Γιαννιού Ν., Εμμανουήλ Φ., Κουφός Ν., Γεννηματά Σ., Αλχανάτης Μ., Ζακυνθινός Σ..

II. Παγκόσμιες: (Αριθμός παρουσιάσεων = 8)

1. 18-22/2010, European Respiratory Seminar, Barcelona, Thematic poster: Infectious exacerbations of COPD: IL-18 and its relation to markers of inflammation. E. Dima, T. Anagnostakos, P. Bakakos, N. Koufos, G. Papadaki, C. Roussos, N. Rovina.

2. 24-28/09/2011, European Respiratory Seminar, Amsterdam, Thematic poster: [P613] Long term outcomes of patients with benign tracheal stenosis after multidisciplinary management, G. Stratakos, D. Chiotis, C. Zisis, M. Stratiki, N. Gianniou, P. Emmanouil, N. Koufos, S. Gennimata, M. Alchanatis, S. Zakynthinos.

3. 24-28/09/2011, European Respiratory Seminar, Amsterdam, Thematic poster: [P3702] Classification of findings in medical Thoracoscopy: Do they correlate with pathology? P. Emmanouil, R. Tringidou, D. Chiotis, M. Stratiki, K. Kontogianni, N. Koufos, S. Gennimata, S. Zakynthinos, M. Alchanatis, G. Stratakos.

4. 15-18/06/2012, 17th World Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology, Cleveland, Ohio, Thematic poster: Specimen Adequacy of Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspirate (EBUS TBNA) for Tumor Markers in Non small cell lung cancer (NSCLC). Koufos N., Carla R. Lamb.

5. 15-18/06/2012, 17th World Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology, Cleveland, Ohio, Thematic poster: Participant knowledge and technical skill acquisition following one day EBUS course. Two year experience at Lahey Clinic. Koufos N., Voduc N., Carla R. Lamb.

6. 15-18/06/2012, 17th World Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology, Cleveland, Ohio, Thematic poster: Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the trachea – Case report and review of literature. Koufos N. Shadchehr S., Carla R. Lamb.

7. 01-05/09/2012, European Respiratory Seminar, Vienna, Thematic poster: [P3576] Incremental midazolam versus midazolam/fentanyl sedation during flexible

bronchoscopy. Safety and tolerance in relation to the complexity of intervention.

Stratakos G, Kokkonouzis I, Moraitaki P, Emmanouil P, Koufos N, Stoubi E, Tsiboura D, Zikopoulou F, Sampsonas F, Alchanatis M, Koulouris N.

8. 27-30/04/2013: 2nd European Congress for Bronchology and Interventional Pulmonology (ECBIP), Cesme – Izmir, Turkey. Oral presentation: [OP-45] Algorithmic approach of CT and EBUS guided TBNA with rapid on site (pulmonologist's)

evaluation for mediastinal exploration. Stratakos G., Emmanouil P., Al Najada M., Sampsonas F., Koufos N., Kokonouzis I., Alchanatis M., Koulouris N.

9. 13-16/04/2014: 18th World Association for Bronchology and Interventional Pulmonology and the International Bronchoesophagology Society Joint Meeting, Kyoto, Japan. Thematic Poster: Combined, algorithmic use of conventional and EBUS - TBNA in mediastinal/hilar lymphadenopathy. Gr. Stratakos, Ph. Emmanouil, N.

Koufos, A. Kokkini, R. Triggidou, I.Karabela.

10. 06-10/09/2014: International Congress, European Respiratory Society, Munich, Germany. Oral presentation: Diagnostic utility of combined, algorithmic use of conventional and EBUS -TBNA in mediastinal/hilar lymphadenopathy. Gr. Stratakos, Ph. Emmanouil, N. Koufos, A. Kokkini, R. Triggidou, I.Karabela.

11. 05-08/11/2014: 23ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα. Προφορική ανακοίνωση: “Αλγόριθμος συνδυασμένης εφαρμογής συμβατικής και EBUS-TBNA στη διερεύνηση λεμφαδενικών διογκώσεων μεσοθωρακίου/πυλών”. Γ. Στρατάκος, Φ. Εμμανουήλ, Ν. Κουφός, Α. Κοκκίνη, Ρ. Τριγγίδου, Ε. Καραμπελά, Β. Βίτσας και Ν. Κουλούρης

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

1. Κουφός Ν., Μελισσινός Χ. Επίδραση της μείωσης σωματικού βάρους στην πνευμονική λειτουργία και στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών στις παχύσαρκες γυναίκες. «Πνεύμων», Απρίλιος 2007; vol 19, (1b), p.247.
2. Κουφός Ν., Εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. «Διαβήτης» Σεπ.-Οκτ. 2011, 23:42-43.
3. Εμμανουήλ Φ., Κουφός Ν., Κουλούρης Ν., Αλχανάτης Μ., Στρατάκος Γ., Βρογχοσκοπική μείωση πνευμονικού όγκου σε προχωρημένο πνευμονικό εμφύσημα: ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των νέων τεχνικών. «Πνεύμων» 2011, 24(4):430-444.
4. Μπακάκος Π., Τραυλός Α., Κουφός Ν., Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες σε αναπνευστικά νοσήματα. «Πνεύμων», 2012, 25(1):58-63.
5. Koufos N, Michailidou D, Xynos ID, Tomos P, Athanasiadou K, Kosmas C, Tsavaris N. Modulation of peripheral immune responses by paclitaxel-ifosfamide-cisplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2013 Dec;139(12):1995-2003.



**Στην οικογένεια μου με αγάπη**

**Στους δασκάλους μου**

**Σε όσους βοήθησαν στην  
ολοκλήρωση αυτής της διατριβής**

*«το ζητούμενον αλωτόν,  
εκφεύγει δε τ' αμελούμενον»*

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Ν. Τσαβαρή και στους Δασκάλους μου Καθηγητή Χ.Μ. Μουτσόπουλο και Καθηγητή Α.Γ. Τζιούφα, των οποίων η συμβολή ήταν καθοριστική στην ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τον Καθηγητή Ε.Σ. Πατσούρη για την πολύ σημαντική υποστήριξή του, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Α.Χ. Λάζαρη που με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού τμήματος της μελέτης.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω θερμά την κα Α. Κορμπά της οποίας η βοήθεια υπήρξε υπερπολύτιμη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	24
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	24
Κάπνισμα .....	24
Ηλικία .....	25
Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	25
Κληρονομικότητα .....	26
Κυτταρική Παθογένεση – Γενετικές μεταβολές.....	27
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ .....	27
Οικογένεια γονιδίων myc.....	27
Οικογένεια γονιδίων ras.....	28
ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ .....	28
ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ .....	30
ΠΑΡΑΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ .....	33
I. Ενδοκρινικά σύνδρομα.....	33
II. Νευρολογικά σύνδρομα .....	33
III. Καρδιαγγειακές – αιματολογικές εκδηλώσεις.....	34
IV. Σκελετικές παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις.....	34
V. Δερματικά παρανεοπλασματικά σύνδρομα .....	34
VI. Σπάνιες παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις.....	34
B1. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΟΓΚΩΝ .....	35
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΑΠΟΔΕΙΞΕΙΣ – ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ .....	38
Πειραματικές – Βιολογικές αποδείξεις.....	38
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	39
ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	42
ΠΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΦΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....	44

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΥΡΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	45
ΩΦΕΛΕΙΑ ΠΡΟΜΗΘΕΙΑΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΥΡΟΔΟΤΗΣΗ.....	47
ΜΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ .....	49
ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΒΡΙΘΕΙΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ .....	50
ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	51
ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΥΡΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	53
Ινοβλαστικός Αυξητικός Παράγων (bFGF).....	54
Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγων (vegf).....	54
ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ.....	58
COX-2.....	58
EGF .....	59
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ .....	59
Έμμεσοι Αγγειογενετικοί Αναστολείς.....	59
Άμεσοι Αγγειογενετικοί Αναστολείς.....	60
Ενδογενείς Αναστολείς.....	61
ΑΓΓΕΙΟΣΤΑΤΙΝΗ .....	62
Φυσιολογικές Λειτουργίες της Ενδοστατίνης.....	63
Πρωτεϊνικής φύσεως υποδοχείς δεσμεύσεως της αγγειοστατίνης .....	64
Διαμόλυνση αγγειοστατίνης .....	64
Γονιδιακή θεραπεία με αγγειοστατίνη .....	65
Ακτινοθεραπεία και αγγειοστατίνη.....	65
ΕΝΔΟΣΤΑΤΙΝΗ.....	66
Φυσιολογικές λειτουργίες ενδοστατίνης.....	67
Αναστολή δέσμευσης του VEGF στον υποδοχέα.....	67
Μείωση της έκφρασης του VEGF .....	68
Προφύλαξη της επαγωγής μετανάστευσης με bFGF-ενδοστατίνη.....	68
Αγγειακή σταθεροποίηση .....	69
Σχέση ενδοστατίνης με μεταλοπρωτεΐνάσες.....	70

Τρόποι δεσμεύσεως της ενδοστατίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.....	70
Νιτρικό οξείδιο ενδοθηλιακών κυττάρων και ενδοστατίνη.....	71
Μείωση παραγωγής ενδοστατίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα επί υποξία .....	72
Ενδοστατίνη και αιμοπετάλια .....	72
Πειραματικές εργασίες θεραπείας όγκων με ενδοστατίνη.....	75
Γονιδιακή θεραπεία με ενδοστατίνη, τοπική γονιδιακή θεραπεία.....	75
Προσδιορισμός μηχανισμών σηματοδότησης του δικτύου ενδοστατίνης.....	75
Κλινικές εφαρμογές χορήγησης ενδοστατίνης .....	76
Αναστολή της D1 κυκλίνης – πρόκληση G1 ανακοπής των ενδοθηλιακών κυττάρων.....	76
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	78
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΕΚΤΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ .....	84
ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	88
ΡΟΛΟΣ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ .....	91
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ.....	92

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Σκοπός.....	96
Σχεδιασμός μελέτης .....	96
Ασθενείς και μέθοδος .....	97
Πρωτόκολλο συγκατάθεσης ασθενών .....	98
Αποτελέσματα.....	105
Ανοσολογικοί παράμετροι.....	106
Μεταβολές αγγειογενετικών και ανοσολογικών παραγόντων προ και μετά τη θεραπεία.....	107
Παράλληλες μελέτες .....	111
Πρότυπα έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα σταδίου ΙΙΙ, που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με Πακλιταξέλη- Ιφωσφαμίδη-Σισπλατίνη .....	111
Τροποποίηση των περιφερικών ανοσολογικών απαντήσεων σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, μετά από τη λήψη θεραπείας με Πακλιταξέλη-	

Ιφωσφαμίδη-Σισπλατίνη .....	112
Συζήτηση.....	113
Περίληψη .....	117
Βιβλιογραφία γενικού μέρους.....	120
Βιβλιογραφία ειδικού μέρους .....	166
Δημοσιευμένες εργασίες .....	170
Εργασίες προς δημοσίευση .....	180

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα από σπάνια μορφή νεοπλασματικής νόσου μέχρι το 1930, εμφάνισε δραματική αύξηση της παρουσίας και της θνησιμότητας του σε άντρες και γυναίκες. Πριν από περίπου 60 έτη πρωτοπεριγράφηκε από τον Hoover η σχέση του καρκίνου του πνεύμονα με το κάπνισμα.<sup>1,2</sup> Στα έτη που ακολούθησαν, η παρατήρηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την καρκινογένεση, έχει βοηθήσει στην κατανόηση της νόσου σε κυτταρικό επίπεδο.<sup>3</sup> Οι παρατηρήσεις αυτές ίσως μπορούν να οδηγήσουν σε βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης, σταδιοποίησης των καρκίνων, θεραπείας και πρόληψη της νόσου.

## ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΟΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΟΣ

**ΚΑΠΝΙΣΜΑ :** Ο καρκίνος του πνεύμονος έχει το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας και στα δύο φύλα στις Η.Π.Α. αλλά και αρκετές ακόμα χώρες. Στις Η.Π.Α. μόνο, το 2003 εντοπίστηκαν περίπου 171.600 νέα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονος, με ποσοστό θνησιμότητας ~31% για τους άνδρες και ~ 25% για τις γυναίκες, ένα σύνολο περίπου 157.200 θανάτων.<sup>4</sup> Σε σύγκριση με τα δεδομένα αυτά, το 1920 αναφέρονται μόνο 956 περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονος, και για το λόγο αυτό εθεωρείτο σπάνια νόσος. Από το 1950 και μετά αναγνωρίστηκε ως σοβαρό πρόβλημα της δημόσιας υγείας.<sup>5</sup> Η εντόπιση νέων περιστατικών της νόσου στους άνδρες κορυφώθηκε το 1984 με περίπου 87 ασθενείς ανά 100.000 άτομα, ενώ η εμφάνιση της νόσου συνέχισε να αυξάνεται σταθερά και στις γυναίκες φτάνοντας τα 42 περιστατικά ανά 100.000 το 1991.

Το 1930 η συχνότητα θανάτου 5 άνδρες και 3 γυναίκες στα 100.000 άτομα, ενώ το 1960 τα νούμερα αυτά έγιναν 38.2 και 5.7 αντίστοιχα. Τα νούμερα αυτά παρουσιάζουν αύξηση 96% της νόσου στους άνδρες και 451% στις γυναίκες από το 1960. Όσον αφορά τους άνδρες, από το 1982 και μετά επικράτησε ισορροπία στη συχνότητα εμφανίσεως της νόσου, ενώ για τις γυναίκες συνέχισε η αυξανόμενη πορεία σε μικρότερο όμως ρυθμό. Από το 1987 και έπειτα, περισσότερες γυναίκες πέθαναν από καρκίνο του πνεύμονα παρά από καρκίνο του μαστού που για 40 και πάνω έτη αποτελούσε τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο για το ασθενές φύλο.



Η αύξηση λοιπόν των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονος είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση στην κατανάλωση τσιγάρων. Στις Η.Π.Α. η νόσος έλαβε μεγάλες διαστάσεις στα 1930, ιδιαίτερα στον αντρικό πληθυσμό λόγω της αύξησης του καπνίσματος κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε στο γυναικείο πληθυσμό κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου, με κορύφωση το 1960, μετά το τέλος του οποίου άρχισε και η σταδιακή μείωση της νόσου. Έχει εκτιμηθεί ότι το κάπνισμα ευθύνεται για περισσότερους από 1 στους 6 θανάτους στις Η.Π.Α.. Με βάση τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 6.000.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο εξαιτίας του καπνίσματος παγκοσμίως. Οι καπνιστές χάνουν σε μέσο όρο 15 χρόνια ζωής από την κατανάλωση του καπνού. Οι πιθανότητες θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα είναι 22 φορές περισσότερες σε άνδρες καπνιστές και 12 φορές σε γυναίκες σε σχέση με μη καπνιστές.<sup>6,7</sup>

**ΗΛΙΚΙΑ:** Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με την ηλικία, κάτι που είναι ανεξάρτητο του φύλου και των φυλετικών δεδομένων.<sup>9</sup> Με την αύξηση της ηλικίας καθίσταται δυσκολότερη η θεραπεία και λιγότερο πιθανή η αναστολή της θνησιμότητας μετά από θεραπευτικές επεμβάσεις.<sup>10-12</sup> Έχει παρατηρηθεί ότι η πιθανότητα εμφάνισης αδενοκαρκινώματος είναι υψηλότερη σε νέους παρά σε ηλικιωμένους ασθενείς.<sup>13-23</sup>

Παράλληλα έχει υποστηριχθεί ότι ο καρκίνος του πνεύμονος είναι πιο επιθετικός σε νέους ασθενείς, κάτι όμως που παραμένει ακόμα αναπόδειχτο. Σίγουρα η πορεία της νόσου εξαρτάται από τη σταδιοποίηση του καρκίνου και την ιστολογία του.<sup>24-26</sup>

#### **ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:**

Η νόσος του καρκίνου του πνεύμονος σχετίζεται με το επαγγελματικό περιβάλλον και με την έκθεση σε άλλους καρκινογόνους παράγοντες εκτός από το κάπνισμα.<sup>27</sup> Τέτοιοι παράγοντες είναι το αρσενικό, ο αμιάντος, διάφοροι τύποι αιθέρα, η χρωμυκίνη, οι υδρογονάνθρακες, το αέριο μουστάρδας, το νικελ και η ακτινοβολία. (πίνακας 1)

Πίνακας 1. Καταγεγραμμένοι επαγγελματικοί καρκινογόνοι παράγοντες	
Χημικές ουσίες	Επαγγελματική έκθεση
Αμίαντος	Smelters, κατασκευαστές εντομοκτόνων
Βερύλλιο	Εργάτες ορυχείων, , εργάτες ναυπηγείων σιδηροδρόμων
Χλωρομεθυλ-αιθέρες	resin κατασκευαστές
Χρώμιο	Chromate κατασκευαστές
Υδρογονάνθρακες	Κατασκευαστές σκεπών, εργαζόμενοι με γκάζι
Αέριο μουστάρδας	Εργάτες με έκθεση σε δηλητηριώδη αέρια
Nickel	Διυλιστής
Ακτινοβολία	Εργάτες σε ορυχεία με ουράνιο και άλλα

Σε περιοχές όπου κατασκευάζονται πλοία, ή βρίσκονται μεγάλες βιομηχανίες η έκθεση σε αμίαντο, αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Η έκθεση σε ουράνιο σε εργάτες ορυχείων έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση μικροκυτταρικού τύπου καρκίνου (Small Cell Lung Carcinoma- SCLC) και χαρακτηριστικό είναι πως τον 19<sup>ο</sup> αιώνα ο τύπος αυτός της νόσου ονομαζόταν «φθίσης ορυχείων». Ο Saccomanno και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν τεράστια ποσοστά εμφάνισης της νόσου σε εργάτες των ορυχείων του Κολοράντο οι οποίοι εκτίθονταν σε ουράνιο. Τα ποσοστά αυτά αυξάνονταν ακόμα περισσότερο όταν συνυπήρχε και κατανάλωση τσιγάρων.<sup>28-29</sup>

**ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ:** Είναι εντυπωσιακό πως μεγάλος αριθμός καπνιστών, συμπεριλαμβανομένων και βαρέων καπνιστών, δεν αναπτύσσουν καρκίνο του πνεύμονα.

Αυτό δηλώνει ότι η νόσος εξαρτάται πιθανώς από τη γενετική προδιάθεση και άλλους παράγοντες όπως επιπρόσθετα καρκινογόνα. Γενικά οι μέχρι σήμερα μελέτες έδειξαν πως οι πιθανότητες σε κάποιους ανθρώπους να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονος είναι ανεξάρτητες από το οικογενειακό ιστορικό. Γενετική διαφοροποίηση σε κάθε άτομο η οποία τελικά καθορίζει την απάντηση του οργανισμού του και κυρίως του ανοσολογικού του συστήματος ως προς τα διάφορα καρκινογόνα αυξάνει ίσως τις πιθανότητες εμφάνισης του καρκίνου. Άλλες μελέτες έδειξαν πως η ανάπτυξη της νόσου σε άτομα κάτω των 50 ετών συσχετιζόταν με ένα επικρατές σπάνιο αυτοσωμικό γονίδιο. Αυτό το γονίδιο δεν εντοπίστηκε σε πιο ηλικιωμένους ασθενείς με τη νόσο. Συνεπώς στους τελευταίους, η βασική αιτία της νόσου ήταν η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου.<sup>29</sup>

**ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ – ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ:** Η ταχέως εξελισσόμενη μοριακή βιολογία επέτρεψε την αναγνώριση γενετικών αλλαγών στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονος. Παρόλ'αυτά η πληθώρα γενετικών ανωμαλιών που έχουν εντοπιστεί έχουν επιφέρει σύγχυση ως προς την αξία τους στη γένεση αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονος.<sup>3,30</sup>

#### **ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ :**

Πρόκειται για οικογένειες γονιδίων που η έκφραση τους επάγει την καρκινογένεση (Πίνακας 2).

Οικογένεια γονιδίων *myc*: Μια από τις πρώτες γονιδιακές αλλαγές που σχετίστηκαν με τον καρκίνο του πνεύμονος ήταν η ενίσχυση του ογκογονιδίου *c-myc*, όπως παρατηρήθηκε κυρίως σε κάποιους τύπους μικροκυτταρικούς καρκίνους πνεύμονα (SCLC). Τα κύτταρα τα οποία χαρακτηρίζονταν από αυτή την γονιδιακή ενίσχυση παρουσίαζαν ταχύτατο διπλασιασμό, υψηλότερες κλωνικές σταθερές και μεγαλύτερη αντοχή στην ακτινοβολία από άλλους τύπους SCLC.<sup>31,32</sup> Η συνολική αξία της υπερέκφρασης της οικογένειας γονιδίων *myc* δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Γενικά οι κυτταρικές σειρές με την τροποποιημένη μορφολογία ήταν πιο ανθεκτικές στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία και στους δύο βασικές κατηγορίες καρκίνου (SCLC, NSCLC).

Ο ρόλος της αυξημένης έκφρασης της οικογένειας γονιδίων *myc* στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα απαιτεί περαιτέρω προσδιορισμό. Παρόλ' αυτά, μάλλον δεν αποτελεί πρωτογενές φαινόμενο αφού εμφανίζεται σε μειονότητα καρκίνων.<sup>33,34</sup>

Η οικογένεια γονιδίων *ras*: Η οικογένεια *ras* (ομόλογη με τον ιό του σαρκώματος των ποντικών) έχει τρία κύρια μέλη γονιδίων, τα H-*ras*, τα K-*ras* και τα N-*ras* τα οποία είναι τα περισσότερο ενεργοποιημένα ογκογονίδια εντοπιζόμενα σε ανθρώπινο καρκίνο. Κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) η οποία βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματοκυτταρικής μεμβράνης, έχουν δραστηριότητα GTPάσης και μπορούν να συμμετέχουν στη μεταφορά σημάτων. Μελέτες σε ποντίκια με καρκίνο πνεύμονος ενοχοποιούν γονίδια *ras* για την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Οι μεταλλάξεις αφορούσαν κυρίως GC με AT αλλαγές υποδεικνύοντας ότι η μεθυλίωση του DNA αποτελεί πιθανότατα τον κύριο λόγο αύξησης της νεοπλασίας από αυτά τα καρκινογόνα.

Οι μελέτες μέχρι σήμερα υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση των *ras* συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Η ενεργοποίηση αφορά το 1/3 περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα ασθενών με βαρύ ιστορικό καπνίσματος.<sup>35,36</sup>

Διάφορα ογκογονίδια έχουν κατά καιρούς μελετηθεί για τη συμβολή τους στον καρκίνο πνεύμονα εκτός από τα *ras* όπως γονίδια της οικογένειας *myc*, BCL, *c-fur*, *c-fes* κ.α.

**ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ:** Είναι γονίδια που σχετίζονται με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και κυτταρική ανάπτυξη και είναι υπεύθυνα για καρκινογένεση. Ο ρόλος τους στην καρκινογένεση σχετίζεται με την απενεργοποίηση άλλων γονιδίων που μπορεί να συντελέσει στην ανάπτυξη κάποιου όγκου.<sup>30,37</sup> Η συχνή εμφάνιση χρωμοσωμιακών διαγραφών στα SCLC και στα NSCLC μας υποδηλώνει ότι η απώλεια ειδικής γονιδιακής λειτουργίας μπορεί να είναι ένα κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη κάποιου καρκίνου πνεύμονα. Δύο πολύ σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι πυρηνικές φωσφοπρωτεΐνες *p53* και *Rb*.<sup>38-40,42</sup>

Το γονίδιο *p53* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 375 αμινοξέων η οποία μπορεί και σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες μεγάλες πρωτεΐνες όπως το αντιγόνο T και η end-binding protein 1 (E1B). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου είναι συχνές σε πληθώρα καρκίνων. Ο ακριβής ρόλος αυτών των μεταλλάξεων αποτελεί και σήμερα θέμα προς διερεύνηση.<sup>38,43</sup>

Αρκετά ακόμα γονίδια έχουν θεωρηθεί υποψήφια ως ογκοκατασταλτικά. Το γονίδιο για παράδειγμα p16 είναι συχνά απενεργοποιημένο σε αρκετούς καρκίνους, όπως και στον καρκίνο του πνεύμονα. Άλλα γονίδια λιγότερο συχνά αναφερόμενα είναι τα Phosphatase και tensin homolog (*PTEN*), *Candida albicans* HOG1 και η BRCA associated protein (*BAP1*).

<b>Πίνακας 2. Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο πνεύμονος</b>		
	<b>SCLC</b>	<b>NSCLC</b>
<b>Ογκογονίδια</b>	c-myc L-myc N-myc c-raf c-myb c-erbB1 ( <i>EGFR</i> ) c-fms c-rlf	K-ras N-ras H-ras c-mycc c-raf c-fur c-fes c-erbB1 ( <i>EGFR</i> ) c-erbB2 ( <i>HER2/neu</i> ) c-sis BCL1
<b>Ογκοκατασταλτικά γονίδια</b>	p53 Rb	P53 Rb

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ:** (πίνακες 3, 4)

Τα σημεία και τα συμπτώματα μπορεί να χωριστούν σε συστηματικά και στα προκαλούμενα από την τοπική διήθηση εκ του όγκου. Τα συστηματικά - μη ειδικά σημεία και συμπτώματα είναι κοινά τόσο στα SCLC όσο και στα NSCLC, ενώ διαφέρουν ανάλογα με την εντόπιση και το μέγεθος του όγκου. Οι κεντρικοί ως προς τη θέση όγκοι προκαλούν βήχα, εντοπισμένο συριγμό, αιμόπτυση αλλά και συμπτώματα απόφραξης του αεραγωγού. (Πίνακας 3)

<b>Πίνακας 3.</b> Συχνότητα εμφάνισης συμπτωμάτων στις δύο βασικές κατηγορίες καρκίνου πνεύμονος.		
<b>Συμπτώματα</b>	<b>SCLC</b>	<b>NSCLC</b>
Βήχας	50-76	40
Δύσπνοια	34-40	30-40
Θωρακικό άλγος	35-36	25-40
Αιμόπτυση	15-23	15-35
Πνευμονίτιδα	21-25	13-24
Παράλυση φωνοχορδών	15	Ασυνήθιστο
Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας	12	<10
Πλευριτική συλλογή	10-15	15
Σύνδρομο Pancoast	Σπάνιο	3
Υγρά περικαρδίτις	Ασυνήθιστο	Σπάνιο

Η προσβολή του μεσοθωρακίου μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή ενός ήπιου εντοπισμένου άλγους συνδυαζόμενο με άλλα σημεία όπως παγίδευση κάποιου νεύρου, αγγειακή απόφραξη και κλινικά σημεία πίεσης ή απόφραξης του οισοφάγου. Μια από τις συνηθέστερες κλινικές συνέπειες από πίεση νεύρου στα πλαίσια διήθησης του μεσοθωρακίου είναι το βράγχος της φωνής από πίεση του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου (συνήθως του αριστερού).<sup>44</sup> Η δημιουργία τράχεο- ή και βρογχο- οισοφαγικού συριγγίου, το

οποίο συμβαίνει σε ποσοστό 0.16%, μπορεί να συνοδευτεί από έντονο βήχα κυρίως κατά την κατάποση, καθώς και από επεισόδια πνευμονίας εξ εισροφήσεως. Συμμετοχή του φρενικού νεύρου συνοδεύεται αρχικά με λόξυγγα και στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε παράλυση και άνωση του ημιδιαφράγματος με επακόλουθη δύσπνοια. Η πίεση της άνω κοίλης φλέβας από τον όγκο προκαλεί το αντίστοιχο σύνδρομο (SVCS- superior vena cava syndrome), ενώ το αγγείο επιβαρύνεται και από την ανάπτυξη αθηρωματώδους πλάκας εντός του αυλού της στα πλαίσια παρανεοπλασματικού συνδρόμου. Από τους άνω λοβούς των πνευμόνων προέρχονται οι καρκίνοι Pancoast οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν και το αντίστοιχο σύνδρομο (κατώτερη βραχιόνιος νευροπάθεια, σύνδρομο Horner και άλγος του ώμου) το οποίο πιθανότατα οφείλεται σε διήθηση του κατώτερου βραχιόνιου πλέγματος. Τέλος, συμπτώματα μπορεί να προκληθούν εξαιτίας της διηθήσεως από τον όγκο της πρώτης ή δεύτερης πλευράς, των σπονδύλων ή άλλων νευρικών κλάδων.<sup>45, 46</sup>

Η συλλογή υγρού στον υπεζωκότα μπορεί να είναι ασυμπτωματική εφόσον είναι μικρή, αλλά συνήθως συνοδεύεται από δύσπνοια, βήχα και θωρακικό άλγος.<sup>47,48</sup> Περικαρδιακή συμμετοχή μπορεί να επέλθει από άμεση επαφή με τον όγκο ή ακόμα και από διασπορά κυττάρων μέσω των μεσοθωρακικών ή επικαρδιακών λεμφαγγείων.<sup>49</sup> (Πίνακας 4)

**Πίνακας 4. Γενικά σημεία και συμπτώματα σε καρκίνο πνεύμονα.**

<b>Σημεία και συμπτώματα</b>	<b><u>Συχνότητα(%)</u></b>	
	<b>SCLC</b>	<b>NSCLC</b>
Ανορεξία	30	30
Απώλεια βάρους	35-52	45-52
Αίσθημα κοπώσεως	23-42	35
Πυρετός	11-15	7-16
Αναιμία	11-15	16-20



**ΠΑΡΑΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ:** Η εμφάνιση τους οφείλεται στην παραγωγή εκ του όγκου ή των μεταστάσεων «ειδικών ουσιών» όπως πεπτιδικών ορμονών, πεπτιδίων με δράση ανάλογη των ορμονών, αντισωμάτων ή ανοσοσυμπλεγμάτων, προσταγλανδινών ή κυτταροκινών.

## **I. ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (12%)**

### **A. Σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (βαζοπρεσσίνης) (SIADH-Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone).**

Οφείλεται σε έκκριση βαζοπρεσσίνης σε ποσότητα μεγαλύτερη έως 70% από αυτή που απαιτείται για τη διατήρηση της ωσμωτικότητας του ενδαγγειακού όγκου.<sup>50-53</sup>

### **B. Σύνδρομο έκτοπης παραγωγής ACTH (Σύνδρομο Cushing)**

Η έκτοπη παραγωγή ACTH (>200pg/ml) είναι η συχνότερη παρανεοπλασματική εκδήλωση που έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα και ειδικότερα τον μικροκυτταρικό.<sup>53-55</sup>

### **Γ. Έκτοπη παραγωγή γοναδοτροπινών**

Αύξηση των επιπέδων της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (Human Chorionic Gonadotrophine – hCG) έχει συσχετισθεί με πάσχοντες με καρκίνο πνεύμονος και ιδιαίτερα μεγαλοκυτταρικού τύπου.<sup>54,57-60</sup>

### **Δ. Καρκινοειδές σύνδρομο**

Απαντάται συνήθως επί μικροκυτταρικού και γενικά επί αδιαφοροποίητου καρκίνου πνεύμονος.

### **Ε. Έκτοπη παραγωγή ορμονών επί καρκίνου πνεύμονος**

Εντοπίζονται συνήθως σε μικροκυτταρικούς καρκίνους και η κλινική τους αξιολόγηση είναι βιβλιογραφικά περιορισμένη.<sup>53, 54</sup>

## **II. ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (1-1.5%)**

Νευρολογικά σύνδρομα σχετιζόμενα με καρκίνο πνεύμονα μπορεί να προκύψουν με αυτοάνοσο μηχανισμό,<sup>61-63</sup>

Τα συχνότερα νευρολογικά σύνδρομα είναι:

A. Το μυασθενικό σύνδρομο Eaton-Lambert<sup>64,68-70</sup>

Β. Υποξεία παρεγκεφαλιδική εκφύλιση<sup>71-74</sup>

Γ. Υποξεία περιφερική νευροπάθεια<sup>75-77</sup>

### **III. Καρδιαγγειακές – αιματολογικές εκδηλώσεις (7-15%)**

Οι δύο περισσότερο αινιγματικές παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις σε καρκίνο πνεύμονος εκ του καρδιαγγειακού συστήματος είναι η μη βακτηριδιακή θρομβωτική ενδοκαρδίτις και η μεταναστευτική θρομβοφλεβίτιδα.

Η μη βακτηριακή θρομβωτική ενδοκαρδίτιδα γνωστή και ως «μαραντική ενδοκαρδίτιδα» παρουσιάζεται ακόμη και σε αρχικά στάδια καρκινώματος πνεύμονος.<sup>73,78,79</sup> Η μεταναστευτική θρομβοφλεβίτιδα αποτελεί κλασική εκδήλωση παρανεοπλασματικού συνδρόμου. Η πνευμονική εμβολή έχει παρατηρηθεί στο 20% νεκροτομικού υλικού πασχόντων από καρκίνο πνεύμονος.<sup>85,86</sup>

Παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις από τα έμμορφα στοιχεία του αίματος όπως πχ. αναιμία, λευκοκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση και τους παράγοντες πήξεως είναι πολύ συχνές.<sup>84,87</sup>

### **IV. ΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ:**

1. Πληκτροδακτυλία (25-30%)
2. Υπερτροφική πνευμονική οστεαρθροπάθεια (ΥΠΟ)

### **V. Δερματικά παρανεοπλασματικά σύνδρομα (1%) επί καρκίνου πνεύμονα:**

Κυριώτερες εξ αυτών είναι: η μελανίζουσα ακάνθωση (Acanthosis nigricans), το σύνδρομο Bazex's και η υποξεία μορφή του δερματικού λύκου.

### **VI. Σπάνιες παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις επί καρκίνου πνεύμονος:**

Αποτελούν δείκτη κακής πρόγνωσης της νόσου και εδώ εντάσσονται κυρίως παθήσεις των νεφρών όπως η μεμβρανώδης σπειραματονεφρίτιδα και μεμονωμένες περιπτώσεις νεφρωσικού συνδρόμου.

## ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΟΓΚΩΝ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αγγειογένεση, είναι η φυσιολογική διαδικασία δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα. Θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη των συμπαγών όγκων δεδομένου ότι συμβάλλει στην εμφάνιση, την τροφοδοσία τους, την τοπική επέκταση και τη μεταστατική εξάπλωσή τους.<sup>97</sup>

Ο ρόλος της αγγειογένεσεως είναι σημαντικός κυρίως διότι προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και πρόσβαση στο αγγειακό δίκτυο διευκολύνοντας τη μετάσταση. Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό συναγωνιζόμενα τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μυελού των οστών,<sup>92,96,97,98</sup> ενώ παράλληλα παράγουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που διεγείρουν τα καρκινικά κύτταρα.<sup>93,94,95</sup>

Η ανάπτυξη της αγγειογένεσεως (Εικόνα 1) αρχικά περιλαμβάνει την επίδραση αγγειογενετικών ερεθισμάτων στα προϋπάρχοντα μετατριχοειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα: 1. την τοπική διάσπαση της βασικής αγγειακής μεμβράνης, 2. την πρωτεόλυση της εξοκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ανασυγκρότησης αυτής, 3. τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο και 4. τη διαφοροποίησή τους σε νέα τριχοειδή τα οποία στη συνέχεια υφίστανται λειτουργική ωρίμανση ικανή να ευνοεί τη ροή και παροχή αίματος.<sup>93,94,95</sup> Η αγγειογένεση είναι ουσιαστικά μια επιμένουσα, άναρχη νεοαγγειοβρίθεια στην περιοχή των νεοπλασματικών όγκων που συνεχίζεται για μήνες ή και χρόνια ανάλογα με τον ιστικό τόπο του νεοπλάσματος και τη διαχρονική του πορεία.<sup>97,101</sup>

Φυσιολογικά η αγγειογένεση είναι θεμελιώδης και αναγκαία για αναπαραγωγική ανάπτυξη και επανόρθωση. Κυρίως επιδρά στους ασκούμενους μύες σαν μια επανόρθωση στη βλάβη που διαρκεί λίγες ημέρες ή εβδομάδες.

Από 100ετίας έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων αγγειοβρίθεια και υπεραϊμία των συμπαγών όγκων μεγαλύτερη από αυτή που συνήθως παρατηρείται στους φυσιολογικούς ιστούς.<sup>102,98</sup> Τα στοιχεία αυτά αρχικά συνδυάστηκαν με σκέψεις και θεωρίες του αριθμού νέων τριχοειδικών αγγείων η διαστολή των οποίων από μεταβολικά προϊόντα των όγκων οδηγούσε σε υπεραϊμία αυτών.

Το 1939 αναφέρεται διαπίστωση νεοαγγειογένεσως στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού κουνελιού μετά από τραυματισμό, που απεκαταστάθη πλήρως μετά την επούλωση της πληγής,<sup>100</sup> ενώ εμφύτευση κακοήθων κυττάρων στην ίδια περιοχή συνδυάστηκε με αύξηση νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων.

Αργότερα, το 1945 και 1947 σε ανάλογες εργασίες εμφυτεύσεως νεοπλασματικών κυττάρων, διαπιστώθηκε αγγειογένεση με βασική πηγή προέλευσης τα αγγεία του ξενιστού και όχι αμιγώς του όγκου.<sup>101,103,104</sup>

Προοδευτικά άρχισε να επικρατεί η άποψη της επαγωγής νεοαγγειογένεσως, ως απάντηση σε φλεγμονώδη αντίδραση έναντι του όγκου ή ως παρενέργεια στο μηχανισμό αυξήσεως του όγκου.<sup>105</sup>

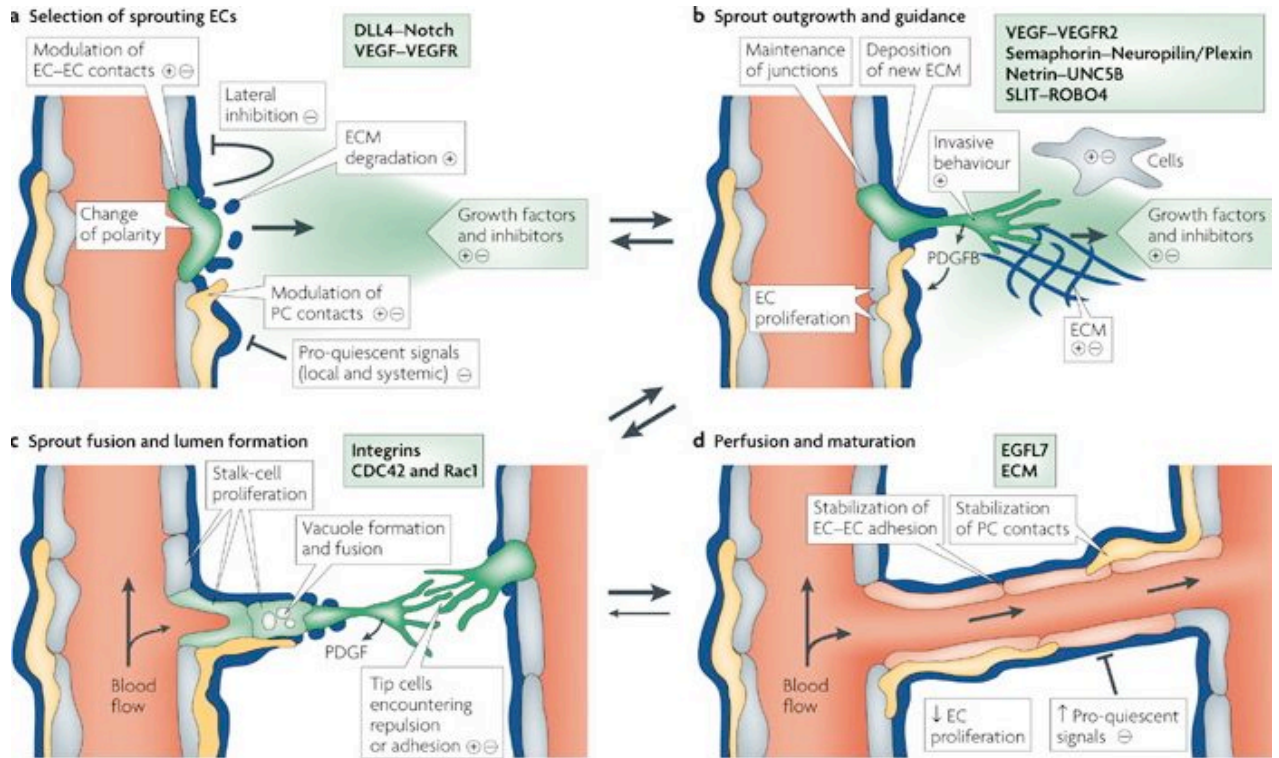
Το 1971 αρχίζει η έρευνα της αγγειογένεσως με την διατύπωση από τον Folkman της θεωρίας ότι η αύξηση του όγκου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αγγειογένεσως.<sup>106</sup> Η «φανταστική υπόθεση» του Folkman εστιαζόταν στη σχέση των κυττάρων τού όγκου και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων αυτού, τα οποία θεωρήθηκαν ένα άριστο «ενεργοποιημένο οικοσύστημα» το οποίο με τη σειρά του λειτουργεί με ουσίες παραγόμενες από τα κακοήθη κύτταρα που μεταστρέφουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τη φάση ηρεμίας (dormant or avascular phase) στου πολλαπλασιασμού και εξέλιξης, με τελικό αποτέλεσμα τη μορφοποίηση νέων αγγείων (vascular phase).

Παράλληλα για πρώτη φορά γίνεται λόγος για ιατρική αντιαγγειογενετική παρέμβαση προς θεραπεία του νεοπλάσματος. Το 1960 ο Folkman με τον Frederick Becker έδειξαν πειραματικά ότι ο περιορισμός της αγγειοβρίθειας του όγκου οδηγούσε παράλληλα σε περιορισμό της αυξήσεώς του.<sup>107,108</sup> Από το 1970 δημοσιεύονται πολλές εργασίες από πολλούς ερευνητές ότι οι νεοπλασματικοί όγκοι συμπαγών οργάνων επάγουν αγγειογένεση με μηχανισμό που ενεργοποιείται από τα νεκρωμένα κύτταρα του όγκου που δημιουργούν τη φλεγμονώδη απάντηση του ξενιστού ή μια παθολογική και κατ' επέκτασιν επιβλαβή αμυντική αντίδραση αυτού.

Άλλες μελέτες της ίδιας περιόδου αναφέρουν πώς όταν η νεοαγγειογενετική πορεία στα τριχοειδή αγγεία του όγκου αναστέλλεται (πχ. με ακτινοβολία) τότε επέρχεται αναστολή της νεοπλασματικής ανάπτυξης.<sup>109-114</sup>

Με βάση αυτά τα στοιχεία το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο πεδίο της αγγειογένεσως με ένα ευρύ φάσμα στόχων που άπτονται της μοριακής βιολογίας, της

γενετικής καθώς και ποικίλων κλινικών ειδικοτήτων όπως η ογκολογία, η καρδιολογία, η δερματολογία, η γυναικολογία, η οφθαλμολογία και η ρευματολογία.



**Εικόνα 1.:** Διαδικασία αγγειογένεσης

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΑΠΟΔΕΙΞΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Από το 1970, πειραματικές μελέτες αναφέρουν τη σχέση της αύξησης του όγκου με την αγγειογένεση. Η αύξηση ενός όγκου είναι ανάλογη της δημιουργίας νέων αγγείων στον όγκο,<sup>111</sup> επομένως αν η αγγειογένεση μπορούσε να ανασταλεί πλήρως τότε ο όγκος θα μπορούσε να περιοριστεί σε μέγεθος.<sup>115</sup>

Η απουσία αγγειογένεσης προφυλάσσει τον πάσχοντα οργανισμό από επέκταση ενός όγκου μεγαλύτερου από 1-2mm<sup>3</sup> περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταστατικότητα του.<sup>116,117</sup> Σημειώνεται ότι οι μη αγγειοβριθείς όγκοι δεν είναι κλινικά ανιχνεύσιμοι με εξαίρεση τους όγκους του δέρματος, των βλεννογόνων και του τραχήλου.

### Πειραματικές - Βιολογικές αποδείξεις

1. Η καλλιέργεια πληθυσμού νεοπλασματικών κυττάρων αναπτύσσεται και επεκτείνεται στο άγαρ ή τη μεθυλσελλουλόζη μέχρι μερικά εκατοστά διατηρώντας σταθερή τη σχέση ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης.<sup>118,-120</sup>
2. Η εμφύτευση νεοπλασματικών κυττάρων στον υποδόριο χώρο έχει παρατηρηθεί ότι ακολουθείται από βραδύ και γραμμικό πολλαπλασιασμό τους, πριν την νεοαγγειογένεση. Μετά την νεοαγγειογένεση του όγκου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυξάνει όπως και η μάζα του όγκου.<sup>103,121</sup>
3. Η αύξηση του όγκου σε ανάγγειο κερατοειδή κονίκλου εξελίσσεται επίσης βραδέως και γραμμικώς, μετατρέπόμενη σε ταχέως αναπτυσσόμενη μετά την νεοαγγειογένεση.<sup>122</sup>
4. Όγκοι του πρόσθιου θαλάμου οφθαλμού κονίκλου θεωρούνται βιώσιμοι μεν, αδρανείς δε, με περιορισμένο μέγεθος (μικρότεροι του 1mm) και ανάγγειοι. Με επαγωγή της νεοαγγειογένεσης στα αγγεία της-ίριδος δημιουργείται αγγειακό δίκτυο που διαμορφώνει χαρακτηριστική εικόνα επιπλεόντων αγγείων στο υδατώδες υγρό με περιορισμένη τροφοδοσία του όγκου. Η νεοαγγείωση δίδει σε αυτόν σημαντική αύξηση έως και 16000 φορές του αρχικού μεγέθους σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων.<sup>122,123</sup>
5. Η αύξηση του όγκου στο υαλώδες σώμα και αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού του κονίκλου είναι περιορισμένη (<0.5mm για μακρό χρονικό διάστημα μέχρι και 100 ημερών). Από τη στιγμή που αρχίζει η νεοαγγειογένεση με τροφοδοσία του όγκου, παρατηρείται σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων αύξηση μέχρι και 19.000 φορές σε σύγκριση με τον ανάγγειο όγκο.<sup>122</sup>

Ανάλογη εικόνα παρατηρείται επί μεταβατικού ρετινοβλαστώματος στο υαλώδες σώμα. Η δευτεροπαθής μεταστατική εστία είναι ανάγγειος αλλά βιώσιμη με περιορισμένη επέκταση.<sup>123</sup>

6. Όγκοι εμφυτευόμενοι στη χοριοαλλαντοειδή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας αυξάνονται κατά τη διάρκεια της ανάγγειας φάσεως περιορισμένα, ενώ κατόπιν, ταχέως όταν αυτοί αγγειώνονται.<sup>123</sup>
7. Μελέτες στο ήπαρ κονίκλου έχουν δείξει ότι μεταστάσεις μεγέθους μέχρι 1mm σε διάμετρο είναι γενικά ανάγγειες, ωστόσο παρά το μέγεθος τους είναι τροφοδοτούμενες.<sup>124</sup>
8. Σε Ca ωοθηκών ανθρώπου που μεθίσταται στο περιτόναιο, αρχικά τα εμφυτεύματα των κακοήθων κυττάρων είναι μικρά (<0.5mm) ομοιόμορφα και ανάγγεια. Οι εμφυτεύσεις αυτές (μεταστάσεις) του περιτοναίου αυξάνουν σε μέγεθος μόλις αρχίσει να αναπτύσσεται αγγειογένεση.<sup>124-126</sup>
9. Σε διαγονιδιακά ποντίκια η ανάπτυξη καρκίνου εκ βλαστικών κυττάρων και νησιδίων του παγκρέατος αναδεικνύεται αφότου ο όγκος γίνει αγγειοβρίθης.<sup>125</sup>
10. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε Ca παχέος εντέρου κονίκλου.<sup>126,127</sup>

## **ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ**

Η αγγειογένεση ρυθμίζεται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που δρούν διεγερτικά ή ανασταλτικά άμεσα ή έμμεσα και που προέρχονται από τα κύτταρα του ξενιστή (στρωματικά, φλεγμονώδη, ενδοθηλιακά κύτταρα) την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα καρκινικά κύτταρα.

Η εφαρμογή βιοχημικών και μοριακών μεθόδων αναστολής της αγγειογένεσης του όγκου άρχισε να γίνεται στόχος των ερευνητών περί το τέλος του 1980. Οι πειραματικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αποσκοπούσαν στη χορήγηση μορίων αναστολής της αγγειογενέσεως με ειδική ή επιλεκτική δράση στη δέσμευση αγγειογενετικών παραγόντων, που έχουν σαν πηγή προελεύσεως τα κακοήθη κύτταρα και την ανάπτυξη όγκων σε διαγονιδιακά ποντίκια.

Υπάρχουν περισσότερες από 60 αναφορές αναστολέων 33 διαφορετικών τύπων πρωτοπαθών όγκων και 23 διαφορετικών τύπων μεταστάσεων που αφορούσαν ανθρώπινους κακοήθεις όγκους αλλά και πειραματοζώων (αρουραίων, κονίκλων, hamster κτλ). Ένας εκ των πρώτων αναστολέων που εκτιμήθηκε ήταν ο TNP-470 ένα συνθετικό ανάλογο της

φουμαζιλλίνης που εκλεκτικά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων in vitro και in vivo.<sup>128</sup>

Η αναστολή της αύξησεως των όγκων διαπιστώθηκε σε ποσοστό 65% με διακύμανση 43-100% σε σταθερή δοσολογία χορήγησης TNP-470. Τα προκλινικά αποτελέσματα της αντινεοπλασματικής δραστηριότητας υπήρξαν λίαν ικανοποιητικά και σε μερικές περιπτώσεις περισσότερο αισιόδοξα από τα χρησιμοποιούμενα μέχρι σήμερα αντικαρκινικά φάρμακα. Ειδικότερα, αναφέρεται πλήρης ύφεση σε 7 τύπους όγκων ποντικών που αφορούσαν νευροινোসάρκωμα, νευροίνωμα, Ca μαστού, στομάχου, χολαγγειοκαρκίνωμα και δικτυοσάρκωμα.<sup>129</sup>

Η μεγάλη ποσοστιαία διακύμανση της αναστολής (43-100%) των όγκων των πειραματοζώων είναι περισσότερο πιθανόν να σχετίζεται με την διαφορετική παραγωγή αγγειογενετικών προϊόντων εξ αυτών, τα οποία με τη σειρά τους ανταγωνίζονται τη σταθερή, συγκεκριμένη δόση ανασταλτικών παραγόντων αγγειογενέσεως (πχ. TNP-470).

Σε πειραματική εργασία, αντισώματα από το νεοπλασματικό όγκο κατά του bFGF (basic fibroblast growth factor) χορηγήθηκαν σε ποντικούς με νεοπλάσμα, με αποτέλεσμα δραματική μείωση της νεοαγγειογένεσης και του νεοπλασματικού όγκου του πειραματοζώου.<sup>130</sup>

Η ερμηνεία του μηχανισμού παραγωγής αντισωμάτων εναντίον bFGF φαίνεται να σχετίζεται με μετάλλαξη ειδικών θέσεων στις οποίες δύο σερίνες αντικαθίστανται από κυστεΐνες. Έτσι το bFGF που απελευθερώνεται από τον όγκο μπορεί να εξουδετερώνεται από ένα ειδικό αντίσωμα που δεν έχει αποτελεσματικότητα σε φυσιολογικό bFGF.

Σε πειραματική μελέτη με ποντικούς που είχαν νεοπλασματικό όγκο, η εξουδετέρωση αντισωμάτων κατά του VEGF, που αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό αγγειογενετικό παράγοντα με άμεση δράση, συνοδεύτηκε από αναστολή της αγγειογένεσεως<sup>131,132</sup> και της αύξησης του όγκου σε ποσοστό περισσότερο του 90%.

Είναι γνωστό ότι η προσκόλληση των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος αποτελεί προϋπόθεση για την κινητοποίηση τους στα σημεία φλεγμονής, την ενεργοποίηση και την αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα όπως είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες.



Η προσκόλληση των κυττάρων εκτελείται από πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια τους. Υπάρχουν τέσσερις ομάδες μορίων προσκόλλησης, οι ιντεγκρίνες (integrins), οι σελεκτίνες (selectins) η οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και οι υδατάνθρακες.

Η επαγωγή της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης πραγματοποιείται μετά από ενεργοποίηση τους, κυρίως μέσω της δράσης κυτταροκινών. Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης, για παράδειγμα, που βρίσκονται στα T-λεμφοκύτταρα, επάγεται με την επίδραση της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) και ιντερλευκίνης-2 (IL-2) ενώ αντίστοιχα των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη δράση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF $\alpha$ ) και ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Επίσης η αναστολή της έκφρασης της ιντεγκρίνης ανβ3 στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών οδηγεί σε απόπτωση ήτοι στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, επάγοντας την υποτροπή των όγκων.<sup>133</sup> Η συνεργική δράση αυτών των κυτταροκινών έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία «χασμάτων» μεταξύ τους.

Στους ενδογενείς ειδικούς αναστολείς του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της αγγειογένεσης περιλαμβάνονται: η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη και η τουμστατίνη. Θεωρούνται παράγωγα πρωτοπαθών όγκων που αναστέλλουν την αύξηση της αγγειογένεσης και τη δημιουργία των απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η αγγειοστατίνη αποτελεί ένα εσωτερικό θραύσμα του πλασμινογόνου μεγέθους 38- με 45-Kda (παραγόμενο σε Lewis πνευμονικό καρκίνο)<sup>134</sup> που συγκρατεί τις μικροσκοπικές μεταστάσεις σε λήθαργο (κατάσταση γνωστή ως συνακόλουθη αντίσταση - concomitant resistance). Σε πειραματικά μοντέλα φάνηκε πως όταν χειρουργικά αφαιρεθεί ο πρωτογενής όγκος οι μεταστατικοί όγκοι αναπτύσσονται γρήγορα, αφού χάνεται η κατασταλτική επίδραση του παράγοντα μεταξύ άλλων. Ο Turnbull et al. και η Pachmann et al. μελέτησαν πειραματικά μοντέλα αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού αντίστοιχα, τη συμπεριφορά των μεταστάσεων μετά από χειρουργική εκτομή του βασικού όγκου, και έδειξαν ότι απελευθερώνονται άμεσα, επιθηλιακά κύτταρα κατά την επέμβαση, που επάγουν τη δραστηριότητα της νόσου. Μελετώντας τα κυκλοφορούντα επιθηλιακά κύτταρα φάνηκε πως σε λίγους ασθενείς ο αριθμός των κυττάρων περιορίστηκε μετά την επέμβαση.<sup>493-497</sup>

Η αναπαραγωγή της αγγειοστατίνης σε επίπεδο υποβλεννογόνιας στοιβάδας, σε καρκίνο πνεύμονα τύπου Lewis, απαιτεί την παρουσία μακροφάγων και είναι άμεσα σχετιζόμενη με

τη δραστηριότητα της μεταλλοελαστάσης. Οι μεταλλοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases MMPs) αποτελούν μια οικογένεια ουδέτερων ενδοπεπτιδασών, εξαρτώμενων από το ψευδάργυρο, που αναδομούν τη θεμέλιο ουσία και τις βασικές μεμβράνες, διαδικασίες που σχετίζονται με την αγγειογένεση.

Η ενδοστατίνη (20KDa), καρβοξυ-τελικό θραύσμα του κολλαγόνου XVIII,<sup>135</sup> έχει απομονωθεί από μυϊκά κύτταρα αιμαγγειοενδοθηλιώματος. Σε δοκιμές φάσης I δεν παρουσίασε τοξικότητα, προκάλεσε υποχώρηση του όγκου, παρατεταμένη σταθεροποίηση της νόσου και μείωση της έκφρασης των VEGF, bFGF (Basic fibroblast growth factor) και MVD (microvessel density) στον όγκο.<sup>136,137</sup>

Ένας ακόμα ενδογενής αναστολέας αγγειογένεσης είναι η τουμστατίνη. Είναι ένα 28 KDa εσωτερικό θραύσμα του κολλαγόνου IV,<sup>138-143</sup> με αντιαγγειογενετική δραστηριότητα *in vitro* και *in vivo*.<sup>143-147</sup> Η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα της τουμστατίνης φαίνεται να σχετίζεται με τη δέσμευση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ιδιαίτερα με τις ανβ3 και α6β1 ιντεγκρίνες.

Οι ενδογενείς ως άνω περιγραφόμενοι ειδικοί αναστολείς του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της αγγειογένεσης δεν αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των εν ηρεμία ευρισκόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων, των επιθηλιακών κυττάρων, των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών, των ινοβλαστών ή των κυττάρων του όγκου *in vitro*. Αναστέλλουν όπως έχει φανεί, την αγγειογένεση στη χοριοαλλαντοειδή μεμβράνη του κοτόπουλου (ορνιθίου) ή του κερατοειδούς του ποντικού.<sup>142</sup> Ιδιαίτερα τονίζεται ότι πρωτοπαθείς και μεταστατικοί όγκοι αναστέλλονται με τη χρήση των ενδογενών αναστολέων χωρίς να παρατηρείται τοξικότητα ή αντίσταση στα φάρμακα.<sup>142</sup> Παράλληλα η χρήση αντισώματος έναντι υποδοχέων του VEGF καλούμενων VEGF-Trap αναστέλλει την αύξηση που επάγεται από VEGF σε όγκους ποντικών.<sup>148</sup>

## ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Από το 1990 άρχισαν να δημοσιεύονται οι πρώτες μελέτες της σχέσης αγγειογένεσης των όγκων και γονιδίων, που στηρίχθηκαν:

**A)** στην εκτίμηση της επιμόλυνσης (transfection) ήτοι της μεταφοράς γενετικού υλικού (προαγγειογενετικής πρωτεΐνης) από το ένα ενδοθηλιακό κύτταρο στο άλλο.

- B)** στο μηχανισμό της επιμόλυνση γονιδίων, δηλαδή την εισαγωγή γενετικού υλικού με τη χρήση κατάλληλα μεταλλαγμένων ρετροϊών ως φορέων, ώστε με αυτό τον τρόπο να εξασφαλίζεται ικανοποιητική αναλογία ενσωμάτωσης του ξένου DNA στο κυτταρικό χρωμόσωμα.
- Γ)** στη ρύθμιση της έκφρασης των ογκογονιδίων αγγειογένεσης. Η μετατροπή της κωδικοποιημένης γενετικής πληροφορίας αρχικά σε μόρια RNA και τελικά σε κυτταρικές πρωτεΐνες αποτελεί τον τρόπο έκφρασης των γονιδίων. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται έτσι ώστε το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που περιέχουν τα γονίδια ενός κυττάρου (γονότυπος) να χρησιμοποιείται εκλεκτικά και να οδηγεί στη δημιουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνών, στο ποσό εκείνο που κάθε φορά χρειάζεται το κύτταρο για τη διατήρηση της μορφής και την επιτέλεση της λειτουργίας του (φαινότυπος).
- Δ)** χειρισμός της αναπτύξεως γονιδίων (παραδείγματα για την καλύτερη κατανόηση)  
Περισσότερες από μια μεταλλάξεις σε ομάδες γονιδίων συνήθως απαιτούνται ώστε ένα φυσιολογικό κύτταρο να μεταλλαχθεί σε καρκινικό. Μόνο οι μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια θα έχουν συμβολή στη διαίρεση του κυττάρου, την απόπτωση, τη διόρθωση του DNA και τελικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Διαφορετικά γονίδια έχει φανεί να συνδέονται με αντίστοιχους μηχανισμούς επαγωγής ή αναστολής της ογκογενέσεως.
- 1) σε ποντικούς με όγκο εγκεφάλου και ανοσολογική ανεπάρκεια αναστέλλεται ή υπολείπεται σημαντικά η αγγειογένεση του όγκου όταν ένας ανασταλτικός για την αγγειογένεση επικρατών μεταλλαγμένος τύπος του υποδοχέα FLK-1 (Fetal liver kinase - 1) εισάγεται μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (με φορέα ρετροϊό). Ο μηχανισμός σηματοδότησης του μεταλλαγμένου υποδοχέα οδηγεί στο σχηματισμό ενός ανενεργού διμερούς με αναλλοίωτο FLK-1 υποδοχέα στα ενδοθηλιακά κύτταρα εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων σαν απάντηση στον VEGF που απελευθερώνεται από τον όγκο.<sup>149</sup>
  - 2) μετασχηματισθέντα κύτταρα δεν είναι ογκογενετικά μέχρι να γίνουν αγγειογενετικά με μειωμένη έκφραση της θρομβοσπονδίνης – πορεία που είναι εξαρτώμενη από το p53.<sup>150</sup>
  - 3) επιμόλυνση (transfection) του φυσιολογικού ανθρώπινου κυττάρου με SV40 (Simian virus) και με μεγάλα T ογκογονίδια, οδηγεί στην in vitro καλλιέργεια

κυττάρων που δεν αποπίπτουν. Η επιμόλυνση ποντικών με ιούς που επάγουν την έκφραση VEGF οδηγεί στο σχηματισμό μικροσκοπικού μεγέθους μη αγγειογενετικού όγκου που δεν αυξάνει σε διάμετρο περισσότερο από 1mm κατά προσέγγιση.<sup>151</sup> Μια επακόλουθη επιμόλυνση με ογκογονίδιο *ras* διαχωρίζει τα κύτταρα σε αγγειογενετικό φαινότυπο, αυξάνοντας τον VEGF και μειώνοντας την παραγωγή ιστικών αναστολέων μεταλλοπρωτεΐναισών. Αυτό οδηγεί σε υψηλού βαθμού νεοαγγειογένεση και ταχεία αύξηση του όγκου.

- 4) Όταν οι όγκοι επιμολύνθηκαν με τις αντιαγγειογενετικές πρωτεΐνες θρομβοσπονδίνη TSP-1 και TSP-2 παρατηρήθηκε αύξηση του όγκου ανάλογη της καταστολής της αγγειογένεσης. Η αναστολή του όγκου άγγιξε ακόμα και το 100% όταν η αγγειογένεση είχε κατασταλλεί πλήρως.

#### **ΠΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΦΑΣΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ**

Κατά την περίοδο αυτή η αγγειογενετική δραστηριότητα απουσιάζει ή είναι εμφανώς ανεπαρκής και ο όγκος του νεοπλάσματος είναι μικρός, της τάξεως μερικών κυβικών χιλιοστών. Παράλληλα η εξελικτική πορεία αυτού είναι βραδεία. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα του όγκου πολλαπλασιάζονται βραδέως και αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με πειραματικές μελέτες που αναφέρουν ότι στην προαγγειακή φάση ο χρόνος διπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων είναι υψηλότερος απ' ό,τι σε ένα αγγειοβρίθη όγκο. Η διαφορά είναι ότι τα κύτταρα του όγκου στην προαγγειακή κατάσταση διατηρούν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης εξαιτίας της ισορροπίας μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.<sup>159</sup> Στην πλειονότητα τους, οι όγκοι στο προαγγειακό στάδιο φαίνεται να είναι κλινικά μη ανιχνεύσιμοι και γίνονται αντιληπτοί μόνο μικροσκοπικά. Παραδείγματα τέτοιων νεοπλασμάτων είναι τα καρκινώματα *in situ*, όπως του μαστού, του προστάτου, της κύστεως, του τραχήλου μήτρας κ.α.<sup>160, 161-163</sup>

Στις πειραματικές καταστάσεις που η αγγειογένεση είναι απύσχα, το μέγεθος των νεοπλασματικών όγκων σε πειραματόζωα είναι μικρό κατά προσέγγιση 0.2-2mm διάμετρο και σε νεοπλασματικό πληθυσμό της τάξεως  $10^5$ - $10^6$  κύτταρα.<sup>120,164</sup> Η διαφορά μεγέθους προαγγειακής και αγγειογενετικής φάσης όγκων στα πειραματόζωα, υποδηλώνει ίσως την ικανότητα επιβίωσης των νεοπλασματικών κυττάρων αυτών υπό συνθήκες υποξίας.<sup>165, 166</sup>

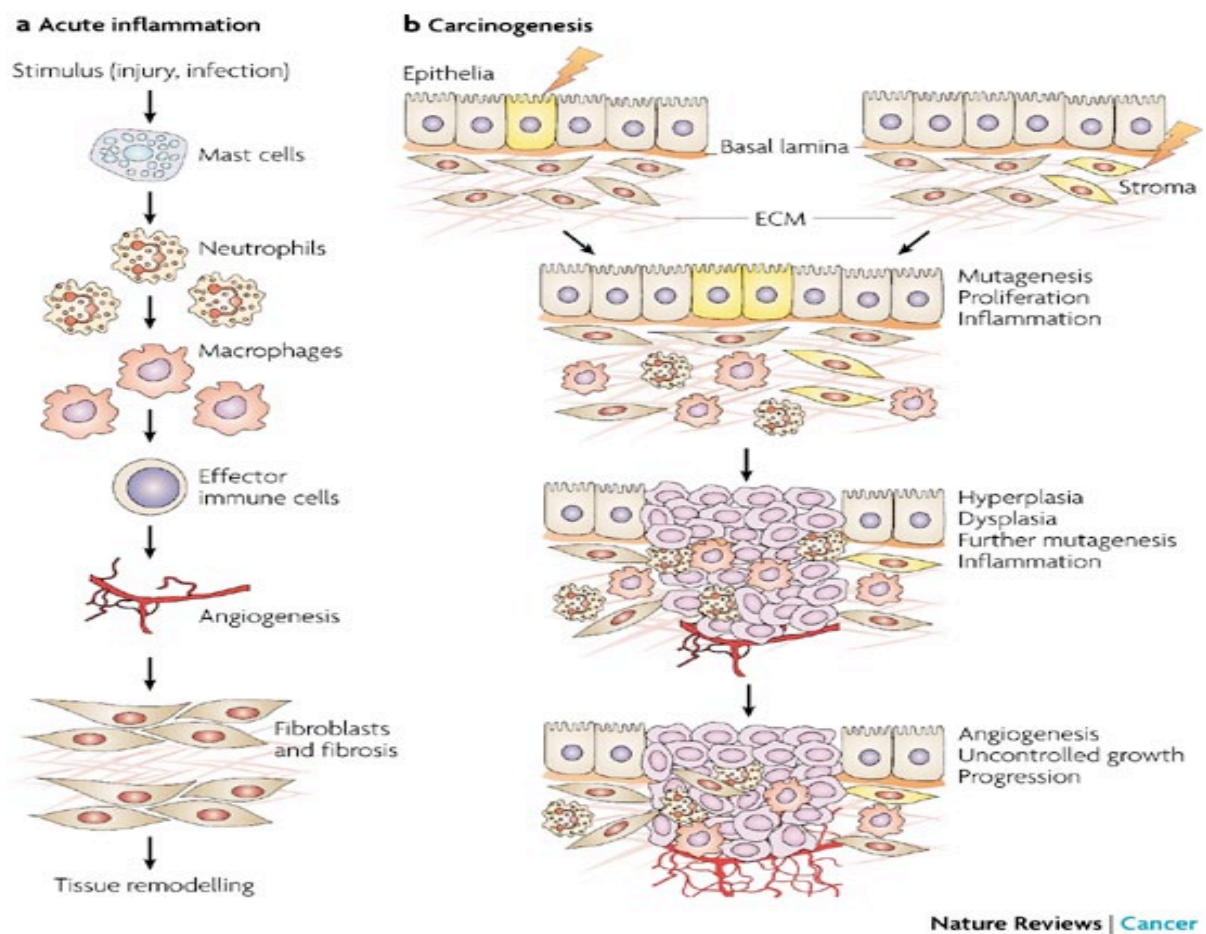
Σε πειραματικές μελέτες, έγιναν εμφυτεύσεις νεοπλασματικών κυττάρων, στο δέρμα πειραματόζωου (ποντικού), με τη προσθήκη μητρικών αγγειογενετικών κύτταρων. Τα μητρικά αγγειογενετικά κύτταρα αυξήθηκαν σε μέγεθος εντός 4 ημέρων, ακολούθησε διαίρεση και πολλαπλασιασμός τους σε 6 ημέρες, ενώ σε 8 ημέρες φαίνεται πως ολοκληρώθηκε η δημιουργία νέων αγγειακών σχηματισμών με εμφανή την ύπαρξη αιματικής ροής. Η παρεμπόδιση της αγγειογένεσης με έγχυση του υποδοχέα VEGFR2 (ή αλλιώς υποδοχέας τυροσινικής κινάσης FLK-1) στο χώρο εμφύτευσης των κυττάρων στο πειραματόζωο, οδηγεί σε απόπτωση και μερικά κύτταρα μεταπίπτουν σε λανθάνουσα κατάσταση εντός 5 ημερών. Ο υποδοχέας VEGFR2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων εμποδίζοντας τη δράση του VEGF που απελευθερώνεται από τον όγκο. Η αναστολή υποδηλώνει τη λειτουργία 2-3 παρακρινικών ανταλλαγών των αυξητικών παραγόντων και των παραγόντων επιβίωσης μεταξύ νεοπλασματικών κυττάρων και των νεογεννηθέντων αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Με βάση το πρότυπο αυτό έχουμε α) έκκριση αγγειογενετικών πρωτεϊνών από τα νεοπλασματικά κύτταρα, β) ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων, γ) τα ενεργοποιηθέντα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να μορφοποιούνται σε νέες αγγειακές εκβλαστήσεις προς τον όγκο, δ) τα ίδια κύτταρα παράγουν μιτογόνους και αντιαποπτωτικούς παράγοντες,<sup>167</sup> ε) αποθήκευση στον εξωκυττάριο χώρο basic fibroblast growth factor (bFGF) και heparin binding endothelial growth factor (HB-EGF), στ) κινητοποίηση του VEGF για διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων και έκκριση πρωτεασών,<sup>164</sup> ζ) ενεργοποίηση πιθανώς του VEGF από νεοπλασματικά κύτταρα για αύξηση της διαπερατότητας των τοπικών μικρών αγγείων έτσι που η μικροαποκία του όγκου να λαμβάνει θρεπτικές ουσίες ακόμη και πριν την ολοκλήρωση της αγγειογένεσης. Η διάχυση των θρεπτικών ουσιών και του O<sub>2</sub> μέσα στον όγκο διευκολύνεται με τη δράση της αγγειοποιητίνης-2 που ευνοεί την τροποποίηση του περικυττάρου χώρου.<sup>168</sup>

## **ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΥΡΟΔΟΤΗΣΗΣ**

Είναι γνωστό πως τα φυσιολογικά κύτταρα που εξελίσσονται σε άτυπο υπερπλασία, *in situ* τοπική κακοήθεια και εν συνεχεία διηθήση και εξέλιξη σε πρωτοπαθή όγκο και ίσως μετάσταση, αρχικά δεν έχουν αγγειογενετική υποδομή. Με την πάροδο του χρόνου τόσο σε πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπινους όγκους διαπιστώθηκε η απουσία νεοαγγείωσης για μήνες ή και ακόμα για χρόνια κατά την ανίχνευση των

μικροσκοπικών όγκων.<sup>170, 171</sup> Τα κλασικά παραδείγματα είναι ο καρκίνος του μαστού που διαπιστώνεται νεοαγγείωση με την πάροδο του χρόνου και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας που στο προνεοπλασματικό στάδιο της δυσπλασίας αρχίζει η νεοαγγειογένεση χωρίς να έχει αναπτυχθεί ο κακοήθης ιστός.<sup>172</sup>

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τέσσερεις μηχανισμοί αγγειογενέσεως η διαμόρφωση των οποίων διέπεται από αλληλουχία γεγονότων που αφορούν τόσο τα πειραματόζωα (ποντίκια) όσο και τον άνθρωπο. (Εικόνα 2)



**Εικόνα 2:** Αγγειογενετική πυροδότηση

## Η ΩΦΕΛΕΙΑ ΠΡΟΜΗΘΕΙΑΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΝΕΟΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΠΡΟΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ

Το 95% των ανθρώπινων καρκίνων φαίνεται να αρχίζουν σαν μια μικροσκοπική βλάβη *in situ*, σε μια ανάγγειο επιθηλιακή στιβάδα πχ. επιδερμίδας ή υποβλεννογονίου ιστού. Η ανάγγειος αυτή επιθηλιακή στιβάδα διαχωρίζεται από την εξωτερική βασική μεμβράνη του αγγείου, που είναι ένας φυσικός φραγμός στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με τη διάσπαση της βασικής μεμβράνης των νέων αγγειακών εκβλαστήσεων, τα νεοπλασματικά κύτταρα συγκεντρώνονται και διατάσσονται γύρω από το κάθε νέο τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο.<sup>173</sup>

Με βάση πολλές πειραματικές και κλινικές μελέτες η παραγωγή ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών μπορεί να επιστρατευθεί στο αγγειακό δίκτυο των όγκων και να μετέχει στην αύξηση τους.<sup>135,170,171,174-184</sup> Ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και σε κάποια επιθηλιακά και καρκινικά κύτταρα.<sup>185</sup> Ιδιαίτερα ο VEGFR-1 εκφράζεται στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα (CD34 στον άνθρωπο, κύτταρα Lineage+ και το ογκογονίδιο c-KIT στα ποντίκια) και ο VEGFR-2 στα CD34AC133 προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τελευταίως, έχουν χρησιμοποιηθεί ζωικά μοντέλα πνευμονικών μεταστάσεων για να αποδειχθεί ο σημαντικός ρόλος των προγονικών μορφών των ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs, endothelial progenitor cells) στην έναρξη της νεοπλασματικής αγγειογένεσης, και συγχρόνως η εκλεκτική, στοχευμένη αναστολή της υπό τη μορφή μιας νέας θεραπευτικής αγωγής.

Οι κακοήθεις όγκοι μπορεί να φτάσουν σε μέγεθος 1-2mm<sup>3</sup> χωρίς οι μεταβολικές απαιτήσεις να περιορίσουν την ανάπτυξη (avascular phase). Η περαιτέρω εξέλιξη επιβάλει τη δημιουργία αγγειακού δικτύου και ανάπτυξης νέων αγγείων που να επιτρέπει τη συνεχή τροφοδοσία τους (vascular phase). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από μια ποικιλία προ- και αντι- αγγειογόνων παραγόντων. Η συνηθέστερη μορφή αγγειογένεσης είναι ο σχηματισμός νέων αγγείων από ήδη υπάρχοντα (sprouting angiogenesis). Τελευταία αρχίζουν να γίνονται κατανοητοί νέοι μηχανισμοί αγγειογένεσης των κακοήθων όγκων. Πρίν από μια δεκαετία ανακαλύφθηκαν οι CD34 υποπληθυσμοί μονοπύρηνων αιμοποιητικών κυττάρων που έχουν τη δυνατότητα να αποκτήσουν φαινότυπο ενδοθηλιακών κυττάρων και ονομάστηκαν EPCs. Η κινητοποίηση και συσσώρευση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial

progenitor cells (EPCs) επάγεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς αυτών και από κυτταροκίνες και μεταγραφικούς παράγοντες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών όπως η καρκινογένεση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κινητική δραστηριότητα των EPCs μπορεί να σχετίζεται με το κλινικό αποτέλεσμα των ασθενών με συμπαγείς όγκους που υποβάλλονται σε αντιαγγειογενετική θεραπεία. Η άμεση συμμετοχή των EPCs σε μηχανισμούς αγγειογένεσης εμφανίζει ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων συμπαγών όγκων. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε επιλεκτικούς μηχανισμούς αγγειογένεσης ανάλογα με το υποκείμενο αγγειακό δίκτυο του οργάνου στόχου είτε σε μεθοδολογικά προβλήματα ταυτοποίησης και αξιολόγησης των EPCs.

Στην κλινική πράξη έχει παρατηρηθεί πως η εξέλιξη της αγγειογένεσης διαμορφώνεται σε μεγάλα συνήθως και απροσδιόριστα χρονικά διαστήματα. Η θεραπευτική στόχευση των EPCs σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς ή άλλους παράγοντες φαίνεται να αποτελεί τη νέα μορφή αντιαγγειογενετικών θεραπευτικών στρατηγικών. Οι ισομορφές του VEGFR-1 ή FLT1 (fms-like tyrosine kinase 1 και ο VEGFR-2 ή FLK2(Fetal liver kinase-2) εμπλέκονται σε μια ποικιλία μηχανισμών σηματοδότησης όγκων και σχετίζονται με την κινητοποίηση αρχέγονων αιμοποιητικών προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων στη κυκλοφορία τα οποία σε δεύτερο χρόνο στρατολογούνται επιλεκτικά στην αγγειακή στιβάδα τοιχώματος των όγκων.<sup>135</sup>

Στην αναγκαία κινητοποίηση για την έναρξη του πολλαπλασιασμού στο μυελό των οστών, μετέχει η μεταλλο-πρωτεΐνωση 9 που οδηγεί στην απελευθέρωση του διαλύτη kit-ligant που συμβάλει στη διαμόρφωση της παθητικής φάσεως ηρεμίας σε φάση πολλαπλασιασμού. Η πηγή προελεύσεως των «δυναμικών ενδοθηλιακών κυττάρων» του τοιχώματος των όγκων για την εξελικτική παραγωγή νέων αγγείων, φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με το είδος της νεοπλασίας. Για παράδειγμα η επιστράτευση ενδοθηλιακών κυττάρων στο λέμφωμα, γίνεται κατά 90% από τα παραγόμενα στο μυελό των οστών εν αντιθέσει με τον καρκίνο του μαστού ή τον καρκίνο του προστάτη που η πλειονότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων προέρχεται από τοπικό αγγειακό δίκτυο και σε πολύ μικρό ποσοστό εκ του μυελού. Οι συσχετισμοί των ποσοστιαίων αναλογιών ενδοθηλιακών κυττάρων που λαμβάνουν μέρος στη νεοαγγειογένεση των όγκων εκ του μυελού και του τοπικού αγγειακού δικτύου είναι επί του παρόντος απροσδιόριστοι. Η γνώση για κάθε μορφή όγκου του περίπλοκου αυτού φαινομένου θα βοηθούσε ίσως στη θεραπευτική αγωγή και ιδιαίτερα: 1) στην αποτελεσματικότητα των



κυτταροστατικών φαρμάκων κατά βιολογικών στόχων, αν είναι γνωστός ο στόχος τους και ιδιαίτερα αν επικεντρώνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού ή της τοπικής εκβλάστησης, 2) στη προφύλαξη του όγκου από πληθώρα προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής θεραπείας, 3) στην εκτίμηση του μυελού όσον αφορά την απελευθέρωση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια χορήγησης αναστολέων αγγειογενέσεως.

Οι μέχρι τώρα παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι η αγγειοστατίνη στοχεύει τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, η ενδοστατίνη επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πειραματόζωα (ποντίκια) και η θαλιδομίδη έχει βρεθεί να μειώνει τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα μέχρι και 10 φορές περισσότερο στο πολλαπλούν μυέλωμα.<sup>187-189</sup>

Είναι σαφές πως ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο υποπληθυσμών των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων ήτοι των προερχόμενων εκ του μυελού των οστών και των προερχόμενων από την αγγειακή στιβάδα του τοιχώματος των αγγείων των όγκων, ίσως βοηθήσει στην καλύτερη αντιαγγειογενετική θεραπεία και συνολική φαρμακευτική θεραπεία.

Ο ρόλος του VEGF είναι εμφανής με βάση τα αναφερόμενα περί αγγειογενετικού σήματος «στρατολόγησης» των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον όγκο. Παράλληλα ο VEGF είναι γνωστό ότι αποθηκεύεται και απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια κατά τη δημιουργία μετατραυματικού θρόμβου του αίματος.<sup>315</sup> Ο Pineto και οι συνεργάτες του, αναφέρουν τη σημαντική προγνωστική αξία των αιμοπεταλίων και ιδιαίτερα όταν ο αριθμός τους είναι αρκετά αυξημένος έχουν αποδείξει ότι η πρόγνωση του πάσχοντος από καρκίνο είναι λίαν δυσμενής.<sup>190,191</sup> Ο συσχετισμός VEGF και αιμοπεταλίων είναι εμφανές ότι έχει ισχυρή θέση στους μηχανισμούς αυξήσεως των όγκων και αγγειογενέσεως.

## **ΜΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**

Παράλληλα με τη στρατολόγηση αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ο όγκος έχει την ικανότητα να προσελκύει μαστοκύτταρα, μακροφάγα και φλεγμονώδη κύτταρα.<sup>192,193</sup> Τα κύτταρα αυτά μπορεί να διευρύνουν τη νεοπλασματική αγγειογένεση επάγοντας την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων όπως είναι ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγων (bFGF) η έκφραση του οποίου διεγείρεται από την οξέωση του εξωκυτταρίου υγρού και ειδικά από τους παράγοντες HIF-1 και HIF-2 (Hypoxia inducible factor-1,2)<sup>110</sup> και ο αυξητικός παράγων των αιμοπεταλίων (platelet derived endothelial cell growth factor PD-

ECGF). Παράλληλα η απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases-MMP) μπορεί να κινητοποιεί τον VEGF και άλλες αγγειογενετικές πρωτεΐνες.<sup>164,194,192,195</sup>

Συμπερασματικά, τα καρκινικά κύτταρα είναι δυνατόν να αποτελέσουν το έναυσμα της υπερέκφρασης αγγειογενετικών πρωτεϊνών για την περαιτέρω εξέλιξη της αγγειογένεσης.

## **ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΒΡΙΘΕΙΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ**

Η αγγειοβρίθεια των πρωτοπαθών όγκων στον άνθρωπο έχει δείξει ότι ένα *in situ* καρκίνωμα χωρίς αγγειακό δίκτυο αρχίζει να αποκτά νεοαγγείωση προοδευτικά, δημιουργώντας ένα μεικτό πληθυσμό από σημαντική ποσοστιαία αναλογία μη αγγειογενετικών και από μικρότερη αγγειογενετικών κυττάρων. Η εκτίμηση της εξέλιξως αυτής έχει γίνει με πειραματικές μελέτες όπου τα μη αγγειογενετικά κύτταρα ανθρώπινου όγκου αφού απομονωθούν χειρουργικά, εμφυτεύονται σε ανοσοκατασταλμένα πειραματόζωα (severe combined immunodeficient mice-SCID) υποδορίως και σε μέγεθος της τάξεως του  $1\text{mm}^3$ . Στη συνέχεια παρακολουθείται η εξέλιξη.

Η παρακολούθηση δείχνει ότι αυτά τα μη αγγειογενετικά αδρανή νεοπλασματικά κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσουν αγγεία. Η έναρξη αγγειογένεσεως είναι συναρτήσεως του τύπου του πρωτοπαθή όγκου. Επί παραδείγματι, κύτταρα οστεοσαρκώματος μπορεί να παραμένουν αδρανή για περισσότερο από 3 χρόνια, μεταφερόμενα κάθε 8 μήνες σε νέο ποντίκι ξενιστή. Η λανθάνουσα αυτή χρονική περίοδος φαίνεται να αποτελεί το όριο για κάθε τύπο νεοπλάσματος μέχρι να δημιουργηθούν οι κατάλληλες προϋποθέσεις εξασφαλίσεως ενός πληθυσμού κυττάρων για την έναρξη βλάστησης νέων αγγείων. Η εμφάνιση νεοαγγείωσης ακολουθείται από την έναρξη μεταστάσεων που είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης δυνατοτήτων που επιτρέπουν την είσοδο των νεοπλασματικών κυττάρων μέσα στα δημιουργημένα νέα τριχοειδή αγγεία. Είναι πιθανό τα κύτταρα που μεθίστανται και εισέρχονται στα αγγεία να μην είναι αγγειογενετικά και να παραμένουν αδρανή για μακρύ χρονικό διάστημα, έως την απόκτηση νέο-αγγειογενετικού εν δυνάμει εξελισσόμενου δικτύου.

Η μετατροπή μη αγγειογενετικών τύπων νεοπλασματικών πληθυσμών σε αγγειογενετικούς στην περίπτωση παρουσίας *ras* ογκογονιδίου έχει αποδειχθεί ότι επάγει σημαντικά την αύξηση της παραγωγής του VEGF και μειώνει την παραγωγή της θρομβοσπονδίνης-1.<sup>159</sup>

### **ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (Εικόνα 3)**

Είναι γνωστό ότι η μετάσταση είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας σειράς διαδικασιών στις οποίες περιλαμβάνονται:

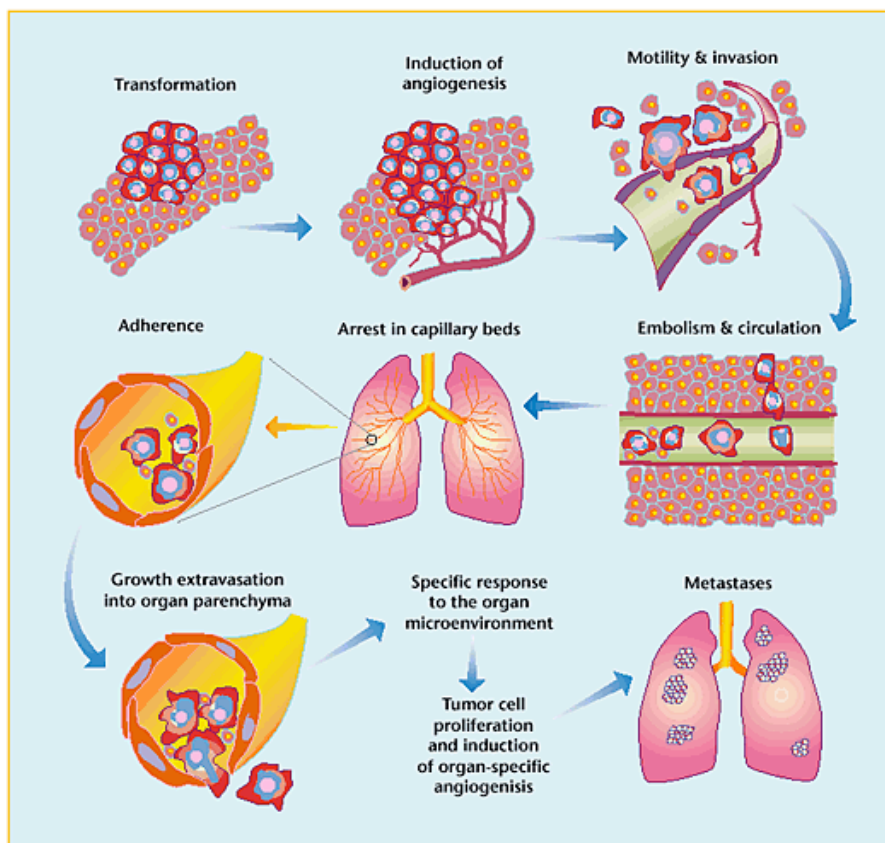
- i. Είσοδος στα φλεβικά και λεμφικά αγγεία καρκινικών κυττάρων.
- ii. Κυκλοφορία αυτών μεμονωμένα ή και σε ομάδες.
- iii. «Παγίδευση» των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία του οργάνου στόχου με προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων αυτών
- iv. Διήθηση της βασικής μεμβράνης και
- v. Έξοδος και δημιουργία της δευτεροπαθούς εστίας.

Είναι σαφές βάσει εργαστηριακών και κλινικών μελετών πως η πορεία μιας μεταστάσης εξαρτάται άμεσα από την αγγειογένεση. Η αγγειογένεση επομένως είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της πρωτοπαθούς εστίας και κατά δεύτερο λόγο της μεταστατικής εστίας, ώστε το μετακινούμενο νεοπλασματικό κύτταρο να εδραιωθεί, να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί στο όργανο στόχο όπου και επάγονται οι αγγειογενετικοί μηχανισμοί σε συνάρτηση με τις ενδογενείς ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, των παραγόντων του ξενιστή, και των ανασταλτικών ιστικών και ανοσολογικών παραγόντων.<sup>136, 152, 153</sup>

Ο αριθμός των κυττάρων που αποσπάται από τον πρωτοπαθή όγκο και εισέρχεται στην κυκλοφορία είναι συνάρτηση της ανάπτυξης της αγγειώσεως του όγκου, της αγγείωσης του οργάνου στόχου και της νεοαγγείωσης που θα αναπτυχθεί στη μεταστατική περιοχή. Η τοπική ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων στηρίζεται στη δράση αγγειογενετικών παραγόντων όπως είναι ο bFGF και ο VEGF που επάγουν την παραγωγή του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου tPA (tissue-type plasminogen activator) και των κολλαγενασών που οδηγούν στη λύση της βασικής μεμβράνης του αγγείου.<sup>154-156</sup> Παράλληλα οι αγγειογενετικοί παράγοντες διεγείρουν το αγγειακό ενδοθήλιο για τον πολλαπλασιασμό και τη χημειοτακτική κίνηση των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου. Προοδευτικά διαμορφώνονται τρεις μορφολογικές ζώνες παραγωγής νέου αγγείου:

- 1) η ζώνη διεισδύσεως που αποτελείται από μεταναστεύοντα και μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που βρίσκονται υπό τη χημειοτακτική επίδραση των αγγειογόνων παραγόντων,
- 2) η «ενδιάμεση» ζώνη που αποτελείται από εντόνως πολλαπλασιαζόμενα αλλά μη ωριμάζοντα κύτταρα και
- 3) η ζώνη από ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφύονται από τον κορμό των γονικών κυττάρων. Η κυλινδρική διάταξη και σηραγγοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων θα οδηγήσει στο σχηματισμό του αυλού του νεόπλαστου αγγείου. Μεταστατικές εστίες στερούμενες αγγειογενετικής δραστηριότητας για ποικίλους λόγους μπορεί να παραμείνουν ως μικροσκοπικοί όγκοι διαμέτρου 100-200μm.<sup>120, 157, 158</sup>

Η διαπίστωση αυτή διαμορφώνει την άποψη ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν ολοκληρώνουν τον κύκλο πολλαπλασιασμού τους, παραμένουν στη G0 φάση και είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν σε 5 και πλέον χρόνια μετά την αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου πχ. μαστού. Πειραματικές ενδείξεις οδηγούν παράλληλα στη σκέψη ότι οι μικρομεταστάσεις μπορεί να έχουν διατηρηθεί με δέσμευση των μηχανισμών αγγειογένεσης που οδηγεί σε εξισορρόπηση του πολλαπλασιασμού και απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων.<sup>120,157</sup> Η σχετική αποτελεσματικότητα ενός δεδομένου αγγειογενετικού παράγοντα μπορεί να είναι διαφορετική στις μεταστατικές εστίες και να τροποποιείται ανάλογα με την παρουσία η μή του πρωτοπαθούς όγκου.<sup>138</sup>



**Εικόνα 3.:** Δημιουργία απομακρυσμένης μετάστασης

### ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΥΡΟΔΟΤΗΣΗΣ

Οι πρώτες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση ανακαλύφθηκαν το 1980. Η παραγωγή από το νεοπλασματικό ιστό παραγόντων που υποκινούν την έναρξη αγγειογένεσης στηρίχθηκε σε πειραματικές μελέτες το 1970, όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα που εμφυτεύθηκαν σε ανάγγειο κερατοειδή χιτώνα ή στη χοριοαλλαντοειδή μεμβράνη όρνιθος ευνοούσαν τη διάχυτη τοπική αγγειογένεση.<sup>169,195,196,197</sup>

Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυρίως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγων (bFGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγων (VEGF) ή παράγων αγγειακής διαπερατότητας (Vascular Permeability Factor).

### **Ινοβλαστικός αυξητικός παράγων (bFGF)**

Ο bFGF είναι η πρώτη πρωτεΐνη που απομονώθηκε το 1982. Περιλαμβάνεται στους περισσότερο δραστήριους αγγειογενετικούς παράγοντες in vivo. Υψηλά επίπεδα έχουν ειδικά βρεθεί σε καρκίνο νεφρού, και σχετίζονται με δυσμενή έκβαση, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) πασχόντων από όγκους κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), στα ούρα παιδιών που πάσχουν από όγκο Wilm's, και στον ορό και τα ούρα πασχόντων από πολλές μορφές συμπαγών όγκων οι τιμές των οποίων ποικίλλουν ανάλογα με το στάδιο και το βαθμό της κακοήθειας.<sup>198,199,200</sup> Παράγεται από διαφορετικές μορφές νεοπλασματικών κυττάρων στις οποίες περιλαμβάνονται κύτταρα ΚΝΣ, σαρκώματος και γεννητικού συστήματος. Έχει υψηλή συγγένεια με την ηπαρίνη και αποθηκεύεται στον εξωκυττάριο χώρο.<sup>201</sup> Πιθανώς η απελευθέρωση και κυρίως η πέψη πρωτεϊνών ή ηπαρινασών επάγει την παραγωγή bFGF.<sup>205, 201-205</sup>

Μερικοί όγκοι προσελκύουν μακροφάγα,<sup>195,205</sup> ενώ άλλοι όγκοι προσελκύουν μαστοκύτταρα τα οποία αν είναι υψηλής περιεκτικότητας σε ηπαρίνη μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση bFGF. Ο παράγων bFGF δεν είναι ειδικό ενδοθηλιακό μιτογόνο αλλά έχει βρεθεί να στοχεύει κύτταρα όπως είναι οι ινοβλάστες, κύτταρα λείων μυικών ινών και νευρώνων. Υπάρχει επιστημονικό αίνιγμα για το πως πειραματικοί όγκοι στους οποίους γίνεται διαμόλυνση με bFGF αναπτύσσουν σύστημα διεγέρσεως ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>130,207</sup>

Ο bFGF ανταγωνίζεται την προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων στο ενδοθήλιο γεγονός που οδηγεί στη σκέψη για πιθανή τοπική ανοσολογική ανοχή η οποία μπορεί να παραχθεί από πλειάδα μηχανισμών που διαμορφώνονται εκ των όγκων.

### **Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγων ή παράγων αγγεικής διαπερατότητας (VEGF)**

Αρχικά ο Dronak διατύπωσε την υποθετική άποψη ότι η αγγειογένεση συνδυάζεται με αυξημένη μικροαγγειακή διαπερατότητα. Στη συνέχεια το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην αναζήτηση παραγόντων που συνδυάζονται με αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.<sup>208,209</sup>

Αργότερα ο Ferrara έδειξε ότι υπάρχει ένας παράγων που επάγει την αγγειογένεση και ονομάστηκε VEGF.<sup>208</sup> Έκτοτε έχουν αναφερθεί περισσότεροι από 15 αντίστοιχοι παράγοντες (πίνακας σελ. 167).

Ο VEGF είναι ο ισχυρότερος και εκλεκτικότερος αγγειογενετικός παράγοντας.

- 1) Αυξάνει τον αριθμό των αγγείων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης που θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη του εμβρυϊκού αγγειακού συστήματος,
- 2) μετέχει στην αγγειογένεση στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα,<sup>220-223</sup>
- 3) αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων διευκολύνοντας τη μετάσταση των όγκων,
- 4) προκαλεί ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων που αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλιο ουσία,
- 5) αναστέλλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων,
- 6) ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>224,225</sup>

Ο VEGF είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη 40 με 45 kDa που παράγεται από καρκινικά κύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν τον όγκο. Η ποσότητα του στον ορό ασθενών με καρκίνο, εκτός από τα καρκινικά και φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου πιθανόν προέρχεται και από κύτταρα του περιφερικού αίματος, κυρίως αιμοπετάλια. Ενδεχομένως τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που διεγείρουν τη σύνθεση του VEGF από τα αιμοπετάλια ή αυξάνουν την πρόσληψη ελεύθερου (μη δεσμευμένου) VEGF από αυτά.<sup>93-95, 108, 204</sup>

Η οικογένεια του γονιδίου του VEGF περιλαμβάνει τον VEGF-A και τις πέντε ισομορφές του (μεγέθους 121, 145, 165, 189 και 206 αμινοξέων αντίστοιχα) τον VEGF-B, τον VEGF-C, τον VEGF-D, τον VEGF-E και τον αυξητικό παράγοντα του πλάκουντα (PIGF).<sup>105,106</sup> Οι δύο πρώτες ισομορφές A και B εκκρίνονται ενώ οι C και D εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας και παραμένουν προσκολλημένες στα κύτταρα. Ειδικά ο VEGF-C πέραν των αγγειογενετικών του ιδιοτήτων ενδεχομένως σχετίζεται και με το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς έχει βρεθεί να επάγει τη χημειοταξία στο μελάνωμα.<sup>107</sup> Οι ισομορφές VEGF-A121 και VEGF-A165 θεωρούνται οι σημαντικότεροι μεσολαβητές της αγγειογένεσης του όγκου. Ο υποδοχέας του VEGF (VEGF-R) ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης που μεταβιβάζει σήματα από αυξητικούς παράγοντες. Είναι μεμβρανική πρωτεΐνη, η ενεργοποίηση της οποίας ξεκινά ενζυμικό

καταρράκτη φωσφορυλιώσεων κατάλοιπων τυροσίνης σε συγκεκριμένες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (φωσφολίπαση C, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιεί την RAS GTPάση κ.α.). Ο VEGFR εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και σε κάποια επιθηλιακά και καρκινικά κύτταρα.<sup>185</sup> Υπάρχουν τρεις ισομορφές του VEGFR: 1) ο VEGFR1 ή Fms-like tyrosine kinase (Flt-1), 180 kDa που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια με τον VEGF-A αλλά παρουσιάζει μικρή δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης, 2) ο VEGFR2 ή KDR (Kinase domain region) ή Flk (Fetal liver kinase 1), 200kDa ανθρώπινη κινάση που σχετίζεται περισσότερο με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη χημειοταξία, 3) ο VEGFR3 ή Flt-4 (Fms-like tyrosine kinase-4) ο οποίος εκφράζεται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων και σχετίζεται με τη λεμφαγγειογένεση. Η Flt4 τυροσινική κινάση έχει βρεθεί σε δύο ισομορφές.<sup>216-218</sup>

### Neuropilin-1

Η Neuropilin-1 είναι μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο NRP-1. Αποτελεί συνυποδοχέα της τυροσινικής κινάσης για τη σύνδεση με τον VEGF. Εκφράζεται σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα και νεοπλασματικά κύτταρα. Η δέσμευση του VEGF στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων ευνοεί το χημειοτακτισμό τους. Επίσης δεσμεύει τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα PlGF-2 (Placenta growth factor-2). Σημαντική για τη δέσμευση του VEGF-C και του PlGF-2 με τη neuropilin-1 είναι η ηπαρίνη.<sup>219,220</sup> Τόσο η έκφραση του VEGF όσο και των υποδοχέων VEGFR διεγείρεται από την υποξία και συχνά αυξάνεται η πυκνότητά τους σε νεκρωμένες περιοχές παρακείμενες του όγκου.<sup>221</sup> Η υποξία προκαλεί το σχηματισμό του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα-1 (Hypoxia inducible factor 1- HIF1) και HIF2 που διεγείρουν μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στη VEGF mRNA μεταγραφή προσδεδεμένοι σε συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης του DNA.<sup>109,110,111,185</sup> Παρόμοια δράση έχει η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) η έκφραση της οποίας επίσης επάγεται από την υποξία. Επιπλέον, η οξέωση του εξωκυττάρου χώρου, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, η δράση των ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων φαίνονται να διεγείρουν άμεσα ή έμμεσα την έκφραση του VEGF. Έχει βρεθεί π.χ. πως μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο K-ras σχετίζονται με υψηλή έκφραση VEGF.<sup>113</sup> Είναι σημαντική επίσης η άποψη που υποστηρίζεται όσον αφορά την έκφραση του VEGF ότι: α) η έκφραση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα αποδίδεται σε παρακρινική δραστηριότητα



των καρκινικών κυττάρων ήτοι σε παραγωγή του από αυτά, β) αντίθετα τα ενδοθηλιακά κύτταρα απαντούν στην αγγειογενετική έκφραση των VEGF υποδοχέων.

Προοδευτικά γίνεται περισσότερο εμφανές ότι ποσότητες του VEGF επαρκείς στο να οδηγήσουν σε νεοπλασματική αγγειογένεση προέρχονται από πολλές κυτταρικές σειρές στις οποίες περιλαμβάνονται τα αιμοπετάλια και τα μυϊκά κύτταρα.<sup>115</sup> Συμπερασματικά η αύξηση της έκφρασης του VEGF είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικών επιγενών παραγόντων στον όγκο όπως είναι η υποξία, το χαμηλό PH, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (πχ. IL-6), αυξητικοί παράγοντες (bFGF), ορμόνες (ανδρογόνα και οιστρογόνα ) και χυμοκίνες παραγόμενες από πχ. στρωματικά κύτταρα όγκων γαστρεντερικού συστήματος και αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα.<sup>109</sup> Είναι πιθανό να υπάρχουν ρυθμιστικοί παράγοντες της αγγειογένεσης εξαρτώμενοι από τον VEGF. Ο αυξητικός παράγων μετασχηματισμού TGF-b (Transforming growth factor - b) μπορεί να είναι εξαρτώμενος του VEGF, του mRNA αυτού και πρωτεϊνών που επάγονται από τους ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα υπό τον TGF-b.<sup>222</sup> Η έκφραση του VEGF αναστέλλεται με την πρωτεΐνη Von Hippel Lindau (VHL). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο VHL απενεργοποιείται σε πάσχοντες από το σύνδρομο VHL όπως και σε κάποια καρκινώματα νεφρού.<sup>223-225</sup> Το γονίδιο αυτό μειώνει μια σειρά εξαρτώμενων γονιδίων εκ της υποξίας συμπεριλαμβανομένου του VEGF, του PDGF-B και του μεταφορέα γλυκόζης γονιδίου GLUT1.<sup>225,226</sup> Εξάλειψη της μετάλλαξης του VHL συνοδεύεται από υπερέκφραση των γονιδίων αυτών υπό φυσιολογικές συνθήκες.(Εικόνα 2) Η δέσμευση του VEGF στον υποδοχέα VEGF-R οδηγεί σε ένα καταρράκτη διαφορετικών μηχανισμών σηματολόγησης οδών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την προαγωγή αγγειογένεσης. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (MMPs) εμφανίζουν πιθανώς αγγειογενετική δράση. Οι MMPs είναι ουδέτερες ενδοπεπτιδάσες εξαρτώμενες από ψευδάργυρο που αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τις βασικές μεμβράνες, διαδικασίες σχετιζόμενες με την αγγειογένεση. Αυξημένη δραστηριότητα των MMPs συνδυάζεται με αυξημένη διηθητικότητα και μετακίνηση των κακόηθων κυττάρων. Ιστικοί αναστολείς των MMP είναι οι TIMP1 (Tissue Inhibitors by Metalloproteinases) και TIMP2 που θεωρούνται ενδογενείς αντιαγγειογενετικοί παράγοντες. Η έκφραση των ιστικών αναστολέων αυξάνει αναλογικά με τα υψηλά επίπεδα MMP.<sup>100,101,106,107,116</sup>

## ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ

Δρούν παράλληλα με τον VEGF για την ωρίμανση και εδραίωση νέων τριχοειδών. Η αγγειοποιητίνη1 (ang1) είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη μεγέθους 70kDa που επάγει τα ενδοθηλιακά κύτταρα στη στρατολόγηση περικυττάρων και κυττάρων λείων μυικών ινών πρό της ενσωμάτωσης τους στο αγγειακό τοίχωμα. Η ενεργοποίηση της επάγει τον παράγοντα τυροσινικής κινάσης Tie-2 δραστηριοποιώντας περικύτταρα και κύτταρα λείων μυικών ινών τα οποία μεσολαβούν στην ενδοθηλιακή παραγωγή PDGF-BB και πιθανώς και άλλων παραγόντων.<sup>227</sup> Η αγγειοποιητίνη2 (ang2) δρά παράλληλα με τον VEGF προκαλώντας στην αγγειογένεση. Φαίνεται πως η σημαντικότερη δράση της εντοπίζεται στην ισορροπία της αγγειακής αύξησης ή υποχώρησης.<sup>228-230</sup>

## COX-2

Η κυκλοοξυγενάση (Cyclooxygenase-COX) μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη (PGH<sub>2</sub>), πρόδρομο των προστανοειδών της σειράς-2. Το ένζυμο περιέχει δύο ενεργά συστατικά: μια αίμη με δράση υπεροξειδάσης υπεύθυνη για τη μείωση της PGG<sub>2</sub> σε PGH<sub>2</sub> και μια περιοχή κυκλοοξυγενάσης όπου το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε υδρόξυ-ενδοϋπεροξειδίο προσταγλανδίνης G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>).<sup>501</sup> Η πρώτη απόδειξη της σχέσης μεταξύ του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) και ανθρωπίνων καρκίνων αναφέρθηκε το 1994, όταν τα επίπεδα του mRNA του COX-2 βρέθηκαν αυξημένα σε καρκίνους παχέος εντέρου.<sup>502</sup> Κατόπιν ακολούθησαν διάφορες μελέτες που επιβεβαίωσαν και επέκτειναν τη γνώση στο θέμα αυτό.<sup>503</sup>

Η COX-2 επηρεάζει την αγγειογένεση μέσω αύξησης της παραγωγής αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο VEGF.<sup>504</sup> Ο ρόλος της COX-2 στην αγγειογένεση διευκρινίστηκε περαιτέρω από τους Chang et al., οι οποίοι χρησιμοποίησαν μοντέλα με διαγονιδιακά ποντίκια MMTV-COX-2 (mouse mammary tumor virus-COX2) για να μελετήσουν τη σχέση της αύξησης της αγγειογένεσης με την επέκταση καρκίνου του μαστού. Χαρακτηριστικά, αναφέρουν ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα αυξήθηκε ακόμα και σε πολύ πρώιμα στάδια της καρκινικής ανάπτυξης.<sup>505</sup>

Η COX-2 και το ενζυματικό της παράγωγο PGE<sub>2</sub> μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη του όγκου μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως: α) επαγωγή της αγγειογένεσης, β) αναστολή της

απόπτωσης, γ) αυξημένη διηθητικότητα και γ) ρύθμιση της φλεγμονής και των ανοολογικών απαντήσεων.

### **Επιδερμοειδής αυξητικός παράγων (EGF)**

Ο επιδερμοειδής αυξητικός παράγων (epidermal growth factor - EGF) έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του EGFR. Ο ανθρώπινος παράγων EGF είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 6045-Da που αποτελείται από 53 κατάλοιπα αμινοξέων και τρεις ενδοκυττάριους δισουλφιδικούς δεσμούς.<sup>506</sup>

Η ανακάλυψη του EGF έγινε από τον Stanley Cohen στο Πανεπιστήμιο του Vanderbilt, για την οποία βραβεύτηκε με το Βραβείο Nobel της Ιατρικής Φυσιολογίας το 1986. Αρχικά μάλιστα χρησιμοποιήθηκε από δερματολόγους στον τομέα της κοσμητικής. Brown Gregory.<sup>507</sup> Ο EGF δρά μετά από σύνδεση υψηλής συγγένειας με τον EGFR στην κυτταρική επιφάνεια και ενεργοποιεί τη δραστηριότητα του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης που με τη σειρά του επάγει μηχανισμό μετάδοσης σημάτων που ως αποτέλεσμα έχει πληθώρα ενδοκυττάριων βιοχημικών αλλαγών όπως αυξημένη γλυκόλυση, πρωτεϊνική σύνδεση και αύξηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων υπεύθυνων για τον EGFR. Αυτομάτως τούτο οδηγεί σε ενεργοποίηση της σύνθεσης του DNA και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.<sup>508</sup>

Η μη φυσιολογική λειτουργία του EGFR έχει περιγραφεί να σχετίζεται με επιθηλιακούς όγκους. Αντίστοιχα η ενεργοποίηση του EGFR φαίνεται ως υπεύθυνη για την αύξηση του VEGF εξαρτώμενου εκ του Ha-ras γονιδίου, όπως και για τη μείωση της αγγειοποιητίνης-1.<sup>509</sup>

## **ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ**

### **ΕΜΜΕΣΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ**

Οι έμμεσοι αγγειογενετικοί αναστολείς μειώνουν ή δεσμεύουν τη γονιδιακή έκφραση (gene expression) ήτοι τη μετατροπή της κωδικοποιημένης στα γονίδια του κυττάρου γενετικής πληροφορίας αρχικά σε μόρια RNA και τελικά σε κυτταρικές πρωτεΐνες. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται από το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που περιέχουν τα γονίδια

ενός κυττάρου (γονότυπος) και χρησιμοποιείται εκλεκτικά εκείνη που οδηγεί στη δημιουργία των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και στο ποσό εκείνο που είναι απαραίτητο για να διατηρήσει το κύτταρο τη μορφή του και να επιτελέσει τη λειτουργία του (φαινότυπος). Η μείωση της γονιδιακής έκφρασης των νεοπλασματικών κυττάρων δια των έμμεσων αγγειογενετικών αναστολέων αφορά πρωτεϊνικής φύσεως προϊόντα με ρόλο τη δέσμευση των υποδοχέων αυτών που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι Rak και Kerbel έχουν περιγράψει περίπου 15 διαφορετικά ογκογονίδια που επιδρούν στην αγγειογένεση του όγκου.<sup>116,231-233</sup> Πρόσφατα έχει αναγνωρισθεί η προ-αγγειογενετική δραστηριότητα πολλών ογκογονιδίων που εκφράζεται με αυξημένη ρυθμιστική δραστηριότητα αγγειογενετικών πρωτεϊνών των καρκινικών κυττάρων ή με μείωση των αναστολέων της αγγειογένεσης.<sup>231,234</sup> Πειραματικές μελέτες με γονιδιακή διαμόλυνση ογκογονιδίων έχουν δείξει αύξηση της παραγωγής προαγγειογενετικών πρωτεϊνών και μείωση της έκφρασης των αναστολέων της αγγειογένεσης.<sup>151,159,233</sup>

Κλασικό παράδειγμα είναι η γονιδιακή διαμόλυνση ήτοι η μεταφορά του bcl-2 ογκογονιδίου σε προστατικά καρκινικά κύτταρα που αποκτούν την ικανότητα αναπτύξεως μεγάλων νεοαγγειούμενων όγκων, ενώ αυξάνει η έκφραση του VEGF και η πυκνότητα των μικρών αγγείων σημαντικά.<sup>234</sup> Εξάλλου επαναδραστηριοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως της p53 μπορεί να αναστέλλει την αγγειογένεση.<sup>235-237</sup>

## **ΑΜΕΣΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ**

Οι άμεσοι αναστολείς δεσμεύουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση των κακόηθων κυττάρων σαν μια απάντηση στις προαγγειογενετικές πρωτεΐνες στις οποίες περιλαμβάνονται οι VEGF, bFGF, IL-8, PDGF, PD-ECGF και άλλες. Παράλληλα στοχεύουν στη σταθεροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και λιγότερο στην αποσταθεροποίηση των κακόηθων κυττάρων.<sup>238</sup> Στους άμεσους αγγειογενετικούς αναστολείς περιλαμβάνονται συνθετικοί αναστολείς, πεπτίδια, φάρμακα και ενδογενείς πρωτεΐνες που δρουν σε διάφορα στάδια της αγγειογενετικής πορείας όπως είναι:

1. Συνθετικοί αναστολείς και πεπτίδια όπως είναι οι ανταγωνιστές της ιντεγκρίνης  $\alpha_v\beta_3$  ή αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών.

2. Χαμηλού μοριακού βάρους φαρμακευτικές ουσίες όπως η θαλιδομίδη, στεροειδή όπως η τετραϋδροκορτιζόλη, η 2-μεθόξυ-οιστραδιόλη, η σκοπολαμίνη, το TNF470 κ.α.
3. Ενδογενείς φυσικές πρωτεΐνες που προφυλάσσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την επίδραση πληθώρας αγγειογενετικών ενεργοποιητών αναστέλλοντας την ανταπόκριση τους στα ερεθίσματα αυτών. Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται η ιντερφερόνη-α, η ιντερλευκίνη-12, ο παράγων 4 των αιμοπεταλίων, η θρομβοσπονδίνη-1, η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη, η κονστατίνη, η τουμστατίνη, ο επιθηλιακός χρωματικός παράγων και η αντιαγγειογενετική αντιθρομβίνη III.<sup>128,133,138,140,159-161,185</sup>

### ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ (Πίνακας 5)

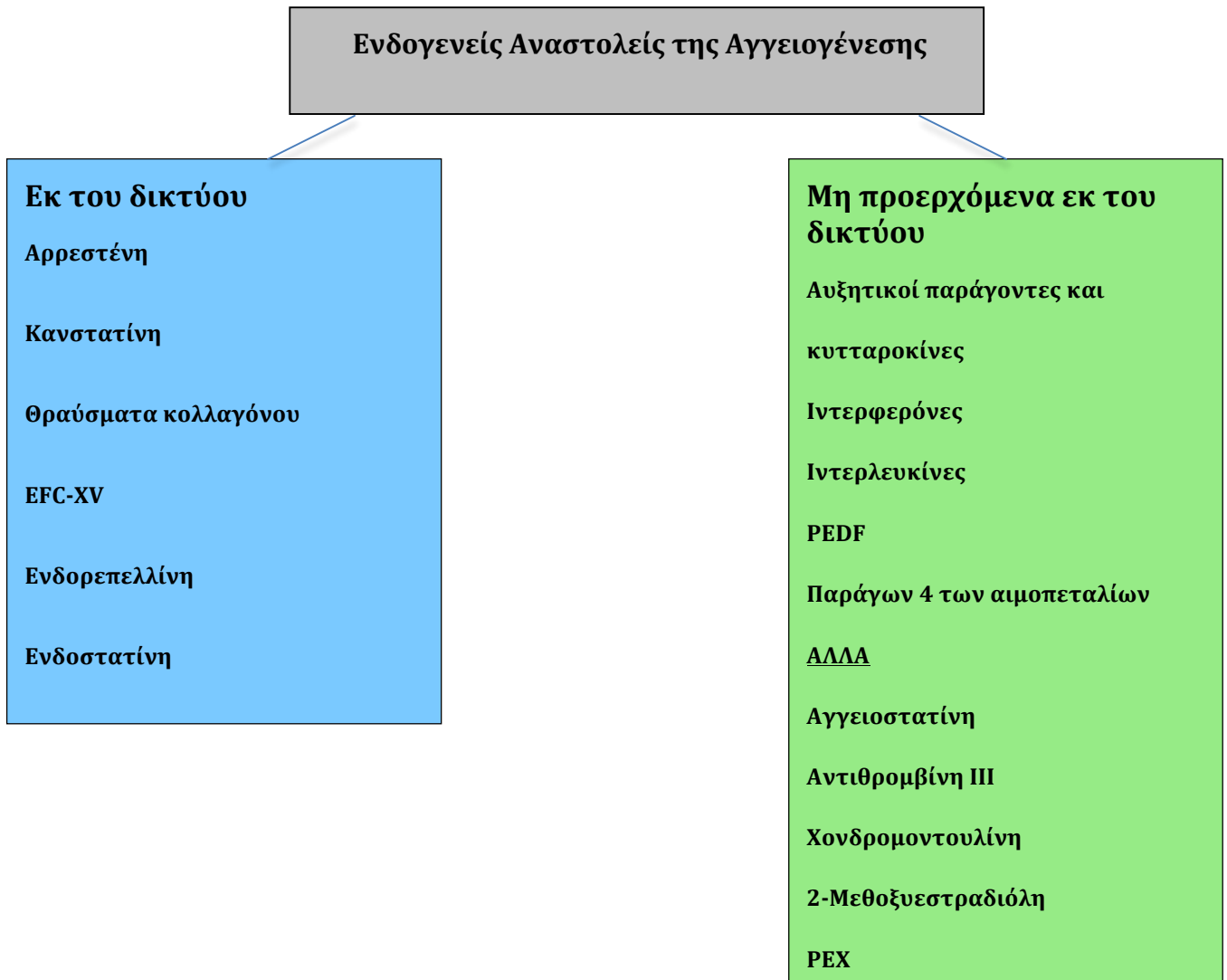
Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται: Η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη, η τουμστατίνη, η κανστατίνη, η αρρεστένη και η αντιθρομβίνη III. (Πίνακας 5)<sup>360,484</sup> Ο λεπτομερής εμπλουτισμός της γνώσεως σχετικά με τις πιο πάνω ουσίες έχει βοηθήσει στην αντίληψη των τρόπων αυτοτελούς ρύθμισης της αύξησης του πρωτοπαθούς όγκου και της μεταστατικής εστίας, και παράλληλα στη διευκρίνιση του ρόλου μιας μεγάλης ομάδας πρωτεϊνικής φύσεως ουσιών η δραστηριότητα των οποίων εντοπίζεται στην αναστολή της ανάπτυξης του ενδοθηλίου και στον περιορισμό της αγγειογένεσης.

Η αντινεοπλασματική δράση της αγγειοστατίνης και ενδοστατίνης μελετάται σε μελέτες φάσης II.<sup>242</sup> Οι υπόλοιπες θα μελετηθούν στο μέλλον.

Ιστορικά η πρώτη ένδειξη υπάρξεως ενδογενών αναστολέων της αγγειογένεσης έγινε γνωστή όταν διεπιστώθη αναστολή μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων με την ιντερφερόνη α/β και την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον παράγοντα 4 των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια αποδείχθη η αναστολή της αγγειογένεσης και με τις δύο κατηγορίες ουσιών ήτοι της ιντερφερόνης και του παράγοντα 4 των αιμοπεταλίων.<sup>243-246</sup>

Οι Rastinejad και οι συνεργάτες του υπήρξαν οι πρώτοι που έδειξαν την παραγωγή αγγειογενετικού αναστολέα από όγκο. Η υπόθεση ήταν πως ο αγγειογενετικός φαινότυπος ήταν αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ ενδογενών αναστολέων και διεγερτών αγγειογένεσης.<sup>247</sup> Σε πειραματική μελέτη με μαστικά κύτταρα διαπιστώθηκε ότι η απώλεια της δράσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγούσε στην έκκριση μεγάλων ποσοτήτων ανασταλτικού αγγειογενετικού παράγοντα του τύπου της θρομβοσπονδίνης 1

(Thrombospondin-1, TSP-1). Σημαντικότερο ρόλο φάνηκε να έχει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53.<sup>248</sup> Η απώλεια της λειτουργικότητας του p53 στα μετασχηματισθέντα παράγωγα αυτών των κυττάρων έδειξε δραματική μείωση των επιπέδων του αγγειογενετικού αναστολέα. Το p53 επηρεάζει την TSP-1 και αυξάνει την αντιαγγειογενετική δραστηριότητα στα κύτταρα των όγκων. Έλλειψη TSP-1 οδηγεί στην επιτάχυνση της αύξησης των νεοπλασματικών κυττάρων καρκίνου μαστού σε διαγονιδιακά ποντίκια.<sup>260</sup>



## ΑΓΓΕΙΟΣΤΑΤΙΝΗ

Αποτελεί ένα 38kDa εσωτερικό θραύσμα του πλασμινογόνου που απομονώθηκε από τον ορό και τα ούρα πειραματόζωου.<sup>134</sup> Καταστέλλει την αύξηση των μικροσκοπικών μεταστάσεων διατηρώντας αυτές σε ληθαργική κατάσταση ευνοώντας την αναστολή της αγγειογένεσής τους, γνωστή και σαν «συνακόλουθη αντίσταση» (concomitant resistance).

Οι μεταστατικές εστίες δεν εμφανίζουν αγγειογένεση, αναπτύσσονται ελάχιστα (περίπου 200μm σε διάμετρο) και συνήθως μορφοποιούνται διαμορφώνοντας μικροκυτταρικού τύπου σχηματισμό γύρω από ένα μικρό αγγείο. Τα κύτταρα των αδρανών αυτών μεταστατικών εστιών εμφανίζουν σε ποσοστά 38% πολλαπλασιασμό και 7-8% απόπτωση.<sup>250</sup>

Η παρουσία του αγγειογενετικού ανασταλτικού παράγοντα πειραματικά αποδεικνύεται: 1) με την πλήρη αναστολή του διεγέρτη bFGF της αγγειογένεσης στον κερατοειδή ποντικού, 2) την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων του τριχοειδούς in vitro σε ορό πειραματοζώου με όγκο, 3) την αναστολή της αγγειογένεσης στη χοριοαλλαντοειδή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου συγκρινόμενη με ορό πειραματοζώου (ποντικού) χωρίς όγκο. Σημειούται παράλληλα με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων του τριχοειδούς σε ποσοστά περισσότερο από 70%, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου και οι ινοβλάστες των λείων μυϊκών ινών παραμένουν ανεπηρέαστα. Η παραγωγή αγγειοστατίνης έχει αναφερθεί και σε άλλους τύπους όγκων όπως πχ. του προστάτη.<sup>251,252,253</sup>

## **ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΑΓΓΕΙΟΣΤΑΤΙΝΗΣ**

### **1. Φυσιολογικές Λειτουργίες της Αγγειοστατίνης**

Τα στοιχεία που αφορούν τη φυσιολογική λειτουργία της αγγειοστατίνης δεν είναι ακόμα επαρκή. Υπάρχουν πολλές παρατηρήσεις κατά τις οποίες φαίνεται ότι η ενδογενής παραγωγή ενδοστατίνης στον οφθαλμό υποβοηθεί πιθανώς την ανάπτυξη της αγγείωσης του αμφιβληστροειδή. Παράλληλα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οφθαλμού, αγγεία εκ του κολλοειδούς αναπτύσσονται και κατανέμονται στον υαλώδη χιτώνα και το φακό. Ακολούθως αυτά τα αγγεία παλινδρομούν, σχηματίζοντας ένα στρώμα στον υαλώδη χιτώνα και το φακό. Όταν η ενδοστατίνη απουσιάζει φαίνεται ότι δε γίνεται αυτή η παλινδρόμηση των αγγείων. Η ανεπάρκεια παλινδρόμησης των αγγείων που αναφέρεται στο σπάνιο σύνδρομο Knoblock εκ του υαλώδους στον αμφιβληστροειδή, οδηγεί σε αδυναμία αναπτύξεως αγγειακού δικτύου με αποτέλεσμα οι πάσχοντες να εμφανίζουν ελάττωση οπτικής οξύτητας ή εικόνα τύφλωσης.<sup>276,277</sup> Ανάλογη αδυναμία αγγειακής ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί σε πειραματόζωα επί ελλείψεως κολλαγόνου XVIII.<sup>278</sup> Ένας υποθετικός μηχανισμός της αμφιβληστροειδικής εκφύλισης σχετίζεται με την πιθανή καταστολή της αιματώσεως από την επιμένουσα αύξηση προσφοράς οξυγόνου στον αμφιβληστροειδή που οδηγεί σε άρση της υποξίας, επαγωγή των HIF-1a και VEGF, που τελικά οδηγούν σε φυσιολογική αύξηση των αγγείων. Η έλλειψη

ενδοστατίνης σε παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο και στα πειραματόζωα φαίνεται να οδηγεί σε αναστολή της αγγειογένεσης.

## **2. Πρωτεϊνικής φύσεως υποδοχείς δεσμεύσεως της αγγειοστατίνης**

Η αγγειοστατίνη φαίνεται ότι τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα αναστολής της αγγειογένεσης. Αναφέρεται ότι η αγγειοστατίνη μπορεί να μετέχει σε σειρά διαδικασιών αναστολής της αγγειογένεσης δεσμευόμενη σε πολλαπλούς υποδοχείς.<sup>279</sup> Οι μέχρι σήμερα περιγραφέντες πρωτεϊνικής φύσεως υποδοχείς της αγγειοστατίνης είναι: 1) Η ATP-συνθετάση στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, 2) η  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη που σχετίζεται με την αγγειογένεση και 3) η αγγειομοτίνη (angiomin) η οποία ανήκει σε μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών.<sup>280,281-283</sup>

Παράλληλα η αγγειοστατίνη αναστέλει το μηχανισμό σηματοδότησης του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (hepatocyte growth factor - hGF) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις λείες μυικές ίνες. Ο αποκλεισμός του hGF επάγει το μηχανισμό σηματοδότησης των C-met, Akt και ERK 1/2.<sup>284</sup> Η αγγειοστατίνη επάγει επίσης την ενδοκυττάρια οξέωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα με απώλεια της ικανότητας προσκολλησεως, όταν αυτά επωάζονται σε συνθήκες που προσομοιάζουν με το χαμηλό pH ενός όγκου.<sup>285</sup> Τέλος, μειώνει την έκφραση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα παρόλο ότι δε βρέθηκε να γίνεται παρακώλυση γεγονότων που σηματοδοτούνται από τον VEGF ή bFGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

## **3. Διαμόλυνση αγγειοστατίνης**

Η διαμόλυνση (transfection) με αγγειοστατίνη μυϊκών κυττάρων ινοσαρκώματος έδειξε: 1) επιβράδυνση και αύξηση του όγκου ανάλογα με τα επίπεδα της αγγειοστατίνης, 2) μείωση της αγγειογενετικής παραγωγής σε όγκους των οποίων κύτταρα είχαν διαμολυνθεί με αγγειοστατίνη. Η επιβράδυνση της επέκτασης και της αύξησης της μάζας του όγκου, υπήρξε ανάλογη της ολικής αγγειογενετικής παραγωγής του, αντιστρόφως ανάλογη της παραγωγής αγγειοστατίνης, ενώ η κυτταρική απόπτωση του όγκου βρέθηκε εξαρτώμενη από τον κυτταρικό πληθυσμό αυτού.



Ανάλογα αποτελέσματα έχουμε σε γονιδιακή διαμόλυνση (ήτοι μεταφορά γονιδίου σε κύτταρα όγκου) με διαφορετικό αναστολέα σε αυτήν τη περίπτωση τη θρομβοσπονδίνη. Η διαμόλυνση κυττάρων όγκου με αναστολείς αγγειογένεσης του τύπου θρομβοσπονδίνης 1 και 2 έδειξε σταθερή συχνότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αφού πρώτα μειώθηκε η αγγειογένεση και κατεστάλη η αύξηση του όγκου.<sup>254</sup> Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν ότι η διαμόλυνση με αγγειοστατίνη κυττάρων όγκου (πχ. σάρκωμα Kaposi) οδηγεί σε παρατεταμένη δράση της αγγειοστατίνης, επιβράδυνση της αυξήσεως του όγκου και μείωση της αγγειοβρίθειας αυτού.<sup>257</sup>

#### **4. Γονιδιακή θεραπεία με αγγειοστατίνη**

Η διαμόλυνση με αγγειοστατίνη οφθαλμών σκύλου, σαν μοντέλο θεραπείας μελανώματος του ραγοειδούς χιτώνα, καθώς και ποικιλίας όγκων και μεταστάσεων τους, όπως καθώς και σε πειραματόζωα πάσχοντα από Ca μαστού, νεφρού, σαρκώματος Kaposi, λευχαιμιών και γλοιώματος ΚΝΣ, έχει εφαρμοστεί ευρέως μέχρι σήμερα με σχετικά αισιόδοξα αποτελέσματα.<sup>255,256,257-261</sup>

Ανάλογο ενδιαφέρον έχουν τα ευρήματα μείωσης της αγγείωσης και αύξησης των όγκων, και της παράτασης της επιβίωσης πειραματοζώων με διαφορετικά μοντέλα νεοπλασματικής ασκιτικής συλλογής και σε πειραματόζωα πάσχοντα από μη νεοπλασματικά νοσήματα όπως η αρθρίτιδα, η ενδομητρίωση κ.α.<sup>262,263-266</sup>

Η θεραπεία με αγγειοστατίνη μόνη ή σε συνδυασμό με ενδοστατίνη ή IL-12 σε πειραματόζωα, έχει δείξει σημαντικά αποτελέσματα για διάφορους τύπους όγκων όπως του μαστού και του οφθαλμού.<sup>267,268-272</sup> Μελέτες πειραματοζώων που παράγουν αυξητικό παράγοντα Granulocyte Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) έχουν δείξει ότι τα επίπεδα αγγειοστατίνης στον ορό τους αυξάνονται σε σχέση με τους μάρτυρες.<sup>273</sup> Τα επίπεδα της αγγειοστατίνης συνδυάζονται άμεσα με την παραγωγή μεταλλοελαστάσης από τα μακροφάγα, η οποία φαίνεται να μεσολαβεί στη διάσπαση του πλασμινογόνου.

#### **5. Ακτινοθεραπεία και αγγειοστατίνη**

Η χορήγηση ακτινοθεραπείας σε πειραματικό (Lewis) πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα ποντικού, επάγει την υποτροπή του πρωτοπαθούς όγκου παράλληλα με τη μείωση έως και

εξαφάνιση της αγγειοστατίνης του αίματος, με ταχεία αύξηση των πνευμονικών και άλλων μεταστάσεων.<sup>274</sup> Η χορήγηση αγγειοστατίνης στις περιπτώσεις αυτές έχει βρεθεί πως παρεμποδίζει την αύξηση των πνευμονικών μεταστάσεων. Η ερμηνεία της εξελίξεως αυτής δεν είναι γνωστή. Πιθανώς σχετίζεται με την παραγωγή από τον όγκο του ανασταλτικού παράγοντα αγγειογενέσεως πριν την ακτινοθεραπεία. Μετά την ακτινοθεραπεία και την καταστροφή του όγκου έχουμε εξαφάνιση της αγγειοστατίνης με αποτέλεσμα την αύξηση των μεταστάσεων. Είναι γνωστό με βάση την αρχική αναφορά ότι η αγγειοστατίνη αποτελεί ένα 38kDa εσωτερικό θραύσμα του πλασμινογόνου. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την παραγωγή ενός νέου θραύσματος πλασμινογόνου των 22kDa που παράγεται από την ενζυματική δραστηριότητα των κυττάρων των όγκων με ισχυρότερη αναστολή του όγκου<sup>138,275</sup> Οι μελέτες σήμερα έχουν επικεντρωθεί σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων όπως το αγγειοενδοθηλιώμα ποντικού και ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα στον άνθρωπο, σε κλινικές μελέτες φάσης I/II με συνδυασμό ενδοστατίνης και αγγειογενετικής αντιθρομβίνης (ααΑΤ).<sup>140-142</sup>

## ΕΝΔΟΣΤΑΤΙΝΗ

Αποτελεί καρβόξυ- τελικό θραύσμα 20kDa του εσωτερικού τμήματος του κολλαγόνου XVIII.<sup>140,142,286,287</sup> Είναι η πρώτη από μια μεγάλη ομάδα ενδογενών αγγειογενετικών αναστολέων, που απομονώθηκε και ακολούθως προσδιορίστηκε ακριβώς, από μυϊκά κύτταρα αιμαγγειοενδοθηλιώματος.<sup>389-392</sup> Η χρησιμοποίηση υψηλής ευκρίνειας ραδιογραφικής απεικόνισης βοήθησε στον προσδιορισμό ανθρώπινης ενδοστατίνης ποντικών.<sup>288,289</sup> Η παραγωγή από το νεοπλασματικό όγκο τουλάχιστον δύο ενζύμων, ελαστίνης και μιας καθιμίνης, θεωρούνται απαραίτητες για την απόσχιση της ενδοστατίνης από την ελικοειδή C-τελική NCI περιοχή του κολλαγόνου XVIII.<sup>290,291</sup>

## ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΔΟΣΤΑΤΙΝΗΣ

### 1. Φυσιολογικές λειτουργίες ενδοστατίνης

Η απελευθέρωση της ενδοστατίνης σε τριμερή μορφή αρχικά μετατρέπεται αργότερα–σε μονομερή. Θεωρείται ειδικός αναστολέας του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων με δράση ανάλογη της αγγειοστατίνης. Ανευρίσκεται κυρίως στη βασική μεμβράνη στο αγγειακό τοίχωμα της αορτής που είναι πλούσιο σε ελαστικές ίνες και λιγότερο στα τοιχώματα των φλεβών.<sup>292,293</sup> Η ενδοστατίνη αυτοπεριορίζεται στις ελαστικές ίνες ενώ έχει αναφερθεί δέσμευση αυτής από γλυκοπρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης όπως οι fibulin-1 και -2, nitrogen -1 και -2, taminin-1 και perlecan.<sup>393-397</sup> Υπό φυσιολογικές καταστάσεις η ενδοστατίνη υπάρχει κυρίως σαν ένα τμήμα μιας αδιάλυτης πρωτεΐνης του κολλαγόνου XVIII. Αυτό σημαίνει ότι ένα πολύ μικρό κλάσμα ενδοστατίνης κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή του επιπέδου, των 30ng/ml περίπου. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 20 ισομορφές κολλαγόνου στα θηλαστικά είδη, ήτοι του κολλαγόνου IV, XV και XVIII, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αγγειογενέσεως.<sup>294</sup> Παράλληλα ομόλογα αυτών των τριών μορφών κολλαγόνου έχουν ταυτοποιηθεί στον σκώληκα *C.elegans*. Η περιοχή ενδοστατίνης στον τύπο XVIII κολλαγόνου έχει ενδιαφέρον διότι φάνηκε να ρυθμίζει τη μετανάστευση νευρικών κυττάρων επί αγγειακών ενδοθηλιακών, γεγονός που προσδίδει μεγάλη αξία στη συγκατοίκηση της ανάπτυξης των αγγείων, των νεύρων και του αίματος.<sup>295-297,398</sup> Πειραματικά έχει βρεθεί ότι η αγγειογένεση επάγεται από την bFGF που αναστέλλεται από ενδοστατίνη. Η ενδοστατίνη έχει υψηλή ικανότητα σύνδεσης με την ηπαρίνη, ενώ την επιφάνειά της μιμείται η συνθετική αργινίνη, πλούσια σε δένδρο-δωδεκασακχαρίδες. Αυτό ερμηνεύει την ανασταλτική δραστηριότητα της ενδοστατίνης από την σύνδεση αυτής με ηπαρίνη.<sup>298,399-404</sup> Η πλήρης γνώση του μηχανισμού δράσης της ενδοστατίνης στην αγγειογένεση είναι επί του παρόντος ασαφής.

### 2. Αναστολή δεσμεύσεως του VEGF στον υποδοχέα

Η ενδοστατίνη εμποδίζει τη δέσμευση των VEGF-121 και VEGF-165 στους υποδοχείς:

I) VEGFR1 ή Fms-like tyrosine kinase 1 (Flt1) που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια για τον VEGF-121 (A) αλλά παρουσιάζει μικρή δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης.

II) VEGFR2 ή KDR/Flk1 (kinase domain region)/(fetal liver kinase) που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και της χημειοταξίας

III) VEGFR3 ή Flt-4 (Fms-like tyrosine kinase 4) ο οποίος εκφράζεται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων και σχετίζεται με τη λεμφαγγειογένεση. Η μη δέσμευση της ενδοστατίνης στους υποδοχείς οδηγεί σε μη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του υποδοχέα και σε μη ενεργοποίηση των μηχανισμών μεταβίβασης ενδοκυττάρου σήματος δια των ERK, p38, MAPK και p125FAK και παράλληλα σε δέσμευση του VEGF.<sup>405-408</sup>

### **3. Μείωση της έκφρασης του VEGF**

Κατά το χρόνο που η ενδοστατίνη δε δεσμεύεται με τον VEGF μειώνεται η έκφραση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα κάτι ανάλογο με αυτό που παρατηρείται με την αγγειοστατίνη.<sup>268,299</sup> Γενικά θεωρείται πως δρά και έμμεσα στην αναστολή της αγγειογενέσεως. Η μεσολάβηση του VEGF στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και της αγγειογενέσεως *in vivo* θεωρείται απαραίτητη για τη δραστηριότητα του αγγειογενετικού παράγοντα bFGF (basic Fibroblast Growth Factor).<sup>300</sup>

### **4. Προφύλαξη της επαγωγής της μετανάστευσης με bFGF-ενδοστατίνη**

Η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται σε στάδιο αναπτύξεως νέων μορφών αγγειακών εκβλαστήσεων κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, απαιτεί μια συνεχή διεργασία μεταξύ αυτών και των μητρικών κυττάρων.<sup>301,409-412</sup> Η διεργασία αυτή διατηρείται με τη δράση της β-κατενίνης που εντοπίζεται στη περιοχή διασυνδέσεως μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των συμπλεγμάτων των τριχοειδών. Χαλάρωση της κυτταρικής σχέσεως πρόσφυσης μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και διευκόλυνση της μετανάστευσής τους επάγεται με bFGF, ενώ η ενδοστατίνη εμποδίζει αυτή τη μετακίνηση. Η σχέση διεργασιών των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μεσοκυτταρίου ουσίας διατηρείται εν μέρει με διαμόρφωση των τοπικών προσφύσεων και της έντασης των ινών ακτίνης. Η ελάττωση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι συναρτήσεως της αποσταθεροποίησης που παρατηρείται με bFGF και ενδοστατίνη. Το αγγειακό τοίχωμα *in vivo* εκτίθεται στην ενδοστατίνη αλλά το αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα θα ήταν εμφανές σε

περιοχές υψηλής διεγερσιμότητας με αυξητικό παράγοντα (VEGF, bFGF κ.α.) όπως στις περιοχές του ενδοθηλίου του όγκου.<sup>302</sup>

## 5. Αγγειακή σταθεροποίηση

Η ενδοστατίνη μειώνει το σχηματισμό VEGF που επάγει τη μικροαγγειακή ανάπτυξη από την αορτή. Ανοσοϊστοχημικώς, η χορήγηση ενδοστατίνης ανιχνεύεται τοπικά στις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων συνδέσεις στις περιοχές πρόσφυσης ενδοθηλίων και βασικής μεμβράνης των αγγείων. Η ανίχνευση της ενδοστατίνης σε νέες αγγειογενετικές μορφές φαίνεται να δρά ενάντια στη χαλάρωση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και προς τη βασική μεμβράνη, στοιχεία αναγκαία για νέες μορφές αγγειακών εκβλαστήσεων. Η εδραίωση της αποτελεσματικότητας της ενδοστατίνης έχει διαπιστωθεί σε όγκους *in vivo*, που η άφθονη χορήγηση της συνδυάζεται με δραστηριότητα ωριμάνσεως και αγγειογενέσεως, κυρίως στα οριακά επίπεδα του όγκου, όπου η αγγειογένεση είναι πολύ ανεπτυγμένη. Παράλληλα, η ενδοστατίνη είναι παρούσα κατά τη διάρκεια διαμόρφωσης σταδίου μορφοποίησης της διάταξης των περιενδοθηλιακών κυττάρων σε μια στιβάδα, αλλά εξαφανίζεται με την πρόοδο ανάπτυξης των αγγείων και δη όταν έχουν αναπτύξει περισσότερες στιβάδες στο τοίχωμά τους.<sup>303,413</sup> Αυτό είναι ενδεικτικό πως η σταθεροποίηση δράσεως της ενδοστατίνης συμβαίνει σε αρχικά στάδια πριν από την ολοκλήρωση της διάταξης των περιενδοθηλιακών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα.

Το επόμενο στάδιο της αγγειακής σταθεροποίησης αφορά τη στρατολόγηση και την ολοκλήρωση της διατάξεως των περιενδοθηλιακών κυττάρων ήτοι των αδιαφοροποίητων περικυττάρων που μπορεί να εξελιχθούν σε ινοκύτταρα, κύτταρα λείων μυϊκών ινών, μακροφάγα κ.τ.λ., υπό την εποπτεία της αγγειοποιητίνης-1, του TGF- $\beta$  και του παράγοντα PDGF.<sup>227</sup>

Είναι γνωστή η δραστηριότητα και η επαγωγή του VEGF στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, στην αναστολή της απόπτωσης αυτών και τη διαμόρφωση αγγειακών σωληναρίων. Η χορήγηση ενδοστατίνης και VEGF τροποποιεί τη σταθερότητα των αγγειακών σωληναρίων. Ο χρόνος επιβιώσεως τους με τη διακοπή της ενδοστατίνης διπλασιάζεται συγκρινόμενος με το χρόνο ζωής με VEGF μόνο. Επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με αντισώματα προ της ενδοστατίνης παρεμποδίζει τη μορφοποίηση που επάγεται από τον VEGF σε σωληναριακούς σχηματισμούς και διακόπτει την παρουσία αυτών. Είναι γνωστή η δράση του bFGF στην έκκριση τόσο στον ενεργοποιητή

πλασμινογόνου UPA (Urokinase type plasminogen activator) που οδηγεί με πρωτεολυτική δραστηριότητα στη βλάστηση και το σχηματισμό σωληναρίων. Η ενδοστατίνη μειώνει το UPA σύστημα στην κυτταρική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

## **6. Σχέση ενδοστατίνης με μεταλλοπρωτεϊνάσες**

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσία (MMP's) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων και εμφανίζουν πιθανά αγγειογενετική δράση. Πρόκειται για εξαρτώμενες από το ψευδάργυρο (zinc) ενδοπεπτιδάσες που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται και ως Metzincins. Οι MMP's ταξινομούνται σε οκτώ δομικές ομάδες εκ των οποίων οι πέντε είναι εκκριτικού τύπου και οι τρεις μεμβρανικού τύπου.<sup>96</sup> Μεσολαβούν σε αντιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο (cell-cell) είτε σαν εξωκυττάρια, είτε σαν συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη ενδοπεπτιδάσες και σε αντιδράσεις κυττάρου προς εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (cell-extracellular matrix). Ο επαγωγέας των MMP's της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular matrix metalloproteinase inducer-EMMPRIN) προάγει τη σύνθεση MMP's μέσω αγνώστου μηχανισμού, ενώ παράλληλα αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της δραστηριότητάς τους. Η αυξημένη έκφραση του EMMPRIN τον καθιστά ρυθμιστικό παράγοντα της δράσης των MMP's στην παθογένεση του καρκίνου. Αυξημένη δραστηριότητα των MMP's σχετίζεται με αυξημένη διηθητικότητα και μεταστατική εξέλιξη των όγκων. Παράλληλα έχουν μελετηθεί στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και της πρόκλησης οξέων ισχαιμικών καρδιακών αλλά και εγκεφαλικών επεισοδίων αν και η παθογενετική διεργασία είναι ακόμη ασαφής.<sup>93,94,95,96</sup>

Η ενδοστατίνη παρεμβαίνει και αναστέλλει την αγγειογενετική δραστηριότητα της μεταλλοπρωτεϊνάσης-2 (MMP-2) και παράλληλα της διηθητικής ικανότητας των νεοπλασματικών κυττάρων.<sup>304,305</sup>

## **7. Δέσμευση της ενδοστατίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων - Τροποποίηση της κινητικότητας και της μορφογένεσης των αγγείων συναρτίζει ιντεγκρίνης και άλλων πρωτεϊνών**

Είναι γνωστό πως η εξωκυττάρια ουσία είναι λειτουργική, συμμετέχει στις διαδικασίες διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού, συμβάλλει στη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής

των ιστών και αποτελεί εκλεκτικό διηθητικό φραγμό για τα μακρομόρια. Τα όρια των διαφόρων ιστικών διαμερισμάτων στα σπονδυλωτά καθορίζουν: α) η βασική μεμβράνη και β) και η μεσοκυττάρια ή διάμεση ουσία ή απλώς στρώμα.

Η διήθηση της εξωκυτταρίου ουσίας στους ενδοθηλιακούς όγκους δηλαδή η μετατροπή του *in situ* καρκινώματος σε διηθητικό σημαίνει έναρξη δημιουργίας μεταστάσεων. Η διήθηση της εξωκυτταρίου ουσίας γίνεται αρχικά με τη σύνδεση ειδικού επιφανειακού υποδοχέα των νεοπλασματικών κυττάρων με στοιχεία της βασικής μεμβράνης. Τα μόρια προσκολλησεως (adhesion molecules), ήτοι οι επιφανειακοί υποδοχείς που συμβάλλουν στην κυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία, επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να προσκολληθούν στη βασική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και να οδηγήσουν μέσω «πρωτεόλυσης» της εξωκυτταρίου ουσίας στη μεταστατική εξέλιξη. Τα μόρια προσκολλησεως διακρίνονται στις μεγάλες ομάδες των ανοσοσφαιρινών, των ιντεγκρινών, των σελεκτινών και των διακυττάρων μορίων προσκόλλησης (intercellular adhesion molecules) ICAM-1, ICAM-2.

Οι ιντεγκρίνες μετέχουν στην εξέλιξη και επέκταση του νεοπλάσματος σχετιζόμενες με αλληλεπίδραση καρκινικών κυττάρων, αιμοπεταλίων, κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, των στοιχείων της εξωκυτταρίου ουσίας και του αγγειακού ενδοθηλίου.

Η ενδοστατίνη αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων που εξαρτάται από τις  $\alpha$ -ιντεγκρίνες. Η αναστολή γίνεται με δέσμευση της ενδοστατίνης με της  $\alpha_5$  και  $\alpha_v$  ιντεγκρίνες της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και κυρίως με τις  $\alpha_5\beta_1$ . Η ενδοστατίνη εξάλλου σε υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να αντιδρά με την τροπομοσίνη διαταράσσοντας την ακεραιότητα των ιστών, αναστέλλοντας την ενδοθηλιακή κινητικότητα και πιθανώς την απόπτωση.<sup>215</sup> Η δέσμευση της ενδοστατίνης με γλυκάνες της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο τους ως υποδοχέων ενδοστατίνης.<sup>414</sup>

## **8. Νιτρικό οξείδιο ενδοθηλιακών κυττάρων και ενδοστατίνη**

Η ενδοστατίνη, όπως αναφέρθηκε, αναστέλλει τη δέσμευση του VEGF, περιορίζει τη συγκέντρωση του και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση. Χορήγηση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ενδοστατίνης, αναστέλλει μερικώς ή πλήρως (ανάλογα με το ποσό χορηγήσεως και όταν η χορηγούμενη δόση είναι τουλάχιστον της τάξεως των 100 ng/ml)<sup>310</sup> την εξαρτημένη εκ του VEGF μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>310</sup> Παράλληλα αναστέλλει την

αποφωσφορυλίωση του νιτρικού οξειδίου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το φωσφορικό άλας της σφιγγοσίνης-1 ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt, που με την σειρά της επάγει την φωσφορυλίωση της συνθετάσης του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου (endothelial nitric oxide synthase-eNOS) με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση του τελευταίου από τα κύτταρα.<sup>311</sup> Ο VEGF διεγείρει τη σύνθεση νιτρικού οξειδίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η ενδοστατίνη καταργεί το μηχανισμό αυτό αντιδρώντας στην ενεργοποίηση του eNOS μειώνοντας την κινάση Akt η οποία ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της eNOS με ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A (protein phosphatase 2A).<sup>312</sup>

#### **8. Μείωση παραγωγής ενδοστατίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα επί υποξίας**

Η ενδοστατίνη αποτελεί το καρβοξυ-τελικό θραύσμα του κολλαγόνου XVIII των κυττάρων. Η απόσχιση της ενδοστατίνης εξ αυτού γίνεται με τη δράση των ενζύμων ελαστίνης και καθεψίνης, που παράγονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα του όγκου και δρουν στο κολλαγόνο. Στη συνέχεια απελευθερώνεται σε τριμερή αρχικά μορφή, μετατρεπόμενη στη συνέχεια σε διμερή και αποκκρινόμενη από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα με μια σταθερή συχνότητα *in vitro*.<sup>313</sup>

Η κυτταρική υποξία μειώνει τα παραγόμενα επίπεδα της ενδοστατίνης σημαντικά και κυρίως από τα περικύτταρα. Η μείωση είναι συναρτήσιμη του βαθμού της υποξίας η οποία αν είναι της τάξεως του 40% συνοδεύεται με ελάττωση της παραγόμενης από τα περικύτταρα ενδοστατίνης κατά 43% και εκ των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά 10%. Ο μηχανισμός μείωσης της ενδοστατίνης στις υποξαιμικές καταστάσεις δεν είναι γνωστός.

#### **10. Ενδοστατίνη και αιμοπετάλια**

Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί αρκετοί παράγοντες που περιέχονται στα αιμοπετάλια και επάγουν την αγγειογένεση όπως και άλλοι που δρουν ανασταλτικά.<sup>314</sup> Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται κυρίως: οι VEGF-A, VEGF-C, bFGF, HGF, αγγειοποιητίνη-1, PDGF, ηπαρινάση, η φωσφατάση της σφιγγοσίνης-1 κ.α. Στη δεύτερη περιλαμβάνονται



κυρίως η ενδοστατίνη, ο παράγων 4 των αιμοπεταλίων, η θρομβοσπονδίνη, το πλασμινογόνο, η α2 αντιπλασμίνη κ.α.

Οι παράγοντες αυτοί είναι δυνατόν να απελευθερώνονται κατά τη δημιουργία μετατραυματικού θρόμβου αίματος. Η απελευθέρωση των εν λόγω διεγερτών και αναστολέων της μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί στην ενορχηστρωμένη νεοαγγειογενετική ρύθμιση του θρόμβου.

Η δομή των αιμοπεταλίων είναι πολύπλοκη. Στη μεμβράνη τους υπάρχουν υποδοχείς για την επαφή τους με διάφορες ουσίες ενεργοποίησης ή αναστολείς και φωσφολιπίδια που σχετίζονται με την παραγωγή διαφόρων ουσιών, κυρίως προσταγλανδινών.

Στο κυτταρόπλασμα περιέχονται μικροϊνίδια ακτίνης που βοηθούν στην κινητικότητα των κυττάρων, ενώ παράγονται πλήθος ουσιών όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγων (PDGF), ο παράγων Von Willebrand, η θρομβοσπονδίνη κ.α.

Όταν γίνεται τραυματισμός του αγγείου, τα αιμοπετάλια έλκονται στο σημείο της βλάβης. Μετατρέπονται σε σφαιρικά κύτταρα με ακανθοειδείς προσεκβολές και αποκαλύπτονται οι υποδοχείς της επιφανείας τους (Ia-IIa-IIIb-IIIa-Ib/Ix). Αυτοί βοηθούν στη μεταξύ τους συγκόλληση (Aggregation) με τη βοήθεια παραγόντων όπως το ινωδογόνο με τις κολλαγονικές ίνες του ενδοθηλίου, τον παράγοντα von Willebrand και γλυκοπρωτεΐνες. Μετά τη συγκόλληση απελευθερώνεται στο περιβάλλον ADP και θρομβοξάνη A2. Οι ουσίες αυτές δρουν σε γειτονικά αιμοπετάλια για να διευρυνθεί η συνάθροιση τους και να αυξηθεί το μέγεθος του θρόμβου.<sup>315</sup>

Εκτός από τη συστολή των αγγείων και το σχηματισμό αιμοπεταλιακού θρόμβου, κινητοποιείται ο μηχανισμός της πήξεως του αίματος που αποσκοπεί στο σχηματισμό ινικής που θα καταστήσει το θρόμβο συμπαγή και πιο ισχυρό. Στην πήξη του αίματος μετέχουν 30 διαφορετικές ουσίες προαγωγής ή αναστολής του φαινομένου που εμφανίζεται σαν ένας καταρράκτης αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η διαδοχική ενεργοποίηση των παραγόντων γίνεται δια της ενδογενούς και εξωγενούς οδού που απλοποιημένα οδηγεί σε μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Η θρομβίνη τέλος επάγει την απελευθέρωση του VEGF και της ενδοστατίνης από τα αιμοπετάλια.<sup>315,316</sup> Η επιστράτευση ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα στο σχηματισθέντα θρόμβο τραυματικής επιφανείας κατά τη διάρκεια της προαγγειογενετικής φάσης, ήτοι της

«κοκκιωμάτωσης του ιστού», γίνεται με άγνωστο μηχανισμό από θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστικούς παράγοντες των αιμοπεταλίων. Ανάλογη επιλογή ενδοθηλιακών κυττάρων έχει αναφερθεί σε τελευταίες εργασίες όταν ο θρόμβος αφορά μεγάλα αγγεία σε όγκους όπως πχ. σε λέμφωμα όπου η στρατολόγηση ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται από το μυελό των οστών.<sup>317</sup>

Απελευθέρωση ενδοστατίνης γίνεται από τα αιμοπετάλια με τη δράση φαρμάκων όπως τα ΜΣΑΦ (Αντιφλεγμονώδη) celecoxib, flurbiprofen και HCT-1026 (που είναι ένα νιτρικό παράγωγο του flurbiprofen). Τα φάρμακα αυτά είναι αναστολείς της κυκλοξυγενάσης και η χορήγηση τους οδηγεί στην αύξηση της απελευθερώμενης ενδοστατίνης στο πλάσμα.<sup>318</sup>

Ανάλογη απελευθέρωση ενδοστατίνης έχουμε όταν χορηγούνται «αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα» όπως η τικλονιδίνη, που αναστέλλουν τη συνάθροιση (συγκόλληση) των αιμοπεταλίων για το σχηματισμό του λευκού θρόμβου, την πρώτη φάση δηλαδή στη διαδικασία της πήξης, γεγονός που υποβοηθεί στην προφύλαξη από θρομβεμβολικά επεισόδια σε σοβαρές αρτηριοπάθειες. Η αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων γίνεται με τη δέσμευση της δράσεως ADP στους υποδοχείς τους.<sup>304</sup>

Η απελευθέρωση ενδοστατίνης με τη χρήση των παραπάνω φαρμάκων οδηγεί σε πολλά ερωτηματικά που συνοψίζονται: 1) Ποιό το όφελος των ενδοθηλιακών κυττάρων που διαμορφώνεται με την παρουσία της ενδοστατίνης σε μια αγγειογενετική περιοχή του όγκου; 2) Η θεραπεία με ΜΣΑΦ εξαντλεί τις αποθήκες ενδοστατίνης των αιμοπεταλίων και ποιός ο αριθμός ανακύκλωσης αυτής; 3) Θα μπορούσε να βοηθήσει η χορήγηση ΜΣΑΦ (πχ. celecoxib) στη θεραπεία του καρκίνου;

Τα στοιχεία αυτά οδηγούν στα συμπεράσματα: 1) η ενδοστατίνη αποτελεί το καρβοξυτελικό θραύσμα του εσωτερικού τμήματος του κολλαγόνου XVIII που αποθηκεύεται στη βασική μεμβράνη, 2) αποθηκεύεται στα αιμοπετάλια, 3) κυκλοφορεί σε χαμηλά επίπεδα σαν ελεύθερη ενδοστατίνη, 4) απελευθερώνεται με τη δράση φαρμάκων και 5) η συγκέντρωση της στις νεοαγγειογενετικές μορφές των όγκων πιθανώς να επηρεάζει τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου και κατ' επέκτασιν το προσδόκιμο επιβίωσης των πασχόντων.

## **11. Πειραματικές εργασίες θεραπείας όγκων με ενδοστατίνη**

Η συστηματική χορήγηση ενδοστατίνης μπορεί να αναστείλλει την ανάπτυξη και να οδηγήσει σε ύφεση νεοπλασματικούς όγκους. Η πρώτη συνδυασμένη ενδοστατίνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν από E. Coli σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με καρκίνο του μαστού. Χορήγηση ανασυνδιασμένης ενδοστατίνης από E.Coli υπό αδιάλυτη ή διαλυτή μορφή παρουσίασε επιτυχή αναστολή της αύξησης του όγκου και παρατεταμένη επιβίωση. Η διακοπή της θεραπείας δε φάνηκε να αναζωπυρώνει το νόσημα, ενώ η διήθηση του όγκου τοπικά με ενδοστατίνη φαίνεται να έχει θεαματικά αποτελέσματα, με μειώσεις του μεγέθους αυτού σε σημαντικά χαμηλότερες δόσεις απ' ότι η συστηματική χορήγηση.<sup>319-327</sup>

## **12. Γονιδιακή θεραπεία με ενδοστατίνη, τοπική γονιδιακή θεραπεία**

Πειραματική μελέτη σε ποντικούς με καρκίνο ήπατος, τα κύτταρα των οποίων διαμολύνθηκαν μέσω RNA ρετροϊών, έδειξε ότι πολύ χαμηλό ποσοστό από αυτούς απεβίωσε όταν έλαβε ενέσιμο διάλυμα ενδοστατίνης.<sup>328</sup>

Ανάλογες εργασίες γονιδιακής θεραπείας με ενδοστατίνη σε ανθρώπινους όγκους ήπατος, νεφρού, μελανώματος, μαστού αλλά και πειραματοζώων, έδειξαν ασαφή αποτελέσματα με άλλοτε παρατεταμένη αναστολή εξελίξεως του όγκου και άλλοτε με ελάχιστη αποτελεσματικότητα.<sup>329-336</sup>

## **13. Προσδιορισμός μηχανισμών σηματοδότησης του δικτύου ενδοστατίνης**

Η μελέτη του προσδιορισμού της απάντησης στη θεραπεία με ενδοστατίνη του γενώματος και πρωτεώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων, έχει ευρέως αναπτυχθεί με τη χρησιμοποίηση ευρείας εκφράσεως κυττάρων που καλύπτουν ποσοστιαία το 95% του ανθρώπινου γενώματος.

Η γονιδιακή υποέκφραση κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ενδοστατίνη στον καρκίνο συνοδεύεται με αγγειογενετική μετατροπή από οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, υποδοχείς τους, προσκολλητικά μόρια, G πρωτεΐνες και παράγοντες μεταγραφής.<sup>337</sup>

Οι μηχανισμοί σηματοδότησης της έκφρασης της ενδοστατίνης συνδυάζονται: 1) με τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης αναστολέα σύνδεσης με το DNA ID-1 και 2) με την αύξηση της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης-1 που αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα της αγγειογένεσης. Τελευταία έχει απομονωθεί η οικογένεια των εφρινών (Ephrin 1, 2) που επάγουν τη βλάστηση αγγείων *in vitro* που μοιάζει με τη δράση του VEGF και της αγγειοποιητίνης-1.<sup>338-343</sup>

Η θρομβίνη είναι ένας ισχυρός διεγέρτης για την απελευθέρωση VEGF με ενεργοποίηση της μεταγραφικής ρύθμισης από τον HIF-1a, ενώ παράλληλα επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων του VEGF των επιθηλιακών κυττάρων.<sup>343,344</sup>

Ο συσχετισμός καρκίνου και θρομβίνης είναι λίαν αξιόλογος δεδομένου ότι πολλοί θάνατοι εξ' αυτού αποδίδονται σε θρόμβωση ή αιμορραγία. Η χορήγηση ενδοστατίνης μειώνει σημαντικά την ευαισθησία των υποδοχέων της θρομβίνης PAR-1 και PAR-2, μειώνει τη δραστηριότητα προαγγειογενετικών γονιδίων και αντίθετα διεγείρει τη δραστηριότητα γονιδίων που με τη σειρά τους επηρεάζουν την αναστολή της αγγειογένεσης.<sup>345,346</sup>

Όλα τα ανωτέρω υποδηλώνουν ενδοκυττάριους επικοινωνιακούς δρόμους με γονιδιακή υποδομή, που σχετίζονται με την αγγειογένεση των όγκων και την παρέμβαση της ενδοστατίνης κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αντιμετώπισης αυτών, χωρίς να είναι επιστημονικά εμφανής η πολυσταδιακή αλληλεπίδραση των μικρών ή μεγάλων μορίων αγγειογενετικής αναστολής.

#### **14. Κλινικές εφαρμογές χορήγησης ενδοστατίνης**

Η μη τοξική δράση της ενδοστατίνης την καθιστά χρήσιμη σε πάσχοντες από κακοήθη νοσήματα.

Οι μέχρι σήμερα κλινικές μελέτες χορηγήσεως ενδοστατίνης είναι φάσεως I και φάσεως II σε πληθυσμούς ασθενών με τις ίδιες παραμέτρους ίδιου τύπου νοσήματος για να απαντηθεί το ερώτημα εάν ενδείκνυται η ευρεία κλινική δοκιμή αυτού.<sup>242,347-349</sup>

### **ΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**

Αναστολή της D1 κυκλίνης – πρόκληση G1 ανακοπής των ενδοθηλιακών κυττάρων

Η σύνθεση του DNA γίνεται στη φάση S (συνθέσεως). Η φάση G<sub>0</sub> είναι περίοδος ηρεμίας ως προς τη σύνθεση του DNA ενώ εξακολουθούν να συντίθεται RNA και λευκώματα. Στη φάση G<sub>1</sub> που παρεμβάλλεται μεταξύ μίτωσης και S φάσεως συντίθενται RNA και λευκώματα που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση DNA στη φάση S. Η φάση G<sub>2</sub> παρεμβάλλεται μεταξύ της φάσεως S και μίτωσης, είναι η μικρότερη σε διάρκεια χρόνου και θεωρείται η περίοδος προπαρασκευής για την έναρξη νέας μίτωσης.

Οι κυκλίνες αποτελούν σημαντική οικογένεια πρωτεϊνών και είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχουν 15 τουλάχιστον γονίδια κυκλίνης στο ανθρώπινο γονιδίωμα που χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Κάθε κατηγορία ρυθμίζει συγκεκριμένη μετάβαση στις φάσεις του κύκλου. Η μετάβαση μέσω της φάσης G<sub>1</sub> στη φάση S ρυθμίζεται από τις κυκλίνες C, D1-3, E και H, ενώ η μετάβαση μέσω της G<sub>2</sub> στη φάση M ρυθμίζεται από τις κυκλίνες B1-2.<sup>93,94,99</sup>

Τα επίπεδα των κυκλινών στο κυτταρόπλασμα μειώνονται ή αυξάνονται ανάλογα με το στάδιο του κύκλου. Αυξημένη πυρηνική έκφραση των κυκλινών επάγει τη πρόοδο από τη μια φάση στην επόμενη, ενώ η χαμηλή επιβραδύνει.

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών, γνωστές ως κυκλινο-εξααρτώμενες κινάσες (CDK's), που έχουν σαν βασικό ρυθμιστικό ρόλο τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη γονιδιακή μεταγραφή.<sup>97</sup> Διαιρούνται σε CDK-G<sub>1</sub> φάση (EdK4), φάση ScdK (CDK2) και M φάση CDK (CDK1).<sup>95,97</sup> Τα επίπεδα τους στο κύτταρο παραμένουν αρκετά σταθερά αλλά η κάθε μια πρέπει να δεσμεύει την κατάλληλη κυκλίνη προκειμένου να ενεργοποιηθούν. Η κυκλίνη D1 μια πρόιμη κυκλίνη της G<sub>1</sub> φάσης κυρίως δεσμεύει και ενεργοποιεί τη CDK2.

Οι ανασταλτικοί παράγοντες των CDK εμποδίζουν τη μετάβαση μεταξύ των δύο φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Οι ανασταλτικοί παράγοντες των CDK, της πρωτεΐνης p16 και p21 ελέγχουν τη δραστηριότητα των συμπλόκων κυκλίνης-CD κινάσης.<sup>100,202</sup> Η πρωτεϊνική οικογένεια p16 περιέχει τέσσερα μέλη και αναστέλλει τις CDK4 και CDK6, δημιουργώντας σύμπλοκο με τη DCK4 in vitro.<sup>98,102</sup> Η πρωτεϊνική οικογένεια της p21 περιέχει τρία μέλη και αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες D και E αναστέλλοντας κατά προτίμηση τη δραστηριότητα της CDK2. Παράλληλα η p21 αποτελεί το πρώτο μόριο που χαρακτηρίστηκε ως wild-type activated factor (WAF-1) λόγω της ρύθμισης του από την κινάση του γονιδίου P53 και

αναγνωρίστηκε επίσης ως παραγόμενος ανασταλτικός παράγοντας της σύνθεσης του DNA<sup>123</sup> από το κύτταρο.<sup>415</sup>

## **ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΕΚ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

### **ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Η μειωμένη απελευθέρωση ενζύμων έκπτωσης από περιοχές μορίων κολλαγόνου, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αντιαγγειογενετική δραστηριότητα.<sup>350-352</sup> Παράλληλα, μπορούν να ρυθμίσουν και να τροποποιήσουν τη συμπεριφορά των ενδοθηλιακών κυττάρων ώστε να προσφέρουν επιπλέον δομική και λειτουργική στήριξη.<sup>360,361</sup> Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί τέτοιου είδους θραύσματα από το κολλαγόνο τύπου IV της βασικής μεμβράνης παράλληλα με την εν πολλοίς αναφερθείσα ενδοστατίνη.<sup>353</sup>

### **Arresten**

Αποτελεί θραύσμα 26 kDa της συνθέσεως της αλυσίδας α1 του κολλαγόνου τύπου IV, που υπάρχει στο πεδίο NCI, το μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων αυτού. Το κύριο συστατικό της βασικής μεμβράνης των αγγείων είναι το κολλαγόνο τύπου IV, που δημιουργεί μια δομή δικτύου με άλλες μεγαλομοριακές ουσίες όπως η λαμίνη, η ινωδονεκτίνη, η εντακτίνη και πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης.<sup>362</sup> Το τύπου IV κολλαγόνο αποτελείται από 6 γενετικά παράγωγα (α<sub>1</sub>-α<sub>6</sub>). Οι αλυσίδες α<sub>1</sub> και α<sub>2</sub> του κολλαγόνου τύπου IV στο σάρκωμα Engelbreth-Holm-Swarm αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων,<sup>363,364</sup> και δεν φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό διαφόρων σειρών καρκινικών κυττάρων. Σε μεγάλες δόσεις αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετανάστευσή τους.<sup>365</sup> Επίσης επηρεάζει τη μετάσταση οδηγώντας σε αξιόλογη μείωση των πνευμονικών όζων πειραματικά σε ποντίκια που έλαβαν αρρεστένη και επιπλέον περιόρισε την ανάπτυξη μεγάλων και μικρών κυττάρων του καρκινώματος νεφρού. Τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν πως το «θραύσμα Arresten» μπορεί να δρά μέσω α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> ιντεγκρίνης και να μπλοκάρει τη σύνδεση της α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> ιντεγκρίνης στο κολλαγόνο τύπου I.<sup>365</sup> Η ιντεγκρίνη α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> είναι ένας υποδοχέας κολλαγόνου που συνδέεται σε συστατικά της βασικής μεμβράνης. Εξουδετερώνει αντισώματα που μπορούν να

καταστειλουν την αγγειογένεση που σχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου.<sup>366</sup> Η βι  
ιντεγκρίνη επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση.<sup>367</sup> Η αφαίρεση ή διακοπή διαδικασιών  
μέσω α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> ιντεγκρίνης αναστέλλει την αγγειογένεση,<sup>366,368</sup> που δείχνει ότι δρά ως  
προαγγειογενετικός παράγων.

Κυκλοφορεί στα φυσιολογικά άτομα και η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα της έχει  
διαπιστωθεί σε ποικιλία αναλύσεων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.<sup>354-356</sup>

### **Canstatin**

Αποτελεί 24 kDa θραύσμα της συνθέσεως α<sub>2</sub> αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου IV και  
βρίσκεται στο μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων πεδίο NCI. Η αντιαγγειογενετική της  
δραστηριότητα επιβεβαιώθηκε σε *in vitro* και *in vivo* αναλύσεις. Η χρήση της  
ανασυνδυασμένης μορφής της φαίνεται να αναστέλλει σε πειραματόζωα την αύξηση  
νεφρικού όγκου 3-4 φορές περισσότερο απ' ότι σε placebo-θεραπεία. Η μείωση του μεγέθους  
των όγκων βρέθηκε να συνδυάζεται με CD31 θετικά τριχοειδή αγγεία στην πάσχουσα  
περιοχή.<sup>357,358</sup> Η δραστηριότητα της σχετίζεται με την αναστολή του VEGF και bFGF στα  
ενδοθηλιακά κύτταρα. Ειδικά επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ  
εμφανίζει ασήμαντη δραστηριότητα στα μη ενδοθηλιακά κύτταρα.<sup>353</sup>

Ανασυνδυασμένη κανστατίνη αναστέλλει σημαντικά τη μετανάστευση, τον  
πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών ανθρώπινων κυττάρων και τη δημιουργία σωληνίσκων,  
με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, αυξάνοντας την απόπτωση.<sup>369</sup> Η αναστολή του πολλαπλασιασμού  
γίνεται μέσω της ρυθμιστικής κινάσης εξωκυττάρου σήματος (ERK- extracellular signal-  
regulated kinase). Αυτό ενισχύει την άποψη ότι η κανστατίνη δεν έχει ως βασικό τρόπο  
δράσης την αναστολή λειτουργιών μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων του VEGF και του  
bFGF. Πιθανότατα δρά οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση. Επίσης η κανστατίνη  
αναστέλλει την αύξηση των όγκων σε μοντέλα ποντικών που ιστολογικά έχουν χαμηλά  
επίπεδα CD31-θετικής αγγείωσης,<sup>369</sup> τη φωσφορυλίωση του Akt, της FAK(focal adhesion  
kinase) του mTOR, της πρωτεΐνης 4E-BP1, της ριβοσωμιακής κινάσης S6, και την έκφραση  
του υποδοχέα Fas. Ενεργοποιεί τις προκασπάσες-8 και 9, αποδυναμώνει τη βασική μεμβράνη  
του μιτοχονδρίου και αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο.<sup>370</sup> Λειτουργικός υποδοχέας της  
κανστατίνης ακόμα δεν έχει βρεθεί, αλλά φαίνεται ότι πιθανότατα δρά μέσω ιντεγκρινών της  
κυτταρικής επιφανείας.

## Tumstatin

Αποτελεί 28kDa θραύσμα της περιοχής NCI του  $\alpha_3$  μορίου του κολλαγόνου που έχει δείξει αντιαγγειογενετική δραστηριότητα σε *in vitro* και *in vivo*.<sup>144-147</sup> Η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της δέσμευσης της με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω  $\alpha_v\beta_3$  και  $\alpha_6\beta_1$ -ιντεγκρινών<sup>143-146</sup> και τελευταία μέσω  $\alpha_3\beta_1$  ιντεγκρίνης.<sup>353,147,358,359</sup>

Πρόκειται δηλαδή για συνθετικά πεπτίδια που προέρχονται από τις  $\alpha_3$  αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου IV και έχει φανεί ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μελανώματος και άλλων επιθηλιακών καρκίνων *in vitro*<sup>371,372</sup> και παράλληλα συνδέονται με το σύμπλεγμα ιντεγκρίνης CD47/ $\alpha_v\beta_3$ .<sup>373</sup> Ολοκληρω το θραύσμα μεγέθους 28 kDa της  $\alpha_3$  αλυσίδας του δικτύου NCI του τύπου IV κολλαγόνου ονομάστηκε τουμστατίνη.<sup>374</sup> Η *in vivo* υπερέκφραση της τουμστατίνης σε κύτταρα όγκου, αναστέλλει τη διηθητική λειτουργία του μελανώματος σε ποντίκια.<sup>375</sup> Η αντιαγγειογενετική δραστηριότητα εντοπίζεται σε περιοχή της τουμστατίνης που βρίσκεται ξεχωριστά από αυτήν που καταστέλλει τη δραστηριότητα των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η τουμστατίνη έχει δύο περιοχές σύνδεσης για την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη, μία στο τελικό N-άκρο της που σχετίζεται με την αναστολή της αγγειογένεσης και το C-άκρο που είναι κυρίως υπεύθυνο για της προ-αποπτωτική της δράση.<sup>373,374,376</sup> Το θραύσμα της τουμστατίνης που περιέχει 54 με 132 συνδέσεις αμινοξέων με τα ενδοθηλιακά όσο και με τα κύτταρα μελανώματος αναστέλλει μόνο τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, το θραύσμα που περιέχει 185 με 203 συνδέσεις αμινοξέων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και με τα κύτταρα μελανώματος αναστέλλει μόνο τον πολλαπλασιασμό των τελευταίων.<sup>374</sup> Ο τρόπος που τα διαφορετικά αυτά τμήματα  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρινών ρυθμίζουν την αντιαγγειογενετική δράση της τουμστατίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός.<sup>377</sup>

Το αντιαγγειογενετικό δίκτυο της τουμστατίνης μεταξύ των περιοχών με 54- και 132- αλληλουχίες αμινοξέων ονομάστηκε Tum-5. Η ανασυνδυασμένη Tum-5 αναστέλλει τη δημιουργία σωληνίσκων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αναστέλλει επίσης τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η Tum-5 έχει αντιαγγειογενετική δραστηριότητα και αναστέλλει την αύξηση του καρκίνου του προστάτου.<sup>378</sup> Συγκεκριμένα η αντιαγγειογενετική δράση της, εντοπίζεται σε περιοχή με 25- αμινοξέα και ανάμεσα σε άλλη με 69- και 98- αμινοξέα



αντίστοιχα. Αμφότερα τα πεπτίδια αυτά είναι αντιαγγειογενετικά και δρουν μέσω  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης με παρόμοιο τρόπο όπως και όλο το μόριο της τουμστατίνης.<sup>379</sup>

Η αντιαγγειογενετική και προαποπτωτική δραστηριότητα της τουμστατίνης είναι ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο Maeshima και οι συνεργάτες του,<sup>380</sup> έδειξαν ότι η τουμστατίνη λειτουργεί ως ειδικός αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μέσω δράσης μαζί με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη, η τουμστατίνη αναστέλει την ενεργοποίηση των FAK, P13K, της πρωτεϊνικής κινάσης B/Akt και του mTOR. Επίσης η τουμστατίνη προκαλεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω αναστολής των οδών μετάδοσης σημάτων που σχετίζονται με την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω πάλι κοινής δράσης με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη.<sup>380</sup> Είναι γνωστό ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν τον VEGF μέσω ρύθμισης από τις ιντεγκρίνες  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_1$  όπως και από άλλες  $\alpha_v$  ιντεγκρίνες. Η τουμστατίνη μπορεί να αναστείλει τη σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τον VEGF μέσω της δράσης με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης, επάγοντας την απόπτωση.<sup>381</sup>

Αν και τουμστατίνη και η ενδοστατίνη είναι αμφότερες αντιαγγειογενετικά πεπτίδια που προέρχονται από δομές NC1 της βασικής μεμβράνης του κολλαγόνου, μοιάζουν μόνο σε 14% ομόλογες περιοχές αμινοξέων και οι δραστηριότητές τους φαίνεται να ρυθμίζονται από διαφορετικά μονοπάτια σημάτων. Η ανθρώπινη τουμστατίνη προλαμβάνει την αγγειογένεση μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της επαγωγής της απόπτωσης, χωρίς επίδραση στη μετανάστευση τους. Η ανθρώπινη ενδοστατίνη προλαμβάνει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στη διαδικασία πολλαπλασιασμού που επάγεται από τον VEGF. Η δράση της τουμστατίνης ρυθμίζεται μέσω σύνδεσης της με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη και η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω της οδού FAK/P13K/Akt/mTOR/4E-BPI, ενώ η δράση της ενδοστατίνης μέσω της  $\alpha_5\beta_1$  ιντεγκρίνης και την αναστολή των σηματοδοτικών οδών FAK/c-Raf/MAPK-ERK και 1/2/p38/ERK1 MAPK κινάσης.<sup>384</sup>

### **Ενδορεπελίνη**

Η περλεκάνη είναι μια πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαράνης της βασικής μεμβράνης που έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των αγγείων. Το τελικό άκρο COOH- της περλεκάνης ή αλλιώς περιοχή V, ονομάζεται ενδορεπελίνη. Η ενδορεπελίνη αναστέλλει με διάφορους τρόπους την αγγειογένεση όπως με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή τη

μορφογένεση των ενδοθηλιακών αγγειακών μικροσωληνίσκων από τα κύτταρα του κολλαγόνου. Η ενεργός ενδορεπελίνη *in vitro* αναστέλλει τη διάχυση της ινωδονεκτίνης και του κολλαγόνου τύπου I, χωρίς όμως να συνδέεται άμεσα στις μεσοκυττάρια πρωτεΐνες.<sup>385</sup> Μέσω υποδοχέων υψηλής συγγένειας με αυτήν, συνδέεται άμεσα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα πλακώδη καρκινικά κύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Ενδιαφέρον σημείο είναι ότι συνδέεται με την ενδοστατίνη, έναν ακόμα αναστολέα της αγγειογένεσης που προέρχεται από το μεσοκυττάριο χώρο και συνεργάζονται στην αντιαγγειογενετική δράση.<sup>385</sup> Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της ενδορεπελίνης δεν είναι ακόμα γνωστός. Φαίνεται πως κάποιο ρόλο ίσως έχουν η β1 ιντεγκρίνη και η α-dystroglycan.<sup>386-388</sup>

### **Θραύσμα όμοιο με ενδοστατίνη από το κολλαγόνο τύπου XV**

Το θραύσμα αυτό είναι μεγέθους 22kDa και βρέθηκε κατά 70% ομόλογο της ενδοστατίνης. Αναστέλλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς να επηρεάζει όμως τον πολλαπλασιασμό τους. Η συστηματική χορήγηση του θραύσματος της ενδοστατίνης από το κολλαγόνο τύπου XV (EFCXV) καταστέλλει την ανάπτυξη των όγκων σε μοντέλα με καρκίνο νεφρού.<sup>416</sup> Αμφότερες αναστέλλουν την αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες VEGF και FGF-2, με διαφορές όμως ως προς την ενεργοποίηση τους από κάθε παράγοντα.<sup>417</sup> Φαίνεται πως η δράση της ενδοστατίνης και της EFCXV σε κάποιο βαθμό συσχετίζονται, ωστόσο όταν χορηγούνται μαζί σε πειραματικό μοντέλο ποντικού δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές, σε σχέση με όταν χορηγούνται ξεχωριστά.<sup>418</sup>

### **Αναστελίνη**

Είναι θραύσμα της ινωδονεκτίνης. Η επώαση της διαλυτής ινωδονεκτίνης με ένα μικρό θραύσμα προερχόμενο από την ινωδονεκτίνη που ονομάζεται αναστελίνη, έχει ως αποτέλεσμα μια πολυμερή μορφή της ινωδονεκτίνης με ισχυρή αντιμεταστατική δράση σε όγκους ποντικών.<sup>419</sup> Τόσο η αναστελίνη όσο και η πολυμερής ινωδονεκτίνη μειώνουν σε μέγεθος όγκους ποντικών, όπως και την αγγείωση τους.<sup>420</sup>

## Fibulins

Η πρωτεολυτική διάσπαση της βασικής μεμβράνης από ελαστάσες και καθεψίνες ελευθερώνει θραύσματα με αντιαγγειογενετικές ιδιότητες.<sup>421</sup> Δύο τέτοια θραύσματα είναι τα τελικά COOH- θραύσματα που αντιστοιχούν στη fibulin 1D και στο δίκτυο III της fibulin 5. Πρόσφατα η fibulin 5 φαίνεται να ανταγωνίζεται τη μετάδοση σήματος του VEGF και να αναστέλλει την αγγειογενετική διασπορά των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>422</sup> Η fibulin 5 συνδέεται με το εξωκυττάριο υπεροξειδίο της δισμουτάσης.<sup>423,424</sup> Μελλοντικές μελέτες πιθανότατα να διαφωτίσουν ακόμα περισσότερο το συγκεκριμένο θέμα.

## Θρομβοσπονδίνες

Η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως φυσικός αναστολέας της αγγειογένεσης.<sup>425</sup> Είναι μια μεγάλη πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη που ρυθμίζει διάφορα βιολογικά γεγονότα, όπως την κυτταρική διάχυση, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την ενεργοποίηση του TGF-β και των πρωτεασών. Μερικές μελέτες αναφέρουν ότι η TSP-1 μπορεί να έχει διπλή δράση ανάλογα με τις πρωτεάσες που ενεργοποιούν τα θραύσματα της.<sup>426,427</sup> Είναι γνωστό ότι αναστέλλει την αύξηση του όγκου και τη δημιουργία μεταστάσεων καθώς επίσης αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της in vivo νεοαγγείωσης και της ογκογένεσης. Η υπερέκφραση της TSP-1 σε ποντίκια καταστέλλει την επούλωση τραύματος και την ογκογένεση, ενώ η έλλειψη της οδηγεί σε αυξημένη νεοαγγείωση συγκεκριμένων ιστών.<sup>428-430</sup> Τέλος, έκφραση της TSP-1 έχει συσχετισθεί με κακοήγη κυτταρική εξαλλαγή κυττάρων σε καρκινώματα μαστού, πνεύμονα και μελανώματος.

Η TSP-2 φαίνεται να έχει αντιαγγειογενετική δράση. Χορήγηση κυττάρων πλακώδους καρκινώματος ποντικών με TSP-2 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της αύξησης του όγκου σε βαθμό ακόμα μεγαλύτερο και από την TSP-1. Ο συνδυασμός TSP-1 και TSP-2 ανέστειλε ολοκληρωτικά την αύξηση του όγκου. Σε όγκους που εκφράζουν την TSP-2 παρατηρήθηκαν εκτεταμένες περιοχές νέκρωσης.<sup>431</sup> Επιπλέον η αγγειογένεση των όγκων ενισχύθηκε σημαντικά σε ποντίκια με ανεπάρκεια της TSP-2. Αν και η ανεπάρκεια της TSP-2 δε φάνηκε να επηρεάζει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μειώθηκε σημαντικά.<sup>432</sup> Φαίνεται ότι η αντιαγγειογενετική ιδιότητα της TSP-2 βρίσκεται περίπου σε μια τελική περιοχή δεσμού NH<sub>2</sub> μεγέθους 80kDa.<sup>433</sup>

## ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΗ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΟΙ ΕΚ ΤΟΥ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

### **Χονδρομοντουλίνη**

Οι χόνδροι περιέχουν πολλούς αγγειογενετικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της οστεοποίησης στην ενήλικη ζωή, ωστόσο αποτελούν ανάγγειο τύπο ιστού. Η χονδρομοντουλίνη, είναι μια ειδική πρωτεΐνη του εξωκυτταρίου δικτύου με μέγεθος 25-kDa που αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της αγγειογένεσης.<sup>434,435</sup> Τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής έχουν παρατηρηθεί να είναι χαμηλά στα χονδροσάρκωματα ή σε καλοήθεις όγκους των χόνδρων. Η τοπική χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης χονδρομοντουλίνης-I σχεδόν αναστέλλει πλήρως τη διήθηση από νεοαγγεία και την αύξηση του όγκου *in vivo*. Επιπλέον αναστέλλει την αύξηση του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου *in vivo* και φαίνεται να έχει θεραπευτικές δυνατότητες έναντι και άλλων καρκίνων.<sup>435</sup>

### **Διαλυτή Fms-like τυροσινική κινάση 1**

Η διαλυτή μορφή του VEGFR-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase 1, sFlt-1) πρωτοαναγνωρίστηκε από τον Kendall και τους συνεργάτες του.<sup>436</sup> Ο sFlt-1 έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τους VEGF και PGF.<sup>436-438</sup> Στον άνθρωπο, ο VEGF κυκλοφορεί σε συγκέντρωση 75pg/ml και ο sFlt-1 σε 23ng/ml. Συνεπώς ο VEGF μπορεί να κυκλοφορεί συνδεδεμένος ή και ελεύθερος ανάλογα με την ποσότητα του sFlt-1. Βάσει αυτού, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο sFlt-1 μπορεί να χρησιμεύσει ως αντικαρκινικός παράγων αναστέλλοντας τον VEGF.<sup>439-441</sup>

### **Διασπούμενη αντιθρομβίνη III και προθρομβίνη**

Οι κυκλοφορούντες παράγοντες πήξης στο αίμα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Εκτός από την αγγειοστατίνη, τους TSP's και τον παράγοντα -4 των αιμοπεταλίων, επιπλέον κάποιες μορφές της αντιθρομβίνης III και της προθρομβίνης φαίνεται να έχουν αντιαγγειογενετικές ιδιότητες.<sup>442,443</sup> Η διάσπαση της τελικής COOH- ομάδας της αντιθρομβίνης επάγει τη διαφοροποίηση του μορίου και το αποτέλεσμα αυτής έχει την παραγόμενη αντιαγγειογενετική και αντικαρκινική κατ' επέκταση δραστηριότητα όπως έχει

φανεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών. Τελευταία έχει φανεί ότι και η μη διασπούμενη μορφή αντιθρομβίνης έχει αντιαγγειογενετική δράση.<sup>442</sup>

### **Ιντερφερόνες (IFN's)**

Οι IFN's είναι κυτταροκίνες με πολλές δράσεις, που ρυθμίζουν αντιϊκές, αντικαρκινικές, αποπτωτικές και κυτταρικές απαντήσεις. Ήταν οι πρώτες που αναγνωρίστηκαν ως ενδογενείς αντικαρκινικοί ρυθμιστές. Φαίνεται να αναστέλλουν την αγγειογένεση που επάγεται από καρκινικά κύτταρα σε ποντίκια.<sup>444</sup> Οι IFN-α και IFN-β έχουν βιολογική δραστηριότητα έναντι πλακώδους καρκινώματος και αναστέλλουν την αγγειογένεση σε μοντέλα ποντικών. Όταν ο όγκος αντιμετωπίζεται *in vitro* με χαμηλές δόσεις IFN-α, τότε φαίνεται να υπάρχει πτώση της IL-8 που είναι βασικός αγγειογενετικός παράγων των όγκων.<sup>445</sup> Η IFN-α μειώνει τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου -ουροκινάσης και τον αναστολέα της ενεργοποίησης πλασμινογόνου -I, όπως επίσης την ενζυμική δραστηριότητα και πρωτεϊνική έκφραση του MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9).<sup>446</sup> Θεραπεία με IFN-α και IFN-β επίσης αναστέλλει την αγγειογένεση με καταστολή της έκφρασης του bFGF.<sup>447-449</sup>

### **Ιντερλευκίνες**

Αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που παράγονται από τα λευκοκύτταρα με ευρύ φάσμα δράσης σε πλειάδα διαδικασιών, μια εκ των οποίων είναι η αγγειογένεση. Περιέχουν ένα τελικό άκρο NH<sub>2</sub>-Glu-Leu-Arg (ERL) που φαίνεται να τους προσδίδει προαγγειογενετικές ιδιότητες πχ. στην IL-8, ενώ επί απουσίας του παρατηρείται αναστολή της αγγειογένεσης.<sup>450</sup> Η IL-1 και δη η IL-1β, συμμετέχουν στη φλεγμονή, την αύξηση του όγκου και τη μετάσταση.<sup>451</sup> Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 μειώνει τη φλεγμονώδη απάντηση και αναστέλλει την αύξηση του όγκου στα ποντίκια.<sup>454</sup> Η IL-4 εξίσου αναστέλλει την FGF-επαγόμενη αγγειογένεση.<sup>453</sup>

Η IL-12 επίσης φαίνεται να έχει αντι-ογκογενείς ιδιότητες χωρίς ωστόσο να είναι σαφής ο τρόπος, διότι οι πολλαπλές της δράσεις καθιστούν δύσκολο να ελεγχθεί σε οποιονδήποτε οργανισμό. Πρόσφατα, οι Albin et al έδειξαν ότι η IL-12 αποτελεί το βασικό ρυθμιστή της αγγειοστατίνης.<sup>500</sup> Επίσης, πιθανότατα τροποποιεί τη σχέση μεταξύ όγκου και ξενιστή, μέσω άμεσων και έμμεσων δράσεων στα λεμφοειδή και μη λεμφοειδή κύτταρα.<sup>456</sup> Αναστέλλει

αμυντικούς κυτταρικούς μηχανισμούς μέσω προαγωγής της διαφοροποίησης των CD4 βοηθητικών T κυττάρων προς την κατεύθυνση των Th1 κυττάρων και επάγοντας την έκφραση των MHC.<sup>457,458</sup> Τα Th1 κύτταρα παράγουν IL-2 και ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) που αποτελούν κυτταροκίνες που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των CD8 κυτταροτοξικών T κυττάρων, των φυσικών φονικών κυττάρων (NK's-Natural Killer cells) και των μακροφάγων και κατ' επέκταση επάγουν τη μείωση του όγκου.<sup>458</sup> Πολλές από τις δράσεις της IL-12, τόσο οι θεραπευτικές όσο και οι τοξικές, έχει φανεί να σχετίζονται και να εξαρτώνται από την επαγόμενη εκ της παραγωγής IFN-γ από τα T και NK κύτταρα.<sup>457,498</sup> Η IL-12 επίσης, ενισχύει πολλούς μη ειδικούς αντιγονικούς ανοσολογικούς και μη-ανοσολογικούς μηχανισμούς, πολλοί εκ των οποίων επάγουν την αύξηση του όγκου. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την άμεση κυτταροτοξικότητα σε συνδυασμό με τον TNF-α,<sup>499</sup> την καθυστέρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού,<sup>458</sup> την αύξηση της παραγωγής νιτρικού οξειδίου και την αναστολή της αγγειογένεσης.<sup>457</sup> Συνεπώς η IL-12 μπορεί να ενεργοποιήσει πλειάδα αντι-ογκογενών μηχανισμών, μερικοί από τους οποίους είναι ειδικοί για κάποια αντιγόνα και άλλοι όχι.

### **Pigment epithelium-derived factor**

Πρόκειται για τον ισχυρότερο αναστολέα αγγειογένεσης στον οφθαλμό των θηλαστικών που συμμετέχει στην παθογένεση των αγγειογενών παθήσεων του οργάνου, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.<sup>459-461</sup> Η έκφραση του PEDF καταστέλλεται από την υποξία και αλλαγές του σχετίζονται με την ανάπτυξη της νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδούς σε ζωικά πειραματικά μοντέλα. Οι ιδιότητες του PEDF τον καθιστούν σημαντική πρωτεΐνη στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Η αντιαγγειογενετική του δράση είναι επιλεκτική και στοχεύει μόνο σε νεοαγγεία και όχι σε ήδη υπάρχοντα. Συνδέεται και δρά στη G<sub>0</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου.<sup>462</sup> Ο PEDF μπορεί να χορηγηθεί θεραπευτικά ως διαλυτή πρωτεΐνη ή μέσω ιογενούς διασποράς.<sup>463,464</sup> Είναι σταθερή και μη τοξική όταν χορηγείται συστηματικά. Η γονιδιακή μεταφορά του PEDF καταστέλλει την αγγείωση του όγκου και την αύξηση του, παρατείνοντας την επιβίωση σε μοντέλα ποντικών με κακοήθειες στο θώρακα.<sup>465</sup> Πρόσφατη μελέτη δείχνει πως υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχει σημαντική ισορροπία μεταξύ PEDF και VEGF, με τον πρώτο να μπορεί να καταστείλλει τη δράση του δεύτερου.

## **2-Methoxyestradiol**

Είναι ένας ενδογενής μεταβολίτης της οιστραδιόλης που αναστέλλει την αγγειογένεση με άμεση δράση στα καρκινικά κύτταρα.<sup>466</sup> Ο μηχανισμός δράσης της σχετίζεται με την ικανότητα να ενώνεται με την πλευρά σύνδεσης της κολχικίνης στην τουμπουλίνη και να αναστέλλει τη δραστηριότητα του υπεροξειδίου της δισμουτάσης.<sup>466-469</sup> Η αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων από την 2ME (2-methoxyestradiol) σχετίζεται με αναστολή στην πυρηνική συγκέντρωση και τη δραστηριότητα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (HIF-1α), οδηγώντας σε σημαντική μείωση των επιπέδων του VEGF.

## **Θραύσμα προλακτίνης**

Η προλακτίνη διασπάται ενζυμικά σε διάφορους ιστούς για να δώσει τελικά δύο επιμέρους θραύσματα μεγέθους 18kDa και 6kDa αντίστοιχα. Το θραύσμα των 18kDa έχει αντιαγγειογενετική δραστηριότητα και κυρίως ρυθμιστική. Επιπλέον αναστέλλει την ενεργοποίηση της οικογένειας γονιδίων Ras που επάγουν τον VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων.<sup>470</sup>

## **Τροπονίνη I**

Αναστολέας αγγειογένεσης που εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* σε πειραματικά μοντέλα. Είναι μια υπομονάδα του συμπλέγματος της τροπονίνης που είναι συνυπεύθυνη με την τροπομυοσίνη για την εξαρτώμενη εκ του ασβεστίου ρύθμιση της μυϊκής σύσπασης. Επίσης αναστέλλει τη μετάσταση πολλών τύπων καρκίνου σε συνθήκες *in vivo*.<sup>471</sup>

## **Ιστικοί αναστολείς των εξωκυτταρίων μεταλλοπρωτεϊνών (Matrix metalloproteinases - tissue inhibitor of metalloproteinases)**

Η επιπλέον δραστηριότητά των MMP (Matrix metalloproteinases) είναι η μέσω των TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases) ανασταλτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* και στην αγγειογένεση *in vivo*. Αυτό για να πραγματοποιηθεί απαιτείται η σύνδεσή τους με την  $\alpha_2\beta_1$  ιντεγκρίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προκαλούν συνολική μείωση της έκφρασης των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης που σχετίζονται με την  $\beta_1$  ιντεγκρίνη.<sup>472,360</sup>

## **Vasostatin**

Είναι ένα δίκτυο από αμινοξέα που θεωρείται αξιόλογος αναστολέας της αγγειογένεσης. Αναστέλει επιλεκτικά τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες και καταστέλλει συνεπώς την αύξηση του όγκου.<sup>472-474,360</sup>

## **Παράγων 4 των αιμοπεταλίων**

Πρωτεΐνη που ελευθερώνεται από τα κοκκία -α των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της συγκόλλησης τους και έχει φανεί πως έχει αντιαγγειογενετικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ανασυνδυασμένος παράγων 4 αναστέλει την αγγειογένεση μέσω άμεσης δράσης στον FGF-2 , αναστέλοντας το διμερισμό του και εμποδίζοντας τη σύνδεση του με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι ιδιότητες του αυτές έχουν σχέση με την τελική COOH- ομάδα που ενώνεται με την ηπαρίνη και πιο συγκεκριμένα με τα αμινοξέα 47-70.<sup>360</sup>

## **ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Η οικογένεια των ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων φαίνεται να αποτελούν σημαντικό στόχο στην αναστολή της αγγειακής ανάπτυξης. Η χρήση του bevacizumab, ήτοι μονοκλωνικού αντισώματος που συνδέεται στον υποδοχέα του VEGF, αποτελεί την πρώτη θεραπευτική εφαρμογή σε προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), σε συνδυασμό με την καρβοπλατίνη και την πακλιταξέλη.<sup>475</sup>

Η μεγαλύτερη κατηγορία φαρμάκων που αναστέλουν την αγγειογένεση είναι οι multi-targeted αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKI's) που στοχεύουν στον υποδοχέα του VEGF. Τα φάρμακα αυτά βρίσκονται ακόμα σε ανάπτυξη και ειδικότερα ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα υπό μελέτη. Οι παράγοντες αυτοί έχουν το πλεονέκτημα ότι χτυπούν πολλαπλούς στόχους, χορηγούνται από το-στόμα και είναι χαμηλού κόστους.

## **Bevacizumab**

Είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με τον VEGF και είναι ο πρώτος αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε ενάντια σε συμπαγείς όγκους.<sup>476</sup> Βάσει μελετών



ήταν ο πρώτος παράγοντας που ανέδειξε αύξηση της επιβίωσης όταν προστέθηκε στο κλασικό χημειοθεραπευτικό σχήμα, σε θεραπεία πρώτης γραμμής.<sup>477</sup> Το bevacizumab επίσης συνδυάστηκε με τον αναστολέα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα erlotinib που είναι ένα μόριο - αναστολέας τυροσινικής κινάσης του EGFR, μικρού μεγέθους, ενεργό για προηγουμένως θεραπευμένο NSCLC.<sup>478</sup>

## **ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΟΝ VEGFR**

Οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης του VEGFR είναι μικρά κύτταρα που ενώνονται στον υποδοχέα ATP των παραγώγων της τυροσινικής κινάσης. Οι υποδοχείς αυτοί συνδυάζονται με αρκετούς βιολογικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των VEGFR. Ειδικό TKIs (Tyrosine kinase inhibitors) των VEGFRs όπως και σε άλλους υποδοχείς που βρίσκονται υπό μελέτη, ενώ οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι οι sorafenib, sunitinib, vandetanib, AZD2171, pazopanib, axitinib, AMG706, XL6474 και enzastaurin.<sup>475</sup>

### **Sorafenib**

Το Sorafenib είναι ένας αναστολέας κινάσης raf, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-Beta, Flt-3, c-kit και p38-alpha με δραστηριότητα σε διάφορα προκλινικά μοντέλα. Μεταλλάξεις στα μονοπάτια των κινασών ras/raf, έχουν παρατηρηθεί μέχρι και στο 20% των NSCLC.<sup>479,480</sup> Αξιόλογα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε συνδυασμο sorafenib με καρβοπλατίνη και πακλιταξέλη σε προχωρημένο NSCLC.<sup>481</sup>

### **Sunitinib**

Το Sunitinib είναι ένας TKI αναστολέας που χορηγείται εκ του στόματος και δρά στους υποδοχείς VEGFR2, PDGFR, c-KIT και Flt-3. Προκλινικές μελέτες συνιστούν ότι συνδυασμένη αναστολή των PDGFR και VEGFR2 μπορεί να οδηγήσει σε αξιόλογο αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα.<sup>482</sup> Τον Ιανουάριο του 2006, ο FDA ενέκρινε τη χορήγηση του Sunitinib στη θεραπεία του γαστρεντερικού καρκίνου επί προόδου νόσου ή επί δυσανεξίας του imatinib mesylate. Η χρήση του επίσης εγκρίθηκε υπό ορισμένες προϋποθέσεις και στο νεφρικό καρκίνο.<sup>485</sup>

## **Vandetanib**

Το Vandetanib είναι ένας TKI (anilinoquinazoline εκ του στόματος χορηγούμενος) του VEGFR2, VEGFR3, RET και EGFR.<sup>483</sup> Ο συνδυασμός του με τη βασική χημειοθεραπεία έχει εκτιμηθεί σε δύο τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης II σε προχωρημένο NSCLC με ικανοποιητικά αποτελέσματα.<sup>484,485</sup>

## **AZD2171**

Πρόκειται για μικρού μεγέθους αναστολέας TKI και δη του VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR-Beta και c-Kit.<sup>486</sup> Σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα εξ ομφαλικής φλέβας, ο AZD2171 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ο οποίος επάγεται από τον VEGF και τη φωσφορυλίωση του KDR (Kinase insert domain receptor).<sup>487</sup>

## **Pazopanib**

Είναι ένας επίσης μικρός αναστολέας TKI των VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR και μονοπατιών σημάτων c-Kit.<sup>488</sup>

## **Axitinib**

Έχει αντίστοιχη δράση με τον Pazopanib και πρόσφατα μελετάται σε προκλινικές μελέτες.<sup>489</sup>

## **AMG 706**

Πρόκειται για έναν multi-kinase αναστολέα που χορηγείται εκ του στόματος και στοχεύει τους υποδοχείς του VEGF και τους PDGF, Ret και Kit. Έχει φανεί να αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε προκλινικά μοντέλα.<sup>490</sup>

## **XL647**

Είναι ένα μικρός αναστολέας του VEGFR2, EGFR, erbB2 και EphB4. Έχει φανεί ότι είναι αποτελεσματικός *in vitro* σε μεγάλο αριθμό κυτταρικών σειρών ανθρώπινων όγκων, περιλαμβανομένου και NSCLC.<sup>491</sup>

## **Enzastaurin**

Πρόκειται για ανταγωνιστικό επιλεκτικό αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης C beta (PKCB) που στοχεύει το μονοπάτι P13K/AKT και αναστέλει παράλληλα τη φωσφορυλίωση του GSK3. Σε *in vitro* καρκινικά μοντέλα φάνηκε να μειώνει τον πολλαπλασιασμό και να επάγει την απόπτωση.<sup>492</sup>

## **ΡΟΛΟΣ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

Είναι γνωστό ότι το ανοσοποιητικό σύστημα εμφανίζει πολυπλοκότητα στην αναγνώριση αντιγόνων του ιδίου οργανισμού, αλλά συγχρόνως έχει δράσεις με εξωγενή πολυδραστικά-πολυειδικά αντισώματα και αυτοαντισώματα κυρίως της τάξεως IgM έναντι ξένων αντιγόνων.<sup>510,511,512</sup>

Σήμερα θα πρέπει να συνυπολογίσουμε ότι έχει επιτευχθεί θεαματική πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών που πυροδοτούν την ανάπτυξη του καρκίνου και έχουν ταυτοποιηθεί εκατοντάδες μοριακές αλλαγές που σχετίζονται με τα κακοήθη νοσήματα. Παράλληλα έχουν αναπτυχθεί νέες εξειδικευμένες θεραπείες με σκευάσματα που στοχεύουν αυτές τις αλλαγές.<sup>513,514</sup>

Η ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος έναντι των όγκων διακρίνεται σε τρεις φάσεις

A) Αναγνώριση του καρκινικού αντιγόνου

B) Ενεργοποίηση ογκοδραστικών απαντήσεων και

Γ) Εξάλειψη των αρχικών καρκινικών εστιών ή παραμονή αυτών σε λανθάνουσα κατάσταση

Η ανοσοκαταστολή επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση πλήθους «διαλυτών παραγόντων» (IL-6, IL-10, IL-23, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  και κύτταρα MDSC-Myeloid derived suppressor cells, Tregs) με συνέπεια την ενίσχυση των ενδογενών επαγόμενων αντικαρκινικών δυνατοτήτων

του ανοσοποιητικού συστήματος γεγονός που ίσως αποτελέσει και τον στόχο της αντικαρκινικής ανοσοθεραπείας.

Η αναστολή της δράσης των ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, η συγχρόνως ενεργοποίηση των δραστικών στοιχείων όπως είναι τα κυτταροτοξικά και βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, αλλά και η ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων σε λύση μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αναμένεται να βελτιώσει σημαντικά την απόκριση των ασθενών με καρκίνο στα θεραπευτικά σχήματα.

Στα πλαίσια αυτά εντάσσονται οι βιολογικές αντικαρκινικές θεραπείες με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της σηματοδότησης μέσω EGFR, VEGF, RANKL, HER2 κτλ. και μικρομοριακών αναστολέων σηματοδοτικών μορίων.

Γενικά, η πλειονότητα των θεραπειών αυτών στοχεύει τις πρωτεϊνικές κινάσες ήτοι μόρια που μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες στα υποστρώματα τους και συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος.

Μια εξίσου ταχέως εξελισσόμενη και πολλά υποσχόμενη μέθοδος παθητικής κυτταρικής ανοσοθεραπείας του καρκίνου βασίζεται στη γενετική τροποποίηση των αυτόλογων T λεμφοκυττάρων των ασθενών ώστε να εκφράζουν χημειρικούς αντιγονικούς υποδοχείς τους λεγόμενου CARs (chimeric antigen receptors).<sup>510</sup>

Η προσέγγιση των θεραπειών αυτών στοχεύει κυρίως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με απώτερη επίτευξη την αναστολή της επαγόμενης από τον καρκίνο λεμφοκυτταρικής ανοσοκαταστολής και τελικά με την ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Η εκτίμηση και η ακριβής κατανόηση των παραγόντων του ανοσιακού συστήματος και οι χρονικές περίοδοι μεταβολής κάθε αλλαγής αυτών πριν και μετά τη θεραπεία είναι καίριας σημασίας σήμερα για οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση.

## **ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ**

Τα σημερινά δεδομένα δίνουν αισιόδοξα μηνύματα για το μέλλον όσον αφορά την αντιαγγειογενετική θεραπεία με βάση την πληθώρα των κλινικών εργασιών που γίνονται σε ειδικά κέντρα της Αμερικής και της Ευρώπης.

Οι εργασίες του Kaban και συν. αφορούν την πλήρη και διαρκή ύφεση υποτροπιάζοντος γιγαντοκυτταρικού όγκου γνάθου με τη χρήση IFN- $\alpha$ ,<sup>332</sup> τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με αυτά του Aiello και συν. που περιέγραψαν την πρώτη περίπτωση πλήρους και σταθεράς αποκαταστάσεως της όρασης πάσχοντος από αιμαγγειοβλάστωμα του οφθαλμού με αναστολέα του υποδοχέα VEGF<sup>405</sup>, αποτελούν μερικές από τις καλύτερες μέχρι σήμερα αναφορές της σημασίας που έχει η αντιαγγειογενετική θεραπευτική αγωγή.

Ο δρόμος είναι ακόμα μακρύς και οι ατέλειες των θεραπευτικών πρωτοκόλλων είναι μεγάλες. Υπάρχει άμεση ανάγκη προσδιορισμού της έκτασης της νεοαγγειογένεσης του όγκου και της χρησιμότητας της σαν στοιχείο/στόχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Θα χρειασθεί επιπλέον η ανίχνευση πιθανών νέων δεικτών αγγειογένεσης και η μελέτη της ισορροπίας αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων.

Η χορήγηση των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων σαν μονοθεραπεία στις κακοήθειες ή σε συνδυασμό με μη κυτταροτοξικούς παράγοντες για τη μείωση της τοξικότητας και την αύξηση της αποτελεσματικότητας και πιθανώς η επιλεκτική αντιαγγειογενετική θεραπεία ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο του νεοπλάσματος και το όργανο προέλευσης του, αποτελούν σήμερα εμφανείς στόχους της κλινικής έρευνας.

Με βάση τα μέχρι σήμερα στοιχεία της μικρής τοξικότητας των αντιαγγειογενετικών φαρμάκων, η χρησιμοποίηση αυτών σαν προληπτικού μέσου σε άτομα υψηλής επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου ή επί αφαίρεσης αυτού και υψηλού βαθμού υποτροπής προφανώς είναι άλλος αξιόλογος στόχος έρευνας.

Η χρήση συνδυαστικών συμβατικών μεθόδων (πχ. χειρουργική αφαίρεση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία) όσο και των ανοσολογικών μεθόδων, και η εφαρμογή τους στο κατάλληλο χρόνο και στην κατάλληλη δόση φαίνεται να είναι αποτελεσματικότερη σε σύγκριση με μεμονωμένες στρατηγικές.

Διό και θεωρείται απαραίτητη η αποκωδικοποίηση βασικών βιολογικών λειτουργιών και η μετάφραση των βιολογικών μηχανισμών σε φαρμακευτικούς τρόπους αντιμετώπισης του καρκίνου. Αξίζει ιδιαίτερα να τονισθεί πόσο σημαντική θα είναι η οποιαδήποτε πρόοδος πάνω στη γονιδιακή αντιαγγειογενετική θεραπεία που θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον ειδικά για την αναστολή ενδογενών πρωτεϊνικών ουσιών που επάγουν αγγειογένεση.

Είναι αξιοσημείωτη άλλωστε η χαρτογράφηση ουσιών των τροφών (π.χ. κατεχίνες, πολυφαινόλες, κόκκινο κρασί κ.α. με υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων που πιθανώς θα υποβοηθούσαν την πρόληψη και τις υποτροπές του καρκίνου.<sup>403</sup>

Το αύριο της ογκολογικής θεραπείας περιλαμβάνει εξατομικευμένες θεραπείες πρόληψης και αντιμετώπισης. Οι εξελίξεις στην τεχνολογία, τους υπολογιστές, τη μοριακή βιολογία, τα γονιδιακά (genomics) και τη βιοπληροφορική, είναι πλέον διακριτές και μπορούν να αποτελέσουν μια καλή αφετηρία. Η ογκολογία είναι ένας τομέας που μπορεί να αποτελέσει ιδανικό πεδίο έρευνας και εφαρμογής των παραπάνω. Έχουν ενοχοποιηθεί ξεκάθαρα άλλωστε τόσο επίκτητα αίτια όσο και συγγενείς μεταλλάξεις που επάγουν την καρκινογένεση. Συνεπώς, απαιτούνται ακόμα περισσότερες μελέτες και μεγαλύτερες δαπάνες πάνω στην έρευνα που έχει ως στόχο την αναζήτηση νέων διαγνωστικών εξετάσεων εντοπισμού πρώιμων καρκινικών κύτταρων ή καρκινικού DNA μέσω ανάλυσης των μικροσυστοιχιών του (microarray analysis). Με την εφαρμογή τέτοιων τεχνικών σε ολόένα και μεγαλύτερες ομάδες, θα αναπτυχθούν τα επιστημονικά δεδομένα στα οποία θα μπορέσουν μελλοντικά να στηριχθούν οι επιστήμονες και να αναπτύξουν νέες τεχνικές διάγνωσης και πρόληψης.<sup>515</sup>

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ**

### **ΣΚΟΠΟΣ**

Ο βασικός σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των πιθανών μεταβολών του VEGF με την επίδραση/παρεμβολή της χημειοθεραπείας, με σύγχρονη πιθανή μεταβολή βασικών ανοσολογικών παραμέτρων που επηρεάζουν την αγγειογένεση.

Παράλληλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν είχαν ως επιπλέον σκοπό την περαιτέρω μελέτη των πιθανών μεταβολών τόσο των υποδοχέων του VEGF όσο και των ανοσολογικών παραμέτρων, βάσει της ανταπόκρισής τους στη θεραπεία.

### **ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Σκοπός της μελέτης ήταν να προσδιορισθούν οι μεταβολές των υποδοχέων του VEGF (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα προ και μετά την παρεμβολή χημειοθεραπείας.

Αρχικά, προσδιορίστηκαν οι υποδοχείς του VEGF (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), προ της έναρξης της χημειοθεραπείας, στο αρχικό διαγνωστικό ιστολογικό υλικό (πρώτος προσδιορισμός). Οι ασθενείς που παρουσίασαν ικανή ανταπόκριση τέτοια που να επιτρέπει τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, υπεβλήθησαν στην κατάλληλη επέμβαση αφαίρεσης του όγκου (Πρωτοπαθούς εστίας). Το μετεγχειρητικό υλικό που ελήφθη εξετάστηκε εκ νέου ιστολογικά και πραγματοποιήθηκε δεύτερος προσδιορισμός των υποδοχέων με την ίδια τεχνική. Παράλληλα, με την εκτίμηση των ενδεχόμενων μεταβολών της εκφράσεως των υποδοχέων του VEGF μετά την παρεμβολή της χημειοθεραπείας, εκτιμήθηκαν στο ίδιο υλικό οι μεταβολές επιπλέον βασικών ανοσολογικών παραμέτρων (TNF $\alpha$ , IL6, IL8, TNF $\beta$ ).

Η ενδιάμεση ανάλυση (interim analysis) μας οδήγησε σε δύο παράλληλες μελέτες. Στην πρώτη μελετήθηκε αναδρομικά σε ιστολογικά παρασκευάσματα οι παράγοντες VEGFR1, VEGFR2 VEGFR3, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , και CD-34. Οι ασθενείς σχημάτισαν δύο ισάριθμες ομάδες, ανταποκρινόμενοι και μη ανταποκρινόμενοι, που έλαβαν το ίδιο χημειοθεραπευτικό συνδυασμό φαρμάκων με Πλατίνη-Ετοποσίδη-Πακλιταξέλη. Ο προσδιορισμός έγινε πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Στη δεύτερη μελέτη, σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, που έλαβαν το ίδιο χημειοθεραπευτικό σχήμα, και σχημάτισαν βάσει της ανταπόκρισής δύο ομάδες



(ανταποκρινόμενοι, και μη), προσδιορίστηκαν ανοσολογικά στον ορό στην αρχή, κατά τη διάρκεια και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, οι IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 και IL-12.

## **ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

### **Κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού**

Για την εισαγωγή των ασθενών στη μελέτη, έπρεπε να τηρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Ιστολογικά τεκμηριωμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις.
2. Ικανοποιητική ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία (μείωση διαστάσεων >50%).
3. Επάρκεια του ιστολογικού υλικού, προς διάγνωση και επεξεργασία, πριν και μετά την επέμβαση καθώς και μετά την παρεμβολή της χημειοθεραπείας.
4. Υποβολή των ασθενών στην ίδια θεραπευτική φαρμακευτική αγωγή με πακλιταξέλη-ιφωσφαμίδη-σισπλατίνη.
5. Διάθεση πλήρους ιατρικού φακέλου του ασθενούς, που να περιλαμβάνει ολοκληρωμένες πληροφορίες σχετικά με τα στοιχεία της πορείας νόσου.
6. Καλή γενική κατάσταση των ασθενών (90-100 κλίμακα Karnofsky), με θεωρητικό προσδόκιμο επιβίωσης >3μηνών.
7. Οι ασθενείς δεν έπρεπε να πάσχουν από σοβαρά συνυπάρχοντα νοσήματα (καρδιακή ανεπάρκεια, ισχαιμική καρδιοπάθεια, νεφρική ανεπάρκεια, ψύχωση, αγγειακή νόσο, κλπ.), να μην εμφανίζουν εγκεφαλικές μεταστάσεις, και να έχουν φυσιολογικό αιματολογικό έλεγχο, ηπατική και νεφρική λειτουργία.
8. Εκτίμηση, προ της εισαγωγής στη μελέτη, με κλινική-φυσική εξέταση, ηλεκτροκαρδιογράφημα, ακτινολογικά με αξονική τομογραφία θώρακος, άνω κοιλίας και εγκεφάλου, αιματολογικά με γενική αίματος και βιοχημικό προφίλ (χολερυθρίνη, αλκαλική φωσφατάση, τρανσαμινάσες, ουρία, κρεατινίνη, φώσφορος, ασβέστιο, σάκχαρο, ολικά λευκώματα, αλβουμίνη και ηλεκτρολύτες). Οι τιμές των εργαστηριακών παραμέτρων θα έπρεπε να κυμαίνονται σε συγκεκριμένο εύρος τιμών (ουδετερόφιλα

$>2.0 \times 10^9/L$ , αιμοσφαιρίνη  $>9.0 \text{ g/dL}$ , αριθμός αιμοπεταλίων  $\geq 100 \times 10^9/L$ ), ολική χολερυθρίνη  $<2 \text{ mg/dL}$ , τρανσαμινάσες  $\leq 3$ πλάσιο της φυσιολογικής τιμής και κρεατινίνη ορού  $\leq 1.5 \text{ mg/dL}$ .

Από την μελέτη αποκλείσθηκαν ασθενείς που δεν τηρούσαν τα παραπάνω κριτήρια εισόδου και επιπλέον:

1. Το ιστολογικό τους υλικό χαρακτηριζόταν από εκτεταμένη νέκρωση, ή ανεπαρκές.
2. Είχαν υποβληθεί ξανά κατά το παρελθόν σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία.
3. Με κυτταρολογική μόνο τεκμηρίωση της νόσου και ασθενείς με μη κατάλληλο ιστολογικό υλικό (ανεπαρκές, ακατάλληλο).

Το πρωτόκολλο της μελέτης διαμορφώνεται με βάση την έγγραφη συγκατάθεση των αρρώστων κατά το ακόλουθο πρότυπο:

#### **Έγγραφη συγκατάθεση ασθενούς**

Ο / Η υπογραφόμενος / νη .....,  
κάτοικος ..... οδού ....., τηλ.....,

πάσχων/ ουσια από μη μικροκυτταρικό νεόπλασμα πνεύμονα (στάδιο .....) δίνω την έγγραφη συγκατάθεσή μου για να χρησιμοποιηθεί τμήμα του υλικού της ιστολογικής μου βιοψίας, ή αιματολογικού μου δείγματος για ερευνητικούς σκοπούς.

Όπως μου εξηγήθηκε αναλυτικά και ξεκάθαρα από τους θεράποντες ιατρούς, η χρήση οποιουδήποτε υλικού δεν θα γίνει εις βάρος της υγείας μου και σε καμία περίπτωση δε θα επηρεάσει το διαγνωστικό εύρος οποιασδήποτε άλλης εξέτασης ή την επάρκεια του ληφθέντος υλικού για πιθανούς μελλοντικούς προσδιορισμούς στο πλαίσιο λήψεως θεραπευτικών αποφάσεων.

Το χημειοθεραπευτικό σχήμα και η συνολική ογκολογική θεραπεία στην οποία θα υποβληθώ κατά τη διάρκεια της μελέτης, μου εξηγήθηκε σαφώς ότι δε θα διαφοροποιηθεί από το προτεινόμενο - βάσει διεθνών πρωτοκόλλων - που χορηγείται σε ασθενείς με το αντίστοιχο νόσημα. Το προτεινόμενο φαρμακευτικό σχήμα από τους ιατρούς είναι η λήψη συνδυασμένου σχήματος Πλατίνας, Ετοποσίδης, Ιφωσφαμίδης. Όποτε κριθεί απαραίτητο θα υποβληθώ σε ακτινοθεραπεία ή χειρουργική αντιμετώπιση.

Ενημερώθηκα ότι θα βρίσκομαι υπό συνεχή προγραμματισμένο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο, όπως ενδείκνυται στους ασθενείς που πάσχουν από το αυτό νόσημα.

Επίσης, δίνω τη συγκατάθεσή μου να χρησιμοποιηθούν ανώνυμα στοιχεία σχετικά με την πορεία της νόσου μου σε γενόμενες επιστημονικές μελέτες και ανακοινώσεις.

## **1. Ασθενείς**

### **1α. Ομάδα ασθενών**

Σύμφωνα με τα κριτήρια εισόδου και αποκλεισμού στη μελέτη, επιλέχθηκαν ασθενείς με σημαντική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, γεγονός που τους οδήγησε σε υποσταδιοποίηση, επέμβαση και αφαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας. Τα αυστηρά κριτήρια επιλογής ασθενών αυτών, είχαν ως αποτέλεσμα τη βραδεία εξέλιξη της μελέτης.

### **1β. Χαρακτηριστικά ασθενών (Πίνακας 1)**

Συνολικά η μελέτη περιέλαβε 35 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Όλοι ήταν σταδίου IIIβ, ως αυτό ορίζεται από το σύστημα σταδιοποίησης TNM (τροποποίησης του συστήματος του 2009 - 7η έκδοση). Από τους 35 ασθενείς οι 30 (85,7%) έπασχαν από πλακώδες καρκίνωμα και οι 5 (14,3%) από αδenoκαρκίνωμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών ήταν άνδρες (94,3% έναντι 5,7% των γυναικών ασθενών), με μέσο όρο ηλικίας τα 60 έτη. Η γενική κατάσταση των ασθενών εκτιμήθηκε στο ξεκίνημα της μελέτης, με το σύστημα Karnofsky και ECOG. Οι περισσότεροι ασθενείς (43%) ήταν σταδίου 1 κατά ECOG, ενώ δεν υπήρξαν ασθενείς με ECOG >2.

**Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά ασθενών

Χαρακτηριστικά ασθενών		Αριθμός / %	
		N	%
Φύλο	Άνδρες	33	94,3
	Γυναίκες	2	5,7
Ηλικία	Μέση τιμή	60	
	Εύρος	50 – 70	
Γενική κατάσταση (ECOG)	0	10	28,5
	1	15	43
	2	10	28,5
Ιστολογικός τύπος	Πλακώδες	30	80,0
	Αδενοκαρκίνωμα	5	14,2
	Μεγαλοκυτταρικό	2	5,7
Σύνολο ασθενών με λεμφαδενική διόγκωση		18	51,4

### 1γ. Θεραπεία

Η χημειοθεραπεία έγινε στην Ογκολογική Μονάδα της Παθολογικής Φυσιολογίας στο Γ.Ν. «Λαϊκό». Η πακλιταξέλη (Taxol®) χορηγήθηκε σε 135–215 mg m<sup>-2</sup>, εντός 1 ώρας, με ενδοφλέβια (ε.φ.) χορήγηση την πρώτη ημέρα, αφού πρώτα χορηγήθηκε δεξαμεθαζόνη 20 mg, διμεθιδίνη (Fenistil®) 4 mg and ρανιτιδίνη 50 mg (όλα χορηγήθηκαν ε.φ. 1 ώρα πριν την πακλιταξέλη). Η ιφωσφαμίδη χορηγήθηκε σε ρυθμό 4.5–6.0 g m<sup>-2</sup> ε.φ., σε παραπάνω από 1 ώρα, χωρισμένη σε 2 ημέρες (1η και 2η ημέρα: 2.25–3.0 g m<sup>-2</sup> την ημέρα), μαζί με mesna (Uromitexan®) για την προστασία του ουροποιητικού. Το 40% της δόσης ιφωσφαμίδης, χορηγήθηκε ε.φ., πριν και στις 3, 6 ώρες μετά από την ιφωσφαμίδη. Η πλατίνα (Cisplatin) χορηγήθηκε με ρυθμό 80–100 mg m<sup>-2</sup> ε.φ σε 30 λεπτά, χωρισμένη σε 2 ημέρες (1η και 2η ημέρα: 40–50 mg m<sup>-2</sup> την ημέρα), με επαρκή ενυδάτωση πριν και μετά, με φουροσεμίδη και επαρκή αποκατάσταση των ηλεκτρολυτών (20 mEq κάλιο και 8 mEq μαγνήσιο ανά λίτρο το διάλυμα που χορηγήθηκε μετά). Οι τροποποιήσεις στις δόσεις για τα τρία χημειοθεραπευτικά

φάρμακα έγινε σε κάθε ασθενή βάσει της τοξικότητας που εμφάνισε στην πορεία της θεραπείας.

Σε περίπτωση μυελοτοξικότητας, τουλάχιστον βαθμού >II (όπως ορίζεται από την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization-WHO) τότε η θεραπεία αναβαλλόταν προκειμένου να αποφευχθούν περαιτέρω σοβαρότερες επιπλοκές. Επί μη εμφανίσεως σημαντικής τοξικότητας, τότε οι δόσεις των χορηγούμενων φαρμάκων παρέμεναν σταθερές. ("Common Terminology Criteria for Adverse Events". Version 4.0, 2009)

#### 1δ. Εκτίμηση ανταπόκρισης

Πρίν από τη θεραπεία, κάθε ασθενής ελέγχθηκε με πλήρη αιματολογικό έλεγχο, ηλεκτροκαρδιογράφημα, Υπολογιστική Τομογραφία θώρακος, άνω-κάτω κοιλίας και εγκεφάλου. Μεταξύ των χημειοθεραπειών, πραγματοποιούταν ο απαραίτητος κλινικο/εργαστηριακός έλεγχος. Μετά την ολοκλήρωση των τριών πρώτων χημειοθεραπευτικών κύκλων, και την ολοκλήρωση 6 κύκλων χημειοθεραπείας επαναλήφθηκε ο πλήρης αιματολογικός έλεγχος, ο ηλεκτροκαρδιογραφικός, η Υπολογιστική Τομογραφία θώρακος, άνω-κάτω κοιλίας και εγκεφάλου, προκειμένου να εκτιμηθεί επαρκώς ο βαθμός ανταπόκρισης των ασθενών. Βάσει των κριτηρίων της WHO ("*Common Terminology Criteria for Adverse Events*". Version 4.0, 2009), και την τροποποίηση της RECIST ("*Common Terminology Criteria for Adverse Events*". Version 4.0, 2009), ο βαθμός ανταπόκρισης εκτιμάται ως εξής:

- i) Πλήρης ανταπόκριση (CR - Complet Response): πλήρης εξαφάνιση όλων των κλινικών και ακτινολογικών στοιχείων στις 4 εβδομάδες από τη λήψη θεραπείας,
- ii) Μερική ανταπόκριση (PR - Partial Response), μείωση κατά 30% της μέγιστης διαμέτρου της βασικής βλάβης στις 4 εβδομάδες,
- iii) Σταθερή νόσος (Stable Disease - SD), αν δεν ικανοποιούνται τα κριτήρια των CR, PR και PD,
- iv) Εξέλιξη της νόσου (Progressive Disease - PD) αύξηση κατά τουλάχιστον 20% ή μη ύπαρξη CR, PR και SD.

## 1ε. Τοξικότητα

Η τοξικότητα εκτιμήθηκε βάσει των κριτηρίων του National Cancer Institute, και συγκεκριμένα βάσει των “Common Toxicity Criteria for Adverse Events” (CTCAE, Version 4.0 2009).

## **2. Μέθοδος**

### 2α. Συλλογή παθολογοανατομικού υλικού (Ιστολογικών τομών)

Το ιστολογικό υλικό προερχόταν από βρογχοσκόπηση ή χειρουργική επέμβαση για να τεκμηριωθεί η διάγνωση του Μη Μικροκυτταρικού Καρκίνου του Πνεύμονα. Το υλικό αυτό ακολούθησε την επεξεργασία με ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% έως το τελικό σχηματισμό κύβου παραφίνης, από όπου κόπηκαν ιστολογικές τομές προς επεξεργασία για τους ανοσοϊστοχημικούς προσδιορισμούς.

Οι τομές ήταν πάχους 4μm, και επιλέχθηκαν τομές με περιοχές πλούσιες σε καρκινικά κύτταρα, ενώ απορρίφθηκαν περιοχές με εκτεταμένη νέκρωση ή αιμορραγία. Το υλικό και η αναφερόμενη μέχρι τώρα διαδικασία έγινε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου των Αθηνών.

### 2β. Ανοσοϊστοχημεία

2β-1. Ανοσο – Ιστοχημικοί Προσδιορισμοί: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: VEGFR1/Flt1 (1:50-1:100, RP 077: Diagnostic BioSystems, CA, USA), VEGFR2/Flk1 (1:50-1:100, RP 076: Diagnostic BioSystems, CA, USA), VEGFR3/Flt4 (RP 135: Diagnostic BioSystems, CA, USA), IL-6 (80841, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), IL-8 (73321, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), TNF-α (52746, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), TNF-β (8302, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

### 2β-2. Ανοσοϊστοχημική τεχνική προσδιορισμού VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3:

Στις τομές από τους κύβους παραφίνης κάθε ασθενούς προσδιορίστηκαν με ανοϊστοχημική μέθοδο:

α) Η έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF.

β) Η έκφραση των υποδοχέων VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1, VEGFR-3/Flt-4.

Η μελέτη του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF και των υποδοχέων VEGFR, έγιναν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο στρεπταβιδίνης – αβιδίνης – βιοτίνης (LSAB). Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε και για τους μάρτυρες.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (wash buffer)
- 2) Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution)
- 3) Διαλύτες RD5K, RD6U, RD1W
- 4) Συμπλήρωμα VEGF
- 5) VEGF standard
- 6) Χρωματικά αντιδραστήρια A και B
- 7) Συσκευή microplate wells και πιπέττες πολλαπλών εξόδων

Τα αντιδραστήρια προετοιμάστηκαν με: α) ρυθμιστικό διάλυμα (διάλυμα έκπλυσης και νερό), β) substrate solution των χρωματικών αντιδραστηρίων: μείξη των αντιδραστηρίων για 15' με αποφυγή την έκθεση στο φως, γ) μείξη VEGF και RD5K.

Τα στάδια της διαδικασίας ήταν τα εξής:

1. Οι ιστολογικές τομές παραφίνης πάχους ~4μm τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για 8 ώρες στους 60°C.
2. Ακολούθησε αποπαραφίνωση των τομών με χρήση ξυλόζης στους 20° και 60°C αντίστοιχα.
3. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε κατιούσες συγκεντρώσεις αιθανόλης και απεσταγμένο νερό, προς ενυδάτωση τους.
4. Ακολούθησε τοποθέτηση των τομών σε προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος, προς αποκάλυψη των ιστικών αντιγονικών επιτόπων.
5. Δύο κύκλοι (περίοδοι) θέρμανσης σε φούρνο μικροκυμάτων 700W, 15' έκαστος κύκλος.

6. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό και σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris-buffer saline) για 10’.
7. Επώαση με την κατάλληλη αραίωση του αντισώματος στους 4°C και κατόπιν έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (2 x 10’).
8. Επώαση των τομών με χρωμογόνο διάλυμα (100μL) που περιέχει 20μL Διαμινοβενζιδίνης (DAB) εντός διαλύτη DAB Substrate Buffer (DAKO) και άμεσος έλεγχος των τομών στο οπτικό μικροσκόπιο.
9. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό και χρώση με διάλυμα αιματοξυλίνης 10% για 3’.

#### 2B-3. Ομάδα ελέγχου (Μάρτυρες)

Η ομάδα ελέγχου περιέλαβε ιστό πλακούντα και αμυγδαλών υγιών δειγμάτων, που υπεβλήθη στην ίδια επεξεργασία με την αντίστοιχη του ιστού των ασθενών της μελέτης, δηλαδή επώαση με (κατάλληλη αραίωση)(θετικός έλεγχος) και χωρίς (αρνητικός έλεγχος) αντίσωμα στους 4°C και κατόπιν έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα TBS.

#### 2β-4. Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν ξεχωριστά από δύο έμπειρους παθολογο-ανατόμους, οι οποίοι υπολόγισαν την ποσοστιαία ποσότητα κυττάρων και την ένταση της χρώσης σε κάθε τομή (1+=ήπια χρώση, 2+=μέτρια, 3+=έντονη). Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα υπολογίστηκαν πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των εντοπιζόμενων κυττάρων με την ένταση της χρώσης. Η ειδικότητα των ανοσοϊστοχημικών διαδικασιών επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας τομές για αρνητικό και θετικό έλεγχο (Μάρτυρες).

#### 2β-5. Στατιστική ανάλυση

Για την υλοποίηση της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε περιγραφική στατιστική. Τα στατιστικά μέτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συχνότητες και ποσοστά κατανομών για τις διακριτές μεταβλητές και περιγραφικά μέτρα (μέση τιμή, διάμεσος, τυπικό σφάλμα μέσου) για τις συνεχείς μεταβλητές. Σε περιπτώσεις όπου απορρίφθηκε η υπόθεση της



κανονική κατανομή με βάση τον έλεγχο Kolmogorov Smirnov, χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Wilcoxon Signed Ranks Test για τη σύγκριση των τιμών των δεικτών πριν και μετά την αγωγή. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,05$  με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS version 16.0.

### **3. Αποτελέσματα**

#### **3α. Ασθενείς**

Από 168 ασθενείς τελικά επελέγησαν για τη μελέτη 35, με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Εξ'αυτών, 33 ήταν άνδρες και 2 γυναίκες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 60 (50 – 70) έτη, ενώ ο δείκτης της γενικής τους κατάστασης (performance status, ECOG) ήταν «0» σε 10 ασθενείς, «1» σε 15 ασθενείς, και «2» σε 10 ασθενείς. Με βάση τον ιστολογικό τύπο, 30 ασθενείς (80,0%) έπασχαν από πλακώδη καρκινώματα, 5 από αδenoκαρκινώματα (14,2%) και 2 από μεγαλοκυτταρικά (5,7%). Σαφή απεικονιστική (CT) λεμφαδενική συμμετοχή στη νόσο παρατηρήθηκε σε 18 ασθενείς (51.4%). (Πίνακας 1)

Αρχικά μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων του VEGF και συγκεκριμένα οι VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 στον ιστό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, προ και μετά τη λήψη χημειοθεραπείας. Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά, ο υποδοχέας VEGFR1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον παράγοντα VEGF-A, ο VEGFR-2 επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη χημειοταξία, ενώ ο VEGFR-3 σχετίζεται περισσότερο με τη λεμφαγγειογένεση.

#### **3β. Εξετασθείσες παράμετροι αγγειογένεσης (Πίνακες 2 και 3)**

##### **VEGFR1:**

Με βάση το ποσοστό των ασθενών, παρατηρήθηκε κυρίως μειωμένη έκφραση του υποδοχέα VEGFR1 μετά τη λήψη χημειοθεραπείας. Αναλυτικότερα, το 68,6% των ασθενών παρουσίασε μείωση τιμής, το 22,9% άνοδο και στο 8,6% η τιμή διατηρήθηκε σταθερή. Η συνολική μέση τιμή του δείκτη VEGFR1 ήταν αρχικά  $12,71 \pm 1,29$  (Διάμεση 10%) έναντι  $11,14 \pm 2,05$  (Διάμεση 5%) μετά τη θεραπεία, διαφορά μη σημαντική στατιστικά ( $p\text{-value}=0,11$ ).

### VEGFR2:

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα μετά τη λήψη της χημειοθεραπείας. Το αποτέλεσμα αυτό διαφέρει από το αντίστοιχο για τον υποδοχέα VEGFR1 όπου παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών. Αναλυτικότερα, στο 65,7% των παρατηρήσεων καταγράφηκε αύξηση των τιμών του δείκτη VEGFR2, στο 17,1% μείωση και αντίστοιχο ποσοστό διατήρησης. Η μεταβολή του δείκτη VEGFR2 πριν και μετά τη χημειοθεραπεία ήταν στατιστικά σημαντική, από  $4,26 \pm 1,33$  σε  $8,80 \pm 1,46$  ( $p\text{-value}=0,01$ ).

### VEGFR3:

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα μετά τη λήψη της χημειοθεραπείας. Οι μεταβολές στο αποτέλεσμα της έκφρασης του υποδοχέα VEGFR3, είναι παρόμοιες με του υποδοχέα VEGFR1 και διαφέρουν από του VEGFR2. Ειδικότερα, στο 68,6% εντοπίστηκε μείωση τιμών, στο 25,7% αύξηση και στο 5,7% διατήρησης. Η αύξηση τιμών ήταν ενδεικτικά σημαντική ( $p\text{-value}=0,08$ ) με μέση αρχική τιμή  $24,43 \pm 1,82$  και τελική τιμή  $18,57 \pm 2,87$ .

## 3γ. Ανοσολογικοί παράμετροι (Πίνακες 2 και 3)

### TNF $\alpha$ :

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών παρατηρήθηκε μείωση των τιμών του δείκτη μετά τη χημειοθεραπεία. Συγκεκριμένα, στο 54,3% παρατηρήθηκε μείωση των τιμών του δείκτη TNF $\alpha$  μετά τη χημειοθεραπεία, έναντι αύξησης στο 25,7% και διατήρησης στο 20,0%. Η μεταβολή τιμών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p\text{-value}=0,28$ ) με μέση αρχική τιμή  $1,91 \pm 0,16$  και τελική τιμή  $1,71 \pm 0,16$ .

### IL-6:

Οι τιμές του δείκτη IL-6 δεν είχαν ιδιαίτερο πρότυπο μεταβολής μεταξύ των δύο χρονικών περιόδων. Στο 28,6% υπήρξε μείωση τιμών, στο 34,3% άνοδος και στο 37,1% διατήρηση των αρχικών τιμών, χωρίς να είναι σημαντική η μεταβολή τιμών πριν και μετά τη χημειοθεραπεία (αρχική μέση τιμή:  $1,89 \pm 0,20$  έναντι τελική μέση τιμή:  $2,03 \pm 0,22$ ,  $p\text{-value}=0,78$ ).

#### IL-8:

Χωρίς ιδιαίτερο πρότυπο μεταβολής καταγράφηκαν οι τιμές του δείκτη IL-8 μεταξύ των δύο χρονικών περιόδων, εικόνα αντίστοιχη με εκείνη της IL-6. Ειδικότερα, στο 26,5% υπήρξε μείωση τιμών, στο 32,4% άνοδο και στο 41,2% διατήρηση, χωρίς να είναι σημαντική η μεταβολή τιμών πριν και μετά τη χημειοθεραπεία (αρχική μέση τιμή:  $0,47 \pm 0,10$  έναντι τελική μέση τιμή:  $0,51 \pm 0,09$ ,  $p\text{-value}=0,84$ ).

#### TNFb:

Αντίθετα με τις προηγούμενες κυτταροκίνες IL-6, IL-8 που οι τιμές δεν τροποποιήθηκαν μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας, για το δείκτη TNFb εντοπίστηκαν μεταβολές τόσο μείωσης (48,6%) όσο και ανόδου (34,3%). Ωστόσο, οι αναφερόμενες μεταβολές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (αρχική μέση τιμή:  $1,63 \pm 0,15$  έναντι τελική μέση τιμή:  $1,29 \pm 0,15$ ,  $p\text{-value}=0,13$ ).

#### 3δ. Μεταβολές στην έκφραση των αγγειογενετικών και ανοσολογικών παραγόντων προ και μετά τη θεραπεία

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι παράλληλα με τη χορήγηση της χημειοθεραπείας και με την υποχώρηση του όγκου, παρατηρήθηκε ελάττωση της μέσης τιμής του VEGFR1 (11,14) όπως και του VEGFR3 (18,57) και αύξηση της μέσης τιμής του VEGFR2 (8,80). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ελάττωση της μέσης τιμής του VEGFR1 και VEGFR3 στο 68,6% των ασθενών, ενώ αύξηση στη μέση τιμή του VEGFR-2 παρατηρήθηκε στο 65,7% περίπου των ασθενών.

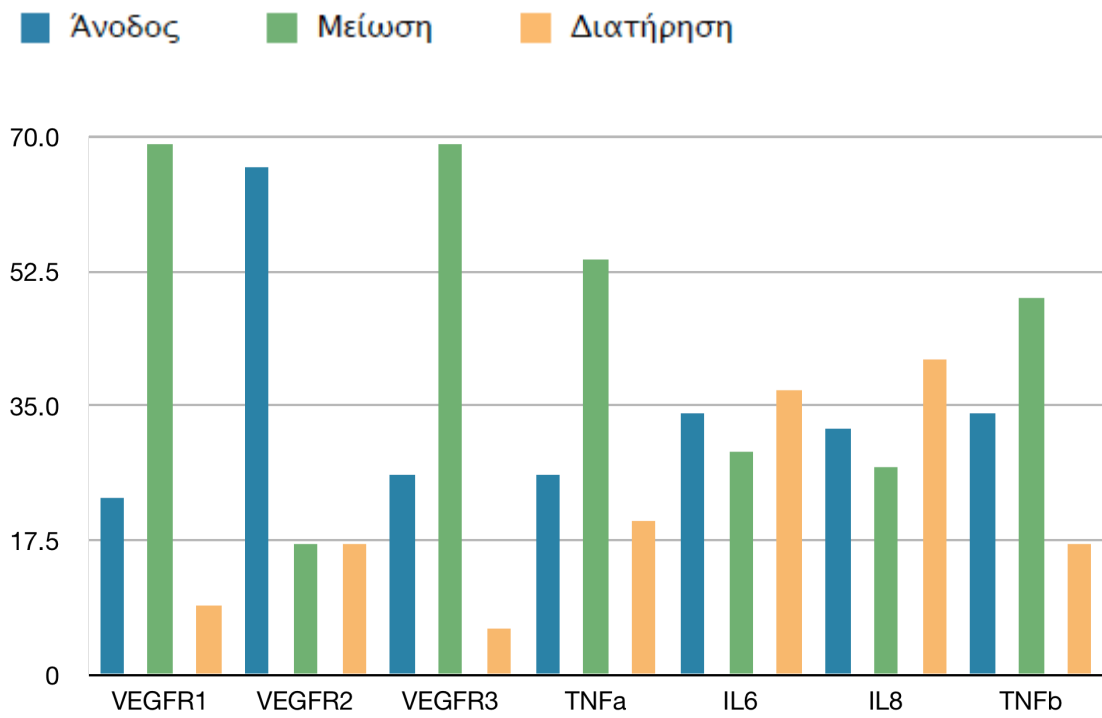
Όσον αφορά τις αλλαγές των τιμών των κυτταροκινών TNF $\alpha$ , IL6, IL8 και TNFb, προ και μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή.

**Πίνακας 2.** Σύνοψη μεταβολών στους υπό μελέτη δείκτες

<b>Ανοσολογικοί Δείκτες</b>	<b>Μεταβολή δεικτών με βάση το ποσοστό των ασθενών</b>			<b>P value</b>
<b>VEGFR1</b>	Άνοδος 23%	Μείωση 69%	Διατήρηση 9%	0,11
<b>VEGFR2</b>	Άνοδος 66%	Μείωση 17%	Διατήρηση 17%	0,01
<b>VEGFR3</b>	Άνοδος 26%	Μείωση 69%	Διατήρηση 6%	0,08
<b>TNFa</b>	Άνοδος 26%	Μείωση 54%	Διατήρηση 20%	0,28
<b>IL-6</b>	Άνοδος 34%	Μείωση 29%	Διατήρηση 37%	0,78
<b>IL-8</b>	Άνοδος 32%	Μείωση 27%	Διατήρηση 41%	0,84
<b>TNFb</b>	Άνοδος 34%	Μείωση 49%	Διατήρηση 17%	0,13

**Πίνακας 3.** Ανοσολογικοί δείκτες προ και μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας

Δείκτες	Προ Θεραπείας			Μετά Θεραπεία			p
	Μ.Τ.	Τυπικό σφάλμα	Διάμεσος	Μ.Τ.	Τυπικό σφάλμα	Διάμεσος	
VEGFR1	12,7	1,29	10	11,14	2,05	5	0,11
VEGFR2	4,26	1,33	0	8,80	1,46	5	<b>0,01</b>
VEGFR3	24,4	1,82	20	18,57	2,87	10	0,08
TNFa	1,91	0,16	2	1,71	0,16	2	0,28
IL-6	1,89	0,20	2	2,03	0,22	3	0,78
IL-8	0,47	0,10	0	0,51	0,09	1	0,84
TNFb	1,63	0,15	1	1,29	0,15	1	0,13



**Εικόνα 1:** Διακύμανση παραγόντων μετά τη χημειοθεραπεία

### **3ε. Παράλληλες μελέτες**

1. Πρότυπα έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα σταδίου III, που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με Πακλιταξέλη-Ιφωσφαμίδη-Σισπλατίνη:

Ο σκοπός της πρώτης παράλληλης μελέτης ήταν η εκτίμηση διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων σε δείγματα όγκου ασθενών με MMKP σταδίου III και η περαιτέρω ανάλυση σε σχέση με την ανταπόκριση τους σε χημειοθεραπεία με Paclitaxel-Ifosfamide-Cisplatin (TIP).

Απομονώθηκαν φρέσκα δείγματα ιστού μέσω βρογχοσκοπικής βιοψίας από 70 ασθενείς με MMKP σταδίου IIIA που δεν είχαν λάβει ξανά χημειοθεραπεία. Προσδιορίστηκαν οι παράγοντες VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3. Επίσης μετρήθηκε η μικροαγγειακή πυκνότητα μέσω προσδιορισμού των αγγειογενετικών δεικτών CD34 και CD105. Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα υπολογίστηκαν μέσω πολλαπλασιασμού του ποσοστού των προσδιοριζόμενων κυττάρων με την ένταση της χρώσης για τον κάθε παράγοντα.

Τα συνολικά αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για όλα τα δείγματα MMKP ήταν 7,83, 5,56 και 15,86 για τους υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3 αντίστοιχα. Η συνολική μέση τιμή των ενδοθηλιακών αντιγόνων CD34 ήταν 16,29, ενώ οι τιμές του CD105 είχαν ποικιλόμορφη κατανομή. Οι ασθενείς που απάντησαν στη χημειοθεραπεία είχαν σημαντικά υψηλότερη έκφραση των μέσων τιμών VEGFR-1 και VEGFR-3 σε σχέση με όσους δεν απάντησαν στη θεραπεία ( $p < 0.001$ ). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές του VEGFR-2 ( $p = 0.06$ ) ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών. Η μέση τιμή του CD34 ήταν σημαντικά αυξημένη στους ανταποκριθέντες ( $p < 0.001$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση του CD105 μεταξύ ανταποκριθέντων και μη ανταποκριθέντων ( $p = 0.07$ ).

Βάσει της μελέτης μας η έκφραση των αγγειογενετικών δεικτών φάνηκε να αποτελεί έναν εν δυνάμει προγνωστικό δείκτη της απάντησης στη θεραπεία ασθενών με σταδίου III MMKP που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

2. Τροποποίηση των περιφερικών ανοσολογικών απαντήσεων σε ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, μετά από τη λήψη θεραπείας με Πακλιταξέλη-Ιφωσφαμίδη-Σισπλατίνη:

Ο σκοπός της δεύτερης παράλληλης μελέτης ήταν η εκτίμηση των συστηματικών ανοσολογικών αντιδράσεων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Paclitaxel/ Ifosfamide/Cisplatin (TIP), ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα σταδίου III/IV. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα (ΠΜΚ) από υγιείς εθελοντές (n=20) και από ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με TIP οι οποίοι δεν είχαν λάβει ξανά χημειοθεραπεία (n=32), και μελετήθηκαν για τους ανοσολογικούς παράγοντες IL-1, TNF-α, TNF-β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 και IL-2. Παρακολουθήθηκαν περαιτέρω για χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων (τέσσερις θεραπευτικοί κύκλοι). Τα ΠΜΚ από τους ασθενείς παρήγαγαν υψηλότερες τιμές IL-1, TNF-α, TNF-β, IL-6, IL-8, IL-10 και IL-12, ενώ η τιμή της IL-2 ήταν χαμηλότερη από ότι στους υγιείς εθελοντές (p<0.001 για όλες τις παραμέτρους). Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες αυξήσεις στην τιμή της IL-2 (p<0.001), ενώ αντίθετα παρουσίασαν μειώσεις στις τιμές των IL-1 (p<0.001), TNF-α (p <0.001), TNF-β (p <0.001), IL-6 (p=0.02), IL-8 (p<0.001), IL-10 (p<0.001) και IL-12 (p<0.001). Οι μη ανταποκρινόμενοι μετά τη θεραπεία, παρουσίασαν μεγαλύτερη παραγωγή των IL-1, TNF-α, TNF-β, IL-6, IL-8, IL-10 και IL-12 και σημαντική μείωση της IL-2 (p<0.001 για όλες τις παραμέτρους). Οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία και παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση της IL-2 είχαν σημαντικά μεγαλύτερη μέση διάρκεια επιβίωσης (p-value<0.001, 26 μήνες vs. 7.5 μήνες). Το συμπέρασμα της μελέτης αυτής είναι ότι η καταγραφή των δυναμικών αλλαγών των κυτταροκινών σε στοιχεία του περιφερικού αίματος (*in vitro*) ασθενών με ΜΜΚΠ και ιδιαίτερα της IL-2, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία και εκτίμησης της συνολικής επιβίωσης.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε την έκφραση των υποδοχέων VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 σε δείγματα ιστών μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (ΜΜΚΠ), λόγω της γνωστής συσχέτισης της οικογένειας του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF με την ανάπτυξη και την πρόοδο του όγκου. Παρατηρήσαμε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της μέσης τιμής των υποδοχέων VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 στα καρκινικά κύτταρα και της υποστροφής του όγκου μετά από τη χορήγηση χημειοθεραπείας με πακλιταξέλη, ιφοσφαμίδη και cisplatin.

Συγκεκριμένα, αναλύσαμε 35 δείγματα ιστού ασθενών με ΜΜΚΠ και παρατηρήσαμε μη στατιστικά σημαντική ελάττωση της μέσης τιμής του VEGFR1 ( $p=0,11$ ) όπως και του VEGFR3 ( $p=0,08$ ) σε περίπου 69% των ασθενών, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης τιμής του VEGFR2 ( $p=0,01$ ) στο 65,7% περίπου των ασθενών μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας.

Πρόσφατες μελέτες σε μοντέλα ζώων προτείνουν ότι η σηματοδοτική οδός του VEGFR2 προστατεύει από την μεταστατική διασπορά σε καρκινοειδείς κυτταρικές σειρές (1). Παρότι ο VEGFR1 έχει περιγραφεί ως ένας αρνητικός αναστολέας της σηματοδοτικής οδού του VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα (2), κάποιες άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ο υποδοχέας αυτός στην διάρκεια άλλων καταστάσεων όπως είναι η ογκογένεση, μπορεί να θεωρηθεί ένας θετικός ρυθμιστής (3). Σε μελέτη που διεξήχθη με δείγματα καρκινικού ιστού από ασθενείς με ΜΜΚΠ σταδίου I-IIIΑ βρέθηκε ότι η αυξημένη ιστική έκφραση των υποδοχέων VEGFR1 ( $p=0,013$ ), VEGFR-2 ( $p=0,006$ ), και VEGFR-3 ( $p=0,0003$ ) αποτέλεσαν αρνητικούς προγνωστικούς δείκτες για την επιβίωση των ασθενών. Εντούτοις, στο στρωματικό όγκο η αυξημένη έκφραση των VEGFR-1 ( $p=0,01$ ), και VEGFR-2 ( $p=0,019$ ) συσχετίστηκε με καλή πρόγνωση (4). Σύμφωνα με άλλη ομάδα εργασιών σε ασθενείς με ΜΜΚΠ σταδίου I-IIIΑ παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση και των τριών υποδοχέων VEGFR-1, -2 and -3, που συσχετίστηκε σημαντικά με ελαττωμένη επιβίωση (5).

Η επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων στο ευρύτερο προφίλ αγγειογενετικών παραγόντων, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, δεν είναι απόλυτα κατανοητή. Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατη μελέτη, η έκφραση του VEGF αυξήθηκε σημαντικά ( $p=0,048$ ), ενώ του διαλυτού υποδοχέα VEGFR-2 (sVEGFR-2) ελαττώθηκε σημαντικά ( $p<0,001$ ) σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν μονοθεραπεία με βαντετανίμπη (vandetanib) την 43η ημέρα θεραπείας

(D43), ενώ ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με καρβοπλατίνη και πακλιταξέλη εμφάνισαν σημαντική ελάττωση στην έκφραση του sVEGFR-2 ( $p= 0.024$ ) την 8<sup>η</sup> ημέρα θεραπείας (D8) συγκριτικά με την αρχική τους έκφραση (6). Σε άλλη μελέτη, οι συγκεντρώσεις τόσο του διαλυτού υποδοχέα VEGFR-1 (sVEGFR-1) όσο και του αγγειογενετικού παράγοντα Tie-2 ήταν αυξημένες σε ασθενείς με MMKΠ προ χορηγήσεως χημειοθεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ μετά τη χορήγηση τεσσάρων κύκλων χημειοθεραπείας ελαττώθηκε στατιστικά σημαντικά η συγκέντρωση του sVEGFR-1 ( $p<0.001$ ) καθώς και του Tie-2 ( $p<0.001$ ). Τόσο ο sVEGFR-1 όσο και ο Tie-2 ενδεχομένως παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους μπορεί να αντανακλούν την ανταπόκριση των ασθενών στην χημειοθεραπεία (7).

Πρόσφατα οι VEGF και VEGFR-2 μελετήθηκαν ως προγνωστικοί βιολογικοί δείκτες σε ασθενείς με προχωρημένο MMKΠ στα πλαίσια ενός μεγάλου προγράμματος κλινικών δοκιμών, BATTLE (Biomarker-integrated Approaches of Targeted Therapy for Lung Cancer Elimination). Με βάση το πρόγραμμα αυτό οι ασθενείς έλαβαν τυχαιοποιημένα ερλοτινίμη (erlotinib), σοραφενίμη (sorafenib), βαντετανίμη (vandetanib) ή ερλοτινίμη/βεξαροτένη (erlotinib/bexarotene). Στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν βαντετανίμη η αυξημένη έκφραση του VEGFR-2 συσχετίστηκε σημαντικά με ευνοϊκό αποτέλεσμα (8,9).

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η χημειοθεραπεία μπορεί να αυξάνει ογκο-επαγόμενες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου ως μέρος μιας συστηματικής απόκρισης του ξενιστή. Το αίμα των ασθενών με καρκίνο που λαμβάνουν χημειοθεραπεία περιέχει αυξημένα επίπεδα αρκετών προκαρκινογόνων αυξητικών παραγόντων και κινητοποιημένων προγονικών κυττάρων μυελικής προέλευσης που μπορούν να εδρεύσουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ακολούθως να συμβάλλουν στην αγγειογένεση (10,11). Σε μια πειραματική μελέτη η επαγόμενη έκφραση του VEGFR-1, από τη χημειοθεραπεία με cisplatin και πακλιταξέλη, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, δημιούργησε ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και αύξησε σημαντικά τις πνευμονικές μεταστάσεις, καταδεικνύοντας τις δυνητικά προκαρκινογενετικές επιδράσεις της χημειοθεραπείας (12).

Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση θεραπείας με βαντετανίμη σε κύτταρα MMKΠ, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή των EGFR και VEGFR-3 (13). Η στόχευση του VEGFR-3 καθώς

και του VEGFR-2 μπορεί να αναστείλει τις δράσεις του VEGF τόσο στα ενδοθηλιακά όσο και στα καρκινικά κύτταρα.

Στη δική μας μελέτη, μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε ασθενείς με MMKΠ και υποστροφή του όγκου, παρατηρήθηκε ελάττωση της ιστικής έκφρασης του VEGFR-3 και VEGFR-1 και αύξηση της ιστικής έκφρασης του VEGFR-2. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι σε όγκους που ανταποκρίνονται στη θεραπεία (καταστροφή, υποστροφή, υποχώρηση όγκου) επάγεται η ιστική έκφραση του VEGFR-2 πιθανότατα ως απόκριση στα υψηλά επίπεδα αρκετών προκαρκινογόνων αυξητικών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένου και του VEGF που είναι ο σημαντικότερος αγγειογενετικός παράγοντας) που εδρεύουν αρχικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου και απελευθερώνονται εν συνεχεία στην κυκλοφορία. Η ελαττωμένη ιστική έκφραση των VEGFR-3 και VEGFR-1 ενδεχομένως αντανακλούν την υποχώρηση του όγκου ως απάντηση στη χημειοθεραπεία και δεν αποκλείεται να αποτελούν θετικούς προγνωστικούς δείκτες για την επιβίωση των ασθενών μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας.

Επιπλέον, μελετήσαμε τις αλλαγές στη μέση τιμή της ιστικής έκφρασης των κυτταροκινών TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 και TNF- $\beta$ , προ και μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας, με δεδομένο ότι υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως μια επιτυχημένη ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου εξαρτάται από τη συνισταμένη προ- και μετα-φλεγμονωδών κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου (14,15). Η IL-8 μάλιστα, αντιπροσωπεύει έναν από τους σημαντικότερους προφλεγμονώδεις αγγειογενετικούς διαμεσολαβητές στην ανάπτυξη και την πρόοδο του όγκου. Σε μια πειραματική μελέτη η IL-8 αναδείχθηκε ως ένας σπουδαίος αγγειογενετικός παράγοντας αφού στην ιστική έκφραση της IL-8 σε νεοπλαστικούς ιστούς από δείγματα ασθενών με MMKΠ αποδόθηκε το 42-80% της συνολικής αγγειογενετικής δραστηριότητας των όγκων αυτών (16). Η IL-8 μπορεί να εκκριθεί ως προφλεγμονώδης παράγοντας σε ανταπόκριση προς την χορήγηση χημειοθεραπείας και έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη αντίστασης στην απόπτωση ακόμη και όταν αυτή προκαλείται από το χημειοθεραπευτικό παράγοντα cisplatin (17,18). Στην παρούσα μελέτη, η μέση τιμή της ιστικής έκφρασης της IL-8 δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή προ και μετά χορηγήσεως χημειοθεραπείας.

Η IL-6 από την άλλη έχει προταθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει ως ένας αυτοκρινής ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη του ανθρώπινου καρκίνου του πνεύμονα, αφού έχει

αποδειχθεί ότι ασκεί ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών σε MMKΠ (19). Υπάρχουν όμως και αρκετές άλλες μελέτες που καταδεικνύουν τον ρόλο της IL-6 στην προστασία των καρκινικών κυττάρων από την απόπτωση. Σε μια από αυτές προτάθηκε ότι στην περίπτωση όγκων πνεύμονα με μεταλλάξεις στον EGFR η θεραπεία με ερλοτινίμη (erlotinib) δεν είναι επαρκής χωρίς την χορήγηση επιπρόσθετων θεραπειών που έχουν ως σκοπό τον έλεγχο της φλεγμονής και την ελαττωμένη βιοδιαθεσιμότητα της IL-6 ώστε να βελτιωθεί η απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με ερλοτινίμη (20). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη μέση τιμή της ιστικής έκφρασης της IL-6 μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας.

Αναφορικά με τις κυτταροκίνες TNF- $\alpha$  και TNF- $\beta$ , η συνέκφρασή τους σε όλα τα στάδια MMKΠ συσχετίστηκε με ευνοϊκό αποτέλεσμα τόσο στην ολική επιβίωση των ασθενών όσο και στην ελεύθερη προόδου νόσο. Η ευνοϊκή επίδραση των παραπάνω κυτταροκινών στο κλινικό αποτέλεσμα των ασθενών με MMKΠ θα μπορούσε να αποδοθεί στην ικανότητα αυτών των κυτταροκινών και κυρίως του TNF- $\alpha$  να προκαλεί αιμορραγική νέκρωση του όγκου (21,22). Σε πρόσφατη μελέτη, προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος των κυτταροκινών στη διαμεσολαβούμενη από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) λύση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, τα τελευταία εκτέθηκαν σε cisplatin και βινορελμπίνη (vinorelbine) και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ανάλυση για τον προσδιορισμό της έκκρισης των IL-1- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, και TGF- $\beta$  συγκριτικά με εκείνα που δεν εκτέθηκαν σε χημειοθεραπεία. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην έκκριση των παραπάνων κυτταροκινών πλην της έκκρισης της IL-8 που αυξήθηκε κατά 1.5 φορές και της έκκρισης του TGF- $\beta$  που ελαττώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (18). Στην παρούσα μελέτη με την ανταπόκριση του όγκου υποχώρησαν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF $\alpha$  και TNF- $\beta$ , χωρίς όμως η ελάττωση αυτή να ήταν στατιστικά σημαντική.

Προφανώς, τα αποτελέσματα της μελέτης μας θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και από μεγαλύτερες και εκτενέστερες μελέτες. Αναμφισβήτητα το καταληκτικό συμπέρασμα της μελέτης αυτής είναι ότι η υποχώρηση του όγκου και η ανταπόκριση των ασθενών στη χορήγηση της χημειοθεραπείας επιφέρει διακριτές μεταβολές τόσο σε αγγειογενετικούς παράγοντες όσο και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Η παρακολούθηση και καταγραφή αυτών των μεταβολών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της ολικής επιβίωσης και του σχετιζόμενου με τη θεραπεία κλινικού αποτελέσματος των ασθενών με MMKΠ που λαμβάνουν χημειοθεραπευτικά σχήματα βασισμένα σε πλατίνα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Ο προσδιορισμός των μεταβολών εκφράσεως των υποδοχέων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και βασικών ανοσολογικών παραμέτρων (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\beta$ ) σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα προ και μετά την παρεμβολή χημειοθεραπείας. Παράλληλα η διερεύνηση του ερωτήματος της χρησιμότητας των διακυμάνσεων αυτών στην αντιμετώπιση του καρκίνου στην κλινική πράξη.

**Υλικό και μέθοδοι:** Συνολικά η μελέτη περιελάμβανε 35 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα σταδίου ΙΙΒ κατά TNM (7<sup>η</sup> έκδοση). Εξ αυτών 30 (85.7%) έπασχαν από πλακώδες καρκίνωμα και οι 5 (14.3%) από αδenoκαρκίνωμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν άνδρες (94.3%) έναντι 5.7% των γυναικών με μέσο όρο ηλικίας τα 60 έτη. Η ιστολογική τεκμηρίωση πραγματοποιήθηκε με βρογχοσκοπικό ή χειρουργικό υλικό και οι ανοσοϊστοχημικοί προσδιορισμοί και τα αποτελέσματα έγιναν στο Παθολογικό Ανατομείο του Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Αποτελέσματα:** Η έκφραση των υποδοχέων VEGF και συγκεκριμένα του VEGFR1 βρέθηκε μειωμένη στο 68.6% των ασθενών μετά τη λήψη χημειοθεραπείας, αυξημένη στο 22.9% και σταθερή στο 86%. Ανάλογες μεταβολές είχαμε και στον VEGFR3 ήτοι 68.6%, 25.7% και 5.7% αντίστοιχα. Για τον υποδοχέα VEGFR2 βρέθηκε αυξημένη έκφραση στο 65.7%, μείωση στο 17.1% και σε ανάλογο ποσοστό μη μεταβολή. Οι διαφορές των τιμών αυτών ήταν μη στατιστικά σημαντικές για τον VEGFR1, ενώ αντίθετα ήταν στατιστικά σημαντικές για τους VEGFR2 ( $p < 0.01$ ) και ενδεικτικές για τον VEGFR3 ( $p < 0.05$ ) πριν και μετά τη θεραπεία. Όσον αφορά τους ανοσολογικούς δείκτες, για τον TNF $\alpha$  παρατηρήθηκε μείωση των τιμών στο 54.3% των ασθενών, αύξηση στο 25.7% και σταθερές τιμές στο 20%, ενώ για τον TNF $\beta$  τα ποσοστά ήταν 48.6%, 34.3% και 17.1% αντίστοιχα προ και μετά τη θεραπεία.

Οι ανευρεθείσες τιμές για την IL-6 βρέθηκαν μειωμένες σε ποσοστό 28.6%, αυξημένες στο 34.3% και σταθερές στο 37.1%. Για την IL-8 είχαμε αντίστοιχη εικόνα με την IL-6 ήτοι 26.5% μείωση, 32.4% αύξηση και 41.2% μη μεταβολή. Οι μεταβολές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

**Συμπέρασμα:** Η ελάττωση της ιστικής έκφρασης του VEGFR1 και VEGFR3 πιθανώς να είναι συνάρτηση της υποχωρήσεως του όγκου μετά τη χημειοθεραπεία γεγονός που πιθανώς να αποτελεί θετικό προγνωστικό δείκτη μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. Η επαγωγή της ιστικής έκφρασης του VEGFR2 σε όγκους που ανταποκρίνονται στη θεραπεία πιθανώς να σχετίζεται με υψηλά επίπεδα προκαρκινικών αυξητικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου και του VEGF που παράγονται στην κυκλοφορία μετά τη χημειοθεραπεία. Η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

## **Abstract**

**Purpose** The expression of various angiogenic factors was assessed in tumour samples of patients with stage III NSCLC before treatment and further analyzed in relation to response to Paclitaxel-Ifosfamide-Cisplatin (TIP) chemotherapy.

**Methods** Freshly isolated lung tumour specimens from 35 NSCLC chemotherapy naïve patients were sampled and analysed for vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 and VEGFR-3, Tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), Tumor growth factor-beta (TGF $\beta$ ), interleukin-6 (IL6) and IL8, before and after treatment. Immunostaining scores were calculated by multiplying the percentage of labeled cells by the intensity of staining for each examined parameter.

**Results** The overall expression of VEGF receptors and particularly of VEGFR1 was decreased in 68.6% of patients, increased in 22.9% and remained stable in 8.6% after the completion of treatment. Similar results were found for VEGFR3 (68.6% decreased, 25.7% increased and 5.7% stable). For VEGFR2 there was an important increase of the value in 65.7% of patients ( $p < 0.01$ ), as the decrease and stable values were found similar (17%). There were no statistically important differences for all immunologic parameters before and after treatment: TNF $\alpha$  (increase 54.3%, decrease 34.3%, stable 20%,  $p = 0.28$ ) TGF $\beta$  (increase 48.6%, decrease 34.3%, stable 17.1%,  $p = 0.13$ ), but no statistically important differences for IL6 (increase 34.3%, decrease 28.6%, stable 37.1%,  $p = 0.78$ ) and IL8 (increase 26.5%, decrease 32.4% and stable 41.2%,  $p = 0.84$ ).

**Conclusion** Our study identified patterns of angiogenic marker expression with predictive significance in stage III NSCLC treated with TIP chemotherapy. The decrease of VEGFR1 and VEGFR3 after treatment it is probably related to the decrease of the tumour size, as the increase of VEGFR2 values could be related to high levels of precancerous growth factors including VEGF that are released in the circulation after chemotherapy something that requires further investigation.

## **A. Βιβλιογραφία Γενικού Μέρους**



1. Hoover R. Epidemiology: tobacco and geographic pathology. In: Harris CC, editors. Pathogenesis and therapy of lung cancer. New York: Marcel Dekker, 1978. P. 3-24.
2. Hoffmann D., Hecht SS. N-nitrosornicotine in tobacco. *Science* 1974;186:265-7.
3. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-48.
4. Jemal A. Murray T. Samuels A., et al. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
5. Ochsner A., De Bakey M. Carcinoma of the lung. *Arch Surg* 1941;42:209-58.
6. American Cancer Society. Cancer facts and figures. Washington, DC:ACS 1995.
7. Johnston LD, Bachman JG, O'Malley PM. Twentieth national survey of American high school seniors and the fourth national survey of eighth and tenth grade students (Press Release). University Of Michigan, 1995.
8. National Institute of Health. Respiratory health effects of passive smoking: lung Cancer and other disorders. *NCI Monograph* 1993;4.
9. O' Rourke MA, Feussner JR, Feigl P, et al. Age trends of lung cancer stage at diagnosis: implications for lung cancer in the elderly. *JAMA* 1987;258:921-6.
10. Sherman S. Guidot CE. Feasibility of thoracotomy for lung cancer in the elderly. *JAMA* 1987;258:927-930.
11. Miller JI Jr. Physiologic evaluation of pulmonary function in the candidate for lung resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:347-51.
12. Osborne DR, Korobkin M, Ravin CE, et al. Comparison of plain radiography, conventional tomography, and computed tomography in detecting intrathoracic lymph node metastases from lung carcinoma. *Radiology* 1982;142:157-61.
13. Sugimura R, Watanabe S. Case-control study on histologically determined multiple primary lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:435-41.
14. Mountain CF, Lukeman JM, Hammar SP. Lung cancer classification: the relationship of disease extent and cell type to survival in a clinical trials population. *J Surg Oncol* 1987;35:147-56.

15. Gail MH, Eagan RT, Feld R, et al. Prognostic factors in patients with resected stage I non small cell lung cancer. *Cancer* 1984;54:1802-13.
16. Shield TW, Yee J, Conn JH, et al. Relationship of cell type and lymph node metastases to survival after resection of bronchial carcinoma. *Ann Thorac Surg* 1975;20:501-10.
17. Nagasaki R, Flehinger B, Martini N, et al. Complications of surgery in the treatment of carcinoma of the lung. *Chest* 1982;82:25-9.
18. Read RC, Scafer R, North N, et al. Diameter, cell type and survival in stage I primary non-small-cell lung cancer. *Arch Surg* 1988;123:446-9.
19. Feld R, Rubinstein L, Weisenburger T, et al. Site of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: A guide for future studies. *J Clin Oncol* 1984;2:1352-7.
20. Zhang L. Results of surgical treatment of stage I non-small-cell lung cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1993;115:209-11.
21. Kadri MA, Dussek JE. Survival and prognosis following resection of primary non small cell bronchogenic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991;79:435-9.
22. Luketich JD, Ginsberg RJ. Limited resections versus lobectomy in the treatment of stage I non small cell lung cancer. In: Pass HI (ed.). *Lung Cancer: Principles and Practice*. Philadelphia/Lippincott-Raven, Chap. 34, pg.561-66, 1996.
23. Read RC, Yoder G, Scaeffler RC. Survival after conservative resection for T1 N0 M0 non small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1990;49:391-8.
24. Leonard JE, Wang QC, Kaplan NO, et al. Kinetics of protein synthesis inactivation in human T-lymphocytes by selective monoclonal antibody-ricin conjugates. *Cancer Res* 1985;45:5263-9.
25. Bystryn JC, Bernstein P, Liu p, et al. Immunophenotype of human melanoma cells in different metastases. *Cancer Res* 1985;45:5603-7.
26. Devessa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1568-71.
27. Saccomanno G, Archer VE, Saunders RP, et al. Early indices of cancer risk among uranium miners with reference to modifying factors. *Ann NY Acad Sci* 1976;271:377-83.

28. Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. *N Engl J Med* 1994;330:159-64.
29. Ooi WL, Elston RC, Chen VW, et al. Increased familial risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:217-22.
30. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-46.
31. Little CD, Nau MM, Carney DN, et al. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983;306:194-6.
32. Funa K, Steinholtz L, Nou E, et al. Increased expression of N-myc in human small cell lung cancer biopsies predicts lack of response to chemotherapy and poor prognosis. *Am J Clin Pathol* 1987;88:216-20.
33. Yokota J, Wada M, Yoshida T, et al. Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of myc family oncogenes. *Oncogene* 1988;2:607-11.
34. Aisner SC, Finkelstein DM, Ettinger DS, et al. The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 1990;8:402-8.
35. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, et al. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991;51:1744-8.
36. Georges RN, Mukhopadhyay T, Zhang Y, et al. Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct. *Cancer Res* 1993;53:1743-6.
37. Weiner DB, Norderg J, Robinson R, et al. Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small-cell lung carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1990;50:421-5.
38. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small-cell lung cancer. *Cancer Res* 1993;53:1-4.
39. Sozzi G, Tornielli S, Tagliabue E, et al. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res* 1997;57:5207-12.

40. Sozzi G, Patorino U, Moiraghi L, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998;58:5032-7.
41. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1997;85:17-26.
42. Ji L, Fang B, Yen N, et al. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999;59:3333-9.
43. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, et al. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:4828-31.
44. Cohen MH. Signs and symptoms of bronchogenic carcinoma. In: Straus MJ, editor. *Lung cancer, clinical diagnosis and treatment*. Philadelphia: Grune and Stratton;1983.p97.
45. O'Connell RS, McLoud TC, Wilkins EW. Superior sulcus tumor: radiographic diagnosis and workup. *Am J Roentegenol* 1983;140:25-9.
46. Johnson HJ, Fantone J, Flye MW. Histological evaluation of the nodules resected in the treatment of pulmonary metastatic disease. *J Surg Oncol* 1982;21:1-4.
47. Mountain CF. Prognostic implications of the international staging system for lung cancer. *Semin Oncol* 1988;3:236-41.
48. Kondo H, Asamura H, Suemasu K, et al. Prognostic significance of pleural lavage cytology immediately after thoracotomy in patients with lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:1092-7.
49. Press OW, Livingston R. Management of malignant pericardial effusion and tamponade. *JAMA* 1988;257:1088-93.
50. Amatruda TT, Mulrow PJ, Gallagher JC, et al. Carcinoma of the lung with inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 1963;269:544-9.
51. Comis RL, Miller M, Ginsberg SJ. Abnormalities in water homeostasis in small cell anaplastic lung cancer. *Cancer* 1983;51:161-8.
52. Rassam JW, Anderson G. Incidence of paramalignant disorders in bronchogenic carcinoma. *Thorax* 1975;30:86-90.

53. Greco FA, Hainsworth J, Sismani A, et al. Hormone production and paraneoplastic syndromes. In: Greco FA, Oldham RK, Bunn PA Jr, editors. Small cell lung cancer. New York: Grune&Stratton; 1981 p177-223.
54. Broder LE, Primack A. Marker substance in bronchogenic carcinoma: a review. In: Straus MJ, editors. Lung cancer: clinical diagnosis and treatment. New York: Grune&Stratton;1983, p. 37-61.
55. Shepherd FA, Laskey J, Evans WK, et al. Cushing's syndrome associated with ectopic corticotropin production and small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:21-5.
56. Bender RA, Hansen H. Hypercalcemia in bronchogenic carcinoma. A prospective study of 200 patients. *Ann Intern Med* 1974;80:205-8.
57. Hattori M, Imura H, Matsukura S, et al. Multiple-hormone producing lung carcinoma. *Cancer* 1979;43:2429-37.
58. Blackman MR, Weintraub BD, Rosen SW, et al. Human placental and pituitary glycoprotein hormones and their subunits as tumor markers: a quantitative assessment. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:81-93.
59. Gailani S, Chu TM, Nuusbaum A, et al. Human chorionic gonadotrophins (HCG) in non-trophoblastic neoplasms. Assesment of abnormalities of HCG and CEA in bronchogenic and digestive neoplasms. *Cancer* 1976;38:1684-92.
60. Majcher S.J. et al Carcinoid Syndrome in bronchogenic carcinoma *Arch. Intern. Med.* 117-57, 1966.
61. Johnson BE, Chute JP. Extrapulmonary syndromes associated with lung tumors. In: Fishman AP, Elias JA, Grippi MI, Kaiser LR, Senior RM (eds.) *Pulmonary Diseases and Disorders*, 3rd Ed., Vol.2, Chap 116, pg. 1841-49, 1988.
62. Patel AM, Davila DG, Peters SG. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993;68:278-81.
63. Lennon VA, Lambert EH. Autoantibodies bind solubilized calcium channel-w-conotoxin complexes with small cell lung carcinoma: a diagnostic aid for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Mayo Clin Proc* 1989;64:1498-501.

64. Lambert EH, Rooke ED, Eatton LM. Myasthenic syndrome occasionally associated with bronchial neoplasm. In: Viets HR, editor. Myasthenia gravis. Springfield: Charles C. Thomas; 1961. p.362.
65. O'Neill JH, Murray NMF, Newson-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome: a review of 50 cases. *Brain* 1988;111:577-82.
66. McEvoy KM, Windebank AJ, Daube JR, et al. 3,4-diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *N Engl J Med* 1989;321:1567-72.
67. Gamou S, Shimosato Y, Shimizu N. Regulation of the epidermal growth factor receptor gene expression in a morphological variant isolated from an epidermal growth factor-deficient small-cell lung carcinoma cell line. *Cell Growth Differ* 1990;1:351-9.
68. Crossland KD, Lee VK, Chen W, et al. T-cells from tumor-immune mice nonspecifically expanded in vitro with anti-CD3 plus IL-2 retain specific function in vitro and can eradicate disseminated leukemia in vivo. *J Immunol* 1991;146:4414-20.
69. Lundh H, Nissson O, Rosen I. Current therapy of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Prog Brain Res* 1990;84:163-166.
70. Lambert EH, Lennon VA. Selected IgG rapidly induces Lambert-Eaton myasthenic syndrome in mice: complement independence and EMG abnormalities. *Muscle Nerve* 1988;11:1133-6.
71. Brennan LV, Craddock PR. Limbic encephalopathy as a nonmetastatic complication of oat cell lung cancer. Its reversal after treatment of the primary lung lesion. *Am J Med* 1983;75:518-21.
72. Lennon VA, Sas DF, Busk MF, et al. Enteric neuronal autoantibodies in pseudo-obstruction with small cell lung carcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:137-42.
73. Anderson HA, Prakash UBS. Diagnosis of symptomatic lung cancer. *Semin Respir Med* 1982;3:165-9.
74. Schuffer MD, Baird HW, Fleming CR, et al. Intestinal pseudo-obstruction as the presenting manifestation of small-cell carcinoma of the lung: a paraneoplastic neuropathy of the gastrointestinal tract. *Ann Intern Med* 1983;98:129-34.

75. Fraser-Muller-Colman-Pan: Diagnosis of diseases of the chest 4th ed. Saunders vol II pp 1069-1228, 1999.
76. Anderson NE, Rosenblum MK, Graus FW, et al. Autoantibodies in paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. Neurolog 198;38:1391-4.
77. Dalmau JD, Furneaux HM, Gralla RJ. Detection of the antiHu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer. A quantitative Western blot analysis. Ann Neurol 1990;27:544-8.
78. Medsger TA et al: The epidemiology of polymyositis, Am J Med 48: 715-723, 1970.
79. MacDonald RA, Robbins SL. The significance of nonbacterial thrombotic endocarditis: an autopsy and clinical study of 78 cases. Ann Intern Med 1957;46:255-9.
80. Fraser et al: Diagnosis of Diseases of the Chest, 4th ed. Sounders Vol II, pp1069-1228, 1999, McMahon et al: Persistent lymphocytopenia as diagnostic feature of bronchogenic carcinoma 78:583, 1980.
81. Ascensao J et al: Leukocytosis and large cell lung cancer: a frequent association, Cancer 60; 903, 1987.
82. Kodama T et al: Large cell carcinoma of the lung associated with marked eosinophilia: Cancer 54: 2313, 1984.
83. Pedersen LM, Milman N, Prognostic significance of thrombocytosis in patient with primary lung cancer, Eur Resp. J. 9: 1926, 1996.
84. Silvis SE, Turkbash N, Doscherholmen A. Thrombocytosis in patients with lung cancer. JAMA 1970;211:1852-6.
85. Coon WW. Risk factors in pulmonary embolism. Surg Gynecol Obstet 1976;143:385-8.
86. Gore JM, Appelbaum JS, Greene HL, et al. Occult cancer in patients with acute pulmonary embolism. Ann Intern Med 1982;96:556-60.
87. Belt RJ, Leite C, Haas CD, et al. Incidence of hemorrhagic complications in patients with cancer. JAMA 1978;239:2571-7.
88. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. Blood 1983;62:14-9.

89. Hansen-Flascen J, Nordberg J. Clubbing and hypertrophic osteoarthropathy. *Clin Chest Med* 1987;8:287-94.
90. Parkash UBS. Hypertrophic pulmonary osteoarthropathy and clubbing. In: Sackner MA, Wanner A, editors. *Weekly update: pulmonary medicine*. Princeton, NJ: Biomedica; 1978, p.2.
91. Greenfield G.B. et al: The various roentgen appearances of pulmonary hypertrophic osteoarthropathy *A.J.R.* 101; 127, 1967
92. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
93. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977;15:53–65.
94. Klagsbrun M, Moses M. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999;6:R217–R224.
95. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, et al. Mechanisms of neovascularization: vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* 1984;51:624–34.
96. Hudlická O. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circ Res* 1982;50:451–61.
97. Folkman J, Brem H. Angiogenesis and Inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1992. p. 821–39.
98. Coman DR, Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumor implants. *Am J Pathol* 1946;22:821–31.
99. Hoppeler H, Kayar SR. Capillarity and oxidative capacity of muscles. *News Physiol Sci* 1988;3:113–6.
100. Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *AJR Am J Roentgenol* 1939;42:891–9.
101. Algire GH, Legallais FY. Growth rate of transplanted tumors in relation to latent period and host vascular reaction. *Cancer Res* 1947;7:724.
102. Warren BA. The vascular morphology of tumors. In: Peter-son H-I, editor. *Tumor blood*



- circulation: angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental human tumors. Florida: CRC Press; 1979. p. 1–47.
103. Algire GH, Chalkely HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo: I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945;6:73–85.
  104. Day ED. Vascular relationships of tumor and host. *Prog Exp Tumor Res* 1964;4:57–97.
  105. Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspect Biol Med* 1985; 29:10–36.
  106. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182–6.
  107. Folkman J, Long DM, Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 1963;16:453–67.
  108. Folkman J. The intestine as an organ culture. In: Burdette WJ, editor. *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*. Springfield, IL: CC Thomas; 1970. p. 113–27.
  109. Folkman J. Antiangiogenesis. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. *Biologic therapy of cancer*. Philadelphia: Lippincott, 1991. p. 743–53.
  110. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275–88.
  111. Folkman J. Angiogenesis. In: Jaffe EA, editor. *Biology of endothelial cells*. Boston, MA: Nijhoff; 1984. p. 412–28.
  112. Klagsbrun M, Knighton D, Folkman J. Tumor angiogenesis activity in cell grown in tissue culture. *Cancer Res* 1976;36:110–4.
  113. Auerbach R, Arensman R, Kubai L, Folkman J. Tumor-induced angiogenesis: lack of inhibitor by irradiation. *Int J Cancer* 1975;15:241–5.
  114. Folkman J, Cotran RS. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 1976;16:207–48.
  115. Folkman J. The vascularization of tumors. *Sci Am* 1976;234:58–73.
  116. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer*

- Inst 1990;82:4–6.
117. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727–39.
  118. Adam JA, Maggelakis AA. Diffusion of regulated growth characteristics of a spherical prevascular carcinoma. *Bull Math Biol* 1990;52:549–82.
  119. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multi-cell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1971;46:113–20.
  120. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149–53.
  121. Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:253–66.
  122. Brem S, Brem H, Folkman J, et al. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* 1976;36:2807–12.
  123. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974;34:2109–13.
  124. Lien W, Ackerman NB. The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber. *Surgery* 1970;68:334–40.
  125. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58–61.
  126. Skinner SA, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990;50:2411–7.
  127. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994–8.
  128. Ingber DM, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990;348:555–7.
  129. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Wells SA Jr, Sharp PA. *Accomplishments in cancer research*. Philadelphia, PA: JB Lippincott Williams and Wilkins; 1998. p. 32–44.

130. Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991;51:6180–4.
131. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362:841–4.
132. Plate KH, Breier G, Millauer B, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1993;53:5822–7.
133. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, et al. Integrin  $\alpha v\beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157–64.
134. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999;285:1926–8.
135. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Med* 2001;7:1194–201.
136. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28:149–250.
137. Nicolson GL. Cancer metastasis. *Sci Am* 1979;240:66–76.
138. 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.
139. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med* 1996;2:689–92.
140. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277–85.
141. O'Reilly MS, Brem H, Folkman J. Treatment of murine hemangioendotheliomas with the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *J Pediatr Surg* 1994;30:325–30.
142. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental

- cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404–7.
143. Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001;276:15240–8.
  144. Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000;275:21340–8.
  145. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R. Two RGD-independent  $\alpha\beta 3$ -integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* 2000;275:23745–50.
  146. Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, et al. Extracellular matrix-derived peptide binds to  $\alpha\beta 3$ -integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:31959–68.
  147. Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, et al. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* 2002;295:140–3.
  148. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap; a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11393–8.
  149. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367:576–9.
  150. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582–4.
  151. Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, et al. Oncogenic Hras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:861–6.
  152. Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 1988;7:143–188.
  153. Weinstat-Saslow D, Steeg PS. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* 1994;8:401–7.
  154. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* 1983;221:281–3.
  155. Moscatelli D, Gross JL, Rifkin DB. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells [abstract]. *J Cell Biol*

- 1981;91:201a.
156. Nagy JA, Brown LF, Senger DR, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta* 1989;948:305–26.
  157. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995;1:27–31.
  158. Chambers AF. The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncol Res* 1999;11:161–8.
  159. Udagawa T, Fernandez A, Achilles E-G, et al. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB J* 2002;16:1361-70.
  160. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1–8.
  161. Hicks RM, Chowanec J. Experimental induction, histology, and ultrastructure of hyperplasia and neoplasia of the urinary bladder epithelium. *Int Rev Exp Pathol* 1978;18:199–280.
  162. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875–87.
  163. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401–9.
  164. Fang J, Shing Y, Wiederschain D, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is required for the switch to the angiogenic phenotype in a novel tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000.;97:3884-9.
  165. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and PO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997;3:177–82.
  166. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 1998;394:485–90.

167. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:263–77.
168. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356–62.
169. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353–64.
170. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, et al. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457–68.
171. Asahara T, Takahashi T, Masuda h, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999;18:3964–72.
172. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994;54:800–4.
173. McDonald D, Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000;156:1363-80.
174. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
175. Shi Q, Rafii S, Wu MH-D, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362–7.
176. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105:1527–36.
177. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000;105(1):17–9.
178. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–8.
179. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12.

180. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001;193:1004–14.
181. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354–60.
182. Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone marrow microenvironment. *Nature Med* 2002;8:841–9.
183. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625–37.
184. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337–46.
185. Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982;297:307–12.
186. Gao D et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenesis switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008 319:195-198.
187. Ito H, Rovira II, Bloom ML, et al. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 1999;59:5875–7.
188. Monestiroli S, Mancuso P, Burlini a, et al. Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:4341–4.
189. Bertolini F, Mingrone W, Alietti A, et al. Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis. Analysis of clinical results and of surrogate angiogenesis markers. *Ann Oncol* 2001; 12:987–90.
190. Verheul HMW, Pinedo HM. Tumour growth: a putative role for platelets? *Oncologist* 1998;3:ii.
191. Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K, et al. Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* 2000;96:4216–21.

192. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992;3:65–71.
193. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000;103:481–90.
194. Kadish JL, Butterfield CE, Folkman J. The effect of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tissue Cell* 1979;11:99–108.
195. Schulze-Osthoff K, Risau W, Vollmer E, Sorg C. In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 1990;137:85–92.
196. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Important advances in oncology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1985. p. 42–62.
197. Murray JC. *Angiogenesis protocols*. New Jersey: Humana Press; 2001. novel heparin-binding growth factor specific for vascuCell 1998;92:735–45.
198. 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. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:356–61.
199. Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, et al. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. *Lancet* 1994;344:82–6.
200. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983–5.
201. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, et al. A heparin-binding angiogenic protein–basic fibroblast growth factor–is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988;130:393–400.
202. Paulus W, Grothe C, Sensenbrenner M, et al. Localization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human-brain tumors. *Acta Neuropathol* 1990;79:418–23.
203. Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, et al. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neurosurg* 1992;76:792–8.
204. Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM, et al. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine of patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Res*



- 1988;48:2083–8.
205. Vlodavsky I, Bashkin PK, Korner G, et al. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: relevance to angiogenesis and metastasis. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1990;31:491–3.
  206. Polverini P, Leibovich S. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor associated macrophages. *Lab Invest* 1984;51:635–42.
  207. Soutter AD, Nguyen M, Watanabe H, Folkman J. Basic fibroblast growth factor secreted by an animal tumor is detectable in urine. *Cancer Res* 1993;53:5297–9.
  208. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851–5.
  209. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In: Goldberg ID, Rosen E, editors. *Control of angiogenesis*. Berlin: Birkhauser Verlag; 1997. p. 233–69.
  210. Otani N, Minami S, Yamoto M, et al. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3845–51.
  211. 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. *Am J Pathol* 1993;143:1255–62.
  212. Inoue M, Hager JH, Ferrara N, et al. VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell* 2002;1:193–202.
  213. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, et al. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenografts growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000;60:6253–8.
  214. Folkman J, Gimbrone MA Jr. Perfusion of the thyroid. In: *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproduction Endocrinology, 4th Symposium: Perfusion Techniques*. Edited by E. Diczfalusy. Stockholm: Karolinska Institutet, 1971, p. 237–

- 248.
215. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175:408–16.
216. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Comm* 1992;187:1579–86.
217. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3566–70.
218. Chang L, Kaipainen A, Folkman J. Lymphangiogenesis. New mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 2002;979:111–9.
219. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735–45.
220. Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, et al. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its blb2 domain. *J Biol Chem* 2002;277:24818–25.
221. Plate K, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992;359:845–8.
222. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031–7.
223. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595–9.
224. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, et al. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1996;56:2299–301.
225. Gnarr JR, Zhou S, Merrill MJ, et al. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene.

- Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:10589–94.
226. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of angiogenesis. In: Teicher BA, editor. *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. New Jersey: Humana Press; 1999. p. 119–42.
  227. Folkman J, D'Amore P. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153–5.
  228. Gately S, Twardowski P, Stack MS, et al. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10868–72.
  229. Thurston G, Suri C, Smith K, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999;286:2511–4.
  230. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
  231. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:24–33.
  232. Kerbel RS, Vitoria-PetitA, Okada F, Rak J. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 1998;4:286–95.
  233. Rak J, Yu JL, Kerbel RS, Coomber BL. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res* 2002;62:1931–4.
  234. Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, et al. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:208–13.
  235. Sherif ZA, Nakai S, Pirollo KF, et al. Down-modulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function. *Cancer Gene Ther* 2001;8:771–82.
  236. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev* 2000;14:34–44.
  237. Zhang L, Zu D, Hu M, et al. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000;60:3655–61.
  238. Kerbel RS. Inhibition of tumour angiogenesis as a strategy to circumvent acquired

- resistance to anticancer therapeutic agents. *Bioessays* 1991;13:31–6.
239. Stetler-Stevenson WG, Krutzch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2). A new member of the metalloproteinases inhibitor family. *J Biol Chem* 1989;264:17374–8.
240. Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 1990;248:1408–10.
241. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285:245–8.
242. Eder JP Jr., Supko JG, Clark JW, et al. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol* 2002; 18:3772–84.
243. Brouty Boye D, Zetter BR. Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 1980;208:516–28.
244. Maione TE, Gray GS, Petro J, et al. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 1990;247:77–9.
245. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogen activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:15059–65.
246. Dvorak HF, Gresser I. Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:497–502.
247. Bouck N. Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 1990;2:179–85.
248. Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Br Cancer Res Treat* 1995;36:119–26.
249. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumorgrowth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(22):12485–90.

250. Gimbrone MA Jr, Leapman S, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136:261–76.
251. O'Reilly M, Rosenthal R, Sage EH, et al. The suppression of tumor metastases by a primary tumor. *Surg Forum* 1993;44:474–6.
252. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, et al. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *JBiol Chem* 1999;274:29568–71.
253. Tarui T, Majumdar M, Miles LA, et al. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of Angiostatin. *J Biol Chem* 2002;277:33564–70.
254. Streit M, Riccardi L, Velasco P, et al. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14888–93.
255. Indraccolo S, Morini M, Gola E, et al. Effects of angiostatin gene transfer on functional properties and in vivo growth of Kaposi's sarcoma cells. *Cancer Res* 2001;61:5441–6.
256. Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, et al. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6367–72.
257. Lay AJ, Jiang XM, Dal E, et al. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *J Biol Chem* 2002;277:9062–8.
258. Abad MC, Geiger J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human Angiostatin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002;58(Pt 3):513–4.
259. Indraccolo S, Gola E, Rosato A, et al. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon- $\alpha$ (1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther* 2002;9:867–78.
260. Gyorffy S, Palmer K, Gauldie J. Adenoviral vector expressing murine Angiostatin inhibits a model of breast cancer metastatic growth in the lungs of mice. *Am J Pathol* 2001;159:1137–47.
261. Sacco MG, Cato EM, Ceruti R, et al. Systemic gene therapy with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice.

- Gene Ther 2001;8:67–70.
262. Hampl M, Tanaka T, Albert PS, et al. Therapeutic effects of viral vector-mediated antiangiogenic gene transfer in malignant ascites. *Human Gene Ther* 2001;12:1713–29.
  263. Kim JM, Ho SH, Park EJ, et al. Angiostatin gene transfer as an effective treatment strategy in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:793–801.
  264. Raisler BJ, Berns KI, Grant MI, et al. Adeno-associated virus type-2 expression of pigmented epithelium-derived factor or Kringles 1-3 of Angiostatin reduce retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8909–14.
  265. Lai CC, Wu WC, Chen SL, et al. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing Angiostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2401–7.
  266. Dabrosin C, Gyorffy S, Margetts P, et al. Therapeutic effect of Angiostatin gene transfer in a murine model of endometriosis. *Am J Pathol* 2002;161:909–18.
  267. Hajitou A, Grignet C, Devy L, et al. The antitumor effect of endostatin and Angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cell. *FASEB J* 2002;16:1802–4.
  268. Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, et al. Angiostatin potentiates cyclophosphamide treatment of metastatic disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:412–8.
  269. Sun X, Kanwar JR, Leung E, et al. Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently effects on vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Gene Ther* 2001;8:719–27.
  270. te Velde EA, Vogten JM, Gebbink MF, et al. Enhanced anti-tumour efficacy by combining conventional chemotherapy with Angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg* 2002;89:1302–9.
  271. Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, et al. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis*. 2001;4(4):263–8.
  272. Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, et al. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation* 2002;105:2185–91.

273. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasm's engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998;188:755–63.
274. Camphausen K, Moses MA, Beecken W-D, et al. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res* 2001;61:2207–11.
275. Kwon M, Yoon CS, Fitzpatrick S, et al. p22 Is a novel plasminogen fragment with antiangiogenic activity. *Biochemistry* 2001;40:13246–53.
276. Sertie AL, Sossi V, Camargo AA, et al. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Human Mol Genet* 2000;9:2051–8.
277. Suzuki OT, Sertie AL, Der Kaloustian VM, et al. Molecular analysis of collagen XVIII reveals novel mutations, presence of a third isoform, and possible genetic heterogeneity in Knobloch syndrome. *Am J Hum Genet* 2002;71(6):1320-1-9.
278. Fukai N, Eklund L, Marneros AG, et al. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J* 2002;21:1535–44.
279. Tuszynski GP, Sharma MR, Rothman VL, Sharma MC. Angiostatin binds to the tyrosine kinase substrate annexin II through the lysine-binding domain in endothelial cells. *Microvasc Res* 2002;64:448–62.
280. Moser TL, Stack MS, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2811–6.
281. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of Angiostatin with integrin  $\alpha\beta 3$  in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:39562-8.
282. Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, et al. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* 2001;152:1247–54.
283. Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, et al. Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled - coil and PDZ binding domains. *Gene* 2002;298:69–77.
284. Wajih N, Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor

- in endothelial and smooth muscle cells. *Blood* 2002;101:1857-63.
285. Wahl ML, Owen CS, Grant DS. Angiostatin induces intracellular acidosis and anoikis in endothelial cells at a tumor-like low pH. *Endothelium* 2002;9:205-16.
286. Oh SP, Kamagata Y, Muragaki Y, et al. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4229-33.
287. Obeso J, Weber J, Auerbach R. A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology. *Lab Invest* 1990;63:259-69.
288. Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J* 1998;17:1656-64.
289. Ding Y-H, Javaherian K, Lo K-M, et al. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10443-8.
290. Wen W, Moses MA, Wiederschain D, et al. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 1999;59:6052-6.
291. Felbor U, Dreier L, Bryant RAR, et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000;19:1187-94.
292. Miosge N, Sasaki T, Timpl R. Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *FASEB J* 1999;13:1743-50.
293. Sasaki T, Larsson H, Tisi D, et al. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol* 2000;301:1179-90.
294. Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* 2001;20:337-45.
295. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, et al. Identification of a natural soluble Neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: in vivo expression and anti-tumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2573-8.
296. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-b2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;93:741-53.



297. Kasai S, Nagasawa H, Shimamura M, et al. Design and synthesis of antiangiogenic/heparin-binding arginine dendrimer mimicking the surface of endostatin. *Bioorg Med Chem Lett* 2002;12:951–4.
298. Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, et al. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1999;18:6240–8.
299. Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27872–9.
300. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141:1659–73.
301. Shuster CB, Herman IM. The mechanics of vascular cell motility. *Microcirculation* 1998;5:239–57.
302. Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. *Cancer Res.* 2002;62(7):1944–7.
303. Ergun S, Kilic N, Wurnbach JH, et al. Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis* 2001;4:193–206.
304. Ma L, Elliott SN, Cirino G, et al. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11):6470–5.
305. Lee SJ, Jang JW, Kim YM, et al. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett* 2002;519(1-3):147–52.
306. Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1024–9.
307. Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, et al. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16464–9.

308. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721–6.
309. Xu R, Yao ZY, Xin L, et al. NC1 domain of human type VIII collagen (alpha 1) inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(1):264–8.
310. 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.
311. Morales-Ruiz M, Lee M-J, Zollner S, et al. Sphingosine 1 phosphate activates akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:19672–7.
312. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer inst* 1998;90:587–96.
313. Wu P, Yonekura H, Li H, et al. Hypoxia down-regulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(5):1149–54.
314. Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001;86:23–33.
315. Möhle R, Green D, Moore MAS, et al. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:663–8.
316. Ma L, Hollenberg MD, Wallace JL. Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor-4 (PAR4) antagonist. *Br J Pharmacol*. 2001;134(4):701–4.
317. Tepper OM, Murayama T, Kearney M, et al. Therapeutic neovascularization as a novel approach to thrombus recanalization and resolution [abstract 324]. *Circulation* 2002;106:II-65.
318. Ma L, del Soldato P, Wallace JL. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: shifting the angiogenic balance. *Proc Natl Acad Sci USA*.

- 2002;;99(20):13243–7.
319. Perletti G, Concari P, Giardini R, et al. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res* 2000;60(7):1793–6.
  320. Huang X, Wong MK, Zhao Q, et al. Soluble recombinant endostatin purified from *Escherichia coli*: antiangiogenic activity and antitumor effect. *Cancer Res* 2001;61(2):478–81.
  321. He ZY, Chen ZY, Qiu CP, et al. Cloning, expression and tumor suppression of human endostatin. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 2000;32:333–6.
  322. Calvo A, Yokoyama Y, Smith LE, et al. Inhibition of the mammary carcinoma angiogenic switch in C3(1)/SV40 transgenic mice by a mutated form of human endostatin. *Int J Cancer*. 2002;101(3):224–34.
  323. Yokoyama Y, Green JE, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 2000;60(16):4362–5.
  324. Bergers G, Javaherian K, Lo KM, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999;284(5415):808–12.
  325. Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, et al. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res* 2000;60(8):2190–6.
  326. Hanna NN, Seetharam S, Mauceri HJ, et al. Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation. *Cancer J* 2000;6:287–93.
  327. Davidoff AM, Leary MA, Ng CY, et al. Autocrine expression of both endostatin and green fluorescent protein provides a synergistic antitumor effect in a murine neuroblastoma model. *Cancer Gene Ther* 2001;8(7):537–45.
  328. Feldman AL, Alexander HR, Hewitt SM, et al. Effect of retroviral endostatin gene transfer on subcutaneous and intraperitoneal growth of murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1014–20.
  329. Yamanaka R, Zullo SA, Ramsey J, et al. Induction of therapeutic antitumor antiangiogenesis by intratumoral injection of genetically engineered endostatin-producing Semliki Forest virus. *Cancer Gene Ther* 2001;8(10):796–802.

330. Peroulis I, Jonas N, Saleh M. Antiangiogenic activity of endostatin inhibits C6 glioma growth. *Int J Cancer* 2002;97(6):839–45.
331. Jin X, Bookstein R, Wills K, et al. Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2001;8(12):982–9.
332. Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, et al. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res* 2000;60:1503–6.
333. Blezinger P, Wang J, Gondo M, et al. systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene therapy. *Nature Biotech* 1999;17:343–8.
334. Lefesvre P, Attema J, van Bekkum D. Adenoviral gene transfer of angiostatic ATF-BPTI inhibits tumour growth. *BMC Cancer.* 2002;2(1):17.
335. Eisterer W, Jiang X, Bachelot T, et al. Unfulfilled promise of endostatin in a gene therapy-xenotransplant model of human acute lymphocytic leukemia. *Mol Ther.* 2002;5(4):352–9.
336. Pawliuk R, Bachelot T, Zurkiya O, et al. Continuous intravascular secretion of endostatin in mice from transduced hematopoietic stem cells. *Mol Ther.* 2002; 5(4):345–51.
337. Kuo CJ, LaMontagne KR Jr, Garcia-Cardena G, et al. Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain. *J Cell Biol.* 2001;152(6):1233–46.
338. Brantley DM, Cheng N, Thompson EJ, et al. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 2002;21:7011–26.
339. Sarma V, Wolf FW, Marks RM, et al. Cloning of a novel tumor necrosis factor- $\alpha$ -inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro. *J Immunol* 1992;148:3303–12.
340. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784–7.
341. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 1996;274:782–4.

342. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945–54.
343. Carmeliet P. Biomedicine. Clotting factors build blood vessels. *Science* 2001;293:1602–4.
344. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem* 1999;274:23969–76.
345. Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827–37.
346. Dezube BJ, Von Roenn JH, Holden-Wiltse J, et al. Fumagillin analog in the treatment of Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS clinical trial group study. AIDS clinical trial group no. 215 team. *J Clin Oncol* 1998;16:1444–9.
347. Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, et al. The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. *J Surg Res.* 2000;91(1):26–31.
348. Zorick TS, Mustacchi Z, Bando SY, et al. High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. *Eur J Hum Genet* 2001;9(11):811–4.
349. Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 2002;359:1019–25.
350. Madri JA. Extracellular matrix modulation of vascular cell behaviour. *Transpl Immunol* 1997;5:179–83.
351. Furcht LT. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest* 1986;55:505–9.
352. Kalluri R. Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and endogenous inhibitors of angiogenesis. Cold Spring Harbor 67<sup>th</sup> Quantitative Symposium, New York, 2002;in press.
353. Petitclerc E, Boutaud A, Prestayko A, et al. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:8051–61.

354. Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 2000;60:2520–6.
355. 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 USA* 1997;94:13612–7.
356. Pozzi A, LeVine WF, Gardner HA. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:272–81.
357. 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 USA* 2000;97:2202–27.
358. Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000;275: 1209–15.
359. Aiello LP, George DJ, Cahill MT, et al. Rapid and durable recovery of visual function in a patient with von Hippel-Lindau syndrome after systemic therapy with vascular endothelial growth factor receptor inhibitor SU5416. *Ophthalmology* 2002;109:1745–51.
360. Nyberg P, Xie L, Kalluri R., Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):3967-79.
361. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):157-8.6) Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Apr;33(4):357-69. Review.
362. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct;8(5):618-24.
363. Madri JA. Extracellular matrix modulation of vascular cell behaviour. *Transpl Immunol.* 1997 Sep;5(3):179-83.
364. Grant DS, Kibbey MC, Kinsella JL, Cid MC, Kleinman HK. The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract.* 1994 Oct;190(9-10):854-63.
365. Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R,

- Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2520-6.
366. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. 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 Dec 9;94(25):13612-7.
367. Bloch W, Forsberg E, Lentini S, Brakebusch C, Martin K, Krell HW, Weidle UH, Addicks K, Fässler R. Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol.* 1997 Oct 6;139(1):265-78.
368. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin  $\alpha 1$  knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 29;97(5):2202-7.
369. Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem.* 2000 Jan 14;275(2):1209-15.
370. Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Sep 26;278(39):37632-6. Epub 2003 Jul 22.
371. Monboisse JC, Garnotel R, Bellon G, Ohno N, Perreau C, Borel JP, Kefalides NA. The  $\alpha 3$  chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1994 Oct 14;269(41):25475-82.
372. Han J, Ohno N, Pasco S, Monboisse JC, Borel JP, Kefalides NA. A cell binding domain from the  $\alpha 3$  chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20395-401.
373. Shahan TA, Ziaie Z, Pasco S, Fawzi A, Bellon G, Monboisse JC, Kefalides NA. Identification of CD47/integrin-associated protein and  $\alpha(v)\beta 3$  as two receptors for the  $\alpha 3(IV)$  chain of type IV collagen on tumor cells. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4584-90.
374. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R. Two RGD-independent  $\alpha v\beta 3$  integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem.* 2000

Aug 4;275(31):23745-50.

375. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Mar;49(3):221-33.
376. Floquet N, Pasco S, Ramont L, Derreumaux P, Laronze JY, Nuzillard JM, Maquart FX, Alix AJ, Monboisse JC. The antitumor properties of the alpha3(IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):2091-100. Epub 2003 Oct 28.
377. Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J, Zhang H. Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002 Feb;80(2):213-30.
378. Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):15240-8. Epub 2001 Feb 7.
379. Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbanda S, Reimer C, Manfredi M, Dickerson WM, Kalluri R. Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):31959-68.
380. Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, Sonenberg N, Hynes RO, Kalluri R. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*. 2002 Jan 4;295(5552):140-3.
381. Hutchings H, Ortega N, Plouët J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J*. 2003 Aug;17(11):1520-2.
384. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4766-71.
385. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem*. 2003



Feb 7;278(6):4238-49.

386. Hayashi K, Madri JA, Yurchenco PD. Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(4):945-59.
387. Brown JC, Sasaki T, Göhring W, Yamada Y, Timpl R. The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem.* 1997 Nov 15;250(1):39-46.
388. Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 1999 Feb 15;18(4):863-70.
389. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997 Jan 24;88(2):277-85.
390. Rehn M, Hintikka E, Pihlajaniemi T. Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1(XVIII) chain with its homologue, the alpha 1(XV) collagen chain. *J Biol Chem.* 1994 May 13;269(19):13929-35.
391. Oh SP, Kamagata Y, Muragaki Y, Timmons S, Ooshima A, Olsen BR. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4229-33.
392. Marneros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* 2001 Sep;20(5-6):337-45.
393. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):404-7.
394. Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. *Cancer Res.* 2002 Apr 1;62(7):1944-7.

395. Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, Simons M, Sukhatme VP. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 10;258(2):345-52.
396. Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):16464-9.
397. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem*. 2002 Aug 2;277(31):27872-9.
398. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J*. 2001 Apr;15(6):1044-53.
399. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Gröne HJ, Debus J, Ansorge W, Folkman J, Hlatky L, Huber PE. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell*. 2004 Mar 12;13(5):649-63.
400. Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo C, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Vuori K. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1024-9.
401. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):625-34.
402. Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5580-9.
403. Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett*. 2003 Feb 11;536(1-3):19-24.
404. Yu Y, Moulton KS, Khan MK, Vineberg S, Boye E, Davis VM, O'Donnell PE, Bischoff J, Milstone DS. E-selectin is required for the antiangiogenic activity of endostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25;101(21):8005-10. Epub 2004 May 17.

405. Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engström A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3403-11.
406. Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme VP. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell*. 2001 Apr;7(4):811-22.
407. Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR, Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J*. 1998 Mar 16;17(6):1656-64.
408. Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U, Hohenester E, Timpl R. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*. 1999 Nov 15;18(22):6240-8.
409. Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L, Spillmann D, Lindahl U. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *EMBO J*. 2002 Dec 2;21(23):6303-11.
410. Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20178-85.
411. Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20178-85. Epub 2004 Feb 18.
412. Lee SJ, Jang JW, Kim YM, Lee HI, Jeon JY, Kwon YG, Lee ST. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett*. 2002 May 22;519(1-3):147-52.
413. Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, Luostarinen J, Heljasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T, Salo T. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2, -9, and -13. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22404-11.

414. Wickström SA, Veikkola T, Rehn M, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Keski-Oja Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *J Cancer Res.* 2001 Sep 1;61(17):6511-6.
415. Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Reijerkerk A, Wu YP, Voest EE, Gebbink MF. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr Biol.* 2002 Oct 29;12(21):1833-9.
416. Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Feb 24;255(3):735-9.
417. Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol.* 2000 Sep 1;301(5):1179-90.
418. Ylikärppä R, Eklund L, Sormunen R, Muona A, Fukai N, Olsen BR, Pihlajaniemi T. Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biol.* 2003 Sep;22(5):443-8.
419. Pasqualini R, Bourdoulous S, Koivunen E, Woods VL Jr, Ruoslahti E. A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat Med.* 1996 Nov;2(11):1197-203.
420. Yi M, Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):620-4.
421. Kalluri R. Discovery of type IV collagen non-collagenous domains as novel integrin ligands and endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:255-66.
422. Albig AR, Schiemann WP. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol.* 2004 Jun;23(6):367-79.
423. Nguyen AD, Itoh S, Jeney V, Yanagisawa H, Fujimoto M, Ushio-Fukai M, Fukai T. Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. *Circ Res.* 2004 Nov 26;95(11):1067-74.

424. Lee MJ, Roy NK, Mogford JE, Schiemann WP, Mustoe TA. Fibulin-5 promotes wound healing in vivo. *J Am Coll Surg*. 2004 Sep;199(3):403-10.
425. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(17):6624-8.
426. Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun;36(6):1070-8.
427. Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):831-9.
428. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J, Detmar M. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):441-52.
429. Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12485-90.
430. Stellmach V, Volpert OV, Crawford SE, Lawler J, Hynes RO, Bouck N. Tumour suppressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in fibroblasts. *Eur J Cancer*. 1996 Dec;32A(14):2394-400.-5.
431. Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. Detmar M *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):14888-93.
432. Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong YK, Kyriakides TR, Brown LF, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2631-40.
433. Noh YH, Matsuda K, Hong YK, Kunstfeld R, Riccardi L, Koch M, Oura H, Dadras SS, Streit M, Detmar M. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell

- migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003 Dec;121(6):1536-43.
434. Kusafuka K, Hiraki Y, Shukunami C, Kayano T, Takemura T. Cartilage-specific matrix protein, chondromodulin-I (ChM-I), is a strong angio-inhibitor in endochondral ossification of human neonatal vertebral tissues in vivo: relationship with angiogenic factors in the cartilage. *Acta Histochem.* 2002;104(2):167-75.
435. Shukunami C, Yamamoto S, Tanabe T, Hiraki Y. Generation of multiple transcripts from the chicken chondromodulin-I gene and their expression during embryonic development. *FEBS Lett.* 1999 Jul 30;456(1):165-70.
436. Hayami T, Shukunami C, Mitsui K, Endo N, Tokunaga K, Kondo J, Takahashi HE, Hiraki Y. Specific loss of chondromodulin-I gene expression in chondrosarcoma and the suppression of tumor angiogenesis and growth by its recombinant protein in vivo. *FEBS Lett.* 1999 Sep 24;458(3):436-40.
437. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Sep 13;226(2):324-8.
438. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996 Feb;7(2):213-21.
439. Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marmé D, Martiny-Baron G. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10382-8.
440. Belgore FM, Blann AD, Lip GY. sFlt-1, a potential antagonist for exogenous VEGF. *Circulation.* 2000 Oct 10;102(15):E108-9.
441. Yoshimura I, Mizuguchi Y, Miyajima A, Asano T, Tadakuma T, Hayakawa M. Suppression of lung metastasis of renal cell carcinoma by the intramuscular gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor I. *J Urol.* 2004 Jun;171(6 Pt 1):2467-70.
442. Ohtani K, Egashira K, Hiasa K, Zhao Q, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S,

- Yonemitsu Y, Sueishi K, Sata M, Shibuya M, Sunagawa K. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells. *Circulation*. 2004 Oct 19;110(16):2444-52.
443. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*. 1999 Sep 17;285(5435):1926-8.
444. Lee TH, Rhim T, Kim SS. Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998 Oct 30;273(44):28805-12.
445. Mitsuyasu RT. Interferon alpha in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Br J Haematol*. 1991 Oct;79 Suppl 1:69-73.
446. Linggen MW, Polverini PJ, Bouck NP. Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1998 Dec 1;58(23):5551-8.
447. 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 Nov 1;167(9):5150-9.
448. Dinney CP, Bielenberg DR, Perrotte P, Reich R, Eve BY, Bucana CD, Fidler IJ. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res*. 1998 Feb 15;58(4):808-14.
449. Ribatti D, Crivellato E, Candussio L, Vacca A, Nico B, Benaglio V, Roncali L, Dammacco F. Angiogenic activity of rat mast cells in the chick embryo chorioallantoic membrane is down-regulated by treatment with recombinant human alpha-2a interferon and partly mediated by fibroblast growth factor-2. *Haematologica*. 2002 May;87(5):465-71.
450. López-Ocejo O, Perea SE, Bequet-Romero M, Araña MJ, López Saura P. Impaired angiogenic balance and suppression of tumorigenicity in HeLa cells chronically exposed to interferon-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Oct 22;277(2):410-6.

451. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27348-57.
452. Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D, Ziche M, Almerigogna F, Bani D, Stern DM. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(17):6487-91.
453. Bar D, Apte RN, Voronov E, Dinarello CA, Cohen S. A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):161-3.
454. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Apr 19;87(8):581-6.
455. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 1996 May 1;87(9):3877-82.
456. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol*. 13:251–276.
457. Hsieh, C.-S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260:547–550.
458. Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM. Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1441-52.
459. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J*. 1999 Dec;13(15):2195-202.
460. Duh EJ, Yang HS, Haller JA, De Juan E, Humayun MS, Gehlbach P, Melia M, Pieramici D, Harlan JB, Campochiaro PA, Zack DJ. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis. *Am J Ophthalmol*. 2004 Apr;137(4):668-74.



461. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2002 Sep;134(3):348-53.
462. Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med*. 2002 Jul;8(7):330-4.
463. Gettins PG, Simonovic M, Volz K. Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a serpin with potent anti-angiogenic and neurite outgrowth-promoting properties. *Biol Chem*. 2002 Nov;383(11):1677-82.
464. Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C. Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol Ther*. 2003 Jul;8(1):72-9.
465. Mahtabifard A, Merritt RE, Yamada RE, Crystal RG, Korst RJ. In vivo gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits tumor growth in syngeneic murine models of thoracic malignancies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Jul;126(1):28-38.
466. Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, O'Connor EM, Bennett J, Wilson JM, Tolentino MJ. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther*. 2002 Oct;6(4):490-4.
467. D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E. 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3964-8.
468. Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004 Mar;53(3):209-19.
469. Huang CY, Fujimura M, Noshita N, Chang YY, Chan PH. SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Feb;21(2):163-73.
470. Cushman M, He HM, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E. Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *J Med Chem*. 1995 Jun 9;38(12):2041-9.

471. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1246-51.
472. Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS, Flynn E, Sytkowski A, Tao T, Langer R. Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2645-50.
473. Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):171-80.
474. Nyberg P et al. *Cancer Res* 2005;65:3967-3979.
475. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006, 56:106-130.
476. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997, 57:4953-59.
477. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al: Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22:2184-2191.
478. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al: Erlotinib in previously treated non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005, 353:123-132.
479. Willhelm SM CC, Tang L, et al: BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004, 64:7099-7109.
480. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al: BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002, 62:6997-7000.
481. Schiller JH, Flaherty KT, Redlinger M, Binger K, Eun J, Petrenciuc O, O'Dwyer P: Sorafenib combined with carboplatin/paclitaxel for advanced non small cell lung

- cancer: a phase I subset analysis. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology, 2006.
482. Abrams TJ, Murray LJ, Pesenti E, et al: Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with “standard of care” for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2003, 2:1011-1021.
483. Ciardiello F, Caputo R, Damiano V et al: Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2003, 9:1546-1556.
484. Lee D: Phase II data with ZD6474, a small molecule kinase inhibitor of growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor previously treated advanced non small cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2005, 7:89-91.
485. Johnson BE, Ma P, West H, Kerr R, Prager D, Sandler A, Herbst RS, Stewart DJ, Dimery IW, Heymach JV: Preliminary phase II safety evaluation of ZD6474, in combination with carboplatin and paclitaxel, as 1<sup>st</sup>-line treatment in patients with NSCLC. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology, 2005.
486. Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, et al: AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res* 2005, 65:4389-4400.
487. Dreys J, Medinger M, Mross K, Zirrgiebel U: Phase I clinical evaluation of AZD2171, a highly potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced tumors. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology, 2005.
488. Hurwitz H, Dowlati A, Savage S, Fernando N, Lasalvia S, Whitehead B, Suttle B, Collins D, Ho P, Pandite L: Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral administration of GW786034 in pts with solid tumors. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology, 2005.
489. Rugo HS, Herbst RS, Liu G, et al: Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 2005, 23:5474-5483.
490. Polverino A, Coxon A, Starnes C, et al: AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit

- receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression xenografts. *Cancer Res* 2006, 66:8715-8721.
491. Wakelee HA, Adjei A, Halsey J, Lensing JL, Dugay JD, Hanson LG, Reid JM, Piens JR, Sikic BI: A phase I dose-escalation and pharmacokinetic (PK) study of a novel spectrum selective kinase inhibitor, XL647, in patients with advanced solid malignancies (ASM). Paper presented at: American Society of Clinical Oncology, 2006.
492. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al: The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res*, 65:7462-7469.
493. Tyzer, E.E. Factors in the production and growth of tumor metastases. *J. Med. Res.* 1913, 28, 309-332.
494. Fisher, E.R.; Turnbull, R.B., Jr. Cytologic demonstration and significance of tumor cells in the mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma. *Surg. Gynec. Obstet.* 1955, 100, 102-108.
495. Hansen, E.; Wolff, N.; Knuechel, R.; Ruschoff, J.; Hofstaedter, F.; Taeger, K. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch. Surg.* 1995, 130, 387-393.
496. Fisher, B.; Fisher, E. Transmigration of lymph nodes by tumor cells. *Science* 1966, 152, 1397-1398.
497. Pachmann K., Tumor Cell Seeding During Surgery – possible contribution to metastasis formation, *Cancers* 2011, 3, 2540-2553; doi:10.3390/cancers3022540
498. 10. Nastala, C.L., H.D. Edington, T.G. McKinney, H. Tahara, M.A. Nalesnik, M.J. Brunda, M.K. Gately, S.F. Wolf, R.D. Schreiber, W.J. Storkus, and M.T. Lotze. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-production. *J. Immunol.* 153:1697–1706.
499. 14. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15:749–795.
500. Albini A, Brigati C, Ventura A, Lorusso G, Pinter M, Morini M, Mancino A, Sica A, Noonan DM. Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *J Transl ed.* 2009 Jan 14;7:5.
501. Picot D, Loll PJ, Garavito RM (January 1994). "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1". *Nature* 367 (6460): 243–9.

502. Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S. & DuBois, R. N. (1994) *Gastroenterology* 107 , 1183–1188.
503. Marnett, L. J. & DuBois, R. N. (2002) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 , 55–80.
504. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M. & DuBois, R. N. (1998) *Cell* 93, 705–716.
505. Chang, S.-H., Lui, C. H., Conway, R., Han, D. K., Nithipatikom, K., Trifan, O. C., Lane, T. F. & Hla, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 , 591–596.
506. Carpenter G, Cohen S (May 1990). "Epidermal growth factor". *The Journal of Biological Chemistry* 265 (14): 7709–12.
507. Bays Brown. "Method of decreasing cutaneous senescence", published 1997-04-08, assigned to Dermatologics Inc, Wikipedia.
508. Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knaver DJ, Cunningham DD (June 1984). "Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development". *Science* 224 (4653): 1107–9.
509. M. Llanos Casanova, Fernando Larcher, Benito Casanova, et al. A Critical Role for *ras*-mediated, Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Angiogenesis in Mouse Skin Carcinogenesis. *Cancer Res* 2002;62:3402-3407.
510. Gross G, Waks T, Esharr Z. Expression of immunoglobulin T cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody types specificity. *Proc Nat Acad. Sci USA* 1989;86(24): 1024-8.
511. Avrameas S, Temynck T. Natural autoantibodies the other side of the immune system. *Immunol* 1995;146:235-48.
512. Locroix-Desmazes S, Kaven SV, Monthon L et al: Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individual. *J. immunol. Methods* 1998;216: 117-37.
513. Avrameas S, Selmi C. Natural autoantibodies in the pathophysiology of the immune system. *J. Autoimmun.* 2013;41:46-49.
514. Σαμαρά Π, Κλάγκου Ε, Τσούλη Δ, Τσιτσιλώνη Ο. Νέες αντικαρκινικές θεραπείες με τη χρήση βιολογικών παραγόντων που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα. *Ανοσία* 2014;10,2:106-114.
515. Collins F, Varmus H, A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med*, 372;9, Feb 2015.

## **Β. Βιβλιογραφία Ειδικού Μέρους**

1. Silva SR, Bowen KA, Rychahou PG, et al. VEGFR-2 expression in carcinoid cancer cells and its role in tumor growth and metastasis. *Int J Cancer* 128:1045-1056, 2011.
2. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371, 2006.
3. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 10;23(5):1011-27. Epub 2004 Dec 7. Review.
4. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K. Inverse prognostic impact of angiogenic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6649-57.
5. Andersen S, Donnem T, Al-Saad S, et al. Angiogenic markers show high prognostic impact on survival in marginally operable non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant radiotherapy. *J Thorac Oncol*. 2009 Apr;4(4):463-71.
6. Hanrahan EO, Lin HY, Kim ES, Yan S, Du DZ, McKee KS, Tran HT, Lee JJ, Ryan AJ, Langmuir P, Johnson BE, Heymach JV. Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):193-201. doi: 10.1200/JCO.2009.22.4279. Epub 2009 Nov 30.
7. Mroz RM, Korniluk M, Panek B, Ossolinska M, Chyczewska E. sVEGF R1 and Tie-2 levels during chemotherapy of lung cancer patients. *Adv Exp Med Biol*. 2013;756:313-9.
8. Kim ES, Herbst RS, Wistuba II, Lee JJ, Blumenschein GR Jr, Tsao A, Stewart DJ, Hicks ME, Erasmus J Jr, Gupta S, Alden CM, Liu S, Tang X, Khuri FR, Tran HT, Johnson BE, Heymach JV, Mao L, Fossella F, Kies MS, Papadimitrakopoulou V, Davis SE, Lippman SM, Hong WK. The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discov*. 2011 Jun;1(1):44-53.
9. Salgia R. Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011 Sep 1;117(17):3889-99.

10. Roodhart JM, Langenberg MH, Vermaat JS, Lolkema MP, Baars A, Giles RH, Witteveen EO, Voest EE. Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia*. 2010 Jan;12(1):87-94.
11. Shaked Y, Henke E, Roodhart JM, Mancuso P, Langenberg MH, Colleoni M, Daenen LG, Man S, Xu P, Emmenegger U, Tang T, Zhu Z, Witte L, Strieter RM, Bertolini F, Voest EE, Benezra R, Kerbel RS. Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer Cell*. 2008 Sep 9;14(3):263-73.
12. Daenen LG, Roodhart JM, van Amersfoort M, Dehnad M, Roessingh W, Ulfman LH, Derksen PW, Voest EE. Chemotherapy enhances metastasis formation via VEGFR-1-expressing endothelial cells. *Cancer Res*. 2011 Nov 15;71(22):6976-85.
13. Siegfried JM, Gubish CT, Rothstein ME, Henry C, Stabile LP. Combining the multitargeted tyrosine kinase inhibitor vandetanib with the antiestrogen fulvestrant enhances its antitumor effect in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012 Mar;7(3):485-95.
14. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett SM. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*. 1995;55: 3847-53.
15. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997 Oct;18(10):493-7.
16. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med*. 1994 May 1;179(5):1409-15.
17. Mayo MW, Denlinger CE, Broad RM, Yeung F, Reilly ET, Shi Y, Jones DR. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):18980-9.
18. Gameiro SR, Caballero JA, Hodge JW. Defining the molecular signature of



chemotherapy mediated lung tumor phenotype modulation and increased susceptibility to T-cell killing. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012 Feb;27(1):23-35.

19. Takizawa H, Ohtoshi T, Ohta K, Yamashita N, Hirohata S, Hirai K, Hiramatsu K, Ito K. Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cell Lines by Interleukin 6 *in Vitro*: A Possible Role in Tumor Growth via an Autocrine Mechanism. *Cancer Res*. 1993 Sep 15;53(18):4175-81.
20. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, Camiolo M, Stiles B, Lindsted T, Schleder M, Johns C, Altorki N, Mittal V, Kenner L, Sordella R. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31;107(35):15535-40.
21. Tran TA, Kallakury BV, Ambros RA, Ross JS. Prognostic significance of tumor necrosis factors and their receptors in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1998 Jul 15;83(2):276-82.
22. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Melfi F, Mussi A, Basolo F, Fontanini G. Tumour necrosis factor-alpha: prognostic role and relationship with interleukin-8 and endothelin-1 in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med*. 2006 May;17(5):887-92.

## **Γ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

## Modulation of peripheral immune responses by paclitaxel–ifosfamide–cisplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer

Nikolaos Koufos · Despina Michailidou · Ioannis D. Xynos · Periclis Tomos · Kalliopi Athanasiadou · Christos Kosmas · Nikolaos Tsavaris

Received: 27 April 2013 / Accepted: 2 September 2013 / Published online: 26 September 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

### Abstract

**Purpose** The aim of this study was to assess systemic immunological responses in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with stage III/IV disease during treatment with paclitaxel–ifosfamide–cisplatin (TIP) chemotherapy.

**Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from healthy donors (HD) ( $n = 20$ ) and chemotherapy-naïve NSCLC patients treated with TIP ( $n = 32$ ) were tested for production of IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IL-2 upon polyclonal stimulation with anti-CD3 mAb. They were further assessed over a treatment period of twelve weeks (i.e., four treatment cycles).

**Results** PBMCs from NSCLC patients produced higher IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 levels, whereas IL-2 exhibited lower values compared to HD ( $p < 0.001$  for all parameters). Of interest, patients who responded to treatment had significantly higher increases in IL-2 ( $p < 0.001$ ) and significantly higher decreases in IL-1 ( $p < 0.001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0.001$ ), TNF- $\beta$  ( $p < 0.001$ ), IL-6 ( $p = 0.02$ ), IL-8 ( $p < 0.001$ ), IL-10 ( $p < 0.001$ ) and IL-12 ( $p < 0.001$ ) levels. Non-responders revealed post-therapeutically a significantly higher increase in IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 secretion and a significantly higher decrease in IL-2 levels ( $p < 0.001$  for all parameters). Patients who responded to treatment and had a significantly higher increase in IL-2 showed a significantly longer median survival ( $p$  value  $< 0.001$ , 26 vs. 7.5 months).

**Conclusion** Our study indicates that monitoring cytokine dynamics in patients with advanced NSCLC and especially those of IL-2 in peripheral blood components in vitro could be used as a predictor of treatment-related outcome and overall survival in NSCLC.

N. Koufos · D. Michailidou · N. Tsavaris (✉)  
Oncology Unit, Department of Pathophysiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital, Agios Thomas 17, 11527 Athens, Greece  
e-mail: tsavari1@otenet.gr

I. D. Xynos  
Imperial Clinical Trials Unit-Cancer, Department of Surgery and Cancer, Charing Cross Hospital, Imperial College London, Fulham Palace Rd, London W6 8RF, UK

P. Tomos  
Second Department of Propedeutic Surgery, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital, Agios Thomas 17, 11527 Athens, Greece

K. Athanasiadou  
Department of Thoracic Surgery, Evaggelismos Hospital, Ipsilantou 45-47, 10676 Athens, Greece

C. Kosmas  
Department of Medicine, 2nd Division of Medical Oncology, Metaxa Cancer Hospital, Mpotasi 51, 18537 Piraeus, Greece

**Keywords** Non-small-cell lung carcinoma · Chemotherapy · Cytokines · Immune

### Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer-related mortality among males in industrialized nations comprising 23 % of the total cancer deaths (Jemal et al. 2011). Early-stage NSCLC is most effectively treated with surgery followed by adjuvant chemotherapy (Douillard et al. 2006). Surgical treatment of locally advanced NSCLC is often not possible due to tumor invasion into adjacent chest structures. However, for some patients with

inoperable disease, neoadjuvant chemotherapy with the goal of down-staging the tumor before surgical resection can be the best therapeutic option. In patients with advanced-stage III/IV NSCLC, platinum-based chemotherapy has been considered a gold standard treatment and the paclitaxel–ifosfamide–cisplatin (TIP) combination appears to be a very effective outpatient regimen (Kosmas et al. 2000; Pohl et al. 2006). In a phase II clinical trial in advanced NSCLC patients conducted by our group, TIP combination chemotherapy demonstrated high activity, prolonged time of progression and survival (Kosmas et al. 2000). Lung cancer development and progression could be affected by a variety of cytokines via both autocrine and paracrine mechanisms that could either regulate the tumor growth or alter the antitumor immune response (Huang et al. 1995). There is little doubt today that a successful immune response to a tumor is dependent on the cytokine repertoire of the tumor microenvironment which may play an active immunoregulatory role (Chouaib et al. 1997). Cytokines are often classified based on whether they initiate and maintain inflammation (proinflammatory), secreted by T-helper 1 (Th1) cells or inhibit inflammation (anti-inflammatory) and secreted by Th2 cells. Th1 cytokines, namely interleukin-2 (IL-2), IL-12, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and TNF- $\beta$ , promote cellular immunity, whereas Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 are responsible for the induction of humoral immunity. IL-1 and IL-8 represent two of the main proinflammatory mediators (Fukuyama et al. 2007; Yamamura et al. 1993; Su et al. 2011). Human non-squamous cell lung cancer (NSCLC) cells produce a distinct Th2 cytokine pattern that may play a significant role in the downregulation of the antitumor immune response (Huang et al. 1995; Hatanaka et al. 2000). Several studies have indicated the presence of Th2 cytokines at the tumor site, suggesting that these cytokines may suppress cellular immune responses (Yamamura et al. 1993; Kharkevitch et al. 1994) and immunotherapy with cytokines may alter this Th2-predominant pattern of the Th1/Th2 axis (Takeuchi et al. 1998).

In this study, we assessed peripheral immune cell responses in chemotherapy-naïve patients with advanced NSCLC receiving treatment with TIP chemotherapy in order to identify systemic shifts in immunity, in relation to clinical outcome. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (HD) and patients with NSCLC treated with TIP were tested for IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IL-2 production upon polyclonal stimulation with anti-CD3 mAb. The respective parameters were studied prior to chemotherapy and during a follow-up period of twelve weeks (i.e., four treatment cycles) and further analyzed according to response to chemotherapy.

## Materials and methods

### Patients and eligibility criteria

Patients were eligible for enrollment to the study if they had a histologically confirmed diagnosis of stage III or IV NSCLC with a radiographic documentation of measurable metastatic disease. Prior to entry into the study, patients were clinically evaluated with physical examination, chest and abdomen/pelvis computer tomography, electrocardiogram, complete blood count with differential and blood chemistry (bilirubin, alkaline phosphatase, alanine transaminase, aspartate transaminase, blood urea nitrogen, creatinine, phosphorus, calcium, glucose, total protein, albumin and electrolytes). Other eligibility criteria included age >20 but <72 years, Karnofsky performance status (PS) >80 %, satisfactory hematological and biochemical parameters (neutrophil count  $\geq 2.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ , hemoglobin >9.0 g dL $^{-1}$ , platelet count  $\geq 100 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ), total bilirubin <2 mg dL $^{-1}$ , serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)  $\leq 3 \times$  the upper limit of normal and serum creatinine  $\leq 2$  mg dL $^{-1}$ , life expectancy of >3 months and written informed consent.

Exclusion criteria included prior chemotherapy or radiotherapy, concurrent serious medical illnesses (uncontrolled diabetes mellitus), grade 2 or higher peripheral neuropathy at time of study enrollment, clinically significant cardiovascular disease (unstable angina or myocardial infarction over the preceding 12 months) and pregnancy or child nursing.

### Study design

Ethics Committee of Laiko University General Hospital approved the study, and informed consent was obtained from all patients before entering the study. A total of thirty-two eligible patients with advanced NSCLC who received chemotherapy with TIP between January 2008 and 2010 were analyzed in this comparative study. Patients were grouped into responders and non-responders to chemotherapy and matched according to baseline performance status and extent of metastatic disease (Table 1). Chemotherapy continued until progressive disease or unacceptable adverse effects. Tumor responses and progression were evaluated with the application of the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) [13]. A control group of twenty HD who ranged in age from 35 to 68 years were also included in the study. Comparisons between patients groups were carried out in a matched-pair fashion.

### Treatment schedule

Eligible patients with advanced NSCLC were assigned to receive TIP chemotherapy. Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) was

administered at 135–215 mg/m<sup>2</sup> over 1 h by intravenous (i.v.) infusion on day 1, after premedication consisting of dexamethasone 20 mg, dimethindene maleate (Fenistil®) 4 mg and ranitidine 50 mg, all administered i.v. 1 h before paclitaxel. Ifosfamide was administered at 4.5–6.0 g/m<sup>2</sup> i.v. over 1 h divided between 2 days (days 1 and 2: 2.25–3.0 g/m<sup>2</sup> per day) together with mesna uroprotection, 40 % of the ifosfamide dose, given i.v. before, at 3 and 6 h after ifosfamide. Cisplatin 80–100 mg/m<sup>2</sup> i.v. over 30 min divided between 2 days (days 1 and 2: 40–50 mg/m<sup>2</sup> per day) with adequate vigorous pre- and post-hydration, furosemide and electrolyte replacement: 20 mEq potassium chloride and 8 mEq magnesium sulfate per liter of post-hydration solution. The treatment schedule consisted

of four 21-day cycles. Dose modifications for all three chemotherapy drugs were made in patients with chemotherapy-related toxicities (Douillard et al. 2006). All toxicities were graded on Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE, version 4.0 2009).

Evaluation of chemotherapy response

Clinical examination, full blood counts, biochemical tests, appropriate serum tumor marker measurements and a chest X-ray were carried out before each cycle of therapy. Evaluation of response was performed every 2 cycles of therapy. Complete response (CR) was defined as the disappearance of all signs and symptoms of disease for at least 1 month, with the documented disappearance of all known lesions by physical examination, X-rays, computerized tomography (CT) scans, bone scans and the development of no new lesions. Partial response (PR) indicated a decrease of 50 % or greater (compared with pretreatment measurements) in the sum of the products of the two largest perpendicular diameters of all measurable lesions and no concomitant growth of new lesions for at least 1 month. Stable disease (SD) indicated a decrease of less than 50 % or an increase in tumor size less than 25 % over the original measurements. Progressive disease (PD) was defined as an increase of 25 % or greater over the original measurements in the sum of the products of the two largest perpendicular diameters of any measurable lesions. Patients were classified as responders if they had achieved one of the following: CR, PR or SD; and non-responders in case of PD.

Sample collection and cell isolation

Blood samples were drawn before treatment initiation (day 0) and following the second (week 6) and fourth (week 12) treatment cycles. Blood from patients and healthy volunteers was collected into a plastic syringe containing heparin (20 U/ml), and PBMCs were isolated by Ficoll–Hypaque centrifugation following standard procedures as previously described (Tsavaris et al. 2012).

Stimulation with anti-CD3 mAb

This was performed as previously reported (Grizapis et al. 2002; Baxevis et al. 1997). In brief, PBMCs (2 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were activated in 25-cm<sup>2</sup> flasks (Costar), precoated with anti-CD3 mAb in 5 ml of culture medium. Immobilization of anti-CD3 mAb was performed by coating the flasks with 5 µg/ml of anti-CD3-ε (Pharmingen, San Diego, CA). Supernatants from such cultures were harvested, centrifuged and stored at –80 °C until use.

**Table 1** Patient characteristics and clinical parameters

Patient characteristics	Healthy donors (HD)	Responders (RE)	Non-responders (NR)	P			
Number (n), percentage (%)	20	100	16	100	16	100	NSS
Sex							
Male	17	85	13	87	13	87	NSS
Female	3	15	3	13	3	13	NSS
Age (years)							
Median	56		58		56		NSS
Range	35–68		40–72		48–70		NSS
Karnofsky performance status							
0			5	31	6	38	NSS
1			5	31	6	38	NSS
2			6	38	4	25	NSS
Stage							
IIIA			2	13	2	13	NSS
IIIB			9	56	9	56	NSS
IV			5	31	5	31	NSS
Histology							
Squamous			8	50	8	50	NSS
Adenocarcinoma			7	43	7	43	NSS
Large cell			1	7	1	7	NSS
Metastatic Sites							
Large nodules			4	25	4	25	NSS
Supraclavicular nodes			2	13	2	13	NSS
Pleural effusion			2	13	2	13	NSS
Number of metastatic sites							
1			6	38	6	38	NSS
2			1	6	1	6	NSS
3 or >			0	0	0	0	NSS

Staging was carried out according to AJCC/UICC TNM system. In brief, stage IIIA includes T3N1M0 and T1-3N2M0, stage IIIB T4N0-2M0 and T1-3N3M0, and stage IV anyT/anyN/M1 disease. NSS: Non-statistical significance



#### Quantification of cytokine levels in culture supernatants of PBMCs stimulated with anti-CD3 mAb

The cytokines IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Samples were processed according to the manufacturer's instructions. ELISA kits specific for IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6 and IL-8 were obtained from R&D systems (Abingdon, UK). IL-10 and IL-12 were quantitated with ELISA kits from Endogen (Boston, MA). All determinations were performed in duplicate.

#### Statistical analysis

Descriptive statistics were calculated with the measures of mean, median and standard deviation for quantitative parameters. The significance of the relationships between cytokine levels and clinical variables was evaluated by using Fisher's exact test. Changes in distributions of baseline quantitative measurement between the three groups (control, responders and non-responders) were studied with the use of one-way ANOVA test. Due to non-homogeneity of variance and low sample size, the non-parametric Kruskal–Wallis test was also employed. Changes in distributions of baseline quantitative measurements between the treatment and control groups were assessed with the use of independent samples Student's *t* test. Changes in time for parameters under study between the responders and non-responders were studied with repeated measurement models incorporating time measurements as within-subjects effect and response as between-subjects effect. Overall survival (OS) times were measured from the study entry date to the date of death from any cause or were censored at the date of last contact for patients still alive. Survival rate was drawn with the Kaplan–Meier product limit method, and comparisons were made with the log-rank test. All analyses are performed at a significance level of  $\alpha = 0.05$  with the use of the statistical package SPSS 12.0.

## Results

#### Baseline analysis

At baseline, all indicators under study were significantly differentiated between chemotherapy-naive NSCLC patients and control group ( $p < 0.001$ ) (Table 2). More specifically, HD had higher mean values for IL-2 and lower mean values for the cytokines IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12.

#### Overall changes in time of the immunological parameters examined

Overall, IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 values significantly decreased from baseline to week 12 (IL-1 *F* value = 12.5, *p* value <0.001; TNF- $\alpha$  *F* value = 26.6, *p* value <0.01; TNF- $\beta$  *F* value = 17.9, *p* value <0.01; IL-6 *F* value = 31.2, *p* value <0.01; IL-8 *F* value = 29.3, *p* value <0.001; IL-10 *F* value = 29.3, *p* value <0.01; IL-12 *F* value = 19.7, *p* value <0.001). IL-2 values were found significantly increased from baseline measurement over this time period (*F* value = 74.1, *p* value <0.01).

#### Changes in time of the immunological parameters examined between response and non-response groups

Significant associations were depicted between the indicators examined among response and non-response groups over the study period of 12 weeks (Table 2). Patients who responded to treatment had significantly higher increases in IL-2 (*F* value = 31.0, *p* value <0.001) and significantly higher decreases in IL-1 (*F* value = 94.4, *p* value <0.001), TNF- $\alpha$  (*F* value = 38.6, *p* value <0.001), TNF- $\beta$  (*F* value = 70.3, *p* value <0.001), IL-6 (*F* value = 5.7, *p* value = 0.02), IL-8 (*F* value = 37.5, *p* value <0.001), IL-10 (*F* value = 66.4, *p* value <0.001) and IL-12 (*F* value = 32.3, *p* value <0.001). Evaluation of post-chemotherapy changes in the non-responders revealed a significantly higher increase in IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 secretion and a significantly higher decrease in IL-2 levels ( $p < 0.001$  for all parameters). Figures 1 and 2 represent schematic diagrams of the levels of each parameter in time expressed as % in response and non-response groups, respectively, in comparison with the control group (HD), which was set to 100 %.

#### Association between overall survival and response to treatment in advanced NSCLC patients

Patients who responded to treatment (group A) and had a significantly higher increase in IL-2 and significantly higher decreases in IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 levels showed a significantly longer median survival versus patients who did not respond (group B) to treatment ( $p$  value <0.001, 26 vs. 7.5 months). Figure 3 shows survival in correlation with tumor response to treatment.

## Discussion

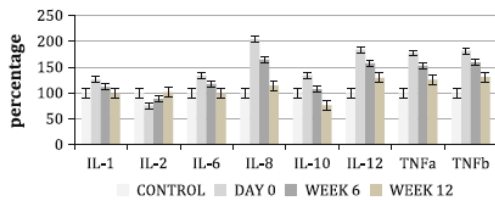
Tumor development, progression and metastasis are complex processes which are exposed to the dynamic balance

**Table 2** Descriptive for baseline across treatment and control groups and changes in time among response and non-response groups

Examined parameters and groups	N	Day 0 (mean values + SD)	<i>P</i> <sup>a</sup>	Week 6 (mean values + SD)	Week 12 (mean values + SD)	<i>P</i> <sup>b</sup>
IL-1			<0.001			
HD	20	87.0 ± 10.9				
RE	16	109.6 ± 8.5		97.3 ± 5.1	85.9 ± 5.9	<0.001
NR	16	98.3 ± 5.9		100.5 ± 6.8	114.3 ± 7.9	
IL-2			<0.001			
HD	20	127.3 ± 29.3				
RE	16	96.0 ± 18.3		113 ± 19.6	129 ± 19.3	<0.001
NR	16	90.0 ± 8.8		85 ± 8.3	81 ± 7.2	
IL-6			<0.001			
HD	20	72.0 ± 8.5				
RE	16	96.1 ± 12.1		84.8 ± 13.2	71.6 ± 11.8	<0.001
NR	16	89.2 ± 12.3		95.0 ± 12.4	99.4 ± 12.8	
IL-8			<0.001			
HD	20	45.0 ± 7.2				
RE	16	91.8 ± 12.8		74.1 ± 11.3	51.5 ± 10.6	<0.001
NR	16	83.7 ± 9.7		92.4 ± 8.8	103.5 ± 9.9	
IL-10			<0.001			
HD	20	69.0 ± 7.6				
RE	16	92.6 ± 12.3		74.3 ± 11.9	52.5 ± 11.2	<0.001
NR	16	91.4 ± 8.5		102.2 ± 10.7	113.8 ± 12.6	
IL-12			<0.001			
HD	20	55.0 ± 6.6				
RE	16	101.1 ± 11.2		86.6 ± 9.7	71.0 ± 9.1	<0.001
NR	16	102.2 ± 11.0		109.8 ± 14.0	114.4 ± 15.7	
TNF-α			<0.001			
HD	20	59.1 ± 9.2				
RE	16	105.0 ± 9.0		90 ± 9.8	75 ± 13.1	<0.001
NR	16	104.0 ± 9.3		110 ± 9.2	116 ± 10.0	
TNF-β			<0.001			
HD	20	52.0 ± 9.8				
RE	16	94.4 ± 5.9		82.8 ± 5.5	68.2 ± 7.8	<0.001
NR	16	96.5 ± 7.9		103.4 ± 9.2	108.6 ± 10.5	

*SD* is the symbol that represents standard deviation, *RE* responders, *HD* healthy donors, *NR* non-responders

<sup>a</sup> *p* values refer to comparisons made between treatment and control groups at baseline, <sup>b</sup> *p* values refer to comparisons made between baseline determination and at 12 weeks within response and non-response groups. All cytokine values are given in ng/mL

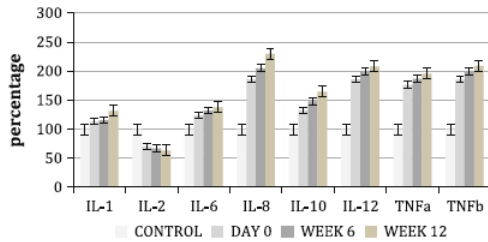


**Fig. 1** Schematic representation including error bars of the levels of examined parameters at baseline and over a treatment period of 12 weeks in responders, expressed as % in comparison with the control group (set to 100 %)

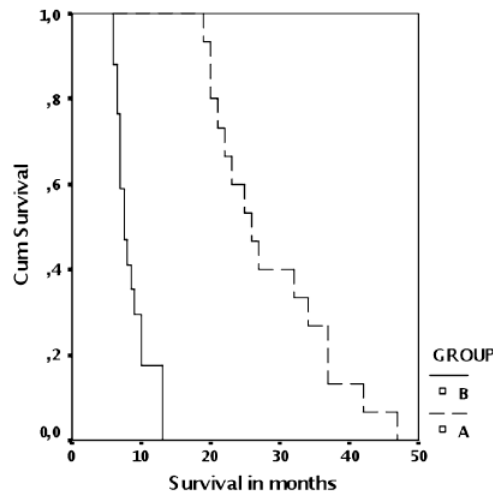
between mechanisms of immunosurveillance that protect the host against tumor growth through the innate and adaptive immune systems and immunoediting that

facilitate tumor progression, at least in part, by sculpting the immunogenic phenotype of tumors as they develop (Mlecnik et al. 2011; Dunn et al. 2004). The immune contexture of tumors appears to have prognostic potential and defines novel targets for the development of innovative immunotherapeutic approaches. Subsequently, a variety of assays have been introduced for assessing different parameters of the immune status and immune response monitoring, aiming at the selection of patients who are more likely to have a clinical benefit from chemotherapy or immunotherapeutic analogs and secondary in the development of new cancer treatment strategies (Bindea et al. 2011).

In the present study, the peripheral immune cell responses to mitogenic signals were assessed in order to



**Fig. 2** Schematic representation including *error bars* of the levels of examined parameters at *baseline* and over a treatment period of 12 weeks in non-responders, expressed as % in comparison with the control group (set to 100 %)



**Fig. 3** Kaplan–Meier survival curve. The *dashed line* represents survival of those patients who responded to treatment (group A). OS for group A (mean 28.8, 95 % CI 24.3–33.3, median 26.0, 95 % CI 20.9–31.1). The *solid line* represents survival of those patients who failed to respond to treatment (group B). OS for group B (mean 8.6, 95 % CI 7.4–9.7, median 7.5, 95 % CI 6.2–8.8). Kaplan–Meier log-rank test: 33.4 at 1 d.f. *p* value < 0.001, a significant difference in the survival distribution between the two groups of patients

identify systemic shifts in immunity in advanced NSCLC patients receiving treatment with TIP, which could be associated with clinical outcome. At baseline, polyclonal activation of PBMCs with anti-CD3 mAb resulted in significantly reduced levels of IL-2 in our chemotherapy-naïve NSCLC patient cohort by comparison with HD. On the contrary, the production of the IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 was significantly enhanced.

IL-1 and IL-8 represent two of the main proinflammatory mediators in tumor development and progression. IL-2, TNF and IL-12 are usually produced by Th1 cells, and their role is to mediate cellular immunity, macrophage

activation, antibody-dependent cellular cytotoxicity and delayed-type hypersensitivity (Cher and Mosmann 1987; Lucey et al. 1996), while the Th2 cell-derived cytokines IL-6 and IL-10 direct anti-inflammatory responses and augment some B cell responses (Stevens et al. 1988; Swain et al. 1990). Cross-regulation of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells through the cytokine network occurs as the Th1 cytokine IFN- $\gamma$  inhibits Th2 cell functions (Gajewski and Fitch 1988), whereas the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are reported to inhibit Th1 responses (Powrie et al. 1993).

It has now become evident that an effective antitumor response requires a Th1-type immune response, while Th2 responses are generally associated with immunosuppression, a state that might be favorable to tumor growth (Oppenheim and Fujiwara 1996).

IL-10-mediated inhibition of Th1 functions including downregulation of major histocompatibility complex (MHC) class II expression and impaired antigen presentation to reactive T cells is likely to be beneficial to downregulation of the antitumor immune response and tumor survival (Chouaib et al. 1997).

In patients with advanced NSCLC, increased production of immunosuppressive IL-10 by tumor cells and increased serum concentrations of IL-10 have both been correlated with reduced survival (Hatanaka et al. 2000; De Vita et al. 2000). IL-2 secretion in whole-blood cell cultures (WBCC) from NSCLC patients is also suppressed having a significant influence on survival (Neuner et al. 2002) [29]. In the study published by Neuner et al, secretion of IL-2 was shown to be inhibited in a dose-dependent manner upon addition of IL-10 in WBCC from normal individuals, which led to the suggestion that the suppression of IL-2 may be mediated by tumor-derived IL-10 (Neuner et al. 2002).

A variety of other lung tumor-produced factors, including IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ , may also either regulate tumor growth or modulate the antitumor immune response (Huang et al. 1995; Fukuyama et al. 2007). Most of these factors were found to be elevated in the sera of NSCLC patients, and specifically, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  had higher levels with tumor progression, suggesting that these cytokines may be associated with a worse prognosis (Kaminska et al. 2006; De Vita et al. 2000). When the levels of IL-1 were evaluated in NSCLC tumors, they were found higher than in normal counterparts, favoring a prometastatic environment (Colasante et al. 1997). IL-6 can also be expressed and released by lung cancer cells and was demonstrated to exert an inhibitory effect on the proliferation of human NSCLC cell lines. Hence, these results suggest that IL-6 may function as an autocrine growth-inhibiting factor in the growth regulation of human lung cancer (Takizawa et al. 1993). IL-8 is a significant angiogenic factor that was found in



freshly isolated specimens of human NSCLC, accounting for 42–80 % of the overall angiogenic activity of these tumors. Arenberg et al. have shown that tumor production of this potent angiogenic factor may be crucial for the neovascularization—a process necessary for initiation and maintenance of NSCLC tumor growth (Arenberg et al. 1996).

Significant coexpression of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  was observed in NSCLC in all tumor stages, predicting a favorable outcome in patients with the disease (Tran et al. 1998). The positive correlation between high TNF- $\alpha$  expression on surgical specimens from NSCLC patients and OS, and disease-free interval was also demonstrated by Boldrini et al. The authors of this study suggested that the favorable effect on clinical outcome could be attributed to the ability of TNF- $\alpha$  to cause hemorrhagic necrosis of the tumor (Boldrini et al. 2000). An interesting association between TGF- $\beta$  expression and survival was also observed in NSCLC patients, since patients with intratumoral TGF- $\beta$  mRNA expression were shown significantly better prognosis (Boldrini et al. 2006).

Elevated levels of serum IL-12 in African Americans with NSCLC were associated with worse survival (Enewold et al. 2009), whereas another report observed an association of higher IL-12 levels with improved survival in an Italian population (Lissoni et al. 1997). IL-12 was shown to stimulate antitumor responses in tumor models, be associated with antiangiogenic activity and induce tumor-associated macrophage proinflammatory profiles as antitumor responses (Enewold et al. 2009). A recent study demonstrated that IL-12 can target the tumor microenvironment by directly inhibiting the growth of human lung adenocarcinoma (Airolidi et al. 2009).

In our study, a tendency toward cytokine level normalization to levels observed in HD could be demonstrated in NSCLC patients under treatment with TIP, and thus, there were statistically significant decreases in the levels of serum IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12, with a parallel increase in the levels of the Th1 cytokine IL-2. It is interesting that the responders had a significantly improved immunological profile, as they exhibited higher levels of IL-2 concurrently with a reduction in IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 levels. Of note, our analysis of post-chemotherapy changes in the non-responders revealed a significantly higher increase in IL-1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 secretion and a significantly higher decrease in IL-2 levels. Furthermore, the restoration of the peripheral immune responses toward normalization levels influenced significantly the OS in advanced NSCLC patients who responded to treatment.

Exposure to chemotherapy with platinum doublets has been shown to alter the cytokine/chemokine

microenvironment and the phenotype of human lung tumor cells, rendering them more susceptible to cytotoxic T lymphocyte (CTL)-mediated lysis (Gameiro et al. 2012). Similarly to us, De Vita et al. have observed a significant increase in the serum levels of IL-10 in advanced NSCLC patients who did not respond to conventional platinum-based chemotherapy, whereas values in responders were found to have significantly decreased (De Vita et al. 2000). The higher increase in IL-10 levels in non-responders could suggest immune breakdown with predominance of IL-10 over IL-2 in non-responders. On the contrary, the reduction of IL-10 in responders may imply a better conservation of residual immune reactivity, with the immunosuppressive effect exerted by IL-10 being counterbalanced by the Th1 cytokine IL-2 (Orditura et al. 2000). A recent study investigated the effect of serum IL-1, IL-2R, IL-5, IL-6, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels on the clinical outcome in advanced NSCLC patients undergoing chemotherapy with platinum-based doublets. Patients with lower levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  post-chemotherapy survived longer than patients with higher concentrations. Serum IL-6 and IL-2R levels correlated with chemoreponse. IL-6 expression levels were significantly decreased in patients with SD, whereas IL-2R was significantly increased in patients with PD (Su et al. 2011).

Rising levels of IL-2 in responders as depicted in our study appear to be a discriminative factor heralding better immune response and delay in cancer progression. These observations are consistent with previous studies showing that (1) spontaneously regressing tumors are associated with predominant IL-2 production (Lowes et al. 1997), (2) IL-2 serum levels may be useful to predict outcome in NSCLC patients undergoing chemotherapy with cisplatin and etoposide (Orditura et al. 2000) and (3) growth control of established metastases can be attained experimentally by boosting IL-2 production (Dow et al. 1999).

Clearly, our results need to be confirmed by larger studies. Additional translational work will also be required as it is currently unknown whether peripheral immune responses, as the ones described, truly represent those occurring at the tumor site. Nevertheless, our study has demonstrated detectable alterations in peripheral immune system function in patients with advanced NSCLC. In addition, this study suggests that monitoring cytokine dynamics, and especially those of IL-2, in peripheral blood components *in vitro* could be used as surrogate measure of treatment-related outcome and predictor of OS in NSCLC treated with platinum-based chemotherapy.

**Acknowledgments** The study received the financial support from the Kapodistrian National Medical University of Athens, Laiko General Hospital, Agios Thomas 17, 11527, Athens, Greece.

**Conflict of interest** None.

**Ethical standards** The study was firstly approved by the ethics committee of the National Medical University of Athens, in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

## References

- Airoldi I, Di Carlo E, Cocco C, Caci E, Cilli M, Sorrentino C, Sozzi G, Ferrini S, Rosini S, Bertolini G, Truini M, Grossi F, Galiotta LJ, Ribatti D, Pistoia V (2009) IL-12 can target human lung adenocarcinoma cells and normal bronchial epithelial cells surrounding tumor lesions. *PLoS ONE* 4(7):e6119
- Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM (1996) Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest* 97(12):2792–2802. doi:10.1172/JCI118734
- Baxevasis CN, Tsiatas ML, Cacoullos NT, Spanakos G, Liacos C, Missitzis I, Papadimitriou SI, Papamichail M (1997) Induction of anti-tumour lymphocytes in cancer patients after brief exposure to supernatants from cultures of anti-CD3-stimulated allogeneic lymphocytes. *Br J Cancer* 76:1072–1080
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Galon J. (2011) The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. *Semin Immunopathol.* 33(4):335–40. Epub 2011 Apr 5. doi:10.1007/s00281-011-0264-x
- Boldrini L, Calcinai A, Samaritani E, Pistolesi F, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Fontanini G (2000) Tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta are significantly associated with better prognosis in non-small cell lung carcinoma: putative relation with BCL-2-mediated neovascularization. *Br J Cancer* 83(4):480–486. doi:10.1054/bjoc.2000.1345
- Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Melfi F, Mussi A, Basolo F, Fontanini G (2006) Tumour necrosis factor-alpha: prognostic role and relationship with interleukin-8 and endothelin-1 in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med* 17(5):887–892
- Cher DJ, Mosmann TR (1987) Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 138:3688–3694
- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY (1997) The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 18(10):493–497
- Colasante A, Mascetra N, Brunetti M, Lattanzio G, Diodoro M, Caltagirone S, Musiani P, Aiello FB (1997) Transforming growth factor beta 1, interleukin-8 and interleukin-1, in non-small-cell lung tumors. *Am J Respir Crit Care Med* 156(3 Pt 1):968–973
- De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, Catalano G (2000) Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 117(2):365–373
- Douillard J-Y, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL, Grodzki T et al (2006) Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 7(9):719–727. doi:10.1016/S1470-2045(06)70804-X
- Dow SW, Elmslie RE, Fradkin LG, Liggitt DH, Heath TD, Willson AP, Potter TA (1999) Intravenous cytokine gene delivery by lipid-DNA complexes controls the growth of established lung metastases. *Hum Gene Ther* 10(18):2961–2972. doi:10.1089/10430349950016375
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol.* 22:329–60. Review. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- Enewold L, Mechanic LE, Bowman ED, Zheng YL, Yu Z, Trivers G, Alberg AJ, Harris CC (2009) Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(1):215–222. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0705
- Fukuyama T, Ichiki Y, Yamada S, Shigematsu Y, Baba T, Nagata Y, Mizukami M, Sugaya M, Takenoyama M, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K (2007) Cytokine production of lung cancer cell lines: correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro. *Cancer Sci* 98:1048–1054. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00507.x
- Gajewski TF, Fitch FW (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140:4245–4252
- Gameiro SR, Caballero JA, Hodge JW (2012) Defining the molecular signature of chemotherapy-mediated lung tumor phenotype modulation and increased susceptibility to T-cell killing. *Cancer Biother Radiopharm.* 27(1):23–35
- Gritzapis AD, Dimitroulopoulos D, Paraskevas E, Baxevasis CN, Papamichail M (2002) Large-scale expansion of CD3(+)/CD56(+) lymphocytes capable of lysing autologous tumor cells with cytokine-rich supernatants. *Cancer Immunol Immunother* 51:440–448
- Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, Oshika Y, Suemizu H, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Inoue H, Nakamura M, Ueyama Y (2000) Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 11(7):815–819
- Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett SM (1995) Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 55:3847–3853
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B, Fuksiewicz M, Glogowski M, Wojcik E, Chechlinska M, Steffen J (2006) Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF - an independent prognostic factor. *Oncology* 70(2):115–125. doi:10.1159/000093002
- Kharkevitch DD, Seito D, Balch GC, Maeda T, Balch CM, Itoh K (1994) Characterization of autologous tumor-specific T-helper 2 cells in tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with metastatic melanoma. *Int J Cancer* 58(3):317–323
- Kosmas C, Tsavaris N, Polyzos A, Kolofonos H, Sepsas E, Malamos N, Vadiaka M, Dosios T, Antonopoulos M (2000) A phase II study of paclitaxel-ifosfamide-cisplatin (PIC) combination in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 89:774–782
- Lissoni P, Rovelli F, Fumagalli L, Mauri E, Barni S, Tancini G (1997) Increased blood concentrations of interleukin-12 are associated with a longer survival in untreatable metastatic solid tumor patients: preliminary observations. *Int J Biol Markers* 12(3):125–127
- Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM (1997) T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 108(6):914–919
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. (1996) Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev.* 9(4):532–62. Review

- Mlecnik B, Bindea G, Pagès F, Galon J (2011) Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 30(1):5–12. doi:10.1007/s10555-011-9270-7
- National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events. Version 4.0 (2009). [http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/ctc.htm#ctc\\_40\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_40_QuickReference_8.5x11.pdf). Accessed 15 September 2009
- Neuner A, Schindel M, Wildenberg U, Muley T, Lahm H, Fischer JR (2002) Prognostic significance of cytokine modulation in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 101(3):287–292. doi:10.1002/ijc.10604
- Oppenheim J, Fujiwara H (1996) The role of cytokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(3):279–288
- Orditura M, Romano C, De Vita F, Galizia G, Lieto E, Infusino S, De Cataldis G, Catalano G (2000) Behaviour of interleukin-2 serum levels in advanced non-small-cell lung cancer patients: relationship with response to therapy and survival. *Cancer Immunol Immunother* 49(10):530–536
- Pohl G, Krajnik G, Malayeri R, Müller RM, Klepetko W, Eckersberger F, Schäfer-Prokop C, Pokrajac B, Schmeikal S, Maier A, Ambrosch G, Woltsche M, Minar W, Pirker R (2006) Induction chemotherapy with the TIP regimen (paclitaxel/ifosfamide/cisplatin) in stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 54(1):63–67. doi:10.1016/j.lungcan.2006.05.027
- Powrie F, Menon S, Coffman RL (1993) Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 23:3043–3049. doi:10.1002/eji.1830231147
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM et al (1988) Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255–258. doi:10.1038/334255a0
- Su C, Zhou C, Zhou S, Xu J (2011) Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Med Oncol* 28(4):1453–1457. doi:10.1007/s12032-010-9645-6
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145:3796–3806
- Takeuchi E, Yanagawa H, Suzuki Y, Bando H, Sone S (1998) Comparative analysis of interleukin 15 and interleukin 2 for induction of killer activity and of type 2 cytokine production by mononuclear cells from lung cancer patients. *Br J Cancer* 78(5):616–620
- Takizawa H, Ohtoshi T, Ohta K, Yamashita N, Hirohata S, Hirai K, Hiramatsu K, Ito K (1993) Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cell Lines by Interleukin 6 *in Vitro*: a Possible Role in Tumor Growth via an Autocrine Mechanism. *Cancer Res* 53(18):4175–4181
- Tran TA, Kallakury BV, Ambros RA, Ross JS (1998) Prognostic significance of tumor necrosis factors and their receptors in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 83(2):276–282
- Tsavaris N, Voutsas IF, Kosmas C, Gritzapis AD, Baxevanis CN (2012) Combined treatment with Bevacizumab and standard chemotherapy restores abnormal immune parameters in advanced colorectal cancer patients. *Invest New Drugs* 30(1):395–402
- Yamamura M, Modin RL, Ohmen JD, Moy RL (1993) Local expression of anti-inflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 91:1005–1010. doi:10.1172/JCI116256

## **Δ. ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ**

Distinct patterns of angiogenic factor expression as a predictive factor of response to chemotherapy in stage IIIA non-small cell lung cancer patients.

Nikolaos Koufos<sup>1\*</sup>, John Syrios<sup>2\*</sup>, Despina Michailidou<sup>1</sup>, Ioannis D Xynos<sup>3</sup>, Andreas Lazaris<sup>4</sup>, Nicolaos Kavantzias<sup>4</sup>, Periclis Tomos<sup>5</sup>, Stamatis Kakaris<sup>6</sup>, Christos Kosmas<sup>7</sup>, Nikolas Tsavaris<sup>1</sup>

\*N. Koufos and J. Syrios are 1<sup>st</sup> co-authors

Correspondence to: Nikolaos Koufos

**Affiliations and addresses:** 1. Oncology Unit, Department of Pathophysiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital, Agios Thomas 17, 11527, Athens, Greece. Tel: +3021320608000

2. 2<sup>nd</sup> Department of Medical Oncology, “St. Savvas” Cancer Hospital. 171 L.Alexandras Av., 11522, Athens, Greece. Tel: +302106409384

3. Imperial Clinical Trials Unit-Cancer, Department of Surgery and Cancer, Charing Cross Hospital, Imperial College London, Fulham Palace Rd London W6 8RF, UK, Tel: +44 20 3311 1234

4. 1st Department of Pathology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

5. Second Department of Propedeutic Surgery, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Laiko General Hospital, Agios Thomas 17, 11527, Athens, Greece. Tel: +3021320608000

6. 1st Thoracic Surgery Department, "SOTIRIA" Hospital of Diseases of the Chest, Athens, Greece.

Department of Thoracic Surgery, Evangelismos Hospital, Ipsilantou 45-47, 10676, Athens, Greece. Tel: +302132041000

7. Department of Medicine, 2nd Division of Medical Oncology, Metaxa Cancer Hospital, Mpotasi 51, 18537, Piraeus, Greece. Tel: +302132079100

**Abstract:**

**Purpose** The expression of various angiogenic factors was assessed in tumour samples of patients with stage III NSCLC and further evaluated in relation to response to induction Paclitaxel-Ifosfamide-Cisplatin (TIP) chemotherapy.

**Methods** Freshly isolated lung tumour specimens obtained by bronchoscopy from 70 stage IIIA NSCLC chemotherapy naïve patients were sampled and analysed for vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 and VEGFR-3. Microvessel density (MVD) was assessed evaluating CD34 and CD105 angiogenic markers. Immunostaining scores were calculated by multiplying the percentage of labeled cells by the intensity of staining for each examined parameter.

**Results** The overall mean immunostaining score value from all NSCLC samples, was 7,83, 5,56 and 15,86 for VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 respectively. The overall mean value of the endothelial antigen CD34 was 16,29, whereas the expression of the CD105 antigen on endothelial cells yielded a multivariate distribution. Patients who responded to chemotherapy expressed significantly higher VEGFR-1 and VEGFR-3 mean values compared to non- responders ( $p < 0.001$ ). No significant difference was noted in VEGFR-2 ( $p = 0.06$ ) mean values between these two groups. The CD34 mean value was significantly higher in responders ( $p < 0.001$ ) whereas no significant difference in CD105 expression was shown between responders and non-responders ( $p = 0.07$ ).

**Conclusion** Angiogenic marker expression proved to be a potential predictive factor of response to chemotherapy in stage III NSCLC which merits further investigation.

**Key words:** angiogenesis, chemotherapy, cytokines, microvessel density, non-small cell lung cancer, predictive factors, prognostic factors, vascular endothelial growth receptors

**Introduction**

Tumour angiogenesis is an essential process in cancer cell proliferation, invasion and metastasis[1]. The balance of pro- and anti-angiogenic factors including growth factors,



cytokines and chemokines that regulates physiologic angiogenesis is disrupted during tumorigenesis[2, 3].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a critical pro-angiogenic protein which drives tumour angiogenesis. The biological functions of VEGF are mediated upon binding to type III receptor tyrosine kinases (RTKs), vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 and VEGFR-3[4-7].

VEGFR-1 plays an important role in tumour progression and dissemination and enhances tumour metastasis in the lung via induction of matrix metalloproteinase 9 (MMP9)[8]. The binding of VEGF to VEGFR-2 activates multiple signalling pathways resulting in up-regulation of endothelial cell proliferation, migration, survival and vascular permeability increase. Expression of VEGFR-2 in combination with VEGFR-3 is significantly up-regulated in the tumour vascular endothelium of most common human solid tumours. VEGFR-3 is largely confined to lymphatic endothelium in adult tissues, but its expression also plays fundamental role in the tumour microenvironment by promoting the sprouting of new lymphatic vessels from preexisting ones[7, 9, 10].

Microvessel density (MVD) as determined by the expression of the endothelial antigens CD34 and CD105 is a direct neo-angiogenesis marker and an important prognostic indicator in NSCLC. MVD has been shown to correlate with the concentration and expression of vascular endothelial growth factor and also to be associated with enzymes involved in the early stages of angiogenesis as well as tumor growth and occurrence of distant metastasis[11-13].

There is plentiful literature regarding the association of angiogenic factors with disease prognosis[4, 14-20], however only a few studies evaluate the role of such factors in predicting response to chemotherapy[21-25].

Platinum based doublet chemotherapy is considered the current standard of care for patients with stage III NSCLC, however, a number of patients from our institution were historically treated with the combination of Paclitaxel-Ifosfamide-Cisplatin (TIP) based on earlier study reports[26-28]. In this study, the expression of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, and of the endothelial markers CD34 and CD105 was assessed in tumour samples of patients with stage III NSCLC and the respective parameters were further analyzed retrospectively in relation to response to induction TIP chemotherapy.

## Patients and Methods

### *Study design*

Ethical approval for the study was received by the Ethics Committee of Laiko General Hospital of Athens, Greece. Seventy patients with stage IIIA NSCLC treated with induction TIP chemotherapy at our institution between 1998 and 2008 were retrospectively analysed. Patients were staged according to the AJCC/UICC TNM staging system (6th edition) and pulled into two equal sized groups (n=35) based on response to chemotherapy (responders *vs* non-responders). Responders and non-responders were subsequently offered surgery and radiotherapy respectively. Groups were matched by pre-treatment patient and tumour characteristics (Table 1).

### *Chemotherapy regimen*

Paclitaxel/Ifosfamide/Cisplatin (TIP) chemotherapy was administered according to the following three weekly schedule: Paclitaxel (Taxol®) was administered at 135–215 mg m<sup>-2</sup> over 1 h by intravenous (i.v.) infusion on day 1, after premedication consisting of dexamethasone 20 mg, dimethidene maleate (Fenistil®) 4 mg and ranitidine 50 mg; all administered i.v. 1 h before paclitaxel. Ifosfamide was administered at 4.5–6.0 g m<sup>-2</sup> i.v. over 1 h divided in day 1 and day 2 (2.25–3.0 g m<sup>-2</sup> per day) along with mesna uroprotection, 40% of the ifosfamide dose, given i.v. before, at 3 and 6 h after Ifosfamide. Cisplatin 80–100 mg m<sup>-2</sup> i.v. over 30 min divided between 2 days (days 1 and 2: 40–50 mg m<sup>-2</sup> per day) with adequate vigorous pre- and post-hydration, furosemide and electrolyte replacement; 20 mEq potassium chloride and 8 mEq magnesium sulphate per litre of post-hydration solution. For febrile neutropenia primary prophylaxis filgrastim 5 mg/kg was administered until recovery of neutrophils. Dose modifications for all three chemotherapy drugs were made in patients with chemotherapy related toxicities. All toxicities were graded according to the Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE)[29]. Patients received up to four cycles of chemotherapy and evaluation of response was performed every 2 cycles by X-rays, Computer Tomography (CT) scans and bone scans using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST, version 1.0)[30]. Patients showing complete or partial response on induction chemotherapy were classified as responders and were



subsequently offered either lobectomy or pneumonectomy with resection of the involved lymph node stations. Non-responders received up to 6 cycles of TIP and were offered radical radiotherapy.

### *Immunocytochemistry*

Tumour samples were obtained at the time of diagnosis via bronchoscopy. The tumour specimens were initially fixed in 10% neutral buffered formaldehyde and then embedded in paraffin wax. Sections of 4µm thick were cut consecutively. Immunohistochemistry was performed on the most representative areas of viable tumour cells avoiding areas of extensive necrosis or haemorrhage at the Pathology Department of National and Kapodistrian University of Athens.

The antibodies used were VEGFR-1/Flt1 (1:50-1:100, RP 077: Diagnostic BioSystems, CA, USA), VEGFR-2/Flk1 (1:50-1:100, RP 076: Diagnostic BioSystems, CA, USA), VEGFR-3/Flt4 (RP 135: Diagnostic BioSystems, CA, USA), CD-105 (Diagnostic BioSystems, CA, USA) and CD-34 (Clone QBEnd 10, Dako, Denmark).

The results were recorded by two experienced pathologists independently counting the percentage of positive cells and the intensity of staining in each section (1+= mild labeling, 2+=moderate, 3+=intense). The immunostaining scores were calculated by multiplying the percentage of labeled cells by the intensity of staining. MVD was evaluated on immunostained sections with CD34 and CD105 and it was determined in the three areas of maximal vascularization by using the criteria of Weidner et al[31].

The specificity of the immunohistochemical procedures was verified by using negative and positive control sections. The negative controls for each tissue were prepared by omitting the primary antibody. Sections from human placenta and tonsils were used as positive controls.

### *Statistical analysis*

Descriptive statistics were used to present the main statistical measures of the parameters under study. Statistical measures used were frequencies and percentages for the discrete variables and descriptive statistics (such as mean, median, standard error of the mean, min-max) for the continuous parameters. In cases where the normal distribution assumption was rejected via the Kolmogorov Smirnov test, the Mann-

Whitney test was implemented so as to compare the markers distribution between the two groups of patients. In addition the Chi-square test was used to test the association between two discrete variables. Survival rate were drawn with the Kaplan Meier product limit method and comparisons were made with the log-rank test. All analyses were implemented at a significance level of  $\alpha=5\%$  with the use of the statistical package SPSS version 16.0.

## **Results**

### *Analysis of immunostaining scores of angiogenic factors in NSCLC*

Tumour samples from 70 NSCLC patients exhibited an overall mean value of immunostaining score of 7,83 (s.error-mean:0,87) for the angiogenic factor VEGFR-1, 5,56 (s.error-mean:0,79) for VEGFR-2 and 15,86 (s.error-mean:1,49) for VEGFR-3. The overall mean value of the endothelial antigen CD34 was 16,29 (s.error-mean:1,29). Table 2 describes the overall mean, median and standard error mean values of the immunostaining scores of the lung tissue expression of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and the endothelial marker CD34.

The expression of the angiogenic marker CD105 showed a multivariate distribution. 81,4% of the patients did not express the CD105 antigen on the endothelial cells of the tumour tissue, whereas 18,6% exhibited immunostaining for the same endothelial marker (Table 3).

### *Variability in expression patterns of angiogenic factors and between responders and non-responders to treatment groups*

Table 4 describes the mean value, standard deviation and standard error mean value of the immunostaining scores of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and CD34 between responders (R) and non-responders (NR) to chemotherapy.

Patients who responded to chemotherapy expressed significantly higher pre-treatment immunostaining scores for VEGFR-1 and VEGFR-3 compared to non-responders ( $p < 0.001$ ) (Figures 1 and 3). No significant difference was noted in VEGFR-2 ( $p = 0.06$ ) immunostaining scores between the two groups of patients (Figure 2). The CD34 immunostaining score was significantly higher in those who responded compared to those who did not respond to treatment ( $p\text{-value} < 0.001$ ) (Figure 4). There was no

significant difference in the distribution of the CD105 expression between responders and non-responders (p-value=0.06) (Table 3).

The median survival for 70 patients was 8.5 months (Figure 5).

## **Discussion**

Angiogenesis is one of the essential hallmarks of cancer evolution laid out by Hanahan and Weinberg[1]. VEGF receptors (VEGFRs) play a significant biological role in this process, however, there is no solid evidence about the prognostic impact of VEGFRs expression on disease outcome.

A number of earlier studies have assessed the prognostic significance of VEGFRs in NSCLC with controversial findings[14, 15]. Particularly, in a meta-analysis the VEGF expression was associated with dismal outcome in patients with NSCLC.[16] In line with this finding were the results of a study which showed a significant association between a strong VEGFR-1 and VEGFR-2 expression with worse survival. Interestingly, the expression of VEGFR-3 conferred favorable outcome in the population of the study.[4]

In a recent meta-analysis of 5386 NSCLC and SCLC patients, VEGF overexpression indicated poor survival for those with NSCLC histology whereas VEGFR-3 expression had not any impact on prognosis.[17]

Although the majority of these studies identified a correlation between VEGFR-1 and VEGFR-2 expression with poor prognosis, there are still conflicting data about the association of VEGFR3 expression with survival. For instance, in a study of 180 NSCLC patients, the cases who stained positive for VEGF-C and VEGFR-3 showed worse survival rates compared to those who fairly stained (p=0.003 and 0.001 respectively).[18]

The diversity of the patient cohorts in terms of stage and histology, median follow-up, and size between the various studies could, to some extent, account for these disparities. Interestingly, angiogenic factors expression was strongly correlated with lower risk of progression only for patients with early stage squamous cell lung cancer in a study, but not for those with adenocarcinoma. This study underlines the diverse biological role of angiogenesis between different histological subtypes of NSCLC.[19]

Several studies have assessed an eventual association between MVD and prognosis in NSCLC patient. In Macchiarini *et al* study, an increased MVD count predicted the aggressive behaviour of the disease. Particularly, NSCLC cases with increased MVD had higher metastatic potential, tumour size and proliferative activity.[20] A meta-analysis published by Meert *et al* concluded that a high MVD assessed by CD34, factor VIII and CD31, is a poor prognostic factor of survival for surgically treated NSCLC patients[13].

Nonetheless, in a meta-analysis of 2719 NSCLC patients MVD has not proved to be a prognostic marker of survival.[32] It was therefore suggested that the apparent inconsistency might be related to methodological differences between studies, such as the antibody/marker used, sample selection, and counting methods.

Regarding NSCLC management, induction chemotherapy with the addition of radiotherapy or not, has been considered the gold standard treatment for stage IIIA NSCLC.[33] Nonetheless, in current literature no angiogenesis-related predictive factors of response to chemotherapy have been validated in large studies in this setting of disease.

For instance, in the BATTLE study 255 heavily pretreated NSCLC patients were randomly allocated to receive erlotinib, vandetanib, erlotinib plus bexarotene, or sorafenib based on molecular biomarkers assessed in fresh core needle biopsy specimens. Patients with high tumour VEGFR-2 expression had improved 8-week disease control rates after treatment with vandetanib compared with those that did not ( $p = 0.05$ ). Despite the improved control rate, this molecule failed to confer any statistically significant overall survival benefit in this phase II study.[21]

Interestingly, several immunocytochemical markers, including angiogenesis, were evaluated in 515 cases of stage I NSCLC in relation to clinical course of the disease. No sufficient evidence supporting any change in clinical practice emerged from this study.[22]

Surprisingly, in a study a high MVD index was predictive of disease response in NSCLC patients who received chemotherapy with the addition of bevacizumab, a monoclonal VEGF antibody. Particularly, a strong correlation between the largest percentage of tumor shrinkage and the MVD of undifferentiated vessels was revealed ( $p= 0.019$ ).[23] However, this finding has yet to be validated in large studies.

In a recently presented study the predictive value of several angiogenic biomarkers, including angiopoietin-2, BMP-9, EGF, endoglin, endothelin-1, FGF-1, FGF-2, follistatin, G-CSF, HB-EGF, HGF, IL-8, leptin, PLGF, VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D, was assessed in 41 patients with stage IV non-squamous NSCLC treated either with chemotherapy alone or with the addition of bevacizumab. Sera was collected before and after the start of treatment. Increased levels of VEGF-A after the first cycle of chemotherapy was correlated with worse PFS in patients who received chemotherapy with bevacizumab. On the contrary, increased leptin levels were associated with improved survival in the group that received the antibody. Besides, increased angiopoietin-2, HGF, follistatin, VEGF-C and VEGF-D conferred poor survival, whereas increased FGF-1 and endothelin-1 predicted improved survival.[25] In the meantime another study evaluated the same panel of angiogenic factors in 68 patients with stage IV non-squamous NSCLC treated either with chemotherapy alone or with the addition of bevacizumab. Sera was collected immediately preceding chemotherapy. High levels of endothelin-1, follistatin, and VEGF-C were associated with worse PFS regardless the type of chemotherapy. High HGF levels conferred worse PFS and overall survival (OS) in those patients who received chemotherapy with bevacizumab compared to those who received chemotherapy alone. Similarly, high endoglin levels were correlated to worse PFS in those patients who received the antibody.[24]

In our study, we retrospectively assessed the expression of certain angiogenic factors in relation to the induction TIP-based chemotherapy response. The unexpectedly high response rate (64%; confidence interval, 50.7-77.3%) observed with this regimen in a previous study of our group led us retrospectively focus on eventual biomarkers affecting prognosis and chemotherapy activity in the population of that study.[27]

Although there is no direct evidence that TIP chemotherapy or its individual components could target angiogenesis, the association between high pre-treatment expression of VEGFR-1 and VEGFR-3 and response to chemotherapy in our study may advocate a possible connection. In support of this notion, data presented by Linderholm et al showed that a decrease of circulating VEGF affects time to progression after 12 weeks of therapy with weekly paclitaxel in metastatic breast cancer, supporting thus a possible role of angiogenic factors in monitoring treatment efficacy of non-VEGF targeted therapies.[34]

Besides, there is strong evidence that a cross talk between several diverse molecular pathways driving tumor invasion and metastasis exists into the cancer cell and its microenvironment.[35] For instance, agents targeting certain gene aberrations may also induce antiangiogenic responses. This may happen due to down-regulation of proangiogenic factors.[36]

We therefore speculate that a cross-talk may occur between angiogenesis and molecular events that repair DNA damages, such as nucleotide excision repair and base-mismatch repair pathways. This hypothesis, would eventually explain the high activity of the TIP regimen, which inhibits the repair of DNA lesion, in the presence of high expression of VEGFR-1, VEGFR-3 and CD34.

Tumor stroma, which is comprised of fibroblastic, inflammatory and immune cells is an additional source of angiogenic factors.[37] Particularly, there is a network of paracrine and autocrine signaling pathways within the tumor cell and its microenvironment. This network may be an appealing therapeutic target in NSCLC.[38] Tumor inducible hypoxia inside the stroma may impede the activity of common chemotherapy regimens. The synergism between paclitaxel and alkylating agents such as cisplatin and ifosfamide has been sufficiently studied.[39] This phenomenon may explain the activity of TIP regimen as an induction or even rescue treatment in several diverse malignancies.[40-42] Whether the TIP regimen may overcome the tumor hypoxia and exert its activity in tumor microenvironment has to be further investigated.

In our study CD34 expression was evident in all samples studied and significantly higher in responders, whereas only one fifth of the patients exhibited immunostaining for the marker CD105 with no association to treatment outcome. Probably the reason of this variability is the inherent capacity of the pan-endothelial marker CD34 to react well with endothelial cells in all blood vessels[11] as opposed to CD-105 which appears to bind preferentially to activated endothelial cells in tissues participating in angiogenesis[12]

The retrospective nature and the small population of our study limit the impact of the results. Nonetheless, given the scarcity of the literature in translation research studies and the lack of predictive factors in the treatment of non-metastatic NSCLC, we suggest that the results of this study merit further investigation. In line with this notion, we plan to carry out a study in order to assess angiogenic factors expression and its impact on

response to chemotherapy regimens with antiangiogenic activity, such as bevacizumab and metronomic vinorelbine, for stage IV NSCLC patients.

**Table 1:** Patient Characteristics and Clinical Parameters.

Characteristic		Group A (Responders)		Group B (Non Responders)	
		N	%	N	%
Patients		35	100	35	100
Sex	Male	30	87	26	74
	Female	5	13	9	26
Age (years)	Median	58		56	
	Range	40 - 72		48-70	
Performance Status	0	13	37	11	31
	1	13	37	16	46
Histology type	Adenocarcinoma	20	57	20	57
	Squamous cell	11	32	13	37
	Large cell	4	11	2	6

**Table 2:** Descriptive table that depicts the results of immunostaining scores of each examined parameter from 70 NSCLC patients.

Examined parameter	Mean value	Median value	Std. error mean
<b>VEGFR-1</b>	7,83	5,0	0,87
<b>VEGFR-2</b>	5,56	5,0	0,79
<b>VEGFR-3</b>	15,86	15,0	1,49
<b>CD34</b>	16,29	15,0	1,29

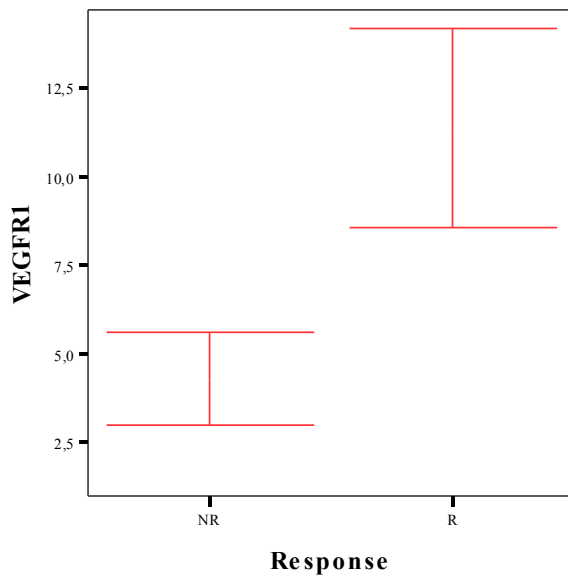
**Table 3.** Descriptive table that shows the results of immunostaining scores of the endothelial antigen CD105 from 70 NSCLC patients. 81,4% of the patients did not express the CD105 antigen versus 18,6% who exhibited immunostaining for the CD105 marker. There was no significant difference in the distribution of the CD105 expression among responders and non-responders (p-value=0,06). RE: Responders, NR: Non-responders. *p*-values<0.05.

		Response		Total	
		NR	R		
CD105	0	No. of patients	32	25	57
		%	91,4%	71,4%	81,4%
	10	No. of patients	3	10	13
		%	8,6%	28,6%	18,6%
Total		No. of patients	35	35	70
		%	100,0%	100,0%	100,0%

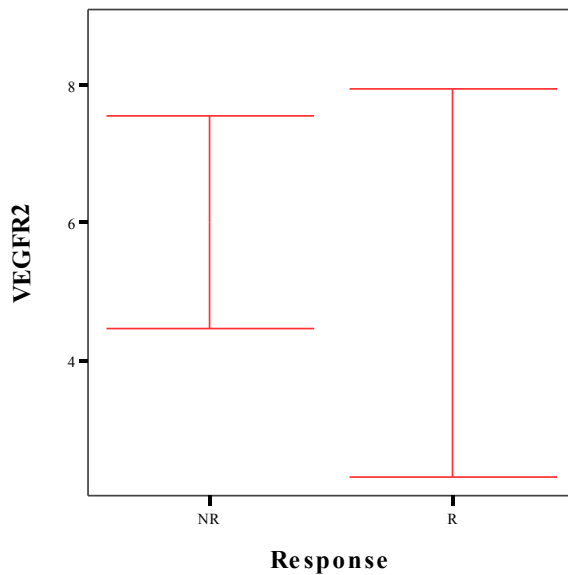


**Table 4:** Descriptive table that depicts the results of immunostaining scores of each examined parameter among response and non-response groups of NSCLC patients. RE: Responders, NR: Non-responders. *p*-values<0.05.

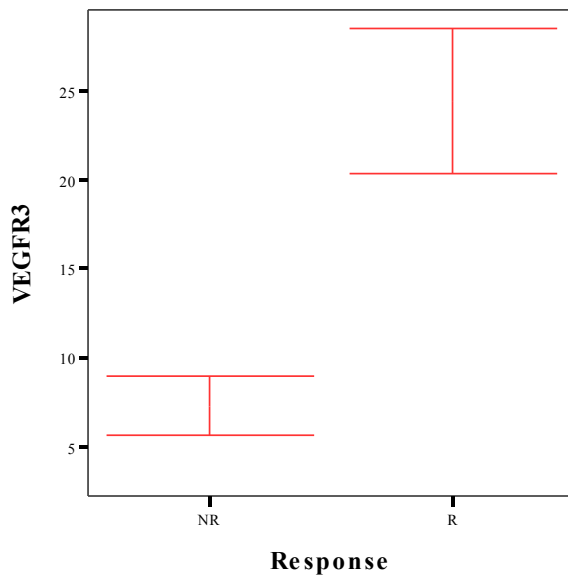
Examined Parameter	Response	N	Mean Value	Std. Deviation	Std. Error	
					Mean	<i>P</i>
<b>VEGFR-1</b>	NR	35	4,29	3,862	0,653	<0,001
	RE	35	11,37	8,153	1,378	
<b>VEGFR-2</b>	NR	35	6,00	4,505	0,761	0.06
	RE	35	5,11	8,231	1,391	
<b>VEGFR-3</b>	NR	35	7,29	4,902	0,829	<0.001
	RE	35	24,43	11,805	1,995	
<b>CD34</b>	NR	35	10,00	5,557	0,939	<0.001
	RE	35	22,57	11,073	1,872	



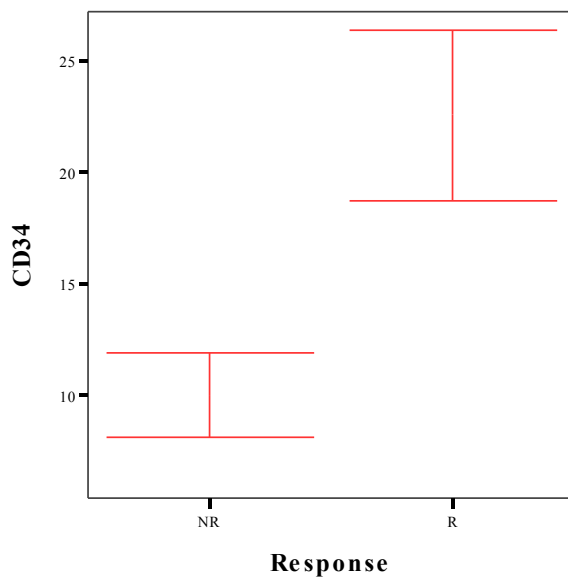
**Figure 1:** Schematic representation and comparison of the levels of tissue VEGFR-1 expression between the two groups of patients. R: Responders, NR: Non-responders. Error bars show 95.0% confidence interval of the mean.



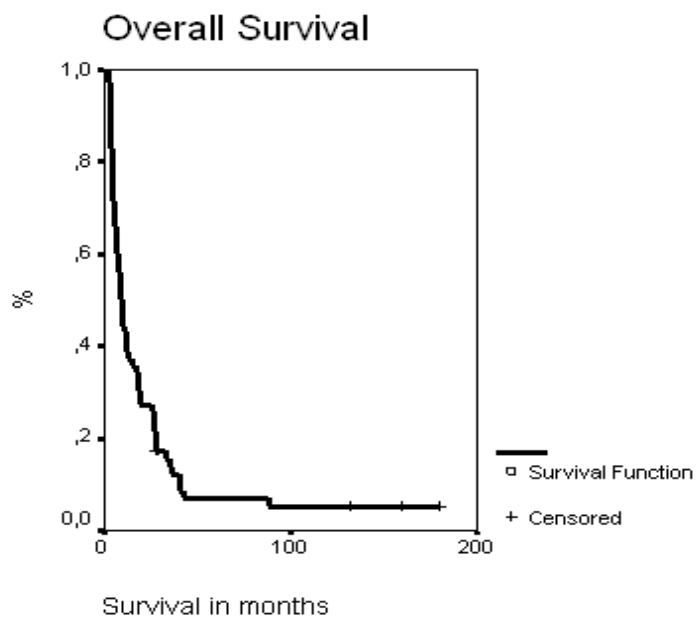
**Figure 2:** Schematic representation and comparison of the levels of tissue VEGFR-2 expression between the two groups of patients. R: Responders, NR: Non-responders. Error bars show 95.0% confidence interval of the mean.



**Figure 3:** Schematic representation and comparison of the levels of tissue VEGFR-3 expression between the two groups of patients. R: Responders, NR: Non-responders. Error bars show 95.0% confidence interval of the mean



**Figure 4:** Schematic representation and comparison of the levels of endothelial CD34 expression between the two groups of patients. R: Responders, NR: Non-responders. Error bars show 95.0% confidence interval of the mean.



**Figure 5:** Median overall survival.

## REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.
2. Benelli R, Lorusso G, Albini A, Noonan DM: Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr Pharm Des* 2006, 12(24):3101-3115.
3. Bremnes RM, Camps C, Sirera R: Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006, 51(2):143-158.
4. Carrillo de Santa Pau E, Arias FC, Caso Pelaez E, Munoz Molina GM, Sanchez Hernandez I, Muguruza Trueba I, Moreno Balsalobre R, Sacristan Lopez S, Gomez Pinillos A, del Val Toledo Lobo M: Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009, 115(8):1701-1712.
5. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K: The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63(5):601-615.
6. Rapisarda A, Melillo G: Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv Cancer Res* 2012, 114:237-267.
7. Smith NR, Baker D, James NH, Ratcliffe K, Jenkins M, Ashton SE, Sproat G, Swann R, Gray N, Ryan A *et al*: Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res* 2010, 16(14):3548-3561.
8. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002, 2(4):289-300.
9. Lenton K: VEGFR-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Regul Homeost Agents* 2002, 16(3):227-232.

10. Shibuya M, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006, 312(5):549-560.
11. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Basolo F, Mussi A, Lucchi M, Chine S, Angeletti CA, Harris AL, Bevilacqua G: Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1995, 177(1):57-63.
12. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C: CD 105 and angiogenesis. *J Pathol* 1996, 178(4):363-366.
13. Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, Lafitte JJ, Mascaux C, Sculier JP: The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002, 87(7):694-701.
14. Volm M, Koomagi R, Mattern J: Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer* 1997, 74(1):64-68.
15. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999, 188(4):369-377.
16. Delmotte P, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP: [VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis]. *Rev Mal Respir* 2002, 19(5 Pt 1):577-584.
17. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y: Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2009, 4(9):1094-1103.
18. Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, Chujo M, Miura T, Uchida Y: Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003, 97(2):457-464.

19. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I, Torre W, Lozano MD, Brambilla E, Brambilla C *et al*: Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012, 30(10):1129-1136.
20. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA: Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992, 340(8812):145-146.
21. Kim ES, Herbst RS, Wistuba, II, Lee JJ, Blumenschein GR, Jr., Tsao A, Stewart DJ, Hicks ME, Erasmus J, Jr., Gupta S *et al*: The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discov* 2011, 1(1):44-53.
22. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F: Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997, 15(8):2858-2865.
23. Zhao YY, Xue C, Jiang W, Zhao HY, Huang Y, Feenstra K, Resau JH, Qian CN, Zhang L: Predictive value of intratumoral microvascular density in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy plus bevacizumab. *J Thorac Oncol* 2012, 7(1):71-75.
24. Borgia J.A. PR, Ibrahim Z., Fhied C., Basu S., Lie W.R., Fidler M.J., Batus M., Bonomi P.D.: Potential predictive value of hepatocyte growth factor (HGF) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with a platinum doublet and bevacizumab. *J Clin Oncol* 2014, 32(suppl; abstr e22000).
25. Batus M PR, Kubasiak J, Fhied C, Ibrahim Z, Melinamani S, Fughhi I, Lie WR, Basu S, Fidler M.J, Bonomi P.D, Borgia J.A.: Differences in circulating angiogenic biomarkers as prognosticator for outcome in bevacizumab-treated nonsquamous non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol* 2014, 32:5s( suppl; abstr 11037).
26. Pohl G, Krajnik G, Malayeri R, Muller RM, Klepetko W, Eckersberger F, Schafer-Prokop C, Pokrajac B, Schmeikal S, Maier A *et al*: Induction chemotherapy with the TIP regimen (paclitaxel/ifosfamide/cisplatin) in stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006, 54(1):63-67.

27. Kosmas C, Tsavaris NB, Polyzos A, Kalofonos HP, Sepsas E, Malamos NA, Vadiaka M, Dosios T, Antonopoulos MJ: A phase II study of paclitaxel-ifosfamide-cisplatin combination in advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2000, 89(4):774-782.
28. Ripley RT, Rusch VW: Role of induction therapy: surgical resection of non-small cell lung cancer after induction therapy. *Thorac Surg Clin* 2013, 23(3):273-285.
29. Common Terminology Criteria for Adverse Events. Version 4.0 (2009). (n.d.).
30. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC *et al*: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92(3):205-216.
31. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991, 324(1):1-8.
32. Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, Harris AL, Altman DG: Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2007, 8(6):488-499.
33. Horita N, Miyazawa N, Morita S, Kojima R, Kimura N, Kaneko T, Ishigatsubo Y: Preoperative chemotherapy is effective for stage III resectable non--small-cell lung cancer: metaanalysis of 16 trials. *Clin Lung Cancer* 2013, 14(5):488-494.
34. Linderholm BK, Lidbrink E, Tallroth E, Einbeigi Z, Svensson H, von Wachenfeldt A, Norberg B, Carlsson L, Olsson ME, Bergh J *et al*: Angiogenic factors in relation to clinical effect in a phase II trial of weekly paclitaxel. *Breast* 2013, 22(6):1142-1147.
35. Ma J, Waxman DJ: Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(12):3670-3684.
36. Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M: Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are



- responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* 2006, 66(4):2173-2180.
37. Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005, 438(7070):967-974.
  38. Crino L, Metro G: Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev* 2014, 23(131):79-91.
  39. Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ: Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86(20):1517-1524.
  40. Kondagunta GV, Bacik J, Donadio A, Bajorin D, Marion S, Sheinfeld J, Bosl GJ, Motzer RJ: Combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin is an effective second-line therapy for patients with relapsed testicular germ cell tumors. *J Clin Oncol* 2005, 23(27):6549-6555.
  41. Lissoni AA, Colombo N, Pellegrino A, Parma G, Zola P, Katsaros D, Chiari S, Buda A, Landoni F, Peiretti M *et al*: A phase II, randomized trial of neoadjuvant chemotherapy comparing a three-drug combination of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) versus paclitaxel and cisplatin (TP) followed by radical surgery in patients with locally advanced squamous cell cervical carcinoma: the Snap-02 Italian Collaborative Study. *Ann Oncol* 2009, 20(4):660-665.
  42. Mountzios G, Dimopoulos MA, Bamias A, Vourli G, Kalofonos H, Aravantinos G, Fountzilas G, Papadimitriou CA: Randomized multicenter phase II trial of cisplatin and ifosfamide with or without paclitaxel in recurrent or metastatic carcinoma of the uterine cervix: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Ann Oncol* 2009, 20(8):1362-1368.