

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Διευθυντής : Καθηγητής Ε. ΠΑΤΣΙΟΥΡΗΣ



**ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (VEGF-C) ΚΑΙ ΤΗΝ ΔΙΗΘΗΣΗ
(MT-MMPS) ΣΕ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΑ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υπό

ΓΕΩΡΓΙΟΥ Μ. ΓΟΡΑΝΤΩΝΑΚΗ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ ΟΥΡΟΛΟΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2014

<u>Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής</u>	: 27/9/2004
<u>Ορισμός τριμελούς Επιτροπής</u>	: 26/10/2004
<u>Μέλη τριμελούς Επιτροπής</u>	: Λ. ΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝ. ΖΕΡΒΑΣ Ν. ΚΑΒΑΤΖΑΣ
<u>Ημερομηνία ορισμού θέματος</u>	: 14/12/2004
<u>Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής</u>	: 29/7/2013
<u>Ορισμός επταμελούς Επιτροπής</u>	: 14/1/2014 Α.Π. : 809
<u>Μέλη επταμελούς Επιτροπής</u>	: Λ. ΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ε. ΠΑΤΣΙΟΥΡΗΣ Ε. ΑΓΑΠΗΤΟΣ Α. ΖΕΡΒΑΣ Ν. ΚΑΒΑΤΖΑΣ Α. ΛΑΖΑΡΗΣ Κ. ΣΤΡΑΒΟΔΗΜΟΣ
<u>Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος</u>	: Μ. Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή : ΑΡΙΣΤΑ

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ του ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. (Νόμος 5543/1932, άρθρον 202, παράγραφος 2)

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ**

« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ . ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΞΕΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΣΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Στην κόρη μου, Νάντια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	10
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	21
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	24
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	28
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	29
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	
ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ.....	31
ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	32
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	37
ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.....	43
1.Επιδημιολογία.....	43
2. Αιτιοπαθογένεια – Παράγοντες κινδύνου.....	46
ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ...	53
ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	56
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ.....	58
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	60
ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	62
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	66
1. Κλασσικοί προγνωστικοί δείκτες.....	67
2. Βιολογικοί- μοριακοί προγνωστικοί δείκτες.....	68
ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ.....	78

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΔΙΑΚΟΠΤΗΣ.....	79
1. Σχηματισμός των αγγείων του όγκου.....	81
2. Δομή του αγγειακού δικτύου των όγκων.....	85
3. Η σημασία της αγγειογένεσης στη μετάσταση.....	86
4. Παράγοντες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση στον όγκο.....	87
ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ	
1 . Μορφολογία των λεμφαγγείων και ανατομία της λεμφαγγειακής μετάστασης.....	88
2. Μηχανισμοί λεμφαγγειογένεσης.....	90
ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF) 97	
1. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων VEGF-A	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	102
2. VEGF-A και καρκίνος.....	106
2. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων VEGF-B	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	108
2. VEGF-B και καρκίνος.....	109
3. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων VEGF-C	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	110
2. VEGF-C και καρκίνος.....	113
4. Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων VEGF-D	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	115
2. VEGF-D και καρκίνος.....	116
ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ	
1. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ -1 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ VEGFR-1	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	117
2. VEGFR-1 και καρκίνος.....	118

2. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ -2 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ VEGFR-2	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	119
2. VEGFR-2 και καρκίνος.....	120
3. Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ -2 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ VEGFR-3	
1. Έκφραση και λειτουργίες.....	121
2. VEGFR-3 και καρκίνος.....	124
Ο VEGF-C ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	125
ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMPs)	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	129
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ MMPs ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	136
3. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ MMPs.....	139
4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ MMPs	
1. Φυσιολογικές καταστάσεις.....	146
2. Παθολογικές καταστάσεις.....	148
MMPs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	
1. ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ MMPs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	149
2. Η ΠΗΓΗ ΤΩΝ MMPs ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ.....	150
3. ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ MMPs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	151
1. Οι MMPs ενισχύουν την αύξηση μέσω της ενεργοποίησης μιτογόνων παραγόντων.....	153
2. Οι MMPs στη διήθηση και μετάσταση.....	153
3. MMPs και αγγειογένεση.....	155
4. Οι MMPs ως προγνωστικοί δείκτες.....	156
5. MMPs—Στοχευμένη θεραπεία.....	165

ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MT-MMPs)	
1. Δομή και ενεργοποίηση των MT-MMPs.....	167
2 . Υποστρώματα των MT-MMPs.....	169
3 . Οι MT-MMPs στην ενεργοποίηση προ MMPs και άλλων ζυμογόνων.....	169
4. MT-MMPs και εξωκυττάρια μηνυματοδότηση.....	170
5 . MT-MMPs και ενδοκυττάρια μηνυματοδότηση.....	170
MT-MMPs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	
1 .MT MMPs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ.....	171
2 . MT-MMP ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	172
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΣΚΟΠΟΣ.....	175
ΥΛΙΚΟ.....	176
ΜΕΘΟΔΟΙ : 1 .Ανοσοιστοχημεία.....	178
2 .Στατιστικές μέθοδοι.....	184
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
1.Πρότυπο έκφρασης.....	185
2 .Συσχέτιση της έκφρασης των μελετώμενων δεικτών με Κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.....	190
3 .Συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών.....	197
4 .Συσχέτιση της έκφρασης των μελετώμενων δεικτών με νεότερους βιολογικούς δείκτες	197
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	200
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	205
SUMMARY.....	207
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	209

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα : ΓΕΩΡΓΙΟΣ
Επώνυμο : ΓΟΡΑΝΤΩΝΑΚΗΣ
Όνομα πατρός : ΜΙΧΑΗΛ
Όνομα μητρός : ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
Ημερομηνία γέννησης : 13/11/1969
Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμος με ένα τέκνο
E-mail : gorantonakis@yahoo.gr

Πανεπιστημιακές Σπουδές : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Τιμισοάρας
Ρουμανίας. Αποφοίτηση : 11/1995

Ξένες γλώσσες : Αγγλικά

Επαγγελματική δραστηριότητα :

-Υπηρεσία υπαίθρου στο άγονο περιφερειακό ιατρείο Ψωφίδος- Τριπόταμα ορεινής Αχαΐας, από 3/1997 έως 4/1998

-1 (ένα) χρόνο ως ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στην Β' Χειρουργική Κλινική του Π.Γ.Ν. Νέας Ιωνίας «Η ΑΓΙΑ ΟΛΓΑ» από 4/1998 έως 4/1999.

- Στρατιωτική θητεία: Από 5/1999 έως 11/2000 (στο Φρουραρχείο Αθηνών και στο Στρατιωτικό Νοσοκομείο Ρόδου, συμμετέχοντας ενεργά σε όλες τις δραστηριότητες του νοσοκομείου.

-Ειδικευόμενος Ουρολόγος στην Ουρολογική Κλινική του Π.Γ.Ν. Νέας Ιωνίας «Η ΑΓΙΑ ΟΛΓΑ» από τον Μάιο 2001 και ολοκλήρωση της ειδικότητας τον Μάιο 2005.

Κατά το ανωτέρω διάστημα απέκτησε ιδιαίτερη εκπαίδευση και στους τομείς της Παιδοουρολογίας και Γυναικολογίας.

-Επιμελητής Πανεπιστημιακής Ουρολογικής Κλινικής Ηρακλείου Κρήτης.
(12/ 2005 έως 12/ 2006) Καθηγ. Σοφράς Φραγκίσκος

(συμμετοχή σε όλα τα κλινικά, εκπαιδευτικά και ερευνητικά προγράμματα του Τμήματος, καθώς και στη διδακτική επιστασία των προπτυχιακών φοιτητών της Ιατρικής Σχολής.)

-Έμμισθος Επιμελητής στην κλινική Λαπαροσκοπικής, Ρομποτικής και ελάχιστα επεμβατικής ουρολογίας του Ιατρικού Κέντρου Αθηνών, (2/2007-2/2010) Δ/ντης: Αν. Καθηγ. Βασίλης Πουλάκης.

(Συμμετοχή σε πληθώρα πρωτοποριακών λαπαροσκοπικών και ρομποτικών χειρουργικών επεμβάσεων).

-Υπηρεσία στο ΙΚΑ-ΕΤΑΜ Ασπροπύργου από 8-2007 έως 3-2013.

- Από τον 8-2007 παρέχω τις ιατρικές μου υπηρεσίες στο ιδιωτικό μου ιατρείο και σε συνεργαζόμενα νοσοκομεία.

Επιστημονική δραστηριότητα

-9/2004: 2nd Course of the European Society of Residents in Urology (ESRU), Prague

-6/2006: Δίπλωμα του Κολλεγίου των Ευρωπαίων Ουρολόγων - Fellow of the European Board of Urology (FEBU)
(Κατόπιν γραπτών και προφορικών εξετάσεων, υπό την αιγίδα της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας)

- 2008: Εκπαίδευση και λήψη πιστοποίησης, κατόπιν γραπτών και προφορικών εξετάσεων στη χρήση των Υπερήχων στην Ουρολογία και στη διενέργεια διορθικών βιοψιών για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη, στο Νοσοκομείο "Ο Άγιος Σάββας.

Ερευνητική Δραστηριότητα

I) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ (FULL PAPER) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (1).

II) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗΣ (ABSTRACTS) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΣΕ ΤΟΜΟΥΣ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ (15).

III) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (3).

IV) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ (43)

Μέλος των ακόλουθων εταιρειών:

- Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας



**Ελληνική
Ουρολογική
Εταιρεία**

- Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρείας
(European Urological Association)



- Διεθνούς Ενδοουρολογικής Εταιρείας
(International Endourological Society)



- ΕΥΡΩΠΑΙΚΗΣ ΡΟΜΠΟΤΙΚΗΣ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ - ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

- I) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ (FULL PAPER) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (1)
- II) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗΣ (ABSTRACTS) ΣΕ ΤΟΜΟΥΣ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ (PROCEEDINGS) - (15)-
- III) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ -(3) –
- IV) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ - (43)-

I) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ (fulltextpaper) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ (1)

EVALUATION OF THE ROLE OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)-C IN UROTHELIAL CARCINOMAS OF THE BLADDER
 Mylona E, Magkou C, Gorantonakis G, Giannopoulou I, Nomikos A, Zarogiannos A, Zervas A, Nakopoulou L.
ANTICANCER RESEARCH ,2006 Sep-Oct; 26(5A):3567-71

II) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗΣ (ABSTRACT) ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΣΕ ΤΟΜΟΥΣ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ (PROCEEDINGS) - (15)-

1.)COMPARATIVE STUDY OF P53 EXPRESSION IN UROTHELIAL TUM ANAKOINΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ORS OF THE BLADDER IN THIN PREP SLIDES AND TISSUE SECTIONS. A FEASIBILITY STUDY.
 H. Spathi¹, K. Delivelioti¹, L. Gianni¹, N. Giannakou², G. Gorantonakis³, I.Gerzelis³, P. Karakitsos⁴.
CYTOPATHOLOGY,Volume15, Supp 2, pg (69-70), October 2004
 30th European congress of Cytology -10/2004

2.) THE EFECTIVENESS OF LOCAL INTRAVEZICAL ANESTHESIA WITH ROPIVOCAINE IN MINIMAL HANDLING ENDOSCOPIC PROCEDURES.OUR EXPERIENCE.
 GorantonakisG.², V. TheodoropoylosV.², LykoudiE.¹, GarneliA¹, Gerzelisl.², RammosL.², Alexandrakis K.², KoutaAs.¹.
EUROPEAN JOURNAL OF ANAESTHESIOLOGY, Vol22, Supp 34, pg (103, A-392), May 2005
 European congress of Anesthesiology, Euroanaesthesia 2005 (28-31 May 2005), Vienna, Austria

3.)THE IMPROVEMENT IN ANALGESIC PARAMETRES OF SPINAL ANAESTHESIA BY THE ADDITION OF INTRATHECAL MIDAZOLAM TO BUPIVOCAINE IN BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA(BPH) SURGERY REPAIR.
 LykoudiE.¹, GorantonakisG.², TheodoropoylosV.², KapotaE.¹, AlexandrakisK.², ChamilosE.², KoutaAs.¹.
EUROPEAN JOURNAL OF ANAESTHESIOLOGY, Vol 22, Supp 34, pg (101, A-382), May 2005
 European congress of Anesthesiology, Euroanaesthesia 2005 (28-31 May 2005) , Vienna, Austria

4.) TOTAL INTRAVENOUS ANESTHESIA (T.I.V.A.) VERSUS SPINAL BLOCK FOR MINOR UROLOGICAL OPERATIONS.

Gorantonakis G.², Lykoudi E.¹, Theodoropoulos V.², Tamvakos G.², Dara Th.¹, Kouta As.¹.

EUROPEAN JOURNAL OF ANAESTHESIOLOGY, Vol 22, Supp 34, pg (97, A-366), May 2005

The European Society of Regional Anesthesia (ESRA) Annual Congress -2004

5.)NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION AND ANDROGEN EXPRESSION IN BENIGN AND NEOPLASTIC PROSTATE EPITHELIUM

Ghikonti Ioanna (2), Tsigas Alexia (2), Mihalopoulou Anna (2), Bairaktari Georgia (2), Tamvakos George (1), Gorantonakis George (1), Chamilos Efthymios (1), Theodoropoulos Nikolaos (2), Skoulidakis George (2), Theodoropoulos V. *VIRCHOW ARCHIVES*, Volume 447, Issue Nr. 2, August 2005 pg(119-572), p681asilios
20th European congress of Pathology – Carrefour Pathologie- Sept 3-8, 2005 Paris, France

6.)IS P63 A RELIABLE MARKER FOR PROSTATE BASAL CELL EPITHELIUM? IMPLICATIONS FOR PROSTATE CANCER DIAGNOSIS

Ghikonti Ioanna (2), Tsigas Alexia (2), Mihalopoulou Anna (2), Bairaktari Georgia (2), Tamvakos George (1), Gorantonakis George (1), Chamilos Efthymios (1), Theodoropoulos Nikolaos (2), Skoulidakis George (2), Theodoropoulos V. *VIRCHOW ARCHIVES*, Volume 447, Issue Nr. 2, August 2005 pg(448-449), European congress of Pathology – Carrefour Pathologie- Sept 3-8, 2005 Paris

7.)EVALUATION OF THE ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)-C IN THE UROTHELIAL CARCINOMAS OF THE BLADDER.

¹Gorantonakis G, ¹Magkou C, ¹Nomikos A, ³Zarogiannos A, ²Giannopoulou I, ¹Zoumbouli C, ³Zervas A, ²Nakopoulou L.

VIRCHOW ARCHIVES Volume 448, Issue Nr. 5, May 2006 pg(698), p111

2nd Inter-congress of the European Society of Pathology, May 2006, Ioannina, Greece

8.)URINARY TRACT INJURIES DURING HYSTERECTOMIES. INCIDENCE RATES, MANAGEMENT AND PREVENTION.A 5-YEAR REVIEW.

Gorantonakis G.¹, Eleftheriadis K.¹, Papadaki M.², Koumantakis E.², Sofras F.¹
INTERNATIONAL UROGYNECOLOGY JOURNAL, Vol 17, Supp 2, pg 325, 499,2006

31', IUGA 2006, Annual meeting of international Urogynecological Association, Sept 2006

9.) EVALUATION OF P53, C-ERBB-2, CK20 EXPRESSION AND KI67 PROLIFERATIVE ACTIVITY AS MARKERS OF TUMOR RECURRENCE, RELAPSE-FREE INTERVAL (RFI) AND PROGRESSION-FREE DISEASE SURVIVAL IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE BLADDER.

Gorantonakis G.¹, Theodoropoulos V.E.¹, Giouris A.¹, Gerzelis I.¹ Tamvakos G.¹, Chamilos E.¹, Kiparidou E.², Bourli A.²

EUROPEAN UROLOGY (Meetings) Vol. 1, Issue 2, Oct 2006, ISSN 1872-7114 ; pg85, p87

18o Congress of the European Society for Urological Research- ESUR- 2004

10.) THE STUDY OF THE EXPRESSION OF THE BIOMARKERS P53, KI67, AND C-ERB-2 IN CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN BLADDER CANCER.

Gorantonakis G.¹, Theodoropoulos V.E.¹, Giouris A.¹, Konstantakis E¹, Tamvakos G.¹, Kiparidou E.², Bourli A.², Manikas K.¹.

EUROPEAN UROLOGY (Meetings) Vol 1, Issue 2, Oct 2006, ISSN 1872-7114 ; pg86, p88

EAU 2nd South Eastern European Meeting, Thessalonica, Greece, 20-21 Oct 2006

11.) DOES EXPRESSION OF P63 AND CYTOKERATIN 903 POTENTIALLY INCREASE THE SPECIFICITY FOR DISCERNING PROSTATE CANCER FROM HIGH GRADE PIN, OR ATYPICAL PROSTATE LESIONS?

Gorantonakis G. (1), Theodoropoulos V.E (1), S. Palaiologos (1), A. Tsigka (2), A. Mihalopoulou (2), K. Alexandrakis (1), E. Chamilos (1), I. Ghikonti (2).

EUROPEAN UROLOGY (Meetings) Vol. 1, Issue 2, Oct 2006, ISSN 1872-7114 ; pg12

EAU 2nd South Eastern European Meeting, Thessalonica, Greece, 20-21 Oct 2006

12.)THE STUDY OF THE EXPRESSION OF NEUROPEPTIDES CHROMOGRANIN A (CgA) AND NEURON SPECIFIC ENOLASE (NSE), IN CORRELATION WITH THE ANDROGEN RECEPTOR (AR) EXPRESSION IN PROSTATE CANCER (PCA), PROSTATE INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (PIN), AND PROSTATE ADENOSIS (PA).

Gorantonakis G.(1), Theodoropoulos V.E.(1), Kalyvas Ch.(1), A. Tsigka (2)

, A. Mihalopoulou (2) K. Alexandrakis (1) , Rammos L.(1), I. Ghikonti (2).

EUROPEAN UROLOGY (Meetings) Vol 1, Issue 2, Oct 2006, ISSN 1872-7114 ; pg10

EAU 2nd South Eastern European Meeting, Thessalonica, Greece, 20-21 Oct 2006

13.) THE STUDY OF THE EXPRESSION OF THE BIOMARKERS P53, KI67, AND C-ERB-2 IN CORRELATION WITH THE GRADE OF MALIGNANCY, THE PATHOLOGICAL STAGE AND THE AGE IN BLADDER CANCER.

Kiparidou E.2, Giouris A.1, Bourli A.2, Konstantakis E1, GORANTONAKIS G.1, Gerzelis I.1, Tamvakos G.1, Manikas K.1.

8th Mediterranean Congress of Urology – September 2003

14.) THE STUDY OF THE PROGNOSTIC MARKERS P53, KI67, AND C-ERB-2 IN RELATION WITH THE CYSTOSCOPIC FINDINGS IN BLADDER CANCER.

Giouris A1, Kiparidou E2, Konstantakis E1, GORANTONAKIS G.1, Chamilos E.1, Alexandrakis K.1, Rammos L.1, Katsonis Z.1.

8th Mediterranean Congress of Urology – September 2003

15.) EFFECT OF LOW AND HIGH LIGATION PROCEDURES IN MEN WITH VARICOCELE-ASSOCIATED INFERTILITY (V.A.I.).NEW SCIENTIFIC INFORMATIONS RELATED TO VARICOCELES

Gorantonakis Georgios et.al.

3rd Mediteranian Symposium of Andrology. Santorini-Greece , 2004

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΕΣ ΚΕΙΜΕΝΟ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ - (3) -

1.) ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΠΥΕΛΙΚΗΣ ΕΚΤΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ. ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΙΑ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΣΠΑΝΙΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Τριαντοπούλου Χ.² Γοραντωνάκη Α.³, Μανίκας Κ.¹, Κουλεντιανός Η.³.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΑ, Τόμος 37, Αρ. 2, Απρίλιος - Ιούνιος 2006

2.) ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΣΤΟΜΑΧΟΥ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΙΑΣ ΣΠΑΝΙΑΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.

Β. Θεοδωρόπουλος (1), Γ. Γοραντωνάκης (1), Ι. Γκερζελής (1), Ελισ. Κυπαρίδου (2).

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΥΡΟΛΟΓΙΑ, 2006, 18:384-388

3.) ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΣΤΟ ΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΟ. ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΙΑ ΣΠΑΝΙΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.

Γεώργιος Γοραντωνάκης (1), Βασ. Θεοδωρόπουλος (1), Αντ. Μπουρλή (2), Ελ. Σπάθη

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΥΡΟΛΟΓΙΑ, 2006, 18:389-393

IV.) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ - (43)-

1.) ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΒΟΥΒΩΝΟΚΗΛΗΣ Ή ΜΕΘΟΔΟΣ STOPPA;

Δ. Νίκζας, Ι. Πετρόπουλος, Ε. Μπαθρέλος, Α. Γεωργακάκης, Δ. Παρθένης, Γ. ΓΟΡΑΝΤΩΝΑΚΗΣ

XXI Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής – Νοέμβριος 1998

2.) Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΧΟΥ .

Ι. Πετρόπουλος, Π. Σκιαδάς, Γ. ΓΟΡΑΝΤΩΝΑΚΗΣ, Η. Κόνιαρης, Τ. Κακαβούλης

XXI Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής – Νοέμβριος 1998

3.) Η ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ.

Γοραντωνάκης Γ.², Μανίκας Κ.², Κουλεντιανός Η.¹.

Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο – 2002

4.) Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΚΙ-67 ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ , ΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΠΟΤΡΟΠΗ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ.

Γιούρης Α¹, Κυπαρίδου Ε²., Γοραντωνάκης Γ¹., Χαμηλός Ε¹., Γκερζελής Ι.¹, Γιάτσου 16^ο

Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - Σεπτέμβριος 2002

5.) Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ P53 ,C-ERB-2, ΚΙ67 ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΥΣΤΕΟΣΚΟΠΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.

Γιούρης Α¹, Κυπαρίδου Ε²., Μπουρλή Α²., Πέτρου Α¹., Γοραντωνάκης Γ¹., Γκερζελής.

16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - Σεπτέμβριος 2002

6.) ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ. ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ

Μπουρλή Α.², Γοραντωνάκης Γ.¹, Κωνσταντάκης Ε.¹, Θεοδωρόπουλος Β.¹,
12^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ογκολογίας - Αθήνα, Νοέμβριος 2003

7.) ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΣΤΟ ΔΩΔΕΚΑΔΑΚΤΥΛΟ. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΝΟΣ ΣΠΑΝΙΟΥ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Κωνσταντάκης Ε.¹, Θεοδωρόπουλος Β.¹, Γιούρης Α.¹,
12^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ογκολογίας - Αθήνα, Νοέμβριος 2003

8.) Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΚΕΡΑΤΙΝΗΣ 20, ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ Ρ53, ΤΟΥ C-ERB-2, ΤΟΥ ΚΙ67 ΚΑΙ ΤΩΝ ΛΟΙΠΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.

Κυπαρίδου Ε.², Γιούρης Α.¹, Γοραντωνάκης Γ.¹, Κωνσταντάκης Ε.¹, Ταμβάκος Γ.¹,
12^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ογκολογίας - Αθήνα, Νοέμβριος 2003

9.) Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ Ρ53 , C-ERB-2, ΚΙ67 ΚΑΙ CK20 ΣΤΟ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.

Κυπαρίδου Ε.², Γιούρης Α.¹, Γοραντωνάκης Γ.¹, Κωνσταντάκης Ε.¹, Γκερζελής Ι.¹,
12^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ογκολογίας - Αθήνα, Νοέμβριος 2003

10.) ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΤΑΠΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ ΜΕ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ- ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΙΑΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ

Γοραντωνάκης Γ.¹, Κυπαρίδου Ε.², Θεοδωρόπουλος Β.¹, Δεληβελιώτη Κ.³, Ταμβάκος
17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2004

11.) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΛΑΚΩΔΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΚΥΣΤΗΣ- ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΙΑ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΣΠΑΝΙΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ

Γοραντωνάκης Γ.¹, Κυπαρίδου Ε.³, Θεοδωρόπουλος Β.¹, Γκερζελής Ι.¹, Μπουρλή Α.³,
17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2004

12.) ΕΝΔΟΚΥΣΤΙΚΗ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΜΕ ΡΟΠΙΒΑΚΑΙΝΗ ΣΕ ΕΛΑΧΙΣΤΑ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥΣ ΣΤΗΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟ ΚΥΣΤΗ

Κωνσταντάκης Ε., Γοραντωνάκης Γ., Θεοδωρόπουλος Β., Αλεξανδράκης Κ., 17^ο
Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2004

13.) ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΧΗΜΕΙΟ-ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΕΒΔΟΜΑΔΙΑΙΑ ΡΑCΛΙΤΑΧΕL ΣΕ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

Γοραντωνάκης Γ., και συν.

17ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, Ιούνιος 2004 -Αλεξανδρούπολη

14.) ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΝΕΦΡΟΣΤΟΜΙΑ ΥΠΟ ΤΟΝ ΑΞΟΝΙΚΟ ΤΟΜΟΓΡΑΦΟ. ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙ 27 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ.

Γοραντωνάκης Γ.², Κωνσταντάκης Ε.², Μανίκας Κ.².

17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2004

15.) ΤΙΜΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΑΙ ΟΛΙΚΟΥ PSA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ, ΚΑΛΟΗΘΗ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ.

Καλύβας Χ., Θεοδωρόπουλος Β., Γοραντωνάκης Γ., Φίλιος Π., Παλαιολόγος Σ.

17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2004

16.) ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΟΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑ ,ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥΣ. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΩΤΕΡΗΣ ΑΠΟΧΕΤΕΥΤΙΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Χαμηλός Ε.¹, Αλεξανδράκης Κ.¹, Μανίκας Κ.¹, Κωστής Β.²,
Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο - 2004

17.) Η ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΗΘΗ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Γοραντωνάκης Γ.¹, Ταμβάκος Γ.¹, Κατσώνης Ζ.¹, Κωνσταντάκης Ε.¹, Δρακάκη Τ.¹,
Γοραντωνάκη Α.², Βασιλάκη Α.², Κατελανής Σ.².
Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο – 2004

18.) ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΠΥΕΛΙΚΗΣ ΕΚΤΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Θεοδωρόπουλος Β.¹, Μανίκας Κ.¹, Βελονάκης Σ.², Γιαννάκου Ν.³
Τριαντοπούλου Χ.⁴, Παπαηλιού Ι.⁴, Κουλεντιανός Η.².
Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο – 2004

19.) Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑΣ, ΤΗΣ ΑΝΙΟΥΣΑΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ C/T ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΧΕΤΕΥΤΙΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΟΥ ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Γκερζελής Ι.¹, Γοραντωνάκη Α.², Βασιλάκη Α.², Τριαντοπούλου Χ.⁴,
Παπαηλιού Ι.⁴, Γκικόντη Ι.³, Κουλεντιανός Η.².
Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο - 2004

20.) ΤΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΑΝΔΡΕΣ ΜΕ ΚΑΛΟΗΘΗ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (ΚΥΠ) ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΤΟ ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ (ΚΥΠ / LUTS).

Γοραντωνάκης Γ.¹, Γκερζελής Ι.¹, Ράμμος Λ.¹, Μανίκας Κ.¹, Παπαβδής Δ.², Δρακάκη Τ.²,
Γοραντωνάκη Α.², Κουλεντιανός Η.².
Πανελλήνιο ακτινολογικό συνέδριο - 2004

21.) ΒΟΥΒΩΝΟΚΗΛΗ ΚΑΙ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ.

Γοραντωνάκης Γ, Γκερζελής Ι, Ταμβάκος Γ, Πενλίδης Π, Κότσαλης Γ. Σταθόπουλος Β
Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής - 10/2004

22.) Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑ ΒΟΣΝΙΑΚ ΣΤΗΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΙΚΩΝ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΟΓΚΩΝ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

Γοραντωνάκης Γ, Μανιάτης Π, Τριαντοπούλου Χ, Χρυσοβέργης Δ, Γοραντωνάκη Α,
Γκερζελής Ι, Μανίκας Κ, Παπαηλιού Ι.
ΧΙΧ Διαπανεπιστημιακό συνέδριο ακτινολογίας –11/2004

23.) Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ P53, KI67, C-ERB-2 ΚΑΙ CK20, ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΥΠΟΤΡΟΠΗΣ, ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ.

Γοραντωνάκης Γ.¹, Γιούρης Α.¹, Κυπαρίδου Ε.², Μπουρλή Α.², Γκερζελής Ι.¹,
Αλεξανδράκης Κ.¹, Κατσώνης Ζ.¹, Μανίκας Κ.¹

5^ο Πανελλήνιο συνέδριο δεικτών καρκίνου και στοχευόμενης θεραπείας, 11/2004

- 24.) ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΟΥΛΩΔΗΣ ΦΙΜΩΣΗ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟ-ΑΝΑΤΟΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.**
 Γοραντωνάκης Γ.², Καρούνου Β.¹, Ιωαννίδης Ι.¹, Παπαδόπουλος Ι.¹, Χαμηλός Ε.², Αλεξανδράκης Κ.², Ταμβάκος Γ.², Μανίκας Κ.¹
 9^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό συνέδριο, Ρόδος Μάρτιος 2005
- 25.) Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΣΤΥΤΙΚΗΣ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΕ ΔΙΑΒΗΤΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΙΛΔΕΝΑΦΙΛΗΣ.**
 Γοραντωνάκης Γ.², Παπαδόπουλος Ι.¹, Ιωαννίδης Ι.¹, Καρούνου Β.¹, Θεοδωρόπουλος Β.², Γκερζελής Ι.², Κατσώνης Ζ.², Ράμμος Λ.².
 9^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό συνέδριο, Ρόδος Μάρτιος 2005
- 26.) ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΟΓΚΟΣ ΩΘΗΚΗΣ ΑΠΟ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ. ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΙΑ ΣΠΑΝΙΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ.**
 Γοραντωνάκης Γ, Γκικόντη Ι, Γκερζελής Ι, Σπάθη Ε, Θεοδωρόπουλος Β, Κατρίνης Μ.
 5^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, Αθήνα, Απρίλιος 2005
- 27.) ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΖΩΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΖΟΛΕΔΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.**
 Γοραντωνάκης Γ.¹, Λυκούδη Ε.², Μανίκας Κ.¹, Ράμμος Λ.¹, Δάρα Θ.², Κουτά Α.².
 16^ο Πανελλήνιο Αναισθησιολογικό συνέδριο, Μύκονος Μάιος 2005
- 28.) ΥΠΑΡΑΧΝΟΕΙΔΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΜΕ ΜΠΟΥΠΙΒΑΚΑΙΝΗ ΚΑΙ ΜΙΔΑΖΟΛΑΜΗ ΣΤΗΝ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ Κ Υ Π.**
 Λυκούδη Ε.², Γοραντωνάκης Γ.¹, Βασιλείου Β.², Ταμβάκος Γ.¹, Χαμηλός Ε.¹, Κουτά Α.
 16^ο Πανελλήνιο Αναισθησιολογικό συνέδριο, Μύκονος Μάιος 2005
- 29.) Η ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΚΟΞΙΜΠΗΣ ΣΕ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΧΟΛΟΚΥΣΤΕΚΤΟΜΗΣ.**
 Λυκούδη Ε.², Γοραντωνάκης Γ.¹, Καποτά Ε.², Πενλίδης Π.¹, Κουτά Α.².
 16^ο Πανελλήνιο Αναισθησιολογικό συνέδριο, Μύκονος Μάιος 2005
- 30.) ΟΛΙΚΗ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΟΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ Ή ΥΠΑΡΑΧΝΟΕΙΔΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΓΙΑ ΜΙΚΡΕΣ ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.**
 Γοραντωνάκης Γ, Λυκούδη Ε, Θεοδωρόπουλος Β, Χαίδος Ν, Γκερζελής Ι, Κουτά Α
 16^ο Πανελλήνιο Αναισθησιολογικό συνέδριο, Μύκονος Μάιος 2005
- 31.) Η ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΡΕΜΙΦΕΝΤΑΝΙΛΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΚΟΞΙΜΠΗΣ ΣΕ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΒΟΥΒΩΝΟΚΗΛΗΣ.**
 Λυκούδη Ε.², Γοραντωνάκης Γ.¹, Γαρνέλη Α.², Σοφianού Α.¹, Κολυμπίρης Χ.¹, Κουτά
 16^ο Πανελλήνιο Αναισθησιολογικό συνέδριο, Μύκονος Μάιος 2005
- 32.) Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ (VEGF)-C ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ (BUC): ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΑΥΞΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ.**
³Γοραντωνάκης Γ,²Μυλωνά Ε, ¹Μάγκου Χ, ¹Νομικός Α, ³Ζαρόγιαννος Α,
²Γιαννοπούλου Ι, ³Ζέρβας Α, ¹Νακοπούλου Λ.
 18 Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2006
- 33.) ΚΑΚΩΣΕΙΣ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΥΣΤΕΡΕΚΤΟΜΕΣ. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ, ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ.**
 Γοραντωνάκης Γ., Ελευθεριάδης Κ., Παπαδάκη Μ., Κουμαντάκης Ε., Σοφράς Φ.
 18^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό συνέδριο - 2006

34.) Η ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΝΕΦΡΟΛΙΘΟΤΡΙΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΛΙΘΩΝ ΤΗΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΠΥΕΛΟΥ 2 ΕΚΑΤΟΣΤΩΝ.

Βασίλης Πουλάκης, Βασίλης Μώρος, Γιώργος Γοραντωνάκης, Ιωάννης Μπόγδανος, Ιωάννης Μιχαηλίδης, Ιωάννης Χρυσογονίδης.
Μακεδονικό Ουρολογικό Συνέδριο 2007

35.) ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΡΙΖΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΓΑΛΟ ΟΓΚΟ ΠΡΟΣΤΑΤΟΥ (200cc)

Βασίλης Πουλάκης, Βασίλης Μώρος, Γιώργος Γοραντωνάκης, Ιωάννης Μπόγδανος, Ιωάννης Μιχαηλίδης, Ιωάννης Χρυσογονίδης.
Μακεδονικό Ουρολογικό Συνέδριο 2007

36.) ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΤ3-MMP ΣΕ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΕΠΙΘΕΤΙΚΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ

1Σ Μελισσάρης, 1Γ. Γοραντωνάκης, 1Ε. Μυλωνά, 1Ι. Γιαννοπούλου, 1Α. Νομικός, 2Α. Ανδρουλάκη, 1Λ. Νακοπούλου
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

37.) ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΡΙΖΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗΣ: ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΜΑΣ ΕΝΟΣ ΕΤΟΥΣ.

Β. Πουλάκης, Β. Μώρος, Γ. Γοραντωνάκης, Ι. Μπόγδανος, Ι. Μιχαηλίδης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

38.) ΡΟΜΠΟΤΙΚΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ (DA VINCI) VS ΑΜΙΓΟΥΣ (PURE) ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΡΙΖΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗΣ. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.

Γ. Γοραντωνάκης, Β. Μώρος, Ι. Μπόγδανος, Ι. Μιχαηλίδης, Γκερζελής, Β. Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

39.) ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΛΙΘΟΤΡΙΨΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΜΙΑΣ ΙΔΙΩΤΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ.

Γ. Γοραντωνάκης, Β. Μώρος, Ι. Μπόγδανος, Ι. Μιχαηλίδης, Γκερζελής, Β. Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

40.) ΡΟΜΠΟΤΙΚΗ (da Vinci) ΜΕΡΙΚΗ ΝΕΦΡΕΚΤΟΜΗ. ΤΕΧΝΙΚΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Γ. Γοραντωνάκης, Β. Μώρος, Ι. Μπόγδανος, Ι. Μιχαηλίδης, Γκερζελής, Β. Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

41.) ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΛΙΘΙΑΣΗ ΚΑΛΥΚΙΚΟΥ ΕΚΚΟΛΠΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΜΟΝΗΡΕΣ ΝΕΦΡΟ. ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.

Γ. Γοραντωνάκης, Β. Μώρος, Ι. Μπόγδανος, Ι. Γκερζελής, Β. Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

42.) DA VINCI ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ. ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΜΑ ΣΗΜΕΙΑ

Γ. Γοραντωνάκης, Β. Μώρος, Ι. Κωνσταντινίδης, Ι. Γκερζελής, Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

43.) ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΚΗ - ΛΑΠΑΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΡΙΖΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΚΤΟΜΗ (Ε-ΛΡΠ) ΜΕ ΕΞΩΠΕΡΙΤΟΝΑΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ. ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΙ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ.

Β. Μώρος, Γ. Γοραντωνάκης, Ι. Μπόγδανος, Ι. Μιχαηλίδης, Ι. Γκερζελής, Β. Πουλάκης
19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 10/2008, Χαλκιδική

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως είναι ο ένατος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως. Αποτελεί το δεύτερο συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του ουροποιογεννητικού και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από όλα τα νεοπλάσματα του ίδιου συστήματος. Αντιπροσωπεύει το 2-3% των νεοπλασμάτων του ανθρωπίνου σώματος.

Ορισμένοι ασθενείς με διηθητικά καρκινώματα παρουσιάζουν δυσμενή πρόγνωση και συχνά υποτροπιάζουν, ακόμη και μετά χειρουργική αντιμετώπιση, χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Οι κλασικοί προγνωστικοί δείκτες, όπως ο βαθμός κακοήθειας και το στάδιο της νόσου, αδυνατούν να προσδιορίσουν τους ασθενείς αυτούς.

Ως εκ τούτου, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται διεθνώς στην ανεύρεση μοριακών βιολογικών δεικτών, οι οποίοι θα παρέχουν τη δυνατότητα καθορισμού, σε ατομικό επίπεδο, της πιθανότητας υποτροπής της νόσου και της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και στην εμφάνιση υποτροπών, διαδραματίζουν οι μηχανισμοί της αγγειογένεσης, διήθησης και μετάστασης.

Η νεοαγγειογένεση θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και στην πρόγνωση πολλών καρκινωμάτων μεταξύ αυτών και στο ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως. Η πορεία της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από ένα σημαντικό αριθμό αγγειογεννητικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων πρωτεύοντα ρόλο κατέχει ο αγγειακός αυξητικός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) και οι υποδοχείς αυτού. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί τρία νέα μέλη της οικογένειας VEGF : ο VEGF-B, VEGF-C και ο VEGF-D. Ο VEGF-C ασκεί ισχυρή λεμφαγγειογόνο δράση σε πειραματικές μελέτες, όπου και προκαλεί υπερπλασία των λεμφαγγείων.

Η οικογένεια VEGF, εκτός από τη μιτογόνο δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων, συμμετέχει και στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (μεταλοπρωτεϊνάσες του στρώματος –matrix MMPs) και κατά συνέπεια στη διήθηση και μετάσταση. Οι μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεϊνάσες (MT-MMPs) αποτελούν μία νέα ομάδα μεταλοπρωτεϊνών οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην

κυτταρική κινητικότητα, αγγειογένεση και μετάσταση. Πειραματικές μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει την σημασία των MT-MMPs στην υποκίνηση της κυτταρικής μετανάστευσης, διήθησης και αγγειογένεσης.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της έκφρασης του VEGF-C και των MMP-15/(MT2-MMP) και MMP-16/(MT3-MMP) σε αρχειακό υλικό τομών παραφίνης από 123 επιφανειακά και διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα. Οι δείκτες αυτοί μελετούνται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και τα αποτελέσματα που προκύπτουν συσχετίζονται μέσω στατιστικών μεθόδων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές προγνωστικές παραμέτρους των καρκινωμάτων, καθώς και με δεδομένα επιβίωσης των ασθενών με στόχο τη διερεύνηση 1) της συμμετοχής των εν λόγω δεικτών στο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό και 2) της πιθανής προγνωστικής αξίας. Οι πληροφορίες για τους ανωτέρω παραμέτρους βρίσκονται σε βάση δεδομένων.

Η εκπόνηση της μελέτης έγινε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, κα. Λυδία Νακοπούλου για την εποπτεία, επιστημονική καθοδήγηση και ηθική συμπαράσταση καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τους Αν. Καθηγητές κ.κ. Αναστάσιο Ζέρβα και Νικόλαο Καβατζά, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Παρακολούθησης της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βιολόγο, κα. Ιωάννα Γιαννοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκπόνηση της μελέτης αυτής.

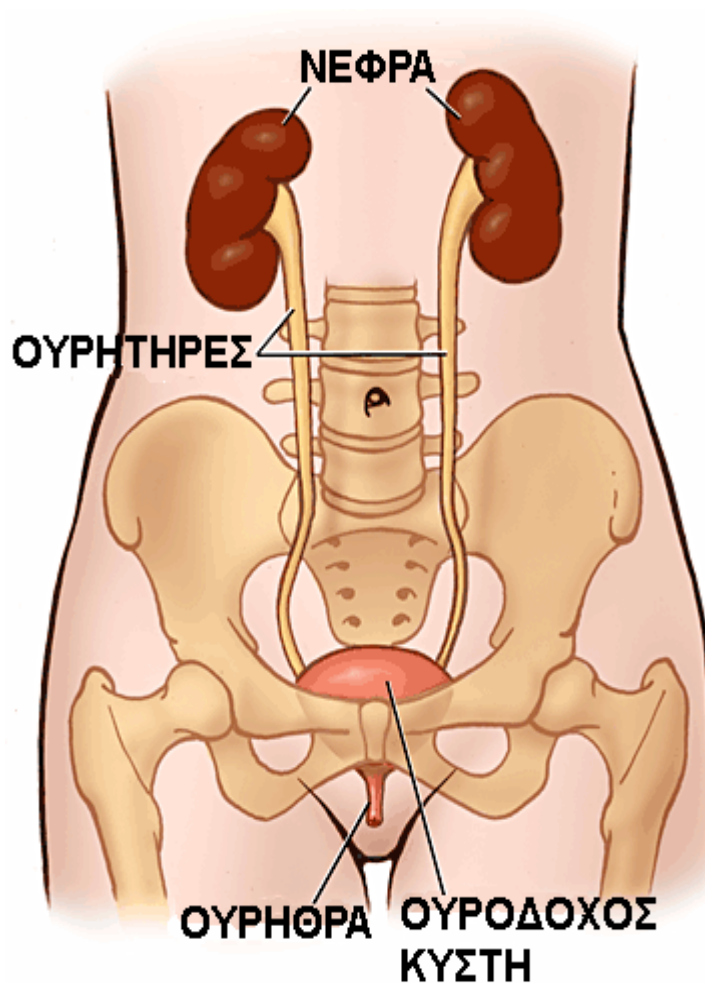
Επιπλέον, οφείλω θερμές ευχαριστίες στον Χειρουργό, κο. Εμμανουήλ Καλοκαιρινό, στην Παθολόγο κα. Έλενα Μυλωνά και στη Βιολόγο κα. Ειρήνη Θεοχάρη, οι οποίοι βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, με τη συμμετοχή τους σε διάφορα στάδια.

Φθάνοντας στο τέλος αυτής της προσπάθειας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την σύζυγό μου, για την αμέριστη υπομονή, συμπαράσταση και υποστήριξη στις ερευνητικές και επαγγελματικές μου ανησυχίες, αλλά και στη ζωή γενικότερα.-

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

Η ουροδόχος κύστη αποτελεί κοίλο μυώδες όργανο, το οποίο βρίσκεται πίσω από την ηβική σύμφυση και το οποίο παρατίθεται μεταξύ των δύο ουρητήρων και της ουρήθρας. Υποδέχεται τα ούρα που κατέρχονται με τους ουρητήρες, τα διατηρεί στα μεσοδιαστήματα μεταξύ των ουρήσεων και τα αποβάλλει δια μέσου της ουρήθρας.



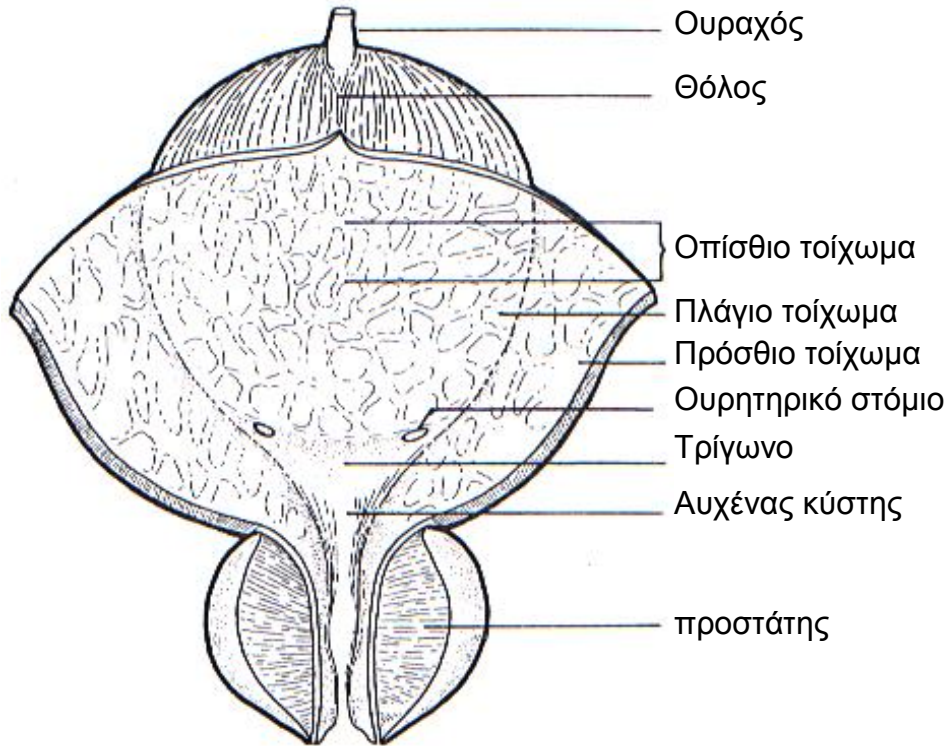
Η χωρητικότητα της κύστης ποικίλει (2-3 χλγρ.) και αυτό εξαρτάται από την ηλικία, από το φύλο και από τις συνήθειες του ατόμου.

Θέση: Η ουροδόχος κύστη βρίσκεται μέσα στη μικρή πύελο, πάνω από το πυελικό έδαφος, στον υποπεριτοναϊκό χώρο και όταν γεμίζει επεκτείνεται και στον προπεριτοναϊκό χώρο.

Μέρη-σχήμα: Για την περιγραφή της κύστης, διακρίνουμε τρία μέρη αυτής, δηλαδή την κορυφή, που βρίσκεται προς τα άνω και μπροστά, το σώμα και τον πυθμένα, που φέρονται προς τα κάτω και πίσω. Από τα μέρη αυτά, ο πυθμένας χωρίζεται από το σώμα με νοητή γραμμή, η οποία ενώνει τις θέσεις κατά τις οποίες οι δύο ουρητήρες εισέρχονται μέσα στο τοίχωμά της, ενώ η κορυφή συνεχίζεται με το σώμα χωρίς σαφή όρια. Σε ωοειδές σχήμα διακρίνουμε ακόμη δύο επιφάνειες αυτής (πρόσθια, οπίσθια) και δύο πλάγια χείλη (δεξιό, αριστερό) (Σχήμα 1,2).

Εσωτερική επιφάνεια της κύστης: Αυτή είναι λεία και κόκκινη στα παιδιά. Στους ενηλίκους όταν είναι κενή η κύστη, εμφανίζει πολυπληθείς πτυχές του βλεννογόνου. Οι πτυχές αυτές εξαφανίζονται κατά την πλήρωση, οπότε η εσωτερική επιφάνεια της κύστης, επειδή ανασηκώνεται ο βλεννογόνος από τις δοκίδες της πλεγματοειδούς έσω μυικής στιβάδας, εμφανίζει αντί πτυχές, ακρολοφίες, δηλαδή η εσωτερική επιφάνειά της εμφανίζεται σαν δίκτυο. Εξαίρεση αποτελεί το κυστικό τρίγωνο (Lietaud).

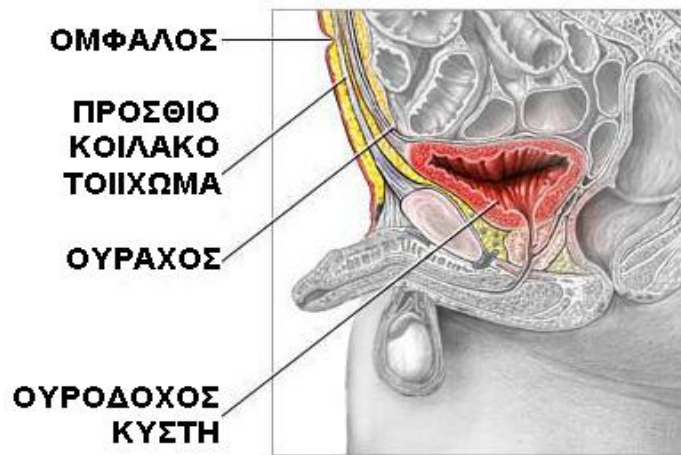
Η κορυφή του κυστικού τριγώνου βρίσκεται στο κατώτερο μέρος του πυθμένα της κύστης και εκτείνεται μέχρι το έσω στόμιο της ουρήθρας, όπου σχηματίζει, ιδιαίτερα στον άνδρα, επιμήκη ακρολοφία, την κιονίδα της κύστης. Το έσω στόμιο της ουρήθρας, περιβάλλεται από κυκλοτερές και πτυχωτό έπαρμα του βλεννογόνου, τον ουρηθραίο δακτύλιο, που παράγεται από τον έσω σφιγκτήρα της ουρήθρας. Το στόμιο αυτό βρίσκεται 2-3 εκ. μπροστά από τα στόμια των ουρητήρων και αντιστοιχεί, όταν είναι κενή η κύστη, 2,5-3 εκ. πίσω από τη μέση μοίρα της ηβικής σύμφυσης. Το έσω αυτό στόμιο της ουρήθρας με την πλησίον μοίρα του πυθμένα της κύστης, περιγράφεται από τους χειρουργούς σαν αυχένας της κύστης.



Σχήμα 1. Ανατομία ουροδόχου κύστεως

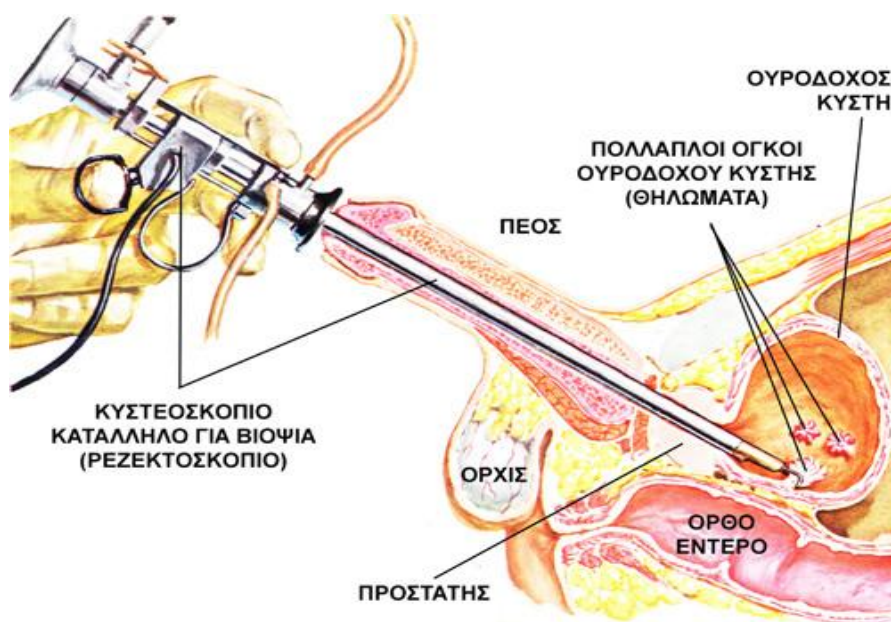
Η βάση του κυστικού τριγώνου αφορίζεται από έπαρμα του βλεννογόνου, το ουρητηρικό όγκωμα, που σχηματίζεται από την ενδοτοιχωματική πορεία των δύο ουρητήρων. Στα άκρα του ουρητηρικού ογκώματος βρίσκονται τα σχισμοειδή και λοξά κομμένα στόμια των δύο ουρητήρων. Αυτά απέχουν το ένα από τα άλλο, σε άδεια κύστη, γύρω στα 2,5 εκ. και σε γεμάτη κύστη γύρω στα 5 εκ. Αφορίζονται προς τα άνω από πτυχή του βλεννογόνου που θεωρείται σαν βαλβίδα του ουρητήρα.

Τέλος, πίσω από το ουρητηρικό όγκωμα βρίσκεται εγκάρσια κοίλανση, ο οπισθοουρητηρικός βόθρος. Το βάθος του βόθρου αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας, ιδιαίτερα στους άνδρες, λόγω υπερτροφίας του προστάτη, που βρίσκεται κάτω από το κυστικό τρίγωνο.



Σχήμα 2. Ανατομία ουροδόχου κύστεως

Με το κυστεοσκόπιο βλέπουμε το εσωτερικό της ουροδόχου κύστης. Κατά την κυστεοσκόπηση φαίνονται: α) το έσω στόμιο της ουρήθρας σε όλη του την περιφέρεια και μαζί με το στόμιο η μοίρα της κύστης που βρίσκεται πάνω από τον προστάτη, β) το κυστικό τρίγωνο, γ) το ουρητηρικό όγκωμα, δ) τα στόμια των ουρητήρων, μέσα στα οποία είναι δυνατό κατάλληλα να εισέλθει καθετήρας, ε) ο βλεννογόνος της κύστης που έχει όψη λάμπουσα και δικτυωτή και στ) τα αιμοφόρα αγγεία της κύστης, τα οποία είναι πιο άφθονα γύρω από τα στόμια των ουρητήρων και του κυστικού τριγώνου.



Αγγεία και νεύρα: Η ουροδόχος κύστη αιματώνεται από την άνω και κάτω κυστική αρτηρία και από μικρούς κλάδους της μέσης αιμορροϊδικής αρτηρίας. Η φλεβική αποχέτευση της ουροδόχου κύστεως γίνεται μέσω του αιδοϊκού και προστατικού φλεβώδους πλέγματος που εκβάλλουν με τις κυστικές φλέβες στην έσω λαγόνια φλέβα. Τα λεμφαγγεία της κύστης φέρονται στα πρόσθια και πλάγια κυστικά λεμφογάγγλια και τα λεμφαγγεία του κυστικού τριγώνου στα έσω λαγόνια λεμφογάγγλια. Η ουροδόχος κύστη νευρώνεται από νευρικές ίνες, που προέρχονται από το κυστικό πλέγμα, το οποίο σχηματίζεται από συμπαθητικές και παρασυμπαθητικές ίνες (1)

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

Η αμάρα διαιρείται με ένα μετωπικό μεσεγγυματικό διάφραγμα -το ουροορθικό διάφραγμα που βρίσκεται στη γωνία ανάμεσα στην αλλαντοίδα και το οπίσθιο έντερο. Καθώς αυτό το διάφραγμα μεγαλώνει προς την αμαρική μεμβράνη, πτυχές σχηματίζονται από τα πλάγια τοιχώματα της αμάρας. Αυτές οι πτυχές προχωρούν η μία προς την άλλη και ενώνονται διαιρώντας την αμάρα σε 2 μέρη: 1) ραχιακά το ορθό και τον πάνω πρωκτικό σωλήνα, 2) κοιλιακά τον ουρογεννητικό κόλπο.

Η ουροδόχος κύστη (αλλά και η ουρήθρα) προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο και το σπλαχνικό μεσέγγυμα της γειτονικής περιοχής. Καθώς η κύστη μεγαλώνει, τα ουραία τμήματα των μεσονεφρικών πόρων εγκλωβίζονται μέσα στο ραχιαίο τοίχωμά της καθώς οι μεσονεφρικοί πόροι απορροφούνται, οι ουρητήρες έρχονται και εκβάλλουν ξεχωριστά μέσα στην ουροδόχο κύστη (2).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

Η ουροδόχος κύστη καλύπτεται από ένα ειδικό επιθήλιο το οποίο αναφέρεται ως ουροθήλιο λόγω της προσαρμογής του στο ουρικό περιβάλλον ή αλλιώς μεταβατικό επιθήλιο.

Το ουροθήλιο αποτελείται από 3-6 στιβάδες κυττάρων. Υπάρχουν δύο υποτύποι ουροθηλιακών κυττάρων: 1) Τα κύτταρα τύπου ομπρέλλας τα οποία καλύπτουν την επιφάνεια και είναι σε άμεση επαφή με τα ούρα και 2) τα υποκείμενα κύτταρα τα οποία συμπεριλαμβάνουν τις άλλες στιβάδες.

Τα κύτταρα τύπου ομπρέλλας είναι τα μεγαλύτερα κύτταρα του ουροθηλίου, εμφανίζουν ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και μπορεί να περιέχουν μικρά ποσά βλέννης. Ο πυρήνας τους είναι μεγάλος και συχνά ανώμαλος με συμπυκνωμένη υπερχρωματική χρωματίνη και αφανή πυρήνια. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα κύτταρα τύπου ομπρέλλας έχουν ασύμμετρες κυτταρικές μεμβράνες με μια εξωτερική στιβάδα και μια ποικιλία διακυτταρικών συνδέσεων. Αυτές οι εξειδικεύσεις δίνουν τη δυνατότητα στα κύτταρα τύπου ομπρέλλας να ανταπεξέρχονται στο περιβάλλον των ούρων και να διατηρούν τον αιματο-ουρικό φραγμό καθώς η ουροδόχος κύστη διαστέλλεται και συστέλλεται. Τα ουροθηλιακά κύτταρα των άλλων στιβάδων είναι μικρότερα και περισσότερο ομοιόμορφα σε σχέση με τα κύτταρα τύπου ομπρέλλας με ωχρο κύτταροπλασμα. Ο πυρήνας είναι κεντρικός, σχήματος κυρίως οβάλ και στις βαθύτερες στιβάδες, προσανατολίζεται κάθετα στη βασική μεμβράνη. Οι μιτώσεις είναι ασυνήθιστες και μελέτες αντιγραφής του DNA δείχνουν ότι το ουροθήλιο ανανεώνεται περίπου 1 φορά το χρόνο. Η βασική στιβάδα του ουροθηλίου στηρίζεται σε μια βασική μεμβράνη. Κάτω από τη βασική μεμβράνη είναι το χαλαρό υπόστρωμα (*lamina propria*), μία ζώνη χαλαρού συνδετικού ιστού η οποία περιέχει μικρά αγγεία, λεπτές δέσμες λείων μυικών ινών που ορίζονται ως βλεννογόνια μυική στιβάδα (*muscularis mucosae*).

Ο συνδετικός ιστός κάτωθι της βλεννογονίας μυικής στιβάδας περιέχει ένα δίκτυο μεγαλύτερων αγγείων· κάτωθι αυτού είναι ο κυρίως μυικός χιτώνας (*muscularis propria*) ο οποίος αποτελείται από παχιές δέσμες μυικών ινών με ένα αραιό ποσό χαλαρού συνδετικού ιστού.

Ο κυρίως μυικός χιτώνας περιλαμβάνει δύο στιβάδες: την έξω και τη μέση. Από τις στιβάδες αυτές η έξω αποτελείται από επιμήκεις ίνες, οι οποίοι εκφύονται από την ηβική σύμφυση, από τον προστάτη στον άνδρα και από τον κολεό στη γυναίκα. Αυτές οι ίνες σχηματίζουν συνεχές μυικό στρώμα στην πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια της κύστης. Κατά τα πλάγια αυτής αραιώνονται και κατά την κορυφή απλώνουν σαν βεντάλια. Η μέση στιβάδα αποτελείται από κυκλοτερείς ίνες και λείπει, κατά το περισσότερο, στο κυστικό τρίγωνο.

Οι μυικές στιβάδες του μυικού χιτώνα της κύστης αναστομώνονται πολλαπλά η μία με την άλλη. Έτσι σχηματίζουν προασπιστικό δίκτυο της κύστης που διατείνεται κατά την πλήρωση. Από λειτουργική πλευρά αποτελούν ενιαίο μυ, το σφιγκτήρα μυ της κύστης, με σύσπαση του οποίου επιτυγχάνεται η εξώθηση του ούρου προς την ουρήθρα. Με την ουρήθρα επιτυγχάνεται η αποβολή του ούρου, η ορμητική έξοδος του οποίου πολύ οφείλεται στην ενέργεια των κοιλιακών μυών (3).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

1. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

Υπερπλαστικές και μεταπλαστικές αλλοιώσεις του ουροθηλίου: Είναι δυσχνές, θεωρούνται φυσιολογικές ή αντιδραστικές και σε μερικές από αυτές αποδίδονται προκαρκινωματώδεις ή δυνητικά καρκινωματώδεις ιδιότητες. Οι πρώτες περιλαμβάνουν την απλή υπερπλασία του καλυπτικού ουροθηλίου, την εστιακή υπερπλασία των καταδύσεων του ουροθηλίου και την κυστική κυστίτιδα, ενώ οι δεύτερες την αδενική κυστίτιδα, την πλακώδη και τη νεφρογενή μετάπλαση.

Θηλώδης υπερπλασία του ουροθηλίου: Είναι η ομαλή αύξηση των φυσιολογικών στιβάδων του ουροθηλίου, χωρίς δυσπλασία και με άγνωστη κλινική σημασία. Πολύ συχνά σχετίζεται με φλεγμονή, λιθίαση και νεόπλασμα.

Καταδύσεις και φωλεές του Brunh: Καταδύσεις του Brunh καλούνται υπερπλαστικές εμβαθύνσεις του ουροθηλίου σε συνέχεια με το καλυπτήριο επιθήλιο, ενώ φωλεές του Brunh ομάδες κυττάρων αποσπασμένες από αυτό. Οι φωλεές του Brunh αποτελούν το πρώτο στάδιο της κυστικής και αδενικής κυστίτιδας.

Κυστική και αδενική κυστίτιδα: Η κυστική κυστίτιδα χαρακτηρίζεται από ομάδες φωλεών ουροθηλίου με κεντρική ηωσινόφιλη σύντηξη, ενώ η αδενική επιπρόσθετα από αδενική μετάπλαση του ουροθηλίου των φωλεών, τα δε βιβλιογραφικά δεδομένα τη συνδέουν με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας.

Πλακώδης μετάπλαση: Λευκοπλακία είναι ο κλινικός όρος της αντικατάστασης του μεταβατικού επιθηλίου από πλακώδες. Διάφορου βαθμού δυσπλασία του πλακώδους επιθηλίου μπορεί να συνυπάρχει. Στην περίπτωση αυτή θεωρείται ως προκαρκινωματώδης κατάσταση αφού βρέθηκε να συνδυάζεται με πλακώδες καρκίνωμα ή να εξελίσσεται σε τέτοιο.

Νεφρογενής μετάπλαση ή νεφρογενές αδένωμα: Θηλώδης ή πολυποειδής εξεργασία διαμέτρου <1 cm συνήθως, που αποκαλύπτεται μικροσκοπικά. Ιστολογικά, μπορεί να έχει αδενική, κυστική, θηλώδη ή και διάχυτη ανάπτυξη των κυτταρικών του στοιχείων. Συνδυάζεται συχνά με

χρόνια κυστίτιδα ή με στρωματική ασβέστωση και υπάρχει κίνδυνος σύγχυσης κυρίως με αδενοκαρκίνωμα της ουροδόχου κύστης.

Υπερπλαστική ατυπία ή δυσπλασία: Είναι παρόμοια με την επιθηλιακή υπερπλασία αλλά συνυπάρχουν διαταραχές στον προσανατολισμό των κυττάρων καθώς και διαταραχές στη μορφολογία, όπως κυτταρική ατυπία, αλλοίωση σχέσης πυρήνα-πρωτοπλάσματος και μιτώσεις που δεν περιορίζονται στη βασική στιβάδα. Σε ασθενείς με επιφανειακό όγκο κύστης η παρουσία ατυπίας σε γειτονικό ουροθήλιο συνδυάζεται (30-40%) με πιθανό κίνδυνο διηθητικής νόσου (54).

Θήλωμα: Είναι σπάνιο νεόπλασμα (2%) μικρό, μονήρες και θηλώδες. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από θηλώδεις σχηματισμούς οι οποίοι αποτελούνται από αγγειοσυνδετικούς άξονες που επενδύονται από φυσιολογικό ουροθήλιο. Η κλινική συμπεριφορά και αντιμετώπιση δεν διαφέρει πολύ από αυτή του G1 καρκινώματος.

2. ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

2.1. Ουροθηλιακά καρκινώματα

Επίπεδα κακοήθη ουροθηλιακά νεοπλάσματα

Στις επίπεδες αλλοιώσεις εντάσσεται το in situ καρκίνωμα (CIS) και η δυσπλασία, η οποία είναι προκαρκινωματώδης αλλοίωση. Το CIS χαρακτηρίζεται από κυτταρικές και αρχιτεκτονικές διαταραχές, πολυμορφία και ατυπία του ουροθηλίου καθώς και μιτώσεις. Οι αλλοιώσεις αυτές καταλαμβάνουν όλο το πάχος του ουροθηλίου ή μέρος αυτού αλλά ποτέ δεν διασπούν τη βασική μεμβράνη του ουροθηλίου. Το CIS διακρίνεται σε πρωτοπαθές, που αφορά το 10% των περιπτώσεων και δεν συνδυάζεται με άλλα ουροθηλιακά νεοπλάσματα καθώς και σε δευτεροπαθές που σχετίζεται με ουροθηλιακό καρκίνωμα, διηθητικό ή μη. Συνοδεύεται από συμπτώματα κυστίτιδας ενώ το 25% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί. Η συχνότητα του CIS αυξάνει με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας και του σταδίου του συνοδού καρκινώματος. Το CIS παρουσιάζει πολυεστιακότητα και εκτεταμένη προσβολή του ουροθηλίου, εξελίσσεται δε, σε ποσοστό 83% σε διηθητικό καρκίνωμα σε διάστημα περίπου 5 ετών. Μικροδιηθήσεις του CIS παρατηρούνται περίπου σε ποσοστό 34%. Τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώθηκαν από κυστεκτομές μετά από χειρουργική αφαίρεση για

θεραπευτικούς σκοπούς. Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων είναι χρήσιμη στη διάγνωση του CIS όπου παρατηρούνται πολλά μονήρη κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν έντονη πυρηνική ατυπία και ελάχιστο πρωτόπλασμα. Η διαφορική διάγνωση γίνεται από το διηθητικό ή μη καρκίνωμα με υψηλό βαθμό κακοήθειας.

Θηλώδη κακοήθη ουροθηλιακά νεοπλάσματα

Εμφανίζονται συχνότερα στην 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής, εκτός των θηλωμάτων τα οποία αναπτύσσονται σε νεαρά άτομα. Η σχέση ανδρών: γυναικών είναι 4:1. Αναπτύσσονται εξωφυτικά, ενδοφυτικά ή και με τις δύο μορφές. Συχνά τα νεοπλάσματα αυτά είναι πολυεστιακά, εκτός από τα θηλώματα, και διακρίνονται σε επιφανειακά και διηθητικά. Ως επιφανειακά νεοπλάσματα χαρακτηρίζονται αυτά που είναι εξωφυτικά και δεν διηθούν το μυϊκό χιτώνα (pTa, pT1) και ως διηθητικά, αυτά που διηθούν το μυϊκό τοίχωμα (pT2,3). Τα επιφανειακά νεοπλάσματα θεωρούνται ότι αποτελούν μέρος μιας εντοπισμένης, υπερπλαστικής, υποτροπιάζουσας διαδικασίας, μπορούν ωστόσο να διατηρούν τη δυνατότητα της διήθησης και μετάστασης. Τα περισσότερα νεοπλάσματα είναι θηλώδη και επιφανειακά κατά την αρχική διάγνωση. Παρουσιάζουν μακρά κλινική πορεία, υποτροπές και αντιμετωπίζονται θεραπευτικά συνήθως με τοπική αφαίρεση. Η επανεμφάνιση των αλλοιώσεων, σε διαφορετικά σημεία της κύστεως, ερμηνεύεται ως πολυεστιακή ανάπτυξη και όχι ως υποτροπή.

Βαθμός κακοηθείας: Ο βαθμός κακοηθείας στηρίζεται στις κυτταρικές αλλοιώσεις και δευτερευόντως στην αρχιτεκτονική. Αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη. Η ταξινόμηση σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO θεωρείται η πλέον αποδεκτή. Διακρίνονται στην ταξινόμηση αυτή: τα θηλώματα και τα θηλώδη καρκινώματα βαθμού κακοήθειας 1 (G1), 2 (G2) και 3 (G3). Τα καρκινώματα βαθμού κακοήθειας G1 παρουσιάζουν καλή βιολογική συμπεριφορά και η 5ετής επιβίωση των ασθενών αυτών ανέρχεται στο 100%, ενώ στους ασθενείς με καρκινώματα G3 η 5ετής επιβίωση ανέρχεται στο 27-44%.

Θηλώδη ουροθηλιακά καρκινώματα G1 και G2: Χαρακτηρίζονται από θηλώδεις σχηματισμούς οι οποίοι αποτελούνται όπως και στα θηλώματα από αγγειοσυνδετικούς άξονες που περιβάλλονται όμως από περισσότερους

στοίχους επιθηλιακών κυττάρων από το φυσιολογικό επιθήλιο, με ελάχιστη διαταραχή της αρχιτεκτονικής. Η τελευταία είναι μεγαλύτερη στα G2 καρκινώματα. Στα τελευταία παρατηρείται μικρού βαθμού ατυπία και πολυμορφία των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα νεοπλάσματα αυτά παρουσιάζουν συχνά υποτροπές, διήθηση του χορίου και κατά την πορεία της νόσου μπορεί να μεταπέσουν σε καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας G3 (5%).

Θηλώδη ουροθηλιακά καρκινώματα G3: Καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας. Τα νεοπλάσματα αυτά διατηρούν το θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης αλλά εμφανίζουν έντονη αρχιτεκτονική διαταραχή, έντονη πυρηνική ατυπία και αρκετές μιτώσεις. Τα νεοπλάσματα αυτά παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο εξέλιξης σε ποσοστό 15-40%, συχνά συνυπάρχουν με διηθητικό καρκίνωμα και με CIS.

Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα: Συνήθως είναι υψηλού βαθμού κακοήθειας, διηθεί το μυϊκό τοίχωμα και το περικυστικό λίπος, μεθίσταται στους επιχώριους λεμφαδένες (60%) και σε απομακρυσμένα όργανα. Η επιβίωση των ασθενών είναι μικρή, περίπου ένα έτος. Στα νεοπλάσματα αυτά συνήθως δεν υπάρχει ιστορικό επιφανειακού καρκινώματος (55-57).

Η ΚΛΙΜΑΚΑ ΕΠΙΘΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ “GRADE”



Το grade έχει πολύ μεγάλη σημασία αφού σχετίζεται τόσο με το στάδιο του όγκου και με τη συχνότητα εξέλιξής του σε διηθητικό όσο και με την πρόγνωση και επιβίωση του ασθενή. Σε όγκους χαμηλής κακοήθειας (grade I) η 10ετής επιβίωση φθάνει μέχρι και 98%, σ' αντίθεση με το 35% επιβίωσης που παρατηρείται σ' όγκους υψηλής κακοήθειας (grade III).

2.2. Κακοήθη νεοπλασμάτα από μη μεταβατικό επιθήλιο

Αδενοκαρκίνωμα

Εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 2% όλων των όγκων της ουροδόχου κύστης. Πρωτοπαθώς εμφανίζεται επί εδάφους φλεγμονών και αδενικής μεταπλασίας σε φυσιολογικές κύστεις, αλλά συνηθέστερα εμφανίζεται σε κύστεις με εκτροφή του οργάνου από εμβρυολογικά υπολείμματα αδενικών κυττάρων, εγκλωβισμένων στο φυσιολογικό ουροθήλιο. Ειδικότερα, τα αδενοκαρκινώματα του θόλου της κύστης οφείλονται συνήθως σε εμβρυολογικά κατάλοιπα αδενικών κυττάρων που παραμένουν μετά την υποστροφή του ουραχού. Αδενοκαρκίνωμα μπορεί να εμφανιστεί επίσης και στα "εντερικά" ουροφόρα σωληνάρια (τμήματα εντέρου που χρησιμοποιούνται για αποχέτευση των ούρων), σε κυστεοπλαστικές με έντερο με σκοπό την αύξηση της χωρητικότητας της ουροδόχου κύστης, σε θύλακες και ουρητηροσιγμοειδοστομίες.

Πλακώδες καρκίνωμα

Εμφανίζεται σε ποσοστό 5-10% του συνόλου των όγκων της ουροδόχου κύστης. Συχνά συνδυάζεται με ιστορικό χρόνιων φλεγμονών, λιθίασης της κύστης ή μόνιμου καθετήρα. Επίσης σχετίζεται με τη σχιστοσωμίαση. Από τους ασθενείς αυτούς το 10% θα εμφανίσει καρκίνο της κύστης, ο τύπος του οποίου κατά τα 3/4 είναι από πλακώδη κύτταρα. Ο καρκίνος αυτός συχνά είναι διηθητικός κατά τη στιγμή της διάγνωσής του. Ιστολογικώς εμφανίζεται με μικρή διαφοροποίηση και τα κύτταρά του είναι πολυγωνικά με χαρακτηριστικές μεσοκυττάριες γέφυρες ή κερατινοποίηση του επιθηλίου.

Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Εμφανίζονται σε ποσοστό 0,5% του συνόλου των νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστης. Αλλά πιθανότατα αυτό δεν αντιπροσωπεύει αληθώς την επίπτωσή του. Στο παρελθόν συχνά εθεωρείτο ως αδιαφοροποίητο. Με τη δυνατότητα όμως σήμερα κατάδειξης του νευροενδοκρινικού του χαρακτήρα ασφαλώς θα αυξηθεί το ποσοστό εμφάνισής του. Ιστολογικώς τα κύτταρά του εμφανίζονται μικρά και είναι όμοια με τα κύτταρα του μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων.

Μικτά καρκινώματα

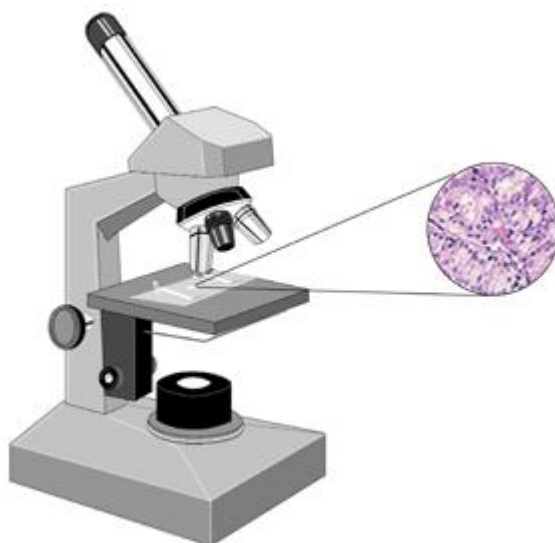
Εμφανίζονται σε ποσοστό 4-6% του συνόλου των νεοπλασμάτων της κύστης. Αποτελούνται από κύτταρα μεταβατικού τύπου, αδενικού τύπου, πλακώδη κύτταρα και αδιαφοροποίητα κύτταρα. Στην πλειονότητά τους είναι διηθητικοί μεγάλοι όγκοι κατά την ώρα της διάγνωσης.

Σπάνιοι επιθηλιακοί και μη επιθηλιακοί όγκοι

Τα λαχνωτά αδενώματα, οι καρκινοειδείς όγκοι, τα καρκινοσαρκώματα, τα μελανώματα, το φαιοχρωμοκύτωμα ή παραγαγγλίωμα και όγκοι καλοήθεις ή κακοήθεις μεσεγχυματογενούς προέλευσης όπως αγγειώματα, αγγειοσαρκώματα, λειομύματα, λειομυοσαρκώματα, ραβδομυοσαρκώματα, οστεοσαρκώματα κ.α.

Μεταστατικοί όγκοι

Είναι οι όγκοι οι οποίοι έχουν δώσει δευτεροπαθείς εντοπίσεις στους επιχώριους λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένα όργανα. Οι πλέον συνηθισμένοι όγκοι που μπορούν να δώσουν μετάσταση στην ουροδόχο κύστη κατά σειρά συχνότητας είναι: το μελάνωμα, το λέμφωμα, ο καρκίνος του στομάχου, του μαστού, του νεφρού και των πνευμόνων. Ο καρκίνος του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας και του ορθού μπορούν να διηθήσουν την ουροδόχο κύστη κατά συνέχεια ιστού (54).



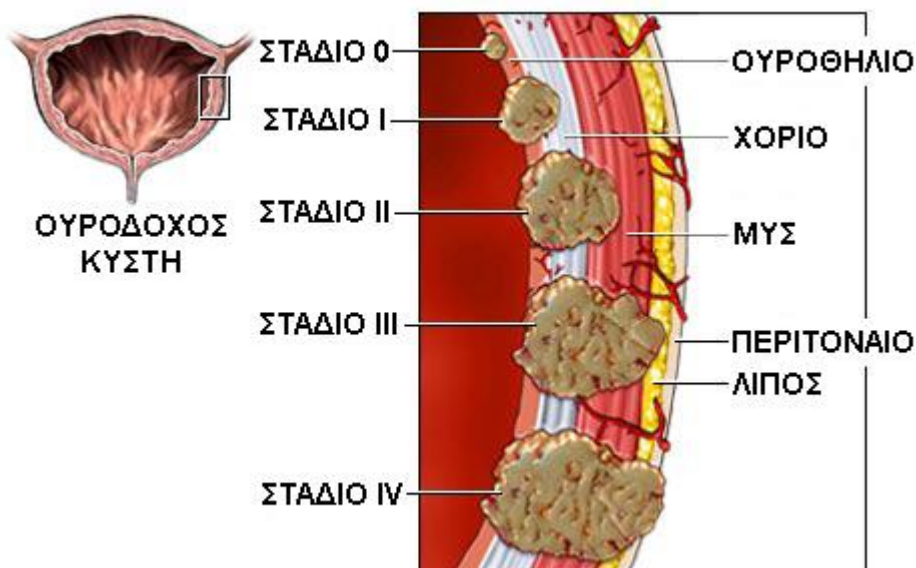
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (STAGE)

Τα συστήματα παθολογοανατομικής και κλινικής σταδιοποίησης που κυρίως εφαρμόζονται σήμερα είναι το σύστημα Marchall (1952) (Πίνακας 2) και το σύστημα TNM που έχει προταθεί (1974) από τη Διεθνή Ένωση Εναντίον του Καρκίνου (International Union Against Cancer, UICC) (Πίνακας 3). Σε οποιοδήποτε σύστημα σταδιοποίησης θα πρέπει να γίνεται και η κλινική σταδιοποίηση με την κλινική εξέταση, την ενδοφλέβιο ουρογραφία, την κυστεοσκόπηση και την αμφίχειρη δακτυλική εξέταση της ουροδόχου κύστεως υπό νάρκωση. Η κλινική εξέταση των επιχωρίων λεμφαδένων εκτιμάται με την κλινική εξέταση, τομογραφία, τη λεμφαγγειογραφία και τη μαγνητική τομογραφία. Τέλος, η εκτίμηση των μεταστάσεων καθορίζεται με την κλινική εξέταση, με τον ακτινολογικό έλεγχο, το υπερηχογράφημα και τις ραδιοϊσοτοπικές μελέτες. Η υπολογιστική τομογραφία είναι πολύτιμη για την κατάταξη υψηλού σταδίου όγκων, η δε διουρηθρική υπερηχογραφία για την κατάταξη όγκων χαμηλότερου σταδίου.

Η σταδιοποίηση γίνεται με βάση το βάθος διήθησης του τοιχώματος της κύστεως. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση γίνεται ως εξής: Στάδιο pT_a: ο όγκος είναι επιφανειακός και δεν διασπά τη βασική μεμβράνη του ουροθηλίου, στάδιο pT₁: το νεόπλασμα διηθεί το χόριο του βλεννογόνου, στάδιο pT₂: το νεόπλασμα διηθεί επιπολής το μυϊκό τοίχωμα, στάδιο pT_{3a}: το νεόπλασμα διηθεί σε βάθος το μυϊκό τοίχωμα, στάδιο pT_{3b}: το νεόπλασμα διηθεί παρακείμενους ιστούς, στάδιο pT₄: το νεόπλασμα διηθεί κατά συνέχεια ιστού παρακείμενα όργανα, στάδιο pN₁₋₃: το νεόπλασμα διηθεί επιχώριους λεμφαδένες και στάδιο pM₁: το νεόπλασμα μεθίσταται σε απομακρυσμένες θέσεις.

Πίνακας 2. Το σύστημα Marchall

- Στάδιο 0: Εντόπιση του όγκου στο επιθήλιο χωρίς να έχει διηθήσει το χόριο.
- Στάδιο A: Εντόπιση του όγκου στο χόριο και υποβλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα.
- Στάδιο B1: Ο όγκος διηθεί μέρος του μυϊκού χιτώνα.
- Στάδιο B2: Ο όγκος διηθεί ολόκληρο το μυϊκό χιτώνα.
- Στάδιο C: Ο όγκος διηθεί το περικυστικό λίπος.
- Στάδιο D1: Ο όγκος διηθεί τα παρακείμενα όργανα (προστάτη, οστά πυέλου κλπ) ή τους λεμφαδένες κάτω από το διχασμό της αορτής ή και τα δύο μαζί.
- Στάδιο D2: Μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα ή στους λεμφαδένες πάνω από το διχασμό της αορτής ή και τα δύο μαζί.



Πίνακας 3. Το σύστημα TNM

T - Πρωτοπαθής όγκος:

Tx: Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί

To: Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου

Ta: Μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα

Tis: Καρκίνωμα in situ "Επίπεδος όγκος"

T1: Ο όγκος διηθεί τον υποεπιθηλιακό συνδετικό ιστό

T2: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα

T_{2a}: Ο όγκος διηθεί τον επιπολής μυϊκό χιτώνα (έσω ήμισυ)

T_{2b}: Ο όγκος διηθεί τον εν τω βάθει μυϊκό χιτώνα (έξω ήμισυ)

T3: Ο όγκος διηθεί τον περικυστικό ιστό

T_{3a}: Μικροσκοπική διήθηση

T_{3b}: Μακροσκοπική διήθηση (εξωκυστική μάζα)

T4: Ο όγκος διηθεί ένα από τα ακόλουθα: προστάτη, μήτρα, κόλπο, πνευλικό τοίχωμα, κοιλιακό τοίχωμα

T_{4a}: Ο όγκος διηθεί τον προστάτη ή τη μήτρα ή τον κόλπο

T_{4b}: Ο όγκος διηθεί το πνευλικό τοίχωμα ή το κοιλιακό τοίχωμα

N - Επιχώριοι λεμφαδένες:

Nx: Αδύνατη η διάγνωση ύπαρξης ή όχι διήθησης των λεμφαδένων

N0: Δεν υπάρχει διήθηση των λεμφαδένων

N1: Διήθηση ενός σύστοιχου επιχωρίου λεμφαδένα ≤ 2 cm

N2: Διήθηση ενός λεμφαδένα > 2 cm αλλά ≤ 5 cm ή πολλών λεμφαδένων κανένας εκ των οποίων δεν είναι μεγαλύτερος από 5 cm

N3: Διήθηση ενός λεμφαδένα > 5 cm

M - Απομακρυσμένες μεταστάσεις:

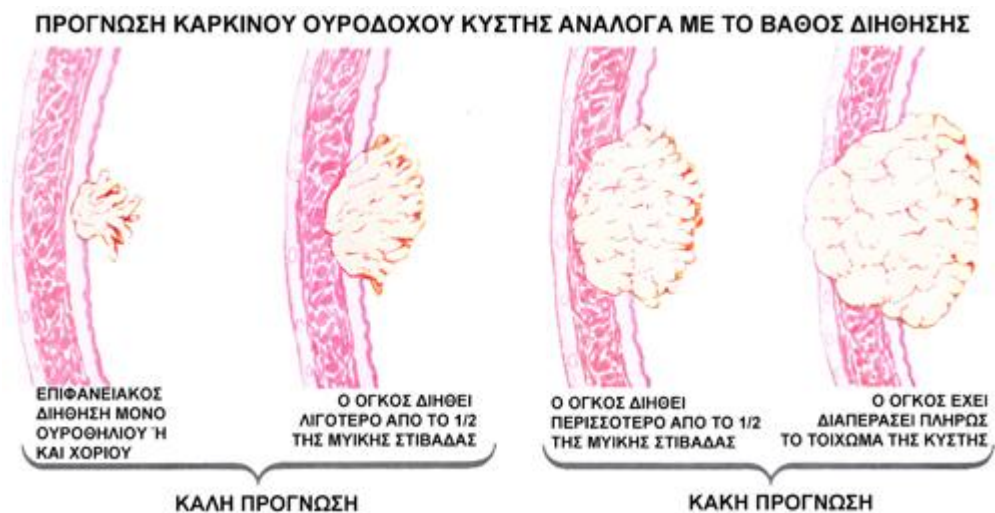
Mx: Αδύνατη η διάγνωση μεταστάσεων

M0: Χωρίς μεταστάσεις

M1: Απομακρυσμένες μεταστάσεις



Εικόνα 1. TNM ταξινόμηση των όγκων της κύστης. Tis: in situ καρκίνωμα. T1: Διήθηση του υποβλεννογόνιου, T2: Διήθηση του μυϊκού χιτώνα, T3a: Μικροσκοπική διήθηση, T3b: Μακροσκοπική διήθηση, T4a: Ο όγκος διηθεί τον προστάτη ή τη μήτρα ή τον κόλπο, T4b: Ο όγκος διηθεί το πυελικό τοίχωμα ή το κοιλιακό τοίχωμα.



Μελέτη των κυττάρων του ουροθηλίου

Κυτταρολογική εξέταση: Η κυτταρολογική εξέταση ούρων καθιερώθηκε στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική για την ανίχνευση κακοήθων κυττάρων της κύστης μετά την πρώτη αναφορά των Παπανικολάου και Marshall το 1945. Η κυτταρολογική εξέταση των ούρων είναι χρήσιμη για τη διάγνωση και την πορεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Ένα τυχαίο δείγμα ούρων αποτελεί το καταλληλότερο υλικό για την εξέταση αυτή. Η διαγνωστική ακρίβεια με ένα δείγμα ούρων βρίσκεται περίπου στο 65% ενώ με τρία δείγματα βρίσκεται περίπου στο 87%.

Για να διαγνωστεί από τα ούρα μια κακοήθεια πρέπει:

1. Η αλλοίωση να έρχεται σε επαφή με τα ούρα. Σημασία όμως έχει και το μέγεθος του όγκου. Μικρός όγκος ή πολλαπλοί μικροί όγκοι αποφολιδώνουν ελάχιστο αριθμό κυττάρων. Ογκοί μικρότεροι των 0,5 εκ. διαγιγνώσκονται σπανίως. Από 2,5 εκ. και άνω η διάγνωση φθάνει το 50%.
2. Η αλλοίωση να αποφολιδώνει εύκολα κύτταρα. Η αποφολιδωση κυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διαφοροποίηση του νεοπλασματος. Όσο πιο καλά διαφοροποιημένο είναι το νεόπλασμα τόσο οι κυτταρικές συνδέσεις είναι ισχυρότερες και τόσο λιγότερα είναι τα κύτταρα που αποφολιδώνονται.
3. Τα αποφολιδούμενα κύτταρα να διαφέρουν επαρκώς από τα φυσιολογικά, ώστε να διαγνωσθεί ο νεοπλασματικός τους χαρακτήρας.

Σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να οδηγήσουν καταστάσεις τραυματικές, αναγεννητικές και εκφυλιστικές, που εμφανίζουν θηλώδη απόπτωση του ουροθηλίου ή ουροθηλιακή ατυπία, όπως:

1. Χειρισμοί διάφοροι μεταξύ των οποίων η κυστεοσκόπηση, ο καθετηριασμός, η χρήση ψήκτρας, οι διουρηθρικές επεμβάσεις, η λήψη βιοψίας και ο καθετηριασμός.
2. Λιθίαση. Δρα ταυτόχρονα ως τραυματικός παράγοντας αλλά και ως αποφολιδωτικός. Με τη λιθίαση όμως μπορεί να συνυπάρχει και καρκίνωμα *in situ*.
3. Φλεγμονή όπως η διάμεση κυστίτιδα (έλκος Hunner), η ιογενής φλεγμονή από τον HPV, που παρατηρείται κυρίως σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, με τη δημιουργία κονδυλωμάτων που αποφλοιώνουν κύτταρα παρόμοια με

τα προερχόμενα από πλακώδες καρκίνωμα.

4. Χημειοθεραπεία και κυρίως χρήση αλκυλιωτικών παραγόντων όπως η κυκλοφωσφαμίδη και η βουσουλφάνη. Αλλά και η τοπική χημειοθεραπεία με τη μορφή ενδοκυστικών εγχύσεων.
5. Ακτινοθεραπεία διενεργούμενη για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας ή του εντέρου επηρεάζει το ουροθήλιο.

Σήμερα, η μεγαλύτερη προσφορά της κυτταρολογικής εξέτασης είναι στον τομέα της ανίχνευσης και της παρακολούθησης του Tis (54).



ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

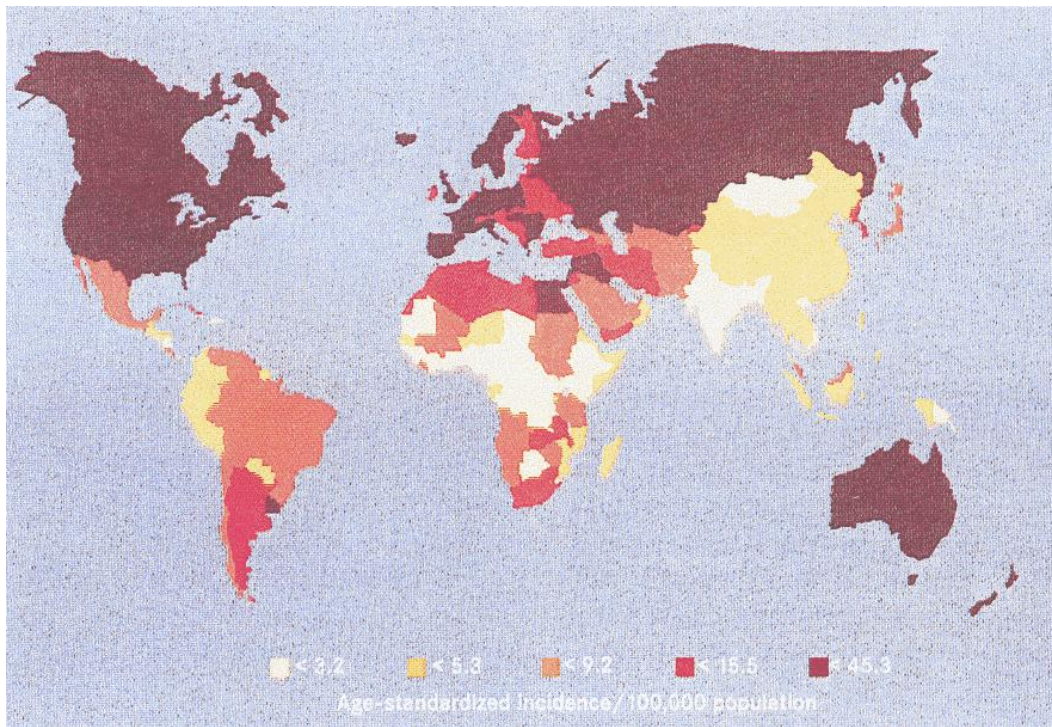
Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (καρκίνωμα από το μεταβατικό επιθήλιο) είναι ο ένατος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως. Αποτελεί το δεύτερο συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα του ουροποιογεννητικού συστήματος και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από όλα τα νεοπλασμάτα του ουροποιογεννητικού συστήματος, αντιπροσωπεύει δε το 2-3% των νεοπλασμάτων του ανθρώπινου σώματος (4). Η επίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως μεταβάλλεται ανά τον κόσμο, με τους υψηλότερους ρυθμούς στη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη και το χαμηλότερο στην Ιαπωνία (Σχήμα 2). Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως παρουσιάζει μια διάκριτη γενετική κατανομή με 2,7 φορές υψηλότερη επίπτωση στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Αυτή η διαφορά αντανακλάται σε ένα περίπου διπλάσιο ρυθμό θανάτου στους άνδρες. Στις ΗΠΑ ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο τέταρτος πιο συχνός τύπος καρκίνου μεταξύ των ανδρών (5).

Η πλειονότητα των καρκινωμάτων ουροδόχου κύστεως παρατηρείται στην προχωρημένη ενήλικη ζωή. Κάθε χρόνο εμφανίζονται 330.000 νέες περιπτώσεις με περισσότερους από 130.000 θανάτους κάθε χρόνο, η θνησιμότητα δε από τον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως υπολογίζεται σε 10 ανά 100.000 πληθυσμού στους άνδρες και σε 2,4 ανά 100.000 για τις γυναίκες. Πάντως οι τιμές αυτές περίπου διπλασιάζονται στις αναπτυγμένες χώρες (6). Η πλειοψηφία αυτών των νέων περιπτώσεων, περίπου 75%, περιορίζονται στο βλεννογόνο και το χαλαρό υπόστρωμα (στάδια Tis, Tα, T1) και η πλειοψηφία αυτών των όγκων μπορεί να αφαιρεθεί με διουρηθρική εκτομή. Οι ρυθμοί υποτροπής είναι υψηλοί (30% έως 85%) και 10% έως 30% των επιφανειακών αυτών όγκων θα εξελιχθούν σε μυοδιηθητική νόσο (στάδια T2-T4) η οποία έχει χειρότερη πρόγνωση (7). Για το υπόλοιπο 25%, η αρχική εμφάνιση περιλαμβάνει διήθηση μυϊκού χιτώνα που συχνά υποτροπιάζει με μεταστάσεις μέσα σε ένα διάστημα 2 ετών αν αντιμετωπισθεί μόνο με διουρηθρική εκτομή και ενδοκυστική θεραπεία (8).

Συχνότητα Καρκίνου ουροδόχου κύστης

- Το 2009 διαγνώστηκαν 70.980 νέες περιπτώσεις καρκίνου ουροδόχου κύστης στις ΗΠΑ (52.810 άνδρες και 18.170 γυναίκες). Τ' αντίστοιχα νούμερα το 2006 στην Ευρώπη ήταν 104.400 (82.800 + 21.600).
- Η πιθανότητα ν' αναπτύξει ένας άνδρας καρκίνο στην ουροδόχο κύστη κατά την διάρκεια της ζωής του είναι 1 στις 27 ενώ για τις γυναίκες 1 στις 84 περίπου.
- Στους άνδρες, ο καρκίνος του προστάτη είναι 5 φορές συχνότερος περίπου σε σχέση με τον καρκίνο της κύστης.





Σχήμα 2. Η παγκόσμια επίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης στον ανδρικό πληθυσμό. Αν και η πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται στις ανεπτυγμένες περιοχές, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης εμφανίζει υψηλούς ρυθμούς σε ορισμένες αναπτυσσόμενες περιοχές, περιλαμβάνοντας μέρη της Β.Αφρικής και της Ν.Αμερικής (Stewart και συν. 2003) (6).

Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την ετερογενή φύση και το ετερογενές δυναμικό κακοήθειας του ουροθηλιακού καρκινώματος, το οποίο αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% των καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης που εμφανίζονται στις ΗΠΑ.

Τα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστεως είναι πιο συχνά σε σχέση με τα νεοπλάσματα του υπόλοιπου αποχετευτικού συστήματος δεδομένου ότι ο ρόλος της κύστης ως αποθήκης ούρων την αναγκάζει να βρίσκεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα κάτω από την επίδραση καρκινογόνων ουσιών που πιθανόν να υπάρχουν στα ούρα.

2. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η μετατροπή ενός καλοήθους ουροθηλιακού κυττάρου σε κακόηθες με δυνατότητα διήθησης και μετάστασης, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εμπεριέχει την αλληλεπίδραση πολλών διαφορετικών γονιδίων, πρωτεϊνών και άλλων μορίων. Διάφορα πεδία μοριακής έρευνας έχουν συνεισφέρει στη γνώση μας σχετικά με την έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου της κύστεως. Η απώλεια λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή η επαγωγή ογκογονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε μη ρυθμιζόμενη κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η ανώμαλη έκφραση αυξητικών παραγόντων, μορίων προσκόλλησης και αγγειογενετικών παραγόντων, συμμετέχει στην εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Οι επικρατέστεροι καρκινογόνοι παράγοντες οι οποίοι έχουν σχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου ουροδόχου κύστης παρατίθενται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

- Κάπνισμα
 - Νιτροζαμίνες
 - 2-ναφθυλαμίνη
- Επαγγελματικοί παράγοντες
 - Βενζιδίνη
 - 2-ναφθυλαμίνη
 - Χλωριωμένοι αλειφατικοί Η/С
 - Αρυλαμίνες
 - Νιτροζαμίνες
 - Άλλοι
- Φάρμακα
 - Φαινακετίνη
 - Κυκλοφωσφαμίδιο
- Ακτινοβολία
- Λοιμογόνοι παράγοντες
 - S.haematobium

2.1. Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός μη επαγγελματικός παράγοντας για την ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως. Εκτιμάται ότι περίπου 65% των περιπτώσεων καρκίνου ουροδόχου κύστεως στους άνδρες και 30% αντίστοιχα στο γυναικείο πληθυσμό σχετίζονται με τον καπνό του τσιγάρου στις ανεπτυγμένες χώρες (9).

Οι καπνιστές τσιγάρου έχουν 2-4 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ουροδόχου κύστης σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ο αυξημένος κίνδυνος είναι παρόμοιος μεταξύ ανδρών και γυναικών καθώς και σε διαφορετικά μέρη του κόσμου. Ο κίνδυνος αυξάνει αναλόγως του αριθμού των καπνιζόμενων τσιγάρων, της διάρκειας καπνίσματος και των πρακτικών εισπνοής.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου κύστεως αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με τη διάρκεια του καπνίσματος όπου μετά πάροδο 40 ετών ο κίνδυνος γίνεται πενταπλάσιος. Ο κίνδυνος αυξάνει επίσης με τον αριθμό των καπνιζόμενων τσιγάρων μέχρι 20 τσιγάρα την ημέρα.

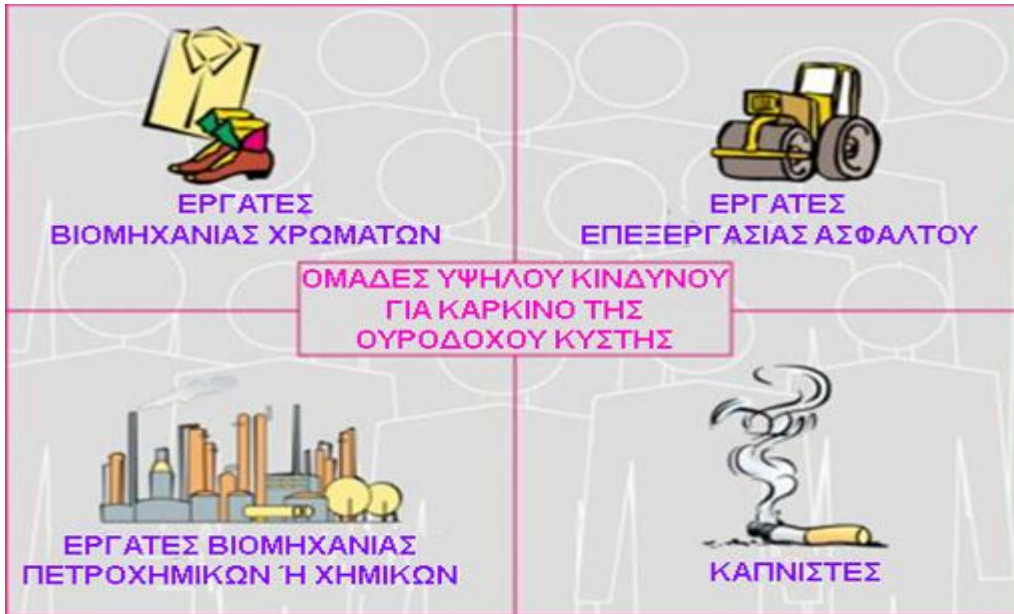


Οι νιτροζαμίνες και η 2-ναφθυλαμίνη είναι γνωστά καρκινογόνα της ουροδόχου κύστεως παρόντα στον καπνό του τσιγάρου, αλλά η συμβολή

τους στην αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης παραμένει άγνωστη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει εστιασθεί στις αρωματικές αμίνες όπως το 4-αμινοδιφαινύλιο (ABP) διότι δεν βρίσκονται μόνο στον καπνό του τσιγάρου αλλά και σε διάφορα βιομηχανικά χημικά. Ένας δυνητικός μηχανισμός μέσω του οποίου οι αμίνες προκαλούν καρκινογένεση είναι σχηματίζοντας DNA πρόσθετα τα οποία επιφέρουν μεταλλαγές. Ο σχηματισμός αυτών των πρόσθετων DNA επηρεάζεται από ηπατικά ένζυμα όπως το κυτόχρωμα P450 1A2 (CYP1A2), η N-ακετυλοτρανσφεράση 2 (NAT2) και η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση M1 (GSTM1). Ορισμένα από αυτά τα ένζυμα είναι επίσης παρόντα στα κύτταρα του ουροθηλίου. Το CYP1A2 είναι ένα επαγωγίσιμο ένζυμο το οποίο απομεθυλιώνοντας τις αρωματικές αμίνες αυξάνει το σχηματισμό των DNA πρόσθετων (10). Αυτά τα ένζυμα είναι πολυμορφικά στο γενικό πληθυσμό, υπάρχουν δε παραλλαγές αυτών των ενζύμων σε ένα πληθυσμό με ελαφρώς διάφορες μοριακές δομές και βιολογικές δραστηριότητες. Μελέτες δείχνουν ότι καπνιστές τσιγάρου με αργο/NAT2/ γρήγορο CYP1A2 φαenότυπο βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου της κύστεως σε σχέση με αυτούς που διαθέτουν γρήγορο NAT2/αργοCYP1A2 (11). Παρόμοια, καπνιστές των οποίων το ένζυμο GSTM1 έχει ομόζυγα εξαλειφθεί, έχουν 1,8 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως σε σχέση με τους καπνιστές που έχουν 1 ή δύο αντίγραφα του GSTM1 (12).

2.2. Επαγγελματική έκθεση

Εκτιμάται ότι η επαγγελματική έκθεση ευθύνεται για περισσότερο από το 20% των περιπτώσεων καρκίνου της κύστεως και για περισσότερο του 33% των περιπτώσεων καρκίνου της κύστεως στη Β. Αμερική (13). Από το 1895, αναγνωρίστηκε ότι εργάτες σε βιομηχανία βαφών ανιλίνης είχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ουροδόχου κύστης, και εν συνεχεία μελέτες έδειξαν ότι αυτοί οι εργάτες είχαν ρυθμούς θανάτου από καρκίνο της ουροδόχου κύστης 10-50 φορές υψηλότερους σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (14,15).



Ο αυξημένος κίνδυνος εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια της έκθεσης. Τα χημικά που εμπλέκονται συχνότερα είναι η βενζιδίνη (4,4 διαμινοδιφαινύλιο) και η 2-ναφθυλαμίνη (αρωματικές αμίνες).

Οι αρωματικές αμίνες από επαγγελματικές εκθέσεις ενεργοποιούνται και αδρανοποιούνται μέσω των ίδιων αντιδράσεων που οι αρωματικές αμίνες του καπνού του τσιγάρου ενεργοποιούνται και αδρανοποιούνται (16). Επαγγέλματα που έχουν αναφερθεί να έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης περιλαμβάνουν εργάτες χρωμάτων, εργάτες ελαστικών και καλωδίων, βαφείς υφασμάτων, οδηγούς φορτηγών, εργάτες που έχουν σχέση με βιομηχανικά αέρια, πετρελαιοειδή, πίσσα.

2.3. Τεχνητά γλυκαντικά

Πειράματα σε ζώα αρχικά υποστηρίχθηκαν από μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων που ανέφερε 1,6 φορές αυξημένο κίνδυνο στους άντρες που χρησιμοποίησαν τεχνητά γλυκαντικά αλλά μελέτες που ακολούθησαν απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα. Ιστολογικές μελέτες κύστεων ανθρώπου δεν έδειξαν διαφορά στο ουροθήλιο μεταξύ χρηστών τεχνητών γλυκαντικών και μαρτύρων. Η ισχύουσα άποψη είναι ότι η χρήση τεχνητών γλυκαντικών αποφέρει μικρό ή καθόλου κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστεως (3).

2.4. Φαρμακευτικές ουσίες

Τα δεδομένα που συνδέουν τη χρήση αναλγητικών με το ουροθηλιακό καρκίνωμα στην ουροδόχο κύστη δεν είναι τόσο ισχυρά όσο στη νεφρική πύελο.

Μελέτες ασθενών-μαρτύρων έδειξαν μια ασθενή σύνδεση ανάμεσα στη χρήση μεταξύ φαινακετίνης και στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (17). Ο κίνδυνος ήταν σημαντικός εφόσον υψηλές αθροιστικές δόσεις επιτυγχάνονταν. Η φαινακετίνη, είναι παράγωγο της ανιλίνης που μεταβολίζεται σε διάφορα προϊόντα εκ των οποίων κυρίως τα N-ακετυλο παράγωγα είναι καρκινογόνα και νεφροτοξικά.

Εχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που λαμβάνουν κυκλοφωσφαμίδη για μεγάλο χρονικό διάστημα και σε υψηλές δόσεις έχουν 9 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης (18). Η πλειονότητα αυτών των όγκων είναι ταχέως αναπτυσσόμενα ουροθηλιακά καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας που έχουν διηθήσει το μυϊκό χιτώνα τη στιγμή της διάγνωσης (19).

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως φαίνεται να είναι ευθέως σχετιζόμενος με τη συνολική αθροιστική δόση της κυκλοφωσφαμίδης (μεγαλύτερη από 50g) (20). Η ακρολεΐνη, ένας μεταβολίτης της κυκλοφωσφαμίδης, είναι καρκινογόνος και πιστεύεται ότι ευθύνεται για την επαγωγή του καρκίνου της κύστεως (21). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η κυκλοφωσφαμίδη ή οι μεταβολίτες της επάγουν τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, παραμένει να διευκρινιστεί.

Μεταλλαγές στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 βρέθηκαν πρόσφατα σε 9 (43%) από 19 ασθενείς με όγκους ουροδόχου κύστης (22) σχετιζόμενους με κυκλοφωσφαμίδιο αλλά είναι άγνωστο αν αυτές οι μεταλλαγές έχουν προέλθει ευθέως από την έκθεση στην κυκλοφωσφαμίδη και τους μεταβολίτες της, αν προκαλούν επαγωγή ή ανάπτυξη του καρκίνου της κύστεως ή σχετίζονται απλά με υψηλού βαθμού κακοήθειας και σταδίου καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.

2.5. Ακτινοβολία

Αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου της κύστεως έχει συσχετιστεί με ακτινοθεραπεία στην περιοχή της πυέλου για καρκινώματα ωθηκών, μήτρας και προστάτη (23,24,25).

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης συνήθως εμφανίζεται 5 χρόνια μετά την ακτινοβολήση και είναι χαρακτηριστικά υψηλού βαθμού κακοήθειας και τοπικά προχωρημένος κατά τη διάγνωση (26). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η ακτινοβολία επάγει καρκίνο της κύστεως είναι άγνωστος αλλά πιθανόν σχετίζεται με τη γένεση ελεύθερων ριζών οι οποίες προκαλούν άμεση μεταλλαγή σημαντικών ρυθμιστικών γονιδίων (κατασταλτικών και ογκογονιδίων).

2.6. Καφές

Ορισμένες αλλά όχι όλες οι μελέτες έχουν προτείνει ένα αυξημένο κίνδυνο καρκίνου ουροδόχου κύστεως σε καταναλωτές καφέ και τσαγιού. Ο Morisson συμπέρανε πως η συσχέτιση, εφόσον υπάρχει, πρέπει να είναι ασθενής (3).

2.7. Σχιστοσωμίαση

Αν και η σχιστοσωμίαση είναι σπάνια στις Δυτικές χώρες, στα μέρη όπου είναι ενδημική, είναι η κύρια αιτία καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Η εκ του *S.haematobium* κυστίτιδα φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου της κύστεως: πλακώδους καρκινώματος και καρκινώματος εκ του μεταβατικού επιθηλίου (TCC) (27).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η σχιστοσωμίαση προκαλεί καρκίνο της κύστεως είναι αβέβαιος, προσοχή έχει εστιαστεί στα νιτρικά και N-νιτροζοσύνθετα (NNCs) (28). Τα NNCs, περιλαμβανομένων των νιτροζαμινών και των με ευθεία δράση νιτροζαμινών είναι καρκινογόνα, επάγουν ογκογενετική αλκυλίωση ειδικών βάσεων και αλληλουχιών του DNA.

Κληρονομικοί παράγοντες

Η ανάπτυξη του καρκίνου της κύστεως δεν σχετίζεται ισχυρά με την κληρονομικότητα. Διάφορες εργασίες έχουν αναφέρει οικογενείς συναθροίσεις περιπτώσεων δείχνοντας ότι μπορεί να υπάρχει ένα μικρό ποσοστό

περιπτώσεων σχετιζόμενες με αυτοσωμική κυρίαρχη κληρονομικότητα αν και τέτοια περιστατικά μπορεί να αντανakλούν κοινή περιβαλλοντική έκθεση (3).

Ο καρκίνος της κύστης είναι περισσότερο συχνός σ' ορισμένες οικογένειες. Αυτό αφορά το 1% όλων των περιπτώσεων. Σ' ορισμένες περιπτώσεις τα μέλη αυτά των οικογενειών έχουν εκτεθεί στην ίδια καρκινογόνο ουσία. Άλλη αιτία μπορεί να είναι η καθυστερημένη ταχύτητα μεταβολισμού και αδρανοποίησης της καρκινογόνου ουσίας.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι οι άνθρωποι διαφέρουν στην ικανότητά τους να διασπούν και ν' αδρανοποιούν χημικές ουσίες στο σώμα τους και αυτή η ικανότητα καθορίζεται από την κληρονομικότητα διαφόρων γονιδίων. Άτομα που έχουν κληρονομήσει γονίδια που προκαλούν πολύ αργή διάσπαση των χημικών ουσιών είναι πιο ευαίσθητα στην καρκινογόνο δράση αυτών των χημικών ουσιών και μπορούν ν' αναπτύξουν ευκολότερα καρκίνο στην ουροδόχο κύστη.

Άνθρωποι που κληρονόμησαν ένα από τα παρακάτω γονίδια, που καθυστερούν να διασπάσουν τις καρκινογόνες τοξικές ουσίες, είναι πιθανότερο να αναπτύξουν καρκίνο στην ουροδόχο κύστη:

- Μετάλλαξη του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (Rb1), το οποίο ευθύνεται για την ανάπτυξη καρκίνου στον οφθαλμό αυτών των ατόμων όταν βρίσκονται στην εφηβική ηλικία, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο ουροδόχου κύστης.
- Νόσος του Cowden, που προκαλείται από μετάλλαξη του γονιδίου που ονομάζεται PTEN, συνδέεται με καρκίνους του μαστού και του θυροειδούς. Άνθρωποι μ' αυτό γονίδιο έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στην ουροδόχο κύστη.
- Το σύνδρομο του οικογενή μή-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer, HNPCC syndrome) γνωστό επίσης και σαν σύνδρομο του Lynch είναι κυρίως συνδεδεμένο με την τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου. Άτομα με αυτό το σύνδρομο είναι σ' αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστης.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο βλεννογόνος της ουροδόχου κύστης έρχεται σε επαφή με όλες σχεδόν τις προσλαμβανόμενες ουσίες ή τους μεταβολίτες τους, κατά την είσοδό τους στον οργανισμό (και μεταξύ αυτών και οι Νιτροδοενώσεις) (29,30). Πιστεύεται ότι ο κρίσιμος στόχος των χημικών καρκινογόνων είναι το γενετικό υλικό. Η χημική αλλοίωση που προκαλούν τα καρκινογόνα στο γενετικό υλικό των κυττάρων-στόχων, θεωρείται το πρώτο βήμα στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η σημαντικότερη προκαρκινική βλάβη την οποία προκαλούν τα καρκινογόνα στο DNA των κυττάρων-στόχων είναι η αλκυλίωση της γουανίνης στη θέση O₆ και ο σχηματισμός O₆-αλκυλογουανίνης. Η προκαρκινική ιδιότητα της γουανίνης οφείλεται στη λανθασμένη κωδικοποίηση του DNA κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού του (31). Το νεοπλασματικό δυναμικό των κυττάρων μπορεί να παραμείνει ανέκφραστο για πολλά έτη (15-40), μέχρις ότου ικανές ποσότητες καρκινογόνου προάγουν την καρκινογένεση μετατρέποντας τα κύτταρα σε κύτταρα όγκου (32).

Τα γονίδια-στόχοι που εμπλέκονται στη νεοπλασματική μετατροπή και εξέλιξη του όγκου ανήκουν σε δύο κατηγορίες: στα πρωτο-ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (33). Οι γενετικές αλλαγές που οδηγούν στην ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων ή στην αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου και συχνά ανιχνεύονται ως μοναδική ανωμαλία, ενώ συχνά συνδυάζονται με ιδιαίτερους τύπους όγκων. Δευτεροπαθείς ανωμαλίες μπορεί να είναι τυχαίες ή μπορεί να καθορίζουν τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων (34).

Μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ανώμαλα, εξαιτίας μιας δομικής ανωμαλίας ή της υπερ- ή της υπο-έκφρασής της, εκφράζει μια ανωμαλία του πυρηνικού DNA. Αυτή η ανωμαλία μπορεί να προκύψει είτε με την παρουσία ενός ενεργοποιημένου ογκογονιδίου, είτε να αποκτηθεί με την αυτόματη μετάλλαξη ή μετά την απώλεια ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου ή μετά από ιογενή λοίμωξη (35).

Απώλεια του ελέγχου των ογκοκατασταλτικών γονιδίων φαίνεται να συμβαίνει συχνά στον καρκίνο της κύστης και το στοιχείο αυτό ανιχνεύεται με την απώλεια της ετεροζυγωτίας. Η ετεροζυγωτία συμβαίνει όταν ένα γονίδιο που κληρονομείται από τον ένα γονέα διαφέρει από το γονίδιο (αλλήλιο) που κληρονομείται από τον άλλο γονέα. Κατά την απώλεια της ετεροζυγωτίας το ένα αλλήλιο χάνεται, αφήνοντας το άτομο με ένα γονίδιο στη γενετική θέση. Κάθε πιθανή μετάλλαξη ή απώλεια του υπολειπόμενου αλληλίου οδηγεί σε πλήρη απώλεια του γονιδίου και της λειτουργίας του. Απώλεια γονιδίων σημαντικού ελέγχου (ογκοκατασταλτικά) με αυτό το μηχανισμό, μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη του καρκίνου.

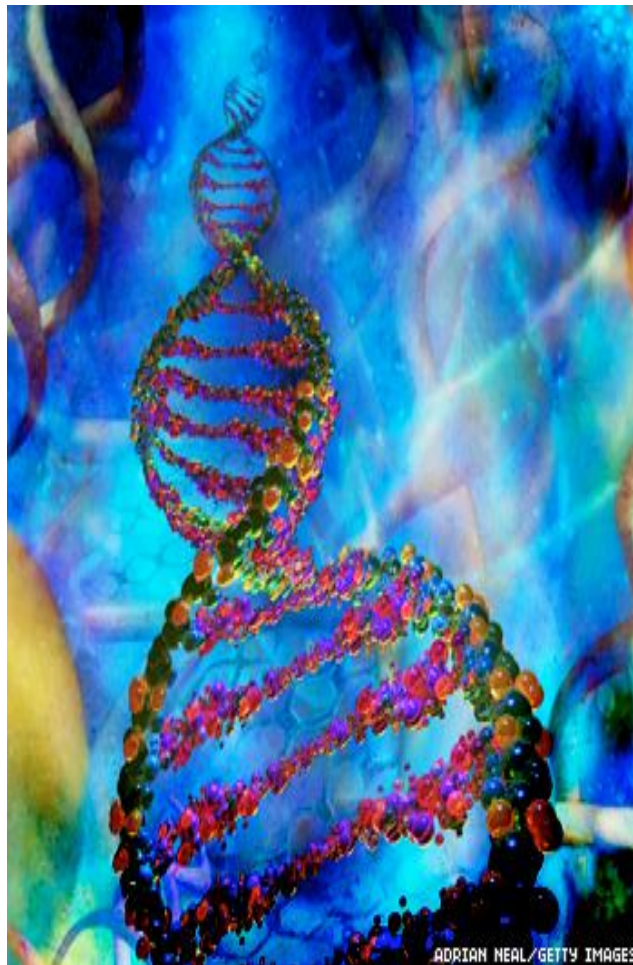
Δύο γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα Rb και p53, έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη του διηθητικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η απώλεια αυτών των γονιδίων, εμπλέκεται στην εξέλιξη, διήθηση και μετάσταση του καρκίνου από το μεταβατικό επιθήλιο.

Η μη φυσιολογική έκφραση ή λειτουργία υποδοχέων για αυξητικούς παράγοντες μπορεί να ενισχύσει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων. Ο επιδερμιδικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι ένα μιτογόνο το οποίο εκκρίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ούρα σε βιολογικά ενεργό μορφή (36) αλλά βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα ούρα ασθενών με καρκίνο κύστεως (37). Αυτό μπορεί να αντανακλά αυξημένη πρόσδεση μορίων όπως οι EGFRs (υποδοχείς επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα) οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται μόνο στη βασική στοιβάδα του ουροθηλίου. Η έκφραση του EGFR (υποδοχέα του επιδερμιδικού αυξητικού παράγοντα) όπως αυτή ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά σχετίζεται με αυξανόμενο βαθμό και στάδιο και φτωχή πρόγνωση (38).

Οι μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες ταξινομήθηκαν με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους με τον EGFR. Ο TGF- α δεσμεύεται στον EGFR, ενώ ο TGF- β δεν δεσμεύεται. Η δέσμευση του TGF- α διεγείρει την έκφραση της κινάσης της τυροσίνης του EGFR. Ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας TGF- α έχει βρεθεί σε αυξημένες ποσότητες στα ούρα ασθενών με διάχυτο καρκίνο και φαίνεται να προέρχεται από τον ίδιο τον όγκο (39). Αυξημένη έκφραση του όξινου ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (acidic fibroblast growth factor) στον καρκίνο της κύστης, συγκριτικά με το φυσιολογικό ουροθήλιο, έχει αποδειχθεί ανοσοϊστοχημικά και aFGF έχει βρεθεί στα ούρα

ασθενών με καρκίνο της κύστης. Αυξημένα επίπεδα του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (basic fibroblast growth factor) έχουν βρεθεί επίσης στα ούρα ασθενών με καρκίνο της κύστης.

Εκτός από τους εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν ή προκαλούν το σχηματισμό προκαρκινικών αλλοιώσεων του DNA, ένας πρόσθετος σημαντικός παράγοντας είναι η ενδογενής ικανότητα των κυττάρων να εξαλείφουν τις αλλοιώσεις αυτές από το DNA τους με τη βοήθεια ενζυμικών επανορθωτικών μηχανισμών. Το γονίδιο GSTM₁ κωδικοποιεί το επανορθωτικό ένζυμο γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση M₁, μέλος της οικογένειας των τρανσφερασών της γλουταθειόνης, που διαδραματίζει ρόλο στην αποτοξίνωση των χημικών. Οι καπνιστές που δεν έχουν αυτό το γονίδιο έχουν 1,8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο της κύστης απ'ότι οι καπνιστές που έχουν ένα ή δύο γονίδια (12).



ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

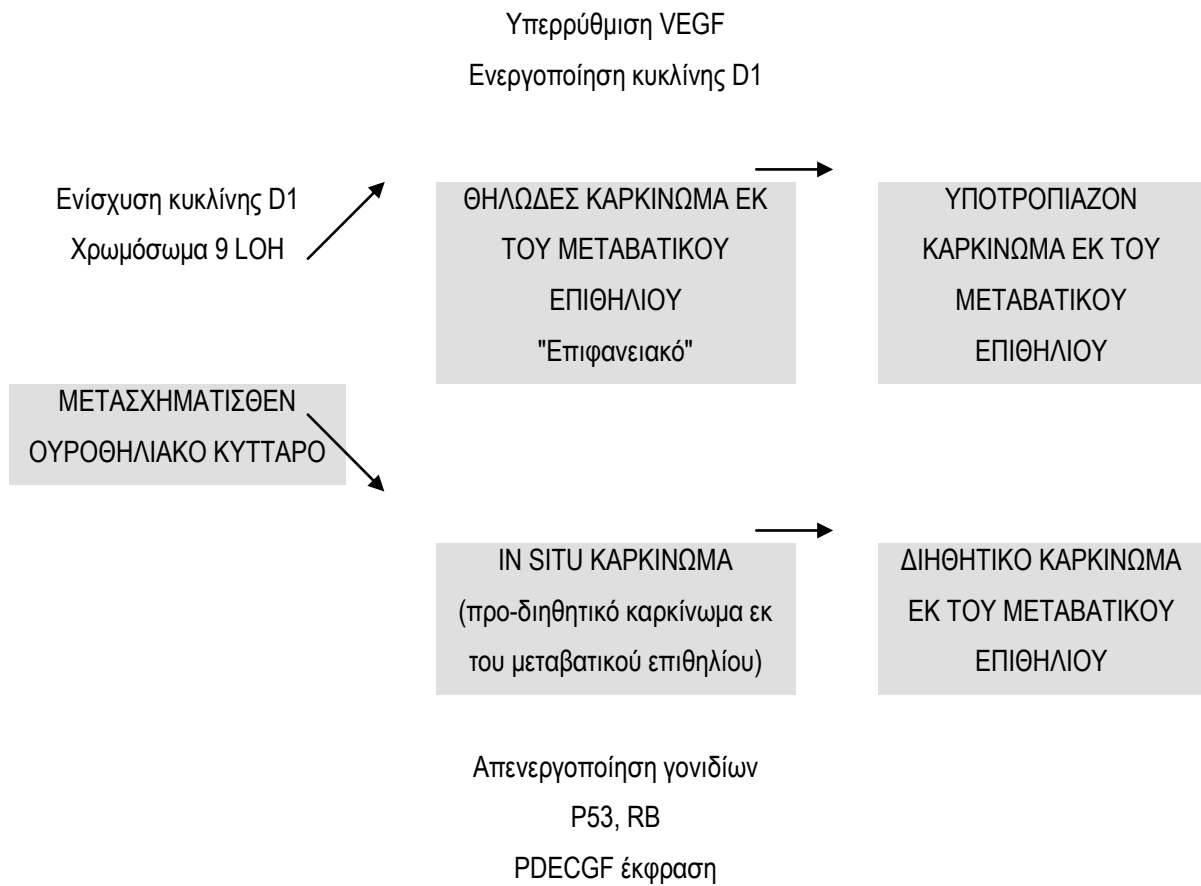
Ενας αριθμός γονιδίων που ρυθμίζουν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό των καρκινογόνων της ουροδόχου κύστεως έχει ταυτοποιηθεί και έχει ειπωθεί ότι άτομα με ειδικούς γονότυπους μπορεί να έχουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης (5).

Για παράδειγμα, κυρίαρχη μετάλλαξη στο γονίδιο NAT2 επιφέρει βραδύ μεταβολισμό των αρωματικών αμινών, ευνοώντας τη μετατροπή τους σε ενεργά καρκινογόνα. Τα άτομα με αργό μεταβολισμό έχουν 40% αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.

Τα άτομα τα οποία στερούνται του γονιδίου GSTM1 το οποίο κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλεκεται στην αποτοξικοποίηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Επίσης, περίπου στο 40% των όγκων της ουροδόχου κύστης έχει παρατηρηθεί μετάλλαξη του ογκογονιδίου HRAS στο κωδικόνιο 12. Υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα σχετίζεται με διηθητική νόσο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το c-erbB-2 (ERBB2) ενισχύεται σε μικρή αναλογία όγκων της ουροδόχου κύστεως.

Κυτταρογενετικές και μοριακές τεχνικές έχουν υποδείξει μερική έλλειψη του χρωμοσώματος 9 σαν ένα κοινό εύρημα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Ακόμη εμπλέκονται οι εξαρτώμενοι από τις κυκλίνες αναστολείς κινάσης p16^{INK4A} και p15. Συχνή είναι η αλλοιωμένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης του γονιδίου ρετινοβλαστώματος που πιο συχνά παρατηρείται σε διηθητικούς όγκους.

Η πυρηνική υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53, κυρίως οφειλόμενη σε μετάλλαξη του γονιδίου, είναι συχνή και σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου (Σχήμα 4) (9).



Σχήμα 4. Γενετικές αλλαγές σχετιζόμενες με την ανάπτυξη καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (Brandan και συν. 2001) (9).

LOH=Απώλεια ετεροζυγωτίας, VEGF=Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, PDECGF=Αιμοπεταλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ

Η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία στα θηλώδη καρκινώματα της ουροδόχου κύστης ανεξαρτήτως βαθμού κακοήθειας ή σταδίου, είναι η απώλεια της ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 9 (34). Απαλείψεις στο χρωμόσωμα 9 συχνά συνιστούν τη μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία των επιφανειακών χαμηλού βαθμού κακοήθειας θηλωδών ουροθηλιακών καρκινωμάτων, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι η αδρανοποίηση κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9 αποτελεί γενεσιουργό παράγοντα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (40). Πράγματι, στη θέση (επίτοπο) 9p21, όπου συχνά παρατηρούνται απαλείψεις, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης εντοπίζονται τρία ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα p14, p15 και p16. Στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (41), η περιοχή όπου συνηθέστερα απαντούνται απαλείψεις είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με το βραχύ άξονα, εκτεινόμενη μεταξύ 9q13 και 9q33. Τα αντιγόνα της ομάδος αίματος (ABH) εκλείπουν από πολλά ουροθηλιακά καρκινώματα, τα γονίδια δε αυτών χαρτογραφούνται στη θέση 9q34.1-34.2. Οι Hartmann και συν. (42) παρατήρησαν μερικές απαλείψεις (partial deletions) ή μονοσωμίες του χρωμοσώματος 9 (9q22 και 9q21) στο 71% των επιφανειακών καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης που μελέτησαν ενώ παρόμοιες γενετικές ανωμαλίες ανευρέθησαν σε παρακείμενες των καρκινωμάτων θέσεις ουροθηλιακής υπερπλασίας.

Η δεύτερη συχνότερη χρωμοσωμική ανωμαλία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι η απώλεια αλληλίου στο χρωμόσωμα 17p. Η απώλεια ετεροζυγωτίας στο 17p συσχετίζεται σημαντικά με το στάδιο και το βαθμό κακοήθειας των καρκινωμάτων, δεδομένου ότι απαντάται στο 70% των μυο-διηθητικών καρκινωμάτων και των *in situ* καρκινωμάτων ενώ δεν ανευρίσκεται συχνά στα χαμηλού σταδίου και χαμηλού βαθμού κακοήθειας νεοπλάσματα (43,44). Στο χρωμόσωμα 17p εντοπίζεται ως γνωστο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53.

Απαλείψεις στο χρωμόσωμα 11p παρατηρούνται στο 20-40% του συνόλου των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης και σε ποσοστό

μεγαλύτερο του 60% των μυο-διηθητικών καρκινωμάτων (44). Οι περιοχές 11p15.5 και 11p15.1-2 συχνά υφίστανται απαλείψεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και δεν περιλαμβάνουν το WT1 (45).

Οι απαλείψεις του χρωμοσώματος 3p είναι συνήθεις σε ποικιλία συμπαγών όγκων συμπεριλαμβανομένων του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και των καρκινωμάτων πνεύμονα, ωθηκών και όρχεων. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, η συχνότητα των αναφερόμενων απαλείψεων του χρωμοσώματος 3p κυμαίνεται από 8 έως 48%, έχει δε ανευρεθεί συσχέτιση των απαλείψεων αυτών με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και το υψηλό στάδιο των καρκινωμάτων (46). Επίσης, οι απαλείψεις στην περιοχή 3p13-14.2 έχουν σχετιστεί με αθανатоποίηση των ανθρώπινων ουροθηλιακών κυττάρων (47).

Περί το 30% των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης παρουσιάζει αλληλική απώλεια στο χρωμόσωμα 18q η οποία σχετίζεται με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και το υψηλό στάδιο των καρκινωμάτων (48).

Το ένα τρίτο επίσης των ουροθηλιακών καρκινωμάτων παρουσιάζει αλληλική απώλεια στο χρωμόσωμα 13q έδρα του ογκοκατασταλτικού γονιδίου pRB.

Οι Knowles και συν. (49) εντόπισαν τέλος απαλείψεις στο χρωμόσωμα 8p σε ποσοστό 23% των καρκινωμάτων ουροδόχου κύστης, απαλείψεις οι οποίες συσχετίστηκαν με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και το υψηλό στάδιο των καρκινωμάτων. Η πολυμορφική N-ακετυλ-τρανσφεράση (polymorphic N acetyl transferase) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8p και έχει συνδεθεί με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (50).

Οι μικροδορυφόροι αποτελούν δυ-, τρι- ή τετρα-νουκλεοτιδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που απαντώνται κατά μήκος του γονιδιώματος (genome). Στο φυσιολογικό ουροθήλιο είναι γενικώς σταθεροί ενώ αστάθεια αυτών παρατηρείται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Συγκεκριμένα μικροδορυφορική αστάθεια στα ουροθηλιακά καρκινώματα έχει παρατηρηθεί στο χρωμόσωμα X στην περιοχή του ανδρογονικού υποδοχέα (51) καθώς και στα χρωμοσώματα 9 (52) και 2 (53).

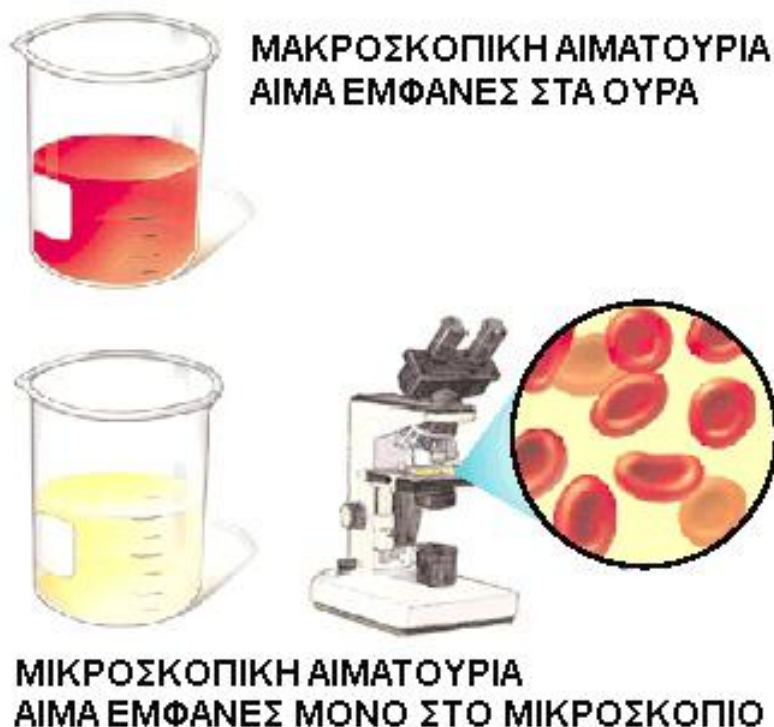
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Τα συνήθη συμπτώματα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι:

- Αίμα στα ούρα, αιματουρία (χρωματίζοντας τα ούρα από ροζέ σε βαθύ κόκκινα)
- Πόνος κατά την ούρηση
- Συχνουρία ή αίσθημα ούρησης χωρίς να έχει περιεχόμενο η κύστη
- Πόνος χαμηλά στην μέση

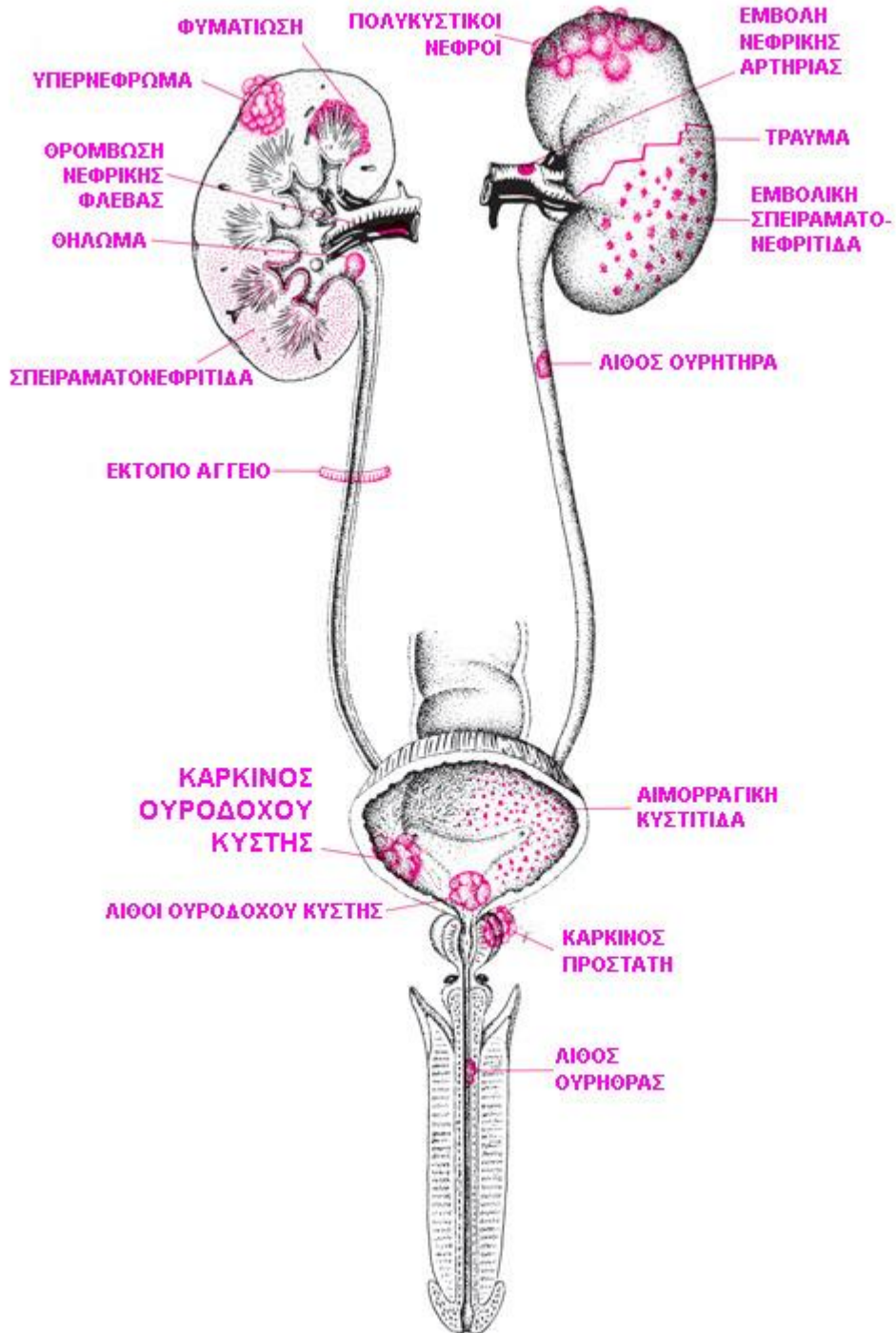
Η αιματουρία είναι το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και συνήθως δεν συνοδεύεται από κανένα πόνο (η λεγόμενη ανώδυνη αιματουρία). Η αιματουρία μπορεί επίσης να είναι μακροσκοπική ή μικροσκοπική, ανάλογα αν το αίμα είναι ή δεν είναι ορατό στα ούρα (χρωματίζει ή δεν χρωματίζει κόκκινα τα ούρα) αντίστοιχα.

Αυτά τα συμπτώματα δεν είναι σίγουρα σημεία καρκίνου της κύστης. Λοιμώξεις, καλοήθεις όγκοι, λίθοι στην κύστη ή άλλα προβλήματα υγείας μπορούν επίσης να προκαλέσουν ανάλογα συμπτώματα.



ΑΙΤΙΑ ΑΙΜΑΤΟΥΡΙΑΣ.

Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΥΡΙΑΣ



Προσυμπτωματική Διάγνωση και Έλεγχος για Καρκίνο Ουροδόχου Κύστης

Το 2009 θα νοσήσουν στις ΗΠΑ περισσότεροι από 68.000 άνθρωποι από καρκίνο της ουροδόχου κύστης και 14.000 περίπου θα πεθάνουν απ' αυτήν την νόσο. Προσυμπτωματικός έλεγχος σημαίνει την διενέργεια εκείνων των εξετάσεων για την έγκαιρη ανακάλυψη του καρκίνου προτού δημιουργήσει οποιοδήποτε ενόχλημα. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος επιτρέπει την ανεύρεση του καρκίνου σ' αρχικό στάδιο. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης σ' αρχικό στάδιο μπορεί να ιαθεί αφού είναι απίθανο να' χει επεκταθεί σ' άλλα όργανα του σώματος.

Υπάρχουν διάφορες εξετάσεις για τον προσυμπτωματικό έλεγχο που αφορούν τα ούρα, τον κόλπο ή το ορθό και βοηθούν στην πρώιμη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης.

Εξέταση ούρων

Με την εξέταση των ούρων ελέγχονται το χρώμα και η περιεκτικότητα σε διάφορες ουσίες , όπως σάκχαρο, πρωτεΐνες ή λευκώματα, ερυθρά αιμοσφαίρια και πτυοσφαίρια.

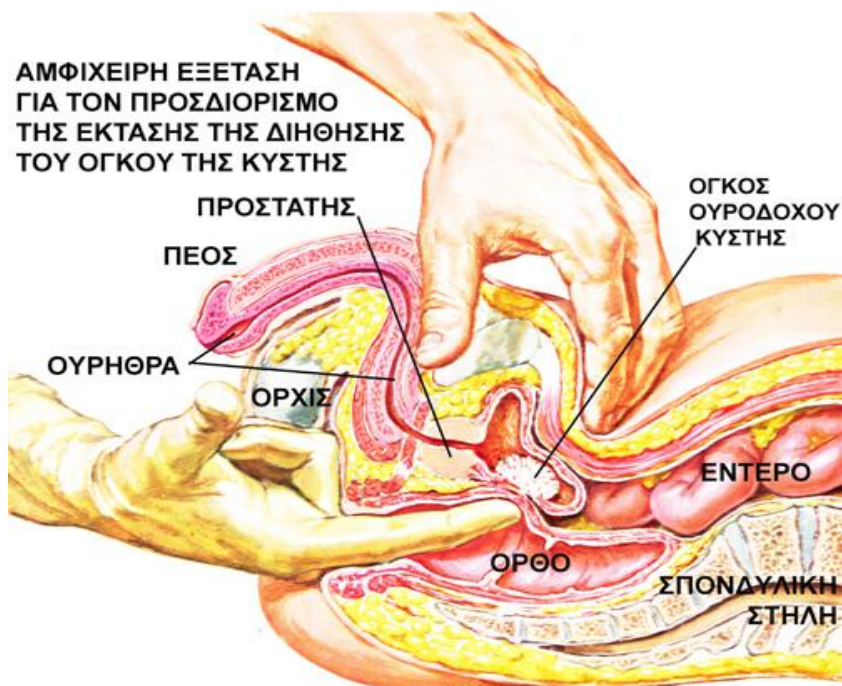
Κυτταρολογική εξέταση ούρων

Η κυτταρολογική ανάλυση των ούρων είναι η εξέταση των ούρων στο μικροσκόπιο για τον έλεγχο ύπαρξης καρκινικών κυττάρων.

Κλινική εξέταση

Περιλαμβάνει την λεγόμενη αμφίχειρη εξέταση του κόλπου και/ή του ορθού.

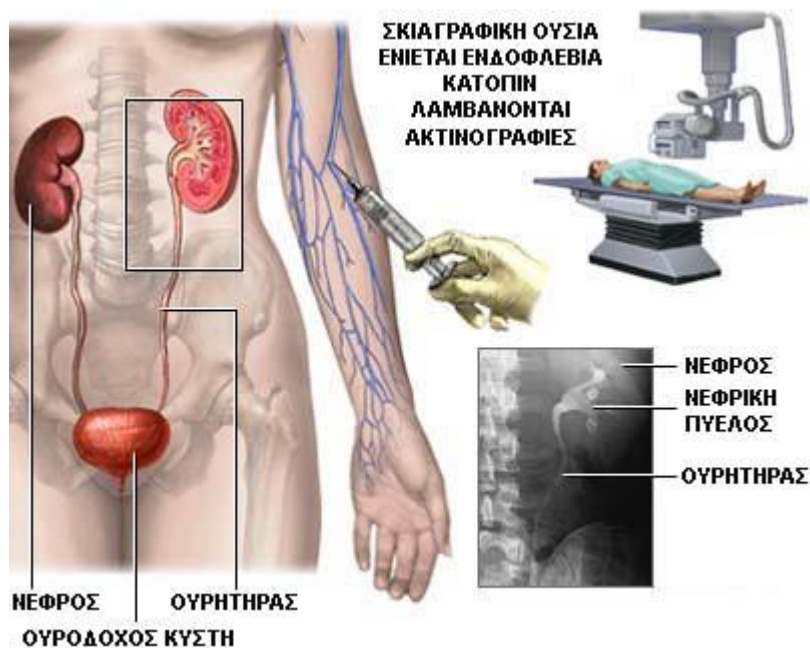
Ο ουρολόγος εισάγει τα δάκτυλα του ενός χεριού στον κόλπο ή στο ορθό και με το άλλο χέρι ψηλαφεί την ουροδόχο κύστη από το κοιλιακό τοίχωμα.



Έτσι ελέγχεται η ύπαρξη όγκων στην κύστη και η κινητικότητα της. Εάν η κύστη ψηλαφάται κινητή και δεν είναι καθηλωμένη στους γύρω ιστούς σημαίνει πιθανόν ότι ο όγκος δεν έχει διηθήσει και τα γειτονικά όργανα και είναι ίσως χειρουργικά εξαιρέσιμος.

Ενδοφλέβια Πυελογραφία

Η ενδοφλέβια πυελογραφία είναι μία σειρά από ακτινογραφίες των νεφρών, ουρητήρων και της ουροδόχου κύστης για την διαπίστωση ύπαρξης όγκων σ' αυτά τα όργανα. Επειδή τα όργανα του ουροποιητικού συστήματος δεν μπορούν να γίνουν εμφανή με τις απλές ακτινογραφίες ένα σκιαγραφικό μέσο χορηγείται ενδοφλεβίως και καθώς το σκιαγραφικό απορροφάται και αποβάλλεται από τους νεφρούς γεμίζει το εσωτερικό των νεφρών, των ουρητήρων και της κύστη και τα απεικονίζει καλύτερα.



ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑΣ ΠΥΕΛΟΓΡΑΦΙΑΣ

Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη όγκων ή λίθων στο εσωτερικό αυτών των οργάνων ή την ύπαρξη οποιουδήποτε κωλύματος στην πορεία αποχέτευσης των ούρων.

Αξονική τομογραφία

Με την αξονική τομογραφία λαμβάνεται μία σειρά από λεπτομερείς εικόνες των εσωτερικών οργάνων του σώματος υπό διαφορετικές γωνίες. Οι εικόνες αυτές δημιουργούνται από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με μία μηχανή παραγωγής ακτίνων Χ. Γι' αυτόν τον λόγο ονομάζεται και η αξονική τομογραφία και αξονική υπολογιστική τομογραφία. Ένα ειδικό σκιαγραφικό μέσο χορηγείται ενδοφλέβια ή και από το στόμα για να βοηθήσει στην σαφέστερη απεικόνιση των οργάνων και στο ακριβή διαχωρισμό τους από τους γύρω ιστούς.

Κυστεοσκόπηση

Με την κυστεοσκόπηση, που είναι η επισκόπηση της κύστης διαμέσου της ουρήθρας, βλέπουμε μέσα στην ουρήθρα και την ουροδόχο κύστη για να ελέγξουμε την ύπαρξη παθολογικών καταστάσεων σ' αυτά τα όργανα. Το κυστεοσκόπιο εισέρχεται διαμέσου της ουρήθρας στο εσωτερικό της

ουροδόχου κύστης. Το κυστεοσκόπιο είναι ένα λεπτό, σωληνοειδές όργανο σαν τηλεσκόπιο εξοπλισμένο με φως και ειδικούς φακούς. Έχει ειδικά κανάλια εργασίας για την είσοδο ειδικών λαβίδων για την λήψη υπό όραση δειγμάτων ιστών, που θα εξετασθούν στο μικροσκόπιο για την ύπαρξη καρκίνου.



ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Το 80% των ασθενών με πρωτοπαθή ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης, παρουσιάζονται με χαμηλής κακοήθειας καρκίνωμα το οποίο περιορίζεται στον επιφανειακό βλεννογόνο, ενώ το 15-30% των ασθενών εμφανίζεται με όγκους που έχουν διηθήσει το μυϊκό τοίχωμα. Ο κίνδυνος υποτροπής στους ασθενείς με επιφανειακά καρκινώματα (ΕΚ) ανέρχεται στο 70% και το 30% των υποτροπιάζόντων νεοπλασμάτων παρουσιάζει εξέλιξη προς υψηλότερο βαθμό κακοήθειας και/ή στάδιο, ενώ το 50% των όγκων που έχουν διηθήσει το μυϊκό τοίχωμα υποτροπιάζει και παρουσιάζει μεταστατική νόσο εντός δύο ετών.

Οι πιο χρήσιμοι προγνωστικοί παράγοντες για την καρκινική υποτροπή και μετέπειτα εξέλιξη του καρκίνου διακρίνονται σε κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες και σε βιολογικούς-μοριακούς προγνωστικούς παράγοντες (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Προγνωστικοί παράγοντες

Κλασικοί:

- Ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (grade)
- Το στάδιο της νόσου
- Η διήθηση των αγγείων
- Η πολυεστιακότητα και το μέγεθος του καρκινώματος
- Η παρουσία δυσπλασίας ή καρκινώματος in situ

Βιολογικοί-Μοριακοί:

- Η ελάτπωση των αντιγόνων ομάδων αίματος
- Αντιγόνα συνδεδεμένα με τον όγκο
- Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού
- Πλοειδικότητα του DNA
- Ογκογονίδια
- Ογκοκατασταλτικά γονίδια
- Μεταλλοπρωτεΐνάσες του στρώματος
- Δείκτες αγγειογένεσης
- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

1. ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1.1. Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (grade) του καρκινώματος: Ο βαθμός διαφοροποίησης ή βαθμός κακοήθειας ενός όγκου, εκφράζει το βαθμό της κυτταρικής του αναπλασίας. Σχετίζεται άμεσα με το στάδιο διήθησης και θεωρείται από τους κυριότερους προγνωστικούς δείκτες για τη βιολογική συμπεριφορά και εξέλιξη του νεοπλασματος.

1.2. Πολυεστιακότητα και μέγεθος του όγκου: Ο αριθμός των όγκων αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για υποτροπές και ανάπτυξη διηθητικής νόσου. Οι ασθενείς με πολλαπλούς όγκους έχουν τριπλάσιες πιθανότητες να αναπτύξουν διηθητικό καρκίνωμα σε σύγκριση με εκείνους που έχουν μονήρη όγκο. Διαφέρει επίσης το ελεύθερο νόσου χρονικό διάστημα που είναι βραχύτερο στους πολλαπλούς όγκους. Το μέγεθος του όγκου επίσης συσχετίστηκε με την εξέλιξη σε διηθητικό καρκίνωμα και με το στάδιο. Άλλος σημαντικός παράγοντας υποτροπής είναι ο αριθμός των υποτροπών που έχουν προηγηθεί. Ενώ ο κίνδυνος υποτροπής είναι 45%, μετά την πρώτη διουρηθρική εκτομή του όγκου, το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 84% για ενδεχόμενη δεύτερη υποτροπή.

1.3. Διήθηση αγγείων: Η παρουσία διήθησης λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων είναι σημείο κακής πρόγνωσης. Το ποσοστό της διήθησης αιμοφόρων αγγείων σε επιφανειακούς όγκους κυμαίνεται από 2,7-7%. Οσον αφορά στη διήθηση λεμφαγγείων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ των ασθενών με ή χωρίς διήθηση και δεν έχει σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου.

1.4. Δυσπλασία και καρκίνωμα in situ: Η παρουσία σε άλλη θέση του βλεννογόνου δυσπλασίας ή καρκινώματος in situ αυξάνει το ποσοστό υποτροπών από 43% σε 73% και τον κίνδυνο διηθητικής εξέλιξης στο 83% όταν εντοπίζονται σε παρακείμενη με τον κυρίως όγκο θέση. Κρίνεται επομένως απαραίτητη η λήψη βιοψιών από θέσεις παρακείμενες και απομακρυσμένες του όγκου ακόμη και όταν ο βλεννογόνος κυστεοσκοπικά φαίνεται φυσιολογικός.

2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ-ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

2.1. Επιφανειακά αντιγόνα ομάδων αίματος

Το γεγονός ότι τα επιφανειακά αντιγόνα ομάδων αίματος ABO(H) δεν βρίσκονται μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια αλλά και σε κύτταρα άλλων οργάνων είναι γνωστό. Αναλόγως με το κάθε άτομο, το φυσιολογικό ουροθήλιο εκφράζει A, B και το πρόδρομο H αντιγόνο όπως και τα σχετιζόμενα M, N, Tα και Lewis αντιγόνα. Η απώλεια των αντιγόνων ομάδων αίματος συσχετίστηκε με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και σε ορισμένες μελέτες δεικνύει αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε ασθενείς με μη διηθητικό θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα (58).

Η ανίχνευση των ABO αντιγόνων εκτός από την ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων μεθόδων, μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες, όπως η ακτινοβολία η οποία μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, η ύπαρξη μικρού αριθμού αντιγόνων στα κύτταρα, η ακανόνιστη διάταξη των αντιγόνων στην επιφάνεια των κυττάρων, καθώς και η ηλεκτρική φόρτιση που επηρεάζει τη σύζευξη των κυττάρων μεταξύ τους. Τέλος, η ανίχνευση των ABO αντιγόνων επηρεάζεται και από την ιστολογική μορφή του όγκου και ιδίως όταν έχουμε παρουσία μη ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων (59).

2.2. Αντιγόνα συνδεδεμένα με τον όγκο (Tumor-associated antigens: M344, 19A211, T138 και DD23)

Πολλά αντιγόνα που έχουν εντοπιστεί με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδέονται με τα ουροθηλιακά καρκινώματα και αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως πιθανοί καρκινικοί δείκτες. Οι δείκτες αυτοί είναι κατά το πλείστον απόντες από το φυσιολογικό μεταβατικό επιθήλιο. Το αντιγόνο M344 αποτελεί μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που ανιχνεύεται στο 70% περίπου των καρκινωμάτων σταδίου Tα και T1 ενώ η έκφρασή του μειώνεται καθώς αυξάνεται το στάδιο και ο βαθμός κακοήθειας των νεοπλασμάτων (25% για τα *in situ* καρκινώματα και 15% για τη διηθητική νόσο) (60,61). Ο συνδυασμός μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των M344, 19A211 και LDQ10 βρίσκεται υπό διερεύνηση ως πιθανή ανοσοϊστοχημική δοκιμασία στα ούρα (62).

Το αντιγόνο 19A211 αποτελεί μια σιαλογλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στο 70% των καρκινωμάτων σταδίου Tα και T1, στο 60% των *in situ* καρκινωμάτων και στο 50% των διηθητικών καρκινωμάτων (63). Το αντιγόνο αυτό ωστόσο ανευρίσκεται και στο 25% των υγιών επιπολής κυττάρων του ουροθηλίου (umbrella cells). Η έκφραση του αντιγόνου 19A211 σχετίζεται με χαμηλό ποσοστό υποτροπών ενώ αντίθετα η έκφραση του T138 σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα υποτροπής (64). Το αντιγόνο T138 αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στο 15% των Tα και T1 ουροθηλιακών καρκινωμάτων και στο 60% των διηθητικών.

2.3. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67, PCNA)

Οι σημαντικότεροι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι οι Ki-67 και PCNA. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Ki-67 αντιδρά με ένα πυρηνικό αντιγόνο, σχετικό με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (65). Αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη Ki-67 παρατηρείται στα ουροθηλιακά καρκινώματα υψηλότερου βαθμού κακοήθειας και σταδίου και έχει συσχετιστεί με την υποτροπή της νόσου (66-71). Σύμφωνα με τους Asakura και συν. (72) ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα υποτροπής για τα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα ενώ οι Poron και συν. (73) αναφέρουν ανεξάρτητη προγνωστική αξία του Ki-67 για όλα τα στάδια της νόσου. Ο Tomaszewski αναφέρει τέλος ότι η αυξημένη αναλογία του Ki-67 ως προς την απόπτωση σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα PCNA ενσωματώνεται στον πυρήνα κατά τη φάση σύνθεσης του DNA. Το 95,8% των ουροθηλιακών καρκινωμάτων είναι θετικά για το PCNA και ο μέσος δείκτης σήμανσης (mean labeling index) είναι υψηλότερος στα διηθητικά και υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκινώματα (74).

2.4. Ανάλυση του DNA

Κυτταρομετρία ροής: Ο προσδιορισμός και η μελέτη της ποσότητας του DNA στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων θεωρείται σαν ένας σημαντικός δείκτης, για την εκτίμηση του βαθμού κακοήθειας του όγκου.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των φυσιολογικών κυττάρων του ανθρώπου είναι η σταθερότητα του ποσού του γενετικού υλικού του. Η

φυσιολογική περιεκτικότητα σε DNA του πυρήνα (7 pg) και η σταθερή του χρωμοσωματική σύνθεση είναι γνωστά με τον όρο ευπλοειδία.

Σαν ανευπλοειδία χαρακτηρίζουμε την οποιαδήποτε παρέκκλιση από τη φυσιολογική κατάσταση, είτε αυτή αναφέρεται σε ποιοτική διαταραχή των χρωμοσωμάτων, είτε σε ποσοτική διαταραχή της περιεκτικότητας σε DNA. Είναι γνωστό ότι οι παρεκκλίσεις αυτές επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά των κυττάρων και θεωρείται σαν ένδειξη κακοήθους εξεργασίας.

Δείκτης DNA (DNA index): Είναι η σχέση του σχετικού ποσού του DNA, που έχουν τα εξεταζόμενα νεοπλασματικά κύτταρα στη φάση G₀/G₁, προς το σχετικό ποσό DNA που έχουν τα φυσιολογικά κύτταρα στην ίδια φάση. Ο δείκτης DNA επομένως δείχνει σε ποιο βαθμό τα νεοπλασματικά κύτταρα απέχουν από τα φυσιολογικά-διπλοειδικά κύτταρα ως προς την περιεκτικότητά τους σε DNA. Η περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA εκφράζεται και σαν πλοειδικότητα του DNA. Οι όγκοι διακρίνονται σε διπλοειδικούς και ανευπλοειδικούς. Διπλοειδικοί είναι οι όγκοι με δείκτη DNA ίσο με τη μονάδα, δηλαδή τα κύτταρα έχουν ποσό DNA, το οποίο αντιστοιχεί σε κανονικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Όταν τα κύτταρα έχουν αριθμό χρωμοσωμάτων πολλαπλάσιο του κανονικού, τότε χαρακτηρίζονται σαν πολυπλοειδικά. Κατά συνέπεια και η περιεκτικότητα σε DNA των κυττάρων αυτών είναι ακέραιο πολλαπλάσιο αυτής που έχουν τα διπλοειδικά κύτταρα. Αnevπλοειδικοί είναι οι όγκοι με δείκτη DNA μικρότερο ή μεγαλύτερο από τη μονάδα, που αντιστοιχεί πάντοτε σε παθολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων. Η παρουσία ανευπλοειδίας επί απουσίας μακροσκοπικά ορατής βλάβης θεωρείται σαν ένδειξη προκαρκινικής μεταβολής. Σε παρουσία έντονης φλεγμονής ή παρουσία λιθίασης κύστης μπορεί να έχουμε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, σε ποσοστό 28-30%. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αποδίδονται σε νεοπλάσματα χαμηλού σταδίου και βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο η κυτταρομετρία ροής μπορεί να διαγνώσει τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης σε ποσοστό 78-83% (75,76).

Σε ένα φυσιολογικό ιστόγραμμα του DNA εμφανίζεται μια καμπύλη με δύο κορυφές: η πρώτη αντιστοιχεί στα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G₀/G₁ και έχουν διπλοειδικό DNA και η δεύτερη αντιστοιχεί στα κύτταρα φάσης G₂/M που έχουν DNA διπλάσιο από το διπλοειδικό. Μεταξύ των δύο κορυφών υπάρχει μια τρίτη περιοχή, που αντιστοιχεί στα κύτταρα που

βρίσκονται στη φάση σύνθεσης (φάση S). Τα κύτταρα της φάσης S σπάνια υπερβαίνουν το 10%. Από τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ιδιαίτερη σημασία έχει η φάση της σύνθεσης (φάση S) η οποία αντανακλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του όγκου. Σε ορισμένα νεοπλάσματα η δραστηριότητα αυτή είναι ανάλογη του βαθμού κακοήθειας των κυττάρων. Σε μια μελέτη που έγινε στην Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική Αθηνών (1995) αποδείχθηκε ότι η κυτταρομετρία ροής υπερείχε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό της κυτταρολογικής εξέτασης των ούρων στη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (77).

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα που προέρχονται από τη μελέτη των κυττάρων με την κυτταρομετρία ροής θα μπορούσαμε να τα συνοψίσουμε στα εξής:

1. Η πλοειδικότητα του DNA στα νεοπλάσματα του ουροθηλίου σχετίζεται με την υποτροπή, την εξελικτική πορεία του όγκου και την επιβίωση του ασθενούς.
2. Σε γενικές γραμμές όλα τα GI και τα 2/3 των GII νεοπλασμάτων είναι διπλοειδικά. Τετραπλοειδικά είναι σχεδόν αποκλειστικά τα GII, ενώ τα περισσότερα GIII είναι ανευπλοειδικά.
3. Η ανάλυση του DNA βοηθά στην ταυτοποίηση των GII νεοπλασμάτων με τάση υποτροπής.
4. Η διαφορά του αριθμού των υποτροπών στα ευπλοειδικά νεοπλάσματα σε σχέση με τα ανευπλοειδικά είναι στατιστικά σημαντική.
5. Υψηλό κλάσμα φάσης S στα νεοπλασματικά κύτταρα υποδηλώνει εξελικτική νόσο και στο 62% των ασθενών επιβίωση μικρότερη της πενταετίας.
6. Υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ πλοειδικότητας, κλάσματος φάσης S και βαθμού διαφοροποίησης των όγκων.

2.5. Ογκογονίδια

Ογκογονίδια (Ras, c-myc, mdm2, c-jun, c-erbB-2): Στην οικογένεια Ras ανήκουν 3 ογκογονίδια (H-Ras, Ki-Ras, N-Ras), μεταλλαγμένες μορφές των οποίων έχουν ανευρεθεί σε ποικιλία κακοήθων όγκων. Το ογκογονίδιο H-Ras κωδικοποιεί την p21 μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στη

μεταβίβαση μηνυμάτων. Οι ογκοπρωτεΐνες Ras υφίστανται σημαντικές μεταλλάξεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία πρωτεϊνών ικανών να προκαλούν καρκινική μετατροπή. Το ογκογονίδιο H-Ras έχει θεωρηθεί ότι συμμετέχει στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστης. Μεταλλάξεις της H-Ras πρωτεΐνης στις θέσεις των αμινοξέων 12, 13, 60 και 61, έχουν αναφερθεί σε ποσοστά κυμαινόμενα από 10% έως 36% των καρκινωμάτων από το μεταβατικό επιθήλιο (78). Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης H-Ras στα επιφανειακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (79).

C-myc: Τα γονίδια της οικογένειας myc κωδικοποιούν πυρηνικές φωσφοπρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών myc προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έχει παρατηρηθεί μεταξύ άλλων και στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης όπου έχει συσχετιστεί με νεοπλάσματα υψηλού βαθμού κακοήθειας (80). Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, η ανίχνευση του ογκογονιδίου c-myc σχετίζεται με την υποτροπή και την εξέλιξη των επιφανειακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης. Μέχρι στιγμής ωστόσο, δεν έχει διαπιστωθεί κάποια ανεξάρτητη προγνωστική αξία των πρωτεϊνών myc στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (81).

Mdm2: Το γονίδιο mdm2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 και περιγράφηκε πρώτη φορά σαν ένα ενισχυμένο γονίδιο σε μια κυτταρική σειρά ποντικών (murine double minute gene 2). Το γονίδιο mdm2 κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης p53 και δεσμεύει τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της. Το γονίδιο mdm2 υπόκειται σε θετική ρύθμιση από το p53 και το ίδιο δρα ως παλίνδρομος αναστολέας της λειτουργίας του p53. Η υπερέκφραση του γονιδίου mdm2 αποτελεί μηχανισμό αδρανοποίησης του p53 και έχει παρατηρηθεί σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, σε ποσοστό 20-30% των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης (82). Παρά την πιθανή συμμετοχή του στην καρκινογένεση, η προγνωστική σημασία του mdm2 δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί.

C-jun: Το πρωτο-ογκογονίδιο c-jun κωδικοποιεί το μεγαλύτερο τμήμα ενός μείζονος παράγοντα μεταγραφής, του AP-1 που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης (83,84). Διαταραχές της έκφρασης του

γονιδίου c-jun έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η υπερ-έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου c-jun έχει συσχετισθεί με τη διηθητικότητα των ουροθηλιακών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης (85).

c-erbB-2: Το πρωτοογκογονίδιο c-erbB-2 (HER-2/neu) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που προσομοιάζει με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R). Η έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχει συσχετισθεί με τον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας των νεοπλασμάτων, με προχωρημένο στάδιο της νόσου και τη φτωχή επιβίωση των ασθενών (86,87). Άλλες ωστόσο μελέτες δεν επιβεβαίωσαν τα ως άνω ευρήματα (39,88,89).

2.6. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb): Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13q14 και κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 110 KD, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα η Rb πρωτεΐνη και τα μέλη της οικογένειάς της, είναι σε θέση να διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση δεσμεύοντας τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για την αντιγραφή του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της Rb πρωτεΐνης από ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται κυκλίνες και από τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες, έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της Rb από τους E2F παράγοντες, γεγονός που επιτρέπει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Η αδρανοποίηση του γονιδίου Rb έχει θεωρηθεί σημαντικό βήμα στην εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Μεταλλάξεις του γονιδίου Rb έχουν παρατηρηθεί στο 30% περίπου των καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης (90,91). Η απώλεια της έκφρασης της Rb πρωτεΐνης έχει συσχετισθεί με καρκινώματα υψηλότερου βαθμού κακοήθειας και προχωρημένου σταδίου (46,92,93).

Σε μυοδιηθητική νόσο, έχει παρατηρηθεί, στατιστικά σημαντική μικρότερη πενταετής και ολική επιβίωση στους ασθενείς που παρουσιάζουν

απώλεια έκφρασης της Rb πρωτεΐνης σε σχέση με εκείνους που είχαν φυσιολογική έκφραση αυτής (90,91). Οι Pollack και συν. (94) αναφέρουν ότι η απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης Rb σε ασθενείς σταδίου T3b που αντιμετωπίστηκαν με ακτινοθεραπεία, αποτελεί δείκτη κακής έκβασης.

Στα επιφανειακά ωστόσο καρκινώματα η απώλεια της έκφρασης της Rb πρωτεΐνης παρόλο που έχει συσχετιστεί με αυξημένο βαθμό κακοήθειας, δεν αποδείχθηκε ανεξάρτητος δείκτης πρόβλεψης των υποτροπών, της εξέλιξης της νόσου και της επιβίωσης των ασθενών (95, 96). Στην προσπάθεια ανεύρεσης ανεξάρτητων δεικτών υποτροπής και εξέλιξης των επιφανειακών καρκινωμάτων, πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη συνδυασμένη έκφραση περισσότερων του ενός γονιδίου. Οι Cordon-Cardo και συν. (96) μελέτησαν την έκφραση των p53 και Rb πρωτεϊνών σε μια σειρά επιφανειακών όγκων κύστεως. Ενώ η έκφραση κάθε μιάς από τις πρωτεΐνες αυτές δεν αποτέλεσε από μόνη της, ανεξάρτητο από το βαθμό κακοήθειας δείκτη εξέλιξης της νόσου, ο συνδυασμός της θετικής έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 και της απώλειας της έκφρασης της Rb αναδείχθηκε ανεξάρτητος δείκτης πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου. Η μελέτη αυτή αναδεικνύει την αξία του συνδυασμού των Rb και p53 για τον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς των επιφανειακών καρκινωμάτων.

Ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53: Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη MB 53 Kda με ρόλο μεταγραφικού παράγοντα και κρίσιμο ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση. Το φυσικό στέλεχος (wild type) του γονιδίου p53 το οποίο είναι παρόν σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες στα κύτταρα και παρουσιάζει ταχύ ρυθμό ανακύκλωσης, παίζει σημαντικό ρόλο κατά την κυτταρική απάντηση μετά από γονιδιακή βλάβη δρώντας ως ανιχνευτής της βλάβης του DNA. Η γονιδιακή βλάβη προκαλεί την ενεργοποίηση αδρανών μορφών του p53 που ανευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Η ενεργοποιημένη p53 πρωτεΐνη συνδέεται με ειδικές αλληλουχίες DNA ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων που δευτερογενώς οδηγούν σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να επιδιορθωθεί η βλάβη ή πυροδοτούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) προκειμένου να εξαλειφθούν τα ανεπιθύμητα κύτταρα. Εκτός από τη γονιδιακή βλάβη την προκαλούμενη από ακτινοβολία ή χημικά

μεταλλαξιγόνα, ενεργοποίηση του p53 προκαλείται και από την υποξία. Η διαδικασία αυτή αντιπροσωπεύει ένα άλλο πιθανό μηχανισμό ογκοκαταστολής διότι καθώς αυξάνεται το μέγεθος του όγκου μέχρι ενός κριτικού ορίου, η αιματική προσφορά περιορίζεται και η επακόλουθη υποξία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω του p53. Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί επιπλέον τη μεταγραφή της θρομβοσπονδίνης, που αποτελεί αναστολέα της αγγειογένεσης, γεγονός που ελαττώνει περαιτέρω την αιματική προσφορά στα νεοπλασμάτα. Η αδρανοποίηση της λειτουργίας του φυσικού στελέχους του γονιδίου p53 αποτελεί γεγονός-κλειδί στη διαδικασία της ογκογένεσης.

Απώλεια ή μετάλλαξη του γονιδίου παρατηρείται σε περισσότερο από το ήμισυ των νεοπλασμάτων και αποτελεί τη συχνότερη γενετική ανωμαλία που παρατηρείται στον καρκίνο. Μετά τις πρώτες δημοσιεύσεις σύμφωνα με τις οποίες οι ανωμαλίες του γονιδίου p53 αφενός αποτελούν συχνό εύρημα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (97,98) και αφετέρου σχετίζονται με καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας και προχωρημένου σταδίου, δημιουργήθηκε η αισιοδοξία ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 θα μπορούσε να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση των ασθενών και την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία.

Ορισμένες μελέτες ανέδειξαν τη θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα εξέλιξης των επιφανειακών καρκινωμάτων (Tα και T1) καθώς και των καρκινωμάτων *in situ* (99-101). Άλλες μελέτες αναφέρουν τη χρησιμότητα της p53 πρωτεΐνης στην πρόβλεψη του χρόνου υποτροπής των επιφανειακών καρκινωμάτων (95) χωρίς, ωστόσο, το εύρημα αυτό να έχει ανεξάρτητη σημασία στην πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση.

Στη μυοδιηθητική νόσο, η έκφραση της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη επιβίωσης, τόσο σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί μόνο σε ριζική κυστεκτομή (102) όσο και σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία και ριζική χειρουργική θεραπεία (82). Άλλες ωστόσο μελέτες δεν έχουν επιβεβαιώσει την ανεξάρτητη σημασία των παραπάνω ευρημάτων με την πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (103).

2.7. Μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (Matrix metalloproteinases-MMPs) αποτελούν μια οικογένεια δομικά συγγενικών πρωτεολυτικών ενζύμων, ικανών να αποδομούν όλα τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Η οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνών περιλαμβάνει περί τα 17 μέλη τα οποία έχουν ταξινομηθεί περαιτέρω σε τέσσερις υποοικογένειες: α) Κολλαγενάσες (MMP-1, MMP-8, MMP-13) που αποδομούν το διάμεσο ινιδώδες κολλαγόνο, β) ζελατινάσες (MMP-2 και MMP-9) που αποδομούν μετουσιωμένα ινίδια κολλαγόνου καθώς και το κολλαγόνο τύπου IV των βασικών μεμβρανών, γ) στρωμελυσίνες (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-18) οι οποίες αποτελούν ένζυμα με ευρεία πρωτεολυτική ικανότητα και δ) μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεϊνάσες (Membrane-type MMPs 1-4).

Υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε ποικίλους τύπους καρκινωμάτων και έχει συνδεθεί με τη διαδικασία της καρκινικής διήθησης και μετάστασης. Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν κυρίως μελετηθεί οι ζελατινάσες (MMP-2 και MMP-9) των οποίων ο ρόλος θεωρήθηκε σημαντικός για τη διηθητική ικανότητα των ουροθηλιακών καρκινωμάτων. Σύμφωνα με τους Davies και συν. (104) τα επίπεδα των MMP-2 και MMP-9 είναι σημαντικά υψηλότερα στα διηθητικά και φτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα, σύμφωνα δε με τους Gohji και συν. (105) υψηλό κλάσμα της MMP-2 προς τον αναστολέα της (TIMP-2) στον ορό συνδέεται με την υποτροπή καρκινωμάτων που έχουν διηθήσει το μυϊκό τοίχωμα, εύρημα που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή ασθενών που θα λάβουν επικουρική θεραπεία μετά την κυστεκτομή. Από τις λοιπές οικογένειες των MMPs, έχουν επίσης μελετηθεί η MMP-1 και η MMP-3 εκ των οποίων η MMP-1 συσχετίστηκε με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας και τη διήθηση του μυϊκού τοιχώματος των ουροθηλιακών καρκινωμάτων (106).

2.8. Δείκτες αγγειογένεσης

Η αύξηση ενός όγκου πέρα ενός συγκεκριμένου πολύ μικρού μεγέθους εξαρτάται από το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (νεοαγγείωση)

απαραίτητων για την κάλυψη, των αναγκών των κυττάρων σε οξυγόνο. Η αγγείωση αυτού του τύπου (νεοαγγείωση) εφοδιάζει επιπλέον τον όγκο με το μηχανισμό της μεταστατικής διασποράς. Η αγγειογενετική δραστηριότητα ενός όγκου είναι δυνατόν να εκτιμηθεί με προσδιορισμό της πυκνότητας των νεοσχηματισθέντων αγγείων, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναδεικνύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα σημαντικότερα από τα αντισώματα αυτά είναι το αντίσωμα έναντι του παράγοντα VIII ή τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD31 και CD34.

Τα ως σήμερα δεδομένα συνηγορούν ότι ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της αγγειογενετικής δραστηριότητας αποτελεί σημαντικό ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στο διηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (107). Οι Jaeger και συν. παρατήρησαν μια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην πυκνότητα των μικροαγγείων και στις λεμφαδενικές μεταστάσεις ασθενών με διηθητικό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης (108) ενώ οι Dickinson και συν. (109) έδειξαν ότι η πυκνότητα των μικροαγγείων αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης, οι ασθενείς δε με αυξημένη πυκνότητα μικροαγγείων παρουσίασαν 2,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου απ'ότι οι ασθενείς με χαμηλή πυκνότητα. Ομοίως, οι Stein και συν. έδειξαν ότι η πυκνότητα των μικροαγγείων συσχετίζεται σημαντικά με την ελευθέρα υποτροπών και την ολική επιβίωση των ασθενών με διηθητικά καρκινώματα (110).

Τα ευρήματα αυτά αν και χρήζουν περαιτέρω επιβεβαίωσης σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών, υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με διηθητική νόσο και αυξημένη αγγειογενετική δραστηριότητα θα ωφελούνται από επιθετικότερη αντιμετώπιση η οποία θα περιλαμβάνει χημειοθεραπεία μετά την κυστεκτομή. Επιπλέον, θα πρέπει μελλοντικά να καθοριστεί η σημασία της αγγειογένεσης στα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα και η πιθανή συσχέτιση αυτής με την υποτροπή ή την εξέλιξη των επιφανειακών καρκινωμάτων.

ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Το κακόηθες νεόπλασμα είναι ένας πληθυσμός κυττάρων του ξενιστή που έχουν χάσει την ικανότητα ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και γι' αυτό πολλαπλασιάζονται διαρκώς, αυξάνοντας το μέγεθος του νεοπλασματος. Παρόλο που είναι πολλά τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχουν και ορισμένες ομοιότητες μεταξύ τους.

Μια σημαντική ομοιότητα είναι ότι και οι δύο τύποι κυτταρικών πληθυσμών χρειάζονται επαρκή προμήθεια οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών, καθώς και έναν αποτελεσματικό τρόπο απομάκρυνσης των παραπροϊόντων του μεταβολισμού τους, προκειμένου να επιβιώσουν. Η παρουσία του αγγειακού δικτύου εκπληρώνει τις παραπάνω απαιτήσεις γι' αυτό και τα κύτταρα των θηλαστικών βρίσκονται πάντοτε σε μια απόσταση 100-200μm από τα αιμοφόρα αγγεία, το όριο διάχυσης για το O₂. Προκειμένου ένας πληθυσμός κυττάρων να αυξηθεί περισσότερο σε μέγεθος θα πρέπει να φτιάξει καινούργια αγγεία με τη διαδικασία της αγγειογένεσης.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της επούλωσης τραύματος και του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η ρύθμισή της ωστόσο διαταράσσεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και ο καρκίνος (111).

Το τελικό στάδιο στην ανάπτυξη ενός όγκου είναι η **μετάσταση**. Η νεοαγγείωση του πρωτοπαθούς όγκου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, καταλήγει στο σχηματισμό ανώριμων αγγείων, υψηλής διαπερατότητας, με λίγη ή καθόλου BM και λιγότερες διακυτταρικές συνάψεις σε σχέση με τα φυσιολογικά αγγεία, αυξάνοντας την πιθανότητα εισόδου των νεοπλασματικών κυττάρων στην κυκλοφορία και διασποράς τους σε άλλα όργανα. Επιπρόσθετα, η αγγειογένεση είναι απαραίτητη και για την ανάπτυξη των μεταστατικών εστιών στα απομακρυσμένα όργανα (112). Η συσχέτιση μεταξύ αγγειογένεσης και μετάστασης φαίνεται καθαρά στα πειράματα χορήγησης αναστολέων της αγγειογένεσης σε πειραματόζωα που φέρουν

κάποιο πρωτοπαθή όγκο. Η μείωση της αγγείωσης του πρωτοπαθούς όγκου σχετίζεται με τη μειωμένη εμφάνιση μεταστάσεων (113). Επίσης, υπάρχουν πολλές εργασίες στις οποίες η πυκνότητα των αγγείων στους όγκους, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, έχει συσχετιστεί με τη μετάσταση του καρκίνου και την πρόγνωση της νόσου, υποδηλώνοντας την αξία της αγγειογένεσης ως δείκτη του μεταστατικού δυναμικού του καρκίνου (114).

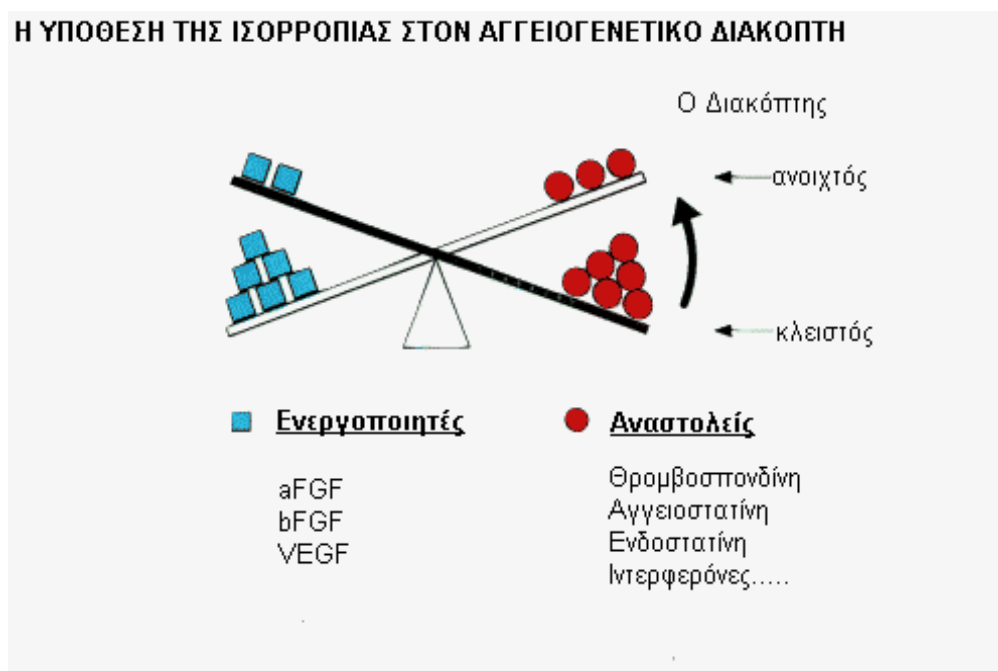
Εκτός από την αιματογενή υπάρχει και η λεμφογενής διασπορά των καρκινικών κυττάρων και μάλιστα υπάρχουν κλινικές και παθολογοανατομικές παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι για πολλά καρκινώματα η μεταφορά μέσω των λεμφαγγείων είναι η πιο κοινή οδός αρχικής διασποράς των νεοπλασματικών κυττάρων (115).

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΔΙΑΚΟΠΤΗΣ

Η παρατήρηση ότι γύρω από τους όγκους λαμβάνει χώρα αγγειογένεση έγινε πριν από 100 χρόνια περίπου (116), ενώ η υπόθεση ότι οι όγκοι παράγουν μια «αγγειογενετική ουσία» διατυπώθηκε το 1968 (117). Το 1971 ο Folkman εξέφρασε την άποψη ότι η ανάπτυξη του όγκου και η μετάσταση είναι διαδικασίες που εξαρτώνται από την αγγειογένεση, η αναστολή της οποίας θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου, πιθανότητα που έστρεψε το ενδιαφέρον της έρευνας στην ανακάλυψη αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων (118).

Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτή η ύπαρξη ενός αγγειογενετικού «διακόπτη» που θεωρείται ανοιχτός (on) όταν η ισορροπία μεταξύ των αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων κλίνει στους αγγειογενετικούς παράγοντες και κλειστός (off) όταν η επίδραση των αγγειογενετικών παραγόντων αντισταθμίζεται από τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες (119) (**Εικόνα 20**). Τα αγγειογενετικά και αντιαγγειογενετικά μόρια μπορεί να προέρχονται από τα καρκινικά, ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα ή την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ΕΘΟ) (120). Έχουν ανακαληφθεί διάφοροι παράγοντες που μπορούν να θέσουν σε λειτουργία το διακόπτη όπως είναι το μεταβολικό στρες (π.χ. χαμηλό PO₂, χαμηλό PH, υπογλυκαιμία), το μηχανικό στρες (π.χ. η πίεση που ασκείται από τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται), η ανοσολογική ή φλεγμονώδης αντίδραση (π.χ. τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν τον ιστό) καθώς και μεταλλάξεις οι οποίες

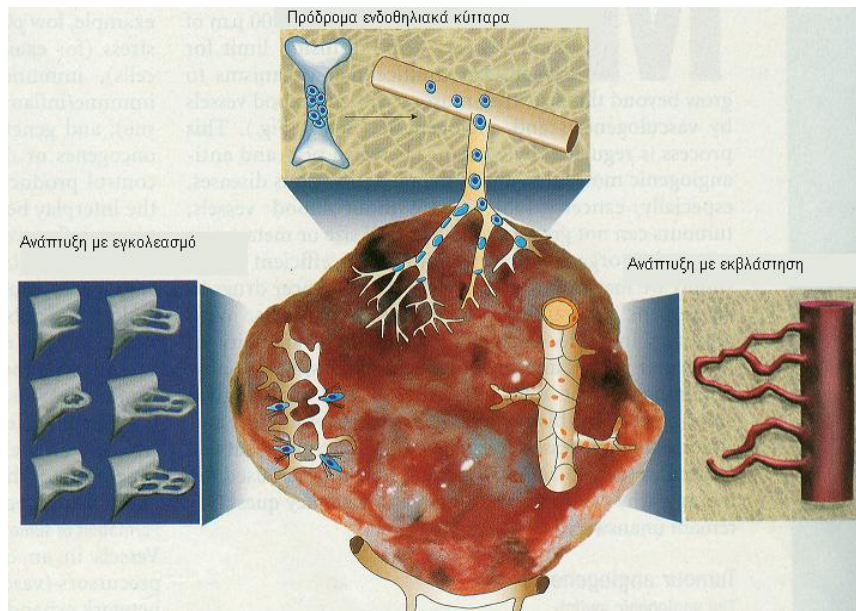
προκαλούν ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή ρυθμιστών της αγγειογένεσης. Στη φυσιολογική αλλά και στην παθολογική αγγειογένεση η υποξία φαίνεται ότι είναι το κυριότερο εναρκτήριο ερέθισμα. Η υποξία επάγει την έκφραση του παράγοντα HIF-1α, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του VEGF, του σημαντικότερου αγγειογενετικού παράγοντα και των υποδοχέων του (121).



Εικόνα 20: Σήμερα υποστηρίζεται η ύπαρξη ενός αγγειογενετικού διακόπτη που θεωρείται ανοιχτός όταν η ισορροπία μεταξύ των αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων κλίνει προς τους αγγειογενετικούς παράγοντες (ενεργοποιητές) και κλειστός, όταν η επίδραση των αγγειογενετικών παραγόντων αντισταθμίζεται από τους αντιαγγειογενετικούς παράγοντες. (122)

1. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Τα αιμοφόρα αγγεία στο έμβρυο σχηματίζονται με τη διαδικασία της *insitu* διαφοροποίησης, πρόδρομων αδιαφοροποίητων κυττάρων, των αγγειοβλαστών, σε ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ένα πρωτόγονο αγγειακό δίκτυο μέσα σ' έναν ανάγγειο ιστό. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται εμβρυϊκή ή αναπτυξιακή αγγειογένεση (122). Εκτός εμβρυογένεσης, στον ενήλικα, ο όρος αγγειογένεση ή νεοαγγειογένεση χρησιμοποιείται για να δηλώσει την αύξηση και αναδιάπλαση ενός ήδη υπάρχοντος αγγειακού δικτύου σε ένα πιο πολύπλοκο δίκτυο. Η διαδικασία περιλαμβάνει σε πρώτη φάση τη διεύρυνση των μετατριχοειδικών φλεβιδίων τα οποία στη συνέχεια, είτε βλασάνουν σχηματίζοντας νέους αγγειακούς κλάδους, είτε διαιρούνται σε νέα τριχοειδή με τη βοήθεια δοκίδων από περιενδοθηλιακά κύτταρα που εισέρχονται στον αυλό τους (εγκολεασμός) (122)



Εικόνα 21: Κυτταρικός μηχανισμός αγγειογένεσης στο νεόπλασμα. Τα αγγεία στον όγκο αναπτύσσονται με διάφορους μηχανισμούς: α) Το αγγειακό δίκτυο του ξενιστή επεκτείνεται σχηματίζοντας εκβλαστήσεις (ανάπτυξη με εκβλάστηση), β) Τα προϋπάρχοντα αγγεία αναδιαπλάθονται και επεκτείνονται

διαιρούμενα από περιενδοθηλιακά κύτταρα που εισέρχονται στον αυλό τους και τα διαχωρίζουν σε νέα τριχοειδή (ανάπτυξη με εγκολεασμό), γ) Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (αγγειοβλάστες), προερχόμενα από το μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα, εισέρχονται στους όγκους και συμβάλλουν στην αγγειογένεση. *CarmelietandJain, 2000 (121)*

Κατ'αναλογία των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω για την αγγειογένεση στον ενήλικα, ο όγκος θεωρείται ότι αρχικά αποτελεί μια ανάγγειο μάζα η οποία αποκτά αγγεία αργότερα, βάσει των ήδη υπαρχόντων του ξενιστή, με τους μηχανισμούς της εκβλάστησης ή του εγκολεασμού (121). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι κυκλοφορούντα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από το τοίχωμα των αγγείων ή το μυελό των οστών, μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην νεοαγγειογένεση (123) (**Εικόνα 21**). Πρόσφατα επίσης διατυπώθηκε η άποψη ότι στην αγγειογένεση που λαμβάνει χώρα στον καρκίνο, εκτός από τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, στρατολογούνται και προγονικές μορφές άλλων κυτταρικών σειρών του μυελού των οστών όπως για παράδειγμα της αιμοποιητικής (124), ενώ έχει ακόμα παρατηρηθεί ότι ορισμένοι τύποι κακοήθων κυττάρων δυνατόν να σχηματίζουν σωληνώδεις σχηματισμούς τύπου αγγείων, ανεξάρτητα από το ενδοθήλιο (125).

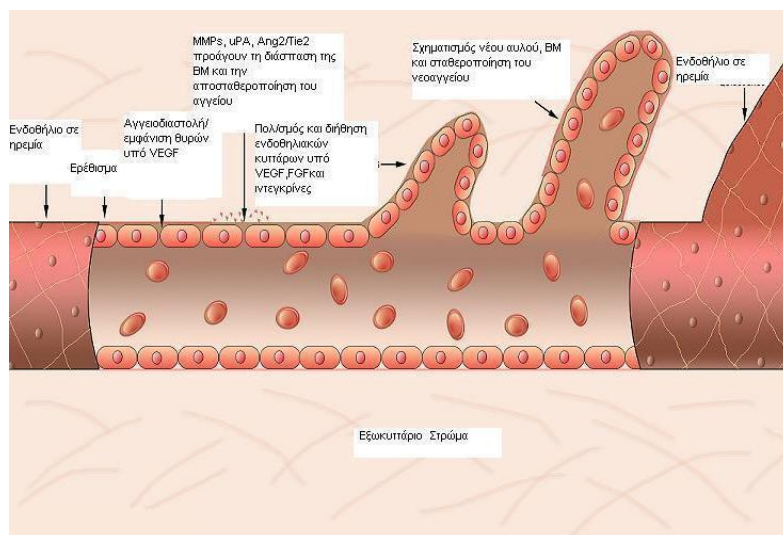
Παρόλο που η κυριαρχούσα άποψη είναι αυτή της ανάπτυξης του όγκου ως ανάγγειας μάζας, πρόσφατα διατυπώθηκε η θεωρία ότι μερικοί όγκοι και ειδικότερα οι μεταστατικές εστίες εγκαθίστανται και αναπτύσσονται γύρω από κάποιο αγγείο του ξενιστή, σαν περιαγγειακό κάλυμμα, με αποτέλεσμα να αποτελούν εξ' αρχής, καλά αγγειούμενες μάζες. Σε δεύτερο χρόνο, υποστηρίζεται ότι τα αγγεία του ξενιστή, σε μια προσπάθεια να αμυνθούν έναντι του καρκίνου, υποχωρούν, με αποτέλεσμα ο όγκος να μετατρέπεται σε μια ανάγγειο, υποξική μάζα που θα καταφέρει να επιβιώσει μόνο εφόσον πραγματοποιήσει νεοαγγειογένεση (126).

Στα ώριμα (μη αυξανόμενα) τριχοειδή το τοίχωμα του αγγείου αποτελείται από μια σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων που έρχονται σε άμεση επαφή με το αίμα και υπενδοθηλιακά περικύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες, ΒΜ και ΕΘΟ. Τα λεία μυϊκά κύτταρα διαχωρίζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα με ΒΜ και έτσι δε βρίσκονται σε άμεση επαφή με αυτά.

Αντίθετα, τα περικύτταρα μοιράζονται τη ΒΜ με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και έρχονται σε άμεση επαφή με αυτά μέσω οπών της ΒΜ (127).

Σχηματικά στην αγγειογένεση διακρίνουμε τη φάση ενεργοποίησης και τη λύση. Η φάση ενεργοποίησης περιλαμβάνει (122) (**Εικόνα 22**):

- α) Την απομάκρυνση των περικυττάρων από το ενδοθήλιο και την αποσταθεροποίηση του αγγείου.
- β) Την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, με αποτέλεσμα την εξαγγείωση και εναπόθεση ινικής, η οποία θεωρείται ότι δρα ως ικρίωμα για τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- γ) Τη διάσπαση της ΒΜ των ήδη υπάρχοντων αγγείων προκειμένου τα ενδοθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν και να διηθήσουν την ΕΘΟ. Έτσι, ορισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα «αρχηγόι» μεταναστεύουν διαμέσου του στρώματος που έχει υποστεί πρωτεόλυση.
- δ) Τον πολλαπλασιασμό των προϋπαρχόντων ενδοθηλιακών κυττάρων που ακολουθούν τα κύτταρα «αρχηγούς». Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες, ορισμένοι από τους οποίους είναι προϊόντα διάσπασης της ΕΘΟ.
- ε) Τέλος, ακολουθεί ο σχηματισμός του αυλού του νεοαγγείου.



Εικόνα 22: Τα διαδοχικά στάδια της αγγειογένεσης στο νεόπλασμα
(www.angioworld.com)

Στη φάση της λύσης αντίθετα, περιλαμβάνεται η αναστολή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, η ανασύσταση της BM καθώς επίσης και η ωρίμανση των νέων αγγείων με τη συνοδό επένδυση του τοιχώματός τους με λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα. Ακολουθεί η ροή αίματος μέσα από τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία (122).

Από τα ανωτέρω καταλαβαίνουμε ότι ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν μόνο τους να ξεκινήσουν την αγγειογένεση, δεν μπορούν και να την ολοκληρώσουν. Τα νεοσχηματιζόμενα τριχοειδικά βλατήματα είναι εύθραυστα και παραμένουν ευάλωτα στην αναδιάπλαση για όσο χρόνο δεν περιβάλλονται από τις απαραίτητες περιαγγειακές δομές. Η ωρίμανση των νέων αγγείων σε σταθερά και λειτουργικά αγγεία απαιτεί το σχηματισμό BM και τη στρατολόγηση περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων για να καλύψουν τη μεμβράνη του αγγείου (128).

Τα λεία μυϊκά κύτταρα παρέχουν δομική στήριξη στα μεγαλύτερα αγγεία, προστατεύοντάς τα από τη ρήξη, ενώ συγχρόνως ρυθμίζουν τη ροή του αίματος και την πίεση λόγω της ικανότητας συστολής που τους προσδίδουν (129). Τα περικύτταρα συμβάλλουν στην ωρίμανση των νεοαγγείων αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγοντας τη σύνθεση εξωκυτταρίου στρώματος (128). Τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μπορεί να προέρχονται από μεσέγχυματιά κύτταρα με *insitu* διαφοροποίηση, από ενδοθηλιακά κύτταρα με *trans* διαφοροποίηση είτε τέλος από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών ή μακροφάγα. Όπως και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν παράλληλα με την ανάπτυξη του αγγειακού πλέγματος (122).

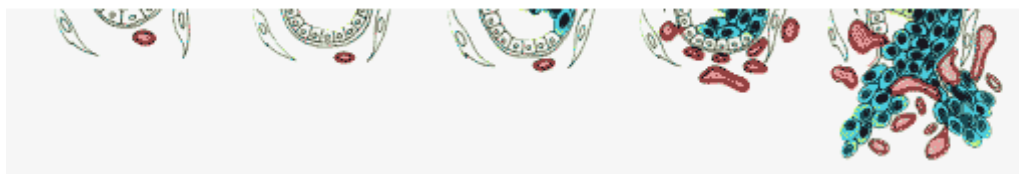
Το μοντέλο επομένως που έχει επικρατήσει ως προς τη συμμετοχή της αγγειογένεσης στην αύξηση των όγκων είναι το εξής: Θεωρείται ότι οι όγκοι αναπτύσσονται αρχικά ως ανάγγειες μάζες από τη γρήγορη διαίρεση ενός καρκινικού κυττάρου. Καθώς η μάζα των κυττάρων αυξάνει, τα κύτταρα απομακρύνονται όλο και περισσότερο από το κοντινότερο τριχοειδές. Τελικά, το ογκίδιο σταματά να αναπτύσσεται έχοντας φτάσει σε μια σταθερή κατάσταση στην οποία ο αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων εξισορροπείται από τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν λόγω υποξίας και έλλειψης

θρεπτικών ουσιών. Αν δεν σχηματιστούν καινούργια αγγεία οι κακοήθεις κλώνοι παραμένουν σιωπηροί και μη ανιχνεύσιμοι για πολλά χρόνια ως ανάγγειες μάζες διαμέτρου 1-2mm, μέγεθος στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα προμηθεύονται το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξή τους με απλή, παθητική διάχυση. Κάποια στιγμή ο κακοήθης κλώνος μπορεί να αποκτήσει αγγειογενετικό φαινότυπο και να αρχίσει να σχηματίζει καινούργια αγγεία, με αποτέλεσμα την περαιτέρω ανάπτυξή του (119) (**Εικόνα 23**).

ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Τα αγγεία των όγκων είναι δομικά και λειτουργικά διαταραγμένα. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά αγγεία, είναι αποδιοργανωμένα, ελικοειδή και διασταλμένα, με ανομοιογενή διάμετρο και εκτεταμένες διακαλαδώσεις και αναστομώσεις (130). Κατά συνέπεια, η ροή αίματος στον όγκο είναι χαοτική και ανομοιογενής με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποξικών περιοχών μέσα σ' αυτόν. Οι παραπάνω συνθήκες μειώνουν την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών μέσων και ασκούν πίεση ώστε να επιλέγεται η επιβίωση κυττάρων με κακοηθέστερο φαινότυπο και υψηλό μεταστατικό δυναμικό.

Επιπλέον, τα αγγεία του όγκου παρουσιάζουν αυξημένη διαπερατότητα σαν αποτέλεσμα της ύπαρξης πολλαπλών θυρίδων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και ασυνεχειών στη ΒΜ. Η χαώδης οργάνωση του αγγειακού δικτύου των όγκων δυνατόν να οφείλεται στην έλλειψη αυστηρής ρύθμισης στην έκφραση των αγγειογενετικών μορίων ή ακόμα στην έλλειψη των προστατευτικών μηχανισμών των φυσιολογικών αγγείων, π.χ. των περιαγγειακών κυττάρων που προστατεύουν τα αγγεία από τις αλλαγές της μερικής τάσης του οξυγόνου (PO_2) (130).



Εικόνα 23: Το κακόηθες νεόπλασμα αναπτύσσεται αρχικά ως ανάγγειος μάζα από τη γρήγορη διαίρεση ενός καρκινικού κυττάρου. Αν δεν σχηματιστούν καινούργια αγγεία, ο κακοήθης κλώνος δυνατόν να παραμείνει σιωπηρός και μη ανιχνεύσιμος για πολλά χρόνια ως ανάγγειος μάζα μεγέθους 2-3mm³. Κάποια στιγμή ο κακοήθης κλώνος μπορεί να αποκτήσει αγγειογενετικό φαινότυπο και να αρχίσει να σχηματίζει καινούργια αγγεία, με αποτέλεσμα την περαιτέρω διηθητική ανάπτυξη και πιθανή μετάστασή του [cis:ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα ή καρκίνωμα insitu] (www.serom.gr).

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

Το τελικό στάδιο στην ανάπτυξη ενός όγκου είναι η μετάσταση. Η νεοαγγείωση του πρωτοπαθούς όγκου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, καταλήγει στο σχηματισμό ανώριμων αγγείων, υψηλής διαπερατότητας, με λίγη ή καθόλου ΒΜ και λιγότερες διακυτταρικές συνάψεις σε σχέση με τα φυσιολογικά αγγεία, αυξάνοντας την πιθανότητα εισόδου των νεοπλασματικών κυττάρων στην κυκλοφορία και διασποράς τους σε άλλα όργανα. Επιπρόσθετα, η αγγειογένεση είναι απαραίτητη και για την ανάπτυξη των μεταστατικών εστιών στα απομακρυσμένα όργανα (112). Η συσχέτιση μεταξύ αγγειογένεσης και μετάστασης φαίνεται καθαρά στα πειράματα χορήγησης αναστολέων της αγγειογένεσης σε πειραματόζωα που φέρουν κάποιο πρωτοπαθή όγκο. Η μείωση της αγγείωσης του πρωτοπαθούς όγκου σχετίζεται με τη μειωμένη εμφάνιση μεταστάσεων (113) (114).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΟΓΚΟ

Για την ανάπτυξη νέων αγγείων στον όγκο συνεργάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα, αγγειογενετικοί και αντιαγγειογενετικοί παράγοντες, μερικοί από τους οποίους εμπλέκονται και στη φυσιολογική αγγειογένεση.

Πρωτεολυτικά ένζυμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, προκειμένου να σχηματιστούν νέα αγγεία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των προϋπαρχόντων αγγείων πρέπει να διασπάσουν τη ΒΜ και να διηθήσουν το στρώμα του γειτονικού ιστού. Οι διαδικασίες αυτές απαιτούν τη συνεργιστική δράση δύο μεγάλων ομάδων πρωτεολυτικών ενζύμων, του συστήματος ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (uPA) και των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (MMPs) και των αναστολέων τους τα οποία θα περιγραφούν αναλυτικότερα σε επόμενο κεφάλαιο.

Αγγειογενετικοί παράγοντες

Οι σημαντικότεροι από τους αγγειογενετικούς παράγοντες που έχουν αναγνωριστεί είναι: Οι αυξητικοί παράγοντες του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) και οι υποδοχείς τους, οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (aFGF, bFGF), οι αγγειοποιητίνες (Ang) με τους υποδοχείς τους και η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) (131). Στο ρόλο του VEGF και των υποδοχέων του στην αγγειογένεση θα αναφερθούμε αναλυτικά στα επόμενα κεφάλαια.

Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί περισσότεροι από 40 ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης που μπορούν να διαιρεθούν σε 5 ομάδες: Τις ιντερφερόνες, τις ιντερλευκίνες, τα πρωτεολυτικά θραύσματα, τη θρομβοσπονδίνη και τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs) (131).

ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

Εκτός από την αιματογενή υπάρχει και η λεμφογενής διασπορά των καρκινικών κυττάρων και μάλιστα υπάρχουν κλινικές και παθολογοανατομικές παρατηρήσεις που υποστηρίζουν ότι για πολλά καρκινώματα η μεταφορά μέσω των λεμφαγγείων είναι η πιο κοινή οδός αρχικής διασποράς των νεοπλασματικών κυττάρων (115).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗΣ

Τα λεμφικά και αιμοφόρα τριχοειδή διαφέρουν μορφολογικά σε πολλά σημεία. Σε σχέση με τα αιμοφόρα αγγεία, το τοίχωμα των λεμφαγγείων είναι λεπτότερο, πιθανόν λόγω της ύπαρξης λιγοστού κυτταροπλάσματος στα ενδοθηλιακά τους κύτταρα. Τα λεμφικά, όπως και τα αιμοφόρα τριχοειδή, επενδύονται από μια μονή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, όμως το ενδοθήλιο των λεμφαγγείων περιέχει λιγότερες στενές συνάψεις και συχνά, μεγάλα διενδοθηλιακά διαστήματα στα οποία μπορεί να οφείλεται και η μεγαλύτερη διαπερατότητά τους. Επίσης, τα λεμφικά τριχοειδή έχουν ασυνεχή ΒΜ και δε διαθέτουν περικύτταρα, ενώ συνδέονται με το εξωκυττάριο στρώμα μέσω δικτυωτών ινών και κολλαγόνου.

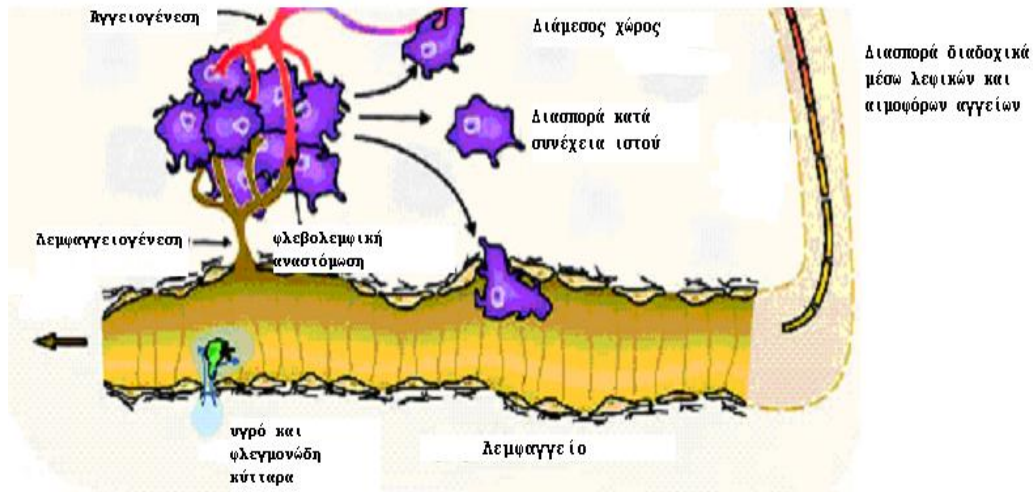
Όταν αυξάνει η πίεση του διάμεσου υγρού, οι συνδετικές ίνες τεντώνονται και ανοίγουν τον αυλό των λεμφαγγείων. Καθώς ο αυλός ανοίγει, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που υπό φυσιολογικές συνθήκες αλληλοεπικαλύπτονται, διαχωρίζονται και ανοίγουν διακυτταρικά κανάλια προκειμένου να εισέλθουν τα μακρομόρια. Τέλος, συγκρινόμενα με τα αιμοφόρα, τα λεμφικά τριχοειδή δίνουν λιγότερες εκβλαστήσεις, αναστομώνονται σπανιότερα και εμφανίζουν πολύ μικρότερη τάση συστολής και αλλαγών στη μορφή και το μέγεθος (115) (**Εικόνα 24**).

Η οδός που ακολουθούν τα καρκινικά κύτταρα για να καταλήξουν στους επιχώριους λεμφαδένες είναι πιθανόν η ίδια σε όλα τα σπονδυλωτά. Τα καρκινικά κύτταρα, αφού διαφύγουν από την κύρια μάζα του όγκου, διηθούν το εξωκυττάριο στρώμα όπου η πίεση του διάμεσου υγρού είναι μικρότερη απ' ό,τι μέσα στον όγκο και όπου η διαφορά στην υδροστατική πίεση οδηγεί σ' ένα «ρεύμα υγρού» που μπορεί να μεταφέρει τα κύτταρα προς τα

περινεοπλασματικά λεμφικά τριχοειδή. Όταν τα καρκινικά κύτταρα φτάσουν στα λεμφικά τριχοειδή μετακινούνται κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας του ενδοθηλίου, καθοδηγούμενα από λεπτές πρωτοπλασματικές αποφυάδες. Τα κύτταρα εισέρχονται στον αυλό μέσω των ευρέων διενδοθηλιακών διαστημάτων των λεμφαγγείων (132).

Σε αντίθεση με το αιμοφόρο αγγειακό δίκτυο που σχηματίζει μια κλειστή συνεχή αγκύλη, τα λεμφαγγεία λειτουργούν σαν ένα σύστημα μεταφοράς μονής κατεύθυνσης για υγρά, πρωτεΐνες, σωματίδια και κύτταρα. Τα αρχικά και τελικά λεμφαγγεία είναι τυφλά, κατάλληλα για την πρόσληψη υγρού, σωματιδίων και κυττάρων, τα οποία μεταφέρουν πίσω στη συστηματική κυκλοφορία. Από τα λεμφικά τριχοειδή το υγρό μεταφέρεται στα collecting λεμφαγγεία τα οποία, μέσω του λείου μυϊκού τοιχώματος από το οποίο περιβάλλονται, αντλούν τη λέμφο ρυθμικά ενώ οι βαλβίδες που διαθέτουν κατά κανονικά διαστήματα εμποδίζουν τη ροή της λέμφου προς τα πίσω. Η λέμφος καταλήγει στη φλεβική κυκλοφορία μέσω του θωρακικού πόρου (387) **(Εικόνα 24)**.

Οι φρουροί λεμφαδένες είναι μια μικρή ομάδα λεμφαδένων που θεωρείται ότι είναι οι πρώτοι που αποχετεύουν τη λέμφο μιας συγκεκριμένης περιοχής, ειδικά για το μελάνωμα και τον καρκίνο του μαστού (138). Σαν γενικός κανόνας ισχύει ότι τα καρκινώματα μεθίστανται πρώτα σ' αυτούς τους λεμφαδένες, παρόλο που τα κακοήθη κύτταρα που βρίσκονται στα λεμφαγγεία μπορούν να περάσουν απευθείας στην συστηματική κυκλοφορία μέσω φλεβολεμφικών αναστομών εντός της νεοπλασματικής μάζας και το αντίστροφο (115) **(Εικόνα 24)**.



Εικόνα 24: Δομή των λεμφαγγείων και πιθανοί τρόποι διασποράς των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα εγκαταλείπουν τον πρωτοπαθή όγκο και διασπείρονται στον περιβάλλοντα ιστό όπου τελικά διηθούν προϋπάρχοντα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία. Εναλλακτικά, η διασπορά γίνεται μέσω των νέων αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων που σχηματίζονται με τις διαδικασίες της λεμφ/αγγειογένεσης. Τα κύτταρα που διηθούν τα λεμφαγγεία καταλήγουν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του θωρακικού πόρου ή των αναστομώσεων, που υποτίθεται ότι υπάρχουν στους όγκους, μεταξύ αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων. Stacker et al., 2002 (132).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η λεμφαγγειογένεση, δηλαδή η ανάπτυξη καινούργιων λεμφαγγείων, λαμβάνει χώρα στο έμβρυο αλλά και στον ενήλικα σε καταστάσεις όπως η επούλωση τραύματος, η φλεγμονή, οι παρασιτικές λοιμώξεις και ο καρκίνος (132).

Στο έμβρυο τα λεμφαγγεία αναπτύσσονται περί το μέσον της εμβρυϊκής περιόδου παράλληλα, αλλά σε δεύτερο χρόνο, σε σχέση με την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων (133). Η προέλευση των λεμφαγγείων είναι θέμα αμφιλεγόμενο. Παραδοσιακά, η πιο διαδεδομένη και αποδεκτή άποψη είναι

αυτή της Sabin η οποία υποστήριξε ότι κατά την πρώιμη εμβρυϊκή περίοδο, οι πρωτόγονοι λεμφικοί σάκοι προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των εμβρυϊκών φλεβών. Σύμφωνα με το μοντέλο της Sabin, το περιφερικό λεμφικό σύστημα εξαπλώνεται από τους πρωτόγονους λεμφικούς σάκους στους γύρω ιστούς και τα όργανα, όπου σχηματίζονται τοπικά λεμφικά τριχοειδή (φυγόκεντρος θεωρία) (134).

Ένα εναλλακτικό μοντέλο προτείνει ότι το λεμφικό σύστημα προέρχεται από πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα των περιφερικών ιστών (λεμφαγγειοβλάστες), ανεξάρτητα από τις φλέβες, και αναπτύσσει δευτερογενώς συνδέσεις με το φλεβικό δίκτυο προκειμένου να σχηματίσει την φλεβολεμφική αγκύλη (κεντρομόλος θεωρία) (135). Θα μπορούσε βέβαια να υποθέσει κανείς ότι ισχύει ο συνδυασμός των δύο μηχανισμών όπου τα φυγόκεντρα εκτεινόμενα βλαστήματα των λεμφαγγείων αναστομώνονται με τα λεμφαγγεία που προέρχονται από τους ιστικούς λεμφαγγειοβλάστες (136). Πρόσφατα, ερευνητές τυποποίησαν ορισμένους δείκτες ειδικούς για τα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία (**Πίνακας 1**).

Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα διαπιστώθηκε η έκφραση ενός ειδικού για τα λεμφαγγεία γονιδιακού προϊόντος, όπως για παράδειγμα του VEGFR-3, στα μετέπειτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης υποδηλώνοντας ότι η διαφοροποίηση του λεμφαγγειακού δικτύου αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία. Η αλληλεπικάλυψη δε των μοριακών δεικτών που εκφράζονται σε αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία υποστηρίζει τη στενή δομική και αναπτυξιακή σχέση μεταξύ των δύο συστημάτων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι Oliver και συν. υποστηρίζουν ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης η έκφραση ενός αριθμού επιπρόσθετων γονιδίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων δυνατόν να καταλήγει στην εμφάνιση του λεμφαγγειακού φαινότυπου και προτείνουν ένα μοντέλο τεσσάρων σταδίων για την ανάπτυξη του λεμφαγγειακού δικτύου στα θηλαστικά (133):

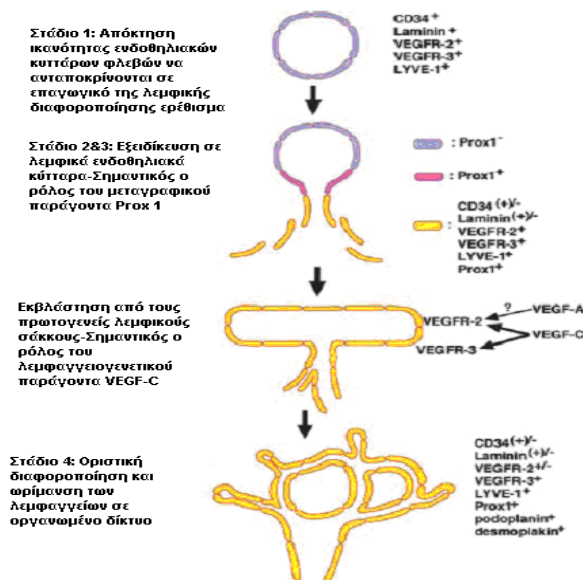
α) Το στάδιο της απόκτησης της ικανότητας διαφοροποίησης προς το λεμφικό ενδοθηλιακό κύτταρο. Πρόκειται για την απόκτηση της αυτόνομης ικανότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων των φλεβών να ανταποκρίνονται σε κάποιο ειδικό, επαγωγικό της λεμφικής διαφοροποίησης σήμα. Αυτό το στάδιο μπορεί να χαρακτηρίζεται, για παράδειγμα, από την εμφάνιση κάποιου υποδοχέα ή τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης ορισμένων μεταγραφικών

παραγόντων. Πρόκειται για μια ενεργητική διαδικασία που αφορά μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των φλεβών αφού τα αντίστοιχα κύτταρα των αρτηριών δεν ανταποκρίνονται, ακόμα και αν εκτεθούν, στο επαγωγικό σήμα.

β) Ένα δεύτερο, ενδιάμεσο στάδιο κατά το οποίο τα φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα προσεγγίζουν φαινοτυπικά ακόμα περισσότερο το λεμφικό κύτταρο χωρίς, ωστόσο, να εκτίθενται σε κάποιο επαγωγικό σήμα. Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Prox-1 θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο στάδιο αυτό.

γ) Το στάδιο της εξειδίκευσης σε λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα συμβαίνει όταν τα «ελαφρώς διαφοροποιημένα» φλεβικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα ανεξάρτητα από τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Αυτό σημαίνει, για παράδειγμα, ότι η πρόσθια κύρια φλέβα θα δώσει λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα ακόμα κι αν μεταμοσχευθεί σε διαφορετική από τη φυσιολογική ανατομική της θέση στο έμβryo.

δ) Τέλος, ακολουθεί η οριστική διαφοροποίηση και ωρίμανση των λεμφαγγείων στο γνωστό μας δίκτυο (137) (**Εικόνα 25**).

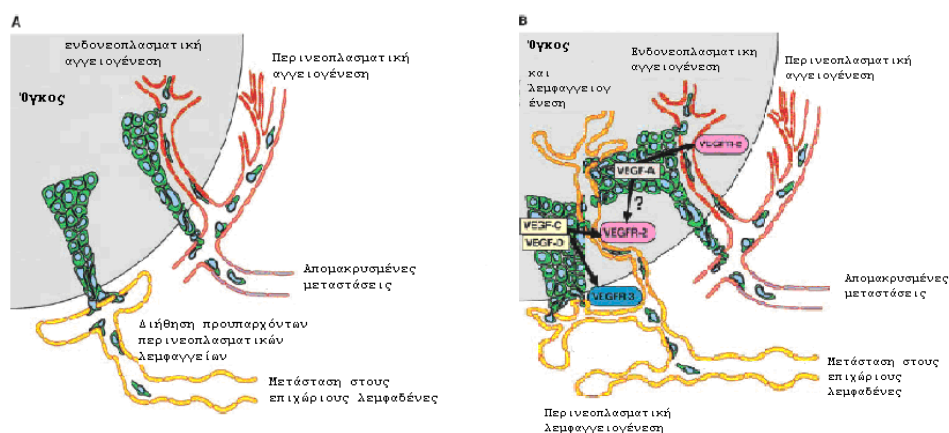


Εικόνα 25: Το υποθετικό μοντέλο των τεσσάρων σταδίων για το σχηματισμό των λεμφαγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. DetmarandHirakawa, 2002 (3940).

Στον ενήλικα, ο όρος λεμφαγγειογένεση αναφέρεται ως επί το πλείστον στην ανάπτυξη καινούργιων λεμφαγγείων, με εκβλάστηση, από τα αγγεία του ξενιστή (132). Η αγγειακή αναδιάπλαση που αφορά στην αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση είναι πιθανό ότι περιλαμβάνει παρόμοιες διαδικασίες. Έτσι, κατά την επούλωση των τραυμάτων τα λεμφικά τριχοειδή εκτείνονται ως βλαστήματα από προϋπάρχοντα λεμφαγγεία, ως επί το πλείστον με τον ίδιο τρόπο που τα αιμοφόρα τριχοειδή βλαστάνουν από προϋπάρχοντα μετατριχοειδικά φλεβίδια κατά την αγγειογένεση. Η εμφάνιση, ωστόσο, των νέων λεμφαγγείων έπεται πάντα εκείνης των αιμοφόρων τριχοειδών, διότι η αναπαραγωγή τους είναι πιο αργή διαδικασία (137). Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ότι παρόλο που μετά τη βλάβη των λεμφαγγείων κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων αναπτύσσεται προσωρικά λεμφοίδημα, αυτό υποχωρεί συνήθως αυτόματα λόγω αναγέννησης ή επανασύνδεσης των εκτομηθέντων λεμφαγγείων. Έντονη, τέλος, αύξηση των λεμφαγγείων έχει αναφερθεί και σε οξείες και χρόνιες φλεγμονές εκτός της διαδικασίας επούλωσης τραύματος, όπου τα νεοσχηματιζόμενα λεμφαγγεία υποστρέφουν μετά τη λύση της φλεγμονής (138).

Σε αντίθεση με το βάθος των γνώσεων που διαθέτουμε σήμερα για την αγγειογένεση στους όγκους, γνωρίζουμε πολύ λίγα για τον τρόπο με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν πρόσβαση στο λεμφικό σύστημα. Η άποψη που επικρατούσε στο παρελθόν ήταν ότι το ενδοθήλιο των λεμφαγγείων κατέχει παθητικό ρόλο στην όλη διαδικασία και ότι απλά τα καρκινικά κύτταρα διηθούν το τοίχωμα των προϋπαρχόντων περινεοπλασματικών λεμφαγγείων όταν τα συναντήσουν κατά τη διήθηση του εξωκυττάριου στρώματος στα πλαίσια της επέκτασής τους (138) (**Εικόνα 26A**). Ωστόσο, η ανακάλυψη λεμφαγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων καθώς και των ειδικών για τα λεμφαγγεία δεικτών οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι πιθανόν στους όγκους να λαμβάνει χώρα λεμφαγγειογένεση η οποία συμβάλλει στη λεμφογενή διασπορά αυτών (**Εικόνα 26B**). Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός κλινικοπαθολογοανατομικών μελετών έχει δείξει τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των λεμφαγγειογενετικών παραγόντων VEGF-C και -D και της μεταστατικής διασποράς διαφόρων κακοήθων νεοπλασμάτων,

υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή της λεμφαγγειογένεσης στην επέκταση των όγκων (138).



Εικόνα 26: (A) Το παραδοσιακό μοντέλο μετάστασης μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων. (B) Μετάσταση μετά από ενεργό λεμφαγγειογένεση. DetmarandHirakawa, 2002 (138).

Παρόλες όμως τις ενδείξεις για τον ενεργό ρόλο των παραγόντων VEGF-C και -D στη λεμφαγγειογένεση στα νεοπλασμάτα, εδώ κι έναν αιώνα περίπου αποτελεί θέμα αμφιλεγόμενο αφενός μεν το αν υπάρχουν λεμφαγγεία στο εσωτερικό των συμπαγών όγκων και αφετέρου αν αυτά που υπάρχουν είναι λειτουργικά.

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα λεμφαγγεία που παρατηρούνται εντός της μάζας ενός συμπαγούς όγκου δυνατόν να αποτελούν μέρος του φυσιολογικού ιστού του ξενιστή που διηθήθηκαν από το κακόηθες νεόπλασμα και τα οποία δεν έχουν την ικανότητα διασποράς των καρκινικών κυττάρων (139), όπως επίσης ότι η υψηλή πίεση του διάμεσου υγρού εντός των όγκων εμποδίζει την ανάπτυξη και τη λειτουργία των ενδοογκικών λεμφαγγείων, άποψη που στηρίχτηκε στην αποτυχία πρόσληψης από τα ενδοεπιπλασματικά λεμφαγγεία χρωστικών ουσιών που ενέθηκαν κοντά σε πειραματικά προκαλούμενους όγκους (140-141).

Ωστόσο, οι μηχανισμοί που αφορούν στη διήθηση και λεμφαγγειακή διασπορά των καρκινικών κυττάρων προφανώς διαφέρουν από εκείνους που

αφορούν στην πρόσληψη και μεταφορά των υγρών. Έτσι, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη αυξανόμενων ενδοογκικών λεμφαγγείων σε εμφυτευμένα ή χημικώς επαγόμενα κακοήθη νεοπλάσματα πειραματόζων και ο συσχετισμός αυτών με τη λεμφογενή μετάσταση (138). Επιπρόσθετα, εκτός από την έλλειψη λειτουργικών ενδονεοπλασματικών λεμφαγγείων έχει περιγραφεί και η ύπαρξη διασταλμένων και πεσυμφορημένων λεμφαγγείων στο στρώμα γύρω από τον όγκο, τα οποία πολλές φορές διεισδύουν στην περιφέρειά του (142). Πρόσφατα, διατυπώθηκε η άποψη ότι τα λεμφαγγεία αυτά δυνατόν να υπήρχαν και πριν στον ιστό και να αυξήθηκαν σε μέγεθος υπό την επίδραση των λεμφογενετικών αυξητικών παραγόντων (125).

Σύμφωνα επομένως με τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα ερευνών φαίνεται ότι στα κακοήθη νεοπλάσματα η λεμφαγγειογενετική διαδικασία που επάγεται από τους VEGF-C και -D ή και άλλους, άγνωστους ακόμα, αυξητικούς παράγοντες οδηγεί σε αύξηση και διάταση των περι- ή και των ενδονεοπλασματικών σε ορισμένα νεοπλάσματα λεμφαγγείων προάγοντας τη μεταστατική διασπορά τους (138) (**Εικόνα 26B**).

Παρόλο που η καθαρή αύξηση της επιφάνειας των λεμφαγγείων μπορεί να αυξάνει την πιθανότητα της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία και της λεμφογενούς μετάστασης αυτών, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων, μέσω της έκκρισης χημειοκινών, πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη χημειοτακτική μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων προς το λεμφικό δίκτυο (138)

Πίνακας 1: Μοριακοί δείκτες που βοηθούν στη διάκριση μεταξύ των λεμφικών και των αιμοφόρων αγγείων.(136)

Δείκτης	Λειτουργία	Λεμφαγγεία	Αιμοφόρα αγγεία
LYNE-1	Υποδοχέας του υαλουρονικού στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων	+++	+
Prox-1	Μεταγραφικός παράγοντας	+++	+
Ποδοπλανίνη	Μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη των ποδοκυττάρων	+++	-
Δεσμοπλακίνη	Πρωτεΐνη των δεσμοσωμάτων που συνδέεται με τις καδερίνες για το σχηματισμό συμπλέγματος προσκόλλησης.	++	-
5'νουκλεοτιδάση	Ένζυμο	+++	(+++) σε νεοπλάσματα
VEGFR-3	Υποδοχέας των αυξητικών παραγόντων VEGF-C και D	+++	+++
VEGFR-2	Υποδοχέας των αυξητικών παραγόντων VEGF-A,-C,D	+	+++
PAL-E	Μόριο σχετιζόμενο με τα ενδοθηλιακά κυστίδια	-	+++
Παράγοντας VIII	Παράγοντας πήξης vonWillebrand	+	+++
Λαμινίνη	Συστατικό της ΒΜ των ενδοθηλιακών κυττάρων	-	+++
PECAM-1	CD31,μόριο προσκόλλησης των αγγείων	++	+++

ΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF) ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ (VEGFR)

Τα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία αναπτύσσονται παράλληλα, αλλά ανεξάρτητα, και σχηματίζουν στο σύνολό τους το κυκλοφορικό σύστημα. Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) και οι υποδοχείς τους (VEGFR) συμμετέχουν στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου. Η οικογένεια VEGF αποτελείται από τους παράγοντες VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (PlGF), οι οποίοι προσδένονται και ενεργοποιούν υποδοχείς τυροσινικής κινάσης στην επιφάνεια των κυττάρων. Στους υποδοχείς αυτούς περιλαμβάνονται ο VEGFR-1 (ή Flt-1), ο VEGFR-2 (ή Flk-1) και ο VEGFR-3 (ή Flt4). Οι νευροπιλίνες -1 και -2 (NRP -1/-2) είναι μια άλλη ομάδα υποδοχέων, που δεν ανήκουν στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και τους οποίους επίσης ενεργοποιούν οι VEGF.

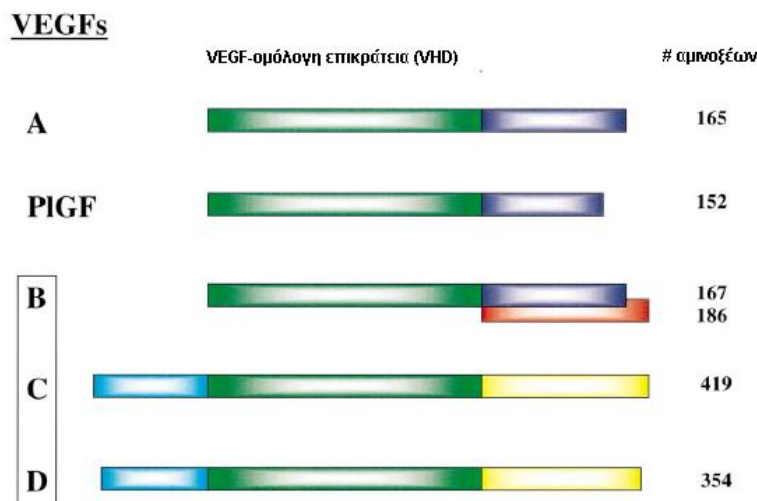
Η οικογένεια των παραγόντων VEGF ανήκει στην υπεροικογένεια των διμερών αυξητικών παραγόντων που φέρουν "κόμβο κυστεΐνης" (143), όπου κάθε μονομερές φέρει ένα, με δισουλφιδικούς δεσμούς σχηματιζόμενο, ενδομοριακό "κόμβο" στο ένα από τα δύο άκρα μιας β-πτυχωτής δομής τεσσάρων αλυσίδων (144). Οι παράγοντες της οικογένειας VEGF έχουν παρόμοια δομή, επιδεικνύουν όμως διαφορετική βιολογική δράση κυρίως λόγω των διαφορών μεταξύ τους ως προς την ειδικότητα σύνδεσης με τους προαναφερόμενους υποδοχείς.

Κοινό δομικό χαρακτηριστικό όλων των VEGF είναι η παρουσία της VEGF-ομόλογης επικράτειας (VHD) στον "πυρήνα" του μορίου τους, ενώ διαφοροποιούνται ως προς τις N-τελικές και C-τελικές τους επικράτειες με αποτέλεσμα τις διαφορετικές βιολογικές και λειτουργικές ιδιότητες του καθενός (145) (**Εικόνα 27**). Συγκεκριμένα, η VEGF-ομόλογη επικράτεια περιέχει 8 κατάλοιπα αμινοξέων, συντηρημένα στις ίδιες ακριβώς θέσεις, τα οποία σχηματίζοντας ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς συντελούν στο σχηματισμό του "κόμβου" κυστεΐνης που χαρακτηρίζει δομικά την οικογένεια VEGF.

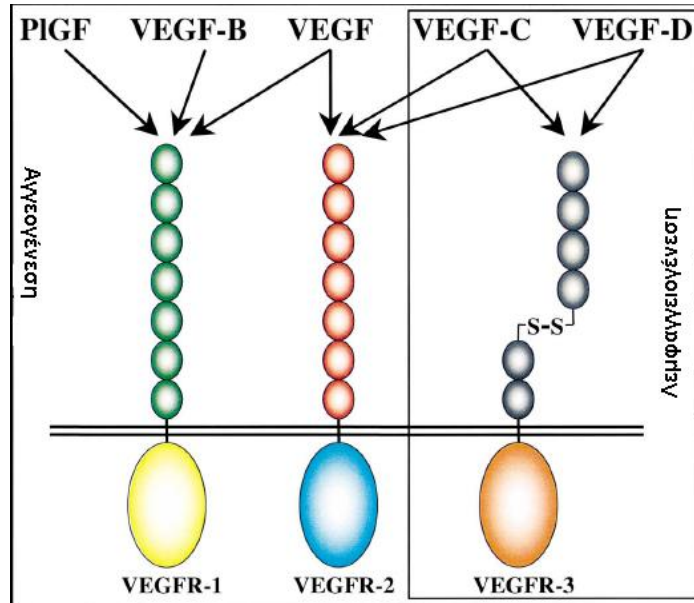
Η αυστηρή συντήρηση της VEGF-ομόλογης επικράτειας, αντανακλάται και σε γονιδιακό επίπεδο. Η συγκριτική μελέτη της δομής των γονιδίων των

VEGF παραγόντων αποκαλύπτει ότι η οργάνωση των γονιδιακών περιοχών που κωδικοποιούν για την VHD επικράτεια, συντηρείται πιστά σε όλους τους VEGF (144). Σε αδρές γραμμές, οι VEGF-A και -B, μέσω των υποδοχέων VEGFR-1 και -2, θεωρείται ότι προάγουν την αγγειογένεση, ενώ οι VEGF-C και -D, μέσω των VEGFR-2 και -3, τη λεμφαγγειογένεση (111,147) (**Εικόνα 28**).

Στους αγγειο- και λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους θα αναφερθούμε αναλυτικά σε επόμενα κεφάλαια, αφού πρώτα περιγράψουμε συνοπτικά, τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε ένα υποδοχέα τύπου τυροσινικήςκινάσης.



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της δομής των μελών της οικογένειας των παραγόντων VEGF. Απεικονίζεται η VEGF-ομόλογη επικράτεια (πράσινο), οι C-τελικές περιοχές που περιέχουν τις βασικές επικράτειες σύνδεσης στην ηπαρίνη ορισμένων ισομορφών του VEGF-A, PlGF και VEGF-B (μπλε), τη μοναδική C-τελική επικράτεια του VEGF-B₁₈₉ (κόκκινο), οι N-τελικές (γαλάζιο) και C-τελικές (κίτρινο) προπεπτιδικές επικράτειες των VEGF-C και VEGF-D. Δεξιά αναφέρεται ο αριθμός των αμινοξέων κάθε πρωτεϊνικού μορίου. Li and Eriksson, 2001 (145)



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της πρόσδεσης των μελών της οικογένειας VEGF στους υποδοχείς VEGFR-1, -2 και -3. Ο VEGFR-3 και οι προσδέτες του VEGF-C και VEGF-D εμπλέκονται στη λεμφαγγειογένεση, ενώ όλοι οι αυξητικοί παράγοντες, και κυρίως οι PIGF, VEGF-A και VEGF-B, εμπλέκονται στην αγγειογένεση μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς VEGFR-1 και -2. LiandEriksson, 2001 (147)

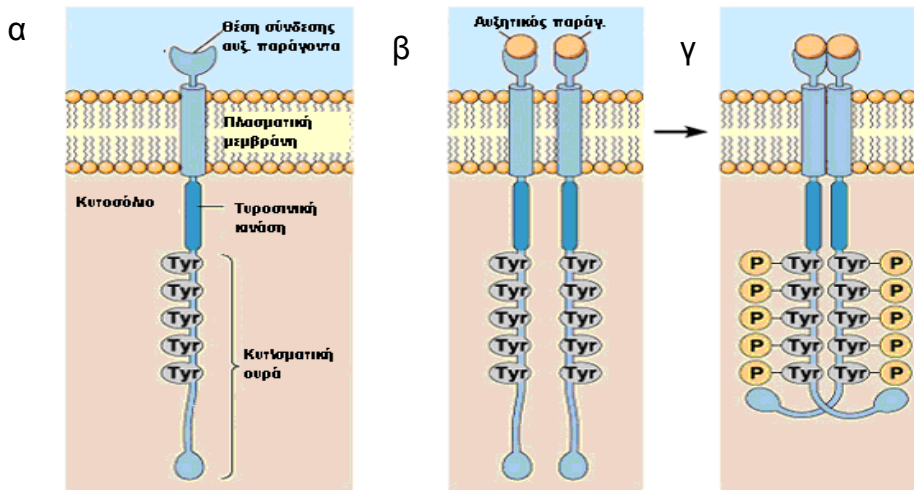
ΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF)

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων είναι σημαντική για την επιβίωση και την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Η κυτταρική επικοινωνία λαμβάνει χώρα είτε μέσω της άμεσης επαφής μεταξύ των κυττάρων, είτε μέσω της αυτοκρινούς, παρακρινούς ή ενδοκρινούς δράσης εκκρινόμενων μορίων. Σε κάθε περίπτωση, τα εκκρινόμενα μόρια δρουν αφού προσδεθούν σε υποδοχείς που εκφράζονται από τα κύτταρα στόχους. Στους ανώτερους οργανισμούς, η πλειονότητα των εκκρινόμενων μορίων είναι πολυπεπτίδια που ονομάζονται αυξητικοί παράγοντες και δρουν σε επιφανειακούς υποδοχείς του τύπου της τυροσινικής κινάσης (148).

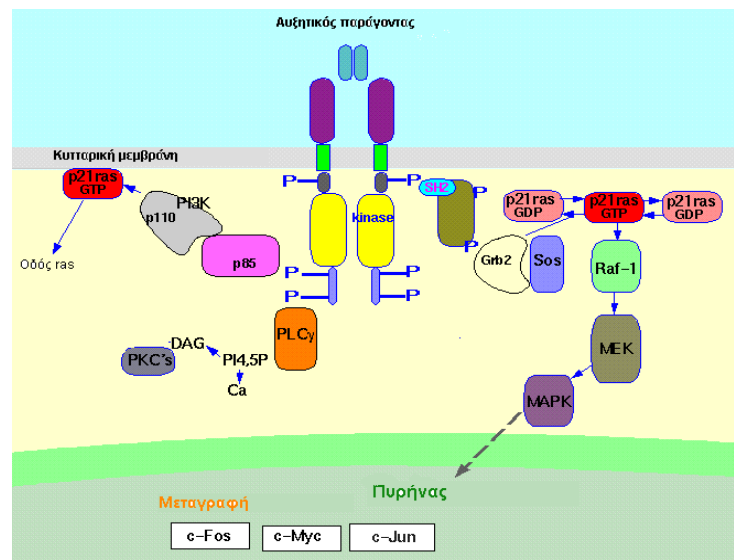
Όλοι οι υποδοχείς του τύπου της τυροσινικής κινάσης αποτελούνται από 3 κύριες επικράτειες: Μια εξωκυττάρια, μια διαμεμβρανική και μια κυτταροπλασματική. Η κυτταροπλασματική επικράτεια περιέχει μια

πρωτεϊνική περιοχή με δράση τυροσινικήςκινάσης καθώς και διάφορες ρυθμιστικές αλληλουχίες με θέσεις φωσφορυλίωσης κατάλοιπων τυροσίνης, σερίνης και θρεονίνης (149) (**Εικόνα 29α**). Η σύνδεση του προσδέτη με τον υποδοχέα προκαλεί το διμερισμό ή ολιγομερισμό του δεύτερου (150) και την «αυτοφωσφορυλίωσή» του, που ουσιαστικά σημαίνει τη φωσφορυλίωση του ενός υποδοχέα-μέλους του διμερούς από τον άλλο (151) (**Εικόνα 29β και γ**). Η αυτοφωσφορυλίωση γίνεται σε δύο διαφορετικές κατηγορίες καταλοίπων τυροσίνης. Η μία κατηγορία αφορά συντηρημένα εξελικτικά κατάλοιπα τυροσίνης εντός των επικρατειών με δράση κινάσης. Σ' αυτή την περίπτωση, η φωσφορυλίωση των τυροσινών αυξάνει τη δραστηριότητα της κινάσης με αποτέλεσμα η τελευταία να φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα σε άλλες θέσεις ή άλλα υποστρώματα (152). Ο μηχανισμός με τον οποίο ξεκινά η αυτοφωσφορυλίωση είναι ακόμα άγνωστος. Μια πιθανότητα είναι ο μονομερής υποδοχέας να διαθέτει μια χαμηλή δραστηριότητα κινάσης, ικανής να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει τον άλλο υποδοχέα κατά το διμερισμό, πράγμα που θα οδηγούσε τελικά στην περαιτέρω φωσφορυλίωση και συνοδό ενεργοποίηση του πρώτου. Εναλλακτικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοκυττάρων επικρατειών των υποδοχέων στο διμερές δυνατόν να επάγει μια αλλαγή στη διαμόρφωση των μορίων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κινασών (152).

Η άλλη κατηγορία θέσεων αυτοφωσφορυλίωσης βρίσκεται εκτός των επικρατειών με δράση κινάσης και χρησιμεύουν ως θέσεις σύνδεσης μηνυματοδοτικών μορίων που φέρουν επικράτειες ομόλογες των τυροσινικώνκινασώνSrc-2 (SH2). Τα κυριότερα μηνυματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς τύπου τυροσινικήςκινάσης των αυξητικών παραγόντων απεικονίζονται στην **εικ. 30**.



Εικόνα 29: Δομή των υποδοχών τύπου τυροσινικήςκινάσης (Α), διμερισμός (Β) και αυτοφωσφορυλίωση (Γ) αυτών μετά τη σύνδεση με τον αυξητικό παράγοντα- συνδέτη.



Εικόνα 30: Ενδοκυττάρια μηνυματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση των αυξητικών παραγόντων με τους υποδοχείς τους. [Συντομογραφίες: PI3K: κινάση των 3'-φωσφοϊνοσιδίων, PLCγ: φωσφολιπάσηCγ, PKC: πρωτεϊνική κινάσηC, DAG: διακυλογλυκερόλη, PI 4,5 P: 4,5 διφωσφορικήινοσιτόλη, Grb2: μόριο σύνδεσης 2 στον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα, MAPK: κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα, MEK: κινάσες των MAPκινασών].

Τη φωσφορυλίωση των μηνυματοδοτικών πρωτεϊνών ανταγωνίζεται ένας αριθμός κυτταρικών φωσφατασών οι οποίες, εξισορροπώντας τη δράση των κινασών, αναστέλλουν τη λειτουργία των οδών μηνυματοδότησης με αποτέλεσμα να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης (153).

Μέσω των προαναφερόμενων οδών μηνυματοδότησης, η δράση των αυξητικών παραγόντων μεταφέρεται από την επιφάνεια στον πυρήνα του κυττάρου όπου, μέσω της ενεργοποίησης ή καταστολής των κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων, επιδρούν ρυθμιστικά σε λειτουργίες όπως είναι η αύξηση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η μετανάστευση των κυττάρων (154).

ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ [VascularEndothelialGrowthFactor (VEGF)]-A

Η παρατήρηση ότι η αύξηση του όγκου συνοδεύεται από αυξημένη αγγείωση έχει αναφερθεί εδώ κι έναν αιώνα περίπου. Το 1939, ο Ide και συν. υπέθεσαν την ύπαρξη ενός παράγοντα, προερχόμενου από τον όγκο, που διεγείρει την αύξηση των αγγείων με αποτέλεσμα την νεοαγγείωση και τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών στον αυξανόμενο όγκο (155). Από τότε, μόλις το 1971 ο Folkman ξεκίνησε ουσιαστικά την προσπάθεια να απομονώσει έναν «αγγειογενετικό παράγοντα» από όγκους ανθρώπων και ζώων και αναφέρθηκε στις αγγειογενετικές επιδράσεις παραγόντων όπως οι TNF-α, TGF-α και -β κτλ. Τα μόρια αυτά βρέθηκε ότι ασκούν αγγειογενετική δράση είτε άμεσα, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε έμμεσα μέσω της στρατολόγησης φλεγμονωδών κυττάρων που στη συνέχεια απελευθερώνουν μιτογόνα των ενδοθηλιακών κυττάρων (156).

Ανεξάρτητες έρευνες συνέκλιναν στην ταυτοποίηση του παράγοντα VEGF. Το 1983, ο Senger και συν. περιέγραψαν τη μερική απομόνωση από το μέσον καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων χοίρου γουϊνέας μιας πρωτεΐνης που προκαλούσε εξαγγείωση υγρού στο δέρμα και ονομάστηκε «παράγοντας διαπερατότητας των αγγείων του όγκου (VPF)». Οι συγγραφείς θεώρησαν τον VPF υπεύθυνο για την αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων του όγκου (157).

Το 1989 ο Ferrara και Henzel ανέφεραν την απομόνωση ενός μιτογόνου, ειδικού για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, από το μέσον καλλιέργειας θυλακιωδών κυττάρων υπόφυσης βοός, το οποίο ονόμασαν «αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF)» προκειμένου να αποδώσουν την ειδικότητα του μορίου ως προς τα κύτταρα στόχους του. Η ανάλυση της αλληλουχίας του NH₂-τελικού άκρου του VEGF απέδειξε ότι αυτή η πρωτεΐνη διέφερε απ' όλα τα μέχρι τότε γνωστά μιτογόνα των εκδοθηλιακών κυττάρων όπως οι aFGF και bFGF (158).

Η κλωνοποίηση του cDNA των VEGF (159) και VPF (160), το 1989, αποκάλυψε ότι ο VEGF και ο VPF ήταν το ίδιο μόριο. Το γεγονός ότι ο VEGF είναι ισχυρός, διαχεόμενος και ειδικός για τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγοντας οδήγησε στη διατύπωση της υπόθεσης ότι το μόριο αυτό δυνατόν να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής και παθολογικής αγγειογένεσης (161).

Σήμερα, ο VEGF αποτελεί το πρότυπο μέλος της οικογένειας των VEGF παραγόντων και ονομάζεται VEGF-A προκειμένου να διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα μέλη.

Λειτουργίες του VEGF

Αγγειογένεση: Ο VEGF-A παίζει πολλαπλούς ρόλους κατά την αγγειογένεση λόγω της ικανότητάς του να επιδρά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την εξειδίκευση και την επιβίωση αυτών (162). Ο VEGF-A προκαλεί την αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με δύο τρόπους: Αφενός μεν, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους σε καλλιέργειες κυττάρων, *in vitro* (163), αφετέρου δε επάγοντας την επιβίωσή τους *in vitro* και *in vivo* (164,165). *In vitro*, ο VEGF-A εμποδίζει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλεί η στέρηση ορού, δραστηριότητα που μεσολαβεί από την οδό της κινάσης-3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3 kinase/Akt) (166). Επιπλέον, ο VEGF-A έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, A1 (470), XIAP (167) και της σουρβιβίνης (168) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. *In vivo*, οι επιδράσεις του ως προς την επιβίωση εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης.

Η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου του οδηγεί σε απόπτωση στα αγγεία του νεογνού, όχι όμως και του ενήλικου ποντικού (169). Κατά

παρόμοιο τρόπο, η επιβίωση των νεοσχηματιζόμενων αγγείων στα νεοπλάσματα φαίνεται ότι εξαρτάται από τον VEGF-A, όχι όμως και των ήδη σχηματισμένων αγγείων (165,170). Η κάλυψη από τα περικύτταρα θεωρείται η κυριώτερη αιτία απώλειας της εξάρτησης των ήδη σχηματισμένων αγγείων από τον VEGF-A (165). Παρόλο που τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν τον κυριότερο στόχο του, μιτογόνο δράση του VEGF-A έχει αναφερθεί και για άλλους τύπους κυττάρων όπως είναι τα μελανοκύτταρα του αμφιβληστροειδούς (171), τα κύτταρα του παγκρεατικού πόρου (172) και τα κύτταρα Schwann (173). Οι Compenolle και συν. έδειξαν ότι ο VEGF-A επάγει την παραγωγή του επιφανειοδραστικού παράγοντα από τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II, προστατεύοντας τα ποντίκια από το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (174). Πρόσφατες μελέτες εξάλλου, έχουν τονίσει το ρόλο του VEGF-A ως πιθανού προστατευτικού παράγοντα για τους νευρώνες και η μειωμένη έκφρασή του έχει αναφερθεί ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πλαγίας μυατροφικής σκλήρυνσης (175).

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό, ο VEGF-A προάγει και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η δράση αυτή βασίζεται στην ικανότητά του α) να σχηματίζει χημειοτακτική κλίση συγκέντρωσης που έλκει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και β) να επάγει την παραγωγή πρωτεασών που βοηθούν στη διήθηση των ιστών (176). Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί το πρωτογενές αγγειακό δίκτυο η κλίση συγκέντρωσης του VEGF-A καθορίζει την επέκταση του δικτύου. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί στον οπίσθιο εγκέφαλο εμβρύων στα οποία τα βλαστώνοντα αγγεία εκτείνουν φιλοπόδια που εκφράζουν VEGFR-2, κατά μήκος της αυξανόμενης συγκέντρωσης του VEGF-A, πριν διηθήσουν τον ενδιάμεσο χώρο για να φτάσουν στην πηγή του παράγοντα (176).

Επιπλέον, ο VEGF-A επάγει την παραγωγή των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και ιστικού τύπου (177) και του υποδοχέα τους (178) σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων βοός, καθώς και της διάμεσης κολλαγενάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (179). Η επαγωγή της παραγωγής των πρωτεασών από τον VEGF-A έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του εξωκυττάρου στρώματος, που διευκολύνει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ο VEGF-A είναι γνωστός και ως παράγοντας διαπερατότητας των αγγείων (VPF), λόγω της ικανότητάς του να επάγει την εξαγγείωση υγρού στο δέρμα χοίρων γουϊνέας (180). Οι Dvorak και συν. διατύπωσαν την άποψη ότι η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων αποτελεί σημαντικό βήμα στην αγγειογένεση διότι διευκολύνει την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος, οι οποίες θα αποτελέσουν το υπόστρωμα πάνω στο οποίο θα αναπτυχθούν τα ενδοθηλιακά και νεοπλασματικά κύτταρα (181-3).

Σήμερα, θεωρείται ότι ο VEGF-A, μέσω της ικανότητάς του να μεταβάλλει τη διαπερατότητα των αγγείων, δυνατόν να συμμετέχει στη διαφοροποίηση και εξειδίκευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ανάλογα με τις ανάγκες των ιστών που αρδεύουν τα αγγεία τα οποία επενδύουν (184).

Ο VEGF-A έχει βρεθεί ότι αυξάνει το σχηματισμό θυρίδων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, *in vitro* και *in vivo*, όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφυτεύονται σε συγκεκριμένες θέσεις στο σώμα (185,186). Αντίστροφα, η αναστολή του VEGF μειώνει τον αριθμό των θυρίδων στο ενδοθήλιο των νεφρικών σωληναρίων στα νεογνά ποντικών και οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια (187).

Τέλος, μια ακόμα επίδραση του VEGF-A στο ενδοθήλιο των αγγείων αποτελεί η διέγερση της μεταφοράς της εξόζης. Η έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής βοός στον VEGF-A ή στον TNF-α κατέληξε σε σημαντική αύξηση του ρυθμού μεταφοράς της εξόζης, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τις αυξημένες ενεργειακές ανάγκες κατά τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ή τη φλεγμονή (188).

Λεμφαγγειογένεση: Μέχρι πρόσφατα, εθεωρείτο ότι ο VEGF-A προάγει αποκλειστικά την αγγειογένεση. Υπάρχουν μελέτες, ωστόσο, που δείχνουν ότι ο VEGF-A επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση και των ενδοθηλιακών κυττάρων των λεμφαγγείων, *in vitro* (189) καθώς και ότι το ενδοθήλιο των λεμφαγγείων εκφράζει, *in vitro* και *in situ*, τον VEGFR-2, τον υποδοχέα που διαμεσολαβεί όλες σχεδόν τις VEGF-A επαγόμενες λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων (190), παρέχοντας ενδείξεις ότι ο VEGF-A πιθανόν να εμπλέκεται και στη λεμφαγγειογένεση. Υποστηρικτικά του λεμφαγγειογενετικού ρόλου του VEGF-A είναι τα ευρήματα των Nagy και συν. σύμφωνα με τα οποία η ενδοδερμική ένεση επίμυων με αδενοϊούς που εξέφραζαν τον VEGF-A κατέληξε στο σχηματισμό δομικά και λειτουργικά

διαταραγμένων αγγείων (191). Επίσης, οι Hirakawa και συν. με τη βοήθεια διαγονιδιακών ποντικών που υπερεξέφραζαν τον VEGF-A και στα οποία προκάλεσαν χημική καρκινογένεση στο δέρμα έδειξαν ότι ο VEGF-A δυνατόν να επάγει την αύξηση των λεμφαγγείων του κακοήθους νεοπλασματος καθώς και τη μετάσταση αυτού στο φρουρό αλλά και σε απομακρυσμένους λεμφαδένες και διατύπωσαν την άποψη ότι η αντι-VEGF-A μονοκλωνική θεραπεία πιθανόν να περιορίζει και τη λεμφική διασπορά του όγκου (192).

Τέλος, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ορισμένες τουλάχιστον επιδράσεις του VEGF-A στα λεμφαγγεία είναι δευτερογενείς, οφειλόμενες στη στρατολόγηση από τον VEGF-A φλεγμονωδών κυττάρων και την επακόλουθη παραγωγή από αυτά των VEGF-C και -D, που αποτελούν τους κατεξοχήν λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες (193).

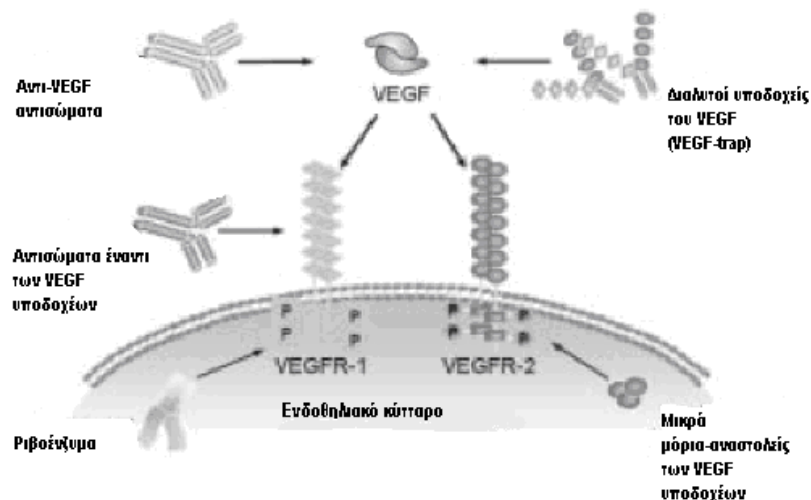
Ο ρόλος του VEGF-A στον καρκίνο

Με τη μέθοδο του *insitu* υβριδισμού, τα επίπεδα του VEGF-A mRNA έχουν βρεθεί αυξημένα σε όλους σχεδόν τους καρκινικούς ιστούς που εξετάστηκαν και που περιλαμβάνουν τον καρκίνο του πνεύμονα (194), του θυρεοειδούς (195), του μαστού (196), του γαστρεντερικού (197), νεφρού και ουροδόχου κύστης (198), ωοθηκών (199), τραχήλου της μήτρας (200), το αγγειοσάρκωμα (201), όγκους του εγκεφάλου όπως το πολύμορφο αγγειοβλάστωμα (202-203) καθώς και το αιμαγγειοβλάστωμα, σποραδικό ή στα πλαίσια του συνδρόμου VHL (204-205).

Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν το VEGF-A mRNA βρέθηκε να εκφράζεται στα κακοήθη κύτταρα και όχι στα ενδοθηλιακά, σε αντίθεση με το mRNA των VEGFR-1 και VEGFR-2 που ήταν αυξημένο στα ενδοθηλιακά κύτταρα εντός των όγκων (197,202,205). Έτσι, διατυπώθηκε η άποψη ότι ο VEGF-A ασκεί παρακρινή δράση. Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες ωστόσο εντόπισαν την πρωτεΐνη του VEGF-A όχι μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και στα αγγεία, καταδεικνύοντας ότι ο VEGF-A πιθανόν να εκκρίνεται από τα κύτταρα του όγκου και να συσσωρεύεται στα κύτταρα στόχους (197,202,205). Το στρώμα του όγκου έχει επίσης αναφερθεί ως πιθανή θέση παραγωγής του VEGF-A (206), ενώ ο Freeman και συν. έχουν διατυπώσει την άποψη ότι τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο μπορεί να

αποτελούν μια επιπλέον πηγή του παράγοντα, που συμβάλλει στην αγγειογένεση (207). Πρόσφατες μελέτες εξάλλου, εντόπισαν ανοσοϊστοχημικά την έκφραση των υποδοχέων του VEGF-A και στα κακοήθη κύτταρα αποκαλύπτοντας την πιθανή αυτοκρινή του δράση (208,209).

Σε ορισμένους τύπους καρκίνου η έκφραση του VEGF-A συσχετίστηκε με την πυκνότητα των αγγείων στον όγκο, η οποία αξιολογήθηκε μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση των αγγείων με αντισώματα έναντι ενδοθηλιακών αντιγόνων (210,211). Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του στομάχου η έκφραση του VEGF συσχετίστηκε με την πυκνότητα των αγγείων στον όγκο, την παρουσία λεμφαδενικών και ηπατικών μεταστάσεων και τη μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών (210), ενώ στον καρκίνο του προστάτη η πυκνότητα των αγγείων συσχετίστηκε με τα επίπεδα του VEGF-A και το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασμάτων (211). Επιπλέον, σε ορισμένους τύπους καρκίνου παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του VEGF-A στον ορό των ασθενών (212) που συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα στους ιστούς (213) καθώς και την έκταση (213) και πρόγνωση της νόσου (214). Άλλες μελέτες ωστόσο έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης στους ιστούς είναι εκείνη που σχετίζεται με το στάδιο και την πρόγνωση της νόσου και όχι τα επίπεδα του VEGF-A στον ορό (215).



Εικόνα 33: Ποικίλοι τρόποι αναστολής της δράσης του VEGF-A

Ο ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF)-B

Κλώνοι του VEGF-B cDNA του ανθρώπου και του ποντικού απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκες κυτταρικών σειρών ανθρώπινου ινοσαρκώματος και ερυθρολευχαιμίας καθώς και καρδιάς ενήλικου ποντικού, αντίστοιχα (216).

Ανεξάρτητα, μια άλλη ερευνητική ομάδα απομόνωσε το ίδιο γονίδιο στην προσπάθεια να τυποποιήσει γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο της πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας τύπου 1 (MEN1). Το προϊόν του γονιδίου αυτού ονομάστηκε παράγοντας σχετιζόμενος με τον VEGF [VRF (VEGF-related factor)] (217).

Έκφραση και λειτουργία

Από τις δύο μέχρι σήμερα γνωστές ισομορφές του VEGF-B, ο VEGF-B είναι η μορφή που απαντάται κυρίως στους ιστούς (218). Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο VEGF-B ανιχνεύεται, κατά κύριο λόγο, στο αναπτυσσόμενο μυοκάρδιο και, σε μικρότερο βαθμό, στους σκελετικούς μυς, τα οστά, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια και το ΚΝΣ (219-221). Στο νεαρό ποντίκι, ο VEGF-B εντοπίζεται στην καρδιά, τους ν-φρούς, το θύμο αδένα και τον εγκέφαλο, με υψηλότερη έκφραση στον ιππόκαμπο (220).

Όσον αφορά στα αγγεία, ο VEGF-B ανιχνεύεται στα λεία μυϊκά κύτταρα και όχι στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυτών (219,221). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι ο υποδοχέας του VEGFR-1 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ενδοθήλιο, οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι ο VEGF-B δρα παρακρινώς στα αγγεία (219).

Η λειτουργία του παράγοντα VEGF-B παραμένει ουσιαστικά αδιευκρίνιστη. Η μιτογόνο δράση που έχει αναφερθεί ότι ασκεί σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων (216), σήμερα αμφισβητείται και αποδίδεται στο σχηματισμό VEGF-B/ VEGF-A ετεροδιμερών (222). Επιπλέον, οι Olofsson και συν. παρατήρησαν ότι η πρόσδεση του VEGF-B στον VEGFR-1 του αγγειακού ενδοθηλίου προκαλεί την αύξηση και ενεργοποίηση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) και του αναστολέα του (PAI), υποδηλώνοντας πιθανόν τη συμμετοχή του VEGF-B

στη διάσπαση του εξωκυττάριου στρώματος και τη μετανάστευση των κυττάρων.

Οι μελέτες απενεργοποίησης του γονιδίου VEGF-B σε πειραματόζωα (VEGF-B knock-out mice) αναφέρουν αντικρουόμενα ευρήματα όσον αφορά το ρόλο του VEGF-B στην αγγειογένεση και την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος. Σε αντίθεση με τα VEGF-A knock-out ποντίκια, εκείνα που δεν εκφράζουν τα αλληλία του VEGF-B γονιδίου είναι βιώσιμα και γόνιμα. Ωστόσο, παρόλο που οι Belmont και συν. αναφέρουν τα VEGF-B knock-out ζώα έχουν μικρότερες καρδιές, με δυσλειτουργούντα στεφανιαία αγγεία και διαταραγμένη αποκατάσταση της στεφανιαίας κυκλοφορίας μετά από τεχνητά προκαλούμενη ισχαιμία του μυοκαρδίου (223), οι Aase και συν. διατυπώνουν ότι ο VEGF-B δεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος, αναφέροντας μόνο ήπιες διαταραχές αγωγιμότητας στο μυοκάρδιο των VEGF-B knock-out ποντικών (224-28).

Τέλος, ο VEGF-B έχει εμπλακεί και στην αγγειακή αναδιάπλαση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η αρθρίτιδα (229), η επούλωση του εγκεφαλικού τραύματος (230) και η πνευμονική υπέρταση (231). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Yoon και Losordo (222) προκειμένου να υποστηρίξει κανείς την αγγειογενετική δράση του VEGF-B θα πρέπει να λάβει υπόψη του ότι α) Ο VEGF-B σχηματίζει ετεροδιμερή με τον VEGF-A και επομένως πιθανόν να ενισχύει την αγγειογενετική δράση του VEGF-A, β) Ο VEGF-B μπορεί να εκτοπίζει τον VEGF-A από τον VEGFR-1 (ο οποίος κατά μία άποψη δεσμεύει και αναστέλλει τη δράση του VEGF-A) με αποτέλεσμα να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα του VEGF-A και τη VEGF-A διαμεσολαβούμενη αγγειογένεση και γ) ότι η πρόσδεση στον VEGFR-1 δυνατόν να κινητοποιεί προγονικά κύτταρα από το μυελό των οστών που συμβάλλουν στην αγγειογένεση.

VEGF-B και καρκίνος

Όπως συμβαίνει με τη λειτουργία του VEGF-B γενικότερα, έτσι και στον καρκίνο, ο ρόλος του παραμένει ουσιαστικά αδιευκρίνιστος. Το γεγονός ότι το γονίδιο του VEGF-B βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 11q13, πολύ κοντά στο γονίδιο της κυκλίνης D1, το οποίο βρίσκεται συχνά ενισχυμένο στον

καρκίνο, οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι δυνατόν και το γονίδιο του VEGF-B να ενισχύεται κατά την καρκινογένεση. Κάτι τέτοιο όμως δε συμβαίνει αφού το VEGF-B γονίδιο δε βρέθηκε ενισχυμένο στα περισσότερα από τα κακοήθη νεοπλασμάτα με ενίσχυση του γονιδίου της κυκλίνης D1 (232).

Οι μελέτες που διερευνούν τα επίπεδα έκφρασης του VEGF-B κατά τη διάρκεια του κακοήθη μετασχηματισμού του βλεννογόνου του παχέος εντέρου υποστηρίζουν είτε ότι τα επίπεδα του VEGF-BmRNA παραμένουν αμετάβλητα κατά το μετασχηματισμό (234), είτε ότι παρατηρείται εντονότερη έκφραση αυτού στα αδενώματα σε σχέση με τα καρκινώματα, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν να παίζει σημαντικότερο ρόλο στα πρώιμα στάδια της νόσου (233-5).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι Gunningham και συν. (236) και Niki και συν. (237) βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του VEGF-BmRNA στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού και του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, αντίστοιχα, με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, αποδίδοντας τη συσχέτιση στην ικανότητα του VEGF-B να ενεργοποιεί το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και επομένως στην πιθανή συμβολή του στη διήθηση (238-41).

Από τα παραπάνω αντιλαμβανόμαστε ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του VEGF-B στην αγγειογένεση, την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος και την καρκινογένεση.

Ο ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF)-C

Εκφραση και Λειτουργία

Ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF)-C αποτελεί μέλος της οικογένειας των παραγόντων VEGF, το cDNA του οποίου απομονώθηκε από το υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων αδενοκαρκινώματος προστάτη (242). Η πρωτεΐνη του παράγεται ως προπροπεπτίδιο, μεγέθους 61 kDa, το οποίο αποτελείται από μια κεντρική περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα, που ονομάζεται «VEGF ομόλογη επικράτεια», εκατέρωθεν της οποίας εκτείνονται αμινο- και καρβοξυ-τελικά προπεπτίδια. Το προπεπτίδιο του καρβοξυτελικού άκρου περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αμινοξέων πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες

παρουσιάζουν ομοιότητα προς την πρωτεΐνη του μεταξιού που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες του εντόμου *Chironomustentans*.

Η VEGF ομόλογη επικράτεια του VEGF-C παρουσιάζει κατά 30% ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή του VEGF-A (242). Ο VEGF-C ασκεί τη δράση του στο κύτταρο μετά από πρόσδεση και ενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR-3, κυρίως, και του VEGFR-2, δευτερευόντως (242). Η νευροπιλίνη 2 πιθανόν, επίσης, να αποτελεί υποδοχέα του VEGF-C (243). Κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους, τα προπροπεπτίδια VEGF-C σχηματίζουν αντιπαράλληλαομοδιμερή με τη βοήθεια δισουλφιδικών δεσμών. Στη συνέχεια, το διμερές μόριο υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία και μετατρέπεται, σταδιακά, σε ενδιάμεσα μόρια με προοδευτικά αυξανόμενη ικανότητα ενεργοποίησης του VEGFR-3.

Ο VEGF-C, όπως και οι άλλοι παράγοντες της οικογένειας VEGF έχει βρεθεί, *in vitro*, ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (242,244,250,251), τη χημειοταξία των μακροφάγων (252) και αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων (244,251) μέσω της απελευθέρωσης NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (251). Οι Joukon και συν, ωστόσο, μελετώντας, *in vitro*, τη δράση μιας μεταλλαγμένης μορφής του VEGF-C η οποία προσδένεται αποκλειστικά στον VEGFR-3 και όχι στον VEGFR-2, παρατήρησαν ότι η μορφή αυτή δεν επάγει την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι οι λειτουργίες αυτές του VEGF-C διαμεσολαβούνται από τον VEGFR-2 (253). Σύμφωνα με μελέτες *in vivo*, ο VEGF-C ασκεί λεμφαγγειογενετική αλλά και αγγειογενετική δράση.

Λεμφαγγειογένεση

Ο VEGF-C θεωρείται ότι δρα ως λεμφαγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης του VEGFR-3. Συγκεκριμένα, οι Oh και συν μελέτησαν την επίδραση του VEGF-C στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη πτηνών, η οποία θεωρείται καλό μοντέλο για τη μελέτη της λεμφαγγειογένεσης αφού διαθέτει ένα πλούσιο λεμφικό δίκτυο που συνοδεύει τις φλέβες και το οποίο εκφράζει τους VEGFR-2 και -3. Σύμφωνα με τους ανωτέρω ερευνητές, η επίδραση του VEGF-C είχε σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των λεμφαγγείων, τα οποία,

κατευθυνόμενα κάτω από το χοριοϊκό επιθήλιο, σχημάτιζαν λεμφικούς κόλπους (253). Επίσης, οι Jeltsch και συν παρατήρησαν ότι η υπερπαραγωγή του VEGF-C από τα κερατινοκύτταρα του δέρματος διαγονιδιακών ποντικών κατέληξε στην υπερπλασία των λεμφαγγείων του δέρματος των ζώων (254).

Φαίνεται, επομένως, ότι ο VEGF-C λειτουργεί λεμφαγγειογενετικά. Η λειτουργία του δε αυτή διαμεσολαβείται κυρίως από τον VEGFR-3 αφού σύμφωνα με τους Veikkola και συν, τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν στην επιδερμίδα τους μεταλλαγμένη μορφή του VEGF-C, η οποία προσδένεται αποκλειστικά και μόνο στον VEGFR-3 και όχι και στον VEGFR-2, εμφανίζουν αύξηση των λεμφαγγείων του δέρματος, χωρίς καμιά απολύτως μεταβολή των αντίστοιχων αιμοφόρων αγγείων (255).

Οι μελέτες, εξάλλου, απενεργοποίησης του VEGF-C γονιδίου έχουν δείξει ότι ο VEGF-C είναι απολύτως απαραίτητος για το σχηματισμό λεμφαγγείων στο έμβρυο (256). Τα έμβρυα που είναι ομόζυγα ως προς το ανενεργό γονίδιο VEGF-C αποτυγχάνουν να σχηματίσουν τους αρχικούς λεμφικούς σάκους από τους οποίους θα προέλθει το λεμφικό δίκτυο και πεθαίνουν

Τέλος, φαίνεται ότι το γονίδιο του VEGF-C επιδρά με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στο σχηματισμό του λεμφικού συστήματος αφού τα έμβρυα που έχουν ενεργό το ένα μόνο από τα δύο αλληλία του VEGF-C γονιδίου εμφανίζουν λεμφοίδημα (256). Οι Kukk και συν, εξάλλου, μελετώντας το πρότυπο έκφρασης του VEGF-C σε σχέση μ' εκείνο του υποδοχέα του, VEGFR-3, έδειξαν ότι στο έμβρυο ο VEGF-C εκφράζεται στα σημεία που τα λεμφαγγεία βλαστάνουν από τις εμβρυϊκές φλέβες, ενώ στο ενήλικο ποντίκι παρατηρήθηκε έντονη έκφραση του VEGF-C σε όργανα όπως ο πνεύμονας, η καρδιά και ο νεφρός, στα οποία παρατηρείται έκφραση και του VEGFR-3 (257).

Ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει η παρατήρηση ότι στο έμβρυο η έκφραση του VEGF-C εμφανίζεται χρονικά πριν από εκείνη του VEGFR-3, που σημαίνει την πιθανή συμμετοχή του παράγοντα και στην αγγειογένεση (257).

Αγγειογένεση

Ο VEGF-C έχει εμπλακεί και στην αγγειογένεση, μέσω μηνυμάτων που άγονται κυρίως από τον VEGFR-2. Σύμφωνα με τους Cao και συν, η έκτοπη εφαρμογή μιας ανασυνδυασμένης μορφής του VEGF-C προκάλεσε την εμφάνιση νεοαγγείων στον κερατοειδή χιτώνα του ματιού πειραματόζωου (250). Οι Witzensbichler και συν μελέτησαν την ικανότητα του VEGF-C να επάγει την αγγειογένεση, ινίνο, σε ζωικό μοντέλο (κουνέλι) με ισχαιμία των πίσω άκρων, στο οποίο, 10 ημέρες μετά την αποκατάσταση της συνέχειας της έξω λαγόνιας αρτηρίας και αφού χορηγήθηκε ο VEGF-C με τη βοήθεια πλασμιδίου, παρατήρησαν την επαγωγή θεραπευτικής αγγειογένεσης, τεκμηριωμένης με αγγειογραφία (251).

Από τα παραπάνω, επομένως, βλέπουμε ότι ο VEGF-C δυνατόν να λειτουργεί τόσο λέμφο όσο και αγγειογενετικά. Θεωρείται δε πιθανό ότι η ιστική απόκριση στην επίδρασή του εξαρτάται αφενός μεν από το βαθμό της πρωτεολυτικής επεξεργασίας που έχει υποστεί, η οποία καθορίζει το βαθμό ενεργοποίησης και την ειδικότητα της δράσης του και αφετέρου, βέβαια, από την κατανομή των υποδοχέων του, VEGFR-2 και -3, στο ενδοθήλιο των αγγείων .

VEGF-C και καρκίνος

Δεδομένης της τάσης πολλών τύπων καρκίνου να μεθίστανται δια της λεμφικής οδού, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι τα κακοήθη νεοπλάσματα είναι πιθανό να διεγείρουν τη λεμφαγγειογένεση με τρόπο ανάλογο εκείνου της αγγειογένεσης, προάγοντας τη λεμφογενή μετάσταση . Η παραγωγή των λεμφαγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων πιστεύεται ότι διεγείρει την ανάπτυξη των λεμφαγγείων στην περιοχή του όγκου, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν πρόσβαση στο λεμφικό αγγειακό δίκτυο.

Ερευνητικά, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ζωικά μοντέλα προκειμένου να μελετηθεί η δυνατότητα του VEGF-C να προάγει την εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων. Υπάρχουν μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η ορθοτοπική μεταμόσχευση καρκινικών κυττάρων μαστού (258-260), στομάχου (261) ή μελανώματος (252), που υπερεκφράζουν τον VEGF-C, σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της λεμφαγγειογένεσης στον όγκο (258,259, 261,262), τα λεμφαγγεία του οποίου

εμφανίζονταν συχνά διηθημένα από καρκινικά κύτταρα (259), αυξημένα ποσοστά μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες (258,259,261) καθώς και στον πνεύμονα (258). Ειδικά στην περίπτωση της μεταμόσχευσης καρκινικών κυττάρων μελανώματος, η υπερέκφραση του VEGF-C είχε σαν αποτέλεσμα την ταυτόχρονη επαγωγή της άγγειο- και λέμφαγγειογένεσης με συνοδό χημειοτακτική δράση επί των μακροφάγων (251).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εργασία των Mandriota και συν οι οποίοι όταν δημιούργησαν, σε πρώτο χρόνο, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν τον VEGF-C στα β-κύτταρα του παγκρέατος παρατήρησαν το σχηματισμό εκτεταμένου δικτύου λεμφαγγείων γύρω από τα νησίδια του Langerhans. Στη συνέχεια, διασταυρώνοντας τα ανωτέρω πειραματόζωα με διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν το T-αντιγόνο του SV40 στα β-κύτταρα του παγκρέατός τους, κατέληξαν στην παραγωγή ζώων τα οποία ανέπτυξαν παγκρεατικούς όγκους που περιβάλλονταν από λεμφαγγεία, εντός των οποίων συχνά ανιχνεύονταν μάζες καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τα προαναφερόμενα ζώα εμφάνιζαν συχνά μεταστάσεις στους επιχώριους παγκρεατικούς λεμφαδένες (263).

Εκτός από τα ζωικά μοντέλα στα οποία φαίνεται ότι ο VEGF-C ενέχεται στη λεμφαγγειογένεση των κακοήθων νεοπλασμάτων και τη λεμφογενή μετάσταση αυτών, οι ερευνητές, μέσω των κλινικοπαθολογικών μελετών, έχουν προσπαθήσει να αποσαφηνίσουν το αν η έκφραση του VEGF-C συσχετίζεται με την ανάπτυξη και τη διασπορά των ανθρώπινων καρκινωμάτων. Έχει δημοσιευθεί ένας μεγάλος αριθμός εργασιών οι οποίες ανιχνεύουν την έκφραση της πρωτεΐνης ή του mRNA του VEGF-C με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και RT-PCR, αντίστοιχα, σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως π.χ. του θυρεοειδούς, του στομάχου, του μαστού, του προστάτη, του παγκρέατος και άλλους και μελετούν την πιθανή συσχέτιση της έκφρασης αυτής με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, με έμφαση στις λεμφαδενικές μεταστάσεις, καθώς και την επιβίωση των ασθενών.

Παρόλο που οι μελέτες αυτές προέρχονται από διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών και επομένως αναφέρονται σε καρκινικούς ιστούς ατόμων με διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα, που έχουν εκτεθεί σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, στην πλειονότητά τους αναφέρουν ισχυρή θετική συσχέτιση

μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης ή του VEGF-C mRNA και της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων ή του σταδίου της νόσου.

Επιπλέον, σε πολλές από αυτές ο VEGF-C έχει αναδειχθεί ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της περιορισμένης επιβίωσης των ασθενών (264,265). Σύμφωνα, επομένως, με τις κλινικοπαθολογοανατομικές μελέτες φαίνεται ότι ο VEGF-C επάγει τη λεμφαγγειογένεση και τη λεμφογενή μετάσταση του καρκίνου και στον άνθρωπο.

Ο ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ (VEGF)-D

Έκφραση και λειτουργία

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου του ποντικού, ο VEGF-D εντοπίζεται σε διάφορα όργανα όπως είναι τα δόντια, το ακουστικό γάγγλιο, η καρδιά, οι πνεύμονες, ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης, οι νεφροί και το δέρμα (266). Οι Farnebo και συν, συγκεκριμένα, βρήκαν ότι τόσο στο έμβρυο όσο και στον ενήλικο ποντικό, ο VEGF-D εκφράζεται κυρίως στον πνεύμονα. Παρατήρησαν μάλιστα ότι στα πρώτα τρίμηνα της κύησης η έκφραση του VEGF-D είναι ελάχιστη στον πνεύμονα, ενώ στο τελευταίο τρίμηνο αυξάνει, παίζοντας πιθανόν έναν ιδιαίτερο ρόλο στην αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη του οργάνου (267-8).

Στον άνθρωπο, μετά την οργανογένεση, η έκφραση του VEGF-D στους φυσιολογικούς ιστούς είναι ελάχιστη και ανιχνεύεται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, της εσωτερη ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων και στα εκκρίνοντα σεροτονίνη εντερο ενδοκρινικά κύτταρα (269-71).

Η επίδραση, ωστόσο, του ώριμου VEGF-D στο δέρμα του πειραματόζωου προκάλεσε αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση, υποδηλώνοντας ότι η βιολογική δράση του VEGF-D είναι ιστοειδική και πιθανόν να εξαρτάται, εκτός των άλλων, και από το πλήθος των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων που εκφράζουν τους υποδοχείς του VEGF-D σε κάποιο συγκεκριμένο ιστό (270).

Ενισχυτικά της ιστοειδικής δράσης του VEGF-D είναι και τα αποτελέσματα της εργασίας των Onogawa και συν που αφορούν στη ρύθμιση της έκφρασης των VEGF-C και -D στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, οι ανωτέρω συγγραφείς εμφύτευαν κύτταρα σειρών

καρκινώματος παχέος εντέρου KM12 υποδερμικά και στο τοίχωμα του τυφλού ανοσοκατασταλμένων ποντικών και παρατήρησαν ότι η έκφραση των VEGF-C και -D ήταν υψηλότερη στα ορθοτοπικά (τοίχωμα τυφλού) σε σχέση με τα έκτοπα (υποδερμικά) και μεταστατικά, στο ήπαρ, νεοπλάσματα, εύρημα που υποδηλώνει ότι η έκφραση των λεμφαγγειογενετικών παραγόντων επηρεάζεται από το μικροπεριβάλλον του οργάνου (272).

VEGF-D και καρκίνος

Δεδομένης της τάσης των περισσότερων νεοπλασμάτων να μεθίστανται δια του λεμφικού συστήματος και του λεμφαγγειογενετικού ρόλου του VEGF-D, ήταν επόμενο η έρευνα να στραφεί προς την κατεύθυνση της αποσαφήνισης του πιθανού ρόλου του VEGF-D στη λεμφαγγειογένεση στους όγκους και τη λεμφογενή διασπορά αυτών. Έχουν περιγραφεί ζωικά μοντέλα νεοπλασμάτων στα οποία η έκφραση του VEGF-D φαίνεται ότι επάγει τη λεμφαγγειογένεση και τη λεμφογενή διασπορά των όγκων (273, 274).

Συγκεκριμένα, οι vonMarschal και συν σε μια πρόσφατη μελέτη τους, εμφύτευσαν καρκινικά κύτταρα πορογενούς καρκινώματος παγκρέατος ανθρώπου που υπερεκφράζουν τον VEGF-D σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια και παρατήρησαν αύξηση στη λεμφαγγειογένεση των αναπτυσσόμενων όγκων, παράλληλη προς τα επίπεδα υπερέκφρασης του VEGF-D και του υποδοχέα του VEGFR-3, σε συνδυασμό με μια αύξηση της διήθησης των λεμφαγγείων από τα καρκινικά κύτταρα με συνοδό αύξηση στα ποσοστά εμφάνισης λεμφαδενικών μεταστάσεων (274). Επιπλέον, οι Ishii και συν ενοφθαλμίζοντας κλώνους κυττάρων καρκίνου του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα, που υποερεκφράζουν VEGF-D, στη δεξιά θωρακική κοιλότητα ανοσοκατασταλμένων πειραματόζων παρατήρησαν ότι τα εκφράζοντα τον VEGF-D νεοπλάσματα εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά διασποράς στον υπεζωκότα και τους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και της αριστερής μασχαλιάας και τραχηλικής χώρας, καταδεικνύοντας το ρόλο του VEGF-D στη λεμφογενή διασπορά των όγκων (275)

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ-1 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ [VascularEndothelialGrowthFactorReceptor (VEGFR)-1]

Το γονίδιο VEGFR-1 απομονώθηκε αρχικά από μια cDNA βιβλιοθήκη ανθρώπινου πλακούντα και το προϊόν του ονομάστηκε τυροσινική κινάση-1 τύπου fms (flt-1) λόγω της δομικής του ομοιότητας με την οικογένεια υποδοχέων fms (276).

Έκφραση και λειτουργία του VEGFR-1

Ο VEGFR-1 εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο ενδοθήλιο των αγγείων (277). Το γονίδιό του μάλιστα, έχει χαρακτηριστεί πλήρως και ο υποκινητής του έχει βρεθεί ότι περιέχει τμήμα μήκους 1kb περίπου, απαραίτητο για την έκφραση του υποδοχέα ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα (278). Κατ' αναλογία με τον VEGF-A, η υποξία θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGFR-1, στο γονίδιο του οποίου έχει εντοπιστεί ρυθμιστική αλληλουχία σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (279).

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, φαίνεται ότι ο VEGFR-1 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά, τα φλεγμονώδη (μονοκύτταρα/ μακροφάγα) και τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, με άλλα λόγια εκφράζεται σε όλα τα είδη των κυττάρων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Συγχρόνως, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του VEGFR-1 σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από νέοαγγειογένεση όπως η ισχαιμική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση (280) και η νόσος Graves (281).

Η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του VEGFR-1 (αντι-flt-1 mab) έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει το σχηματισμό νεοαγγείων και συμβάλλει στην υποχώρηση των προαναφερόμενων παθολογικών καταστάσεων, υποσημαίνοντας ότι ο VEGFR-1 παίζει ενεργό ρόλο στην παθολογική αγγειογένεση (280). Το γεγονός δε ότι η χορήγηση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του VEGFR-2, που εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, δεν έχει καμία αντιαγγειογενετική επίδραση καταδεικνύει ότι η αντιαγγειογενετική επίδραση του αντι-flt-1 mab το πιθανότερο είναι να οφείλεται στην κατασταλτική του δράση επί των φλεγμονωδών και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (281).

VEGFR-1 και καρκίνος

Όπως προαναφέρθηκε, ο VEGFR-1 αρχικά θεωρήθηκε ότι εκφράζεται ειδικά στο ενδοθήλιο των αγγείων. Σήμερα γνωρίζουμε ότι, εκτός από τα ενδοθηλιακά, εκφράζεται και σε άλλα είδη κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασματικών. Έτσι, με τις τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας και του *insitu* υβριδισμού, ο VEGFR-1 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα όγκων διαφόρων οργάνων όπως του μαστού (282-284), του ενδομητρίου (285,286), του στομάχου (287), του παγκρέατος (288,289), του ήπατος (290), του προστάτη (291-293), κεφαλής και τραχήλου (294) και του Πολλαπλού Μυελώματος (295) καταδεικνύοντας την αυτοκρινή δράση του VEGF-A και άλλων αυξητικών παραγόντων που, εκκρινόμενοι από τα νεοπλασματικά κύτταρα και δρώντας στον υποδοχέα VEGFR-1 των ίδιων κυττάρων, προάγουν την ανάπτυξη των όγκων. Επιπλέον, η ανίχνευση του VEGFR-1 τόσο στο ενδοθήλιο των αγγείων του όγκου (282,285) όσο και στα στρωματικά κύτταρα αυτού (294,295) υποδηλώνει την παρακρινή δράση του VEGF και των υπολοίπων προσδετών του VEGFR-1.

Ενισχυτικά των ως άνω αναφερομένων είναι τα αποτελέσματα κλινικοπαθολογοανατομικών ερευνών που υποστηρίζουν ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του *sflt-1* στον όγκο σχετίζονται με περιορισμό της ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού και προτείνουν τη χρήση του πηλίκου *sflt-1*/VEGF-A ως ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη (296,297).

Συνοψίζοντας τα συμπεράσματα των ερευνών που αφορούν στην έκφραση και το λειτουργικό ρόλο του υποδοχέα VEGFR-1 τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις καταλήγουμε ότι ο VEGFR-1, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, φαίνεται ότι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της αύξησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, πιθανόν μέσω της ικανότητας της διαλυτής του μορφής (*sflt-1*) να δεσμεύει τον VEGF-A καθιστώντας τον μη διαθέσιμο για τον ενεργό υποδοχέα VEGFR-2 ενώ αντίθετα, κατά την παθολογική αγγειογένεση, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του μεμβρανοσυνδεδεμένου VEGFR-1 ο οποίος μοιάζει να δρα ως ενεργός φορέας αγγειογενετικών μηνυμάτων (298).

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ-2 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ [VASCULARENDOTHELIALGROWTHFACTORRECEPTOR (VEGFR)-2]

Εκφραση και λειτουργία του VEGFR-2

Ο VEGFR-2 αποτελεί τον κυριότερο διαμεσολαβητή των λειτουργιών του VEGF-A. Σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων από ομφαλική φλέβα ανθρώπου που εκφράζουν τον VEGFR-2 παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των κυττάρων καθώς επίσης και μεταβολή στη μορφολογία τους, με αναδιοργάνωση του δικτύου της ακτίνης, υπό την επίδραση του VEGF-A, λειτουργίες που δεν παρατηρήθηκαν στα κύτταρα που εκφράζουν τον VEGFR-1 (299). Οι Keyt και συν. έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή του VEGF-A που έχει χάσει την ικανότητα σύνδεσης με τον VEGFR-2, δεν επιδεικνύει μιτογόνο δράση (300). Εκτός όμως από τον πολλαπλασιασμό, η ενεργοποίηση του VEGFR-2 προάγει και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων

Σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα, φαίνεται ότι ο VEGFR-2 συμμετέχει κυρίως στην αγγειογένεση. Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν ότι η ενδοδερμική χορήγηση αδενοϊών που υπερεξέφραζαν VEGF-A σε μύες, κατέληξε στο σχηματισμό δομικά και λειτουργικά διαταραγμένων λεμφαγγείων, αποδίδοντας στον VEGF-A, μέσω πιθανόν της ενεργοποίησης του VEGFR-2, και λεμφαγγειογενετικό ρόλο (301). Δεδομένου επομένως ότι

α) στους προσδέτες του VEGFR-2 ανήκουν και οι VEGF-C και VEGF-D, δύο κατ'εξοχήν λεμφαγγειογενετικοί παράγοντες (302,303) και

β) τα ευρήματα μελετών που υποστηρίζουν τον ετεροδιμερισμό των υποδοχέων VEGFR-2 και VEGFR-3 κατά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τους VEGF-C και -D (304,305), είναι πιθανή η συμμετοχή του VEGFR-2 και στη λεμφαγγειογένεση εκτός της αγγειογένεσης.

VEGFR-2 και καρκίνος

Κατ'αναλογία προς τον VEGFR-1 και ο VEGFR-2 θεωρήθηκε αρχικά ότι εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο ενδοθήλιο των αγγείων. Στη συνέχεια ωστόσο βρέθηκε ότι εκφράζεται και στα επιθηλιακά κύτταρα τόσο φυσιολογικών όσο και νεοπλασματικών ιστών (306). Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας και του mRNA insitu υβριδισμού, ο VEGFR-2 έχει εντοπιστεί στα καρκινικά κύτταρα μαστού (307,309), ενδομητρίου (310,311), στομάχου (312), παγκρέατος (313,314), προστάτη (316,318), κεφαλής και τραχήλου (319) και του πολλαπλού μυελώματος (320), επιβεβαιώνοντας την αυτοκρινή δράση του VEGF-A.

Όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι και στα νεοπλασματικά, η λειτουργία του VEGFR-2 είναι κυρίως αυξητική. Η προσθήκη εξωγενούς VEGF-A σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών στομάχου (312) και παγκρέατος (313) προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μόνο εφόσον αυτά εκφράζουν τον VEGFR-2. Επιπλέον, η χορήγηση ριβοενζύμου που συνδέεται εκλεκτικά και διασπά το mRNA του VEGFR-2 με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του τελευταίου, έχει σαν συνέπεια τον περιορισμό της ανάπτυξης του καρκινώματος του πνεύμονα τύπου Lewis (322). Ομοίως, η αδρανοποίηση του VEGFR-2 γονιδίου των ενδοθηλιακών κυττάρων αθυμικών ποντικών έχειδειχθεί ότι καταλήγει στην αναστολή της ανάπτυξης ποικίλων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκινώματος του μαστού, των ωοθηκών και του πνεύμονα (323).

Με βάση τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των προκλινικών μελετών, σήμερα έχουν σχεδιαστεί και δοκιμάζονται κλινικά διάφορα σκευάσματα που στοχεύουν στην αναστολή της μηνυματοδότησης δια του VEGFR-2. Τα σκευάσματα αυτά είναι

α) του τύπου των μονοκλωνικών αντισωμάτων που δεσμεύουν και αναστέλλουν εκλεκτικά τον υποδοχέα,

β) μικρά μόρια που αναστέλλουν τη δράση τυροσινικής κινάσης και επομένως την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ή

γ) ριβοένζυμα, ένζυμα δηλαδή που δεσμεύουν εκλεκτικά και διασπούν το mRNA του VEGFR-2 (324).

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον της έρευνας έχει στραφεί στη δημιουργία εμβολίων για την καταστολή της αγγειογένεσης στον καρκίνο.

Συγκεκριμένα, χορηγούνται εμβόλια που περιέχουν το τμήμα DNA που κωδικοποιεί το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει με σκοπό την επαγωγή μιας έντονης, διαμεσολαβούμενης από τα T-κύτταρα, ανοσολογικής απόκρισης που θα υπερνικήσει την ανοχή των περιφερικών T-κυττάρων έναντι των αυτοαντιγόνων του νεοπλασματος (324). Μέχρι τώρα, η χορήγηση DNA εμβολίου βάσει του VEGFR-2 έχει καταλήξει στην αναστολή της ανάπτυξης του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων, ίνινο, σε ζωικά μοντέλα μελανώματος, καρκίνου του παχέος εντέρου και μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα, καθιστώντας τον DNA εμβολιασμό μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου στο μέλλον (324).

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ-3 ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ [VASCULARENDOTHELIALGROWTHFACTORRECEPTOR (VEGFR)-3]

Έκφραση, λειτουργία

Ο VEGFR-3 αποτελεί τον τρίτο υποδοχέα της οικογένειας των υποδοχέων των παραγόντων VEGF. Όπως και τα άλλα δύο μέλη της οικογένειας είναι ένας υποδοχέας τύπου τυροσινικήςκινάσης.

Οι μέχρι τώρα γνωστοί προσδέτες του VEGFR-3 είναι οι παράγοντες VEGF-C και -D οι οποίοι τον ενεργοποιούν επάγοντας τη φωσφορυλίωσή του σε κατάλοιπα τυροσίνης (325).

Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ο VEGFR-3 φαίνεται ότι είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του πρωτογενούς καρδιαγγειακού δικτύου, σε στάδια προγενέστερα της εμφάνισης των λεμφαγγείων, αφού τα έμβρυα των ποντικών στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί και τα δύο αλληλικά του γονιδίου VEGFR-3 (knockout) πεθαίνουν νωρίς (ημέρα 9,5) εμφανίζοντας διαταραχή στην αιμοποίηση και καρδιαγγειακή ανεπάρκεια (326).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα προαναφερόμενα έμβρυα η διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο σχηματισμός του πρωτογενούς αγγειακού δικτύου και η εκβλάστηση νέων αγγείων ήταν φυσιολογικά υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία του VEGFR-3 δεν είναι απαραίτητη στα πρώιμα αυτά στάδια της αγγειακής ανάπτυξης. Αργότερα, στα επόμενα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης και τον ενήλικα η έκφραση του

VEGFR-3 περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων (327).

Στον ενήλικα, εκτός από τα λεμφαγγεία, ο VEGFR-3 εκφράζεται και σε ορισμένα τριχοειδή αγγεία, ενώ δεν έχει εντοπιστεί ποτέ στο ενδοθήλιο μεγάλων αιμοφόρων αγγείων (328). Παρόλο που στο έμβρυο τα λεμφαγγεία προέρχονται από τις φλέβες, στον ενήλικα, ελάχιστοι μόνο ιστοί διατηρούν την έκφραση του VEGFR-3 στο φλεβικό τους ενδοθήλιο. Τέτοιοι ιστοί είναι οι χόνδροι, τα σώματα των σπονδύλων, τα φλεβικά κανάλια του μυελού των επινεφριδίων και τα φλεβικά κολποειδή του σπλήνα (328). Επίσης, διαφορές έχουν περιγραφεί και στην έκφραση του υποδοχέα στο ενδοθήλιο συνεχών και ασυνεχών τριχοειδών αγγείων. Το συνεχές ενδοθήλιο απαντάται στα αγγεία ιστών όπως ο συνδετικός, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος, ενώ το ασυνεχές είναι τυπικό εκκριτικών ιστών όπως οι ενδοκρινείς αδένες και τα νεφρικά σωληνάκια.

Ο VEGFR-3 εκφράζεται συνήθως στο ενδοθήλιο των ασυνεχών τριχοειδών υποδηλώνοντας ότι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στην αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων των ιστών με μεγάλη δραστηριότητα μεταφοράς /ανταλλαγής ουσιών (328). Επίσης, ο VEGFR-3 απαντάται στο ενδοθήλιο περιοχών που λαμβάνει χώρα αιμοποίηση ή διέλευση κυττάρων του αίματος όπως είναι τα κολποειδή του ήπατος, του σπλήνα και ο μυελός των οστών επισημαίνοντας τον πιθανό ρυθμιστικό του ρόλο στη μεταφορά των αιμοποιητικών κυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου (328). Τέλος, έχει αναφερθεί έκφραση του VEGFR-3 άλλη, εκτός της ενδοθηλιακής, στα κύτταρα της εμβρυϊκής νωτιαίας χορδής και την τροφοβλάστη (329), στους οστεοβλάστες (331) καθώς και σε ορισμένα δενδριτικά κύτταρα (332).

Σύμφωνα με μια εργασία των Veikkola και συν η έκφραση του VEGFR-3 σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου μειώνεται σημαντικά μετά την συνκαλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων με λεία μυϊκά κύτταρα, εύρημα σύμφωνο προς την παρατήρηση ότι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όταν τα αγγεία αρχίσουν να ωριμάζουν και να καλύπτονται από περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα σταματούν να εκφράζουν τον VEGFR-3 (333).

Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς όπου εκφράζεται κυρίως στα λεμφαγγεία, ο VEGFR-3 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται και στο ενδοθήλιο των

αιμοφόρων αγγείων κατά την νεοαγγειογένεση που λαμβάνει χώρα σε παθολογικές καταστάσεις όπως η καρκινογένεση, η φλεγμονή και η επούλωση του τραύματος. Έτσι, ο VEGFR-3 ανιχνεύεται στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων στον καρκίνο του μαστού (332), στον αμφιβληστροειδή του διαβητικού ματιού (334) και κατά την επούλωση τραύματος (335), με αποτέλεσμα την ελάττωση της αξίας του ως λεμφαγγειακού δείκτη στις καταστάσεις αυτές.

Όσον αφορά τη λειτουργία του υποδοχέα, όπως έχουμε ήδη αναφέρει και όπως προκύπτει με τη βοήθεια της τεχνολογίας των knock-out πειραματόζων, ο VEGFR-3 συμβάλλει στη διαμόρφωση του καρδιαγγειακού συστήματος κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (336). Στη συνέχεια όμως, είναι πολλά τα δεδομένα που υποστηρίζουν τη λεμφαγγειογενετική του δράση.

Συγκεκριμένα οι Makinen και συν έδειξαν σε καλλιέργειες μεμονωμένων ενδοθηλιακών κυττάρων ότι η διέγερση του VEGFR-3 προάγει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων των λεμφαγγείων (337), ενώ οι Persaud και συν, χρησιμοποιώντας έναν ανταγωνιστή έναντι του ανθρώπινου VEGFR-3, έδειξαν ότι ο τελευταίος συμμετέχει στη διαμόρφωση σωληνωδών σχηματισμών από ενδοθηλιακά κύτταρα λεμφαγγείων και ομφαλικής φλέβας ανθρώπου, *in vitro* (338).

Η λεμφαγγειογενετική δράση του VEGFR-3 ενισχύεται ακόμα περισσότερο από τα ευρήματα των πειραμάτων των Veikkola και συν οι οποίοι, χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν στην επιδερμίδα τους μια ειδική μορφή του VEGF-C, ικανή να συνδέεται μόνο στον VEGFR-3 και όχι στον VEGFR-2, παρατήρησαν αύξηση στα λεμφαγγεία του δέρματος χωρίς καμιά απολύτως μεταβολή στα αντίστοιχα αιμοφόρα αγγεία (340). Επιπλέον, οι Makinen και συν χορηγώντας μια διαλυτή μορφή του VEGFR-3 που αναστέλλει τη σύνδεση των VEGF-C και -D στους ενδογενείς υποδοχείς των ανωτέρω διαγονιδιακών ποντικών ανέφεραν αναστολή της λεμφαγγειογένεσης με συνοδό υποστροφή των ήδη σχηματισθέντων λεμφαγγείων στο δέρμα των πειραματόζων (339).

VEGFR-3 και καρκίνος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αρχικά, ο VEGFR-3 θεωρήθηκε ότι εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για την ανίχνευση των λεμφαγγείων στους ιστούς. Στη συνέχεια, ωστόσο, ανιχνεύθηκε και στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα των νεοπλασματικών ιστών. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας κυρίως, ο VEGFR-3 έχει εντοπιστεί στα κακοήθη κύτταρα του καρκίνου του παχέος εντέρου (341,342), του πνεύμονα (343-346), στο μελάνωμα (347), το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου (348), τον καρκίνο του προστάτη (349,350), των ωοθηκών (351) και του παγκρέατος (352) στο σάρκωμα Kaposi (353) καθώς και σε άλλους αγγειακούς όγκους (354).

Βλέπουμε, επομένως, ότι παρόλο που στους φυσιολογικούς ιστούς μεσεγγυματικής προέλευσης η έκφραση του VEGFR-3 περιορίζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων, ο VEGFR-3 εντοπίζεται και στα κύτταρα των καλοήθων και κακοήθων αγγειακών όγκων, υποδηλώνοντας ότι η έκφρασή του επάγεται στα αυξανόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, υπόθεση που συμφωνεί με την αναφερόμενη έκφραση του VEGFR-3 στα αναπτυσσόμενα αγγεία του εμβρύου καθώς και στα νεοαγγεία των νεοπλασμάτων στον ενήλικα (355,356).

Επιβεβαιωτικά του λεμφαγγειογενετικού ρόλου του VEGFR-3 στον καρκίνο είναι τα ευρήματα των μελετών αναστολής της δράσης του υποδοχέα με τη βοήθεια αντί-VEGFR-3 μονοκλωνικών αντισωμάτων, σύμφωνα με τα οποία η αγωγή με αντί-VEGFR-3 αντισώματα ζωικών μοντέλων-φορέων κακοηθειών οδήγησε σε μείωση της πυκνότητας των λεμφαγγείων στις πρωτοπαθείς εστίες και σε αναστολή τόσο της χορήγησης μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες (357), όσο και της VEGF-C επαγόμενης λεμφαγγειογένεσης, χωρίς να επηρεάζει την αγγειογένεση ή τη λειτουργία των ήδη υπαρχόντων λεμφαγγείων (358).

Αντίθετα, οι Kubo και συν αναφέρουν ότι μετά τη χορήγηση αντί-VEGFR-3 μονοκλωνικών αντισωμάτων σε πειραματόζωα με καρκίνο παρατήρησαν μικροαιμορραγίες στο νεοπλασματικό ιστό καθώς και διαταραχή στη στοίχιση των ενδοθηλιακών κυττάρων των μετατριχοειδικώνφλεβιδίων, διατυπώνοντας την υπόθεση ότι ο VEGFR-3 πιθανόν να

συμμετέχει στη διατήρηση της στεγανότητας της στιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση (359). Ανεξάρτητα πάντως από το αν ο VEGFR-3 κατέχει ρόλο αποκλειστικά λεμφαγγειογενετικό ή συμμετέχει και στην αγγειογένεση, τα ευρήματα των ανωτέρω μελετών υποδηλώνουν ότι η μηνυματοδοτική οδός του δυνατόν να αποτελέσει στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου στο μέλλον.

Ο VEGF-C ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου στην ουροδόχο κύστη αυξάνεται συνεχώς. Ο καρκίνος μεθίσταται συνήθως μέσω των λεμφαγγείων. Από την στιγμή που εγκατασταθούν λεμφαδενικές μεταστάσεις οι θεραπευτικές επιλογές περιορίζονται και η πρόγνωση της νόσου γίνεται φτωχότερη.

Ο VEGF-C μπορεί να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία και στα λεμφαγγεία. Ο VEGF-C αντιδρά και με τον VEGFR-2 αλλά όχι με τον VEGFR-1. Η αυξημένη έκφραση του VEGF-C σε ορισμένα καρκινώματα, είναι σημαντικά συνδεδεμένη με την αγγειογένεση, τη λεμφαγγειογένεση και τη λεμφαδενική μετάσταση, αν και ο ρόλος του VEGF-C στην δημιουργία και στην εξέλιξη της νόσου παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος(360).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης η έκφραση του VEGF-C σχετίζεται στενά με το μέγεθος του όγκου, το παθολογοανατομικό στάδιο, το βαθμό κακοήθειας και την μετάσταση στους πνευλικούς λεμφαδένες, με την τελευταία να αποτελεί τον πιο υψηλά και στενά σχετιζόμενο με την επιβίωση παράγοντα (361).

Συνεπώς η έκφραση του VEGF-C θα μπορούσε ενδεχομένως να φανεί χρήσιμη στην κλινική πράξη συνεισφέροντας αφενός, στην ακριβέστερη και πιο έγκαιρη εκτίμηση του σταδίου της νόσου, και αφετέρου, στην καλύτερη εκτίμηση του δυναμικού κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων με σκοπό την έγκαιρη επιλογή της εκάστοτε καταλληλότερης θεραπείας(372).

Με βάση την προαναφερθείσα υπόθεση, οι Zhuo Li και συν. μελέτησαν την σχέση του VEGF-C με την CT στον προσδιορισμό λεμφαδενικών μεταστάσεων. Μελετήθηκαν 127 ασθενείς με διηθητικό καρκίνο ουροδόχου

κύστης που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή με συνοδό πυελική λεμφαδενεκτομή (373).

Η μετεγχειρητική ιστολογική εξέταση ανέδειξε 46 περιπτώσεις με λεμφαδενικές μεταστάσεις οι οποίες αφορούσαν 9 περιπτώσεις σε στάδιο T4, 33 σε στάδιο T3, 4 σε στάδιο T2 και καμία περίπτωση σε στάδιο T1. Βρέθηκε θετική έκφραση του VEGF-C στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων αλλά και στο φυσιολογικό μεταβατικό επιθήλιο σε πολύ μικρότερο βαθμό ($p < 0.05$). Η έκφραση του VEGF-C σχετίστηκε σημαντικά με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις ($p < 0.05$).

Οι συγγραφείς καταμέτρησαν τα ποσοστά ειδικότητας, ακρίβειας και ευαισθησίας της έκφρασης του VEGF-C στον εντοπισμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων, χωρίζοντας τους ασθενείς σε 2 ομάδες ανάλογα με το βαθμό έκφρασης του VEGF-C: VEGF-C (I, II) ομάδα χαμηλής έκφρασης και VEGF-C (III, IV) ομάδα υψηλής έκφρασης. Βρέθηκαν 40 ασθενείς VEGF-C (III, IV) με λεμφαδενικές μεταστάσεις, αλλά και 26 ασθενείς VEGF-C (III, IV) χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις. Επίσης βρέθηκαν 55 ασθενείς VEGF-C (I,II) χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, αλλά και 6 ασθενείς VEGF-C (I,II) με λεμφαδενικές μεταστάσεις. Τα ποσοστά ειδικότητας, ακρίβειας και ευαισθησίας της έκφρασης του VEGF-C στον εντοπισμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων βρέθηκαν να είναι 67.9%, 74.8% και 87.0% αντίστοιχα.

Όλοι είχαν υποβληθεί σε CT κάτω κοιλίας προεγχειρητικά η οποία είχε δείξει 38 ασθενείς (29.9% -38/127) με πυελικές λεμφαδενικές μεταστάσεις, εκ των οποίων 9 είχαν T4 στάδιο νόσου, 29 είχαν T3 στάδιο νόσου, ενώ δεν ανεδείχθησαν από την CT ασθενείς με νόσο T2 ή T1 και μεταστάσεις. Η μετεγχειρητική ιστολογική εξέταση ανέδειξε 22 ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις και θετική CT και 16 ασθενείς με θετική CT χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις. 65 ασθενείς βρέθηκαν χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις και αρνητική CT, ενώ 24 ασθενείς βρέθηκαν με λεμφαδενικές μεταστάσεις και αρνητική CT. Τα ποσοστά ειδικότητας, ακρίβειας και ευαισθησίας της CT στον εντοπισμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων βρέθηκαν να είναι 80.2%, 68.5% και 47.8% αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός της έκφρασης του VEGF-C και της CT στον εντοπισμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων αυξάνει τα ποσοστά ειδικότητας, ακρίβειας

και ευαισθησίας σε 84.0% (68/81 των περιπτώσεων), 86.6% (110/127 των περιπτώσεων) και 91.3% (42/46 των περιπτώσεων) αντίστοιχα (373).

Σε άλλη μελέτη των Zhuo Li και συν. το 2011 μελετήθηκε αν μπορεί ο VEGF-C να αποτελέσει ασφαλή δείκτη διατήρησης του οργάνου σε διηθητικό καρκίνο της κύστης (374). Μελέτησαν ομάδα 93 επιλεγμένων με συγκεκριμένα κριτήρια ασθενών, με διηθητικό καρκίνο κύστεως, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ριζική διουρηθρική εκτομή του όγκου. Όλοι οι ασθενείς είχαν ενημερωθεί ότι η standard θεραπεία για τη νόσο τους είναι η κυστεκτομή και ότι τα πρωτόκολλα για τη διατήρηση της κύστης είναι υπό έρευνα.

Τα ιστολογικά κριτήρια για την είσοδο στη μελέτη ήταν επαναληπτικές βιοψίες με ελεύθερο νόσου υποκείμενο μυϊκό ιστό από την αρχική περιοχή εμφάνισης του όγκου, περιφερικότερα και εν τω βάθει της αρχικής βλάβης. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο, υδρονέφρωση, μεταστάσεις και ασθενείς με T4 στάδιο νόσου. Βρέθηκε ότι σε επιλεγμένη ομάδα ασθενών σταδίου T2, με χαμηλή έκφραση VEGF-C και απουσία καρκινώματος insitu, οι οποίοι συνδυάζουν υψηλή ολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση, ο VEGF-C θα μπορούσε να συνεισφέρει στην επιλογή της θεραπείας.

Η ριζική διουρηθρική εκτομή του όγκου, δύναται, σε επιλεγμένους ασθενείς να προσφέρει ποσοστά 5ετούς επιβίωσης ανάλογα της κυστεκτομής (375). Συνεπώς η έκφραση του VEGF-C θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη στην εκτίμηση του δυναμικού κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων της νόσου και ως εκ τούτου στην επιλογή της εκάστοτε καταλληλότερης θεραπείας (376,377).

Οι ενδοκυτικές εγχύσεις με Mitomycin c (MMC), χρησιμοποιούνται ευρέως ως χημιοθεραπευτικός παράγοντας για την θεραπεία του μη διηθητικού ουροθηλιακού καρκίνου. Εντούτοις λίγοι ασθενείς ανευρίσκονται ελεύθεροι καρκινικοί κυττάρων μετά την θεραπεία με MMC. Επιπλέον οι Dias και συν. το 2002, παρατήρησαν ότι, τα καρκινικά κύτταρα των ασθενών με υψηλή έκφραση VEGF-C παρουσίαζαν μεγαλύτερη φαρμακευτική αντοχή στη θεραπεία με MMC, από αυτά με χαμηλή έκφραση (378).

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η μελέτη των Xiongbing Zu και συν., όπου συγκρίνεται η έκφραση του VEGF-C με την MRI στην διάγνωση και στον εντοπισμό πυελικών λεμφαδενικών μεταστάσεων. Φάνηκαν υψηλότερα

ποσοστά ειδικότητας και ακρίβειας για την MRI (62,2% και 67,9% για τον VEGF-C vs 100% και 80% για την MRI αντίστοιχα), ενώ η έκφραση του VEGF-C φάνηκε να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την MRI (81,3% vs 43,8% αντίστοιχα) στην διάγνωση και τον εντοπισμό πυελικών λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπροσθέτως ασθενείς με υψηλή έκφραση VEGF-C είχαν σημαντικά χαμηλότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση και φτωχότερη πρόγνωση, από αυτούς με χαμηλή ή αρνητική έκφραση ($p=0.014$)(379).

Οι Hermann και συν. το 2007, σε μελέτη 286 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή, δεν βρήκαν καμία συσχέτιση του VEGF-C με ιστοπαθολογικούς παραμέτρους ή με την κλινική εξέλιξη της νόσου(380)

Οι Afoso J. Το 2009, και συν. σε ανάλογη μελέτη 83 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή , παρατήρησαν ότι αν και η υπερέκφραση του VEGF-C φαινόταν σε ασθενείς με φτωχότερη πρόγνωση (χαμηλή διαφοροποίηση, υψηλό στάδιο νόσου), εντούτοις δεν βρέθηκε σημαντική σχέση με την επιβίωση των ασθενών(381).

Γενικότερα η υπερέκφραση του VEGF-C , έχει σχετιστεί με φτωχής πρόγνωσης ουροθηλιακά καρκινώματα. Πολλές μελέτες εξειδικεύουν την σχέση της υπερέκφρασης του VEGF-C με αυξημένη BVD, LVD και λεμφαγγειακή διήθηση, συνεπώς και με φτωχότερη πρόγνωση(372,373,374).

ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία (ΕΘΟ) είναι σημαντικές για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία ενός οργανισμού. Τροποποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων συμβαίνει μέσω της δράσης πρωτεολυτικών ενζυμικών συστημάτων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την υδρόλυση πληθώρας συστατικών της ΕΘΟ. Τα ενζυμικά αυτά συστήματα επηρεάζουν την ακεραιότητα και σύνθεση της ΕΘΟ και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο μηνυμάτων που προέρχονται από τα μόρια της ΕΘΟ, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και κυτταρικό θάνατο. Η αποδόμηση και αναδόμηση της ΕΘΟ πρέπει να υπόκεινται σε αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς καθώς η μη ελεγχόμενη πρωτεόλυση συνεισφέρει στην ανώμαλη ανάπτυξη και στη γένεση αρκετών παθολογικών καταστάσεων (385).

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες του στρώματος (Matrix Metalloproteinases, MMPs), ή ματριξίνες όπως διαφορετικά ονομάζονται, είναι μια οικογένεια 24, ψευδάργυρο (Zn^{2+}) και ασβέστιο (Ca^{2+})-εξαρτώμενων ενδοπεπτιδασών στο ανθρώπινο πρωτέωμα, οι οποίες συλλογικά μπορούν να αποδομούν όλα τα πρωτεϊνικά συστατικά της ΕΘΟ, καθώς και μη στρωματικές πρωτεΐνες (385-7,389,390).

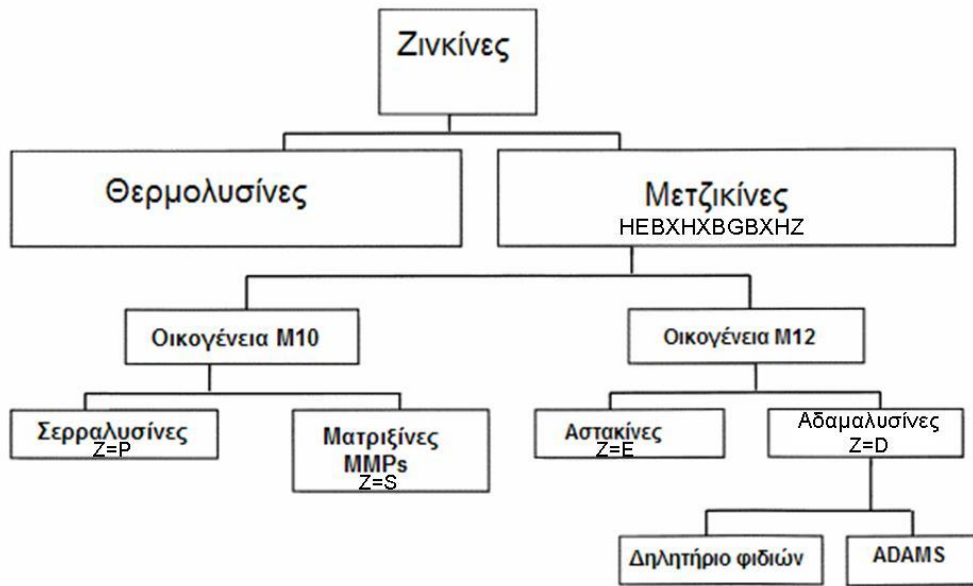
In vitro μελέτες αρχικά είχαν δείξει ότι οι MMPs έχουν την ικανότητα να αποδομούν τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού και ότι πιθανά παίζουν ρόλο στην καταστροφή και ανασχηματισμό αυτού που παρατηρείται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπως η καταστροφή του χόνδρου στην αρθρίτιδα, η ρήξη των αθηρωματικών πλακών, η ανάπτυξη ανευρύσματος, η καρκινική διήθηση και μετάσταση (391-4). Άμεσες αποδείξεις έχουν προκύψει από ex vivo μελέτες όπου η αυξημένη έκφραση των MMPs μπορεί να προσδιορισθεί σε ιστικό επίπεδο με τεχνικές ανάλυσης RNA και πρωτεΐνης, όπως ο insitu υβριδισμός (ISH), η αντίστροφης μεταγραφάσης-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR), η ανοσοϊστοχημεία (IHC) και η ζυμογραφία (395).

Τα τελευταία χρόνια έχουν προστεθεί πληροφορίες και από άλλες πηγές όσον αφορά στο ρόλο των MMPs σε παθολογικές καταστάσεις. Πρώτον, αυξημένα επίπεδα MMPs στον ορό ή στο πλάσμα έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με καρκίνο (386-8) με ρευματοειδή αρθρίτιδα (389), οστεοαρθρίτιδα (390), συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (391), πολλαπλή σκλήρυνση (392), πολυκυστική νόσο των νεφρών (393), ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (394), ασταθή στηθάγχη (395) ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (395).

Δεύτερον, μελέτες σε διαγονιδιακά και απενεργοποιημένα (knock-out) μοντέλα ζώων έχουν αποδείξει ότι ίνινο η MMP-3 μπορεί να υποκινήσει την καρκινογένεση (396) και ότι η MMP-3 και MMP-1 εμπλέκονται στην επούλωση πληγών (397).

Τρίτον, έχουν προσδιορισθεί αρκετές φυσικά προερχόμενες παραλλαγές των γονιδίων των ανθρώπινων MMPs (γενετικοί πολυμορφισμοί) οι οποίες συσχετίζονται με την προδιάθεση και/ή την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, των ανευρυσμάτων και διαφόρων καρκινωμάτων (398).

Οι MMPs αποτελούν οικογένεια της μεγάλης ομάδας των μεταλλοπεπτιδασών Zincins. Οι μεταλλοπεπτιδάσες είναι υδρολάσες, όπου το μόριο νερού που μεσολαβεί στη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, ενεργοποιείται από μεταλλικό ιόν (συνήθως ένα άτομο Zn^{2+}), το οποίο ενώνεται με τρία αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν μια καταλυτική ενεργή θέση "τσέπης". Οι Zincins ταξινομούνται σε 8 φυλές (clan) και κάθε φυλή σε αρκετές οικογένειες (Εικ. 16). Η φυλή MB (clanMB) αποτελεί τις "Metzincins", οι οποίες παρουσιάζουν στην καταλυτική θέση του μορίου τους μια καλά συντηρημένη εξελικτικά αλληλουχία αμινοξέων με το μοτίβο HEBXHXBGBXHZ. Οι τρεις ιστιδίνες (H) είναι οι συνδέτες του ψευδαργύρου, ενώ το γλουταμινικό οξύ (E) αποτελεί την ενεργή θέση. Οι Metzincins διαιρούνται σε 4 οικογένειες: τις σεραλυσίνες, αδαμαλυσίνες, αστακίνες και ματριξίνες- MMPs (Εικ. 17).



Εικόνα 16. Υπεροικογένεια μεταλλοενδοπεπτιδασών: Μετζικίνες. Οι 4 μεγάλες οικογένειες των μετζικινών χαρακτηρίζονται από την κοινή υπογραφή τους, το μοτίβο των τριών ιστιδινών δέσμευσης ψευδαργύρου **HEBXHXBGBXHZ**. Η: ιστιδίνη, Ε: γλουταμινικό οξύ, G: γλυκίνη, Β: έντονα υδρόφοβο κατάλοιπο, Χ: ποικίλο αμινοξύ και Ζ: κατάλοιπο ειδικό της οικογένειας. Οι τρεις ιστιδίνες αποτελούν την καταλυτική τριάδα. Με βάση το «Ζ» κατάλοιπο, τέσσερις οικογένειες έχουν περιγραφεί: οι Σερραλυσίνες, Αδαμαλυσίνες, Αστακίνες και οι Ματριξίνες (MMPs) (399).

Οι ματριξίνες έχουν μια επιπλέον θέση δέσμευσης για Zn^{2+} και μια ή δύο για Ca^{2+} που απαιτούνται για τη σταθερότητα του μορίου (400). Εκτός από τα παραπάνω, οι ματριξίνες μοιράζονται και τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- α)** εμφανίζουν ομολογία στη δομή και στην αμινοξική αλληλουχία,
- β)** η ενεργή θέση μεσολαβεί τόσο στην υδρόλυση του υποστρώματος όσο και στην αυτολυτική τους διάσπαση,
- γ)** εκτός από λίγες εξαιρέσεις, εκκρίνονται σε ανενεργή μορφή ζυμογόνου, το οποίο ενεργοποιείται με μερική πρωτεολυτική διάσπαση και επακόλουθη αυτόλυση,
- δ)** αναστέλλονται από ειδικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs) (401).

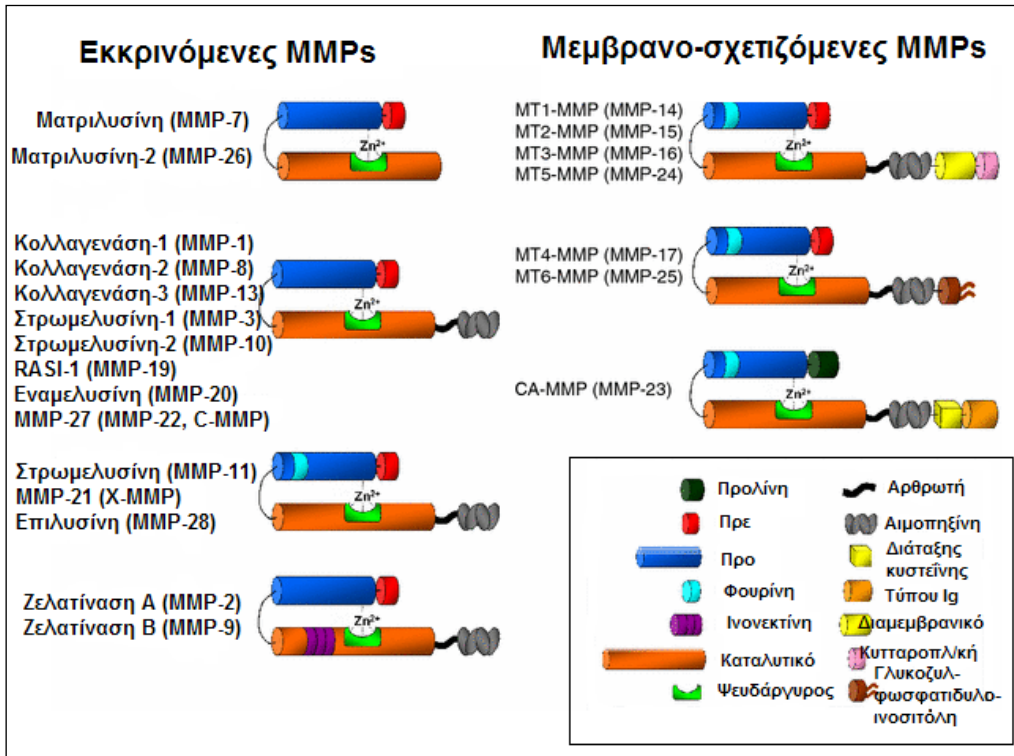
γνωρίσματα του κάθε ενζύμου. Ορισμένες MMPs στις οποίες δόθηκε ένας αριθμός, βρέθηκε μεταγενέστερα ότι ήταν όμοιες με προηγούμενα χαρακτηρισμένες MMPs. Ωστόσο, ο αριθμητικός δείκτης δεν άλλαξε αντιστοίχως. Ως εκ τούτου, ενώ το τελευταίο μέλος της οικογένειας είναι η MMP-28, μόνο 24 διαφορετικές MMPs έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί (Πίνακας 5) (402-3). Ματριξίνες έχουν επίσης ανιχνευθεί σε άλλους οργανισμούς όπως: Hydra, Seurchin, Arabidopsis, Drosophilamelanogaster και Caenorhabditiselegans.

Πίνακας 5. Κατάλογος των γνωστών MMPs και των υποστρωμάτων τους. Οι MMPs-4 (πανομοιότυπη με την MMP-2), -5 (όμοια με την MMP-3 ή -13) και 6 (ίδια με την MMP-3) έχουν αφαιρεθεί λόγω μετέπειτα ταυτοποίησης με τις άλλες MMPs (Τροποποίηση από Lynch και Matrisian 2002).

MMP	Υπόστρωμα στην ΕΘΟ	Υποστρώματα εκτός ΕΘΟ
MMP-1/ Κολλαγενάση-1	Κολλαγόνο τύπου I/ II/ III/ VII/ X/ XI, ζελατίνη, εντακτίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, βιτρονεκτίνη	Περλεκάνη, IGFBP-2/3, προ-TNF-α, α1-αντι-χυμοθρυψίνη, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-2/ Ζελατινάση A	Κολλαγόνο τύπου I/ III/ IV/ V/ VII/ X/ XI, ζελατίνη, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, βιτρονεκτίνη, δεκορίνη	TGF-β, TGF-β2, IL-1β, MCP-3, SDF-1, IGFBP-3/5, TNF-α, FGF-R1, α1-αντι-χυμοθρυψίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-3/ Στρωμελυσίνη-1	Κολλαγόνο τύπου III/ IV/ V/ VII/ IX/ X/ XI, ζελατίνη, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, βιτρονεκτίνη, δεκορίνη, εντακτίνη	Περλεκάνη, HB-EGF, IL-1β, πλασμινογόνο, E-Καδερίνη, IGFBP-3, TNF-α, α1-αντι-χυμοθρυψίνη, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-7/ Ματριλυσίνη	Κολλαγόνο τύπου I/ IV, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, ζελατίνη, εντακτίνη, δεκορίνη, ελαστίνη, βιτρονεκτίνη	FASL, β ₄ ιντεγκρίνη, E-Καδερίνη, HB-EGF, πλασμινογόνο, TNF-α, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-8/ Κολλαγενάση-2	Κολλαγόνο τύπου I/ II/ III	α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-9/ Ζελατινάση B	Κολλαγόνο τύπου IV/ V/ XI/ XIV, δεκορίνη, ζελατίνη, ελαστίνη, λαμινίνη, βιτρονεκτίνη	TGF-β2, IL-1β, TNF-α, IL-2Rα, πλασμινογόνο, α1-αντι-χυμοθρυψίνη, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-10/ Στρωμελυσίνη-2	Κολλαγόνο τύπου III/ IV/ V, ελαστίνη, λαμινίνη, φιβρονεκτίνη, ζελατίνη	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-11/ Στρωμελυσίνη-3	Δεν έχει προσδιοριστεί	IGFBP-1, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-12/ Μεταλλοελαστάση	Κολλαγόνο τύπου I/ IV, δεκορίνη, ζελατίνη, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, βιτρονεκτίνη, εντακτίνη	Πλασμινογόνο, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-13/ Κολλαγενάση-3	Κολλαγόνο τύπου I/ II/ III/ VI/ IX/ X/ XIV, ζελατίνη, φιβρονεκτίνη	α2-μακροσφαιρίνη
MMP-14/ MT1- MMP	Κολλαγόνο τύπου I/ II/ III, ζελατίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη, εντακτίνη, βιτρονεκτίνη	CD44, Τρανσγλουταμινάση, α2-μακροσφαιρίνη, αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-15/ MT2- MMP	Εντακτίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη	Τρανσγλουταμινάση
MMP-16/MT3-MMP	Κολλαγόνο τύπου III, φιβρονεκτίνη, ζελατίνη	Τρανσγλουταμινάση
MMP-17/MT4- MMP	Ζελατίνη	α2-μακροσφαιρίνη, TNF-α
MMP-18/Κολλαγε- νάση-4 (Xenopus)	Κολλαγόνο τύπου I	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-19/ RAS1	Κολλαγόνο τύπου I/ IV, φιβρονεκτίνη, ζελατίνη, λαμινίνη, εντακτίνη, COMP	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP- 20/Εναμελυσίνη	Κολλαγόνο τύπου XVIII, amelogenin, COMP	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-21/ MMP (Xenopus)	Όχι γνωστά υποστρώματα	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-22/ MMP(όνιθα)	Ζελατίνη	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-23/ MMP τάξης κυστεΐνης (CA-MMP)	Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-2/ MT5-MMP	Κολλαγόνο τύπου I, ζελατίνη, φιβρονεκτίνη, λαμινίνη	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-25/MT6-MMP	Κολλαγόνο τύπου IV, ζελατίνη, φιβρονεκτίνη	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-26/Ματριλυ- σίνη-2/Ενδομετάση	Κολλαγόνο τύπου IV, ζελατίνη, φιβρονεκτίνη	Αναστολείς α1-πρωτεϊνών
MMP-27	Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει προσδιοριστεί
MMP-28/Επιλυσίνη	Δεν έχει προσδιοριστεί	Δεν έχει προσδιοριστεί

[IGFBP=συνδεόμενη στον ινσουλινοειδή αυξητικό παράγοντα πρωτεΐνη, TGF-β=αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β, HB-EGF=συνδεμένος στην ηπαρίνη επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, IL=Ιντερλευκίνη, TNF-α= παράγοντας νέκρωσης όγκου-α]

Οι MMPs ταξινομούνται σε υποκατηγορίες με βάση την ειδικότητα του υποστρώματος και την ομολογία ως προς τις δομικές περιοχές (domains) (Εικ. 18).

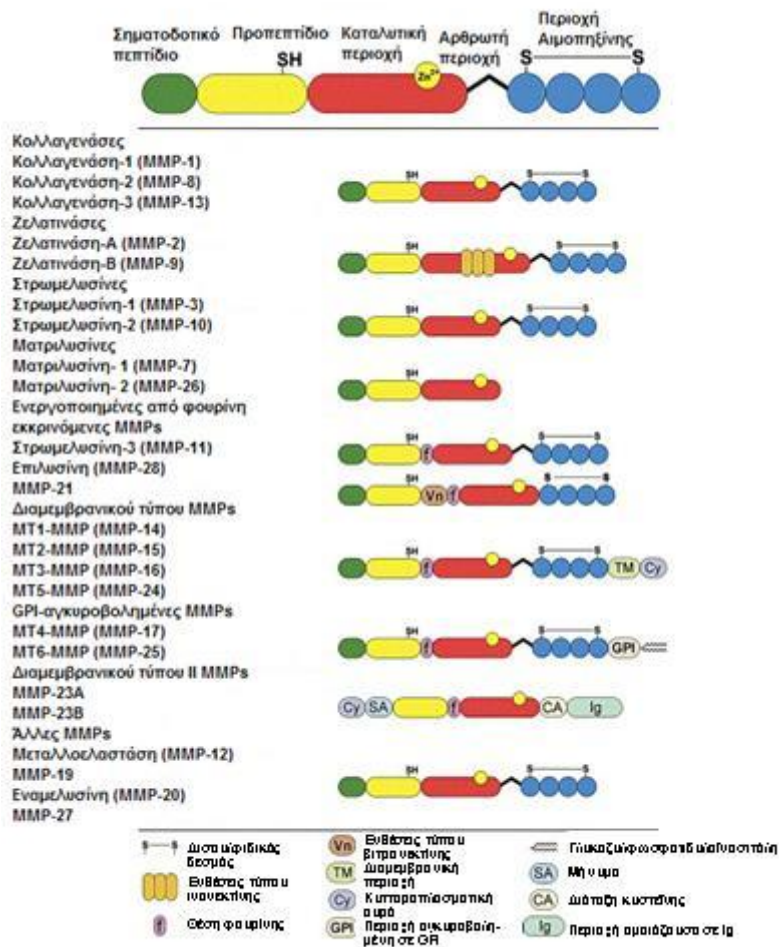


Εικόνα 18. Δομή των MMPs. Οι Ματριλυσίνες είναι MMPs με τον ελάχιστο αριθμό δομικών περιοχών. Περιέχουν ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο (Pre) για έκκριση και ένα προπεπτιδίο (Pro) που διατηρεί το ένζυμο σε ανενεργή μορφή αλληλεπιδρώντας με τη δεσμευτική θέση Zn^{2+} της καταλυτικής περιοχής. Οι κολλαγενάσες, οι στρωμελυσίνες, η μεταλλοελαστάση, η εναμελυσίνη και η MMP-27 περιέχουν επιπλέον μια περιοχή τύπου αιμοπηξίνης που συνδέεται με την καταλυτική περιοχή μέσω μιας άρθρωσης. Περαιτέρω, οι ζελατινάσες χαρακτηρίζονται από μόρια ινονεκτίνης τύπου II που διευκολύνουν την αποδόμηση του κολλαγόνου/ζελατίνης, ενώ η στρωμελυσίνη 3, η MMP-21 και η επιλυσίνη ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια καθώς κατέχουν θέση διάσπασης που ομοιάζει στη φουρίνη. Οι MT-MMPs συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη είτε μέσω διαμεμβρανικής περιοχής (TM) (MT1-,2-,3-, 5-MMPs) είτε μέσω αγκυροβόλησης με γλυκοζυλ-

φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (GPI) (MT4-, 6- MMPs). Η MMP-23 είναι μια διαμεμβρανική MMP που αγκυροβολεί στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της αμινοτελικής περιοχής και χαρακτηρίζεται επίσης από μια μοναδική διάταξη κυστεΐνης και περιοχές που ομοιάζουν στην ανοσοσφαιρίνη (404).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ MMPs ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Οι MMPs διακρίνονται σε 5 υποκατηγορίες σύμφωνα με την ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα (Εικ. 19).



Εικόνα 19. Οργάνωση δομικών περιοχών των ανθρώπινων MMPs και ταξινόμηση σύμφωνα με τη δομή και την ειδικότητα του υποστρώματος (405).

1. Κολλαγενάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν την **MMP-1** (κολλαγενάση, κολλαγενάση-1, διάμεση κολλαγενάση ή κολλαγενάση των ινοβλαστών), η οποία παράγεται από ποικιλία κυττάρων όπως οι ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, την **MMP-8** (κολλαγενάση-2, ουδετερόφιλη κολλαγενάση ή PMN κολλαγενάση), που απαντάται μόνο στα ουδετερόφιλα κοκκία, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες MMPs, οι οποίες γρήγορα εκκρίνονται από τα κύτταρα παραγωγής τους (406) και **MMP-13** (κολλαγενάση-3), ένα ένζυμο το οποίο αρχικά περιγράφηκε στον καρκίνο του μαστού και πιθανά αναπαριστά την κυρίαρχη κολλαγενάση σε αρκετά τρωκτικά (407). Η MMP-13 έχει μεγαλύτερη ευαισθησία για το κολλαγόνο τύπου II (408). Τέλος, σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η **MMP-18** (κολλαγενάση 4) που μπορεί να αποδομήσει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των τύπων IV, V, IX και X κολλαγόνων, της ινονεκτίνης, της λαμινίνης, της ελαστίνης και ζελατίνης (409). Το κύριο γνώρισμα αυτών των ενζύμων είναι η ικανότητα να διασπούν τα διάμεσα κολλαγόνα I, II και III σε μια συγκεκριμένη θέση $\frac{3}{4}$ από το αμινοτελικό άκρο. Οι κολλαγενάσες μπορούν επίσης να αποδομήσουν έναν αριθμό άλλων μορίων της ΕΘΟ, αλλά και εκτός αυτής (410).

2. Ζελατινάσες, οι οποίες αρχικά ονομάζονταν τύπου IV κολλαγενάσες, περιλαμβάνουν την **MMP-2** (ζελατινάση Α ή 72-KDa τύπου IV κολλαγενάση) και την **MMP-9** (ζελατινάση Β ή 92-KDa τύπου IV κολλαγενάση (411). Διασπούν τα μετουσιωμένα κολλαγόνα, δηλ. τις ζελατίνες, το κολλαγόνο τύπου IV, V, VII, X, XI και XIV, την ινονεκτίνη, την ελαστίνη και τις πρωτεογλυκάνες (412). Περιέχουν 3 επαναλήψεις μιας περιοχής τύπου II ινονεκτίνης ενσωματωμένες στην καταλυτική περιοχή, οι οποίες δένονται στη ζελατίνη, τα κολλαγόνα και τη λαμινίνη. Η MMP-2 αποδομεί τα κολλαγόνα τύπου I, II και III, όχι όμως και η MMP-9. Η MMP-2 εκφράζεται ευρέως σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς. Η MMP-9 επάγεται κάτω από συνθήκες που απαιτούν ιστική αναδιαμόρφωση, όπως η επούλωση πληγών και η καρκινική διήθηση (409). Αν και ποντίκια με απουσία MMP-2 αναπτύσσονται χωρίς κάποια εμφανή ανωμαλία, μεταλλάξεις στην ανθρώπινη MMP-2, που έχουν ως αποτέλεσμα την απουσία του ενεργού ενζύμου, συνδέονται με μια αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή πολυκεντρικής οστεόλυσης, μια σπάνια γενετική διαταραχή που προκαλεί καταστροφή και

απορρόφηση των προσβαλλόμενων οστών. Αυτό υποστηρίζει ότι η MMP-2 στους ανθρώπους είναι σημαντική για την οστεογένεση (403).

3. Στρωμελυσίνες, οι οποίες περιλαμβάνουν τρία μέλη: την **MMP-3** (στρωμελυσίνη-1), την **MMP-10** (στρωμελυσίνη-2) και **MMP-11** (στρωμελυσίνη-3) (413). Η Στρωμελυσίνη 1 (MMP-3) και η 2 (MMP-10) έχουν παρεμφερείς ειδικότητες υποστρωμάτων, αλλά η MMP-3 έχει γενικά υψηλότερη πρωτεολυτική ικανότητα από την MMP-10. Εκτός από την διάσπαση συστατικών της ΕΘΟ η MMP-3 ενεργοποιεί έναν αριθμό πρόδρομων MMPs και η δράση της σε ένα μερικώς πρωτεολυμένο μόριο προ-MMP-1 είναι κρίσιμη για τη δημιουργία πλήρως ενεργών MMP-1. Η MMP-11 καλείται στρωμελυσίνη 3, αλλά συνήθως κατατάσσεται στις «άλλες MMPs» γιατί η αμινοξική ακολουθία και ειδικότητα υποστρώματός της αποκλίνουν από της MMP-3, ενώ μπορεί να εκκριθεί ως δυνητικά ενεργή πρωτεάση (408). Οι στρωμελυσίνες έχουν σχετικά ευρεία ειδικότητα υποστρώματος, καταλύοντας την αποδόμηση πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων ΕΘΟ και μη-ΕΘΟ.

4. Ματριλυσίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έλλειψη της περιοχής τύπου αιμοπηξίνης. Η ματριλυσίνη 1 (**MMP-7**) και η ματριλυσίνη 2 (**MMP-26**), που καλείται και ενδομετάση (endometase), ανήκουν στην ομάδα αυτή. Εκτός από τα συστατικά της ΕΘΟ, η MMP-7 αποδομεί μόρια της κυτταρικής επιφάνειας, όπως η προ-α-defensin, ο συνδέτης Fas, ο πρόδρομος παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF)-α και η E-cadherin (E-καδερίνη). Η MMP-26 επίσης διασπά έναν αριθμό ΕΘΟ συστατικών (403).

5. Μεμβρανικού τύπου MMPs (MembraneType MT-MMPs), οι οποίες αποτελούνται από 6 μέλη (**MT1-, MT2-, MT3-, MT4-, MT5-, MT6-MMP** ή **MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25**) (414). Οι MT-MMPs έχουν τη μοναδική ιδιότητα να κατέχουν μια υδρόφοβη αλληλουχία πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου, η οποία επιτρέπει την είσοδο της πρωτεΐνης εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπου η καταλυτική περιοχή εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ διαθέτουν μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή (20-26 αμινοξέα). Οι MT4 και MT6-MMP προσδένονται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω γλυκοζυλ-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI) (403). Διαλυτές MT-MMPs έχουν περιγραφεί σε καλλιέργειες ορισμένων καρκινικών κυτταρικών σειρών (415). Εκτός της MT4-MMP θεωρούνται ενεργοποιητές της MMP-2

(414, 416). Η MT4-MMP διαφέρει δομικά από τις υπόλοιπες MT-MMPs και ο φυσιολογικός της ρόλος είναι άγνωστος (417). Αυτά τα ένζυμα μπορούν ακόμη να αποδομήσουν έναν αριθμό ΕΘΟ συστατικών και η MT1-MMP (MMP-14) έχει κολλαγονο-λυτική δράση στα τύπου I, II και III κολλαγόνα. Ποντίκια με απουσία MT1-MMP παρουσιάζουν σκελετικές ανωμαλίες κατά τη μετεμβρυϊκή ανάπτυξη που οφείλονται πιθανότατα σε έλλειψη κολλαγονο-λυτικής δραστηριότητας. Η MT1-MMP επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Η MT5-MMP (MMP-24) είναι ειδική για τον εγκέφαλο και εκφράζεται κυρίως στην παρεγκεφαλίδα. Η MT6-MMP (MMP-25) εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος και σε αναπλαστικό αστροκύτωμα και γλοιοβλάστωμα, αλλά όχι σε μηνιγγίωμα (403).

Ορισμένες MMPs δεν ανήκουν σε καμμία από τις προηγούμενες κατηγορίες. Η **MMP-12** (μεταλλοελαστάση ή ελαστάση των μακροφάγων ποντικού) αποδομεί το κολλαγόνο τύπου IV και τη μη-διαλυτή ελαστίνη, αλλά σε αντίθεση με τις ζελατινάσες δεν διασπά τις ζελατίνες (418). Η **MMP-19** παρουσιάζει μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά από τις άλλες MMPs των θηλαστικών και πιθανά αποτελεί νέα κατηγορία αυτών των ενζύμων (419). Η MMP-19 ταυτοποιήθηκε με κλωνοποίηση c-DNA από ήπαρ και ως αυτοαντιγόνο προερχόμενο από T κύτταρα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RASI) (403). Η **MMP-20** (εναμελυσίνη) έχει πιο πρόσφατα κλωνοποιηθεί από κύτταρα οδοντοβλαστών και στερείται αρκετών δομικών χαρακτηριστικών σε σχέση με τις υπόλοιπες MMPs.

Η τελευταία προσθήκη στην οικογένεια των MMPs είναι η **MMP-28**, η επιλυσίνη, η οποία εκφράζεται κυρίως στα κερατινοκύτταρα και συμβάλλει στην επούλωση των τραυμάτων (420-21)

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ MMPs

Οι MMPs παρουσιάζουν διαφορετική αλλά μερικά επικαλυπτόμενη ειδικότητα ως προς τα υποστρώματα, στα οποία δρουν (Πίνακας 5).

Για σειρά ετών επικρατούσε η άποψη ότι οι MMPs πρωταρχικά αποδιοργανώνουν την ΕΘΟ, ενώ έχει γίνει εκτεταμένη ανασκόπηση για την ειδικότητά τους για συγκεκριμένα υποστρώματα της ΕΘΟ. Υπήρχε η πεποίθηση ότι η διευκόλυνση της κυτταρικής μετανάστευσης ήταν το κύριο

αποτελεσμα της μεσολαβούμενης από MMPs αποδιοργάνωσης των φραγμών της ΕΘΟ. Παρόλα αυτά, οι επιδράσεις της αποδιοργάνωσης της ΕΘΟ στη συμπεριφορά του κυττάρου είναι πιθανόν να είναι εξαιρετικά σύνθετες, λόγω τουλάχιστον ενός συνδυασμού αλλαγών στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και των αποδομημένων πρωτεϊνών της ΕΘΟ από τη μια μεριά και της απελευθέρωσης ενός πλήθους δεσμευμένων με την ΕΘΟ κυτοκινών από την άλλη.

Αρκετά προϊόντα αποδόμησης της ΕΘΟ αποδείχτηκε ότι κατέχουν μοναδικές βιολογικές ιδιότητες, τουλάχιστον εν μέρει με την αποκάλυψη νέων θέσεων αναγνώρισης για υποδοχείς ΕΘΟ στην κυτταρική επιφάνεια που μπορούν να πυροδοτήσουν ποικιλία κυτταρικών σημάτων. Για παράδειγμα, η διάσπαση του κολλαγόνου IV και της λαμινίνης-5 προκαλεί την έκθεση κρυπτικών πεπτιδίων που προάγουν τη μετανάστευση (422).

Οι **διάμεσες κολλαγενάσες** είναι οι πιο αυστηρές ως προς το υπόστρωμα και διασπούν ένα ειδικό πεπτιδικό δεσμό στην τριπλή έλικα των ινωδών κολλαγόνων I, II και III (423) καθώς επίσης και κολλαγόνα τύπου VII και X. Δεν μπορούν να αποδομήσουν ζελατίνες, κολλαγόνο τύπου IV ή άλλες πρωτεΐνες της ΕΘΟ.

Σε αντίθεση, οι **δύο ζελατινάσες**, η ζελατινάση A (MMP-2) και η ζελατινάση B (MMP-9) έχουν ως στόχους τα κολλαγόνα τύπου I (ζελατινάση A), V, VII και X, τις ζελατίνες (προέλευση ονόματος) και τον τύπο IV του κολλαγόνου που βρίσκεται στις βασικές μεμβράνες. Επίσης αποδομούν και ινονεκτίνες (423).

Μεταξύ των MMPs, οι **στρωμελυσίνες** έχουν το πιο ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Οι στρωμελυσίνες -1 και -2, (MMP-3 και MMP-10 αντίστοιχα), αποδομούν πρωτεογλυκάνες, ζελατίνη, λαμινίνη, ινονεκτίνη και ελαστίνη. Σε αντίθεση με την MMP-1 και τις ζελατινάσες, οι στρωμελυσίνες αποδομούν τα κολλαγόνα τύπου IV, V, VIII και IX μόνο στη μη ελικοειδή περιοχή και το τύπου I στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου (424). Η στρωμελυσίνη-3 (MMP-11) παρουσιάζει ασθενή πρωτεολυτική δραστηριότητα

Η στρωμελυσίνη-1 διασπά ινωδογόνο και πολυμερισμένη ινική (425). Η μικρότερη MMP, η **ματριλυσίνη-1** (MMP-7) (MB 28 kDa) κατέχει ευρεία και ισχυρή πρωτεολυτική δραστηριότητα. Είναι πιο αποτελεσματική πρωτεογλυκανάση σε σχέση με τη στρωμελυσίνη-1 ή -2 και επίσης αποδομεί

κολλαγόνο τύπου IV, μη διαλυτή ελαστίνη, λαμινίνη, ινονεκτίνη, ζελατίνη και εντακτίνη. Η ματριλυσίνη-1 παράγεται από συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, με σαφή υπερίσχυση των αδενικών επιθηλίων (426).

Η τελευταία υποομάδα των MMPs περιλαμβάνει πέντε **μεμβρανο-συνδεόμενες** MMPs: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP. Η MT1-MMP (MMP-14) αποδομεί εντός του προπεπτιδίου της ζελατινάσης A και κολλαγενάσης-3 με αποτέλεσμα να τις ενεργοποιεί (427, 428). Ανάλυση ανασυνδυασμένης MT1-MMP, η οποία στερείται το διαμεμβρανικό τμήμα, απέδειξε ότι η πρωτεάση αυτή αποδομεί ζελατίνη (Imai και συν. 1996) καθώς επίσης και φυσικά κολλαγόνα τύπου I, II και III σε χαρακτηριστικά κλάσματα 3/4 και 1/4 (429).

Καθαρή MT1-MMP επίσης αποδομεί ινονεκτίνη, τενασκίνη, νιδογόνο, αγκρεκάνη και περλεκάνη. Μόνο η MT2-MMP επιδεικνύει πρωτεολυτική δραστηριότητα έναντι της λαμινίνης (430). Η MT1-MMP καθώς και η MMP-2, συνδεόμενες στη μεμβράνη, αποδομούν πολυμερισμένη, μη διαλυτή ινική με μικρή όμως αποτελεσματικότητα (431). Η MT1-MMP υδρολύει το κολλαγόνο τύπου I 4 ή 6,5 φορές πιο αποτελεσματικά από τα κολλαγόνα τύπου II και III, ενώ η MMP-1 αποδομεί το κολλαγόνο τύπου III πιο δραστικά από τα υπόλοιπα δύο (432). Η MT1-MMP επίσης διασπά την πρωτεογλυκάνη των χόνδρων, βιτρονεκτίνη, τον αναστολέα της α_1 -πρωτεΐνάσης και την α_2 -μακροσφαιρίνη. Η δραστηριότητα έναντι του κολλαγόνου τύπου I αυξάνει συνεργιστικά όταν επωάζεται ταυτόχρονα με MMP-2. Φαίνεται ότι η MT1-MMP μοιράζεται κοινά υποστρώματα τόσο με την MMP-1 όσο και με την MMP-2 και ότι η πρωτεολυτική της δραστηριότητα εξαρτάται από την ενεργοποίηση της προMMP-2. (432). Είναι πιθανό όμως η ειδικότητα της κυτταρο-δεσμευμένης MT1-MMP να είναι διαφορετική από εκείνη της διαλυτής μορφής.

Οι MMPs μπορούν να αποδομούν μη-ΕΘΟ υποστρώματα, όπως αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, παράγοντες κυτταρικού θανάτου και επιβίωσης και ρύθμισης της αγγειογένεσης. Η ικανότητα απελευθέρωσης ενεργών μορίων της κυτταρικής μεμβράνης έχει προσδώσει στις MMPs την ιδιότητα της "sheddase" (σεντάσης) (402-3) (Πίνακας 5).

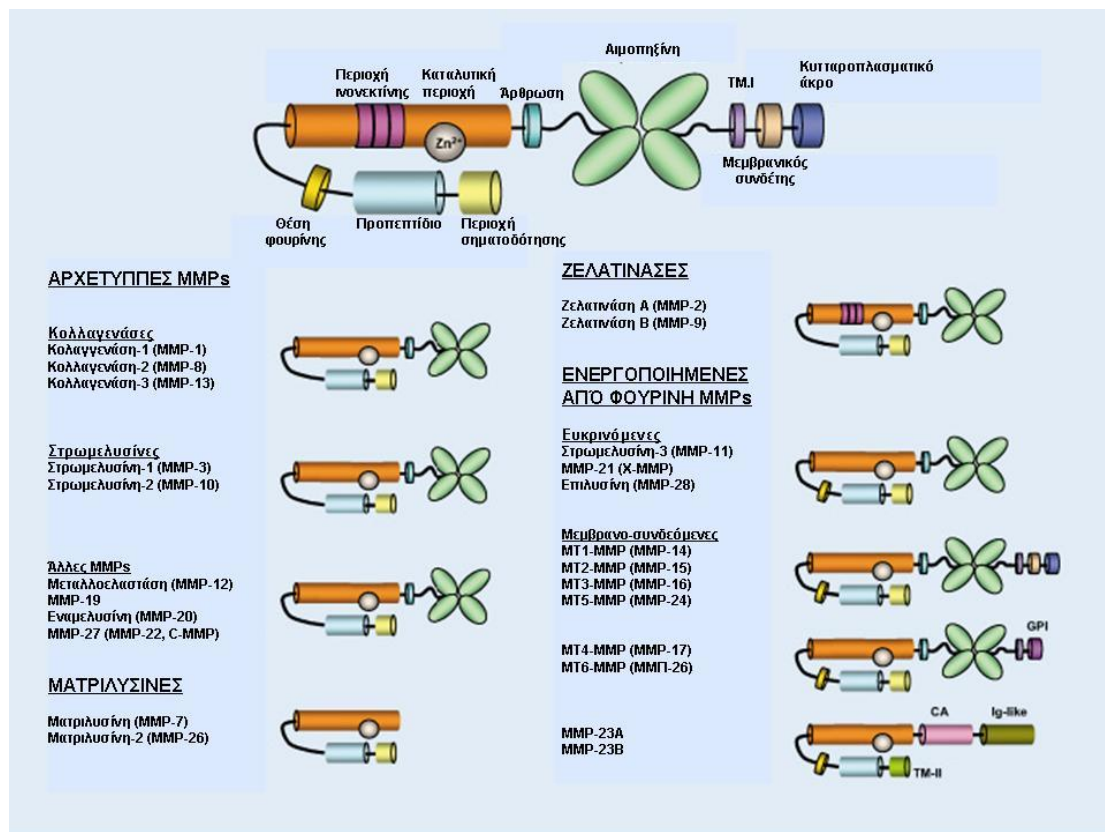
Υποδοχείς και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης καθώς και πρωτεογλυκάνες είναι επίσης στόχοι της μεσολαβούμενης από MMP

διάσπασης και αποβολής. Η E-cadherin (E-καδερίνη) διασπάται από τις MMP-3 και MMP-7, ενώ η εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα υαλουρονικού οξέος (HA) CD44 διασπάται από την MMP-14

Τέλος, μια ποικιλία κυτοκινών, υποδοχέων κυτοκινών και χημειοκινών έχει παρατηρηθεί ότι υφίσταται διάσπαση με μεσολάβηση MMP

ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ MMPs

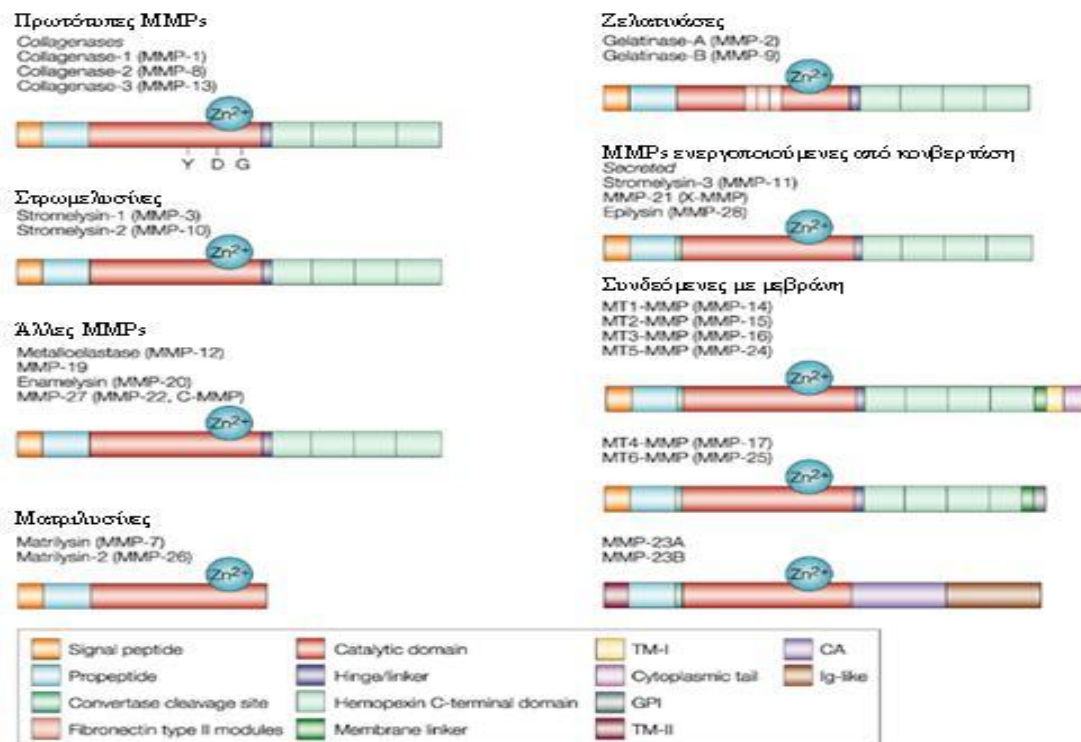
Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ματριξίνες συντίθεται ως προ-προένζυμα και εκκρίνονται ως ανενεργή προένζυμα (433). Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των κλωνοποιημένων MMPs αποκάλυψε την παρουσία διακριτών περιοχών-domains, οι οποίες είναι συντηρημένες εξελικτικά, μεταξύ των μελών της οικογένειας (434) (Εικ. 20-22).



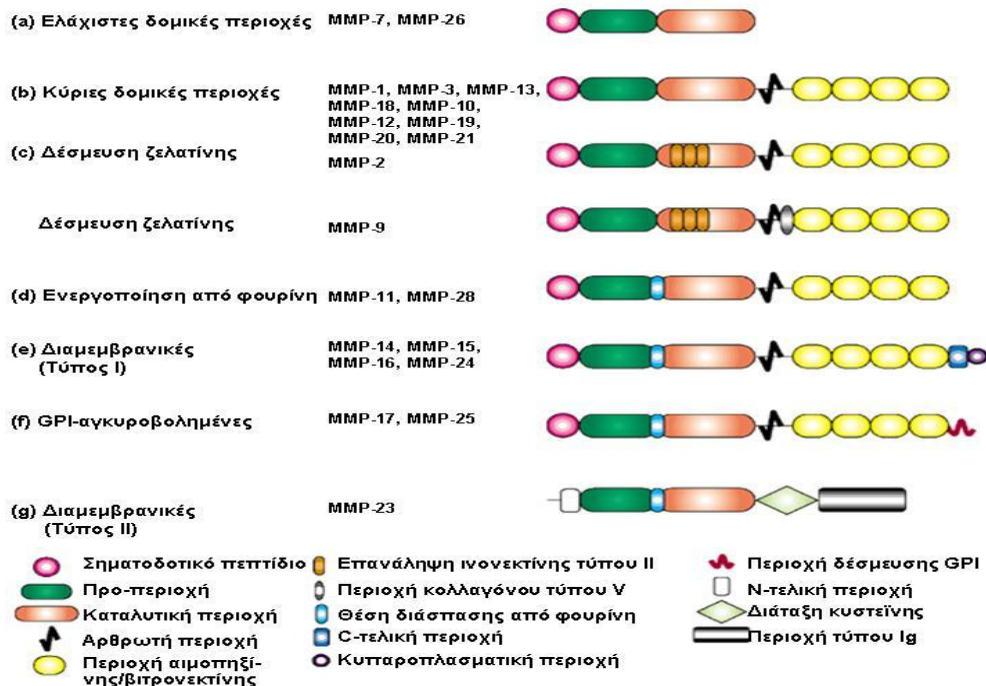
Εικόνα 20. Ποικιλία των ανθρώπινων MMPs: ταξινόμηση με βάση τη δομική οργάνωση (Fulgueras και συν. 2004).

Περιοχή σηματοδότη: Είναι μια αλληλουχία μηνυματοδότησης, υπεύθυνη για την έκκριση της πρωτεΐνης και διασπάται πριν την απελευθέρωση στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η MT4-MMP στερείται της περιοχής αυτής.

Περιοχή προπεπτιδίου: (περίπου 80 αμινοξέα και MB 8-10 KDa). Περιέχει τμήμα 8 αμινοξέων [(PRCG(V/N)PDV] το οποίο διατηρείται σε όλες τις MMPs και ονομάζεται διακόπτης κυστεΐνης. Η κυστεΐνη (C) είναι ο συνδέτης της ενεργής θέσης του Zn^{2+} . Η περιοχή αυτή αναδιπλώνεται (Εικ. 20) και καλύπτει την καταλυτική θέση διατηρώντας έναν ανενεργό σχηματισμό, μετά την απελευθέρωση στο εξωκυττάριο περιβάλλον, γνωστό ως ζυμογόνο (403). Αποτελείται από τρεις α-έλικες και συνδετικές θηλιές. Η πρώτη θηλιά μεταξύ της έλικας 1 και της 2 είναι μια περιοχή ευαίσθητη στις πρωτεάσεις, «περιοχή δόλωμα». Η περιοχή του πεπτιδίου μετά την έλικα 3 είναι η περιοχή του «διακόπτη κυστεΐνης». Το προπεπτιδίο της MT1-MMP απαιτείται για τη δέσμευση με τον TIMP-2 και την επακόλουθη ενεργοποίηση της προ-MMP-2



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση της δομής των 24 ανθρώπινων MMPs, οι οποίες ταξινομούνται σε 4 διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με την οργάνωση των δομικών περιοχών τους. Οι αρχέτυπες MMPs περιέχουν ένα πεπτιδίο σηματοδότη (απαραίτητο για την έκκρισή τους), το προπεπτιδίο, την καταλυτική περιοχή που δεσμεύει τον Zn^{++} και την καρβοξυ-τελική περιοχή της αιμοπηξίνης. Υ, D, και G συμβολίζουν τα αμινοξέα τυροσίνης, ασπαρτικού οξέος και γλυκίνης, τα οποία είναι παρόντα στην καταλυτική περιοχή όλων των κολλαγενασών. Οι MMPs ενεργοποιούμενες από κονβερτάση εμφανίζουν στο προπεπτιδίο περιοχή, η οποία στοχεύεται από πρωτεάσες τύπου φουρίνης. Οι MMPs αυτής της ομάδας μπορεί να είναι είτε εκκρινόμενες, είτε δεσμευμένες στη μεμβράνη μέσω γλυκοζυλ-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (τύπος II) ή διαμεμβρανικού τμήματος (τύπος I). Οι MMP-23A και MMP-23 B περιέχουν επαναλήψεις κυστεΐνης και περιοχές τύπου ανοσοσφαιρίνης στο καρβοξυ-τελικό τμήμα τους (435).



Εικόνα 22. Ομαδοποίηση των MMPs με βάση την πολυπλοκότητα των δομικών περιοχών (Somerville και συν. 2003).

Η **καταλυτική περιοχή** (περίπου 165 αμινοξέα και MB 21 KDa) (Mignatti και Rifkin 2000) περιέχει την αλληλουχία HEXXHXXGXXH, στην οποία τα τρία αμινοξέα ιστιδίνης (H) αποτελούν τους τρεις συνδέτες του Zn^{2+} . Σημειακές μεταλλάξεις ένθεσης σ' αυτή την αλληλουχία καθιστούν τα ένζυμα καταλυτικά ανενεργά (401). Τέλος, η καταλυτική περιοχή είναι η θέση αλληλεπίδρασης με ειδικούς αναστολείς των MMPs, τους TIMPs και συνεισφέρει στον καθορισμό της ειδικότητας του υποστρώματος (Mignatti και Rifkin 2000).

Η **περιοχή τύπου αιμοπηξίνης** παίζει, επίσης, ρόλο στην ειδικότητα του υποστρώματος. Δεν υπάρχει στις MMP-7,-21,-22 και -26. Η περιοχή τύπου αιμοπηξίνης (περίπου 210 αμινοξέα) στο καρβοξυτελικό άκρο έχει σχήμα ελλειψοειδούς δίσκου με δομή τεσσάρων κυστοειδών β-προπελλών (436) με μόνο ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυστών 1 και 4. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τις πρωτεΐνες του πλάσματος της οικογένειας της αιμοπηξίνης, όπως είναι η βιτρονεκτίνη. Οι ζελατινάσες (MMP-2 και MMP-9) κατέχουν μια μοναδική **περιοχή δέσμευσης κολλαγόνου**, η οποία αποτελείται από τρεις συνακόλουθες επαναλήψεις 58 αμινοξέων, αλληλουχία ομοιάζουσα της ινονεκτίνης τύπου II. Η καταλυτική περιοχή χωρίζεται από την περιοχή της αιμοπηξίνης από μια **αρθρωτή περιοχή (hingeregion)** που ποικίλει σε μήκος και σύσταση. Δομικές διαφορές αυτής της περιοχής συνεισφέρουν στην ειδικότητα υποστρώματος μεταξύ των κολλαγενασών και στρωμελυσινών (437).

Ένα **μικρό διαμεμβρανικό τμήμα** (10-15 υδρόφοβα αμινοξέα) στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου χαρακτηρίζει τις μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεϊνάσες (MT-MMPs τύπου I) και συνδέει τα ένζυμα αυτά με την κυτταρική επιφάνεια.

Περιοχή γλυκοζυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI): Μέσω αυτής της περιοχής προσδένονται στην κυτταρική μεμβράνη οι δεσμευμένες στην μεμβράνη MMP (MT-MMPPs τύπου II) (403).

Η στρωμελυσίνη-3, οι MT-MMPs και *X.laensis* MMP έχουν ένα κοινό τμήμα στο τέλος του προπεπτιδίου, που αναγνωρίζεται από ένζυμα ομοιάζοντα στη **φουρίνη (αλληλουχία RX(K/R)R)** (Arg-Arg / Lys-Arg), το οποίο επιτρέπει τη διάσπαση του προπεπτιδίου ενδοκυττάρια στη συσκευή Golgi (422). Η MMP του *X.laensis* (MMP-21) περιέχει μια ένθεση 37 αμινοξέων

μεταξύ του προπεπτιδίου και του τύπου φουρίνης τμήματος, ένθεση η οποία είναι μοναδική για όλες τις MMPs, που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (438).

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ MMPs

Η δυναμική ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και αποδόμησης των συστατικών της ΕΘΟ ελέγχεται στενά από τις MMPs και τους TIMPs με στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ιστική ακεραιότητα.

Οι MMPs, ως εκ τούτου, παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές πορείες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή, εμβρυογένεση, αύξηση των οστών, σχηματισμό σμάλτου δοντιών, επούλωση τραυμάτων και αγγειογένεση. Επίσης εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, ορισμένες ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος και στην καρκινική διήθηση και μετάσταση (439).

1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Αναπαραγωγή και εμβρυογένεση

Αλλαγές στη δραστηριότητα των MMPs έχουν παρατηρηθεί σε πολλά στάδια του γυναικείου αναπαραγωγικού κύκλου.

Η αναδόμηση του ενδομητρίου περιλαμβάνει αλλαγές στα επίπεδα διαφορετικών MMPs, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αποδόμηση του ιστού κατά τη διάρκεια της έμμηνης ρύσης. Η ματριλυσίνη (MMP-7) εκφράζεται μόνο στο υπερπλαστικό, όψιμο εκκρινικό και στο επιθήλιο της εμμήνου, όχι όμως στο πρώιμο ή μεσο-εκκρινικό ενδομήτριο. Η ωορρηξία προϋποθέτει συμμετοχή MMPs και TIMPs (440). Για την εμφύτευση του εμβρύου, μετά τη γονιμοποίηση, στα τοιχώματα της μήτρας απαιτείται η παρουσία ζελατινάσης Β (MMP-9)(441). Γεγονότα σχετιζόμενα με την εγκυμοσύνη και τον τοκετό, όπως η διαστολή του τραχήλου και η υποστροφή της μήτρας χρειάζονται τη συγχρονισμένη δράση MMPs και TIMPs. Κατά τη διάρκεια των ωδίνων, τα επίπεδα της διάμεσης κολλαγενάσης (MMP-1) στον τράχηλο αυξάνονται 23 φορές σε σχέση με εκείνα της εμμήνου ρήσεως, ενώ ο TIMP-1 μόνο διπλασιάζεται. Αυτή η ανισορροπία συνεισφέρει στη διάσπαση του κολλαγόνου και στη διαστολή του τραχήλου .

Οι γρήγορες μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια

της εμβρυϊκής ανάπτυξης απαιτούν σημαντική αναδόμηση της ΕΘΟ. Η ρύθμιση της δραστηριότητας των MMPs και TIMPs στην ΕΘΟ διευκολύνει την κυτταρική μετανάστευση και αύξηση. Οι Flenniken και Williams (442) έδειξαν ότι η έκφραση του TIMP-1 εντοπίζεται σε περιοχές με εναπόθεση ΕΘΟ και ιστοί που υφίστανται οστεογένεση είναι οι πρώτοι που εκφράζουν TIMP-1.

Επιπλέον, οι MMPs ελέγχουν την υποστροφή του μαζικού αδένου μετά τον απογαλακτισμό. Η έκφραση της στρωμελυσίνης-1 (MMP-3) αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αποδόμησης της βασικής μεμβράνης, η έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την παραγωγή γάλακτος σταματά και υπάρχει σημαντική απόπτωση των ενδοθηλιακών, μυοεπιθηλιακών και εκκριτικών επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία αντικαθίστανται από λιπώδη ιστό (443).

Ανάπτυξη οστών και σμάλτου δοντιών

Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης και αναδόμησης των οστών, τα οργανικά και ανόργανα συστατικά του στρώματος των οστών αποδομούνται. Οι TIMP-1 και -2 έχει δείχθει ότι αναστέλλουν την απορρόφηση προτείνοντας ένα ρόλο για αυτούς τους αναστολείς στον ανασχηματισμό των οστών. Ομοίως, ο σχηματισμός του σμάλτου των δοντιών περιλαμβάνει μια διαδικασία απομάκρυνσης του οργανικού στρώματος μέσω πρωτεόλυσης από τα ένζυμα της ΕΘΟ κυρίως τις αμελογενίνες. Η εναμελυσίνη, μια MMP που εκφράζεται μόνο στον οδοντικό ιστό, θα μπορούσε να παίξει αυτό το ρόλο στο σχηματισμό του σμάλτου (444).

Επούλωση τραυμάτων και αγγειογένεση

Η επούλωση των τραυμάτων είναι σύνθετη πορεία που περιλαμβάνει φλεγμονή, αγγειογένεση και επαναεπιθηλιοποίηση. Οι διαδικασίες αυτές απαιτούν πρωτεόλυση της βασικής μεμβράνης και του στρώματος. Αν και ο ρόλος των MMPs στις διαδικασίες αυτές είναι ασαφής, η αυξημένη έκφραση αυτών σε τραυματισμένους ιστούς ενισχύει το ρόλο τους σ' αυτό, στις εκδορές (446) και στα εγκαύματα (447) η έκφραση των ζελατινών Α και Β αυξάνεται. Οι Tarlton και συν. (448) έδειξαν ότι στα επιμολυσμένα και χρόνια τραύματα η ζελατινάση Β αυξάνεται, ενώ μειώνεται καθώς η επούλωση εξελίσσεται. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι MMPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης βαρύτητας της επιμόλυνσης.

Στην υπερτασική καρδιακή νόσο παρατηρείται άθροιση ινώδους κολλαγόνου στο συνδετικό μυοκαρδιακό ιστό (449). Η ίνωση αυτή σχετίζεται με ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης. In vitro και in vivo μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αγγειοτενσίνη II και η αλδοστερόνη αυξάνουν τη σύνθεση των κολλαγόνων I και III από τις μυοκαρδιακές ινοβλάστες. Επίσης, η αγγειοτενσίνη II αναστέλλει την αποδόμηση του κολλαγόνου από τη διάμεση κολλαγενάση. Αντίθετα, η προσταγλανδίνη E₂ αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα αυτής (450).

Οι MMPs παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, πορεία που οδηγεί στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα (451). Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η νεοαγγειογένεση ρυθμίζεται αυστηρά και παίζει κρίσιμο ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην ιστική αναγέννηση μετά από βλάβη ή στις αναπαραγωγικές λειτουργίες του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Μετά από ενεργοποίηση από αυξητικούς παράγοντες, οι MMPs αποδομούν τη βασική μεμβράνη προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων και επιτρέπουν έτσι τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων για να σχηματίσουν νέα αγγεία (452).

2. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Παθήσεις των αρθρώσεων και χόνδρων

Ο καθοριστικός ρόλος της ΕΘΟ στην αύξηση των ιστών και στην ανάπτυξη, υποδεικνύει ότι αλλαγές στην ισορροπία μεταξύ MMPs και TIMPs συνεισφέρουν στην παθογένεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Οι ρευματικές παθήσεις αποτελούν παράδειγμα διατάραξης αυτής της ισορροπίας προς όφελος των MMPs, οι οποίες εμπλέκονται στην αποδόμηση του χόνδρου στην οστεοαρθρίτιδα και των αρθρικών ιστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (453). Αρθρικά κύτταρα σε καλλιέργειες απελευθερώνουν κολλαγενάσες και στρωμελυσίνη . mRNA και πρωτεΐνες MMPs είναι παρόντα στις αρθρώσεις, ενώ η καταστροφή των οστών και των χόνδρων μπορεί να παρεμποδιστεί από αναστολείς των MMPs (454).

Παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος

Η διάμεση κολλαγενάση, η στρωμελυσίνη-1 και οι ζελατινάσες A και B υπερεκφράζονται στις αλλοιώσεις εγκεφάλου ασθενών με πολλαπλή

σκλήρυνση σε σύγκριση με φυσιολογικά νεκροτομικά δείγματα (455). MMPs παρούσες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό καταλύουν την αποδόμηση της μυελίνης (456-7). Η κυτοκίνη ιντερφερόνη β, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης, αναστέλλει τη ζελατινάση Β. Άλλη δράση των MMPs αποτελεί η διαταραχή της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που επιτρέπει τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων μέσα στο ΚΝΣ.

Έχει επίσης προταθεί ότι οι MMPs πιθανά υπερεκφράζονται στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο Alzheimer δεδομένου ότι σε καλλιέργειες γλοιακών και νευρωνικών κυττάρων ιππόκαμπτου αυξάνεται η έκφραση μερικών MMPs όταν εκτίθενται σε πρωτεΐνες β-αμυλοειδούς. Ωστόσο ο ρόλος των MMPs στη νόσο Alzheimer είναι υπό διερεύνηση. Αντίθετα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί, όπου η ζελατινάση Α μειώνει (458) ή αυξάνει (459) τα επίπεδα του β-αμυλοειδούς.

MMPs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Έκφραση των MMPs στον καρκίνο

Η ενοχοποίηση της συμμετοχής των MMPs στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου προέρχεται από πειραματικά μοντέλα διήθησης *in vitro* και διήθησης και μετάστασης *in vivo* όπου η έκφραση συγκεκριμένων MMPs στα καρκινικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι επάγει την καρκινική αύξηση, διήθηση και μετάσταση, ενώ φυσικοί και συνθετικοί αναστολείς των MMPs περιορίζουν ή ακόμα και αναστέλλουν την καρκινική ανάπτυξη (422).

Κύτταρα καρκινικών σειρών ουροδόχου κύστης που εκφράζουν την MMP-2, ινοσαρκώματος για τη MMP-9 και πνεύμονα για τη MT1-MMP, όταν ενίονται ενδοφλέβια οδηγούν στο σχηματισμό πνευμονικών μεταστάσεων (460)

Μελέτες σε ανθρώπινα καρκινώματα μας πληροφορούν για την αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα των MMPs και τη συσχέτιση αυτών με τη διηθητική ικανότητα και την πτωχή πρόγνωση, υποστηρίζοντας με αυτό τον τρόπο τα πειραματικά δεδομένα. (422).

Ο υψηλός λόγος MMP:TIMP έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την επιθετικότητα αρκετών συμπαγών όγκων. Η χαμηλή έκφραση των TIMPs συσχετίζεται με αυξημένη διηθητικότητα διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών μύς και άνθρωπο (461).

Η αυτόματη απώλεια του μεταστατικού φαινότυπου μιας ανθρώπινης

κυτταρικής σειράς επιδερμοειδούς καρκινώματος συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση του TIMP-2 (462).

Επίσης, έχει δειχθεί ότι ορισμένες MMPs όπως οι MMP-7, -9, -11, επάγουν τη δημιουργία μηνυμάτων που προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση και επάγουν την κυτταρική επιβίωση. Η MMP-7 αποδομεί το συνδέτη του Fas, η MMP-9 ενεργοποιεί τον TGF- β ενώ ο μηχανισμός για την MMP-11 είναι άγνωστος (422).

Οι MMPs υποκινούν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων μέσω αλληλεπιδράσεων με μόρια της ΕΘΟ και ιντεγκρίνες, διασπώντας ισουλινοειδείς αυξητικούς παράγοντες και απελευθερώνοντας διαμεμβρανικούς πρόδρομους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGF- α . Οι MMPs υποκινούν την αγγειογένεση με την αύξηση στη βιοδιαθεσιμότητα προ-αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων. Οι MMPs επίσης ρυθμίζουν τη διήθηση και μετανάστευση μέσω αποδόμησης δομικών συστατικών της ΕΘΟ και ιδιαίτερα των λαμινίνη-5, IL-6R, TGF- β και TNF (463).

Η ΠΗΓΗ ΤΩΝ MMPs ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Οι MMPs εκφράζονται σε αφθονία στους καρκινικούς ιστούς. Η αυξημένη δραστηριότητα των MMPs αρχικά θεωρήθηκε ότι οφείλεται στην παραγωγή από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα ενζύμων που βοηθούν στη διήθηση και μεταστατική διασπορά του πρωτοπαθούς όγκου.

Πολλές επιθηλιακές καρκινικές κυτταρικές σειρές έχουν την ικανότητα παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία συμβάλλουν στην κυτταρική διήθηση σε invitro δοκιμές μετανάστευσης/διήθησης, μέσω αποδόμησης διαφόρων υποστρωμάτων, όπως το κολλαγόνο τύπου I ή το Matrigel (464). Εντούτοις, έχει αποδειχθεί με insitu υβριδισμό ότι πολλές MMPs που είναι παρούσες στο μικροπεριβάλλον του όγκου εκφράζονται από στρωματικά κύτταρα και όχι από τον όγκο. Για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού οι MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-12 και MMP-13 εντοπίστηκαν στο στρώμα του όγκου.

Με insitu υβριδισμό έχει επίσης δειχθεί εντόπιση mRNA των MMP-1, -2, -3, -9 και -14 στις ινοβλάστες πλησίον των διηθητικών καρκινικών κυττάρων σε καρκινώματα παχέος εντέρου, πνεύμονα, προστάτη, ωθηκών και κεφαλής-τραχήλου (465). Επιθηλιακή εντόπιση μεταγράφων έχει παρατηρηθεί σε καρ-

κινώματα παγκρέατος, προστάτη, εγκεφάλου (464) και ουροδόχου κύστης (466). Παράλληλα, η εξέταση των καρκινικών ιστών με ανοσοϊστοχημεία ανέδειξε κυρίαρχη εντόπιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα.

Οι μελέτες αυτές προτείνουν ότι ο όγκος σε επικοινωνία με το περιβάλλον του, μπορεί να διεγείρει την έκφραση των MMPs, η οποία με τη σειρά της δεν θα διευκολύνει μόνο τη διήθηση και μετάσταση, αλλά ακόμα θα προωθήσει την εξέλιξη του όγκου μέσω αρκετών οδών (402).

Η παραγωγή MMPs από τα στρωματικά πλησίον του όγκου κύτταρα οφείλεται σε διέγερσή τους από παράγοντες των ιδίων των κυττάρων, όπως η μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη EMMPRIN. Ο EMMPRIN επάγει τη σύνθεση των MMP-1, -2, -3 από τις στρωματικές ινοβλάστες, οι οποίες ακολούθως εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο και μπορούν να δεσμευθούν ως ώριμα-ενεργά μόρια από τα καρκινικά κύτταρα (467-8). Η σταδιο-εξαρτώμενη έκφραση των MMPs αντιστοιχεί σε συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια, όπως *ras*, *myc*, ως αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής του DNA κατά τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα τροποποίηση της ρύθμισης των μηνυματοδοτικών οδών που στοχεύουν στον υποκινητή των MMP γονιδίων. Η ταυτόχρονη απώλεια αρνητικών ρυθμιστών όπως το γονίδιο *jun-B* και το όφελος σε θετικούς ρυθμιστές, όπως *jun-C* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σύνθεσης των MMPs. Καθώς ο όγκος εξελίσσεται, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκφράζουν συνεχώς υψηλά επίπεδα πρωτεασών και κυρίως κολλαγενασών.

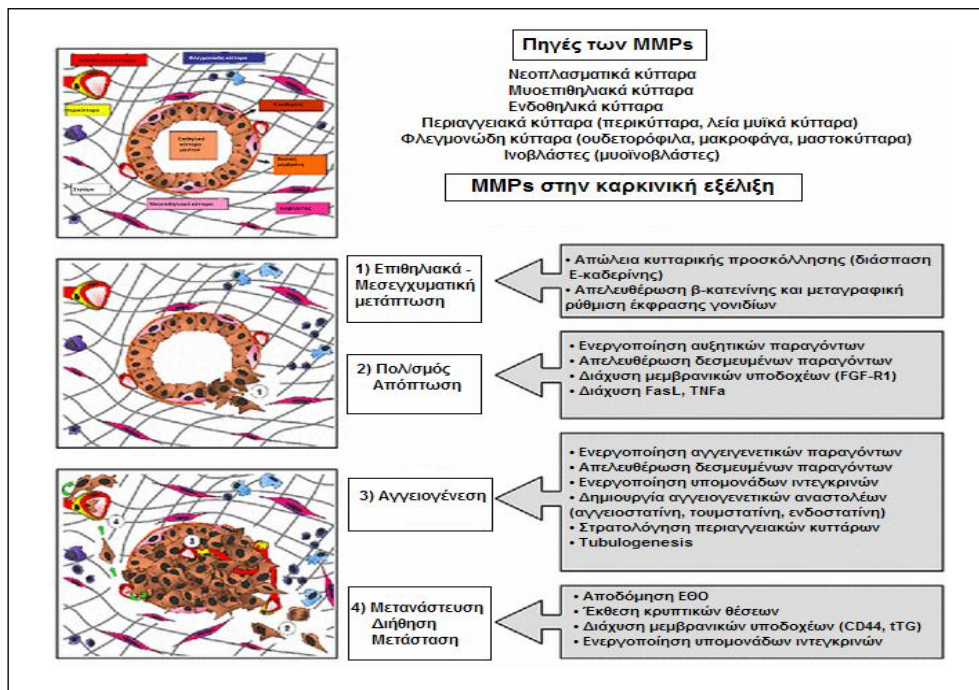
ΡΟΛΟΙ ΤΩΝ MMPs ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Πληθώρα μελετών έχουν τεκμηριώσει τη σημασία της διαμεσολαβούμενης από MMPs αποδόμησης της ΕΘΟ για τη διασπορά διαφόρων καρκινωμάτων, αλλά γίνεται ολοένα ξεκάθαρο ότι οι MMPs εμπλέκονται και σε νεότερα στάδια της ογκογένεσης. Ως εκ τούτου, οι MMPs επιδεικνύουν μεγάλη ποικιλία λειτουργιών που μπορούν να υποκινήσουν την καρκινογένεση, την αύξηση, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση, την επιλογή των ανθεκτικών στην απόπτωση υποπληθυσμών κυττάρων και τη διήθηση και μετάσταση. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για πολλές από αυτές τις διαδικασίες προέρχονται από την κυτταρική επιφάνεια του όγκου, ή από

στρωματικά κύτταρα, ή είναι βυθισμένοι στην ΕΘΟ. Έτσι, οι MMPs δε μπορούν πλέον να θεωρούνται ως «καταστροφείς», αλλά ως μέλη ενός λεπτού συστήματος επικοινωνίας μέσω του οποίου ο όγκος αλληλεπιδρά με το στρώμα (402).

Η ικανότητα διαφυγής από τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) είναι γεγονός κλειδί στην καρκινογένεση. Οι MMPs αποδείχτηκε ότι επηρεάζουν την απόπτωση με δύο τουλάχιστον μηχανισμούς: (i) την αποδιοργάνωση της ΕΘΟ και την απώλεια απαραίτητων σημάτων επιβίωσης [(anoikis) : Ως anoikis ορίζεται «η απόπτωση που επάγεται από ανεπαρκή ή ακατάλληλη αλληλεπίδραση κυττάρου-ΕΘΟ] και (ii) την αποδόμηση συγκεκριμένων συνδετών που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Και στις δύο περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι αυξημένη απόπτωση. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι αντίθετο με τα θετικά αποτελέσματα των MMPs στην πρόοδο του όγκου. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το παράδοξο προέρχεται από τη διαπίστωση, ότι η επαγωγή της απόπτωσης διεγείρει την επιλογή κυττάρων που είναι ανθεκτικά σε αυτήν.

Έτσι, η συνεισφορά των MMPs στην επαγωγή της απόπτωσης μπορεί να έχει συνέπεια την επιλογή ενός πληθυσμού κυττάρων που είναι περισσότερο ογκογόνα, ως αποτέλεσμα της μειωμένης τους ευαισθησίας σε φυσιολογικά αποπτωτικά ερεθίσματα (402)(Εικ. 39).



Εικ.39

1. Οι MMPs ενισχύουν την αύξηση μέσω της ενεργοποίησης μιτογόνων παραγόντων

Αποδόμηση του μικροπεριβάλλοντος των αναπτυσσόμενων όγκων από MMPs που εκφράζονται στο στρώμα ή στα καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων. Η έκφραση των MMPs συχνά αυξάνεται σε απόκριση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως είναι μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και ινσουλινοειδών αυξητικών παραγόντων (IGFs). Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες είναι δυνητικά μιτογόνα (μόρια που προκαλούν κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και επομένως, η αύξηση στη βιοδιαθεσιμότητά τους όχι μόνο εξυπηρετεί στη θετική ρύθμιση της έκφρασης των MMPs, αλλά και στην προώθηση και επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου.

Έχει αποδειχτεί ότι οι MMPs (ειδικά η MMP-7) αποδεσμεύουν το δεσμευμένο στην ηπαρίνη επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (HB-EGF), ένα μέλος της οικογένειας EGF, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του και ακολούθως την έναρξη μηνυμάτων επιβίωσης και ανάπτυξης. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η MMP-9 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το CD44 και αυτό το σύμπλοκο είναι ικανό για την ενεργοποίηση του TGFβ (αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β), ο οποίος με τη σειρά του κάνει δυνατή την καρκινική εξέλιξη και τη διήθηση.

. Από την άλλη πλευρά, οι MMPs αποδομούν μόρια των οποίων η διάσπαση είναι αρνητική για την ανάπτυξη του όγκου. Η οικογένεια των FGFs είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό, την ιστική αύξηση και την αγγειογένεση. Η διάσπαση των υποδοχέων αυτών των παραγόντων από την MMP-2 καθυστερεί την ανάπτυξη του όγκου.

2. MMPs στη μετανάστευση, διήθηση και μετάσταση

Η **μετανάστευση** των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή διασπορά τους σε δευτερογενή περιοχή. Δύο τύποι πρότυπης απποκινητικής μετανάστευσης κυττάρων, μέσω της τρισδιάστατης ΕΘΟ, έχουν περιγραφεί: η «Αμοιβαδοειδής» και η «Τύπου

Ινοβλαστών». Και στις δύο περιπτώσεις η κίνηση των κυττάρων περιλαμβάνει τρία βήματα: προσκόλληση στη βασική μεμβράνη ή το στρώμα μέσω ειδικών υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας, συστολή του κυτταρικού σώματος και αποκόλληση. Οι MMPs εμπλέκονται βασικά στις φάσεις προσκόλλησης και αποκόλλησης της μετανάστευσης «Τύπου Ινοβλαστών».

Κατά την προσκόλληση βρέθηκε ότι πολλές MMPs συνεντοπίζονται με μόρια προσκόλλησης παρόντα στην κυτταρική επιφάνεια. Η παρουσία των MMPs στις θέσεις της προσκόλλησης μπορεί να βοηθά τη μετανάστευση των κυττάρου του όγκου μέσω πυκνών περιοχών της ΕΘΟ, στις οποίες χωρίς την πρωτεολυτική δράση των MMPs τα κύτταρα δε θα ήταν ικανά να διεισδύσουν. (403).

Η καρκινική **διήθηση** είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αλληλεπίδραση ανάμεσα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που είναι παρόντες στο περιβάλλον του όγκου και παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Η συνεχιζόμενη διήθηση των κυττάρων του όγκου στους ιστούς επιτυγχάνεται με κυκλική επανάληψη των τριών βημάτων μετανάστευσης που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η αυξημένη παραγωγή των MMPs στο περιβάλλον του όγκου, είτε από στρωματικά κύτταρα που εμπλέκονται στην αντίδραση στρώματος, είτε από κύτταρα του όγκου που έχουν υποστεί EMT παρουσιάζεται ως γεγονός-κλειδί της διήθησης του όγκου. Η παραγωγή MMPs από τα στρωματικά κύτταρα προτείνει ότι ο όγκος μπορεί να επάγει την έκφραση αυτή, η οποία με τη σειρά της επιταχύνει τη μετανάστευση του όγκου σε δευτερογενή θέση (409).

Μετάσταση είναι η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε απομακρυσμένες θέσεις και αποτελεί τον κύριο λόγο θανάτου σε ασθενείς με καρκίνο. Για να δώσει μετάσταση ένα καρκινικό κύτταρο πρέπει να επιτύχει τα ακόλουθα τέσσερα βήματα:

- (1) Αποκόλληση από τον πρωτοπαθή όγκο και επακόλουθη διήθηση του στρώματος,
- (2) Είσοδος στα αιμοφόρα αγγεία ή στο λεμφικό σύστημα (ενδο-αγγείωση) για να μεταφερθεί σε απομακρυσμένα σημεία στο σώμα,
- (3) Έξοδος από την κυκλοφορία (εξαγγείωση) και
- (4) Σχηματισμός μεταστατικής αποικίας (470).

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διαπερνούν τη βασική

μεμβράνη, να μεταναστεύουν μέσω του συνδετικού ιστού και να εισέρχονται στα αιμοφόρα αγγεία φαίνεται να εξαρτάται από την παραγωγή πρωτεασών που αποδιοργανώνουν την ΕΘΟ, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι MMPs. Αντίθετα, η εξαγγείωση είναι μια φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και δεν εξαρτάται από πρωτεάσες (465).

3. MMPs και αγγειογένεση

Για να αναπτυχθεί ο όγκος πέρα από ένα συγκεκριμένο μέγεθος πρέπει να επικοινωνεί με το μικροπεριβάλλον και να διαμορφώνει την αρχιτεκτονική της ΕΘΟ, ώστε να πραγματοποιείται νέα αγγειογένεση. Με αυτό τον τρόπο ο όγκος μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξή του αυξάνοντας την ποσότητα θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου που του παρέχεται. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές από τις MMPs που είναι παρούσες στο σημείο επαφής στρώματος-όγκου μπορεί να έχουν θετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη και διήθηση του όγκου. Παρόλα αυτά, οι ρόλοι που έχουν αναγνωριστεί για τις MMPs στην αγγειογένεση είναι αντικρουόμενοι (402). Όμως, είναι ξεκάθαρο σε έναν αριθμό περιπτώσεων ότι οι προ-αγγειακές δράσεις των MMPs παρέχουν ένα μέσο επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων όγκου και στρωματικών κυττάρων του άμεσου περιβάλλοντός του προκειμένου να προωθηθεί η αγγειογένεση.

Η MT1-MMP ρυθμίζει θετικά τον VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας) και βοηθά στην αναδιαμόρφωση της ΕΘΟ μέσω της συσχέτισής της με την MMP-2. Χρησιμοποιώντας μοντέλο καρκινογένεσης παγκρέατος, στο οποίο υπάρχει αγγειακός «διακόπτης» για την εναλλαγή από αγγειακή ηρεμία σε αγγειογένεση, αναφέρθηκε ότι η MMP-9 είναι σημαντική για τη νέο-αγγειογένεση. Τόσο η MMP-9, όσο και η MMP-2 ρυθμίζονται θετικά στα αγγεία στο μοντέλο αυτό. Με διάφορες μεθόδους καθορίστηκε ότι μόνο η MMP-9 συσχετίζεται με παράλληλη αύξηση στο σύμπλοκο VEGF/υποδοχέα VEGF. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του VEGF και των υποδοχέων του οδηγεί μεταγενέστερα σε αγγειογένεση των παγκρεατικών νησίδων, ενώ ο αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού (CTGF) μπορεί να προσδένεται στον VEGF και να την παρεμποδίζει. Μελέτη δείχνει ότι οι MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9 και MMP-13 μπορούν να επεξεργαστούν τον CTGF και να μεσολαβήσουν στην απελευθέρωση του VEGF, παρουσιάζοντας έτσι έναν άλλο μηχανισμό

ρύθμισης της αγγειογένεσης(450, 463, 466).

Από την άλλη, αναφορές έδειξαν ότι οι MMPs μπορούν να ρυθμίσουν και αρνητικά την αγγειογένεση. Οι MMP-7 και MMP-9 μπορούν να μετατρέψουν το πλασμινογόνο στον δυνητικό αγγειακό αναστολέα, την αγγειοστατίνη. Μείωση της MMP-9 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα αγγειοστατίνης και μια προκύπτουσα αύξηση στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη νέα αγγειογένεση (402).

ΟΙ MMPs ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η Goldstandard μέθοδος για τη διάγνωση του πρωτοπαθούς και του υποτροπιάζοντος καρκίνου στην ουροδόχου κύστη είναι η κυστεοσκόπηση, η οποία είναι όμως ενδοσκοπική, μη ανεκτή εύκολα και ως εκ τούτου λιγότερο κατάλληλη για σκοπούς γενικού ελέγχου (screening). Η κυτταρολογική ούρων είναι μία συχνά προτιμώμενη διαγνωστική τεχνική, η οποία δεν είναι επεμβατική, με υψηλή ειδικότητα αλλά χαμηλή ευαισθησία, ειδικότερα στον προσδιορισμό χαμηλής κακοήθειας καρκινωμάτων. Ως αποτέλεσμα αρκετή προσπάθεια έχει γίνει για τον προσδιορισμό νεώτερων μη επεμβατικών εξετάσεων στα ούρα ή στο αίμα με στόχο την διάγνωση του ουροθηλιακού καρκίνου με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία.

Η διαγνωστική σημασία των MMP-2 και MMP-9 στα ούρα, έχει αποδειχθεί υψηλότερη της κυτταρολογικής εξέτασης, αλλά λιγότερο ευαίσθητη από το δείκτη NMP22. Ως εκ τούτου οι MMP-2 και MMP-9 μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμους δείκτες για την πρώιμη διάγνωση του ουροθηλιακού καρκίνου σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους παρά μόνης τους.(471,472,473,474)

Οι MMPs δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη υποτροπής του όγκου σε αρκετούς καρκινικούς τύπους. Λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων και δραστηριότητας των MMP-2 και MMP-9 στα ούρα, έχουν εκτενώς αναλυθεί ως προγνωστικοί δείκτες. Υψηλά προεγχειρητικά επίπεδα ορού για τις MMP-2 ή MMP-3 συσχετίζονται με εμφάνιση υποτροπών σε ασθενείς με προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνωμα (475,476).., ενώ αυξημένη έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με την υποτροπή του επιφανειακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης (477).

Οι υψηλοί ρυθμοί υποτροπών είναι ο κύριος προβληματισμός των επιφανειακών ουροθηλιακών καρκινωμάτων. Η επακόλουθη ανάγκη για μακροχρόνια επιτήρηση καθιστά το ουροθηλιακό καρκίνωμα ένα από τα πιο ακριβά για θεραπεία. Επομένως θα ήταν χρήσιμοι βιολογικοί δείκτες που επιτρέπουν τον προσδιορισμό ασθενών με υψηλό κίνδυνο υποτροπής, οι οποίοι μπορούν να ωφεληθούν από περισσότερο επιθετικές θεραπείες, όπως οι ενδοκυστικές εγχύσεις με μυτομυσίνη C ή BCG.

Παρομοίως σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου για υποτροπή, το μεσοδιάστημα των κυστεοσκοπικών ελέγχων μπορεί να επιμηκυνθεί. Η ιδέα αυτή επιβεβαιώθηκε από μία μεγάλη μελέτη που έδειξε ότι ελέγχοντας (monitoring) τα επίπεδα της MMP-9 στα ούρα μπορούν να μειωθούν οι άσκοπες κυστεοσκοπήσεις έως και 42% (478). Επίσης η αυξημένη έκκριση των m-RNA MMP-1, MMP-9, MMP-12 και TIMP-2 σε πρωτοπαθή όγκο, μπορεί να προσδιορίσει ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής.(477,479).

Ένας λιγότερος συχνός αλλά όχι ασήμαντος κίνδυνος για ασθενείς με επιφανειακό ουροθηλιακό καρκίνο είναι η εξέλιξη του σταδίου της νόσου, η οποία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου από τη νόσο. Ασθενείς με επιφανειακό ουροθηλιακό καρκίνο και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης της νόσου, μπορούν να ωφεληθούν από έγκαιρη ριζική κυστεκτομή.

Επομένως η ακριβής πρόβλεψη αυτού του απαραίτητη για την καρκινική διήθηση και επέκταση της νόσου. Σε συμφωνία με αυτό, τα επίπεδα των MMP-1, MMP-2 και TIMP-1 προσδιορίστηκαν ως υποσχόμενοι δείκτες σε όγκους υψηλού σταδίου και υψηλού βαθμού κακοήθειας(480,481)). Με βάση τον σημαντικό και καίριο ρόλο τους στην καρκινική εξέλιξη οι MMPs μπορεί να φανούν χρήσιμοι όχι μόνο ως προγνωστικοί δείκτες αλλά και ως στόχοι για νεώτερα θεραπευτικά σχήματα(482,483).

Ο μυοδιηθητικός αποτελεί δυνητικά μια νόσο με υψηλό βαθμό και ρυθμό θνησιμότητας. Η ριζική κυστεκτομή είναι η συνήθης αντιμετώπιση σε αυτές τις περιπτώσεις. Η θεραπεία και η πρόγνωση μετά το χειρουργείο καθορίζεται κυρίως από την κατάσταση των λεμφαδένων. Η χημειοθεραπεία αποτελεί την θεραπεία εκλογής για ασθενείς με μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο και σχετίζεται με αξιοσημείωτο όφελος στην επιβίωση, υποδηλώνοντας την σημασία της έγκαιρης ανεύρεσης μεταστάσεων. Η αξιολόγηση της κατάστασης των λεμφαδένων με τις τρέχουσες απεικονιστικές

μεθόδους (CT, MRI) στηρίζεται στο μέγεθος των λεμφαδένων. Ωστόσο η ευαισθησία αυτών των τεχνικών στον προσδιορισμό λεμφαδενικών μεταστάσεων σε φυσιολογικούς ή ελάχιστα αυξημένους σε μέγεθος λεμφαδένες είναι περιορισμένη. Ως αποτέλεσμα το 1/3 των ασθενών με μυοδιηθητική νόσο έχουν μη ανιχνεύσιμες μεταστάσεις προεγχειρητικά(484).

Η εξαίρεση των λεμφαδένων της πυέλου αποτελεί μέρος της ριζικής κυστεκτομής, έχει δε δειχθεί ότι η εκτεταμένη, πέραν των πυελικών, λεμφαδενεκτομή παρέχει πιο αξιόπιστη σταδιοποίηση, βελτιώνοντας την επιβίωση (484).

Ανάλυση προγνωστικών βιοδεικτών σε δείγματα διαθέσιμα προεγχειρητικά (αίμα ,ορός , πλάσμα), μπορεί να προσδιορίσει ασθενείς υψηλού κινδύνου για λεμφαδενικές μεταστάσεις και οι οποίοι μπορεί να ωφεληθούν από ένα εκτεταμένο λεμφαδενικό καθαρισμό. Έχει βρεθεί ότι τα προεγχειρητικά επίπεδα της MMP-7 σε ορό και ούρα είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο με θετικούς λεμφαδένες(485,486).

Έτσι, ο συνδυασμός των επιπέδων της MMP-7 στα ούρα ή στον ορό με τις απεικονιστικές μεθόδους , μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία του προεγχειρητικού προσδιορισμού λεμφαδενικών μεταστάσεων και να βοηθήσει στη επιλογή ασθενών για εκτεταμένη λεμφαδενεκτομή, καθώς επίσης και για επικουρική ΧΜΘ.

Οι MMPs έχουν εκτενώς μελετηθεί για την προγνωστική τους σημασία στον ουροθηλιακό καρκίνο. Ωστόσο τα μικρού μεγέθους δείγματα και η έλλειψη πολυπαραγοντικής ανάλυσης είναι τα κύρια μειονεκτήματα των μελετών, καθιστώντας δύσκολη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Τα επίπεδα της MMP-9 στα ούρα, της MMP-7 στον ορό και των MMP-2 και MMP-14 σε ιστό, έχουν προσδιορισθεί ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες στον ουροθηλιακό καρκίνο. Αυτές οι MMPs φαίνεται να σχετίζονται με τη βιολογική συμπεριφορά του ουροθηλιακού καρκίνου και έτσι μπορούν να προβλέψουν την πορεία των ασθενών με αυτή τη νόσο. Ο συνδυασμός των εδραιωμένων κλινικοπαθολογοανατομικών παραγόντων κινδύνου, με τα ευρήματα των απεικονιστικών μεθόδων και των βιοδεικτών σε προγνωστικά νομογράμματα, είναι πιθανόν να παρέχει την πιο ακριβή προγνωστική αξιολόγηση(487).

Η αυξημένη έκφραση διαφόρων MMPs έχει συσχετισθεί με μικρότερο διάστημα επιβίωσης των ασθενών στις περισσότερες προγνωστικές μελέτες που έχουν γίνει (488).

MMP-1

Ανοσοδραστηριότητα της MMP-1 έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα, τόσο στα επιφανειακά όσο και στα διηθητικά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης. Έχει παρατηρηθεί σε καρκινώματα υψηλού σταδίου και υψηλού βαθμού κακοηθείας, υποδηλώνοντας τη συσχέτισή της με την εξέλιξη του όγκου. Ωστόσο συσχέτιση μεταξύ της MMP-1 και της επιβίωσης των ασθενών δεν έχει ανευρεθεί. (466,489)

Σε μελέτη με c-DNA μικροσυστοιχία, η οποία συνέκρινε το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των υποτροπιαζόντων χαμηλού βαθμού επιφανειακών καρκινωμάτων, βρέθηκε ότι η αυξημένη ιστική MMP-1 και MMP-12 συνδεόταν με υψηλότερο ρυθμό υποτροπής. (490)

Η MMP-1 έχει προσδιορισθεί και σε δείγματα ούρων ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης, αλλά όχι σε υγιείς. Ωστόσο λόγω του χαμηλού ποσοστού προσδιορισμού της (26%) δεν παρέχεται η απαιτούμενη υψηλή ευαισθησία για τη διάγνωση του ουροθηλιακού καρκίνου. Από την άλλη μεριά η MMP-1 σχετίζεται με το στάδιο της νόσου, το βαθμό κακοήθειας και το μέγεθος του όγκου, με τα υψηλά επίπεδα να παρουσιάζουν προβλεπτική αξία για την εξέλιξη της νόσου και να σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση. (491)

Λόγω απουσίας πολυπαραγοντικής ανάλυσης, παραμένει αδιευκρίνιστο αν η MMP-1 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη. Σε ορό ασθενών έχουν ανιχνευθεί χαμηλά επίπεδα της MMP-1, δίχως προγνωστική ή διαγνωστική αξία (SZ64.65). Η έκφραση της MMP-1 επάγεται από τον EGF στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, προτείνοντας συμμετοχή του EGF στη μεταγραφική ρύθμιση της MMP-1. Η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται από την οδό μνηματοδότησης STAT (492,493).

MMP-2

Η MMP-2 μαζί με την MMP-9 αποδομούν το κολλαγόνο τύπου IV, το κύριο συστατικό της βασικής μεμβράνης. Η έκφραση και η δραστηριότητα της MMP-2, αυξάνονται στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό (494,495). Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με την

ιστική εντόπιση της MMP-2. Δύο ανεξάρτητες μελέτες με RNA in situ υβριδισμό και Real Time RT-PCR προτείνουν στρωματική προέλευση της MMP-2(494,496), ενώ άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν ανοσοιστοχημική ανάλυση εντοπίζουν την MMP-2 κυρίως στα καρκινικά κύτταρα(496,497).

Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από τη θεώρηση ότι τα καρκινικά κύτταρα επάγουν τα στρωματικά κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες, στην έκφραση και έκκριση MMP-2, η οποία ακολούθως προσδένεται σε δεσμευτικές θέσεις των γειτονικών καρκινικών κυττάρων. Οι μεμβρανοσυνδεδεμένες MMPs στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα για την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, επιτρέποντας την καρκινική διήθηση. Σε συμφωνία με αυτό η έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης MMP-2, καθώς επίσης και η δραστηριότητα, έχει ξεκάθαρα δειχθεί να σχετίζεται με περισσότερο διηθητικό και κακόηθες φαινότυπο ουροθηλιακού καρκίνου(498,499).

Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με την προγνωστική αξία της MMP-2 στην ουροδόχο κύστη. Οι Vasala et all(498) και οι Kanamaya et all,(493) προσδιόρισαν υψηλά επίπεδα m-RNA και πρωτεΐνης MMP-2 ως σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση, ενώ οι Hara et all(477) και οι Grignon et all.(497) δεν βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ επιπέδων MMP-2 και πρόγνωσης. Ωστόσο οι μελέτες αυτές δεν είναι συγκρίσιμες για 4 λόγους :

- 1) Η επιλογή των ασθενών διέφερε μεταξύ των μελετών. Καρκινώματα όλων των σταδίων υπήρχαν σε 2 εργασίες, ενώ οι Grignon et all μελέτησαν ασθενείς μόνο με διηθητική νόσο και οι Hara et all εστίασαν αποκλειστικά σε μη διηθητικές περιπτώσεις.
- 2) Οι μελέτες διέφεραν στις αναλυτικές μεθόδους που εφάρμοσαν.
- 3) ο καθορισμός του cut –off επιπέδου για τη διχοτόμηση των δεδομένων δεν ήταν ο ίδιος σε όλες τις μελέτες
- 4) εφαρμόσθηκαν διαφορετικές στατιστικές αναλύσεις.

Η δραστηριότητα και η συγκέντρωση της MMP-2 στα ούρα ασθενών με καρκίνο της κύστης έχει βρεθεί να είναι σταθερά αυξημένα, προτείνοντας την χρησιμοποίησή τους ως δείκτες πρώιμης διάγνωσης(500). Ωστόσο η ευαισθησία αποδείχθηκε ίση ή χαμηλότερη της κυτταρολογικής εξέτασης (472,473).

Από την άλλη πλευρά τα επίπεδα της MMP-2 στα ούρα σχετίστηκαν ισχυρά με το στάδιο της νόσου. Στηριζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα φαίνεται ότι τα επίπεδα MMP-2 στα ούρα είναι χρήσιμα στον προσδιορισμό πρώιμης εξέλιξης της νόσου. Επίσης ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η ευαισθησία της MMP-2 και του λόγου MMP-2/TIMP-2 στα ούρα είναι ιδιαίτερα υψηλή για τον σχετιζόμενο με το σχιστόσωμα καρκίνο της κύστης, οπότε μπορεί να έχουν κλινική σημασία στην διάγνωση αυτού του τύπου καρκίνου στην ουροδόχο κύστη.(503)

MMP-3

Η MMP-3 έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό διαφόρων καρκινωμάτων. Στον ουροθηλιακό καρκίνο αυξημένη ανοσοδραστικότητα της MMP-3 εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, εντούτοις ο RNA in situ υβριδισμός ανέδειξε και στρωματική εντόπιση της εν λόγω πρωτεΐνης(466).

Η ιστοική έκφραση της MMP-3 δεν βρέθηκε να σχετίζεται με κλινικοπαθολογοανατομικούς παραμέτρους ούτε με την πρόγνωση της νόσου (491,492). Επιπλέον τα επίπεδα της MMP-3 δεν ήταν σε θέση να διαχωρίσουν τους ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο από τους , ούτε σχετίστηκαν με την ελεύθερη νόσου επιβίωση.

Αντιθέτως υψηλά επίπεδα MMP-3 στον ορό ασθενών σχετίστηκαν με μικρότερο ελεύθερο υποτροπής διάστημα και με μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (472). Από τα προαναφερθέντα φαίνεται ότι η MMP-3 δεν έχει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία στον ουροθηλιακό καρκίνο, ενώ οι απόψεις για την προγνωστική της χρησιμότητα είναι αντικρουόμενες .

MMP-7

Η MMP-7 αποτελεί το μικρότερο μέλος της οικογένειας των MMPs(502) Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης σε ιστό, στον ορό αλλά και στα ούρα ασθενών με λεμφαδενικές μεταστάσεις(503,504).

Επιπλέον η αυξημένη γονιδιακή έκφραση της MMP-7 και η αυξημένη συγκέντρωσή της στον ορό, φαίνεται να είναι ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας ελεύθερης νόσου επιβίωσης (503)

. Τα ανωτέρω ευρήματα προσδίνουν στην MMP-7, μια αυξημένη προγνωστική ικανότητα στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης (500). Έχει επίσηςδειχτεί ότι η MMP-7, σχετίζεται με αντίσταση στη χημιοθεραπεία, οπότε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπεία.

MMP-9

Η πρωτεΐνη MMP-9 και η ενζυμική της δραστηριότητα είναι παρούσα μόνο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και όχι στο φυσιολογικό ουροθήλιο(489,494,498). Ανοσοδραστηριότητα της MMP-9 εντοπίστηκε στα καρκινικά και στρωματικά κύτταρα, εντούτοις ο RNA in situ υβριδισμός ανέδειξε μόνο στρωματική εντόπιση της εν λόγω πρωτεΐνης(481, 489, 495).

Οι απόψεις για την προγνωστική της χρησιμότητα είναι αντικρουόμενες. Οι Durkan et al (481) και οι Hara et al (477) αναφέρουν ότι υψηλή έκφραση της MMP-9 σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό υποτροπών και κακή πρόγνωση, ενώ οι Staton et al.(505) δεν βρήκαν καμία συσχέτιση της MMP-9 με την επιβίωση και ο Vasala et al. προτείνουν τα υψηλά επίπεδα MMP-9 ως ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα. (498).

Η συγκέντρωση της MMP-9 στον ορό ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο, ήταν σαφώς υψηλότερη και σχετίστηκε με υψηλό στάδιο νόσου, αυξημένου βαθμού κακοήθειας νεόπλασμα και φτωχότερη πρόγνωση, ενώ η συγκέντρωσή της στο πλάσμα δεν ήταν προγνωστική για εξέλιξη σε μυοδιηθητική νόσο(495).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της MMP-9 σε δείγματα ούρων ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο και προτείνουν ένα MMP-9 test ως διαγνωστικό δείκτη ή για σκοπούς γενικού ελέγχου (screening), με την ευαισθησία της μεθόδου να φθάνει στο 40% σε 2 μελέτες και την ειδικότητα της να είναι συγκρίσιμη με αυτή της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων (472,473,474). Τα αποτελέσματα αυτά δίνουν περιορισμένη διαγνωστική αξία στην ανάλυση της MMP-9 στα ούρα όταν αυτή χρησιμοποιείται από μόνη της. Επιπλέον το γεγονός ότι η έκκριση της MMP-9 θεωρείται ότι γίνεται ως επί το πλείστον από φλεγμονώδη κύτταρα, εγείρει το ερώτημα μήπως και φλεγμονώδεις, μη κακοήθεις καταστάσεις οδηγούν

δυναμικά σε αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης , οπότε και σε μείωση της ειδικότητας της μεθόδου.

Αν και οι συγκεντρώσεις της MMP-9 στα ούρα βρέθηκαν ανεξάρτητες από την κυτταρολογική εξέταση και από τα αποτελέσματα του NMP22 test, ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων μπορεί να αυξήσει την διαγνωστική ακρίβεια.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι αυξημένη δραστηριότητα της MMP-9 αλλά και της MMP-2 βρέθηκε και σε ούρα ασθενών με όγκους εκτός του ουροποιητικού, γεγονός που δείχνει ότι η αυξημένη συγκέντρωση MMP-9 στα ούρα μπορεί να προέρχεται , εκτός από τα καρκινικά κύτταρα απευθείας, και από τη συστηματική κυκλοφορία μέσω νεφρικής διήθησης ή ως αιματοουρία(507).

Η MMP-9 αποτελεί και ένα ελκυστικό θεραπευτικό στόχο αφού η ρύθμισή της εμπλέκεται στην ογκογεννητική δράση διαφόρων πρωτεϊνών και συνεπώς στην καρκινική εξέλιξη, ενώ δύναται να αποτελέσει και σημαντικό συμπληρωματικό ενισχυτικό "εργαλείο" για τις τρέχουσες διαγνωστικές μεθόδους.

MMP-14

Η MMP-14 ή MT1-MMP, είναι μία επιφανειακά συνδεόμενη MMP, για την οποία έχει δειχθεί ότι ενισχύει την καρκινική διήθηση και μετάσταση, μέσω ενεργοποίησης της pro-MMP-2. Σε δείγματα ιστών ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης βρέθηκε υψηλότερη έκφραση της MMP-14 από ότι σε υγιείς(495). Επίσης η MMP-14 εκφράζεται ως επί το πλείστον σε στρωματικά κύτταρα και η αυξημένη γονιδιακή της έκφραση σχετίστηκε με υψηλό στάδιο νόσου, αυξημένου βαθμού κακοήθειας νεόπλασμα και φτωχότερη πρόγνωση(496,499).

Επιπλέον η MMP-14 φαίνεται να έχει και μεταγραφικές ιδιότητες. Για παράδειγμα η αρνητική ρύθμιση της MMP-14 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, οδηγεί σε εκλεκτική μεταγραφική αναστολή του ογκοκατασταλτικού παράγοντα Dickkopf -3 (DKK3), γεγονός που μπορεί να αναστείλει την καρκινική διήθηση (508).

ΑΛΛΕΣ MMPs

Λίγα είναι γνωστά για το ρόλο των MMP-10, MMP-11, MMP-13 και MMP-15 ή MT2-MMP, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Η έκφραση της MMP-10 και MMP-13, δεν σχετίστηκε με το στάδιο της νόσου ή το βαθμό διήθησης του όγκου, ενώ η έκφραση των MMP-11 και MMP-15, βρέθηκε σημαντικά αυξημένη σε υψηλού σταδίου και υψηλού βαθμού κακοηθείας ουροθηλιακά καρκινώματα (495,509,510,511).

TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteins)

Οι ιστικοί αναστολείς των μεταλοπρωτεϊνών (TIMPs) έχειδειχθεί ότι αναστέλλουν επαρκώς την καρκινική διήθηση και την αγγειογένεση (512). Από την άλλη μεριά η δράση τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένη. Επίσης αυξημένη έκφραση ορισμένων TIMPs βρέθηκε να σχετίζεται με την καρκινική εξέλιξη και με αυξημένη ογκογένεση σε πειραματικά μοντέλα (513,514).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης η έκφραση της TIMP-1 βρέθηκε αυξημένη σε καρκινικούς ιστούς αλλά και σε δείγματα φυσιολογικού ουροθηλίου (496). Επίσης τα επίπεδα της TIMP-1 στον ορό, στα ούρα αλλά και σε ιστικό επίπεδο έχουν σχετιστεί με το στάδιο της νόσου και το βαθμό διήθησης του όγκου σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων, αναδεικνύοντας κάποιο ρόλο της TIMP-1 στην καρκινική εξέλιξη. Αυξημένες συγκεντρώσεις της TIMP-1 στο πλάσμα, αλλά μειωμένες στον ορό και στα ούρα, έχουν βρεθεί σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, συγκριτικά με τις ανάλογες συγκεντρώσεις σε υγιείς. (515)

Όσον αφορά την TIMP-2 στον ουροθηλιακό καρκίνο αυξημένη έκφραση εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, αλλά και σε στρωματικά κύτταρα(496,516).

Εντούτοις η θετική ανοσοδραστικότητα εντοπίστηκε ως επί το πλείστον στα στρωματικά κύτταρα που γειννιάζαν με τον όγκο, γεγονός που σημαίνει ότι η έκφραση της TIMP-2 πιθανόν να είναι μία χροστ αντίδραση στον όγκο.

Επίσης στον ουροθηλιακό καρκίνο αυξημένη έκφραση TIMP-2 mRNA σχετίστηκε με υψηλό στάδιο νόσου, αυξημένου βαθμού κακοήθειας νεόπλασμα, συχνότερες υποτροπές και μειωμένη επιβίωση, γεγονός που

σχετίζεται και με την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την TIMP-2, αφού έχει δειχθεί η στενή σχέση της πρωτεΐνης με το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 στον ουροθηλιακό καρκίνο(516,517).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν 2 μελέτες στις οποίες μελετώντας τα επίπεδα της TIMP-2 στον ορό και στο πλάσμα, βρέθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης σε υγιείς από ότι σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης και συμπληρώνουν με την παρατήρηση ότι τα αυξημένα επίπεδα της TIMP-2 στον ορό και στο πλάσμα, αποτελούσαν ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης(518,519).

Η αυξημένη καρκινική έκφραση της MMP-2 συσχετίζεται με πτωχή επιβίωση ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης (520).

MMPS – ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η εμφανής συσχέτιση μεταξύ των MMPs και της καρκινικής εξέλιξης, τις καθιστά στόχο για φαρμακολογική αναστολή. Ωστόσο οι αναστολείς των MMPs δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στον ουροθηλιακό καρκίνο, ενώ η εφαρμογή τους σε άλλα καρκινώματα δεν έδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση, ενώ σε μερικές περιπτώσεις σχετίστηκε με δυσμενή επιβίωση και σοβαρές παρενέργειες, προφανώς λόγω της αναστολής και των λοιπών φυσιολογικών ρόλων τους καθώς δεν πρόκειται για ένζυμα που αποδομούν μόνο το εξωκυττάριο στρώμα(521,522,523).

Η καλύτερη κατανόηση του σύνθετου ρόλου των MMPs τόσο στη φυσιολογική όσο και στις παθολογικές πορείες, απαιτείται για τον σχεδιασμό κλινικά αποτελεσματικών αντι- MMP θεραπειών. Δεδομένου του πολυπαραγοντικού ρόλου των MMPs , είτε η επιλεκτική αναστολή μίας απλής MMP, είτε η στόχευση ειδικά έναντι του όγκου που ενδιαφέρει , μπορεί να παρέχουν νέες στρατηγικές για περισσότερο αποτελεσματικές θεραπείες. Νέες μη επεμβατικές in vivo MMP απεικονιστικές μέθοδοι που θα επιτρέπουν τον καλύτερο χειρισμό της θεραπείας πιθανόν να μπορούν να υποστηρίξουν αυτή την προσπάθεια.

Από τις αρχές της δεκαετίας του '90 με βάση τα αποτελέσματα invitro και in vivo προκλινικών μελετών, οι οποίες πρότειναν ένα θετικό ρόλο των MMPs στην καρκινική εξέλιξη, αρκετοί συνθετικοί αναστολείς των MMPs

αναπτύχθηκαν από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες και εισήχθησαν σε κλινικές δοκιμές (524).

Οι αναστολείς αυτοί ανήκουν σε 4 κατηγορίες: πεπτιδομιμητικοί, μη-πεπτιδομιμητικοί, παράγωγα τετρακυκλίνης και διφωσφονικά (525). Οι πεπτιδομιμητικοί αναστολείς μιμούνται τη δομή του κολλαγόνου στη θέση διάσπασης από τις MMP και οι κυριότεροι από αυτούς είναι το *Batimastat* και *Marimastat*. Οι μη-πεπτιδομιμητικοί αναστολείς έχουν σχεδιασθεί με βάση την τριτοταγή διαμόρφωση της ενεργούς θέσης των MMPs και σε αυτούς ανήκουν: το BAY12-9566, το AG3340 (prinomastat) και το BMS-275291.

Οι χημικά τροποποιημένες τετρακυκλίνες στερούνται της αντιβιοτικής δραστηριότητας, δεσμεύουν τα ιόντα Zn και Ca και ρυθμίζουν καθοδικά την μεταγραφή των *MMP* γονιδίων, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν όχι μόνο τη λειτουργία τους αλλά και την παραγωγή τους. Αντιπρόσωποι αυτών των παραγόντων είναι: το *Minocycline*, το *Metastat (COL-3)* και το *Periostat*. Η δοξοκυκλίνη *Periostat* έχει γίνει αποδεκτή από τον FDA και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της περιοδοντίτιδας (525). Τα διφωσφονικά επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια για τον κρυσταλλικό υδροξυαπατίτη και αναστέλλουν δυο ένζυμα- κλειδιά στην οδό mevalonate.

. Η χορήγηση αυτών του ευρέος φάσματος MMPIs συνοδεύεται από δοσοεξαρτώμενες παρενέργειες, όπως μυοσκελετικούς πόνους. Ένας από τους λόγους αποτυχίας ήταν ότι οι δοκιμές στα ζωικά πειραματικά μοντέλα εφαρμόστηκαν σε αρχικά στάδια του καρκίνου, ενώ στις κλινικές δοκιμές χορηγήθηκαν σε ασθενείς τελικού σταδίου (526, 528).

Ορισμένες MMPs (MMP-3, -8, -9, -12, -14) επιδεικνύουν επιπρόσθετες αντικαρκινικές δράσεις (προστατευτικές ή ωφέλιμες), όπως αναστολή της αγγειογένεσης και μεσολάβηση στην απάντηση τύπου ξενιστή έναντι του όγκου. Επομένως, η χορήγηση μη-ειδικών MMPIs θα στοχεύσει επίσης και αντικαρκινικές MMPs (anti-targets), γεγονός που συμβάλλει στη χειρότερη κλινική έκβαση σε φάσεις III κλινικών δοκιμών (525).

Παρόλα αυτά, η υψηλά επιλεκτική και ειδική αναστολή των MMPs μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου, ειδικά αν στοχευθούν οι σχετιζόμενες MMPs σε αρχόμενα στάδια της νόσου (526).

Μια περισσότερο στοχευμένη προσέγγιση στηρίζεται στη τεχνολογία του

παρεμβαλλόμενου RNA (RNAinterference- RNAi), όπου η έκφραση ενός μόνο γονιδίου απενεργοποιείται από μικρά δίκλινα RNAs τα οποία στοχεύουν το mRNA. Το παρεμβαλλόμενο RNA μπορεί να εισαχθεί με παροδική διαμόλυνση (shortinterferingRNAs-siRNA) ή με σταθερή ενσωμάτωση εντός του γονιδιώματος (shorthairpinRNAs-shRNA). Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών η εφαρμογή siRNAs έναντι της MMP-9 οδήγησε σε καθυστέρηση της καρκινικής έναρξης ή και εξέλιξης (529), τα shRNA έναντι MMP-1 και -2 σε μείωση των πρωτοπαθών και μεταστατικών καρκινωμάτων μαστού (530) και τέλος MMP-1 shRNAs παρεμπόδισε τη μετάσταση μελανώματος στον πνεύμονα (531).

Η τεχνολογία αυτή αναπτύσσεται γρήγορα ενώ παραμένουν οι δυσκολίες που αφορούν στη σταθερότητα των μορίων και στην ειδική στόχευση.

MT-MMPs

Δομή και ενεργοποίηση των MT-MMPs

Οι MT-MMPs περιέχουν όλες τις δομικές περιοχές των πρωτεϊνικών μορίων των MMPs: τοπεπτιδίο σηματοδότηση, το προπεπτιδίο, την καταλυτική δομική περιοχή με τη θέση δέσμευσης του Zn^{2+} , την αρθρωτή περιοχή και την καρβοξυλική περιοχή της αιμοπηξίνης .

Όλες οι MMPs παράγονται ως ζυμογόνα που περιέχουν μία αλληλουχία μνηματοδότησης για έκκριση και ένα προπεπτιδίο, του οποίου η πρωτεολυτική διάσπαση απαιτείται για ενδομοριακή «chaperone». Είναι απαραίτητο για την κατάλληλη αναδίπλωση της πρωτεΐνης και τις ενζυμικές δραστηριότητες (ενεργοποίηση προ MMP-2, αποδόμηση υποστρώματος και δέσμευση στον TIMP-2) (532,533,534)

Ένα βασικό τετραπεπτιδίο (Arg^{108} - Arg^{109} - Lys^{110} - Arg^{111}), βρίσκεται μεταξύ του προπεπτιδίου και της καταλυτικής περιοχής. Το μοτίβο αυτό αναγνώρισης της φουρίνης, διασπάται από κουβεράσες στη συσκευή Golgi κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας των MT-MMPs από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη (535,536,537,538).

Ωστόσο έχει αναφερθεί σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, ενεργοποίηση των MT-MMPs από φουρίνη-ανεξάρτητο μονοπάτι. Το μονοπάτι αυτό

εξαρτάται από αυτοπρωτεολυτική ενεργοποίηση ή από τη δράση άλλων μη-φουρινο-εξαρτώμενων προτεασών(538,539). Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί εξωκυττάρια ενεργοποίηση προ MT1-MMP από την πλασμίνη(540).

Το προπεπτιδίο ακολουθείται από την καταλυτική περιοχή, η οποία περιέχει το μοτίβο δέσμησης του Zn^{2+} HEBΧΗXB6B, όπου Χ είναι ένα μεταβλητό αμινοξύ, ενώ Β, ένα υδρόφυλο αμινοξύ. Η καταλυτική περιοχή των MT-MMPs, περιέχει μία χαρακτηριστική ένθεση 8 αμινοξέων, που ονομάζεται MT-θηλιά. Η περιοχή αυτή της MT3-MMP θεωρείται σημαντική για την ειδικότητα του υποστρώματος και την αποτελεσματική ενεργοποίηση της προ-MMP-2. Οι MT4-MMP και MT6-MMP, στερούνται αυτής της θηλιάς και αδυνατούν να ενεργοποιήσουν την προ-MMP-2. Η ανθρώπινη MT2-MMP είναι λιγότερο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση της προ-MMP-2, έναντι της MT2-MMP ποντικού(541,542,543,544).

Ομοίως με τις υπόλοιπες MMPs, εκτός των MMP-7 και MMP-26, οι MT-MMPs περιέχουν μία καρβοξυ-τελική περιοχή τύπου αιμοπηξίνης που προσφέρει την ειδικότητα του υποστρώματος(532,545,546). Ωστόσο οι MT-MMPs διαφέρουν από τις υπόλοιπες από την παρουσία καρβοξυ-τελικής περιοχής πλούσιας σε υδρόφοβα αμινοξέα που μεσολαβούν στη σύνδεση με την κυτταρική μεμβράνη.

Σύμφωνα με τη δομή αυτής της καρβοξυ-τελικής περιοχής οι MT-MMPs μπορούν να διαιρεθούν σε δύο υποομάδες :

1.) Τις τύπου 1 διαμεμβρανικού τύπου πρωτεΐνες (MT1, MT2, MT3 και MT5-MMPs), οι οποίες χαρακτηρίζονται από μία εκτεταμένη υδρόφιλη αλληλουχία που ακολουθείται από μία βραχεία κυτταροπλασματική ουρά και

2.) τις τύπου γλυκοσολφωσφατιδυλοινωσιτόλης (GPI) MT-MMPs (MT4 και MT6-MMPs), οι οποίες περιέχουν μία βραχεία υδρόφιλη αλληλουχία που προσδένεται στο GPI. Η αλληλουχία αυτή δεν ακολουθείται από κυτταροπλασματική ουρά.

Η κυτταροπλασματική ουρά των τύπου 1 MT-MMPs, θεωρείται ότι συμμετέχει σε κυτταρικά γεγονότα όπως : κυτταρική μηνυματοδότηση, υπο-κυτταρική εντόπιση, κυκλοφορία και διμερισμός των MT-MMP(538,547,548,549,550,551).

Υποστρώματα των MT-MMPs

Η συνεισφορά των MT-MMPs στην αποδόμηση μίας ποικιλίας συστατικών της ΕΘΟ, οδηγεί στην απελευθέρωση βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών και στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης, αύξησης, διαφοροποίησης και επιβίωσης μέσω ελέγχου της κυτταρικής προσκόλλησης και οργάνωσης του κυτταροσκελετού(522).

Η ενεργοποιημένη MT1-MMP είναι μία δυναμικά μεμβρανική πρωτεΐνη με την ικανότητα να διασπά το τύπου I κολλαγόνο περισσότερο αποτελεσματικά από τους τύπους II και III (553). Λόγω της ικανότητάς τους να διασπούν το τύπου I κολλαγόνο τόσο η MT1-MMP όσο και η MT2-MMP, είναι ικανές να μετατρέπουν τα μη διηθητικά MDCK κύτταρα με τη δυνατότητα να διεισδύουν σε υπόστρωμα τύπου I κολλαγόνου (534).

Οι MT1-MMP και η MT3-MMP, αποδομούν την ινονεκτίνη, λαμινίνη 1, βιτρονεκτίνη, αγκρεκάνη, ζελατινίνη, α2 μικροσφαιρίνη, αναστολέα α1 πρωτεΐνης και συνδεκάνη (553-558).

Επιπλέον οι MT-MMPs είναι ικανές να διασπούν μηνυματοδοτικά μόρια, όπως μεμβρανικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες, δεσμευτικές πρωτεΐνες αυξητικών παραγόντων κυττοκίνες / χημειοκίνες (559).

Οι MT-MMPs στην ενεργοποίηση προ MMPs και άλλων ζυμογόνων

Οι MT-MMPs ελέγχουν την περικυτταρική ενεργοποίηση προMMPs και άλλων πρωτεασών. Οι κύριοι φυσιολογικοί ενεργοποιητές της προMMP-2 (ζελατινάση 2) είναι μέλη της υποομάδας των MT-MMP.

Η ενεργοποίηση της προMMP-2 μέσω της MT1-MMP, περιλαμβάνει τη δράση του TIMP-2 (560). Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει στοιχειομετρική δέσμευση του TIMP-2 στην καταλυτική περιοχή της MT1-MMP στην κυτταρική μεμβράνη, που ακολουθείται από τη δέσμευση της καρβοξυ-τελικής περιοχής της αιμοπηξίνης της προMMP-2 στο καρβοξυ-τελικό άκρο του TIMP-2. Ο TIMP-2 δρα ως θετικός ρυθμιστής της MT1-MMP σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε περίσσεια παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της προMMP-2.

Οι MT2, MT5 και MT6-MMP μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τηνπροMMP-2, αλλά η συμμετοχή του TIMP-2 είναι αβέβαιη (61,62).

Η σύγκριση της ενεργοποίησης της προMMP-2 από κύτταρα που εκφράζουν MT1, MT2 και MT3-MMP, απέδειξε ότι η MT2 και MT3-MMP είναι λιγότερο αποτελεσματικές από την MT1-MMP. Σε αντίθεση με τις λοιπές MT-MMPs, η MT4-MMP είναι ανεπαρκής στην ενεργοποίηση της προMMP-2 (563,564).

Συγκεντρωτικά, όλα τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι MT-MMPs συμμετέχουν σε καταρράκτη ενεργοποίησης, που οδηγεί σε ενίσχυση της πρωτεόλυσης πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας.

MT-MMPs και εξωκυττάρια μηνυματοδότηση

Οι MT-MMPs εκτός από τη διάσπαση συστατικών της ΕΘΟ μπορούν να διασπών μεμβρανικές ή και περικυτταρικές πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας την κυτταρική συμπεριφορά στην καρκινική μετάσταση και αγγειογένεση. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν:

- 1.) Αλλαγές στις κυτταρικές και κυτταροστρωματικές επαφές.
- 2.) Απελευθέρωση, ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση αυτοκρινών ή παρακρινών μηνυματοδοτικών μορίων.
- 3.) Απελευθέρωση ή ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων.
- 4.) Ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μηνυματοδοτικών οδών

Οι MMP-2, MMP-9 και η MMP-13, ενεργοποιούν τον λανθάνοντα TGFβ(4). Η MT1-MMP ρυθμίζει την βιοδιαθεσιμότητα του μέσω διαφόρων μηχανισμών(565,566). Η αποδόμηση της δεσμευτικής πρωτεΐνης με αυξητικούς παράγοντες που μοιάζουν στην ινσουλίνη (IGF-BP), από αρκετές MMPs, απελευθερώνει IGF(567,568).

MT-MMPs και ενδοκυττάρια μηνυματοδότηση

Η εντόπιση της MT-MMP στην κυτταρική επιφάνεια, εντός εξειδικευμένων μεμβρανικών περιοχών, πλούσιων σε υποδοχείς και μηνυματοδοτικά μόρια τα <<caveoli>>, μπορεί να ενσωματώσει εξωκυττάρια μυνήματα (569).

Η MT1-MMP μπορεί να επάγει μεταγωγή σήματος και ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης(570,571). Το κυτταροπλασματικό τμήμα της MT1-MMP είναι διακριτό από εκείνο των MT2, MT3, MT5-MMP(572).

Εκτός από το σημαντικό ρόλο στην εντόπιση της MT1-MMP και στην ενεργοποίηση της προMMP-2, το κυτταροπλασματικό τμήμα της MT1-MMP

είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση της οδού ERK και στην υπερ-ρύθμιση του VEGF, μέσω των οδών της τυροσινικής κινάσης Src.(550)

Οι MMP-2, MMP-9 και MT3-MMP έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του EGFR.

MTMMPs ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Τα τελευταία χρόνια κλινικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η έκφραση των MT1- MMP και MMP-2 σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση ασθενών με προχωρημένο νευροβλάστωμα(573), μικροκυτταρικό Ca πνεύμονα (SCLC) (574), πλακώδες καρκίνωμα γλώσσας (575), καρκίνωμα κεφαλής - τραχήλου (576), ουροθηλιακό καρκίνωμα (577) και καρκίνωμα ωοθηκών (578).

Χαμηλά επίπεδα έκφρασης της MT1- MMP, θεωρούνται ως ευνοϊκοί δείκτες επιβίωσης σε προχωρημένο Ca παχέος εντέρου (579). Η MT1- MMP έχει προσδιορισθεί σε καρκινικά κύτταρα και στα γειτονικά στρωματικά κύτταρα σε μία ποικιλία ανθρώπινων καρκινωμάτων που περιλαμβάνουν μαστό, τράχηλο, παχύ έντερο, ουροδόχο κύστη, στόμαχο, πάγκρεας, ήπαρ, ωοθήκες, προστάτη και θυρεοειδή. Μελέτες με *insitu* υβριδισμό σε καρκινώματα πνεύμονα και μαστού αποκάλυψαν ότι το MT1- MMP mRNA εντοπίζεται στα στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα. (580,581,582).

. Το γεγονός αυτό προτείνει ότι το προφίλ έκφρασης της ποικίλει από τον ένα καρκινικό τύπο στον άλλο. Επιπλέον, η παραγωγή της MT1- MMP από τα καρκινικά κύτταρα, έχει συνδεθεί με τη μετάπτωση τους από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση(583).

Αν και η MT2- MMP έχει βρεθεί σε καρκινώματα τραχήλου, κεφαλής - τραχήλου, γλοιοβλαστώματος και αστροκυττώματος η έκφρασή της δεν σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου (580,583-5).

Οι Velasco-Loyden και συν., (566) ανέφεραν σε πειραματικό μοντέλο ότι η MT1- MMP ρυθμίζεται αρνητικά από την MT2- MMP. Το γεγονός μπορεί να εξηγήσει την έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της MT1- MMP και της επιθετικότητας των καρκινωμάτων, ωστόσο απαιτείται περισσότερη διερεύνηση. (566).

Η MT3- MMP έχει προσδιοριστεί σε καρκινώματα μαστού και νεφρού, αστροκυττώματα και μελανώματα (587). Οι MT5- MMP και MT6- MMP υπερεκφράζονται σε ανθρώπινα καρκινώματα εγκεφάλου. (587)

Υπάρχει σαφής ένδειξη ότι η MT1- MMP και η MMP-2 εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια της καρκινικής εξέλιξης, από την αρχική ανάπτυξη του όγκου, αύξηση και αγγειογένεση, στη διήθηση, μετάσταση και αύξηση σε δευτερογενείς θέσεις(588).

MT-MMP ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνουν στο ρόλο που διαδραματίζουν οι MT-MMPs στην αγγειογένεση σε παθολογικές και σε φυσιολογικές καταστάσεις. Η δραστηριότητα των MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP και MT5-MMP, είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση του μικροενδοθηλιακού κυττάρου σε σωλήνα εντός γέλης ινικής(589).

Σε γέλη 3D κολλαγόνου η έκφραση της MT1-MMP και της MT3-MMP απαιτούνται για την οργάνωση του ενδοθηλιακού κυττάρου σε αγγειακό δίκτυο (590,591). Καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν την MT1-MMP, αναπτύσσονται γρήγορα σχηματίζοντας όγκους με αυξημένη αγγείωση (592,593).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η προ-αγγειογενετική δράση της υπερέκφρασης της MT1-MMP μεσολαβεί από τουλάχιστον μία αύξηση της ρύθμισης του VEGF, σε επίπεδο πρωτεΐνης αλλά και m-RNA, μέσω υποδοχέα τυροσινικής κινάσης(594).

Εντούτοις, η έκφραση άλλων αγγειογενετικών παραγόντων όπως VEGF-B-C-D, PlGF, αγγειοποιητίνη ή των υποδοχέων τους VEGF-R1-R2-νευροπιλίνη, Tie-1 Tie-2, δεν επηρεάζεται από την υπερέκφραση της MT1-MMP (595).

Ο έλεγχος της βιοδιαθεσιμότητας του VEGF από τις MMPs έχει επίσης αναφερθεί σε διάφορες μελέτες. Η MMP-9 ελέγχει την βιοδιαθεσιμότητα του VEGF, αποδεσμεύοντάς τον από την κυτταρική μεμβράνη (ECM)(596).

Οι MMP-1-3-7 και 13 αποδομούν εκλεκτικά τον προσδεμένο στον VEGF συνδετικό ιστό του αυξητικού παράγοντα (CTGF), ενεργοποιώντας την αγγειογενετική του δράση (597).

Η κυτταρική πρωτεόλυση φαίνεται όλο και περισσότερο ότι αποτελεί σημαντικό γεγονός στον έλεγχο του τοπικού περιβάλλοντος γύρω από τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι MT-MMPs αποτελούν μία υποομάδα κλειδί για τα σχετιζόμενα με την κυτταρική μεμβράνη ένζυμα, συμμετέχοντας στη αναδόμηση του εξωκυτταρικού matrix (595,598).

Η πολυλειτουργικότητα των MT-MMPs χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση και ένα σημαντικό μελλοντικό σχέδιο είναι να επισημανθούν λεπτομερέστερα οι διαφορές μεταξύ των έξι MT-MMPs και να τεκμηριωθεί η υποτιθέμενη αφθονία τους.-

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη, σε πρωτεϊνικό επίπεδο, των Μεμβρανικού Τύπου-2 και -3 Μεταλλοπρωτεϊνών (MT-2 MMP/ MMP-15 και MT-3 MMP/MMP-16) καθώς και του αγγειογενετικού αυξητικού παράγοντα VEGF-C σε ουροθηλιακά καρκινώματα ουροδόχου κύστης. Για την εντόπιση των πρωτεϊνών εφαρμόσθηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος τριών βημάτων. Η έκφραση των ανωτέρω δεικτών υποβλήθηκε σε στατιστική ανάλυση για τη διερεύνηση της σχέσης τους με α) τις γνωστές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους του ουροθηλιακού καρκίνου (βαθμός κακοήθειας, στάδιο νόσου), β) νεότερους βιολογικούς δείκτες όπως ανοσοϊστοχημική έκφραση δεικτών απόπτωσης γ) την ολική και ελευθέρα νόσου επιβίωση των ασθενών. Οι πληροφορίες για τους νεότερους προγνωστικούς δείκτες προέκυψαν από την αρχειακή βάση δεδομένων του ερευνητικού εργαστηρίου της Καθηγήτριας κ. Νακοπούλου. Τα ευρήματα που προέκυψαν σχολιάζονται σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης των μελετώμενων δεικτών στην επιθετικότητα, διηθητικό δυναμικό και πρόγνωση του ουροθηλιακού καρκίνου.

ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 123 ασθενείς με καρκίνο του μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης (TCCs), οι οποίοι χειρουργήθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό».

Τα χειρουργικά παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμαλδεΐδης 10%, τα δε ιστικά δείγματα που ελήφθησαν για παθολογοανατομική εξέταση σκηνώθηκαν σε παραφίνη. Η μικροσκοπική εξέταση πραγματοποιήθηκε με χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τα ιστολογικά δείγματα ταξινομήθηκαν και οι όγκοι από μεταβατικό επιθήλιο κατατάχθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO/ISUP (1998). Οι όγκοι, ανεξάρτητα από τη θηλώδη τους διαμόρφωση, ταξινομήθηκαν ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης σύμφωνα με το τριτοβάθμιο σχήμα του Mostofi που υιοθετήθηκε από το American Bladder Tumor Registry και το οποίο αναγνωρίζει τρεις ιστολογικούς βαθμούς κακοήθειας [Grade 1 (καλής διαφοροποίησης) - 24 περιπτώσεις, Grade 2 (μέτριας διαφοροποίησης) - 40 περιπτώσεις, Grade 3 (φτωχής διαφοροποίησης) - 59 περιπτώσεις] (Πίνακας1).

Η σταδιοποίηση των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με το TNM σύστημα της Διεθνούς Ένωσης κατά του Καρκίνου (TNM System of the International Union against Cancer, 1999). Η σταδιοποίηση του όγκου πραγματοποιήθηκε βασισμένη στα αποτελέσματα του υπερηχογραφικού ελέγχου, της ενδοφλέβιας πυελογραφίας (όπου χρειαζόταν), υπολογιστικής τομογραφίας, αμφίχειρης κλινικής εξέτασης υπό αναισθησία και διουρηθρικής βιοψίας. Οι όγκοι διακρίθηκαν σε «επιφανειακούς» (Tα-T1) (71 περιπτώσεις) και σε «αμιγώς διηθητικούς» (T2-T4) (52 περιπτώσεις).

Αυτή η ομαδοποίηση (επιφανειακοί έναντι διηθητικών καρκινωμάτων) είναι δικαιολογημένη κλινικά διότι η φυσική εξέλιξη των TCCs υποστηρίζει το γεγονός ότι δεν πρόκειται για μία μοναδική-ενιαία πάθηση. Φαίνεται να υπάρχουν δύο ομάδες ασθενών με διαφορετική πορεία νόσου: ασθενείς με επιφανειακά στοιχεία ανάπτυξης και ασθενείς με όγκους που διηθούν το μυϊκό χιτώνα.

Από την άλλη μεριά, *in situ* (επίπεδοι όγκοι) TCCs (Tis) δεν συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη διότι αντιπροσωπεύουν μια

ξεχωριστή οντότητα των προδιηθητικών βιολογικά επιθετικών όγκων, που δεν μπορούν να καταταγούν στην ομάδα των επιφανειακών θηλωδών όγκων TCCs.

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 68,99 έτη (31 έως 89 ετών) και η αναλογία ανδρών / γυναικών 107:16.

Το μέσο διάστημα παρακολούθησης των ασθενών ήταν 82,24 μήνες με ελάχιστο χρόνο παρακολούθησης ένα μήνα και με μέγιστο χρόνο παρακολούθησης 193 μήνες. Από τους 123 ασθενείς, οι 51 απεβίωσαν από τη νόσο κατά τη χρονική διάρκεια παρακολούθησης.

Κανένας από τους ασθενείς δεν έλαβε προηγουμένως χημειοθεραπεία, ενδοκυτικές εγχύσεις ή ακτινοβολία. Οι επιφανειακοί όγκοι παρακολουθήθηκαν και αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά μόνο μετά από υποτροπή με ενδοκυτικές εγχύσεις, είτε με BCG είτε με επιρουμπικίνη, σύμφωνα με τα κλινικά πρωτόκολλα. Τα διηθητικά καρκινώματα αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά με κυστεκτομή, ακτινοβολία ή συστηματική χημειοθεραπεία.

ΜΕΘΟΔΟΙ

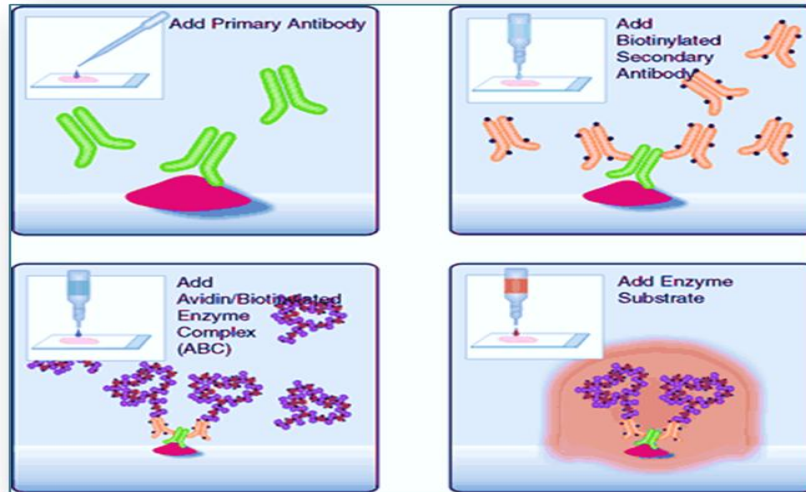
Ο προσδιορισμός των MT-2, MT-3 MMPs και VEGF-C στα ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης από κύβους παραφίνης αρχειακού υλικού, πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή ενζυμικής ανοσοϊστοχημικής μεθόδου, η οποία βασίζεται στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες των ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου προϊόντος. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η υπεροξειδάση του ραπανιού, ενώ η μέθοδος, αυτή του συμπλέγματος Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης (ABC / HPR).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία βήματα:

- 1^ο) εφαρμογή του πρωτογενούς αντισώματος,
- 2^ο) εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος, και
- 3^ο) επώαση με το σύμπλεγμα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης.

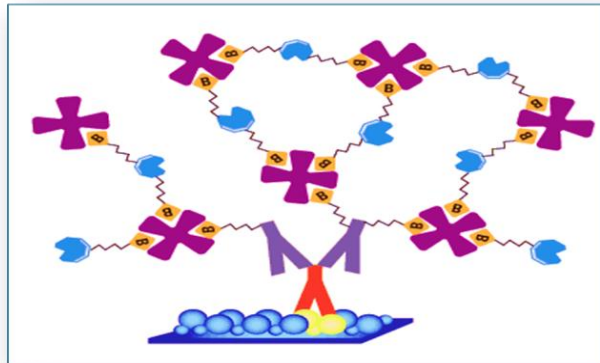
Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, λόγω της μεγάλης δεσμευτικής ικανότητας μεταξύ της αβιδίνης και της βιοτίνης. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με MB 70.000 Daltons, που προέρχεται από το λευκό του αυγού της κότας και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (4 συνδετικές θέσεις ανά μόριο) για τη βιοτίνη. Η βιοτίνη, δηλαδή η βιταμίνη Η, είναι προσθετική ομάδα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και χρησιμεύει ως μεταφορέας διοξειδίου του άνθρακα μέσα στα μιτοχόνδρια. Έχει την τάση να συνδέεται με IgG γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αβιδίνη με την οποία κάνει ισχυρή σύνδεση («Βιολογία Κυττάρου», Μαργαρίτης και συν., 2004).

Το πρώτο αντίσωμα συνδέεται με το δεύτερο αντίσωμα που είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με βιοτίνη. Αυτή στη συνέχεια μπορεί να συνδεθεί με το σύμπλεγμα Αβιδίνης – Βιοτίνης – Υπεροξειδάσης, το οποίο και ανιχνεύεται ιστοχημικά (Εικόνες 1-2)



Εικόνα 1

- (α) προσθήκη πρωτογενούς (ειδικού) αντισώματος
- (β) προσθήκη δευτερογενούς βιοτινυλιωμένου αντισώματος
- (γ) προσθήκη συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-ένζυμο
- (δ) προσθήκη υποστρώματος ενζύμου



Εικόνα 2

- (i) Κίτρινο χρώμα = υπό μελέτη αντιγόνο
- (ii) Πορτοκαλί χρώμα = πρώτο αντίσωμα
- (iii) Μωβ χρώμα = δεύτερο αντίσωμα
- (iv) Βυσσινί χρώμα = αβιδίνη
- (v) Μπλε χρώμα = ένζυμο
- (vi) B = βιοτίνη

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος των τριών βημάτων της αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης, εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης πάχους 4 μm που έχουν προέλθει από τα καρκινώματα της ουροδόχου κύστης της μελέτης αυτής.

Οι τομές παραφίνης υποβλήθηκαν αρχικά σε αποπαραφίνωση με τον οργανικό διαλύτη ξυλόλη για 30 min (15 min x 2), ενυδάτωση με κατιόντα διαλύματα αιθανόλης [100° (5 min x2), 96° (5 min x2)] και τέλος εμβύθιση σε απεσταγμένο νερό. Η χρήση του ενζύμου υπεροξειδάση προϋποθέτει την εξουδετέρωση του ενδογενούς ενζύμου των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, οι τομές επώασθηκαν με διάλυμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα για 30 min σε σκοτεινό περιβάλλον. Οι τομές, μετά το πέρας της αντίδρασης, εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TBS [Tris Buffer Saline (50mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.6 σε αναλογία 1:9)].

Η χρήση της φορμαλδεΰδης ως μονιμοποιητικού μέσου είναι γνωστό ότι προκαλεί ενδοδιασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να μειώνεται η αντιγονικότητα των ιστών, λόγω «κάλυψης» των επιτόπων. Για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01 M, pH 6.0 και υπέστησαν προεργασία θέρμανσης σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 750 Watt για 10 min (5 min X2). Ακολούθως οι τομές αυτές παρέμειναν στο ίδιο διάλυμα και σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min ώστε να επανέλθουν σταδιακά σε χαμηλότερη θερμοκρασία (περιβάλλοντα χώρου) και να ανακτήσουν οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες την τριτοταγή τους διαμόρφωση.

Οι ιστικές τομές με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και ρυθμιστικό διάλυμα TBS, όπου και παρέμειναν για 5 min.

Ακολούθησε επικάλυψη των τομών με φυσιολογικό ορό αλόγου (horse) με αραιώση 1:5 (normal horse serum: TBS) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20-30 min με στόχο την ελάττωση της μη ειδικής χρώσης που μπορεί να προέρχεται από ενδοδιασταυρούμενες αντιδράσεις τόσο των πρωτογενών

αντισωμάτων με τα ενδογενή αντιγόνα, όσο και των αντιορών του συστήματος προσδιορισμού.

Στη συνέχεια, μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου αντιορού, οι τομές επικαλύφθηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα και η επώαση έγινε ολονύκτια στους 4°C. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. MT-2 MMP: πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού(rabbit polyclonal, RB 9280-P) έναντι της καταλυτικής δομικής περιοχής της MT-2 MMP ποντικού(αναγνωρίζει ειδικά το ανθρώπινο αντιγόνο) της εταιρείας Neomarkers, LabVision (Fremont, CA). Η αραίωση που εφαρμόστηκε ήταν 1:50 σε TBS.
2. MT-3 MMP: πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού(rabbit polyclonal, RB-1547-P) έναντι της καταλυτικής δομικής περιοχής της ανθρώπινης MT-3 MMP της εταιρείας Neomarkers, LabVision (Fremont, CA). Η αραίωση που εφαρμόστηκε ήταν 1:80 σε TBS
3. VEGF-C: πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας(goat polyclonal, C-20, sc-1881) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) έναντι του καρβοξυτελικού άκρου του ανθρώπινου VEGF-C. Η αραίωση που εφαρμόστηκε ήταν 1:50 σε TBS

Την επόμενη ημέρα οι τομές εκπλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS για 15 min (5 min X3). Το σύστημα προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για την εντόπιση των συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος ήταν το Kit αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης της εταιρείας Vector (VectorLab, Burlingame, CA), οι αντιοροί του οποίου είχαν παραχθεί σε άλογο(horse).

Οι τομές επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min με το βιοτινυλιωμένο αντιορό αλόγου έναντι ανοσοσφαιρίνης 1)κουνελιού (biotinylated horse anti-rabbit IgG) σε αραίωση 1:50 σε TBS για τις MT-MMPs και 2) αίγας (biotinylated horse anti-goat IgG) σε αραίωση 1: 80 για τον VEGF-C. Οι τομές, ακολούθως, εκπλύθηκαν με TBS για 15 min (5 min X3) και εν συνεχεία επωάστηκαν με το σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και αραίωση 1:50 για το κάθε συστατικό σε TBS.

Οι τομές εκπλύθηκαν με TBS για 15 min (5 min X3) και η χρωστική αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επώαση των τομών με διάλυμα 0,5 mg/ml τετραϋδροχλωρικής 3,3' διαμινοβενζιδίνης (DAB) (Sigma, Chemical Co.,

St.Louis MO) και 0,06% H₂O₂ σε Tris ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris base pH 7.6) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η DAB αποτελεί το χρωμογόνο υπόστρωμα της υπεροξειδάσης και η αντίδραση πολυμερισμού της, με ταυτόχρονη πρόσληψη δύο ηλεκτρονίων που προέρχονται από το υπεροξειδίο παρέχει με καφέ χρώμα τις εντοπίσεις των ανοσοσυμπλεγμάτων.

Τα τελευταία βήματα της μεθόδου αφορούσαν στη χρώση υποστρώματος με αιματοξυλίνη Harris, για την εκτίμηση της μορφολογίας του ιστού, στην αφυδάτωση με ανιόντα διαλύματα αιθανόλης (αντίστροφη πορεία της αρχικής ενυδάτωσης), στη βύθιση σε ξυλόλη και τέλος επίστρωση των αντικειμενοφόρων πλακιδίων με καλυπτρίδα και μικροσκόπηση.

Μάρτυρες: Ως θετικοί μάρτυρες για τις MMPs χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από διηθητικά καρκινώματα μαστού. Αρνητικοί μάρτυρες αποτέλεσαν τομές παραφίνης από τα ίδια καρκινώματα, στις οποίες εφαρμόσθηκαν όλα τα βήματα της μεθόδου, με τη διαφορά της αντικατάστασης των πρωτογενών αντισωμάτων με TBS και στόχο την εκτίμηση της μη ειδικής χρώσης που πιθανά μπορεί να δημιουργηθεί από ενδοδιασταυρούμενες επιδράσεις με τα αντιδραστήρια του συστήματος προσδιορισμού.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

VEGF-C: Τα χρωστικά αποτελέσματα αξιολογήθηκαν από δύο παθολογοανατόμους με ημιποσοτική εκτίμηση της έντασης της χρώσης και του αριθμού των θετικών κυττάρων. Μελετήθηκαν 10 οπτικά πεδία με μεγέθυνση 400X για κάθε περίπτωση. Σε κάθε ένα από αυτά μετρήθηκαν τα θετικά κύτταρα και το επί τοις εκατό ποσοστό της θετικής έκφρασης ήταν ο μέσος όρος των θετικών κυττάρων και των 10 πεδίων.

Η ανοσοδραστικότητα εκτιμήθηκε ως συνδυασμός της έντασης και έκτασης της θετικής χρώσης.

Η ένταση της χρώσης μετά από σύγκριση με τους θετικούς μάρτυρες κατατάχθηκε σε 3 κατηγορίες:

- Ασθενής ένταση χρώσης (+)
- Μέτρια ένταση χρώσης (++)

- Εντονη ένταση χρώσης (+++)

Η έκταση της χρώσης με βάση το επί τοις εκατό ποσοστό θετικότητας κατατάχθηκε σε 4 κατηγορίες (κλίμακα 0-3):

- Αρνητική έκφραση (0) = <10% θετικά κύτταρα
- Ασθενής θετική έκφραση (1) = 10%-20% θετικά κύτταρα
- Μέτρια θετική έκφραση (2) = 21%-50% θετικά κύτταρα
- Εντονα θετική έκφραση (3) = >50% θετικά κύτταρα

Ο συνυπολογισμός έδωσε αποτελέσματα που συμπίπτουν με την κλίμακα της έκτασης της θετικότητας.

MT-MMPs: Εκτιμήθηκε ομοίως τόσο η έκταση όσο και η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Η έκταση της χρώσης εκτιμήθηκε σε μία κλίμακα τεσσάρων διαβαθμίσεων στην οποία το 0 (μηδέν) αντιστοιχούσε σε πλακίδια όπου ένα ποσοστό μικρότερο του 10% των κυττάρων ήταν θετικό, το 1 (ένα) αντιστοιχούσε σε πλακίδια όπου το ποσοστό των θετικών κυττάρων κυμαίνεται από 11-20%, το 2 (δύο) αντιστοιχούσε σε πλακίδια όπου το ποσοστό των θετικών κυττάρων κυμαίνεται από 21-30% και τέλος το 3 (τρία) αντιστοιχούσε σε πλακίδια όπου το ποσοστό των θετικών κυττάρων είναι μεγαλύτερο από 30%. Η ένταση της χρώσης εκτιμήθηκε σε μία κλίμακα τριών διαβαθμίσεων όπου το ένα (+) αντιστοιχεί σε ασθενή χρώση, το δύο (++) σε μέτρια χρώση και το τρία (+++) σε ισχυρή χρώση. Η συνολική εκτίμηση της χρώσης υπολογίσθηκε πολλαπλασιάζοντας την εκτιμηθείσα έκταση της χρώσης με την εκτιμηθείσα ένταση της χρώσης. Στις περιπτώσεις όπου το γινόμενο αυτό προέκυπτε μεγαλύτερο ή ίσο της μονάδας θεωρείτο ότι υπάρχει θετική έκφραση.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Κατά τη στατιστική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ανάλυση Pearson's chi-square και Fisher's exact probability test για την αξιολόγηση της σχέσης των μελετώμενων δεικτών με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους του ουροθηλιακού καρκινώματος (ηλικία, φύλο, βαθμός κακοηθείας, στάδιο της νόσου) και την έκφραση των λοιπών μοριακών δεικτών.

Η στατιστική ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών σε σχέση με την έκφραση των μελετώμενων δεικτών έγινε με μονοπαραγοντική (Log-Rank test) στατιστική ανάλυση, ενώ η διερεύνηση της ανεξάρτητης προγνωστικής σημασίας της έκφρασης των ως άνω πρωτεϊνών και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων της μελέτης σε σχέση με την επιβίωση των ασθενών πραγματοποιήθηκε με το πολυπαραγοντικό μοντέλο ανάλυσης κινδύνου (Cox's proportional hazard regression model).

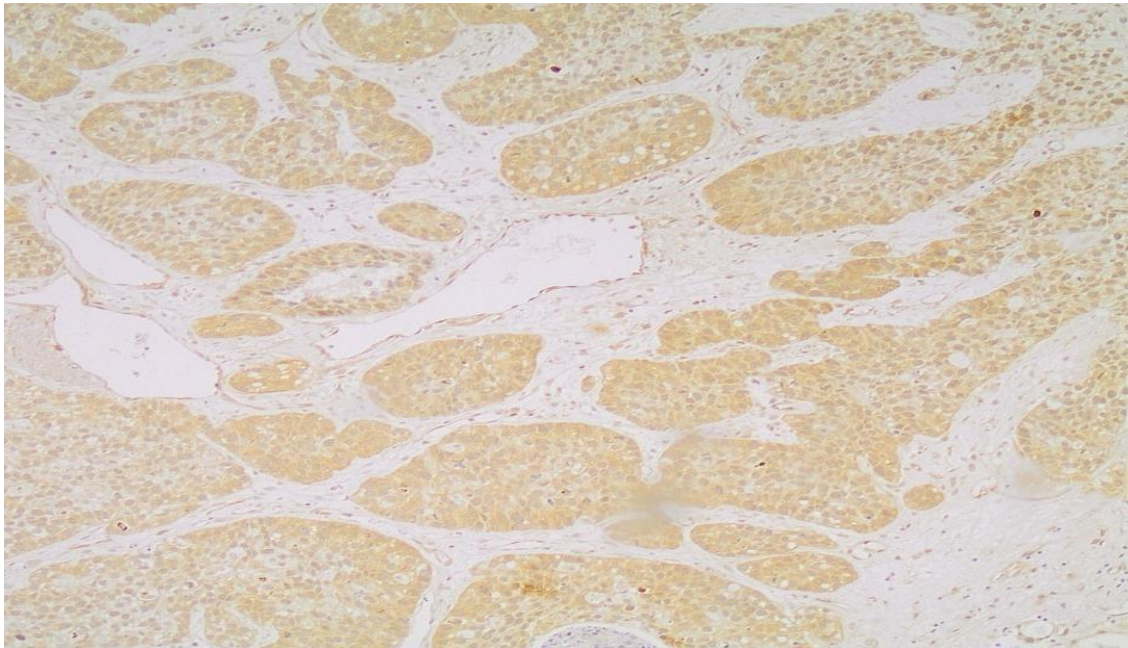
Στις παραπάνω δοκιμασίες, η στατιστική σημαντικότητα $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

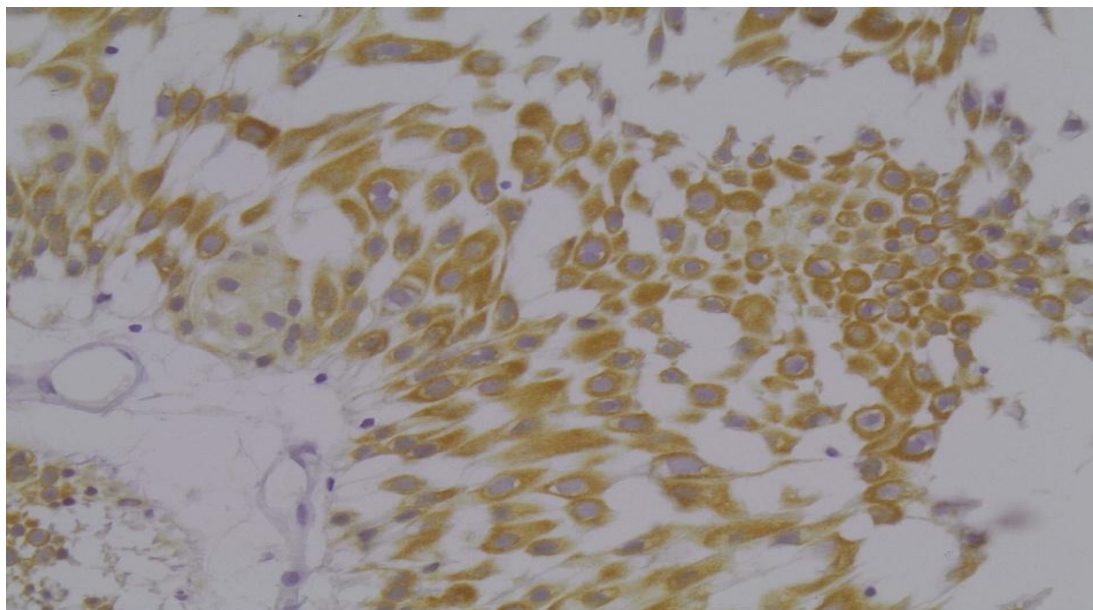
1. ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

VEGF-C

Από τα 123 ουροθηλιακά καρκινώματα που μελετήθηκαν 27(22%) ήταν θετικά για τον παράγοντα VEGF-C. Παρατηρήθηκε εντόπιση του VEGF-C, κύρια, στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 1-3) και περιστασιακά στις στρωματικές ινοβλάστες. Ελαφρά θετική έκφραση παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό ουροθήλιο, όπου αυτό συνυπήρχε(Εικόνα 4). Το πρότυπο της χρώσης ήταν διάχυτο κυτταροπλασματικό, με ετερογένεια στην ένταση από μέτρια έως έντονη ανοσοδραστικότητα.



Εικόνα 2. Ελαφρά θετική έκφραση του VEGF-C στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων ενός ουροθηλιακού καρκινώματος(ABC/HRPx200)

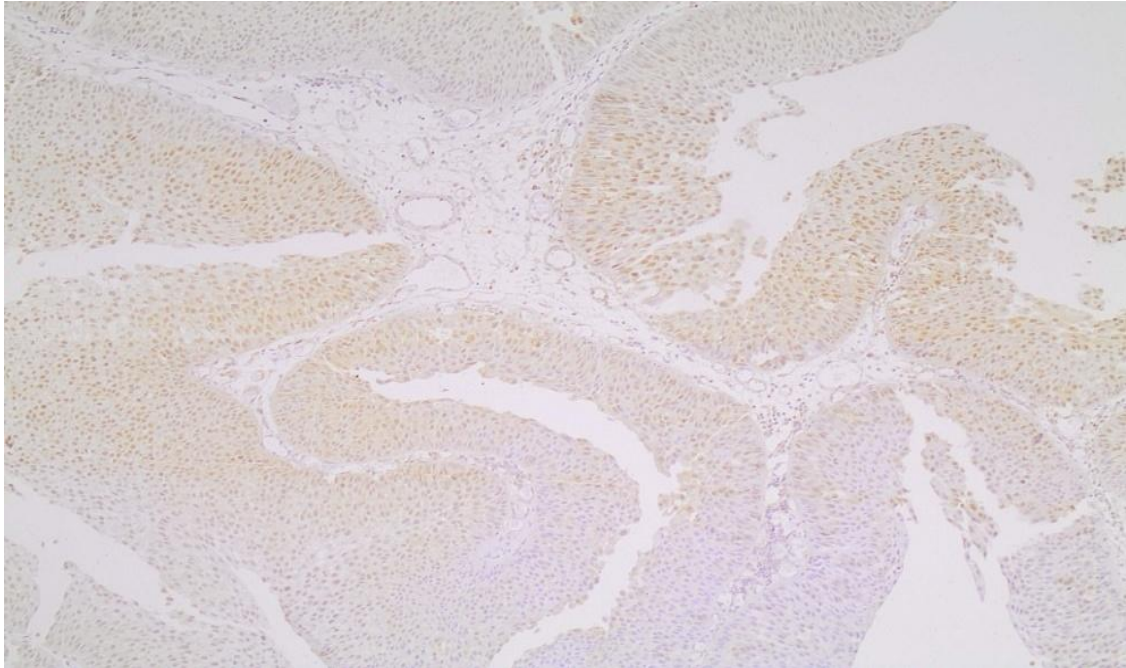


Εικόνα 3. Εντονα θετική έκφραση του VEGF-C σε πολλά καρκινικά κύτταρα (ABC/HRP \times 300)

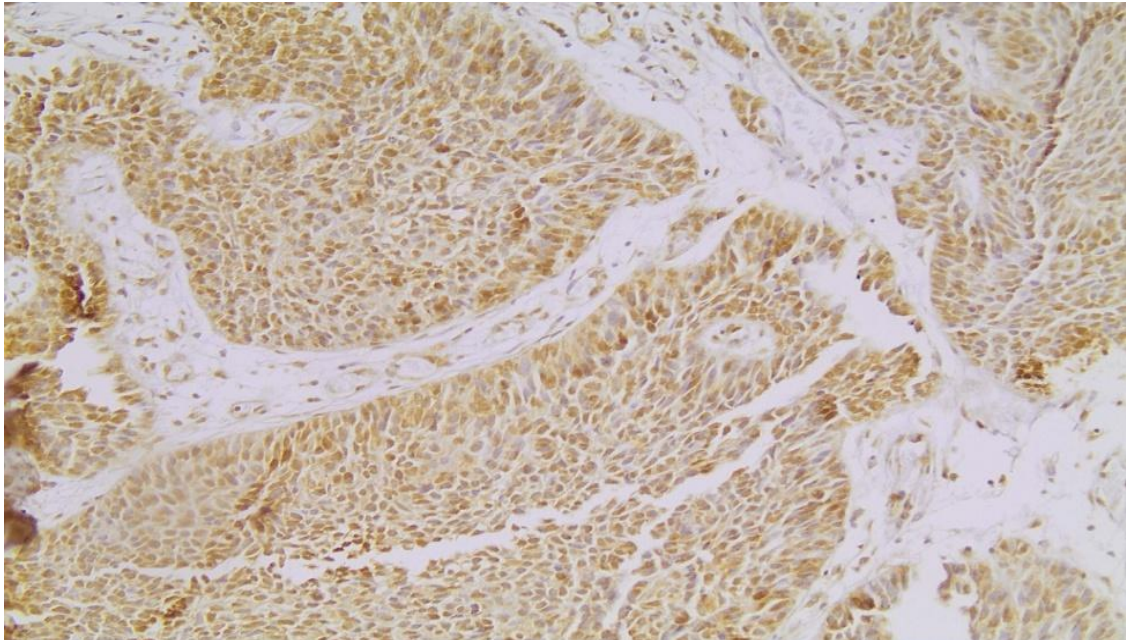
MT2-MMP

Θετική ανοσοδραστικότητα για την MT2-MMP παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων, με διάχυτο πρότυπο και ετερογένεια στην ένταση (Εικόνες 5-8). Σποραδικά παρατηρήθηκε και στρωματική εντόπιση. Θετική κυτταροπλασματική έκφραση ανευρέθη σε ποσοστό 60,3% (70 περιπτώσεις από τις 116 που μελετήθηκαν) των καρκινικών κυττάρων. Θετική πυρηνική εντόπιση σημειώθηκε σε ποσοστό 36,2% (42/116 περιπτώσεις). Το φυσιολογικό ουροθήλιο, όπου συνυπήρχε, ήταν αρνητικό.

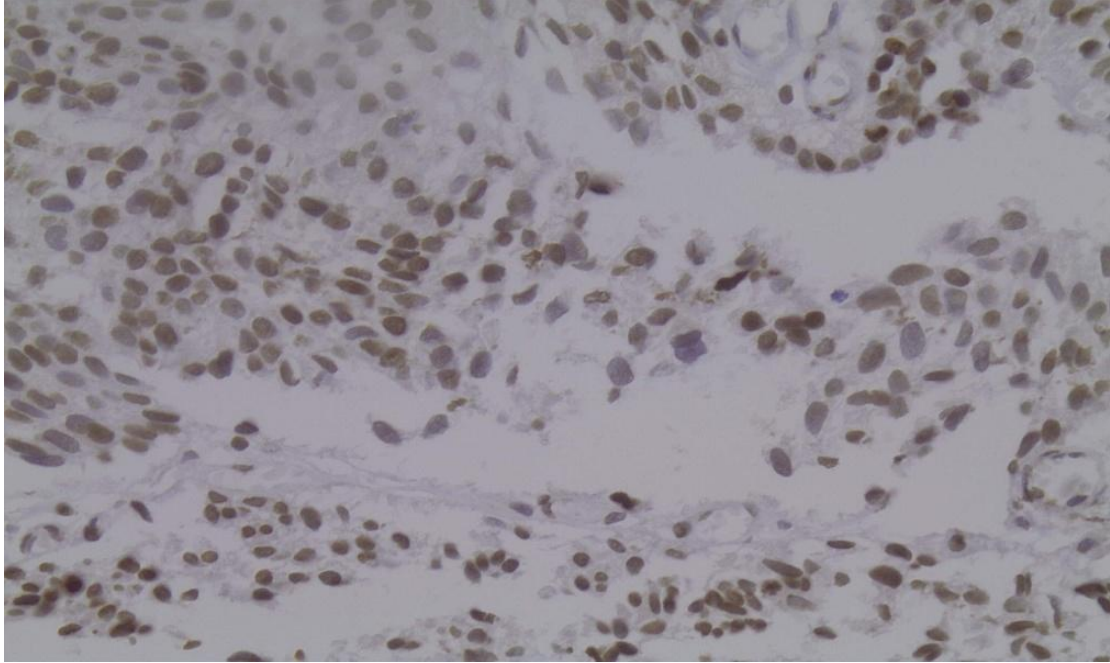
Εικόνα 5. Ελάχιστη έκφραση της MT2-MMP στο κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRPx200)



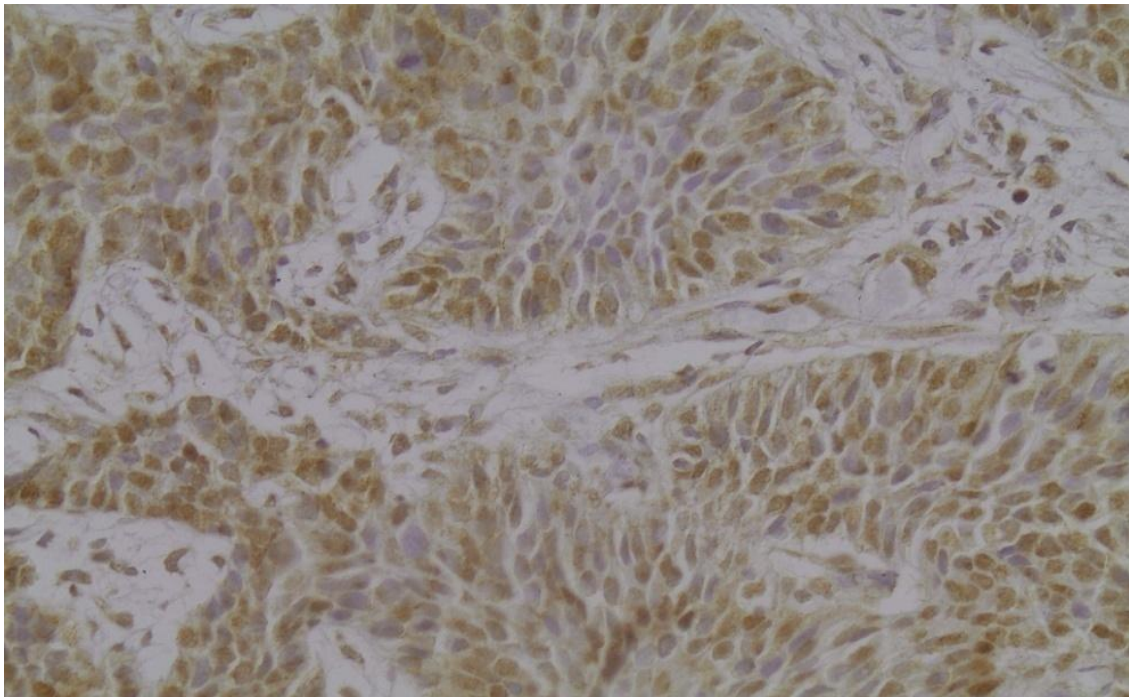
Εικόνα 6. Κυτταροπλασματική εντόπιση της MT2-MMP σε καρκινικά κύτταρα (ABC/HRP x400)



Εικόνα 7. Πυρηνική εντόπιση της MT2-MMP σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 250)

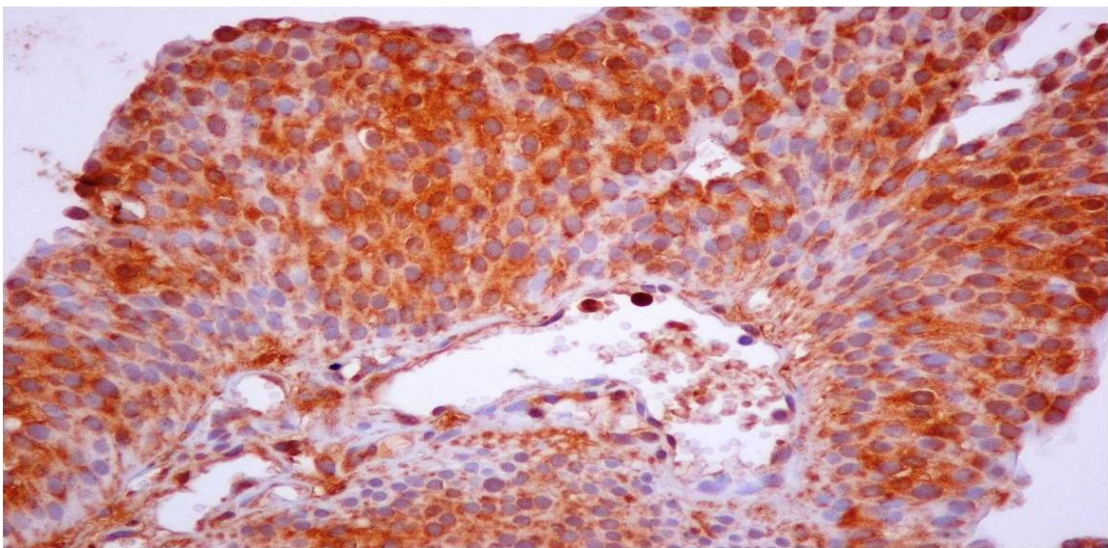


Εικόνα 8. Πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση της MT2-MMP σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 300)

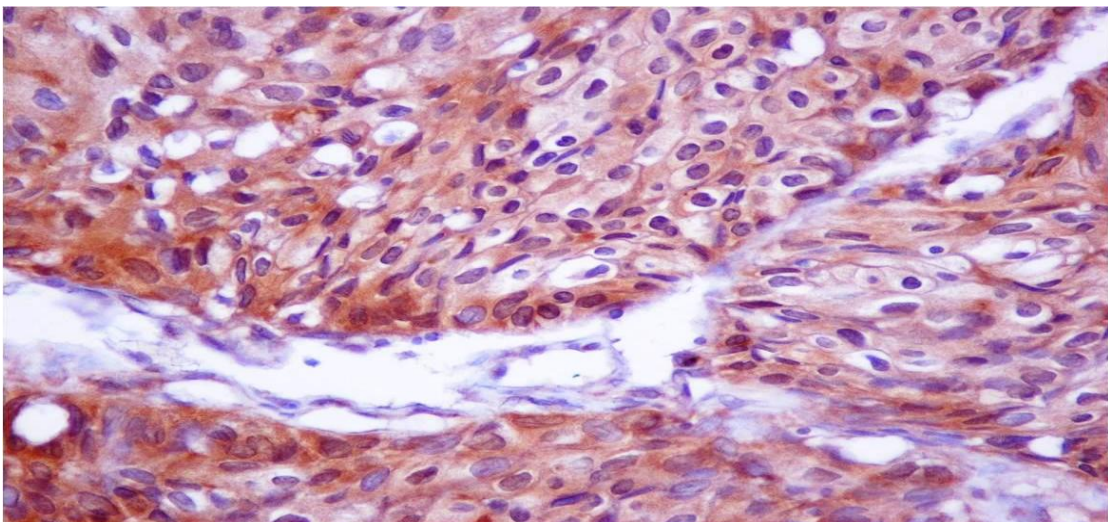


MT3-MMP

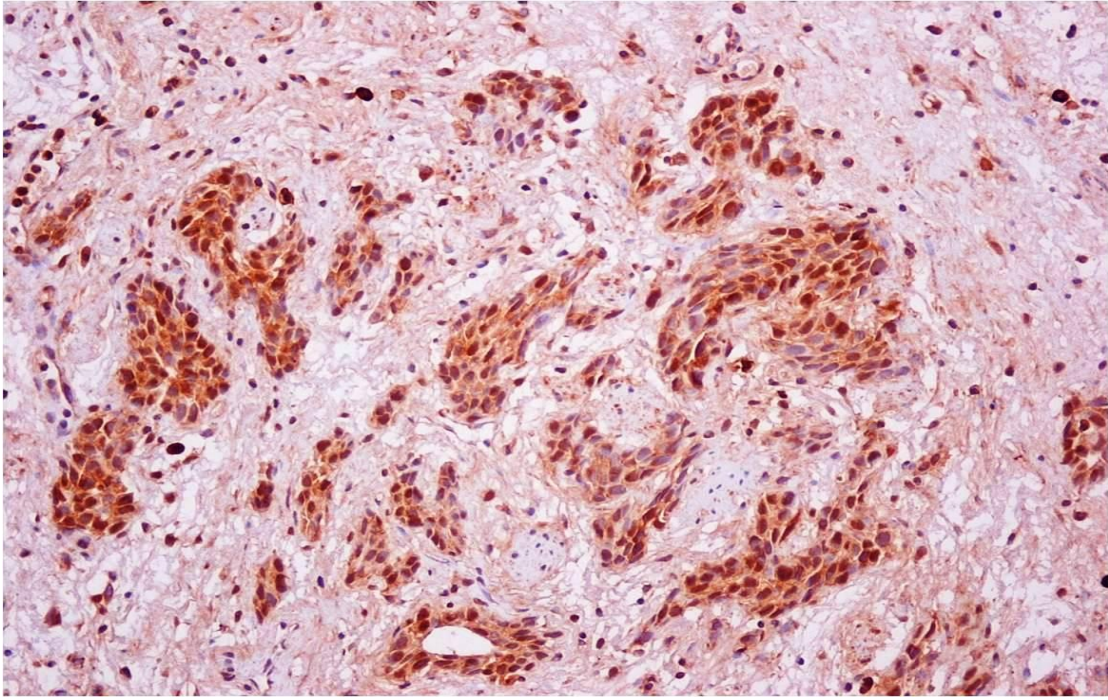
Θετική ανοσοδραστικότητα για την MT3-MMP παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων, με διάχυτο πρότυπο και ετερογένεια στην ένταση(Εικόνες 9-12). Θετική κυτταροπλασματική έκφραση ανευρέθη σε ποσοστό 64,8% (55 περιπτώσεις από τις 91 που μελετήθηκαν) των καρκινικών κυττάρων. Θετική πυρηνική εντόπιση σημειώθηκε σε ποσοστό 32,2%(30/91 περιπτώσεις). Το φυσιολογικό ουροθήλιο, όπου συνυπήρχε, ήταν αρνητικό



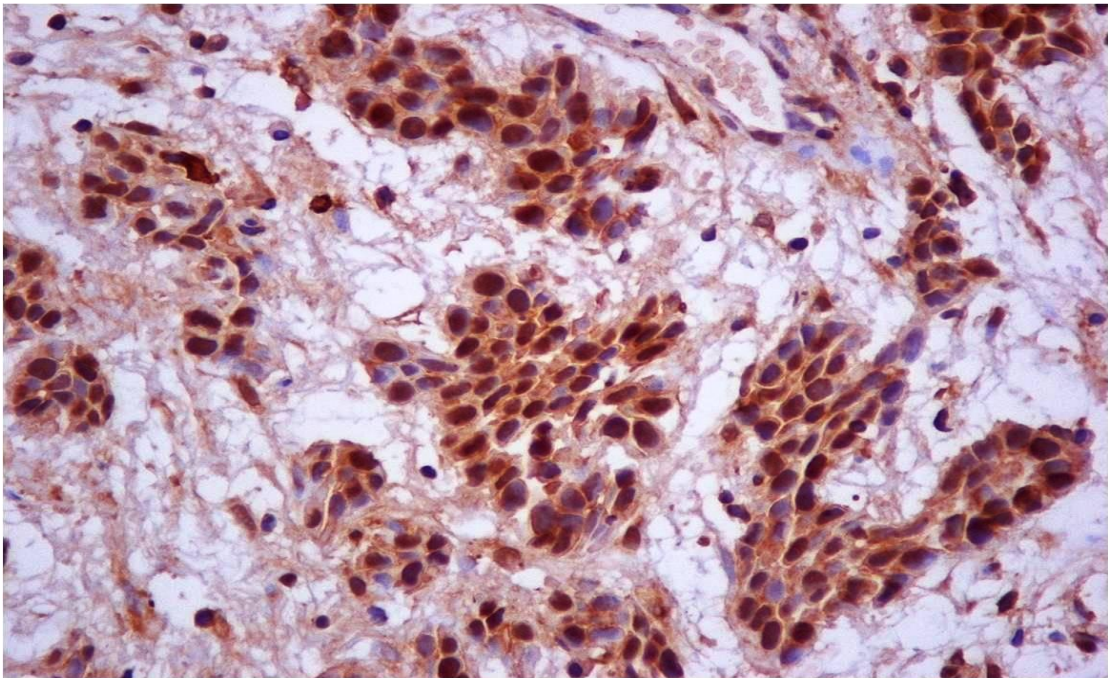
Εικόνα 9. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της MT3-MMP στο κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 250)



Εικόνα 10. Κυτταροπλασματική εντόπιση της MT3-MMP σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 400)



Εικόνα 11. Πυρηνική εντόπιση της MT3-MMP σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 250)



Εικόνα 12. Πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση της MT3-MMP σε καρκινικά κύτταρα ουροθηλιακού καρκινώματος (ABC/HRP \times 300)

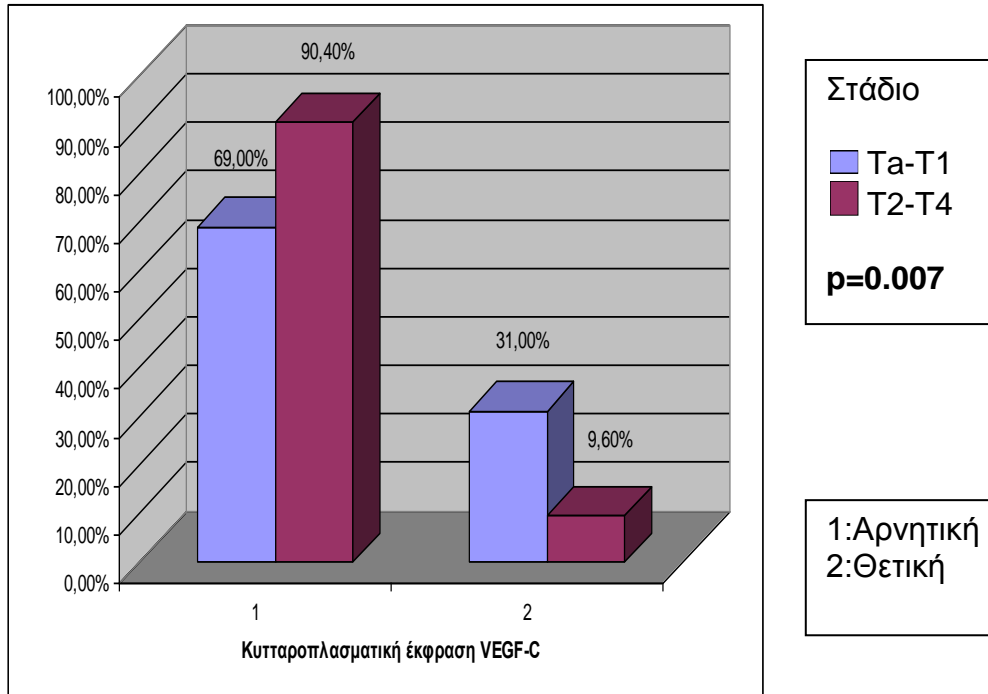
2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

VEGF-C

Κατά τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων αναδείχθηκε ανάστροφη σχέση μεταξύ της ανοσοδραστικότητας του VEGF-C και του σταδίου του όγκου ($p=0,007$)(Πίνακας 1, Γράφημα 1). Ανιχνεύθηκε πιο συχνά στα επιφανειακά (pTα-pT1) από ότι στα διηθητικά (pT2-pT4) ουροθηλιακά καρκινώματα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο και το βαθμό κακοηθείας (Πίνακας 1)

Πίνακας 1. Συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-C με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά 123 ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης

ΘΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF-C				
Παράμετροι	Σύνολο περιπτώσεων	Θετικές περιπτώσεις	% θετικότητα	Στατιστική σημαντικότητα p
Σύνολο	123	27	22,0	
Φύλο				
Ανδρες	107	24	22,4	NS
Γυναίκες	16	3	18,8	
Βαθμός Κακοηθείας				NS
1	24	8	33,3	
2	40	9	22,5	
3	59	10	16,9	
Στάδιο				0,007
pTα-T1	71	22	31,0	
pT2-T4	52	5	9,6	



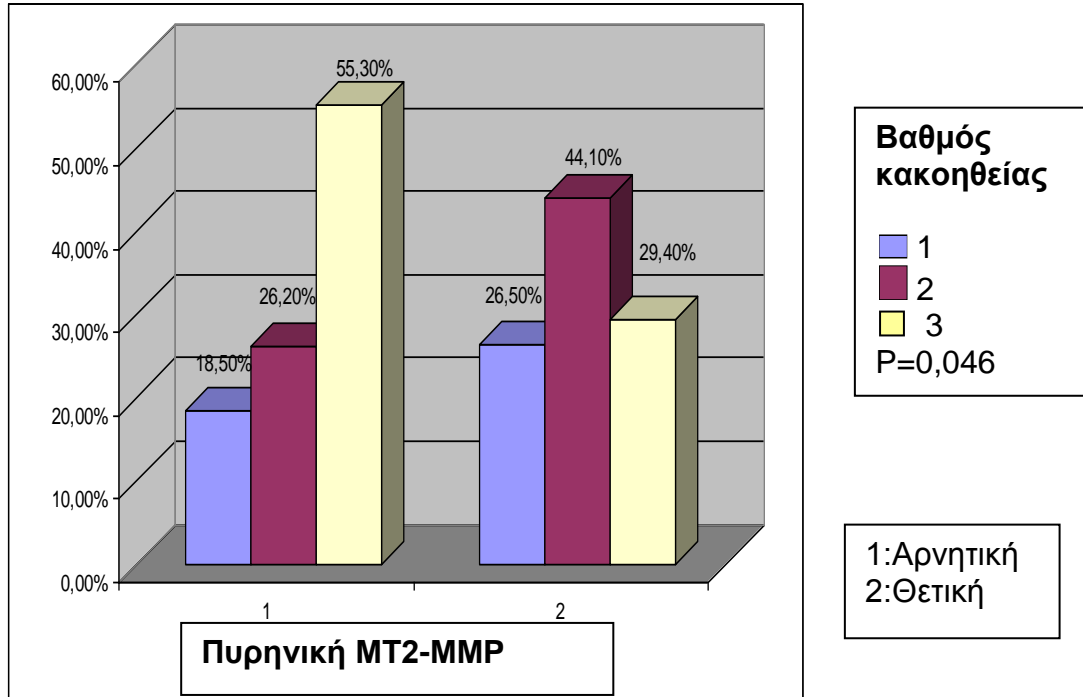
Γράφημα 1: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης του VEGF-C με το στάδιο

MT2-MMP

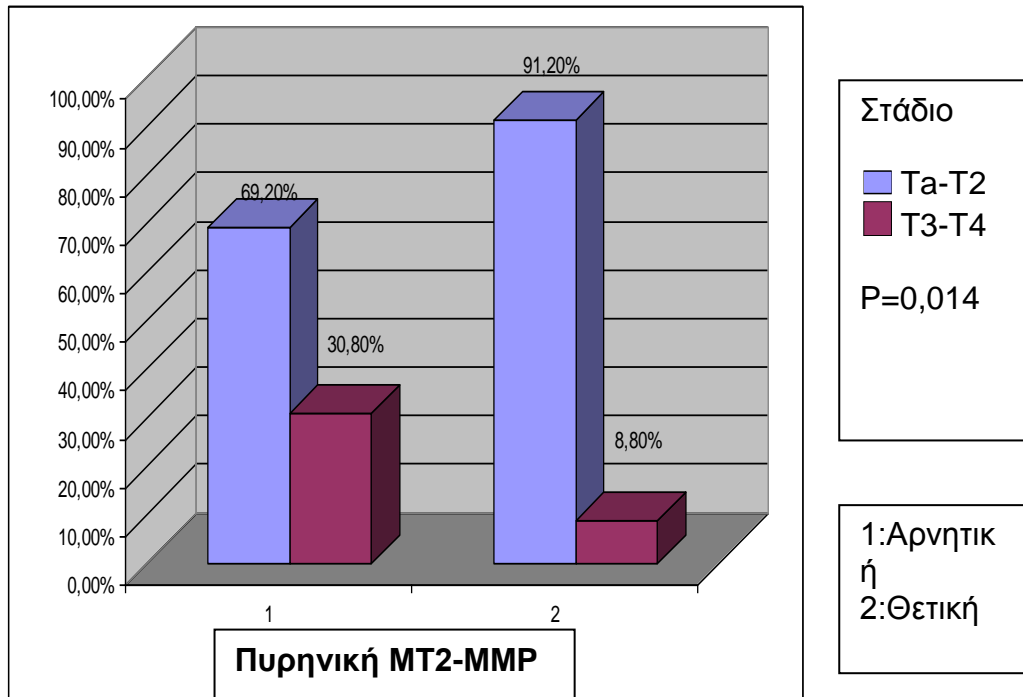
Η πυρηνική εντόπιση της MT2-MMP παρουσίασε ανάστροφη συσχέτιση με το βαθμό κακοηθείας ($p=0.046$) (Πίνακας 2, Γράφημα 2). Πυρηνική εντόπιση παρατηρήθηκε συχνότερα στα grade 1 και 2 έναντι του grade 3. Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιφανειακών και διηθητικών καρκινωμάτων (Πίνακας 2). Ωστόσο, όταν διακρίναμε τις περιπτώσεις σε στάδιο Ta-T2 και T3-T4, τότε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ανάστροφη συσχέτιση με το στάδιο ($p=0,014$). (Γράφημα 3)

Πίνακας 2. Συσχέτιση της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής έκφρασης της MT2-MMP με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά 116 ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης

ΘΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ MT2-MMP								
	ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ				ΠΥΡΗΝΙΚΗ			
Παράμετροι (έκφραση)	Σύνολο Περιπτ.	Θετικές περιπτ.	% θετικό- τητα	Στατ. σημαντ ικότητα p	Σύνολο Περιπτ	Θετικές περιπτ.	% θετικό- τητα	P
Σύνολο	116	70	60,3		116	42	36,2	
Φύλο								
Ανδρες	101	34	87,2	NS	101	36	87,8	NS
Γυναίκες	15	5	12,8		15	5	12,2	
Βαθμός Κακοηθείας								
1	21	8	26,7	NS	21	9	26,5	0,046
2	32	10	33,3		32	15	44,1	
3	46	12	40,0		46	10	29,4	
Στάδιο								
pTa-T1	63	20	66,7	NS	63	25	73,5	NS
pT2-T4	36	10	33,3		36	9	26,5	



Γράφημα 2: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης της πυρηνικής εντόπισης της MT2-MMP με το βαθμό κακοηθείας



Γράφημα 3: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης της πυρηνικής εντόπισης της MT2-MMP με το στάδιο

Η κυτταροπλασματική MT2-MMP δεν εμφάνισε καμία στατιστικά σημαντική σχέση με τους προγνωστικούς δείκτες του ουροθηλιακού καρκινώματος(Πίνακας 2)

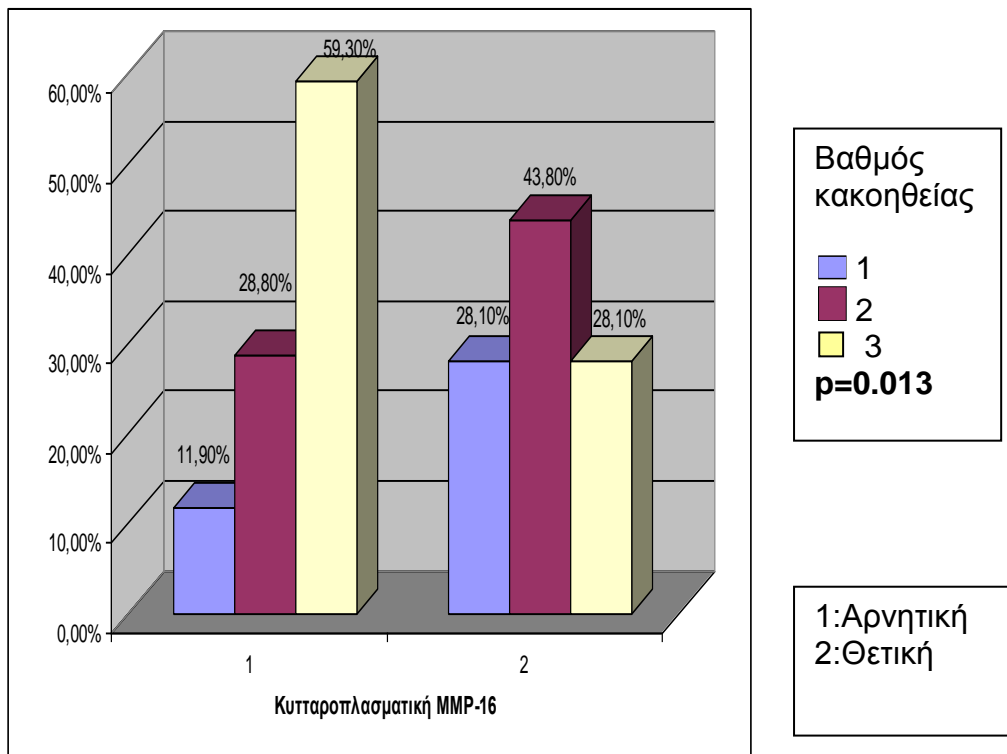
MT3-MMP

Η κυτταροπλασματική έκφραση της MT3-MMP, συσχετίστηκε αντίστροφα με τον βαθμό κακοηθείας των ουροθηλιακών καρκινωμάτων ($p=0.013$). (Πίνακας 3, Γράφημα 4). Η κυτταροπλασματική έκφραση της MT3-MMP ανιχνεύτηκε συχνότερα στα επιφανειακά (pTα-T1) σε σχέση με τα διηθητικά (T2-T4) ουροθηλιακά καρκινώματα ($p=0.07$)(Πίνακας 3,Γράφημα 5).

Η πυρηνική εντόπιση της MT3-MMP δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το φύλο, το βαθμό κακοήθειας και το στάδιο της νόσου(Πίνακας 3).

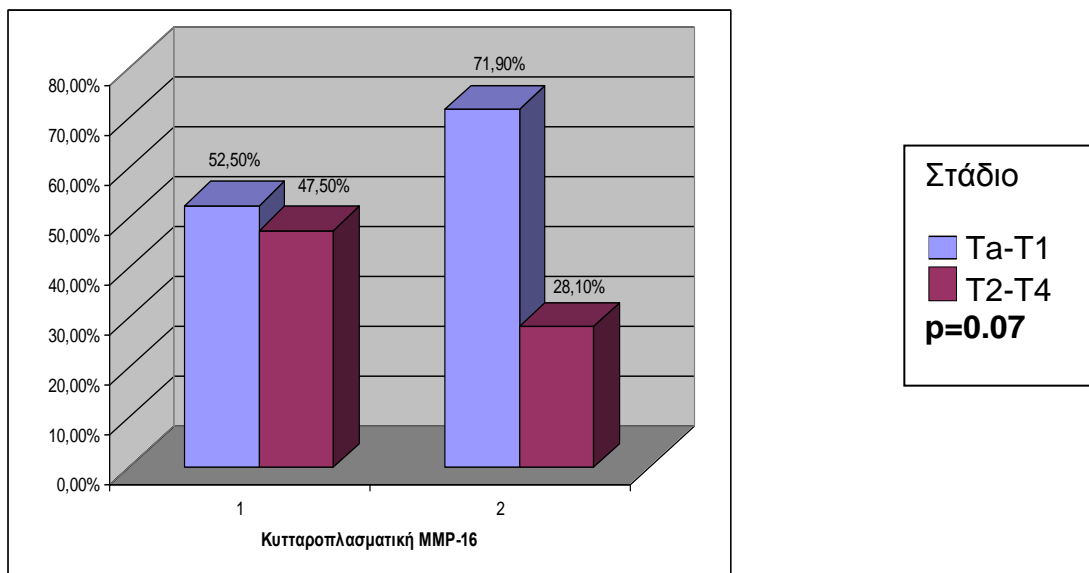
Πίνακας3: Συσχέτιση της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής έκφρασης της MT3-MMP με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά 91 ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο της ουροδόχου κύστης

Χαρακτηριστικό		πυρηνικό MT3-MMP				κυτταροπλασματικό MT3-MMP			
		Σύνολο	θετικό	%	p	Σύνολο	θετικό	%	p
Φύλο	άνδρες	79	14	17,70%	NS	79	28	35,40%	NS
	γυναίκες	11	2	18,20%		12	4	33,30%	
Στάδιο	pTα-T1	53	12	22,60%	NS	53	23	43,40%	0,07
	pT2-T4	37	4	10,80%		38	9	23,70%	
Ιστολ. βαθμός διαφοροποίησης	1	16	5	31,30%	NS	16	9	56,30%	0,013
	2	31	6	19,40%		31	14	45,20%	
	3	43	5	11,60%		44	9	20,50%	



Κυτταροπλασματική MT3-MMP

Γράφημα 4. Σχηματική απεικόνιση της σχέσης MT3-MMP με τον βαθμό κακοηθείας



Γράφημα 5. Σχηματική απεικόνιση της σχέσης της MT3-MMP με το στάδιο

3.ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η έκφραση και των τριών πρωτεϊνών δεν παρουσίασε καμία επίδραση στην ολική και ελεύθερα νόσου επιβίωση των ασθενών, τόσο στη μονοπαραγοντική (log- rank test) όσο και στην πολυπαραγοντική (Cox's hazards proportional model) στατιστική ανάλυση.

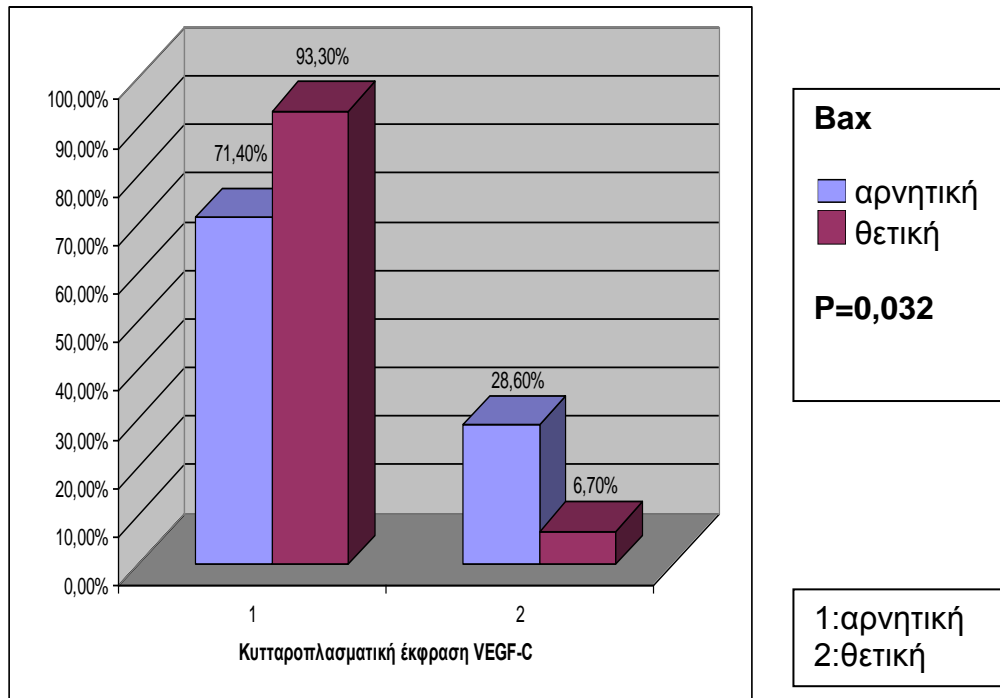
4 . ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΝΕΟΤΕΡΟΥΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ

VEGF-C

Η θετική έκφραση του VEGF-C παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με την προ-αποπρωτική πρωτεΐνη α Bax ($p=0,032$)(Πίνακας 4, Γράφημα 6).

Πίνακας 4. Συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-C με την προ-αποπρωτική πρωτεΐνη α Bax

ΘΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ VEGF-C				
Παράμετροι (έκφραση)	Σύνολο περιπτώσεων	Θετικές περιπτώσεις	% θετικότητα	Στατιστική σημ/τητα p
Σύνολο	123	27	22,0	
αBax Αρνητική Θετική	42 30	12 2	28,6 6,7	P=0,032



Γράφημα 6: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης του VEGF-C με την πρωτεΐνη Bax

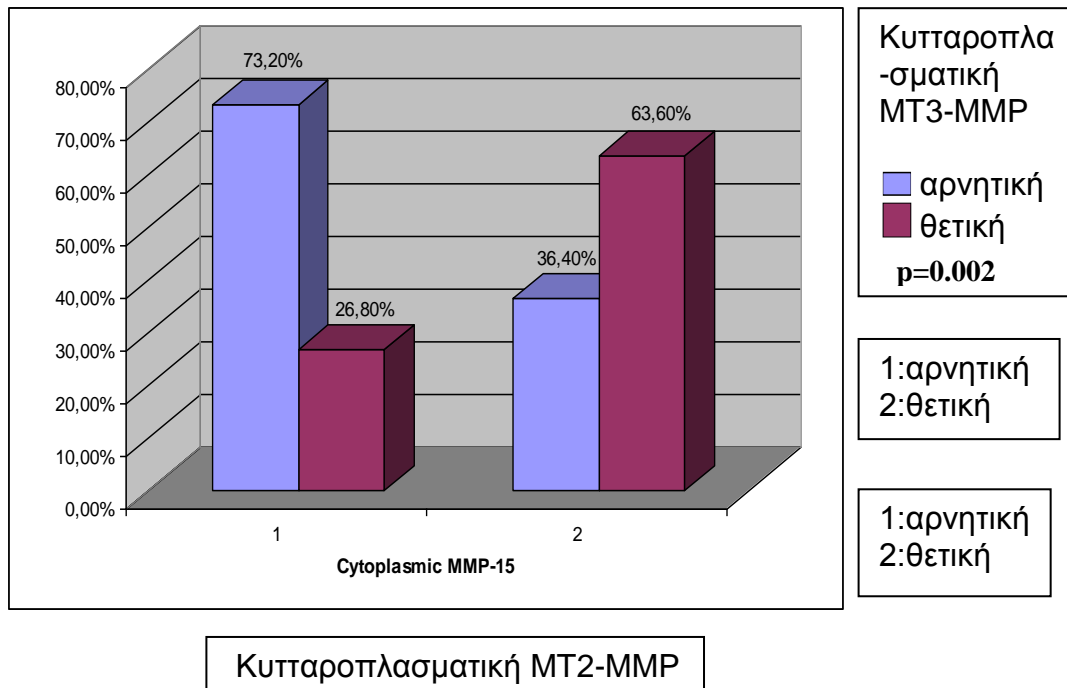
MT2-MMP

Η κυτταροπλασματική έκφραση της MT2-MMP συσχετίσθηκε παράλληλα με την κυτταροπλασματική MT3-MMP ($p=0,002$) (Πίνακας 5, Γραφήματα 7-9). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τις πρωτεΐνες Bax και VEGF-C (Πίνακας 5).

Για την πυρηνική εντόπιση της MT2-MMP δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 5)

Πίνακας 5. Συσχέτιση της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής έκφρασης της MT2-MMP με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax.

Παρά-μετροι (έκφραση)	ΘΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ MT2-MMP ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ				ΠΥΡΗΝΙΚΗ			
	Σύνολο Περιπτ.	Θετικές περιπτ.	% θετικότητα	p	Σύνολο Περιπτ.	Θετικές περιπτ.	% θετικότητα	P
Σύνολο	116	70	60,3		116	42	36,2	
Bax								
Αρνητική	35	15	83,3	NS	35	16	69,6	NS
Θετική	17	3	16,7		17	7	30,4	



Γράφημα 9: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης της κυτταροπλασματικής MT2-MMP με την κυτταροπλασματική MT3-MMP

MT3-MMP

Η πυρηνική εντόπιση της MT3-MMP δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το βαθμό κακοήθειας, το στάδιο της νόσου, τον VEGF-C ή την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας που απασχολεί τους ουρολόγους παγκοσμίως.

Το στάδιο της νόσου είναι το πιο σημαντικό προγνωστικό κριτήριο, αλλά η επιβίωση των ασθενών εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως το μέγεθος του όγκου, το παθολογοανατομικό στάδιο, ο βαθμός κακοήθειας και η μετάσταση στους πνευμονικούς λεμφαδένες. Η τελευταία αποτελεί τον πιο υψηλά και στενά σχετιζόμενο με την επιβίωση παράγοντα (603). Εντούτοις οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέονται με τη λεμφαδενική μετάσταση δεν είναι απόλυτα γνωστοί. Ως εκ τούτου, το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται διεθνώς στην ανεύρεση νέων μοριακών βιολογικών δεικτών, οι οποίοι θα παρέχουν τη δυνατότητα ασφαλούς πρόγνωσης της νόσου και εκτίμησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία, σε ατομικό επίπεδο.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την προγνωστική σημασία του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα -C (VEGF-C) σε κακοήθεις όγκους άλλων οργάνων όπως στον καρκίνο του μαστού, στον γαστρικό καρκίνο, στον μη- μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο των ωοθηκών και στον παγκρεατικό καρκίνο (310-19).

Αυτό που είναι καλά γνωστό είναι ότι ο VEGF-C είναι απαραίτητος στην αγγειογένεση και λεμφαγγειογένεση. Ο VEGF-C συνδέεται με τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης VEGFR-3 (Fl4) ,ο οποίος έχει μεγάλη ειδικότητα στο λεμφαγγειακό ενδοθήλιο και επάγει την αυτοφωσφορίλιωση του (313). Πρόσφατες μελέτες σε ουροθηλιακά καρκινώματα έδειξαν ότι, η σύνδεση του VEGF-C με τον υποδοχέα VEGFR-3, προάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στα αγγεία και λεμφαγγεία, καθώς επίσης και ότι η αυξημένη έκφραση του VEGF-C σχετίζεται με την αγγειογένεση, την λεμφαγγειογένεση και τη λεμφαδενική μετάσταση (316). Ο VEGF-C συνδέεται επίσης και με τον VEGFR-2 (KDR) ο οποίος έχει μεγάλη ειδικότητα στο αγγειακό ενδοθήλιο (314-5). Εντούτοις, σήμερα ο VEGF-C θεωρείται σε μεγαλύτερο βαθμό λεμφαγγειοαγενετικός παρά αγγειογενετικός παράγοντας (316).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 123 παρασκευάσματα διουρηθρικής εκτομής ουροθηλιακού καρκινώματος (71 επιφανειακά και 52 διηθητικά). Εξ αυτών 27 (22%) ήταν θετικά για τον παράγοντα VEGF-C. Εντόπιση του VEGF-C παρατηρήθηκε κύρια, στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων και σπάνια στις στρωματικές ινοβλάστες. Ελαφρά θετική έκφραση παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό ουροθήλιο.

Παρατηρήθηκε ανάστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF-C και του σταδίου του όγκου ($p=0,007$), με την έννοια ότι η πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε πιο συχνά στα επιφανειακά (pT_a-pT₁) από ότι στα διηθητικά (pT₂-pT₄) ουροθηλιακά καρκινώματα (22/71 ή 31% θετικότητα VS 5/52 ή 9,6% θετικότητα αντίστοιχα).

Τα ευρήματα, της παρούσας μελέτης, όσον αφορά τη συχνότητα έκφρασης του VEGF-C, είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα ανάλογης μελέτης των Miyata και συν.(600), οι οποίοι αφού μελέτησαν 126 παρασκευάσματα διουρηθρικής εκτομής επιφανειακών (pT_a-pT₁) και διηθητικών (pT₂-pT₄) ουροθηλιακών καρκινωμάτων (104 και 22 αντίστοιχα), παρατήρησαν θετική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-C στο 30,1% (38/126) του συνόλου και στο 29.8% (31/104) των επιφανειακών (pT_a-pT₁) περιπτώσεων αντίστοιχα.

Επιπροσθέτως στην παρούσα μελέτη, ασθενείς με VEGF-C θετικούς όγκους έτειναν να έχουν καλύτερη πρόγνωση, εντούτοις η στατιστική διαφορά δεν ήταν σημαντική .

Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που ανευρίσκουν την έκφραση της πρωτεΐνης VEGF-C να σχετίζεται θετικά με το παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου, ή αναφέρουν ότι ασθενείς με VEGF-C θετικούς όγκους είχαν δυσμενέστερη πρόγνωση από τους ασθενείς με VEGF-C αρνητικούς όγκους.

Οι διχογνωμίες μεταξύ των μελετών θα μπορούσαν να αποδοθούν, αφενός στον αριθμό των ασθενών και αφετέρου στη διαδικασία συλλογής των δειγμάτων, αφού στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκαν 123 δείγματα ασθενών με επιφανειακό ή διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνο μετά διουρηθρικά εκτομή του όγκου, ενώ οι άλλες μελέτες αφορούν σε μικρότερο αριθμό ασθενών ή πρόκειται για μελέτες που αφορούν αποκλειστικά σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ριζική κυστεκτομή λόγω διηθητικού ουροθηλιακού καρκινώματος (599, 601, 602).

Σύμφωνα με την λεμφαγγειογενετική δράση του VEGF-C, θα αναμέναμε συχνότερη έκφρασή του στα διηθητικά από ότι στα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα, εντούτοις, η άμεση συμμετοχή του VEGF-C στη διήθηση, αν υφίσταται, είναι άγνωστη.

Αν και έχουν αναφερθεί σαφείς μοριακοί παθογενετικοί μηχανισμοί για τα ουροθηλιακά καρκινώματα (609), μελέτες έχουν δείξει ότι ο VEGF μπορεί να προάγει την καρκινική εξέλιξη όχι μόνο επάγοντας την αγγειογένεση και τη λεμφαγγειογένεση, αλλά και με απευθείας δράση σε υποδοχείς πάνω στο καρκινικό κύτταρο (612, 613).

Μία άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η έκφραση του VEGF-C ίσως αποτελεί πρόδρομο γεγονός στην διαδικασία απόκτησης ενός επιθετικού φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα, πριν την διηθητική εξάπλωση. Εξάλλου, το γεγονός ότι στο

φυσιολογικό ουροθήλιο παρατηρήθηκε θετική έκφραση VEGF-C, ενισχύει περαιτέρω την πιθανή συμμετοχή της εν λόγω πρωτεΐνης σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης.

Οι O'Brien και συν.(608) με τη μέθοδο RNase protection analysis έδειξαν ότι η έκφραση του VEGF-A στα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα ήταν κατά 4 φορές υψηλότερη από ότι στα διηθητικά, πιστεύουν δε ότι ο VEGF είναι το αγγειογεννητικό μόριο κλειδί στις επιφανειακές θηλωματώδεις βλάβες και πιθανόν να σχετίζεται με το μοριακό παθογενετικό μηχανισμό των επιφανειακών ουροθηλιακών καρκινωμάτων.

Ανάλογα ευρήματα παρατηρήθηκαν σε μελέτες του VEGF-C και σε άλλα όργανα.

Στον καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε υπερέκφραση του VEGF-C στο ενδοτορικό in situ καρκίνωμα του μαστού (DCIS), γεγονός που ενισχύει την άποψη της δράσης αυτού σε αρχικά στάδια της νόσου. Επίσης, οι Kinoshita και συν. (614) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο VEGF-C ενδεχομένως να ευθύνεται για περιπτώσεις πρόωρης λεμφικής διασποράς πριν τη λεμφαδενική μετάσταση στο μαστό.

Άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση στην παρούσα μελέτη, είναι ότι η έκφραση του VEGF-C παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax ($p=0,032$), γεγονός που αναδεικνύει εμμέσως τον αντιαποπτωτικό ρόλο του VEGF-C στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, αφού η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bax επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η σύνδεση VEGF-C/VEGFR-3 (FL4) διαδραματίζει αντιαποπτωτικό ρόλο. Μεταλλαγμένος VEGF-C, ο οποίος συνδέεται μόνο με τον υποδοχέα VEGFR-3 και όχι με τον υποδοχέα VEGFR-2, προστατεύει τα λευχαιμικά κύτταρα από την αποπτωτική δράση τριών χημιοθεραπευτικών παραγόντων (613). Επίσης οι Dias και συν. (615) έδειξαν ότι, σε λευχαιμικά κύτταρα η VEGF-C σηματοδότηση μέσω VEGFR-3 ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, παρατήρηση η οποία δεν δύναται να λάβει χώρα σε ιστικό επίπεδο, αφού η έκφραση του VEGF-C δεν σχετίζεται με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki 67.

Συμπερασματικά, το γεγονός ότι ο VEGF-C ανιχνεύθηκε πιο συχνά στα επιφανειακά (pT_a-pT₁) από ότι στα διηθητικά (pT₂-pT₄) ουροθηλιακά καρκινώματα υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης VEGF-C πιθανόν να αποτελεί πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκινώματος, η δε ανάστροφη συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-C με την έκφραση του προαποπτωτικού παράγοντα Bax, συνηγορούν εμμέσως, υπέρ του αντιαποπτωτικού του ρόλου.

Η οικογένεια VEGF, εκτός από τη μιτογόνο δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων, συμμετέχει και στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αποδόμηση της

εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (μεταλοπρωτεΐνάσες του στρώματος–matrix MMPs) και κατά συνέπεια στη διήθηση και μετάσταση (421). Οι MMPs εκφράζονται σε πολλά καρκινώματα και έχουν πολυλειτουργικό ρόλο, συμμετέχουν δε στην έναρξη της ογκογένεσης, στην αγγειογένεση, στη διήθηση και στη μετάσταση (22).

Οι μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεΐνάσες (MT-MMPs) αποτελούν μία νέα ομάδα μεταλοπρωτεϊνών και πολλές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή τους στην κυτταρική μετανάστευση, διήθηση και αγγειογένεση. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι MT-MMPs συμμετέχουν σε καταρράκτη ενεργοποίησης, που οδηγεί σε ενίσχυση της πρωτεόλυσης πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας (403).

Επιπλέον οι MT-MMPs είναι ικανές να διασπούν μηνυματοδοτικά μόρια, όπως μεμβρανικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες, δεσμευτικές πρωτεΐνες αυξητικών παραγόντων, κυττοκίνες / χημειοκίνες.

Η MT2- MMP είναι μία μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεΐνάση, η οποία έχει βρεθεί να ανιχνεύεται σε περιπτώσεις γλοιοβλαστώματος, αστροκυττώματος αλλά και στον ουροθηλιακό καρκίνο (403,404,405). Η πρωτεΐνη MT3-MMP, είναι επίσης μία μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεΐνάση, η οποία εκτός από την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μπορεί να συνδεθεί με διάφορες εξωκυττάριας πρωτεΐνες και να τροποποιήσει μηχανισμούς του κυττάρου όπως η διήθηση και η αγγειογένεση (406,407).

Στην παρούσα μελέτη, θετική έκφραση για την MT2-MMP και την MT3-MMP παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Σποραδικά παρατηρήθηκε και στρωματική εντόπιση.

Ειδικότερα, θετική κυτταροπλασματική έκφραση ανευρέθη σε ποσοστό 66,2% και 64,8% των περιπτώσεων και θετική πυρηνική εντόπιση σε ποσοστό 48,9% και 32,2% των περιπτώσεων για τις MT2-MMP και MT3-MMP αντίστοιχα.

Η MT2-MMP εμφάνισε στατιστικά σημαντική σχέση με χαμηλό στάδιο νόσου και χαμηλό βαθμό κακοήθειας, ($p=0.046$ and $p=0.014$) αντίστοιχα. Η MT3-MMP εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική σχέση με χαμηλό στάδιο νόσου ($p=0.013$) και οριακά με το βαθμό κακοήθειας ($p=0.086$). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των εν λόγω MMPs και την ολική επιβίωση των ασθενών.

Η απουσία συσχέτισης της έκφρασης της MT3-MMP και MT2-MMP με την επιβίωση των ασθενών, συμφωνεί με τις αντίστοιχες έρευνες που έχουν γίνει, για την έκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών και σε άλλα κακοήθη νεοπλασμάτα (588-598).

Στη διεθνή βιβλιογραφία βρέθηκαν δύο μελέτες για τις MT2 και MT3-MMP. σε ουροθηλιακά καρκινώματα.

Στην πρώτη μελέτη των Kitagawa Y. και συν. (616), αξιολογείται η m-RNA έκφραση των MT1- MT2 και MT3 MMP, και φαίνεται η έκφραση της MT3 MMP στα καρκινικά κύτταρα να υστερεί σημαντικά σε αντίθεση με την έκφραση των MT1 και MT2-MMP, η οποία φαίνεται να αυξάνεται στους επιφανειακούς όγκους.

Στην δεύτερη μελέτη των Mohammad MA και συν.(617), μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών MT1-MMP και MT2-MMP και παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μόνο της έκφρασης της MT2-MMP με το στάδιο της νόσου, αλλά σε μικρότερο αριθμό ασθενών συγκριτικά με την παρούσα μελέτη (50 vs 123) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ριζική κυστεκτομή.

Το γεγονός ότι η MT2-MMP και η MT3-MMP σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, εκφράζονται συχνότερα στα επιφανειακά ουροθηλιακά καρκινώματα, καθώς και η διαπίστωση ότι συσχετίζονται ανάστροφα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, υποδηλώνει ότι οι ανωτέρω πρωτεΐνες φαίνεται να συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης, εύρημα που ενισχύεται και από τη συμμετοχή της MT2-MMP και της MT3-MMP στην ενεργοποίηση της προ-MMP2, η οποία συμβάλλει στη διήθηση της βασικής μεμβράνης κατά τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης (545).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης και σε αντίθεση με τα αναμενόμενα λόγω της συμμετοχής τους στην αγγειογένεση και μετάσταση, η έκφραση των πρωτεϊνών MT2-MMP και MT3-MMP φαίνεται να συσχετίζεται με λιγότερο επιθετικά καρκινώματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι η MT2- MMP και η MT3- MMP δεν έχουν ιδιαίτερα μελετηθεί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, σε ιστικό ή άλλο επίπεδο, ενώ για πρώτη φορά αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία η ταυτόχρονη μελέτη της έκφραση της πρωτεϊνών αυτών σε επιφανειακά και διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα .

Επιπροσθέτως, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αναδεικνύει την υπερέκφραση του VEGF-C ως πιθανόν πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκίνου και που φαίνεται η υπερέκφραση του VEGF-C να συμμετέχει, εμμέσως, στην αναστολή της απόπτωσης.

Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα σε μοριακό επίπεδο και σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, για την διερεύνηση της MT3-MMP, της MT2-MMP και του VEGF-C στα ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης.-

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκινώματος διαδραματίζουν οι μηχανισμοί της διήθησης, αγγειογένεσης και μετάστασης. Η πορεία της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από ένα σημαντικό αριθμό παραγόντων, μεταξύ των οποίων πρωτεύοντα ρόλο κατέχει ο αγγειακός αυξητικός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) και οι υποδοχείς αυτού. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί τρία νέα μέλη της οικογένειας VEGF : ο VEGF-B, VEGF-C και ο VEGF-D. Ο VEGF-C ασκεί ισχυρή λεμφαγγειογόνο δράση σε πειραματικές μελέτες και προκαλεί υπερπλασία των λεμφαγγείων.

Η οικογένεια VEGF συμμετέχει και στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (μεταλοπρωτεϊνάσες του στρώματος – matrix MMPs) και κατά συνέπεια στη διήθηση και μετάσταση.

Οι μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεϊνάσες (MT-MMPs) αποτελούν μία νέα ομάδα μεταλοπρωτεϊνών και πολλές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει τη συμμετοχή τους στην κυτταρική μετανάστευση, διήθηση και αγγειογένεση.

Υπάρχουν έξι μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMPs). Οι πρωτεΐνες MT2-MMP και MT3-MMP, είναι μεμβρανικού τύπου μεταλοπρωτεϊνάσες οι οποίες εκτός από την αποδόμηση της ΕΘΟ, μπορούν να συνδεθούν με διάφορες εξωκυττάρια πρωτεΐνες και να τροποποιήσουν μηχανισμούς του κυττάρου όπως η διήθηση και η αγγειογένεση.

ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη της έκφρασης των μοριακών δεικτών VEGF-C, MT2-MMP και MT3-MMP στο ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης σε σχέση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, την επιβίωση των ασθενών και την προαποπτική πρωτεΐνη Bax.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Σε αρχειακό υλικό τομών παραφίνης από 123 επιφανειακά και διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος τριών βημάτων για την ανίχνευση των πρωτεϊνών VEGF-C, MT2-MMP και MT3-MMP. Ακολούθησε αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και στατιστική ανάλυση, με σκοπό τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους, με την ολική επιβίωση ασθενών, καθώς και με το αποπτική δυναμικό των νεοπλασμάτων μέσω της έκφρασης του αντιαποπτικού παράγοντα Bax.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θετική έκφραση VEGF-C ανευρέθη σε ποσοστό 22% των περιπτώσεων, ενώ ανιχνεύθηκε πιο συχνά στα επιφανειακά (pTα-pT1) από ότι στα διηθητικά (pT2-pT4) ουροθηλιακά καρκινώματα ($p=0,007$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το βαθμό κακοηθείας. Η θετική έκφραση του VEGF-C παρουσίασε αντίστροφη συσχέτιση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη *Bax* ($p=0,032$).

Θετική έκφραση για την MT2-MMP και την MT3-MMP ανευρέθη σε ποσοστό 66,2% και 64,8% των περιπτώσεων, ενώ παρατηρήθηκε και θετική πυρηνική εντόπιση των πρωτεϊνών σε ποσοστό 48,9% και 32,2% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Η MT2-MMP εμφάνισε στατιστικά σημαντική σχέση με χαμηλό στάδιο νόσου και χαμηλό βαθμό κακοηθείας, ($p=0.046$ and $p=0.014$) αντίστοιχα. Η MT3-MMP εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική σχέση με χαμηλό στάδιο νόσου ($p=0.013$) και οριακά με το βαθμό κακοηθείας ($p=0.086$). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των MMPs και την ολική επιβίωση των ασθενών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο VEGF-C ανιχνεύθηκε πιο συχνά στα επιφανειακά από ότι στα διηθητικά ουροθηλιακά καρκινώματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης VEGF-C πιθανόν να αποτελεί πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκινώματος. Επίσης, η ανάστροφη συσχέτιση της έκφρασης του VEGF-C με την έκφραση του προαποπτωτικού παράγοντα *Bax*, αποτελεί εύρημα που συνηγορεί υπέρ του αντιαποπτωτικού ρόλου του VEGF-C στο ουροθηλιακό καρκίνωμα.

Το γεγονός ότι η MT2-MMP και η MT3-MMP σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, εκφράζονται συχνότερα σε πρωιμότερα στάδια της νόσου, καθώς και η ανάστροφη συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, υποδηλώνει ότι οι ανωτέρω πρωτεΐνες φαίνεται να συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης.

Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα σε μοριακό επίπεδο και σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, για την διερεύνηση της MT3-MMP, της MT2-MMP και του VEGF-C στα ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστης.

SUMMARY

INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is significantly associated with angiogenesis, lymphangiogenesis and regional lymph node metastasis in several carcinomas. In addition, VEGF-C has been reported to have an antiapoptotic and proliferative role. To our knowledge, the role of VEGF-C in bladder urothelial carcinoma (BUC) has not been clarified yet.

The matrix metalloproteinases (MMPs) represent a large family of proteolytic enzymes (28 members) that play key roles in cancer invasion and metastasis. MMPs have recently been characterized as multifunctional molecules with growth-promoting and growth-inhibiting properties. The expression of MT2-MMP and MT3-MMP has not been investigated in urothelial bladder carcinoma, while they have been found in other cancer types (brain tumors, renal cell carcinoma etc). Some reports have established a positive influence in cancer progression.

AIM

The aim of the present study was to examine the expression of VEGF-C, MT2-MMP and MT3-MMP proteins in urothelial bladder carcinoma (BUC) and to correlate the immunohistochemistry findings with clinicopathologic parameters (grade, stage), patients' survival and Bax protein.

PATIENTS AND METHODS

123 patients, 107 men and 16 women with BUC (71 pTa-T1 and 52 pT2-T4) were included in this study. The mean age at diagnosis was 68.99 years (age range, 31-89 years) and the median follow-up was 82.24 months (range 1-193) during which 51 patients had died of BUC.

Formalin-fixed tissue samples were obtained from first transurethral resection of the tumor. A three-step immunohistochemical method (Avidin–Biotin–Peroxidase) was applied on 123 paraffin-embedded specimens of BUC for the detection of the VEGF-C, MT2-MMP, MT3-MMP and Bax proteins. With regard to proteins immunostaining, statistical correlations were investigated with classical clinicopathological prognostic

indicators (stage, grade), patient overall survival and immunohistochemical expression of Bax protein.

The results were evaluated semi-quantitatively and statistically processed using Pearson's chi-square test. Survival distribution curves were assessed by univariate analysis.

RESULTS

VEGF-C was expressed in tumor cell cytoplasm, faintly in normal urothelial cell cytoplasm and in stromal fibroblasts. With regard to VEGF-C expression in cancer cells, of 123 BUCs, 27 (22.0%) were VEGF-C positive. VEGF-C immunoreactivity was inversely correlated with tumor pathological stage ($p=0.007$) and negatively associated with bax immunoexpression ($p=0.032$). VEGF-C expression was not related to tumor grade. Patients with VEGF-C positive tumors tended to have better prognosis.

MT2-MMP and MT3-MMP positive immunoreactivity was observed in 66.2% and 64.8% of cancer cells, respectively. MT2-MMP was statistically significant related to lower grade and stage ($p=0.046$ and $p=0.014$, respectively). MT3-MMP was also statistically significant related to lower grade ($p=0.013$) and borderline to lower stage of disease ($p=0.086$). There was no correlation between MMPs expression and patients' overall survival.

CONCLUSION:

The present study implies that VEGF-C may be an early event in the carcinogenesis and might have an antiapoptotic role, through his inverse correlation with tumor pathological stage and Bax immunoexpression. However, its potential prognostic significance remains to be clarified.

According to our results, over expression of MT2-MMP and MT3-MMP were associated with a less aggressive tumor phenotype through their correlation with lower grade and stage and may be an early event in the carcinogenesis, also.

VEGF-C and these MMPs could be used as potential prognostic markers if our results would be validated in larger series of patients with BUCs.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Παπαδόπουλος Ν, Κατρίτσης Ε. Ανατομική του Ανθρώπου. Εκδ. Λίτσας.
2. Moore, Persaud, Shiota. Έγχρωμη Κλινική Εμβρυολογία. Εκδ. Πασχαλίδης, σελ. 165-179, 1997.
3. Urologic Surgical Pathology, edited by David Bostwick and John Eble, Mosby, 1997.
4. Tanagho DA, McAninch JW. Smith's General Urology, 13th edition, p. 341, 1992.
5. d'Errico A, Malats N, Vineis P, Boffetta P. Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. In: Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P eds. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer (IARC Scientific Publication No. 148), Lyon, IARC Press, 323-393, 1999.
6. World Cancer Report. Edited by Bernard W. Stewart and Paul Kleihues, IARC Press, Lyon 2003.
7. Skinner DG, Lieskowsky G. Management of invasive and high-grade bladder cancer. In Skinner DG, Lieskowsky G, eds. Diagnosis and Management of Genitourinary Cancer, Philadelphia, Pa: Saunders, 1988.
8. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. Urology 45:387-396, 1995.
9. Brandau S, Bohle A. Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. Eur Urol 39:491-497, 2001.
10. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, et al. Human cytochrome P450-PA (P-450IA2), the phenacetin O-deacetylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7696-7700, 1989.
11. Kaderlik KR, Kadlubar FF. Metabolic polymorphisms and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. Pharmacogenetics 5:S108-S117, 1995.
12. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, et al. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GST M1) that increases susceptibility to bladder cancer. J Natl Cancer Inst 85:1159-1164, 1993.
13. Cole P, Hoover R, Friedell GH. Occupation and cancer of the lower urinary tract. Cancer 29:1250-1260, 1972.
14. Thomas A, Rozanski H, Grossman B. Recent development in the pathophysiology of bladder cancer. AJR 163:789-792, 1994.
15. Samuel M, Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. Urol Clin North America, 19(3):421-428, 1992.
16. Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. Cancer control. JMCC 7(4): 325-334, 2000.
17. Bengtsson U, Angervall L, Ekman H, Lehman L. Transitional cell tumors of the renal pelvis in analgesic abusers. Scand J Urol Nephrol 2:145-150, 1968.
18. Tuttle TM, Williams GM, Marshall FF. Evidence for cyclophosphamide-induced transitional cell carcinoma in a renal transplant patient. J Urol 140:1009-1011, 1988.
19. Fernandes ET, Manivel JC, Reddy PK, et al. Cyclophosphamide associated bladder cancer: a highly aggressive disease. Analysis of 12 cases. J Urol 156:1931-1933, 1996.

20. Travis LB, Curtis RE, Glimelius B, et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 87:524-530, 1995.
21. Cohen SM, Garland EM, St. John M, et al. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 52:3577-3581, 1992.
22. Khan MA, Travis LB, Lynch CF, et al. p53 mutations in cyclophosphamide-associated bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:397-403, 1998.
23. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 63:1-6, 1995.
24. Kleinerman RA, Boice JD Jr, Storm HH, et al. Second primary cancer after treatment for cervical cancer: an international cancer registries study. *Cancer* 76:442-452, 1995.
25. Neugut AI, Ahsan H, Robinson E, et al. Bladder carcinoma and other second malignancies after radiotherapy for prostate carcinoma. *Cancer* 79:1600-1604, 1997.
26. Quilty PM, Kerr GR. Bladder cancer following low or high dose pelvic irradiation. *Clin Radiol* 38:583-585, 1987.
27. Lucas SB. Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis. *East Afr Med J* 59:345-351, 1982.
28. Badawi AF. Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Lett* 105:123-138, 1996.
29. Hoffman D, Schmeltz I, Hecht SS, et al. Tobacco carcinogenesis. In: Gelboin H, T'so PO, eds. *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Vol. I, New York, Academic Press, 85:117, 1978.
30. Hoover RN, Strasser PH. Artificial sweeteners and human bladder cancer. Preliminary results. *Lancet* 1:837-840, 1980.
31. Souliotis V, Giannopoulos A, Koufakis I, Kaila S, Dimopoulos C, Kytropoulos S. Development and validation of a new assay for O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase based on the use of an oligonucleotide substrate and its application to the measurement of DNA repair activity in extracts of biopsy samples of human urinary bladder mucosa. *Carcinogenesis* 10(7):1203-1208, 1989.
32. Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Advances Cancer Res* 10:163-246, 1967.
33. Gonzalez-Zulueta M, Jones PA. Molecular Biology of Bladder Cancer. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology* 314-325, 1992.
34. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* 342:469-471, 1993.
35. Brewster SF, Gingell JC, Brown KW. Tumour suppressor genes in urinary tract oncology. *Br J Urol* 70:585-590, 1992.
36. Hirata Y, Orth DN. Epidermal growth factor (urogastrone) in human fluids: size heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 48:673-679, 1979.
37. Messing EM, Murphy-Brooks N. Recovery of epidermal growth factor in voided urine of patients with bladder cancer. *Urology* 44:502-506, 1994.
38. Messing EM, Hanson P, Ulrich P, et al. Epidermal growth factor-Interactions with normal and malignant urothelium: in vivo and in situ studies. *J Urol* 138:1329-1335, 1987.
39. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 69:1120-1125, 1994.
40. Van Tilborg AA, Hekman AC, Vissers KJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC.

- Loss of heterozygosity on chromosome 9 and loss of chromosome 9 copy number are separate events in the pathogenesis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer* 75(1): 9-14, 1998.
41. Keen AJ, Knowles MA. Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene* 9(7):2083-2088, 1994.
 42. Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasia of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154(93):721-727
 43. Habuchi T, Ogawa O, Kakehi Y, Ogura K, Koshiba M, Sugiyama T, Yoshida O. Allelic loss of chromosome 17p in urothelial cancer: strong association with invasive phenotype. *J Urol* 148(5):1595-1599, 1992.
 44. Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI, Jones PA. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 50(21):7081-7083, 1990.
 45. Shaw ME, Knowles MA. Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes Chromosomes Cancer* 13(1):1-8, 1995.
 46. Presti JC Jr, Reutter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 51(19):5405-5409, 1991.
 47. Vieten L, Belair CD, Savelieva L, Julicher K, Brocker F, Bardenheuer W, Schutte J, Opalka B, Reznikoff CA. Minimal deletion of 3p13→14.2 associated with immortalization of human uroepithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* 21(1):39-48, 1998.
 48. Brewster SF, Gingell JC, Browne S, Brown KW. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 70(4):697-700, 1994.
 49. Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 54(2):531-538, 1994.
 50. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA. Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder cancer. *Lancet* 2(8303):842-845, 1982.
 51. Gonzalez-Zulueta M, Ruppert JM, Tokino K, Tsai YC, Spruck CH 3rd, Miyao N, Nichols PW, Hermann GG, Horn T, Steven K, et al. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res* 53(23):5620-5623, 1993.
 52. Linnenbach AJ, Pressler LB, Seng BA, Kimmel BS, Tomaszewski JE, Malkowicz SB. Characterization of chromosome 9 deletions in transitional cell carcinoma by microsatellite assay. *Hum Mol* 2(9): 1407-1411, 1993.
 53. Linnenbach AJ, Robbins SL, Seng BA, Tomaszewski TE, Pressler LB, Malkowicz SB. Urothelial carcinogenesis. *Nature* 267(6462): 419-420, 1994.
 54. Δημόπουλος ΚΑ. Ουρολογία, 5^η έκδοση, 1998, Εκδ. Πασχαλίδης.
 55. Bengt-Erik Carbin et al. Grading of human UCC based on nuclear atypia and mitotic frequency. *J Urol* 1991, 145:968-971.
 56. Herman GG et al. The influence of the level of lamina propria invasion on survival in stage T1 TCCs. *J Urol* 1998, 159:91-94.
 57. Jonathan L et al. The WHO/ISUP Pathology Consensus Classification of urothelial neoplasms of urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 22 (12):1435-1448, 1998
 58. Limas C, Lange P. A,B,H antigens detectability in normal and neoplastic urothelium. *Cancer* 49:2476-2484, 1982.
 59. Alroy J, Teramura K, Miller A, Pauli B, Gottesman J, Flanagan M, Davidsohn I, Weistein R. Isoantigens A,B and H in urinary bladder carcinomas following radiotherapy. *Cancer* 41:1739-1745, 1978.
 60. Fradet Y, Cordon-Cardo C. Critical appraisal of tumor markers in bladder cancer. *Semin Urol* 11(3):145-153, 1993.

61. Fradet Y, Locchard C. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: ImmunoCyt trade mark. *Can J Urol* 4(3):400-405, 1997.
62. Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M, Marberger M. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 161(5):1486-1489, 1999.
63. Malmstrom PU, Busch C, Norlen BJ, Andersson B. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 22(4):265-270, 1988.
64. Allard P, Fradet Y, Tetu B, Bernard P. Tumor-associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 1(10): 1195-1202, 1995.
65. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1):13-20, 1983.
66. Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J. Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 144(4):875-878, 1990.
67. Fontana D, Bellina M, Gubetta L, Fasolis G, Rolle L, Scoffone C, Porphiglia F, Colombo M, Tarabuzzi R, Leonardo E. Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* 148(4):1149-1151, 1992.
68. Cohen MB, Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Chew K, Mayall BH. Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 24(7):772-778, 1993
69. Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUd and Ki-67 immunostaining. *J Urol* 145(4):846-849, 1991.
70. Mulder AH, Van Hootegeem JC, Sylvester R, ten Kate FJ, Kurth KH, Ooms EC, Van der Kwast TH. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol* 166(1):37-43, 1992.
71. Bush C, Price P, Norton J, Parkins CS, Bailey MJ, Boyd J, Jones CR, A'Hern RP, Horwich A. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: its potential clinical importance. *Br J Cancer* 64(2):357-360, 1991.
72. Asakura T, Takano Y, Iki M, Suwa Y, Noguchi S, Kubota Y, Masuda M. Prognostic value of Ki-67 for recurrence and progression of superficial bladder cancer. *J Urol* 158(2):385-388, 1997.
73. Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Carin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, Abohh CC, Mazerolles C, Chopin DK. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 80(8): 1472-1481, 1997.
74. Chen G, Lin MS, Li RC. Expression and prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 25(1):25-30, 1997.
75. Murphy WM, Emerson GD, Chandler RW, Moinuddin S, Mand, Solonat MS. Flow cytometry versus urinary cytology in the evaluation of patients with bladder cancer. *J Urol* 136:815-819, 1986.
76. Badalament RA, Hermansen DK, Kimmel M, Gay G, Herr H, et al. The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology and voided urine cytology in the detection of bladder carcinoma. *Cancer* 60:1423-1427, 1987.
77. Γαβράς Π, Γιαννόπουλος Α, Δημόπουλος Κ. Η διαγνωστική αξία της

- κυτταρομετρίας (flow cytometry) στα νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης από μεταβατικό επιθήλιο. *Ελλην Ουρολ* 6:46-52, 1994.
78. Strohmeier TG, Slamon TG. Prot-oncogenes and tumor suppressor genes in human urological malignancies. *J Urol* 151(6):1479-1497, 1994.
 79. Fontana D, Bellina M, Scoffone C, Cagnazzi E, Cappia S, Cavallo F, Russo R, Leonard E. Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *Eur J Urol* 29(4):470-476, 1996.
 80. Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, Shiku H, Nakayama E. Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *JpnJCancerRes*81(12);1198-01, 1990.
 81. Lipponen PK. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J Pathol* 175(2):203-210, 1995.
 82. Lianes P, Orbow I, Zhang ZV, Oliva MR, Sarkis AS, Reuter VE, Cordon-Cardo C. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 86(17):1325-1330, 1994.
 83. Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334(6183): 629-631, 1988.
 84. Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M, Verma IM. Fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell* 54(4): 553-560, 1988.
 85. Tiniakos DG, Mellon K, Anderson JJ, Robinson MC, Neal DE, Horne CH. C-jun oncogene expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 74(6):757-761, 1994.
 86. Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato K, Watanuki T, Hikage T, Katsuta N, Mori S. Expression of c-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol* 145(2):423-427, 1991.
 87. Sato K, Moriyama M, Mori S, Saito M, Watanuki T, Terada K, Okuhara E, Akiyama T, Toyoshima K, Yamamoto T et al. An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 70(10):2493-2498, 1992.
 88. Lipponen P. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 29A(5):749-753, 1993.
 89. Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, Gudat F, Epper R, Waldman FM. p53 but not c-erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 25(12):1346-1351, 1994.
 90. Logothetis CJ, Yu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Odonez N, Benedict WF. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *JNatlCancer Inst* 84(16):1256-1261, 1992.
 91. Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter WE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *JNatlCancerInst*84(16)6, 1992.
 92. Xu HJ, Cairns P, Hu SY, Knowles MA, Benedict WF. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 53(5):721-724, 1993.
 93. Miyamoto H, Shrin T, Ikeda I, Hosaka M, Kubota Y. Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J Urol* 155(4):1444-1447, 1996.
 94. Pollack A, Czerniak B, Zagars GK, Hu SX, Wu CS, Dinney CP, Chyle V, Benedict WF. Retinoblastoma protein expression and radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39(3):687-695, 1997.
 95. Tetu B, Fradet Y, Allard P, Veilleux C, Roberge N, Bernard P. Prevalence and clinical significance of HER/2neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol* 155(5):1784-1788, 1996.
 96. Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Yu HJ, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB

- alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* 57(7):1217-1221, 1997.
97. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhoyes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252(2006):706-709, 1991.
 98. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 52(6):1393-1398, 1992.
 99. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 13(6):1384-1390, 1995
 100. Sarkis AS, Dalbagni G, Gordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 152:388-392, 1994.
 101. Serth J, Kuczyk KA, Bokemeyer C, Hervatin C, Nafe R, Tan HK, Jonas U. p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 71(1):201-205, 1995.
 102. Kuczyk MA, Bokemlyer C, Serth J, Hervatin C, Oelke M, Hofner K, Tan HK, Jonas U. p53 overexpression as a prognostic factor for advanced stage bladder cancer. *Eur J Cancer* 31A(13-14):2143-2147, 1995.
 103. Nakopoulou LL, Constadinides CA, Tzonou A, Lazaris AC, Zervas A, Dimopoulos CA. Immunohistochemical evaluation of nm23-H1 gene product in transitional cell carcinoma of the bladder. *Histopathology* 28(5):429-435, 1996.
 104. Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 53(22):5365-5369, 1993.
 105. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res* 56(14):3196-3198, 1996.
 106. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, Giannopoulou I, Constantinides C, Lazaris AC, Liapis H, Kyriakou G, Dimopoulos C. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(2):130-137, 2001.
 107. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 87(21):1603-1612, 1995.
 108. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM, Carroll PR. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 154(1): 69-71, 1995.
 109. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74(6):762-766, 1994.
 110. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 160(3 Pt 1):645-659, 1998.
 111. Bohle AS, Kalthoff M. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 1999, 384:133-140.
 112. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer

- metastasis. *Oncogene* 2003, 22:6504-6536
- Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ et al. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001, 10(2):243-255.
113. Wong CW, Song C, Grimes MM et al. Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am J Pathology* 2002, 161(3):749-753.
 114. Hendrix HJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:411-421.
 115. Callaway MP, Briggs JC. The incidence of late recurrence (greater than 10 years), an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma. *Br J Plast Surg* 1989, 42:46-49.
 116. Demicheli R. Tumor dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001, 11(4):297-306.
 117. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995, 1:149-153.
 118. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971, 285: 1182-1186.
 119. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004, 112:402-412.
 120. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907, 2: 1236-1240.
 121. Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968, 41:111-124.
 122. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86:353-364.
 123. Sund M, Xie L, Kalluri R. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004, 112:450-462.
 124. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407:249-257.
 125. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000, 6(3):389-395.
 126. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. *J Clin Invest* 2000, 105:17-19.
 127. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 2002, 9:631-641.
 128. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999, 18:6336-63362.
 129. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995, 9:926-933.
 130. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001, 30:543-553.
 131. Berk B. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001, 81:999-1030.
 132. Balsh JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res* 2000, 60: 3683-3688.
 133. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, Vantloutte K et al. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential and angiogenesis. *Cancer Res* 1994, 54:6504-6511.

134. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991, 324:1-8.
135. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282(5):C947-970.
136. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002, 16:922-934.
137. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003, 98:413-423.
138. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunology* 2004, 4:35-45.
139. Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development
140. Huntigton GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. *Am J Anat* 1910, 10:177-311.
141. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor family members: a structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 1993, 73:421-424.
142. Li X, Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:421-426.
143. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991, 64:271-280.
144. Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992, 9:383-391.
145. Heldin C-H, Östman A. Ligand-induced dimerization of growth factor receptors: variations on the theme. *Cytokines Growth Factor Rev* 1996, 7:3-10.
146. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990, 61:293-212.
147. Heldin C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995, 80:213-223.
148. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991, 252:668-674.
149. Heldin H-E, Östman A, Rönstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factors receptors. *Biochem Biophys Acta* 1998, 1378:F79-F113.
150. Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signaling system? *Biochim Biophys Acta* 1993, 1179:27-75.
151. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002, 82:673-700.
152. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: Myth or reality? *Clinical Cancer Res* 2001, 7:462-468.
153. Hartveit F. Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology* 1990, 16:533-543.
154. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor family members: a structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 1993, 73:421-424.
155. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971, 285: 1182-1186.
156. Bohle AS, Kalthoff M. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 1999, 384:133-140.
157. Balsh JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res* 2000, 60: 3683-3688.
158. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, Vantloutte K et al. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell

- line reduces primary tumor growth, metastatic potential and angiogenesis. *Cancer Res* 1994, 54:6504-6511.
159. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282(5):C947-970.
 160. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004, 112:402-412.
 161. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907, 2: 1236-1240
 162. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995, 1:149-153.
 163. Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968, 41:111-124.
 164. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86:353-364.
 165. Sund M, Xie L, Kalluri R. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004, 112:450-462.
 166. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407:249-257.
 167. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000, 6(3):389-395
 168. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. *J Clin Invest* 2000, 105:17-19.
 169. Wong CW, Song C, Grimes MM et al. Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am J Pathology* 2002, 161(3):749-753
 170. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 2002, 9:631-641.
 171. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999, 18:5336-63362.
 172. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995, 9:926-933.
 173. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001, 30:543-553.
 174. Berk B. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001, 81:999-1030.
 175. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991, 324:1-8
 176. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002, 16:922-934
 177. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003, 98:413-423.
 178. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunology* 2004, 4:35-45.
 179. Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development
 180. Huntigton GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. *Am J Anat* 1910, 10:177-311.
 181. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002, 82:673-700.

182. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: Myth or reality? *Clinical Cancer Res* 2001, 7:462-468.
183. Detmar M, Hiraoka S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med* 2002, 196(6):713-718.
184. Jain Rk, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistakes identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 2002, 94(6):417-421
185. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000, 60:4324-4227.
186. Padera TP, Kadambi A, diTomaso E et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002, 296:1883-1886.
187. Hartveit F. Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology* 1990, 16:533-543.
188. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor family of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 1993, 73:421-424
189. Li X, Eriksson U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:421-426.
190. Huntigton GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. *Am J Anat* 1910, 10:177-311.
191. Huntigton GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. *Am J Anat* 1910, 10:177-311.
192. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991, 64:271-280.
193. Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992, 9:383-391.
194. Heldin C-H, Östman A. Ligand-induced dimerization of growth factor receptors: variations on the theme. *Cytokines Growth Factor Rev* 1996, 7:3-10.
195. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990, 61:293-212.
196. Heldin C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995, 80:213-223
197. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991, 252:668-674.
198. Heldin H-E, Östman A, Rönstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factors receptors. *Biochem Biophys Acta* 1998, 1378:F79-F113.
199. Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentigenol* 1939, 42:891-899.
200. Folkman J, Merker E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971, 133:275-288.
201. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983, 219:983-985.
202. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 161:851-858.
203. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989, 246:2007-2004.
204. Keck PI, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989, 236:1309-1312.

205. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 1991, 47:211-218.
206. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 280: C1358-C136
207. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995, 1:1024-1028.
208. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:13313-13316.
209. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999, 103:159-165.
210. Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 274:16349-16354.
211. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins surviving and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 99:4349-4354.
212. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for surviving in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:4349-4354.
213. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126:1149-1159.
214. Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14765-14770.
215. Guerrin M, MOukadiri H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol* 1995, 164:385-394.
216. Oberg-Welsh C, Sandler S, Andersson A, Welsh M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997, 126:125-132.
217. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999, 19:5731-5740.
218. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor YEK, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2a and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002, 8:702-710.
219. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W,

- Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003, 34:383-394.
220. Ruhrberg Ch. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *BioEssays* 2003, 25:1052-1060.
221. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 181:902-908.
222. Mandriota S, Montesano O, Orci L, Seghezzi G, Vassalli J-D et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995, 270:9709-9716.
223. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992, 153:557-562.
224. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 1989, 254:20017-20024.
225. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P et al. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987, 57:673-686.
226. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987, 8:95-114.
227. Olk RJ, Lee CM. *Diabetic retinopathy: practical management*. Philadelphia, Lippincott, 1993.
228. Rhodin JAG. The diaphragm of capillary endothelial fenestrations, 1962.
229. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995, 108:2369-2379.
230. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G et al. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998, 140:947-959.
231. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999, 126:1149-1159.
232. Pekala P, Marelow M, Heuvelman D, Connolly D. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor- α , but not by insulin. *J Biol Chem* 265:18051-18054, 1990.
233. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the α 1 β 1 and α 2 β 1 integrins. *FASEB J* 2004, 18(10):1111-1113.
234. Veikkola T, Lohela M, Ikenberg K et al. Intrinsic versus microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *FASEB J* 2003, 17(14):2006-2013.
235. Nagy JA, Vasile E, Feng D et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002, 196 (11):1497-1506.
236. Hiarakawa S, Kodama S, Kunstfeld R et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005, 201(7): 1089-1099.
237. Cursiefen C, Chen L, Borges LP et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004, 113(7):1040-1050.

238. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res* 1997, 17:99-103.
239. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995, 11:1569-1579.
240. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995, 26:86-91.
241. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993, 53:4727-4735.
242. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993, 143:1255-1262.
243. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994, 54:276-280.
244. Guidi AJ, Abu-Jawden G, Berse B et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:12137-12145.
245. Hashimoto M, Ohawa M, Ohnishi A, Naka N et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 1995, 73:859-863.
246. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992, 359:845-848.
247. Phillips HS, Armanini M, Stavrou D, Ferrara N, Westphal M. Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis. *Int J Oncol* 1993, 2:913-919.
248. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993, 91:153-159.
249. Witzigmann Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995, 55:1358-1364.
250. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998, 94:715-725.
251. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C et al. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role of T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 1995, 55:4140-4145.
252. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol* 2004 (in press).
253. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001, 98:1904-1913.

254. Maeda K, Chung VS, Ogawa Y, Takatsuka S et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996, 77:858-863.
255. Stefanou D, Batistatou A, Kamina S et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prognostic hyperplasia and prostate cancer. *In vivo* 2004, 18(2):155-160.
256. Yamamoto Y, Toi M, Kondo S et al. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2(5):821-826, 1996.
257. Salvey P, Mampaa H, Orpana A et al. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 3(5):647-651, 1997.
258. Hasegawa Y, Takanashi S, Okudera K, Kumagai M et al. Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients. *Intern Med* 2005, 44(1):26-34.
259. Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M et al. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003, 192(2):215-225.
260. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:2576-2581.
261. Grimmond S, Lagercrantz J, Drinkwater C et al. Cloning and characterization of a novel human gene related to vascular endothelial growth factor. *Genome Res* 1996, 6:124-131.
262. Li X, Aase K, Li H, von Euler G, Eriksson U. Isoform-specific expression of VEGF-B in normal tissues and tumors. *Growth Factors* 2001, 19(1):49-59.
263. Aase K, Lymboysaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U. Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* 1999, 215(1):12-25.
264. Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C et al. A comparative study of the expression patterns for vegf, vegf-b/vrf and vegf-c in the developing and adult mouse. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1398(2):157-163.
265. Belgore F, Blann A, Neil D, Ahmed AS, Lip GY. Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries. *J Clin Pathol* 2004, 57(3):266-272.
266. Yoon Y, Losordo DW. VEGF-B joins the ranks of proangiogenic cytokines. *Circulation Res* 2003, 93:87-90.
267. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000, 86(2):E29-35.
268. Aase K, von Euler G, Li X et al. Vascular endothelial growth factor-B deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001, 104(3):358-364.
269. Bhardwaj S, Roy H, Gruchala M et al. Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Hum Gene Ther* 2003, 14(15):1451-1462.
270. Rissanen TT, Harkkanen JE, Gruchala M et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003, 92(10):1098-1106.
271. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG et al. Vascular endothelial growth factor-b promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 2003, 93:114-123
272. Mould AW, Greco SA, Cahill MM et al. Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circ Res* 2005, 97(6):260-270.
273. Mould AW, Tonks ID, Cahill MM et al. *Vegfb* gene knock-out mice display

- reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48(9):2660-2669.
274. Nag S, Eskandarian MR, Davis J, Eubanks JH. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-B after brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61(9):778-788.
 275. Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2002, 55(2):361-368.
 276. Avantaggiato V, Orlandini M, Acampora D, Oliviero S, Simeone A. Embryonic expression pattern of the murine FigF gene, a growth factor belonging to platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Mech Dev* 1998, 73(2):221-224.
 277. Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J. Restricted expression pattern of Vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 257(3):891-894.
 278. Greenberg JM, Thompson FY, Brooks SK et al. Mesenchymal expression of vascular endothelial growth factors D and A defines vascular patterning in developing lung. *Dev Dyn* 2002, 224(2):144-153.
 279. Partanen TA, Arola J, Saaristo A et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptors, VEGFR-3 in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000, 14:2087-2096.
 280. Byzova TV, Goldman CK, Jankau J et al. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 2002, 99(12):4434-4442.
 281. 674. Jia H, Bagherzadeh A, Bicknell R et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGFF-A differentially regulate KDR-mediated signaling and biological function in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2004, 279(34):36148-36157.
 282. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D expression by the organ microenvironment in human colon carcinoma. *Eur J Cancer* 2004, 40(19):1604-1609.
 283. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001, 7(2):186-191.
 284. Von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA et al. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005, 27(3):669-679.
 285. Ishii H, Yazawa T, Sato H et al. Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs). *Lung Cancer* 2004, 45(3):325-337.
 286. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (Flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990, 5:519-524.
 287. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. Flk-1, an Flt-related receptor tyrosine kinase, is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993, 118:489-498.
 288. Morishita K, Johnson DE, Williams LT. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 1995, 270:27948-27953.
 289. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997, 272:23659-23667.

290. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wy Y et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt-1. *Nat Med* 2002, 8:831-840.
291. Nagura S, Katoh R, Miyagi E, Shibuya M, Kawaoi A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-1 (Flt-1) in Graves disease possibly correlated with increased vascular density. *Hum Pathol* 2001, 32:10-17.
292. Meunier-Carpentier S, Dales JP, Djemli A, Garcia S et al. Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma. *Int J Oncol* 2005, 26(4):977-984.
293. Wu H, Li Y, Zhu G, Zhang L, He X. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (Flt-1) in breast carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002, 82(10):708-711.
294. Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F et al. Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma. *Ann Pathol* 2003, 23(4):297-305.
295. Wang H, Chen G, Zhang B. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2002, 31(5):391-395.
296. Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, Dey T. VEGF, flt-1 and KDR-Flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000, 76(1):33-39.
297. Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002, 8(6):994-998.
298. Von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R et al. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology* 2000, 119(5):1358-1372.
299. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, Kornmann M, Korc M. Concomitant overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2000, 85(1):27-34.
300. Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001, 116(6):838-845.
301. Hahn D, Simak R, Steiner GE, Handisurya A et al. Expression of the VEGF-receptor Flt-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *J Urol* 2000, 164(2):506-510.
302. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999, 54(3):567-572.
303. Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2002, 62(3):854-859.
304. Lalla RV, Boisineau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003, 129(8):882-888.
305. Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003, 88(2):176-185.
306. Bando H, Weich HA, Brokelmann M, Horiguchi S et al. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 2005, 92(3): 553-561.

307. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) / soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 2002, 98(1): 14-18.
308. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 2003, 1:1356-1370.
309. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Meldin C-H. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994, 269:26988-26995.
310. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and Flt-1 receptors. *J Biol Chem* 1996, 271:5638-5646.
311. Nagy JA, Vasile E, Feng D et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002, 196 (11):1497-1506.
312. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996, 15(2):290-298.
313. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(2):548-553.
314. Gitay-Goren H et al. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem* 1992, 267:6093-6098.
315. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995, 376:62-66.
316. Bergsland EK. Update on clinical trials targeting vascular endothelial growth factor in cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2004, 61(suppl.5): S12-S20.
317. Meunier-Carpentier S, Dales JP, Djemli A, Garcia S et al. Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma. *Int J Oncol* 2005, 26(4):977-984.
318. Wu H, Li Y, Zhu G, Zhang L, He X. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (Flt-1) in breast carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002, 82(10):708-711.
319. Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F et al. Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma. *Ann Pathol* 2003, 23(4):297-305.
320. Wang H, Chen G, Zhang B. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2002, 31(5):391-395.
321. Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, Dey T. VEGF, flt-1 and KDR-Flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000, 76(1):33-39.
322. Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002, 8(6):994-998.
323. Von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R et al. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology* 2000, 119(5):1358-1372.
324. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, Kornmann M, Korc M. Concomitant overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2000, 85(1):27-34.

325. Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001, 116(6):838-845.
326. Hahn D, Simak R, Steiner GE, Handisurya A et al. Expression of the VEGF-receptor Flt-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *J Urol* 2000, 164(2):506-510.
327. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999, 54(3):567-572.
328. Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2002, 62(3):854-859.
329. Lalla RV, Boisineau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003, 129(8):882-888.
330. Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *Haematologica* 2003, 88(2):176-185.
331. Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001, 12(3):129-135.
332. Pavco PA, Bouhoma KS, Gallegos AM, Agrawal A et al. Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 2000, 6(5):2094-2103.
333. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y, Xiang R. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of antiangiogenesis. *Immunol Rev* 2004, 199:181-190.
334. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y, Xiang R. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of antiangiogenesis. *Immunol Rev* 2004, 199:181-190.
335. Yang H, Li M, Chai H et al. Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *J Surg Res* 2004, 122(2):249-255.
336. 848Borg J-P, deLapeyriere O, Noguchi T et al. Biochemical characterization of two isoforms of Flt4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene* 1995, 10:973-984.
337. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998, 282:946-949.
338. Partanen TA, Arola J, Saaristo A et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptors, VEGFR-3 in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000, 14:2087-2096.
339. 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, 92:3566-3570.
340. Wilting J, Eichmann A, Christ B. Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. *Cell Tissue Res* 1997, 288:207-223.
341. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 2002, 30(3):472-477.
342. Hamrah P, Chen L, Zhang Q, Dana MR. Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. *Am J Pathol* 2003, 163(1):57-68.

343. Veikkola T, Lohela M, Ikenberg K et al. Intrinsic versus microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *FASEB J* 2003, 17(14):2006-2013.
344. Valtola R, Salven P, Heikkila P et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999, 154(5):1381-1390.
345. Smith G, McLeod D, Foreman D, Boulton M. Immunolocalisation of the VEGF receptors Flt-1, KDR and Flt-4 in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1999, 83(4):486-494.
346. Borg J-P, deLapeyriere O, Noguchi T et al. Biochemical characterization of two isoforms of Flt4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene* 1995, 10:973-984.
347. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000, 156(5):1499-1504.
348. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001, 20(17):4762-4763.
349. Persaud K, Tille JC, Liu M et al. Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci* 2004, 117:2745-2756.
350. Veikkola et al, Jussila L, Makinen T et al. Signaling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001, 20(6):1223-1231.
351. Wang JF, Zhang XF, Groopman JE. Stimulation of beta1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem* 2001, 276(45):41950-41957.
352. Witte D, Thomas A, Ali N et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2002, 22(3):1463-1466.
353. Kawakami M, Furuhashi T, Kimura V et al. Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Surgery* 2003, 133(3):300-308.
354. Kojima H, Shijubo N, Yamada G et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with T1 lung adenocarcinoma. *Cancer* 2005.....
355. Arinaga M, Noguchi T, Takeno S et al. 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.
356. Li Q, Dong X, Gu W et al. Clinical significance of co-expression of VEGF-C and VEGF-4 in non-small cell lung cancer. *Clin Med J (Engl)* 2003, 116(5):727-730.
357. Chen F, Takenaka K, Ogawa E et al. Flt-4 positive endothelial cell density and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(24):8548-8553.
358. Clarijs R, Schalkwijk L, Hofmann UB et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002, 62(23):7059-7065.
359. Yokoyama Y, Sato S, Futagami M et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometria carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000, 77(3):413-418.

360. Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer in association with regional lymph node metastasis. *Prostate* 2005, 65(2):110-116.
361. Li R, Younes M, Wheeler TM et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate* 2004, 58(2):193-199.
362. Nishida N, Yano H, Komai K et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004, 101(6):1364-1374.
363. Tang RF, Itakura J, Aikawa T et al. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2001, 22(3):285-292.
364. Marchio S, Primo L, Pagano M et al. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the migration and proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem* 1999, 274(39):27617-27622.
365. Borg J-P, deLapeyriere O, Noguchi T et al. Biochemical characterization of two isoforms of Flt4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene* 1995, 10:973-984.
366. Hamrah P, Chen L, Zhang Q, Dana MR. Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. *Am J Pathol* 2003, 163(1):57-68.
367. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M et al. Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(14):5313-5317.
368. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K et al. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci* 2004, 95(4):328-333.
369. Pytowski B, Goldman J, Persaud K et al. Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97(1):14-21.
370. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122:3829-3837
371. Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 2002;98:335-343
372. Zu XB, Tang ZY, Li Y, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int*. 2006;98:1090-1093
373. Li Z, Qi F, Miao J, Zu X, He W, Wang L, Qi L. Vascular endothelial growth factor-C associated with computed tomography used in the diagnosis of lymph node metastasis of bladder carcinoma. *Arch Med Res*. 2010 Nov;41(8):606-10.
374. Li Z, Qi F, Qi L, Zhang H, Chen M, Wang L, Zu X. VEGF-C as a decision-making biomarker for selected patients with invasive bladder cancer who underwent bladder-preserving radical surgery. *Arch Med Res*. 2011 Jul;42(5):405-11.
375. Herr HW. Conservative management of muscle-infiltrating bladder cancer: prospective experience. *J Urol*. 1987;138:1162-1163
376. Solsona E, Iborra I, Collado A, et al. Feasibility of radical transurethral resection as monotherapy for selected patients with muscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 2010;184:475-481

377. Herr HW. Transurethral resection of muscle-invasive bladder cancer: 10-year outcome. *J Clin Oncol.* 2001;19:89–93
378. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2179-84
379. Li Z, Qi F, Miao J, Zu X, He W, Wang L, Qi L. Vascular endothelial growth factor-C associated with computed tomography used in the diagnosis of lymph node metastasis of bladder carcinoma. *Arch Med Res.* 2010 Nov;41(8):606-10. .
380. Herrmann E, Eltze E, Bierer S, Köpke T, Gorge T, Neumann J, Hertle L, Wülfing C. VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5A):3127-33.
381. Afonso J, Santos LL, Amaro T, Lobo F, Longatto-Filho A. The aggressiveness of urothelial carcinoma depends to a large extent on lymphovascular invasion--the prognostic contribution of related molecular markers *Histopathology.* 2009 Nov;55(5):514-24
382. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Hayashida Y, Eguchi J, Hayashi T, Kanetake H. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):800-6.
383. Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol.* 2005 Feb;12(2):15
384. Zhang HH, Qi F, Shi YR, Miao JG, Zhou M, He W, Chen MF, Li Y, Zu XB, Qi L. RNA interference-mediated vascular endothelial growth factor-C reduction suppresses malignant progression and enhances mitomycin C sensitivity of bladder cancer T24 cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012 Jun;27(5):291-8.
385. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery SH. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J* 12: 1075-1095, 1998.
386. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 1990 Apr;6(4):121-5. Review.
387. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays* 14:455-463, 1992.
388. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 5:891-897, 1993.
389. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27: 1-11, 2009.
390. Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what they do not do. New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* xxx: 1-15, 2009 (in press).
391. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197-2
392. Murphy G, Reynolds JJ. Extracellular matrix degradation. In: Royce PM, Steinman B (eds). *Connective Tissue and its Heritable Disorders*, Wiley-Liss, New York, pp. 287-316, 1993a 50, 1993.
393. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494, 1999.
394. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Asp Med* 29: 290-308, 2008.
395. Woessner JF Jr, Taplin CJ. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem* 263: 16918-16925, 1988
396. Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA. Matrix

- metalloproteinase 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 74:220-223, 1997.
397. Torii A, Kodera Y, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Yamamura Y, Kato T, Hayakawa T, Fujimoto N, Kito T. Plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 in gastric cancer. *Br J Surg* 84:133-136, 1997.
 398. Lein M, Jung K, Laube C, Hübne T, Winkelmann B, Stephan C, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 85:801-804, 2000.
 399. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Greenwald RA, Gruber B, Tickle Sp, Baker TS, Docherty AJ. Elevated plasma stromelysin levels in arthritis. *J Rheumatol* 21:2329-2333, 1994.
 400. Naito K, Takahashi M, Kushida K, Suzuki M, Ohishi T, Miura M, Inoue T, Nagano A. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38:510-515, 1999.
 401. Zucker S, Mian N, Drews M, Conner C, Davidson A, Miller F, Birembaut P, Nawrocki B, Docherty AJ, Greenwald RA, Grimson R, Barland P. Increased serum stromelysin-1 levels in systemic lupus erythematosus: lack of correlation with disease activity. *J Rheumatol* 26:78-80, 1999.
 402. Lichtinghagen R, Seifert T, Kracke A, Marckmann S, Wurster U, Heidenreich F. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 99:19-26, 1999.
 403. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Ebihara I, Shimada N, Kaide H. Elevation of serum levels of metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen, and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease. *Am J Nephrol* 20:32-36, 2000.
 404. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 29:122-127, 1999.
 405. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 32:368-372, 1998.
 406. Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/ stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98:137-146, 1999.
 407. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg* 230:260-265, 1999.
 408. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biology* 19:623-629, 2000.
 409. Bergers G, Cousseus LM. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev* 10: 120-127, 2000
 410. DeClerck YA, Laug WE. Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 49:72-84, 1996
 411. Mignatti P, Rifkin D. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: Novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 78:103-157, 2000.

412. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 70:561-573, 2002.
413. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res* 92: 827-839, 2003.
414. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insight into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 24:647-656, 2007.
415. Ala-aho R, Kahari V-M. Collagenases in cancer. *Biochimie* 87:273-286, 2005.
416. Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 265:11421-11424, 1990.
417. Freije JM, Diez-Itra I, Balbin M, Sanchez L, Blasco R, Toliviou J, Lopez-Otin C. Molecular cloning and expressing of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269:16766-16773, 1994.
418. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2:252-257, 2000.
419. Polette M, Gilbert N, Stas I, Nawrocki B, Noel A, Remacle A, Stetler-Stevenson WG, Birembaut P, Foidart M. Gelatinase A expression and localization in human breast cancer. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch* 424:641-645, 1994 or 426:29-35, 1994.
420. Ala-aho R, Kahari V-M. Collagenases in cancer. *Biochimie* 87:273-286, 2005.
421. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P. Membrane-type matrix metalloproteinase genes is expressed in stromal cells of human colon, breast and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2730-2734, 1995.
422. Johansson N, Abonen M, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 57:5-15, 2000.
423. Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading. *J Biol Chem* 260:12367-12376, 1985
424. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature (London)* 370:61-65, 1994.
425. Matsumoto S, Katoh M, Saito S, Watanabe T, Masuho Y. Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1354:159-170, 1997.
426. Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* 274:8925-8932, 1999.
427. Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. Molecular cloning of a novel membrane type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 56:944-949, 1996.
428. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 268: 23824-23829, 1993.
429. Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schatzlein C, Eibel H, Peter HH, Schmitt J, Krawinkel U. Matrix metalloproteinase MMP-19 (RAS-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 198:408-423, 1998
430. Yang M, Kurkinen M. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP for chicken embryo fibroblasts. CMMP, xenopus XMMP and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J Biol Chem* 273:17893-17900, 1998.
431. Velasco G, Pendas Am, Fueyo A, Knauper V, Murphy G, López-Otin C.

- Cloning and characterization of human MMP-23 a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem* 274:4570-4576, 1999.
432. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200:448-464, 2003.
 433. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase inhibitor-free enzyme that catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4 length fragments. *J Biol Chem* 270:5872-5876, 1995.
 434. Wilchem SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. Human skin fibroblast stromelysin: structures, glycosylation, substrate specificity and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6725-6729, 1987.
 435. Bini A, Itoh Y, Kudryk BJ, Nagase H. Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry* 35:13056-13063, 1996
 436. Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Giudice LC, Gocstein OF. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am J Obstet Gynecol* 168:253-260, 1993.
 437. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271:17119-17123, 1996.
 438. Knauper V, Will H, Lopez-Otin, Smith B, Atkinson JS, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271:17124-17131, 1996
 439. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272:2446-2451, 1997
 440. d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250:751-757, 1997.
 441. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Cyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysis. *Cell* 95:365-377, 1998
 442. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272:2446-2451, 1997.
 443. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491-21494, 1999.
 444. Mignatti P, Rifkin D. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: Novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 78:103-157, 2000.
 445. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-672, 2002
 446. Gomis-Rüth FX, Gohlke U, Betz M, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C, Bode W. The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): A crystal structure of its C-terminal haemopexin like domain. *J Mol Biol* 264: 556-566, 1996.
 447. Hirose T, Patterson C, Pourmotabbed T, Mainardi CI, Hasty KA. Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 90:2569-2573, 1993
448. Yang M, Murray MT, Kurkinen M. A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in *Henopus laevis* early embryo development. *J Biol Chem* 272:13527-13533, 1997.
 449. Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77:465-480, 1999.
 450. Curry TE Jr, Mann JS, Estes RS, Jones PBC. Alpha-2 macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries. *Endocrinology* 127:63-68, 1990.
 451. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-KD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 113:437-449, 1991.
 452. Flenniken AM, Williams BRG. Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lack fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev* 4:1094-1106, 1990.
 453. Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77:465-480, 1999
 454. Llano E, Pendas AM, Knäuper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, López-Otin C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 36:15101-15108, 1997.
 455. Wysocki AB, Stiano-Coico L, Grinnel F. Would fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101:64-68, 1993.
 456. Oikarinen A, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H, Autio P, Salo T. Demonstration of 72-KDa and 92-KDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization and decrease by topical glucocorticoids. *J Invest Dermatol* 101:205-210, 1993.
 457. Yang M, Kurkinen M. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP for chicken embryo fibroblasts. CMMP, xenopus XMMP and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J Biol Chem* 273:17893-17900, 1998
 458. Tarlton JF, Vickery CJ, Leaper DJ, Bailey AJ. Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Dermatol* 137:506-516, 1997.
 459. Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in hypertrophied rat myocardium. *Circ Res* 67:787-794, 1990.
 460. Funck RC, Wilke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodelling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Mol Biol* 432:35-44, 1997.
 461. Gingras D, Béliveau R. L'angiogenese tumorale une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *M/S* 13:1428-1435
 462. Forget MA, Desrosiers RR, Béliveau R. Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77:465-480, 1999.
 463. McCachren SS. Expression of metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor in human arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 34:1085-1093, 1991.
 464. Ellis AJ, Curry VA, Powell EK, Cawston TE. The prevention of collagen breakdown in bovine nasal cartilage by TIMP-2 and a low molecular weight synthetic inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 201:94-101, 1994.
 465. Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central

- nervous system, microglial nodules and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:300-309, 1996.
466. Opdenakker G, VanDamme J. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today* 15:103-107, 1994.
467. Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 48:921-926, 1997.
468. Miyazaki K, Hasegawa M, Funahash K, Umeda M. A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature (London)* 362:839-841, 1993.
469. LePage RN, Fosang AJ, Fuller SJ, Murphy G, Evin G, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. Gelatinase A possesses a beta-secretase-like activity in cleaving the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 377:267-270, 1995.
470. Tsunozuka Y, Kinoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A, Sato H, Seiki M. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 56:5678-5683, 1996.
471. Khokha R, Zimmer MJ, Wilson SM, Chambers AF. Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells suppresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin Exp Metastasis* 32:365-370, 1992.
472. Testa JE. Loss of the metastatic phenotype by a human epidermoid carcinoma cell line, Hep-3, is accompanied by increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Cancer Res* 52:5597-5603, 1992.
473. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews Cancer* 3: 489-501, 2003.
474. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Rev* 23:101-117, 2004.
475. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149, 2000.
476. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, Giannopoulou I, Constantinides C, Lazaris AC, Liapis H, Kyriakou G, Dimopoulos C. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morph* 9:130-137, 2001
477. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 272:24-27, 1997
478. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 50:97-116, 1998.
479. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insight into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 24:647-656, 2007.
480. Itoh T, Tanioka M, Matsuola H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17:177-181, 1999.
481. Szarvas T, vom Dorp F, Ergün S, Rübber H. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2011 May;8(5):241-54. doi: 10.1038/nrurol.2011.44. Epub 2011 Apr 12.
482. Sier et al., Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin. Cancer Res.*, 6: 2333-2340, 2000.
483. Gerhards S, Jung K, Koenig F, Danilchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology*. 2001

- Apr;57(4):675-9.
484. Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, Fridman R, Wood DP Jr. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin Cancer Res.* 1998 Dec;4(12):3011-6.
 485. Gohji K, Fujimoto N, Komiyama T, Fujii A, Ohkawa J, Kamidono S, Nakajima M. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer* 78:2379-2387, 1996a.
 486. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance correlating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res* 56:3196-3198, 1996b.
 487. Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 165:1769-1772, 2001.
 488. Fernández CA, Wszolek MF, Loughlin KR, Libertino JA, Summerhayes IC, Shuber AP. A novel approach to using matrix metalloproteinases for bladder cancer. *J Urol.* 2009 Nov;182(5):2188-94. doi: 10.1016/j.juro.2009.07.032. Epub 2009 Sep 16.
 489. Choi YD, Cho NH, Ahn HS, Cho KS, Cho SY, Yang WJ. . Matrix metalloproteinase expression in the recurrence of superficial low grade bladder transitional cell carcinoma. *J Urol.* 2007 Mar;177(3):1174-8.
 490. de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, López Arranz JS. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005 Jul;41(6):568-79..
 491. Durkan GC, Nutt JE, Rajjayabun PH, Neal DE, Lunec J, Mellon JK Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in voided urine samples from patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2001 Nov;7(11):3450-6.
 492. Eissa S, Ali-Labib R, Swellam M, Bassiony M, Tash F, El-Zayat TM. . Noninvasive diagnosis of bladder cancer by detection of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-2) in urine. *Eur Urol.* 2007 Nov;52(5):1388-96. Epub 2007 Apr 10.
 493. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2576-8
 494. Leissner J, Ghoneim MA, Abol-Enein H, Thüroff JW, Franzaring L, Fisch M, Schulze H, Managadze G, Allhoff EP, el-Baz MA, Kastendieck H, Buhtz P, Kropf S, Hohenfellner R, Wolf HK. . Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J Urol.* 2004 Jan;171(1):139-44.
 495. Szarvas T, Becker M, vom Dorp F, Gethmann C, Tötsch M, Bánkfalvi A, Schmid KW, Romics I, Rübber H, Ergün S. Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2010 May;101(5):1300-8.
 496. Szarvas T, Singer BB, Becker M, Vom Dorp F, Jäger T, Szendroi A, Riesz P, Romics I, Rübber H, Ergün S. Urinary matrix metalloproteinase-7 level is associated with the presence of metastasis in bladder cancer. *BJU Int.* 2011 Apr;107(7):1069-73.
 497. Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Lerner SP, Palapattu GS, Cote RJ, Sagalowsky AI, Lotan Y. . Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. *Cancer.*

- 2008 Jan 15;112(2):315-2
498. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Annals of Oncology* 19:1566-1572, 2008.
 499. Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinoma, *J Urol.* 1999 Apr;161(4):1359-63.
 500. Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol.* 2006 Aug 10;6:19.
 501. Svatek RS, Shah JB, Xing J, Chang D, Lin J, McConkey DJ, Wu X, Dinney CP. A multiplexed, particle-based flow cytometric assay identified plasma matrix metalloproteinase-7 to be associated with cancer-related death among patients with bladder cancer. *Cancer.* 2010 Oct 1;116(19):4513-9
 502. J. E. Nutt, J. K. Mellon, K. Qureshi, and J. Lunec, "Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours," *British Journal of Cancer*, vol.78, no. 2, pp. 215–220, 1998.
 503. Itoh M, Murata T, Suzuki T, Shindoh M, Nakajima K, Imai K, Yoshida K. Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene.* 2006 Feb 23;25(8):1195-204
 504. B. Davies, J.Waxman, H.Wasan et al., "Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion," *Cancer Research*, vol. 53, no. 22, pp. 5365–5369, 1993
 505. M. A.Mohammad, N. R. Ismael, S. M. Shaarawy, and M. M. El-Merzabani, "Prognostic value of membrane type 1 and 2 matrix metalloproteinase expression and gelatinase a activity in bladder cancer," *International Journal of Biological Markers*, vol. 25, no. 2, pp. 69–74, 2010
 506. Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burt G, Mills IG, Warren A, Leung HY, Murphy G, Edwards DR, Neal DE, Kelly JD. Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. *Br J Cancer.* 2006 Feb 27;94(4):569-77.
 507. D. J. Grignon, W. Sakr, M. Toth et al., "High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer," *Cancer Research*, vol. 56, no. 7, pp. 1654–1659, 1996.
 508. Vasala K, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase 2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology.* 2003 Nov;62(5):952-7.
 509. Kanayama, K. Yokota, Y. Kurokawa, Y. Murakami, M. Nishitani, and S. Kagawa, "Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer," *Cancer*, vol. 82, no. 7, pp.1359–1366, 1998.
 510. K. Gohji, N. Fujimoto, T. Komiyama et al., "Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma," *Cancer*, vol. 78, no. 11, pp. 2379–2387, 1996.
 511. Eissa S, Ali-Labib R, Swellam M, Bassiony M, Tash F, El-Zayat TM. Noninvasive diagnosis of bladder cancer by detection of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-2) in urine. *Eur Urol.* 2007 Nov;52(5):1388-96. Epub 2007 Apr 10.
 512. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):485-96.

513. Szarvas T, Becker M, vom Dorp F, Gethmann C, Tötsch M, Bánkfalvi A, Schmid KW, Romics I, Rübber H, Ergün S. Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2010 May;101(5):1300-8.
514. Szarvas T, Singer BB, Becker M, Vom Dorp F, Jäger T, Szendroi A, Riesz P, Romics I, Rübber H, Ergün S. Urinary matrix metalloproteinase-7 level is associated with the presence of metastasis in bladder cancer. *BJU Int.* 2011 Apr;107(7):1069-73.
515. Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Karashima T, Czerniak B, Shen Y, Yang Y, Benedict WF, Dinney CP. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol.* 2004 Feb;171(2 Pt 1):570-4.
516. Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2003 Apr;61(4):719-23.
517. Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1395-9.
518. Saeb-Parsy K, Veerakumarasivam A, Wallard MJ, Thorne N, Kawano Y, Murphy G, Neal DE, Mills IG, Kelly JD. MT1-MMP regulates urothelial cell invasion via transcriptional regulation of Dickkopf-3. *Br J Cancer.* 2008 Aug 19;99(4):663-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6604513. Epub 2008 Jul 29.
519. Seargent JM, Loadman PM, Martin SW, Naylor B, Bibby MC, Gill JH. Expression of matrix metalloproteinase-10 in human bladder transitional cell carcinoma. *Urology.* 2005 Apr;65(4):815-20.
520. Mueller J, Steiner C, Höfler H. Stromelysin-3 expression in noninvasive and invasive neoplasms of the urinary bladder. *Hum Pathol.* 2000 Jul;31(7):860-5.
521. Rodríguez Faba O, Fernández Gómez JM, Palou Redorta J, Escaf Barmadah S, Vizoso F, Villavicencio Mavrich H. Significance of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) in invasive bladder cancer: correlation with pathological parameters. *Urol Int.* 2007;78(2):140-4.
522. Cruz-Munoz W, Khokha R. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(3):291-338.
523. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol.* 2000 Feb;190(2):150-6.
524. Kong Y, Poon R, Nadesan P, Di Muccio T, Fodde R, Khokha R, Alman BA. Matrix metalloproteinase activity modulates tumor size, cell motility, and cell invasiveness in murine aggressive fibromatosis. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5795-803
525. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H, Kagawa S, Yamashita K, Hayakawa T. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol.* 1994 Sep;1(3):228-31.
526. Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, Mavrommatis I, Panayotopoulou EG, Tsirmpa I, Stravodimos C, Giannopoulos A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 15;9(15):5573-81.
527. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci.* 1994 Sep;107 (P9):2373-9.
528. K. Vasala and T. Turpeenniemi-Hujanen, "Serum tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and matrix metalloproteinase-2 in complex with the inhibitor (MMP- 2:TIMP-2) as prognostic markers in bladder cancer,"

- Clinical Biochemistry*, vol. 40, no. 9-10, pp. 640–644, 2007.
529. K. Vasala, P. Kuvaja, and T. Turpeenniemi-Hujanen, "Low circulating levels of ProMMP-2 are associated with adverse prognosis in bladder cancer," *Tumor Biology*, vol. 29, no. 5, pp. 279–286, 2008.
 530. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, Giannopoulou I, Constantinides C, Lazaris AC, Liapis H, Kyriakou G, Dimopoulos C. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morph* 9:130-137, 2001.
 531. Nemunaitis J, Poole C, Primrose J, Rosemurgy A, Malfetano J, Brown P, Berrington A, Cornish A, Lynch K, Rasmussen H, Kerr D, Cox D, Millar A. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies. *Clin Cancer Res*. 1998 May;4(5):1101-9.
 532. Pavlaki M, Zucker S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPis): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Jun-Sep;22(2-3):177-203. Review
 533. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002 Mar 29;295(5564):2387-92. Review.
 534. Jodele S, Blavier L, Yoon JM. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 25:35-43, 2006.
 535. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40:1156-1168, 2008
 536. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26: 717-724, 2007.
 537. Ala-aho R, Kahari V-M. Collagenases in cancer. *Biochimie* 87:273-286, 2005.
 538. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 28: 639-648, 2006
 539. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 23: 4681-4689, 2004.
 540. Wyatt CA, Geoghegan JC, Brinckerhoff CE. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells. Effects on matrix destruction and tumor growth. *Cancer Res* 65: 11101-11108, 2005.
 541. Blackburn J, Coon C, Rhodes C, Brinckerhoff C. RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res* 67: 10849-10858, 2007
 542. Sounni NE, Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie*. 2005 Mar-Apr;87(3-4):329-4
 543. M. Pavlaki, J. Cao, M. Hymowitz, W.T. Chen, W. Bahou, S. Zucker, A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2740–2749.
 544. K. Hotary, E. Allen, A. Punturieri, I. Yana, S.J. Weiss, Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 1309–1323.
 545. S. Zucker, D. Pei, J. Cao, C. Lopez-Otin, Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP), *Curr. Top. Dev. Biol.* 54 (2003) 1D.
 546. Pei, S.J. Weiss, Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type

- matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity, *J. Biol.Chem.* 271(1996) 9135–9140.
547. I. Yana, S.J. Weiss, Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2387–2401.
 548. D.V. Rozanov, E.I. Deryugina, B.I. Ratnikov, E.Z. Monosov, G.N. Marchenko, J.P. Quigley, A.Y. Strongin, Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 276
 549. J. Cao, A. Rehemtulla, W. Bahou, S. Zucker, Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30174–3018
 550. Y. Okumura, H. Sato, M. Seiki, H. Kido, Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator, *FEBS Lett.* 402 (1997)181–184.
 551. C. Fernandez-Catalan, W. Bode, R. Huber, D. Turk, J.J. Calvete, A. Lichte, H. Tschesche, K. Maskos, Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor, *EMBO J.* 17 (1998) 5238–5248.
 552. R. Lang, M. Braun, N.E. Sounni, A. Noel, F. Frankenne, J.M. Foidart, W. Bode, K. Maskos, Crystal structure of the catalytic domain of MMP-16/MT3-MMP: Characterization of MT-MMP specific features *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 213–225.
 553. W.R. English, B. Holtz, G. Vogt, V. Knauper, G. Murphy, Characterization of the role of the “MT-loop”: an eight-amino acid insertion specific to progelatinaseA (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42018–42026.
 554. H. Miyamori, T. Takino, M. Seiki, H. Sato, Human membrane type-2 matrix metalloproteinase is defective in cell-associated activation of progelatinase A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 796–800
 555. N.E. Sounni, M. Janssen, J.M. Foidart, A. Noel, Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis, *Matrix Biol.* 22 (2003) 55–61.
 556. D.D. Cataldo, M.M. Gueders, N. Rocks, N.E. Sounni, B. Evrard, P. Bartsch, R. Louis, A. Noel, J.M. Foidart, Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors, *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 49 (2003)
 557. Y. Itoh, A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki, M. Seiki, Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion, *EMBO J.* 20 (2001) 4782–4793.
 558. T. Uekita, I. Gotoh, T. Kinoshita, Y. Itoh, H. Sato, T. Shiomi, Y. Okada, M. Seiki, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the cupin superfamily: a possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 12734–12743.
 559. X. Wang, D. Ma, J. Keski-Oja, D. Pei, Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9331–9336.
 560. N.E. Sounni, C. Roghi, V. Chabottaux, M. Janssen, C. Munaut, E. Maquoi, B.G. Galvez, C. Gilles, F. Frankenne, G. Murphy, J.M. Foidart, A. Noel, Up-regulation of vascular endothelial growth factor-a by active membrane-type 1

- matrix metalloproteinase through activation of src-tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13564–13574.
561. D. Gingras, N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M.P. Lachambre, B. Annabi, R. Beliveau, Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by MT1-MMP matrix metalloproteinase (MT1-MMP), *FEBS Lett.* 507 (2001) 231–236
 562. M. Egeblad, Z. Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 161–174.
 563. E. Ohuchi, K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki, Y. Okada, Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2446–245
 564. M.P. d'Ortho, H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi, G. Murphy, Membrane type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases, *Eur. J. Biochem.* 250 (1997) 751–757.
 565. M.P. d'Ortho, H. Stanton, M. Butler, S.J. Atkinson, G. Murphy, R.M. Hembry, MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films, *FEBS Lett.* 421 (1998) 159–164
 566. T. Kang, J. Yi, W. Yang, X. Wang, A. Jiang, D. Pei, Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice, *FASEB J.* 14 (2000) 2559–2568.
 567. T. Shimada, H. Nakamura, E. Ohuchi, Y. Fujii, Y. Murakami, H. Sato, M. Seiki, Y. Okada, Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase, *Eur. J. Biochem.* 262 (1999) 907–914.
 568. K. Endo, T. Takino, H. Miyamori, H. Kinsen, T. Yoshizaki, M. Furukawa, H. Sato, Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40764–40770
 569. S. Zucker, D. Pei, J. Cao, C. Lopez-Otin, Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP), *Curr. Top. Dev. Biol.* 54 (2003) 1D. Pei, S.J. Weiss, Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9135–9140.
 570. A.Y. Strongin, I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmer, G.A. Grant, G.I. Goldberg, Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5331–5338.
 571. C.J. Morrison, G.S. Butler, H.F. Bigg, C.R. Roberts, P.D. Soloway, C.M. Overall, Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47402–47410.
 572. S. Hernandez-Barrantes, M. Bernardo, M. Toth, R. Fridman, Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 131–138
 573. W.R. English, X.S. Puente, J.M. Freije, V. Knauper, A. Amour, A. Merryweather, C. Lopez-Otin, G. Murphy, Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor- α convertase activity but does not activate pro-MMP2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14046–14055.
 574. W.R. English, B. Holtz, G. Vogt, V. Knauper, G. Murphy, Characterization of the role of the “MT-loop”: an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42018–42026.
 575. D. Mu, S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J.L. Baron, J.S. Munger, H. Kawakatsu,

- D. Sheppard, V.C. Broaddus, S.L. Nishimura, The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1- MMP-dependent activation of TGF-beta1, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 493–507.
576. G. Velasco-Loyden, J. Arribas, F. Lopez-Casillas, The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloproteinase-1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 7721–7733
577. S. Manes, E. Mira, M.M. Barbacid, A. Cipres, P. Fernandez-Resa, J.M. Buesa, I. Merida, M. Aracil, G. Marquez, A. Martinez, Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3, *J. Biol. Chem.* 272
578. Manes, M. Llorente, R.A. Lacalle, C. Gomez-Mouton, L. Kremer, E. Mira, A. Martinez, The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6935–6945
579. B. Annabi, M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras, R. Beliveau, Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains, *Biochem. J.* 353 (2001) 547–553
580. A. Jiang, K. Lehti, X.Wang, S.J.Weiss, J. Keski-Oja, D. Pei, Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 13693–13698.
581. A. Remacle, G. Murphy, C. Roghi, Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 3905–3916
582. R. Szabo, Q. Wu, R.B. Dickson, S. Netzel-Arnett, T.M. Antalis, T.H. Bugge, Type II transmembrane serine proteases, *Thromb. Haemost.* 90 (2003) 185–193.
583. M. Sakakibara, S. Koizumi, Y. Saikawa, H.Wada, T. Ichihara, H. Sato, S. Horita, H. Mugishima, Y. Kaneko, K. Koike, Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma, *Cancer* 85 (1999) 231–239.
584. M. Michael, B. Babic, R. Khokha, M. Tsao, J. Ho, M. Pintilie, K. Leco, D. Chamberlain, F.A. Shepherd, Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 1802–1808.
585. T. Yoshizaki, Y. Maruyama, H. Sato, M. Furukawa, Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma, *Int. J. Cancer* 95 (2001) 44–50.
586. T. Yoshizaki, H. Sato, Y. Maruyama, S. Muro, M. Furukawa, C.S. Park, M. Seiki, Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma, *Cancer* 79 (1997) 139–144.
587. H. Kanayama, K. Yokota, Y. Kurokawa, Y. Murakami, M. Nishitani, S. Kagawa, Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer, *Cancer* 82 (1998) 1359–1366.
588. B. Davidson, I. Goldberg, W.H. Gotlieb, J. Kopolovic, G. Ben Baruch, J.M. Nesland, R. Reich, The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma, *Mol. Cell Endocrinol.* 187 (2002) 39–45.
589. R. Bendardaf, H. Lamlum, P. Vihinen, R. Ristamaki, J. Laine, S. Pyrhonen, Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma, *Oncology* 65 (2003) 337–346.
590. M. Polette, B. Nawrocki, C. Gilles, H. Sato, M. Seiki, J.M. Tournier, P. Birembaut, MT-MMP expression and localisation in human lung and breast

- cancers, *Virchows Arch.* 428 (1996) 29–35.
591. C. Bisson, S. Blacher, M. Polette, J.F. Blanc, F. Kebers, J. Desreux, B. Tetu, J. Rosenbaum, J.M. Foidart, P. Birembaut, A. Noel, Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells, *Int. J. Cancer* 105 (2003) 7–13.
 592. A. Okada, J.P. Bellocq, N. Rouyer, M.P. Chenard, M.C. Rio, P. Chambon, P. Basset, Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2730–2734.
 593. C. Gilles, M. Polette, M. Seiki, P. Birembaut, E.W. Thompson, Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma, *Lab. Invest.* 76 (1997) 651–660.
 594. C. Gilles, M. Polette, J. Piette, C. Munaut, E.W. Thompson, P. Birembaut, J.M. Foidart, High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells, *Int. J. Cancer* 65 (1996) 209–213.
 595. M. Nakada, H. Nakamura, E. Ikeda, N. Fujimoto, J. Yamashita, H. Sato, M. Seiki, Y. Okada, Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors, *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 417–428.
 596. R.K. Nuttall, C.J. Pennington, J. Taplin, A. Wheal, V.W. Yong, P.A. Forsyth, D.R. Edwards, Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells, *Mol. Cancer Res.* 1 (2003) 333–34
 597. G. Velasco, S. Cal, A. Merlos-Suarez, A.A. Ferrando, S. Alvarez, A. Nakano, J. Arribas, C. Lopez-Otin, Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors, *Cancer Res.* 60 (2000) 877–882
 598. M. Seiki, N. Koshikawa, I. Yana, Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis, *Cancer Metastasis Rev.* 22 (2003) 129–143.
 599. Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol.* 2005 Feb;12(2):152-8
 600. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Hayashida Y, Eguchi J, Hayashi T, Kanetake H. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):800-
 601. Herrmann E, Eltze E, Bierer S, Köpke T, Gorge T, Neumann J, Hertle L, Wülfing C. VEGF-C, VEGF-D and Flt-4 in transitional bladder cancer: relationships to clinicopathological parameters and long-term survival. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5A):3127-33
 602. Afonso J, Santos LL, Amaro T, Lobo F, Longatto-Filho A. The aggressiveness of urothelial carcinoma depends to a large extent on lymphovascular invasion--the prognostic contribution of related molecular markers. *Histopathology.* 2009 Nov;55(5):514-24.
 603. Zu X, Tang Z, Li Y, Gao N, Ding J, Qi L. Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int.* 2006 Nov;98(5):1090-3.
 604. Zhou M, He L, Zu X, Zhang H, Zeng H, Qi L. Lymphatic vessel density as a predictor of lymph node metastasis and its relationship with prognosis in urothelial carcinoma of the bladder. *Histopathology.* 2009 Nov;55(5):514-24
 605. Li Z, Qi F, Miao J, Zu X, He W, Wang L, Qi L. Vascular endothelial growth factor-C associated with computed tomography used in the diagnosis of lymph node metastasis of bladder carcinoma. *Arch Med Res.* 2010

- Nov;41(8):606-10.
606. Li Z, Qi F, Qi L, Zhang H, Chen M, Wang L, Zu X. VEGF-C as a decision-making biomarker for selected patients with invasive bladder cancer who underwent bladder-preserving radical surgery. *Arch Med Res.* 2011 Jul;42(5):
 607. Zhang HH, Qi F, Shi YR, Miao JG, Zhou M, He W, Chen MF, Li Y, Zu XB, Qi L. RNA interference-mediated vascular endothelial growth factor-C reduction suppresses malignant progression and enhances mitomycin C sensitivity of bladder cancer T24 cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012 Jun;27(5):291-8
 608. O'Brien, T., et al., Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res*, 1995. 55: p. 510-513.
 609. Spruck, C.I., et al., Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 1994. 54: p. 784-788
 610. Crew, J.P., et al., Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage in superficial bladder cancer. *Cancer Res*, 1997. 57: p. 5281-5285.
 611. Habuchi, T., et al., Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet*, 1993. 342: p. 1087-1088.
 612. Witte, D., et al., Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2002. 22: p. 1463-1466.
 613. Gunningham, S.P., et al., The short form of the alternatively spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(11): p. 4278-86.
 614. Kinoshita, J., et al., Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. 66(2): p. 159-64.
 615. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99:2179-2184.
 616. Kitagawa Y, Kunimi K, Ito H, Sato H, Uchibayashi T, Okada Y, Seiki M, Namiki M Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol.* 1998 Oct;160(4):1540-5.
 617. Mohammad MA, Ismael NR, Shaarawy SM, El-Merzabani MM. Prognostic value of membrane type 1 and 2 matrix metalloproteinase expression and gelatinase A activity in bladder cancer. *Int J Biol Markers.* 2010 Apr-Jun;25(2):69-74.