

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

---

**Ο Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός  
παραγόντας και το Οξειδωτικό stress στους  
ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα.**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΚΑΤΣΑΜΠΕΚΗ ΚΑΤΣΑΦΛΗ**

*Ειδικευόμενη Παθολογίας*

ΛΑΡΙΣΑ 2009

## **Τριμελής Επιτροπή**

**Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ** (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ν. ΣΤΑΘΑΚΗΣ**

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

**Κ. ΝΤΑΛΕΚΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

## **Επταμελής Επιτροπή**

**Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ** (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ν. ΣΤΑΘΑΚΗΣ**

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

**Κ. ΝΤΑΛΕΚΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας

**Α. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες.....	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	6
Πρόλογος.....	12
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	14
<b>1 Καρκίνος πνεύμονα(ΚΠ)</b> .....	15
<b>2 Αγγειογένεση</b> .....	17
2.1 Νεοπλασματική αγγειογένεση.....	25
2.1.1 Επαγωγείς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.....	30
2.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor –VEGF). ....	34
2.2.1 Ισομορφές του VEGF. ....	34
2.2.2 Οι υποδοχείς του VEGF.....	36
2.2.3 Ρόλος του VEGF στην καρκινική αγγειογένεση. ....	37
2.2.4 Λεμφαγγειογένεση.....	37
2.2.5 Ο VEGF στο καρκίνο του πνεύμονα .....	39
2.2.6 Θεραπευτικές παρεμβάσεις.....	42
<b>3 Το οξειδωτικό stress</b> .....	44
3.1.1 Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα.....	47
3.1.2 Παθοφυσιολογία του οξειδωτικού stress.....	48
3.1.3 Οξειδωτικό stress και καρκινογένεση.....	51
3.1.4 Οξειδωτικό stress και νεοπλασματική αγγειογένεση.....	53
3.1.5 Το οξειδωτικό stress στο ΚΠ. ....	53
3.1.5.1 Παράγωγα του οξειδωτικού stress στα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ.....	55
Πίνακας 2. Παράγωγα του οξειδωτικού stress στα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ. ....	56
3.1.5.2 Το οξειδωτικό stress και ΧΜΘ/ΑΚΘ.....	58
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	59
<b>4 ΥΛΙΚΟ</b> .....	60
<b>5 ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	62
5.1 Προσδιορισμός του OS.....	62
5.2 Προσδιορισμός του VEGF.....	62
5.3 Στατιστική ανάλυση.....	63
<b>6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	64
6.1 Οι τιμές του VEGF και του OS κατά την διάγνωση.....	64
6.2 Συσχέτιση του VEGF και του OS με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. ....	66
6.3 Συσχέτιση του VEGF με το OS κατά την διάγνωση. ....	70
6.4 Συσχέτιση του VEGF με το OS μετά τη ΧΜΘ.....	70
6.5 Σχέση VEGF και OS με την χορήγηση ΧΜΘ. ....	72
6.6 Σχέση του VEGF και του OS με την επιβίωση των ασθενών. ....	74
<b>7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	77
Τα επίπεδα του VEGF στο ΚΠ. ....	78
Τα επίπεδα του OS στο ΚΠ. ....	81
Η συσχέτιση του OS και του VEGF πριν και μετά τη ΧΜΘ.....	83
Συμπεράσματα και προοπτικές.....	84
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	86

<b>ABSTRACT</b> .....	88
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	90

## Συντομογραφίες

<b>ΚΠ</b>	καρκίνος πνεύμονα
<b>ΜΜΚΠ</b>	μη-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα.
<b>ΜΚΠ</b>	μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα.
<b>OS</b>	(oxidative stress): οξειδωτικό stress
<b>VEGF</b>	(vascular endothelial growth factor): ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας.
<b>VEGFR-1/VEGFR-2/VEGFR-3</b>	(vascular endothelial growth factor receptor-1,2,3): υποδοχέας (1,2,3) του ενδοθηλιακού αγγειακού αυξητικού παράγοντα.
<b>FGF-2</b>	(fibroblast growth factor-2): ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2
<b>SMCs</b>	(smooth muscular cells): λεία μυϊκά κύτταρα
<b>PDGF-B</b>	(Platelet -derived growth factor B): αυξητικός παράγοντα των αιμοπεταλίων B.
<b>Ang</b>	(angiopoietins): αγγειοποιητίνες.
<b>TGF-α/TGF-β</b>	(Transforming Growth Factor-α/β) αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α/β
<b>MAP κινάσες</b>	(Mitogen Activator Protein Kinases, MAPKs):
<b>PIGF</b>	(placenta growth factor): αυξητικός παράγοντας του πλακούντα.
<b>EPCs</b>	(Endothelial Progenitor Cells): προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα.
<b>HSCs</b>	(haematopoietic stem cells): αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.
<b>TSP-1</b>	(thrombospondin-1): γλυκοπρωτεΐνη θρομβοσποντίνη-1.
<b>ROS</b>	(Reactive Oxygen Species)
<b>RNS</b>	(Reactive Nitrogen Species)
<b>NFκB</b>	
<b>AP-1</b>	μεταγραφικός παράγοντας, σύμπλεγμα πρωτεϊνών (πρωτοογκογονίδια) c-fos, jun-c, jun-B, jun-D
<b>IL-8</b>	(interleukin 8): ιντερλευκίνη 8
<b>IL-2</b>	(interleukin 2): ιντερλευκίνη 2
<b>MMP's</b>	(metaloproteins), μεταλλο-πρωτεΐνασες του στρώματος.
<b>IGF-1,</b>	(insulin-like growth factor-I): παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας.
<b>EGFR</b>	(Epidermal growth factor): επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
<b>TNM στάδιο :</b>	T-χαρακτηρισμός του όγκου, N-λεμφαδενικές μεταστάσεις, M-απομακρυσμένες μεταστάσεις.
<b>PS</b>	(performance status): βιολογική κατάσταση.
<b>ΧΜΘ</b>	χημειοθεραπεία.
<b>ΑΚΘ</b>	ακτινοθεραπεία
<b>PCR</b>	(polymerase chain reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**Όνοματεπώνυμο:** Κατσαμπέκη-Κατσαφλή Αλεξάνδρα

**Ημερομηνία γεννήσεως:** 08 – 07 – 1976

**Τόπος γεννήσεως:** Τρίκαλα, Θεσσαλίας.

**Οικογενειακή κατάσταση:** Άγαμη

**Διεύθυνση κατοικίας:** Κωλέπτη 28, Τρίκαλα 42100.  
Τηλ.: 2431035927 / 6974451286.

**Διεύθυνση εργασίας:** Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο Νίκαιας,  
Πειραιάς  
Γ΄ Παθολογική Τηλ.: 213-2077272

**e-mail** alexandakk@yahoo.gr

**Μέση εκπαίδευση:** 3<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Τρικάλων 1994  
Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα (19<sup>3/11</sup>)

**Ξένες Γλώσσες:** Αγγλικά, Βουλγάρικα

### **ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ**

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής του Κρατικού Ιατρικού Ινστιτούτου Πλόβντιβ, Βουλγαρίας, 2001. Βαθμός Πτυχίου: Λίαν καλώς (7,65)

### **I. ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

**03/03/2003 - 02/03/2004:** Υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι Ραφάνης, Κ.Υ Γόννων, Νοσοκομείου Λάρισας.

**20/08/2007 – :** Ειδικευόμενη (συνέχιση ειδικότητας) 3<sup>ης</sup> Παθολογικής Κλινικής Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας Πειραιάς «Ο Άγιος Παντελεήμων».

### **II. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

1. 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 13-16/10/2003, Αλεξανδρούπολη.
2. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, 27-30/11/2003, Αθήνα.
3. 7<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος , Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, 29-31/10/2004
4. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2005» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 2-4/09/2005, Λίμνη Πλαστήρα, Καρδίτσα.
5. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, 26-30/04/2006, Κέρκυρα.
6. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2006» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 22-24/09/2006, Λάρισα.
7. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5/10/2006, Κρήτη.
8. 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Επιστημών Φροντίδας Χρονίων Πασχόντων, 16-19/10/2006, Λάρισα.
9. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος ,6-9/12/2007, Αθήνα.
10. 7<sup>ο</sup> Μετακπενευδικό Σεμινάριο στο Διαβήτη τύπου 2 με θέμα: "Διαβήτη τύπου 2 και Καρδιοαγγειακή Νόσος :από τη θεωρία στη πράξη", 24-25/11/ 2007, Αθήνα.
11. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-ERS, 10-13/05/2007, Κώς.
12. 17<sup>th</sup> ERS Annual Congress 15-19/09/2007, Stockholm
13. Εκπαιδευτικές ημερίδες Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας "Γ. Παπαδάκης", 11-15/02/2008, Αθήνα.
14. 34<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,20-24/05/ 2008, Αθήνα.
15. 1<sup>st</sup> European Lung Cancer Conference, ESMO, 23-26/04/2008, Geneva, Switzerland
16. Μετακπενευδικό Σεμινάριο με θέμα: "Διαγνωστική και Θεραπευτική Αντιμετώπιση της Καρδιοαγγειακής νόσου στα πλαίσια της Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας", Εκπαιδευτικές ημερίδες Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας "Γ. Παπαδάκης", 16-21/02/ 2009, Αθήνα

## **A. ΒΡΑΒΕΙΑ**

1. 2<sup>ο</sup> βραβείο καλύτερης επιστημονικής ανακοίνωσης με τίτλο: Προσδιορισμός του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Δαλαβέρης Ε, Κερενίδη Θ, **Κατσαμπέκη Α**, Τανού Κ, Κυρόπουλος Θ, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Κωστίκας Κ.16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.

## **Β. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

1. **Katsabeki-Katsafli A**, Kerenidi T, Kostikas K, Dalaveris E, Kiropoulos TS, Gogou E, Papaioannou AI, Gourgoulialis KI. Vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008, 60:271-6.
2. Dalaveris E, Kerenidi T, **Katsabeki-Katsafli A**, Kiropoulos T, Lada M, Tanou K, Gourgoulialis KI, Kostikas K. VEGF, TNF- $\alpha$  and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* (submitted).
3. Koutsokera A, Papaioannou A, Malli F, **Katsabeki A**, Kiropoulos T, Kerenidi T, Gourgoulialis KI, Daniil Z. Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther* (accepted) (I F: 2.56, (2008 2.283)

## **Γ. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΥΠΟ ΣΥΓΓΡΑΦΗ**

1. Kerenidi T, **Katsabeki-Katsafli A**, Κ Tsaroucha Α Gourgoulialis KI. Prognostic significance of oxidative stress in patients with lung cancer.

## **Δ. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ**



1. **Katsabeki A**, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, Dalaveris E, Gourgoulianis K. Vascular endothelial growth factor and oxidative stress in patients with primary lung cancer (e-poster discussion). *European Respiratory Journal* 2007, 30:51(Suppl.), 291-291
2. Dalaveris E, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, **Katsabeki A**, Gourgoulianis K Pretreatment levels of TNF- $\alpha$  in serum and exhaled breath condensate in patients with lung cancer (e-poster discussion). *European Respiratory Journal* 2007, 30:51(Suppl.), 292-292
3. Koutsokera A, Daniil Z., Papaioannou AI, Kiropoulos T, **Katsabeki A.**, Kerenidi T, Gourgoulianis KI. Oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis: the role of systemic corticosteroids. *European Respiratory Journal* 2007, 30:51(Suppl.), 110-110
4. **Katsabeki-Katsafli A**, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, Dalaveris E, Gourgoulianis KI. High pre-treatment serum levels of VEGF and oxidative stress in lung cancer patients and their clinical implications. (poster discussion). *Journal of Thoracic Oncology* 2008, 3:4(Suppl.1):43-43.
5. Dalaveris E, Kerenidi T, Kiropoulos T, **Katsabeki A**, Gourgoulianis K, Kostikas K. Pretreatment levels of VEGF and 8-isoprostane in exhaled breath condensate (EBC) and serum of lung cancer patients. *European Respiratory Journal* 2008, 32:52(Suppl.), 464-465.
6. Gogou E, Hatzoglou C, Chamos V, Kerenidi T, **Katsabeki A**, Dalaveris E, Gourgoulianis K, Molyvdas P A. Vitamin C decreases the permeability of sheep pleura. *European Respiratory Journal* 2008, 32:52(Suppl.), 531-531.

## **E. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. **Kerenidi T**, Katsampeki-Katsafli A, Kostikas K, Kiropoulos T, Dalaveris E, Gourgoulianis KI. High pre-treatment serum levels of

VEGF and oxidative stress in lung cancer patients. Postgraduate seminar on Lung cancer, 1-4/5/2008 Santorini

## **Z. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Ζαμανάκου Μ, Κερενίδη Θ, Νάκου Μ, Χέβας Α, **Κατσαμπέκη Α**, Κουκούλης Γ, Γουργουλιάνης Κ.Ι, Γερμενής Α.Ε. Έκφραση της 2,3 διοξυγονάση της ινδολεαμίνης (IDO) στον Καρκίνο του Πνεύμονα. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη
2. Δαλαβέρης Ε, Κερενίδη Θ, **Κατσαμπέκη Α**, Τανού Κ, Κυρόπουλος Θ, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Κωστίκας Κ. Προσδιορισμός του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα
3. Γώγου Ε, Κερενίδη Θ, Χάμος Β, **Κατσαμπέκη Α**, Δαλαβέρης Ε, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Περιπτώσεις ασθενών με μεσοθηλίωμα στην πνευμονολογική κλινική του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το 2001 ως το 2005. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
4. Γώγου Ε, Κερενίδη Θ, Χάμος Β, **Κατσαμπέκη Α**, Δαλαβέρης Ε, Ζιντζαράς Η, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Επιδημιολογία του μεσοθηλιώματος στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1983-2003. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
5. **Κατσαμπέκη Α**, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Δαλαβέρης Ε, Παπαιωάννου Α, Γώγου Ε, Κυρόπουλος Θ, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκινό πνεύμονα: Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
6. Κερενίδη Θ, **Κατσαμπέκη Α**, Δαλαβέρης Ε, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Διαμόρφωση της καπνιστικής συνήθειας ασθενών με καρκίνο πνεύμονα κατά την διάγνωση της νόσου. 1<sup>ο</sup>

Συνέδριο Επιστημόνων Φροντίδας Χρόνιων Πασχόντων, 16-19/11/2006 Λάρισα.

7. **Κατσαμπέκη Α**, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Κυρόπουλος Θ, Δαλαβέρης Ε, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Ο αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και το οξειδωτικό stress σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα », 10-13 /05/2007 Κως.
8. Δαλαβέρης Ε, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Κυρόπουλος Θ, **Κατσαμπέκη Α**, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Μέτρηση TNF-α και VEGF στον εκπνεόμενο αέρα και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα», 10-13 /05/2007 Κως.
9. Παπαϊωάννου Α, Παπαγεωργίου Ε, **Κατσαμπέκη Α**, Κυρόπουλος Θ, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Γουργουλιάνης ΚΙ. Επίπεδα οξειδωτικού stress στον ορό και το πλευριτικό υγρό ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο του πνεύμονα και κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
10. Γώγου Ε, Χατζόγλου Χ, Χάμος Β, Κερενίδη Θ, **Κατσαμπέκη Α**, Δαλαβέρης Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Μεταβολή της διαπερατότητας υπεζωκότα προβάτου με τη δράση του ασκορβικού οξέως και της κουερσετίνης. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
11. **Κατσαμπέκη Α**, Κερενίδη Θ, Τσαρούχα Α, Δαλαβέρης Ε, Κωστίκας Κ, Γουργουλιάνης Κ. Η προγνωστική αξία του οξειδωτικού στρες στον καρκίνο του πνεύμονα. 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23/11/2008 Αλεξανδρούπολη

## Πρόλογος

Πολλές μελέτες *in vitro* και *in vivo*, τόσο στο ΚΠ όσο και σε άλλους καρκίνους, έχουν διαπιστώσει την σημαντική επαγωγή του VEGF από το OS στην νεοπλασματική αγγειογένεση, χωρίς όμως οι μηχανισμοί να είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Στις μελέτες αυτές υποδεικνύεται η επαγωγή του VEGF ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγής των ROS. Τα αυξημένα όμως επίπεδα ROS είναι αποτέλεσμα διαταραχής του ισοζυγίου μεταξύ των παραγόμενων επιπέδων ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων, συνεπώς του OS. Επίσης υποδεικνύεται η ρύθμιση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και παράγοντες ρύθμισης της κυτταρικής απόπτωσης (NF-κB, bcl-2, p53), η επαγωγή των οποίων ρυθμίζεται επίσης από τα επίπεδα του OS. Υπογραμμίζεται δε, και η επαγωγή πολλών αγγειογενετικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων του VEGF από τα επίπεδα του OS.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να προσδιοριστούν τα επίπεδα του OS και του VEGF στον καρκίνο του πνεύμονα και να διερευνηθεί η μεταξύ τους σχέση σε κλινικό επίπεδο. Οι μέχρι τώρα μελέτες διαπιστώνουν τον σημαντικό ρόλο του OS και του VEGF στην νεοπλασματική αγγειογένεση χωρίς όμως να διερευνούν τη πιθανή μεταξύ τους συσχέτιση. Επίσης στους στόχους της μελέτης ήταν και η συσχέτιση του OS και του VEGF με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους και τέλος η διερεύνηση της προβλεπτικής και προγνωστικής τους αξία στο ΚΠ.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας και σε υλικό ασθενών της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα πρέπει τυπικά να ακολουθήσουν οι ευχαριστίες οι οποίες όμως για μένα είναι ουσιαστικές. Στον επιβλέποντα τη διδακτορική μου διατριβή, σεβαστό μου Καθηγητή Πνευμονολογίας, Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για την πολύτιμη βοήθεια του, την καθοδήγηση του και τις συμβουλές του καθ' όλη την πορεία της μελέτης. Ο Καθηγητής μου αποτέλεσε και θα αποτελεί το δάσκαλο μου, όχι μόνο στο τρόπο ιατρικής σκέψης και άσκησης της ιατρικής αλλά και στην

στάση του ως άνθρωπος και επιστήμονας. Κοντά του έμαθα την αξία της έρευνας, να αγωνίζομαι παρά τις όποιες αντιξοότητες και να πιστεύω στις ικανότητες μου. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αποτελεί λόγο για να συνεχίσω να αγωνίζομαι. Τις θερμές ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους εκφράζω επίσης, στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τους Καθηγητές Παθολογίας κκ. Ν Σταθάκη και Κ.Νταλέκο.

Η διδακτορική μου διατριβή έγινε η αφορμή να γνωρίσω και να συνεργαστώ με την επιμελήτρια Πνευμονολογίας κ. Θεοδώρα Κερενίδη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς, όχι μόνο για τον καθοριστικό ρόλο της στη διεξαγωγή της μελέτης, αλλά και για την πραγματική της φιλία. Η στάση της ως επιστήμονα και ως ανθρώπου θα με ακολουθούν για πάντα.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω, επίσης, και στους συναδέλφους που συνεργάστηκαν σε αυτή τη μελέτη: τον κ. Κ. Κωστίκα από το Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, τον κ. Θ. Κυρόπουλο και τις κκ. Ε.Τσιλιώνη και Σ. Οικονομίδη από το Βιοχημικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και τους συνεργάτες κ. Ε. Δαλαβέρη, κ. Ε. Παπαγεωργίου, κ. Ε. Γώγου και κ. Α. Παπαϊωάννου.

Δεν θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω τη συνδρομή της πολύ καλής μου φίλης και συναδέλφου κ. Ε. Μαραγκούλη η οποία ήταν η αφορμή να γνωρίσω την Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Η εμπιστοσύνη της και η φιλία της ήταν ουσιαστικές στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Ειλικρινές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και στους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη, οι οποίοι παρά τις δυσκολίες που αντιμετώπιζαν καθημερινά λόγω της νόσου δεν αρνήθηκαν την αμέριστη βοήθεια τους στην πραγμάτωση της προσπάθειας μου.

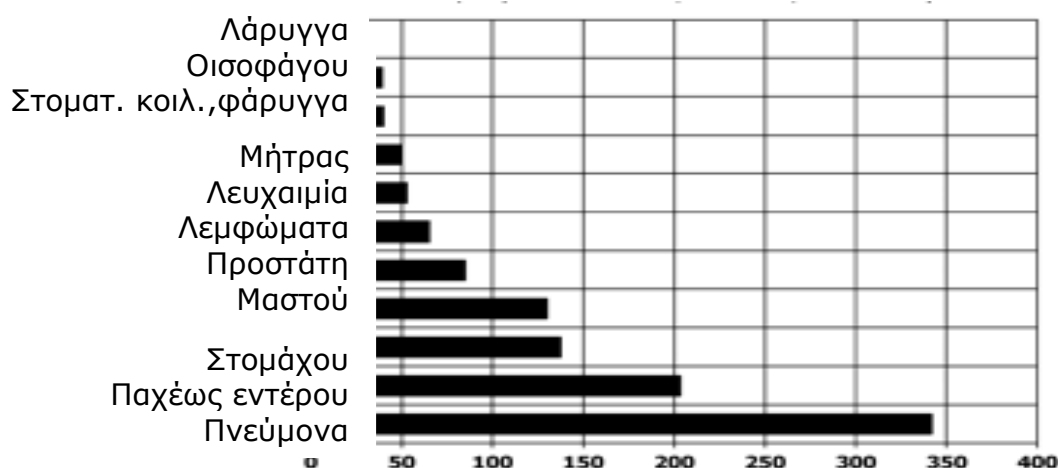
Τελειώνοντας θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, τον αδερφό μου και τη νύφη μου για την ουσιαστική τους υποστήριξη και βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση τους, η ιατρική θα αποτελούσε ένα απραγματοποίητο όνειρο για εμένα. Είναι οι άνθρωποι για τους οποίους θέλω πραγματικά να αγωνίζομαι και να γίνομαι καλύτερη ως άνθρωπος και ιατρός.

## ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---

## 1 Καρκίνος πνεύμονα(ΚΠ)

Στο δυτικό κόσμο, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου στους άνδρες ( 178.400 θάνατοι το 2004 , 23,7% των θανάτων από καρκίνο), ενώ στις γυναίκες έρχεται στη τρίτη θέση μετά το καρκίνο του μαστού και του παχέως εντέρου (55.900 θάνατοι το 2004, 11% των θανάτων από καρκίνο) (1). Παγκοσμίως αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δυο φύλα (2). Το 2002 παρουσιάστηκαν 1.352.100 νέες περιπτώσεις ΚΠ παγκοσμίως , ενώ στην Ευρώπη το 2004 αναφέρθηκαν 341.800 θάνατοι από ΚΠ (20% των θανάτων από καρκίνο) (Εικόνα 1) και 381.500 νέες περιπτώσεις (13.2% των νέων περιπτώσεων καρκίνου)



**Εικόνα 1.** Αριθμός θανάτων σε χιλιάδες από διάφορους τύπους καρκίνου στην Ευρώπη το 2004. Ο καρκίνος του πνεύμονα βρίσκεται στην πρώτη θέση με 341.800 θανάτους .

Το κάπνισμα τσιγάρων είναι αναμφίβολα ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας (90% του ΚΠ αποδίδεται στο κάπνισμα και ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξής του σε έναν καπνιστή είναι 10 – 30 φορές μεγαλύτερος από ότι σε έναν μη καπνιστή). Άλλοι παράγοντες που φαίνεται να συσχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα είναι (3, 4):

- επαγγελματική έκθεση σε διάφορα υλικά (πίσσα, αιθάλη και μέταλλα όπως αρσενικό και χρώμιο),

- έκθεση σε οικοδομικά υλικά (άλατα πυριτίου και αμίαντο)
- ακτινοβολία (ραδόνιο, ακτίνες-Χ και ακτίνες γάμμα)
- ατμοσφαιρική ρύπανση (λόγω κυκλοφορίας - κυρίως λόγω των καυσαερίων από τις εξατμίσεις μηχανών ντίζελ και άλλων καρκινογόνων που μεταφέρονται με τον αέρα)
- ρύπανση εσωτερικών χώρων (που προκαλείται από τις καύσεις για θέρμανση και μαγείρεμα και είναι ιδιαίτερα σημαντική στις φτωχότερες χώρες).

Ο ΚΠ διακρίνεται σε δυο τύπους: α. μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (75-80%) ο οποίος περιλαμβάνει τρεις ιστολογικούς τύπους: αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες και μεγαλοκυτταρικό και β. σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (15-20%) (5). Η διάγνωση του ΚΠ τίθεται με κυτταρολογική/ιστολογική επιβεβαίωση, δυστυχώς στις περισσότερες περιπτώσεις σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Η σταδιοποίηση της νόσου περιλαμβάνει: ακτινογραφία θώρακος, βρογχοσκόπηση, αξονική τομογραφία θώρακος, κοιλιάς, εγκεφάλου και σπινθηρογράφημα οστών. Μεσοθωρακοσκόπηση διενεργείται μονό όταν υπάρχουν κλινικές ενδείξεις (6).

Η θεραπεία του ΚΠ περιλαμβάνει τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία καθώς και το συνδυασμό τους. Αν και ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένας από τους πιο κοινούς συμπαγείς όγκους, είναι δύσκολο να διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο. Είναι φυσιολογικό, οι ασθενείς με συμπτώματα να επισκέπτονται για πρώτη φορά την κλινική σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μειωμένες θεραπευτικές επιλογές και κακή πρόγνωση. Η θεραπεία στο ΚΠ παραμένει μη ικανοποιητική καθώς η 5ετής επιβίωση επιτυγχάνεται μόλις στο 10-15%. Σε πρώιμο στάδιο νόσου, η χειρουργική εξαίρεση του όγκου προσδίδει ριζική θεραπεία μονό στο 25% των ασθενών από τους οποίους μονό το 50% παραμένει ελεύθερο νόσου για 5 χρόνια.

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται μεγάλη προσπάθεια μελέτης σε μοριακό επίπεδο, της έκφρασης διαφόρων παραγόντων (ογκογονίδια, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, αγγειογενετικοί παράγοντες κ.ά.) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση και ανάπτυξη του όγκου. Η



αξιολόγηση της διαγνωστικής και προγνωστικής τους αξίας, μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες με κλινικό όφελος. Επίσης, η προσπάθεια ταυτοποίησης του μοριακού συνδυασμού του όγκου, μπορεί να αναδείξει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, με σκοπό την εξατομικευμένη προσέγγιση των ασθενών, ελπίζοντας σε ουσιαστικότερη θεραπευτική παρέμβαση (7).

Τέλος, στις μέρες μας διαδραματίζεται σημαντική έρευνα για την κατανόηση του ρόλου της νεοπλασματικής αγγειογένεσης και της συμμετοχής της στα πολύπλοκα μονοπάτια της ογκογένεσης, σε μια προσπάθεια ανάδειξης κάποιας αποτελεσματικής αντιαγγειογενετικής θεραπευτικής παρέμβασης

## 2 Αγγειογένεση

Κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης τα αγγεία αναπτύσσονται μέσω δύο διαδικασιών, της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis) και της αγγειογένεσης. Η αγγειακή διαφοροποίηση περιλαμβάνει την *de novo* διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από αρχέγονα κύτταρα του μεσοδέρματος. Αγγειογένεση καλείται η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα.

Νέα αγγεία μπορούν να προκύψουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη από το άωρο αγγειακό πλέγμα της αγγειακής διαφοροποίησης. Κατά την αγγειακή διαφοροποίηση ο σχηματισμός νέων αγγείων στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εντοπίζεται στο λεκιθικό ασκό ως εστιακές συναθροίσεις μεσεγγυματικών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως αιματικές νησίδες (blood islands). Πολλές μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι τα αρχέγονα κύτταρα των ενδοθηλιακών και αιματοποιητικών κυττάρων έχουν κοινή προέλευση τους αιμαγγειοβλάστες. Τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των αιμαγγειοβλαστών γίνονται μέσα στις αιματικές νησίδες και τα κύτταρα που βρίσκονται στην περίμετρο αυτών δημιουργούν τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλάστες), ενώ αυτά που βρίσκονται στο κέντρο αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα των αιμοποιητικών κυττάρων (Εικόνα 2).

Οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την τύχη των αιμαγγειοβλαστών δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά πολλοί παράγοντες έχουν βρεθεί που επηρεάζουν τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης (8). Ανάμεσα σε αυτούς, είναι πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας GATA, βασικοί παράγοντες έλικας-θηλειάς-έλικας (basic helix-loop-helix, bHLH) και οι πρωτεΐνες Id (inhibitors of differentiation) (9, 10). Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) επάγουν την δημιουργία αγγειοβλαστών από το μεσόδερμα (11). Επιπλέον, οι αγγειοβλάστες εκφράζουν τον υποδοχέα 2 του ενδοθηλιακού αγγειακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) και πολλαπλασιάζονται σε ανταπόκριση του αυξητικού αγγειακού παράγοντα VEGF (Εικόνα 1). Το άωρο αγγειακό πλέγμα, το οποίο προέρχεται από την αγγειακή διαφοροποίηση, προκειμένου να ανταποκριθεί στις ανάγκες των αναπτυσσόμενων ιστών του εμβρύου, υφίσταται συνεχή αγγειογενετική αναδιαμόρφωση. Κατ' αυτή, δημιουργούνται καινούργια αγγεία με διαδικασίες όπως η εκβλάστηση, η γεφυροποίηση και ο εγκολεασμός, αλλά επίσης και υποστροφή εκεί όπου τα αγγεία υπερεπαρκούν ή δεν χρειάζονται πλέον.

Παράλληλα με την αγγειογενετική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος, τα αγγεία πρέπει να γίνουν λειτουργικά και το τοίχωμά τους να ωριμάσει με την προσέλκυση μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε περιενδοθηλιακά κύτταρα (περικύτταρα στο επίπεδο των τριχοειδών και λεία μυϊκά κύτταρα στο επίπεδο των αρτηριδίων και αρτηριών). Η διαδικασία αυτή καλείται αγγειακή μυογένεση και είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs) των αγγείων σταθεροποιούν τα νέα αγγεία και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (12). Τα περιενδοθηλιακά κύτταρα με μια ποικιλία αγγειοδραστικών πεπτιδίων, και κυτταροκινών που εκκρίνουν, αλλά και με την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξασφαλίζουν σταθεροποίηση, στεγανοποίηση και ρύθμιση του τόνου των αγγείων. Η πρόελευση των κυττάρων αυτών είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από την θέση τους μέσα στο έμβρυο (13).

Τα SMCs μπορούν να διαφοροποιηθούν από ενδοθηλιακά κύτταρα όπως γίνεται στα πρώτα νεοσχηματιζόμενα αγγεία του εμβρύου (13), από μεσεγχυματικά κύτταρα, από πρόγονα κύτταρα του μυελού του οστού ή από μακροφάγα. Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε ένας κοινός πρόγονος των κυττάρων που διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε ανταπόκριση στον αυξητικό παράγοντα VEGF ή σε SMCs σε ανταπόκριση στον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων B (Platelet-derived growth factor B, PDGF-B) (14). Η προσέλκυση των περιενδοθηλιακών κυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων γίνεται από διάφορους παράγοντες. Ο παράγοντας PDGF-B έχει δείξει ότι παίζει ρόλο χημειοτακτικό (chemoattractant) για τα κύτταρα που απαρτίζουν τα τοιχώματα των αγγείων, ενώ ο παράγοντας VEGF μέσω της σύνδεσης του με τους VEGF υποδοχείς επίσης συνεισφέρει σε αυτή την διαδικασία (15). Η απουσία είτε του παράγοντα PDGF-B είτε του υποδοχέα οδηγεί στην αιμορραγία των αγγείων, αποτέλεσμα της μειωμένης κάλυψης με περικύτταρα (16, 17).

Επίσης, οι αγγειοποιητίνες (angiopoietins, Ang) καθώς και οι υποδοχείς Tie έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ωρίμανση των αγγείων. Οι αγγειοποιητίνες (Ang1 και Ang2) που προσδένονται στους υποδοχείς Tie με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης, εκφράζονται στο αγγειακό ενδοθήλιο όπως και οι υποδοχείς του VEGF (18, 19). Η σύνδεση της Ang1 με τον υποδοχέα της Tie2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων, όπως ο PDGF-B, οι οποίοι προσελκύουν μεσεγχυματικά κύτταρα. Επιπλέον, υπερέκφραση της Ang1 καθιστά τα αγγεία ανθεκτικά στις ρωγμές (20). Επίσης, οι παραπάνω μελέτες έχουν δείξει ότι η Ang1 σταθεροποιεί τα αγγεία επηρεάζοντας μόρια σύνδεσης και προάγοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων που υποστηρίζουν το αγγείο. Η Ang2 φαίνεται να έχει αντίθετη δράση από αυτή της Ang1. Υπερέκφραση της Ang2 στο ενδοθήλιο του εμβρύου οδηγεί στην θνησιμότητα του εμβρύου και οι ανωμαλίες που παρουσιάζονται είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται κατά τη απουσία έκφρασης της Ang1 ή του υποδοχέα Tie2 (21). Στον ενήλικα οργανισμό η Ang2 επάγεται στο ενδοθήλιο των αγγείων που βρίσκονται υπό ενεργή διαμόρφωση όπως στην εκβλάστηση ή την αποστροφή των αγγείων στις ωοθήκες (21, 22).

Ο ρόλος λοιπόν της Ang2 είναι η αποσταθεροποίηση των αγγείων επιτρέποντας είτε την υποστροφή των αγγείων (regression) στις περιπτώσεις απουσίας αυξητικού παράγοντα είτε τις αγγειογενετικές αλλαγές που επάγονται από αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο VEGF. Κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής η σύνδεση της Ang1 με τον υποδοχέα Tie2 είναι απαραίτητη για την διατήρηση του εφησυχάζοντος αγγειακού συστήματος, υποδεικνύοντας ότι η ισορροπία μεταξύ Ang1 και Ang2 σημάτων πρέπει να είναι ακριβής για την σωστή λειτουργία του αγγειακού συστήματος.

Μέλη της οικογένειας TGF-β (Transforming Growth Factor-β), περιλαμβανομένου του TGF-β1, παίζουν επίσης ρόλο στην ωρίμανση των αγγείων με το να ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα και την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 2).

Όπως προαναφέρθηκε η μετέπειτα αύξηση, επέκταση και αγγειακή αναδιαμόρφωση του αρχικού δικτύου γίνεται με την διαδικασία της αγγειογένεσης. Στους ενήλικες οργανισμούς, η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα από ήδη ώριμα αγγεία, είτε αυτή είναι φυσιολογική (επανόρθωση ιστών, αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας), είτε παθολογική (αγγειογενετικές νόσοι περιλαμβανομένων και αυτών του οφθαλμού, καρκινογένεση). Τα νέα αγγεία στο ενήλικο άτομο σχηματίζονται με εκβλάστηση (sprouting), με δημιουργία γεφυρών ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα (bridging) και με διχοτόμηση ή ενδίπλωση (intussuseption). Ο μηχανισμός που έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα είναι η αγγειογένεση με εκβλάστηση, η οποία ρυθμίζεται από ειδικούς αγγειακούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο VEGF, οι αγγειοποιητίνες Ang-1 και Ang-2 και οι εφρίνες (ephrin-B1/B2).

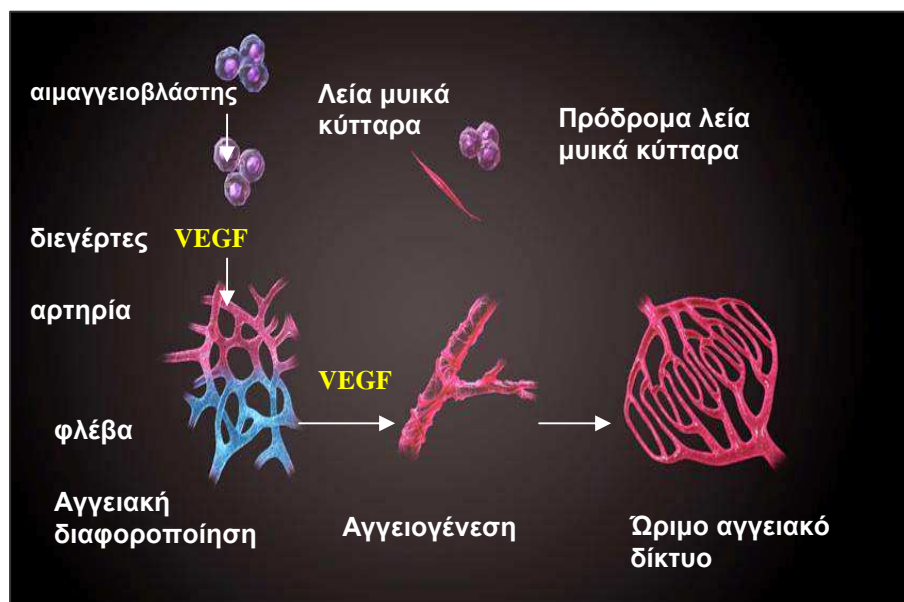
Κατά την αγγειογένεση με εκβλάστηση, αγγειογενετικοί παράγοντες δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενεργοποιούν μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσα στο κύτταρο, όπως π.χ. η ενεργοποίηση των MAP κινασών (Mitogen Activator Protein Kinases, MAPKs), με τελικό στόχο την τροποποιημένη έκφραση γονιδίων. Στη συνέχεια, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες αποικοδομούν το εξωκυτταρικό υλικό,

επιτρέποντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα να μεταναστεύσουν από το τοίχωμα των προϋπαρχόντων αγγείων και να πολλαπλασιαστούν. Στην επιφάνεια των αγγείων υπάρχουν μόρια προσκόλλησης, τα οποία συμμετέχουν και διευκολύνουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ3 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγεται από παράγοντες που διεγείρουν την αγγειογενετική διαδικασία και διευκολύνει τη μετανάστευση και προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο εξωκυτταρικό υλικό. Μετά τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι αγγειοποιητίνες δεσμεύονται στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, Tie 1/2, οι οποίοι εκφράζονται αποκλειστικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Με το τρόπο αυτό ενεργοποιούν την αλληλεπίδραση ενδοθηλιακών και περιενδοθηλιακών κυττάρων και έτσι σταθεροποιούν τη δομή των νεοσχηματισμένων πρώιμων αγγείων (23). Συγκεκριμένα τα πρώιμα αγγεία αναδιαρθρώνονται με την προσέλκυση μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία με την επίδραση του PDGF, που εκφράζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαφοροποιούνται σε περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα περικύτταρα (στο επίπεδο των τριχοειδών) και τα λεία μυϊκά (στο επίπεδο των αρτηριδίων) επενδύουν εξωτερικά τον αγγειακό αυλό, προστατεύοντας έτσι τα αγγεία από μεταβολές στην παροχή οξυγόνου ή στο ορμονικό ισοζύγιο (Εικόνα 2). Η διατήρηση των νέων αγγείων εξαρτάται από την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία σε φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να επιβιώσουν για αρκετά χρόνια (9, 24)

Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να παραχθούν όχι μόνο από την διαίρεση των προϋπαρχόντων διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και από την εισροή αρχέγονων ενδοθηλιακών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται μερικές φορές με τον όρο συστηματική αγγειογένεση (25).

Η αγγειογένεση υπόκειται σε αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης και συντονισμού ώστε η παραγωγή νέων τριχοειδών αγγείων να σταματήσει όταν εκπληρωθεί ο σκοπός για τον οποίο προκλήθηκε. Η απώλεια μηχανισμών ρύθμισης της αγγειογένεσης έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή του ελέγχου και του συντονισμού της παραγωγής διεγερτών και αναστολέων της αγγειογένεσης. Επομένως, η ακριβής ισορροπία μεταξύ

των διεγερτών και των αναστολέων της αγγειογένεσης είναι απαραίτητη για την διατήρηση του εφesusχάζοντος αγγειακού δικτύου και την φυσιολογική λειτουργία των ιστών.



**Εικόνα 2. Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση.** Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (αγγειοβλάστες) οργανώνονται σε ένα αρχικό δίκτυο (αγγειακή διαφοροποίηση) που στην συνέχεια επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται (αγγειογένεση). Λεία μυϊκά κύτταρα σταθεροποιούν τα νέα αγγεία για την δημιουργία του ώριμου αγγειακού δικτύου (9, 24).

Πολλοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί οι οποίοι είτε αναστέλλουν είτε επάγουν την αγγειογένεση. Ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) ανακαλύφθηκε για την ικανότητά του να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα (26) ενώ αργότερα χαρακτηρίστηκε ως από τους πιο ισχυρούς επαγωγείς της αγγειογένεσης. Η οικογένεια VEGF αποτελείται από έξι μέλη: VEGF-A (ο αρχικός παράγοντας που χαρακτηρίστηκε), ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (placenta growth factor, PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E. Επιπλέον, εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο VEGF-A έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και άλλων ισομορφών που διαφέρουν στον τελικό αριθμό αμινοξέων. Οι βιολογικές δράσεις των VEGFs πραγματοποιούνται μέσω

ειδικών κυτταρικών υποδοχέων VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3. Οι VEGFR-1 και VEGFR-2 εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα. (27). Ο VEGF-A δρα τόσο τοπικά ενεργοποιώντας τα ήδη υπάρχοντα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμμετέχοντας στον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την προστασία τους από την απόπτωση αλλά και συστηματικά κινητοποιώντας αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα από τον μυελό των οστών.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κυκλοφορόντα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) προσελκύονται και ενσωματώνονται σε σημεία όπου διαδραματίζεται ενεργή νεοαγγείωση, όπως για παράδειγμα στις ισχαιμίες του μυοκαρδίου (28), αλλά και στον καρκίνο (25). Τα EPCs αρχικά χαρακτηρίστηκαν και απομονώθηκαν με βάση την έκφραση των αντιγόνων VEGFR-2 και CD34 που είναι και κλασικοί δείκτες των αγγειοβλαστών (29). Η πλειοψηφία των EPC βρίσκεται στον μυελό των οστών σε στενή σύνδεση με τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (haematopoietic stem cells, HSCs) και το στρώμα του μυελού των οστών. Πολλές πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα του στρώματος μπορεί να συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό και στην μετακίνηση των EPC μέσα από το φράγμα μυελού των οστών και αίματος. Σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των EPC (τα οποία εκφράζουν το VEGFR-2) και των HSC (τα οποία εκφράζουν το VEGFR-1) παίζει η παραγωγή VEGF .

Η IL-8 αποτελεί ακόμη ένα αγγειογενετικό παράγοντα ο οποίος παράγεται σε υψηλά επίπεδα στα μονοκύτταρα και μακροφάγα (30). Η IL-8 επάγει την κυτταρική μετακίνηση των ανθρώπινων ομφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων, (31) και την μορφογένεση του αυλού των αγγείων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. (32).

Στους αναστολείς της αγγειογένεσης συγκαταλέγονται η ιντερφερόνη-α, ο παράγοντας αιμοπεταλίων-4, η αγγειοστατίνη, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως τμήμα του πλασμινογόνου και αναστέλλει την μετανάστευση και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (33-35), η ενδοστατίνη με παρόμοια δράση με αυτή της αγγειοστατίνης, (αποτελεί τμήμα του κολλαγόνου XVIII (36) και τέλος ένας από τους κυριότερους αναστολείς η γλυκοπρωτεΐνη θρομβοσποντίνη-1 (thrombospondin-1, TSP-

1) Τα επίπεδα έκφρασης της TSP-1 είναι υψηλά σε φυσιολογικά κύτταρα, ενώ έχει δειχτεί ότι η TSP-1 ρυθμίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (37). Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των αναστολέων ή η αύξηση των διεγερτών έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της ισορροπίας και την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης. Στο φυσιολογικά αγγειακό δίκτυο μπορεί να ενεργοποιηθεί η αγγειογένεση μέσω της αλλαγής της ισορροπίας μεταξύ αναστολέων και διεγερτών.

Σημαντικός είναι και ο ρόλος του οξειδωτικού stress (OS) στην αγγειογένεση κυρίως μέσω της επαγωγής του VEGF μέσω διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Το οξειδωτικό stress είναι η σοβαρή διαταραχή ισοζυγίου μεταξύ ελευθέρων ριζών (ROS-Reactive Oxygen Spesies, RNS-Reactive Nitrogen Spesies) και αντιοξειδωτικών παραγώγων, στο οποίο θα αναφερθούμε αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο. Ο σημαντικός ρόλος των ROS στην αγγειογένεση φαίνεται σε πολλές μελέτες. Η έλλειψη του EGB-761, αντιοξειδωτικού παράγοντα εξαγόμενου από gingo δίλοβα φύλλα, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την λεμφοκυτταρική αγγειογένεση (38). Επιπλέον ο σημαντικός ρόλος των ROS στην αγγειογένεση ενισχύεται και από μελέτες οι οποίες δείχνουν την αναστολή της μονοκυτταρικής ή μακροφαγοκυτταρικής δραστηριότητας από αντιοξειδωτικούς παράγοντες (39). Πρόσφατη μελέτη έδειξε την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση της αγγειογένεσης μέσω των ROS γεγονός που ενισχύει τον σημαντικό ρόλο των ROS στην αγγειογένεσης (38).

Επιπλέον το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει τους μεταγραφικούς παράγοντες: NFκB (40), AP-1 (41), T-cell serum response factor (42), οι οποίοι προάγουν την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση. Έτσι, το οξειδωτικό stress ενεργοποιεί τον οξειδοαναγωγικά ρυθμιζόμενο μεταγραφικό παράγοντα NFκB. Μελέτες έδειξαν την άμεση ενοχοποίηση των ROS μέσω του NFκB στην αγγειογένεση του μυοκαρδίου (in vivo). Ο NFκB ενεργοποιεί την IL-2 η οποία επάγει τους αυξητικούς παράγοντες πολλαπλασιασμού των λεμφοκυτταρικών και μυελικών κυττάρων (43, 44). Η έκφραση του AP-1(c-fos και c-jun) φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά εξαιτίας του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, όπου c-jun ήταν εν μέρει συνδεδεμένο με την H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ενεργοποίηση της αγγειογένεσης σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει επίσης βρεθεί η



H202 ενεργοποίηση της IL-8 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων σε βαθμό ικανό να προάγει την αγγειογένεση (45). Η IL-8 έχει την ίδια αγγειογενετική δράση όπως ο TNF, bFGF, angiogenin, angiotropin και VEGF (31).

Σημαντική είναι και η ενεργοποίηση των Ang-1, Ang-2 σε συνθήκες υποξίας οι οποίες προάγουν την ωρίμανση των νέων αγγείων (46). Η Ang-2 προκαλεί λύση της περικυττάριας ουσίας και δημιουργεί περιβάλλον κατάλληλο για μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων και τριχοειδική επέκταση.

Η υποξία έχει βρεθεί ότι αποτελεί το κύριο παράγοντα ενεργοποίησης (in vivo και in vitro) του VEGF μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών (47, 48). Η ιστική υποξία προκαλεί έναρξη της αγγειογένεσης κυρίως μέσω του VEGF. Ο VEGF ενεργοποιεί μονοπάτια επιβίωσης, πολλαπλασιασμού, μετακίνησης και διαφοροποίησης αρχέγονων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Η in vivo πρόκληση αγγειογενετική απάντηση στην υποξία σε μυοκάρδιο ποντικίου (49) φαίνεται να ενεργοποιείται όχι μόνο μέσω της επαγωγής του VEGF αλλά και των υποδοχέων του Flt-1 και Flk-1 και της ανταγωνιστικής δράσης των Ang-1, Ang-2, Tie-1 και Tie-2. Η απορρύθμιση του VEGF, Flt-1 και Flk-1 (υποδοχείς του ) από την υποξία έχει αποδειχθεί in vitro και in vivo (50-53), εντούτοις υπάρχουν και αντίθετες μελέτες για το Flk-1 (in vitro) οι οποίες ενέχουν έναν άλλο παράγοντα αδενοσίνης ο οποίος λειτουργεί σαν παρακρινικός μεσολαβητής μέσω του A2 υποδοχέα (54, 55).

## **2.1 Νεοπλασματική αγγειογένεση.**

Η αγγειογένεση είναι μια κεφαλιώδους σημασίας διεργασία στην πορεία της ογκογένεσης. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η ανάπτυξη των όγκων εξαρτάται από την δημιουργία νέων τριχοειδών. Οι περισσότεροι όγκοι προέρχονται από μικρές μη αγγειωμένες μάζες που στην συνέχεια επάγουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό νέων αγγείων όταν η διάμετρος του όγκου ξεπεράσει το μέγεθος των 2 mm<sup>3</sup>. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι όγκοι δεν προέρχονται μόνο από μη αγγειωμένες μάζες. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να

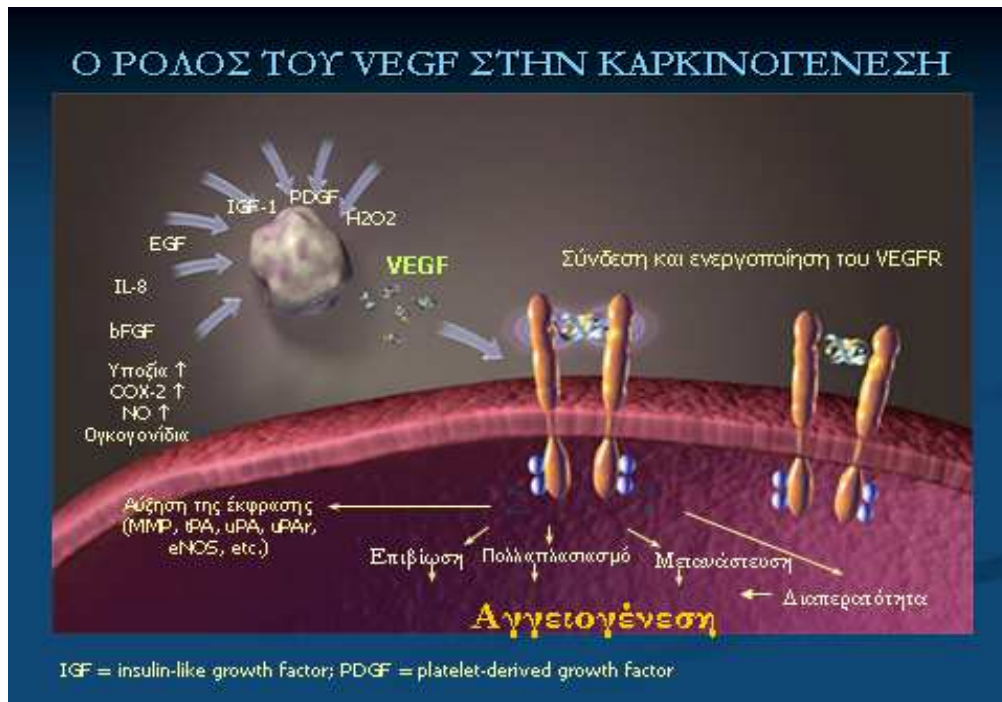
εκμεταλλεύονται την ύπαρξη ήδη προϋπαρχόντων αγγείων (co-option) για να ξεκινήσουν την δημιουργία ενός καλά αγγειωμένου όγκου. Η αμυντική ανταπόκριση των αρχικών αγγείων σε αυτή την διαδικασία είναι η υποστροφή (regression) των αγγείων με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μη αγγειωμένου όγκου. Οι όγκοι που θα καταφέρουν να αναπτυχθούν είναι αυτοί που θα έχουν ξεπεράσει την διαδικασία υποστροφής των αγγείων επάγοντας εκ νέου την αγγειογένεση.

Όταν η κυτταρική μάζα αυξάνει είτε από υπερπλασία είτε από υπερτροφία, το τοπικό μικροπεριβάλλον αλλάζει με ποικίλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου. Η μεταφορά του οξυγόνου μειώνεται σαν αποτέλεσμα της αύξησης των αποστάσεων διάχυσης μεταξύ των τριχοειδών και του κέντρου απ' όπου αυξάνεται η κυτταρική μάζα. Έτσι, η ανάπτυξη του πρώιμου καρκίνου σε μέγεθος οδηγεί σε ελάττωση της προσφοράς οξυγόνου στα κύτταρα που απέχουν πάνω από τα 150-200μm από τα πλησιέστερα τριχοειδή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή παροχή σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο (56). Η περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου καθίσταται εφικτή μόνο όταν ανοίξει ο διακόπτης της αγγειογένεσης. Ο "αγγειογενετικός διακόπτης" είναι "κλειστός" όταν τα προαγγειογενετικά μόρια είναι σε ισορροπία με τα αντιαγγειογενετικά, και είναι "ανοικτός" όταν η ισορροπία ευνοεί την αγγειογένεση (υπερπαραγωγή VEGF και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων) (57).

Η νεοπλασματική αγγειογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού νεόπλαστων αγγείων από ήδη υπάρχοντα αγγεία (co-option) ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (58, 59). Ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την αγγειογένεση είναι η υποξία. Μέσω ενός μηχανισμού γονιδιακής έκφρασης που σημαντικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη Von-Hippel Lindau (VHL) στα υποξικά καρκινικά κύτταρα αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor) που οδηγεί σε μεταγραφική υπερέκφραση πολλών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων επάγουν την αγγειογένεση. Ο σημαντικότερος και καλύτερα μελετημένος είναι ο VEGF-A, ενώ δεν μπορεί να αγνοηθεί ο ρόλος δεκάδων άλλων, ανάμεσά τους ο PDGF.

Η διαδικασία της νεο-αγγειογένεσης είναι σύνθετη και η ολοκλήρωσή της περιλαμβάνει μια καλά ενορχηστρωμένη ακολουθία στην οποία

συμμετέχουν πληθώρα αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων σε μια λεπτή και ακριβή διαδικασία. Καταρχήν η ισχαιμική-υποξική περιοχή στέλνει σήματα στο περιβάλλον (VEGF, FGF, TGF- $\alpha$ , PDGF) που διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων προς όφελος της αγγειογένεσης. Η δημιουργία νέων αγγείων περιλαμβάνει μια σειρά από στάδια. Στο πρώτο από αυτά έχουμε την αποκόλληση των περι-αγγειακών κυττάρων που περιβάλλουν τα ήδη υπάρχοντα αγγεία (περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα) μέσω της δράσης της Ang-2 στον υποδοχέα της Tie-2. Ακολουθεί η διάσπαση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου στρώματος με τη δράση των μεταλλο-πρωτεϊνών του στρώματος (MMP's). Στη συνέχεια εκκρίνεται VEGF από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων μεταξύ των οποίων: το οξειδωτικό stress, ο επαγόμενος παράγοντας υποξίας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor), ο παρόμοιος με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (insulin-like growth factor-I, IGF-1), IL-8, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας ( Epidermal growth factor EGFR), διάφορα ογκογονίδια (Bcl-2, p53, csrs, ras) και οι μεταγραφικοί παράγοντες NFkB και AP-1. Ο VEGF συνδέεται με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης με τους υποδοχείς VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/KDR/flk-1 που βρίσκονται στην επιφάνεια των ήδη υπάρχοντων ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει το πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την προστασία τους από την απόπτωση (επιβίωση). Επιπλέον κινητοποιεί EPCs από τον μυελό των οστών. Στη συνέχεια τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν δημιουργώντας εκβλαστήσεις από νεόπλαστα αγγεία προς την κατεύθυνση του ερεθίσματος (του VEGF που εκκρίνεται από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα). Αυτή η διαδικασία μεσολαβείται μέσω και της μεταβολής της έκφρασης ιντεγκρινών (integrins μια οικογένεια υποδοχέων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων με το περιβάλλον στρώμα). Στο τέλος τα ανώριμα αυτά αγγεία χρειάζεται να ωριμάσουν, μια διαδικασία που μέσω της δράσης του PDGF στους υποδοχείς του στα περικύτταρα θα οδηγήσει στην επικάλυψη των νεόπλαστων αγγείων από τα περικύτταρα.



**Εικόνα 3.** Ο VEGF εκκρίνεται από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων (οξειδωτικό stress, HIF-1, ο IGF-1 ,IL-8, ο EGFR, Bcl-2, p53, csrs, ras κ.α. Ο VEGF συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/KDR/flk-1 που βρίσκονται στην επιφάνεια των ήδη υπάρχοντων ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει το πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση (9)..

Παρ' όλα αυτά η νέο-αγγείωση που επάγεται από τα καρκινικά κύτταρα απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί ως φυσιολογική. Οι λεπτές ισορροπίες μεταξύ των παραγόντων που επάγουν και αναστέλλουν την αγγειογένεση εδώ είναι διαταραγμένες, με συνεχή επικράτηση των αγγειογενετικών παραγόντων. Τα καρκινικά κύτταρα ποτέ δεν φτάνουν σε ισορροπία με το περιβάλλον. Η συνεχής ανάπτυξη του όγκου συνεχώς δημιουργεί νέες υποξικές περιοχές και έτσι επιτείνεται ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί σε καρκινικά αγγεία που εμφανίζουν δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες σε σχέση με τα φυσιολογικά (60). Έτσι τα καρκινικά αγγεία χαρακτηρίζονται από χαοτική αρχιτεκτονική και αιματική ροή (τα αγγεία έχουν ελικοειδή μορφή, είναι διευρυμένα, με άνιση διάμετρο και εκτεταμένες διακλαδώσεις). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η αιματική ροή στα καρκινικά αγγεία να μην ακολουθεί τη φυσιολογική της πορεία και να οδηγεί στη δημιουργία υποξικών περιοχών στους όγκους. Αυτή η διαφοροποιημένη οργάνωση των αγγείων ρυθμίζει την παραγωγή

επαγωγών και αναστολέων της αγγειογένεσης, και ενισχύει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων με τον πιο κακοήθη και μεταστατικό φαινότυπο. Επίσης τα καρκινικά αγγεία χαρακτηρίζονται από υψηλή αγγειακή διαπερατότητα. Τα τοιχώματα των καρκινικών αγγείων εμφανίζουν διάφορα ανοίγματα, διευρυμένες διαενδοθηλιακές συνδέσεις και ασυνέχειες στη βασική μεμβράνη. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τα αγγεία των όγκων να έχουν διαρροή. Σημαντική είναι και η μη ομοιόμορφη έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν μόρια τα οποία μεταβάλλουν την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, καθώς και άλλα μόρια που εκφράζονται φυσιολογικά στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (60).

Τέλος οι όγκοι χαρακτηρίζονται από την έλλειψη λειτουργικών λεμφαγγείων. Τα λεμφαγγεία φυσιολογικά συλλέγουν το ενδιάμεσο υγρό των ιστών και βοηθούν στη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων στους ιστούς. Μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχουν λειτουργικά λεμφαγγεία μέσα στον όγκο, αλλά στην περιφέρεια του όγκου και είναι μεγεθυμένα, ενδεχομένως λόγω αυξημένης έκφρασης του VEGF-C. Αυτά τα λεμφαγγεία μπορούν να απορροφούν καρκινικά κύτταρα από την επιφάνεια του όγκου και έτσι να διευκολύνουν τη μετάσταση (60).

## Ο VEGF προκαλεί σχηματισμό ανώμαλου αγγειακού δικτύου



**Εικόνα 4.** Τα καρκινικά αγγεία χαρακτηρίζονται από χαοτική αρχιτεκτονική και αιματική ροή. Είναι ακανόνιστα σχηματισμένα, διευρυμένα, ελικοειδή, και χωρίς διέξοδο. Δεν είναι οργανωμένα σε φλεβίδια, αρτηρίδια και τριχοειδή όπως το φυσιολογικό αγγειακό δίκτυο αλλά αντιθέτως έχουν χαοτική εκδοχή όλων αυτών. Το αγγειακό δίκτυο είναι διαπερατό και αιμορραγικό τουλάχιστον εν μέρει, λόγω της υπερπαραγωγής του VEGF. Τα ενδοθηλιακά κυτταρικά κανάλια είναι γυμνά, διαπερατά και εύθρυπτα, εύκολα διαρρηγνύονται και αιμορραγούν οδηγώντας έτσι σε μειωμένη ροή και αγγειακή υποστροφή. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν διαμέσω των διάκενων των ιγκρετινών και του στρώματος (9, 61)

### 2.1.1 Επαγωγείς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης

Όπως προαναφέρθηκε ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την αγγειογένεση είναι η υποξία. Έχει βρεθεί ότι η υποξία προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών ROS (reactive oxygen species), οι οποίες προάγουν την αγγειογένεση. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν κυρίως H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελεί ένα από τα κυριότερα ερεθίσματα της αγγειογένεσης στον καρκίνο (62). Μελέτες έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της καρκινικής κυτταρικής ανάπτυξης το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση και μορφογένεση του αυλού των αγγείων (38, 63). Επιπλέον το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την παραγωγή VEGF από τα κύτταρα των όγκων και οδηγεί στην κινητοποίηση των EPC και HSC από το μυελό των οστών στους όγκους με συνοδό τη περαιτέρω διαφοροποίηση τους σε ενδοθηλιακά

κύτταρα και σχηματισμό νέων αγγείων μέσω της αγγειακής διαφοροποίησης (25).

Ο κυριότερος μεσολαβητής για την επαγωγή μεταγωγής σήματος από την υποξία είναι ο επαγόμενος παράγοντας υποξίας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) (64). Ο HIF-1 συνδέεται σε συγκεκριμένες περιοχές ανταπόκρισης, HRE (Hypoxia Response Element) στους υποκινητές ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που ανταποκρίνονται στην υποξία αυξάνοντας την έκφρασή τους. Εκτός από την παρουσία της περιοχής HRE στον υποκινητή του γονιδίου του VEGF, οι περιοχές HREs έχουν βρεθεί και στους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων VEGFR-1 και Tie-2 (65, 66). Ο ρόλος του HIF-1 στην αγγειογένεση, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός, φαίνεται να είναι αρκετά σημαντικός αφού μη λειτουργικές μεταλλάξεις στην υπομονάδα α του HIF-1 έχουν σαν αποτέλεσμα την θνησιμότητα των εμβρύων (67, 68). Επίσης πρόσφατη μελέτη έχει δείξει την επαγωγή του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα IGF-1 ο οποίος με την σειρά του επάγεται από τον HIF-1 και τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 σε ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδούς (69). Ο IGF-1 επάγει την μεταγραφική έκφραση του VEGFmRNA. Πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι ο IGF-IR και ο προσδέτης του IGF-I παίζουν σημαντικό ρόλο στους κακοήθεις όγκους και κυρίως στον καρκίνο του μαστού. Ο IGF-IR συχνά υπερεκφράζεται στους κακοήθεις όγκους και υψηλές συγκεντρώσεις IGF-I έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνων. Επιπλέον ο IGF-I αναστέλλει την απόπτωση και επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ένα από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά του κακοήθους κυττάρου είναι η ικανότητά του για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Συχνά στον καρκίνο οι μηχανισμοί ελέγχου του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου ανευρίσκονται ελαττωματικοί. Είναι γνωστό ότι το OS προκαλεί μεταλλάξεις σε διαφορά γονίδια τα οποία προάγουν την καρκινογένεση μέσω διαφόρων μονοπατιών. Γονίδια στα οποία κάποια μετάλλαξη προσδίδει μια νέα λειτουργία ή ενισχύει μια ήδη υπάρχουσα αναφέρονται σαν πρωτοογκογονίδια. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιδέχονται αγγειογενετικά ερεθίσματα και μέσω της ενεργοποίησης ογκογονιδίων τα οποία επάγουν την έκφραση του VEGF όπως ο c-srs (70-72).

Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *ras* (*Kras* και *Hras*) για παράδειγμα, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης του αναστολέα της αγγειογένεσης θρομβοσποντίνης (TSP1) (73). Παρόμοια, μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση. Η φυσιολογική πρωτεΐνη *p53* αναστέλλει την αγγειογένεση στους όγκους αφού επάγει τον αναστολέα της αγγειογένεσης TSP1 και την αποικοδόμηση του επαγόμενου παράγοντα της υποξίας HIF, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει την μεταγραφή του παράγοντα VEGF και της πρωτεΐνης που συνδέεται με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Έτσι, η απουσία ή μετάλλαξη του γονιδίου του *p53* επαγόμενη από τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την αυξημένη αγγείωση των ογκών (74, 75).

Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου της IL-8 επάγεται από το οξειδωτικό stress (76) και αναστέλλεται από διάφορους αντιοξειδωτικούς παράγοντες (77, 78). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της IL-8 φέρει θέσεις συνδέσεις (binding sites) για τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-κB (79-81). Η IL-8 συμβάλλει στην αγγειογένεση στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (82).

Είναι γνωστό ότι η μεγάλη παραγωγή OS προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης (83), ενώ σε μικρότερα επίπεδα αναστέλλει την απόπτωση (τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) των κυττάρων και προάγει την καρκινογένεση. Μελέτη έδειξε την προαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων μέσω του αντιοξειδωτικού παράγοντα SOD (84). Το οξειδωτικό stress καταστέλλει το *p53* και επάγει το ογκογονίδιο *bcl2*. Ο *bcl-2* αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων (85-88). Πολλοί μηχανισμοί θεωρηθήκαν υπεύθυνοι για τον τρόπο δράσης του *bcl2* μεταξύ των οποίων, η ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η απελευθέρωση «αντι-αποπτωτικών» πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια (89, 90), η καταστολή του *p53* στην μεμβράνη του πυρήνα των κυττάρων (91) και η ρύθμιση του οξειδοαναγόμενου συστήματος της γλουταθειόνης



(92). Πρόσφατη μελέτη έδειξε την επαγωγή του VEGF από το bcl2 στο καρκίνο του προστάτη σε συνθήκες υποξίας (93).

Φαίνεται λοιπόν, ότι σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αγγειογένεσης παίζει η παρουσία «αντι-αποπτωτικού σήματος». Σημαντική είναι η απάντηση του VEGF στο «αντι-αποπτωτικό σήμα». Έτσι, το οξειδωτικό stress αναστέλλει την ενδοθηλιακή κυτταρική απόπτωση (bcl-2, NFκB, p-53) και επάγει την νεοαγγειογένεση (αγγειογένεση από προϋπάρχοντα αγγεία) μέσω της ενεργοποίησης του VEGF. Ο VEGF επάγεται από το OS μέσω διαφόρων μονοπατιών που προαναφέρθηκαν όπως HIF, p53, bcl2, NFκB, IGF-1, IL-8 καθώς και με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού VEGFmRNA (η ενεργοποίησης του VEGFmRNA εξαρτάται από την ποσότητα του παραγόμενου OS) (94, 95). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει τον VEGF mRNA, την μεταγράφηκη έκφραση της πρωτεΐνης του (96) και ενεργοποιεί με τον τρόπο αυτό την κυτταρική μετακίνηση, πολλαπλασιασμό (97) και μορφογένεση του αυλού των αγγείων (45). Τέλος ο NFκB αποτελεί το μόνο μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναστολή της απόπτωσης προάγοντας με αυτό το τρόπο την αγγείωση του όγκου (98).

**Πίνακας 1.** Οι κύριοι παράγοντες μέσω των οποίων το οξειδωτικό stress επάγει την αγγειογένεση στους όγκους.

ό stress	Οξειδωτικ	Νεοπλασματική αγγειογένεση
	↑NFkB,	↑ VEGF
	↑bcl-2	↑ διαπερατότητα μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση αντι-αποπτωτικών παραγόντων,↑ VEGF
	↓p53(καταστέλλει)	↑TSP1 , ↓ HIF
	↑ras	↑ VEGF, ↓TSP1
	↑c-srs	↑ VEGF
	↑VEGFR-1	↑ VEGF
	↑Tie-2	↑Ang1
A	↑VEGFmRN	↑ VEGF
	↑HIF	↑ VEGF ↓p53
	↑Ang2	Αποσταθεροποίηση, απόπτωση των αγγείων
	↑IL-8	Bindings sites NFkB, AP-1
	↑IGF	↑VEGF

## 2.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular endothelial growth factor –VEGF).

### 2.2.1 Ισομορφές του VEGF.

Το ανθρώπινο γονίδιο του VEGF αποτελείται από οκτώ εξόνια και το μέγεθος της κωδικοποιούσας περιοχής είναι περίπου 14 kb. Με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του VEGF στο ανθρώπινο γονιδίωμα προκύπτουν έξι ισομορφές με 121, 145, 165, 183, 189 και 206 αμινοξέα αντίστοιχα. Οι ισομορφές VEGF121, VEGF165 και VEGF189 είναι οι ισομορφές που εκκρίνονται από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους (99). Οι VEGF121, VEGF145 και VEGF165 επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση *in vivo*. Αντίθετα, οι

ισομορφές VEGF189 και VEGF206 βρίσκονται δεσμευμένες σε πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης και έτσι μπορούν και απελευθερώνουν άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως είναι ο bFGF, οι οποίοι βρίσκονται αποθηκευμένοι σε μόρια θειικής ηπαρίνης του εξωκυτταρικού υλικού (100). Η έκφραση του VEGF εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές νεοαγγειογένεσης και αγγειογένεσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (101). Ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αρτηρίες, φλέβες, ακόμα και από λεμφαγγεία και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης σε διάφορα *in vivo* μοντέλα. *In vitro*, ο VEGF αναστέλλει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2 και A1 (102). Τα επίπεδα έκκρισης της πρωτεΐνης του VEGF κατά την ανάπτυξη είναι σημαντικά, καθώς ποντίκια που δεν εκφράζουν κανένα αλληλόμορφο για τον VEGF εμφανίζουν ανωμαλίες στο σχηματισμό των αγγείων και πεθαίνουν τις μέρες εμβρυϊκής ανάπτυξης E11-E12 (103). Επίσης, μελέτες σε ποντίκια που εκφράζουν μόνο VEGF120 (ομόλογο του ανθρώπινου VEGF121), έδειξαν ότι τα ζώα πεθαίνουν αμέσως μετά τη γέννηση και όσα επιβιώνουν αρχικά, πεθαίνουν αργότερα λόγω ισχαιμικής καρδιοπάθειας. Αντίθετα, ποντίκια που εκφράζουν μόνο VEGF164 (ομόλογο του ανθρώπινου VEGF165), επιβιώνουν και είναι υγιή (104). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της ρυθμιστικής δράσης του VEGF στην αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός αγγείων στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού, η οποία πραγματοποιείται μετά τη γέννηση στα τρωκτικά. Καθώς ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αναπτύσσεται, αστροκύτταρα και πρόδρομα νευρικά κύτταρα μεταναστεύουν μακριά από τα υπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να βρεθούν σε συνθήκες υποξίας, οπότε και αρχίζουν να παράγουν VEGF και επάγεται ο σχηματισμός νέων αγγείων. Καθώς υποχωρούν οι υποξικές συνθήκες, τα αστροκύτταρα μειώνουν την έκφραση του VEGF. Σταδιακά, τα αγγεία σταθεροποιούνται και δεν ανταποκρίνονται στον VEGF. Η αγγειογένεση με εκβλάστηση στον αρχικά μη αγγειωμένο και υποξικό αμφιβληστροειδή των τρωκτικών εξαρτάται άμεσα από την έκφραση του VEGF. Καταστολή της έκφρασης του VEGF, μετά από έκθεση των τρωκτικών σε συνθήκες υπεροξίας, προκαλεί διακοπή στην ανάπτυξη των αγγείων και αγγειακή υποστρόφη (105). Αν τα ζώα επανέλθουν σε φυσιολογικές συνθήκες

οξυγόνου, τότε προκαλείται υπερβολική παραγωγή VEGF, με αποτέλεσμα τα αγγεία που δημιουργούνται να είναι αιμορραγικά, με διαρροή και με εξαιρετικά μεγάλους αυλούς (100). Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται *in vitro* από διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, όπως η IL-1, ο TGF- $\beta$ , ο EGF, ο PDGF-BB, ο TPA (Tris 2-methylpyridine amine), η IL-6 και στεροειδείς ορμόνες. Επίσης, απενεργοποίηση του γονιδίου p53 ή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Von Hippel- Lindau (VHL), καθώς και ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras*, *raf* ή *src* ενισχύουν την έκφραση του VEGF. Σημαντικός ρυθμιστής της έκφρασης του VEGF αποτελεί η υποξία, η οποία ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες (Hypoxia-inducible Transcription Factors, HIFs), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν την έκφραση του VEGF, καθώς και άλλων αγγειογενετικών μορίων (106-108) (Εικόνα 3).

### 2.2.2 Οι υποδοχείς του VEGF.

Οι υποδοχείς του VEGF ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης και είναι οι VEGFR-1/*flt-1*, VEGFR-2/KDR/*flk-1* και VEGFR-3/*flt-4* (Εικόνα 5). Υπάρχουν επίσης και βοηθητικοί υποδοχείς, όπως είναι οι neuropilins, NP1 και NP2, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν τη δέσμευση στους κύριους υποδοχείς. Δομικά, οι υποδοχείς του VEGF χαρακτηρίζονται από 7 περιοχές τύπου ανοσοσφαιρίνης στην εξωκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και την περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης στο κυτταροπλασματικό άκρο. Ο υποδοχέας VEGFR-3 εκφράζεται στα λεμφαγγεία και δεσμεύει τις ισομορφές VEGF-C και VEGF-D. Οι υποδοχείς που κυριαρχούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι οι KDR/*flk-1* και *flt-1*. Οι KDR/*flk-1* και *flt-1* πιθανότατα ενεργοποιούνται από όλες τις ισομορφές του VEGF, αλλά εκπληρώνουν διαφορετικές δράσεις *in vivo*. Ο KDR/*flk-1* φαίνεται ότι μετέχει στις βασικές δράσεις του VEGF, ενώ ο *flt-1* μάλλον δρα ως υποδοχέας-δόλωμα ή καταστέλλει τη μεταγωγή σήματος μέσω του KDR/*flk-1* (109). Για το λόγο αυτό, ποντίκια που δεν εκφράζουν τον KDR δεν αναπτύσσουν αγγειακό πλέγμα και έχουν πολύ λίγα ενδοθηλιακά κύτταρα (110), ενώ ποντίκια που δεν εκφράζουν τον *flt-1* οδηγούνται σε πρόωρο εμβρυϊκό θάνατο, διαθέτουν πληθώρα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία συνενώνονται ανώμαλα και σχηματίζουν

αποδιοργανωμένους αυλούς (111). Αν και οι υποδοχείς του VEGF εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφρασή τους παρατηρείται και σε καρκινικά κύτταρα (112-115). Η έκφραση του *flt-1* από καρκινικές σειρές παγκρέατος έχει δειχθεί ότι επάγει τη μεταγωγή σήματος μέσω της MAPK και ενεργοποιεί τη μετανάστευση και τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό την επιβίωσή τους (116) (εικόνα 5).

### **2.2.3 Ρόλος του VEGF στην καρκινική αγγειογένεση.**

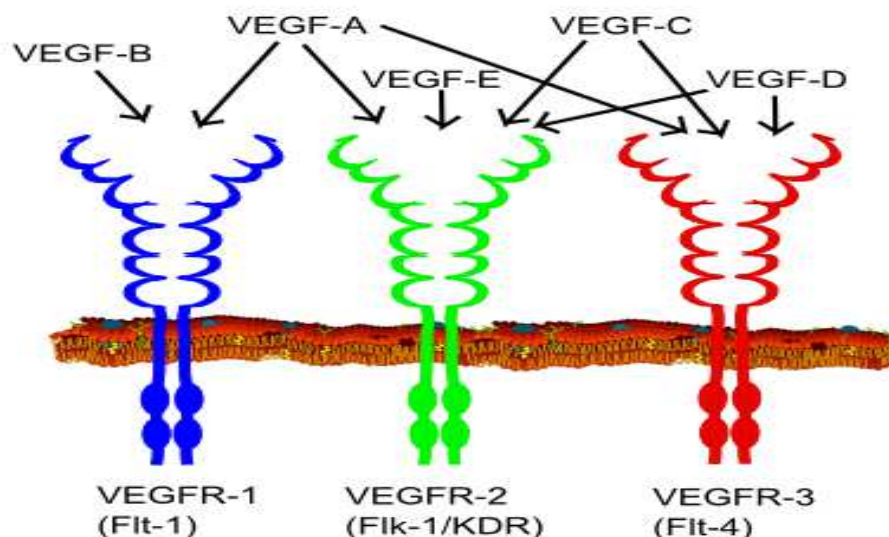
Η παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη συμπαγών όγκων. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο VEGF εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως μαστού, πνεύμονα (102), γλοιωμάτων του νευρικού συστήματος (117), παγκρέατος (116), μελανώματος (118). Σε πολλούς καρκινικούς όγκους, τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια του όγκου, όπου δεν υπάρχει υποξία, παράγουν αυξημένες ποσότητες VEGF. Σε αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η έκφραση του mRNA του VEGF επάγεται από ενεργοποιημένα ογκογονίδια που βρίσκονται στο μονοπάτι Ras (119) ή από απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών μορίων, όπως π.χ. p53 και θρομβοσπονδίνης-1 (57). Υπερέκφραση του VEGF σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές γλοιώματος ενισχύει την ογκογενετική δραστηριότητα των κυττάρων *in vivo* (120). Αναστολή της δράσης του VEGF με τη χρήση αντισωμάτων (118) ή με τη χρήση αντιαγγειογενετικών μορίων (102, 121) ή με την εφαρμογή γονιδιακών προσεγγίσεων (122), οδηγεί σε μείωση της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου. Επίσης, αναστολή της μεταγωγής σήματος του VEGF, περιορίζει τόσο την καρκινική αγγειογένεση, όσο και την ογκογένεση (123, 124).

### **2.2.4 Λεμφαγγειογένεση.**

Η λεμφαγγειογένεση αφορά στην ανάπτυξη και στο σχηματισμό νέων λεμφαγγείων και παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικά αναπτυσσόμενους

ιστούς, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Το λεμφικό σύστημα αποτελείται από ένα ευρύ δίκτυο αγγείων και αγωγών, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της ισορροπίας του ενδιάμεσου υγρού, για τη μετακίνηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, εμπλέκονται σε περιπτώσεις φλεγμονής και οιδήματος και συμμετέχουν στη μετάσταση καρκινικών κυττάρων (125, 126). Η ανάπτυξη του εμβρυϊκού λεμφικού συστήματος έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έδειξε ότι τα λεμφαγγεία σε πτηνά, θηλαστικά και στον άνθρωπο προέρχονται από τους εμβρυϊκούς λεμφικούς σάκους, οι οποίοι αναπτύσσονται σε στενή επαφή με το σύστημα των αιμοφόρων αγγείων. Οι αρχέγονοι λεμφικοί σάκοι είτε προέρχονται από την εκβλάστηση ενδοθηλιακών κυττάρων από τις εμβρυϊκές φλέβες (127), είτε προκύπτουν από λεμφαγγειοβλάστες, κύτταρα ανεξάρτητα από τις φλέβες. Τα μέλη της οικογένειας του VEGF που μετέχουν κυρίως στη λεμφαγγειογένεση είναι οι VEGF-C και VEGF-D και ο υποδοχέας τους VEGFR-3. Ο VEGF-C επάγει τη λεμφαγγειογένεση στο δέρμα διαγονιδιακών ποντικών και στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη του εμβρύου της όρνιθας (CAM) (125, 126). Ο VEGF-D επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και αν και ασκεί αγγειογενετική δράση στο *in vivo* μοντέλο του αμφιβληστροειδή οφθαλμού κουνελιού (128), έχει βρεθεί ότι επάγει την λεμφαγγειογένεση σε καρκινικό μοντέλο ποντικού (129) και προωθεί τη μετάσταση μέσω των λεμφαγγείων (130).

Ο υποδοχέας VEGFR-3 εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων, αλλά και των κυττάρων του αιματοποιητικού συστήματος. Απενεργοποίηση του γονιδίου του VEGFR-3 οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα (125). Πρόσφατες μελέτες συνδέουν και τον αγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα VEGF-A με την καρκινική λεμφαγγειογένεση και τη μετάσταση. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν VEGF-A παρατηρείται επαγωγή της καρκινικής λεμφαγγειογένεσης και αγγειογένεσης σε καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου του δέρματος και αυξημένη μετάσταση στους γειτονικούς λεμφικούς όζους. Ο VEGF-A φαίνεται να ασκεί τη λεμφαγγειογενετική του δράση μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα VEGFR-2 που εκφράζεται από τα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα (131) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Οι ισομορφές του VEGF και οι υποδοχείς σύνδεσής του.

### 2.2.5 Ο VEGF στο καρκίνο του πνεύμονα

Μελέτες έχουν δείξει την μεγάλη παραγωγή VEGF από τα καρκινικά κύτταρα ασθενών με ΚΠ ανεξάρτητα του κυτταρικού τύπου (132-135). Τα επίπεδα του VEGF στο ορό έχουν μετρηθεί τόσο σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (134, 136-138) όσο και σε ασθενείς με ΜΚΠ (139-141) και έχουν βρεθεί υψηλότερα σε σχέση με εκείνα των υγιών μαρτύρων. Αυξημένα επίπεδα VEGF έχουν επίσης βρεθεί στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ (142, 143), στο πλευριτικό υγρό (144-152), στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) (153, 154) και στον καρκινικό ιστό (VEGF-πρωτεΐνη, VEGF-R) (155, 156). Σημαντικός είναι και ο προσδιορισμός των διαφορών ισομορφών και των υποδοχέων του VEGF στους ασθενείς με ΚΠ. Οι Donnem et al. βρήκαν αυξημένη έκφραση του VEGF A, VEGF C και του VEGFR-3 στον καρκινικό ιστό ασθενών με ΜΜΚΠ με λεμφαδενικές μεταστάσεις (156). Οι Bonnesen et.al. βρήκαν αυξημένη έκφραση του VEGF A και VEGFR-2 σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (157). Αυξημένη έκφραση του VEGF C και VEGFR-3 έχει βρεθεί επίσης και σε αρκετές άλλες μελέτες τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (158-162) όσο και στον ορό ασθενών με ΜΜΚΠ με λεμφαδενικές μεταστάσεις (163-165). Αυτό υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο του VEGF C (πρόσφατα και των VEGF A και VEGF D) καθώς και του υποδοχέα VEGFR-3 στη λεμφαγγειακή διασπορά και μετάσταση.

Πολλές είναι οι μελέτες οι οποίες προσπάθησαν να συσχετίσουν τα επίπεδα του VEGF με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, διερευνώντας με το τρόπο αυτό την εν δυνάμει προγνωστική του αξία. Στις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους που μελετηθήκαν συγκαταλέγονται το φύλο, η απώλεια βάρους, η καπνιστική συνήθεια, η ηλικία, η κατάσταση του ασθενούς κατά τη διάγνωση της νόσου (performance status-PS), ο ιστολογικός τύπος και το TNM στάδιο της νόσου. Σε καμία μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του VEGF με το φύλο, την ηλικία και την απώλεια βάρους του ασθενούς (121, 139, 157, 166), ενώ με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα.

Έτσι υπάρχουν μελέτες στις οποίες βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του VEGF με το στάδιο της νόσου (145, 167) και πιο πρόσφατες μελέτες στις οποίες ο VEGF δεν συσχετίζεται με το στάδιο της νόσου (133, 165, 168). Συγκεκριμένα οι Matsuyama et. al προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF στον ορό 49 ασθενών με ΚΠ (ΜΜΚΠ και ΜΚΠ) και διαπίστωσαν υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου (145). Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν οι Takigawa et. al., οι οποίοι προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF σε 70 ασθενείς με ΚΠ και δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση αυτών τόσο με το προχωρημένο στάδιο νόσου όσο και με την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων (135). Καμία συσχέτιση με το στάδιο νόσου δεν ανευρεθεί και σε πιο πρόσφατες μελέτες των Park et.al. και των Bonnesen et. al. (157, 168).

Σημαντική είναι και η προσπάθεια διερεύνησης της σχέσης του VEGF με τα επιμέρους χαρακτηριστικά της TNM σταδιοποίησης (T, N και M) όπως αυτή καταγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι Imoto et al. προσδιόρισαν τα επίπεδα του VEGF σε καρκινικό ιστό 91 ασθενών με ΜΜΚΠ. Ασθενείς με T3-4 όγκο είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα VEGF σε σύγκριση με τους ασθενείς με T1-2. (167). Επιπλέον, οι Tamura et al. καθώς και οι Ohta et al. δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική διαφορά του VEGF και της ισομορφής του VEGF C σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση (164, 169) σε αντίθεση με άλλες μελέτες όπως αυτή των Kaya et al. στην οποία προσδιορίστηκαν υψηλότερα επίπεδα VEGF σε ασθενείς με πιο προχωρημένες λεμφαδενικές μεταστάσεις (N2-N3) σε σχέση με τους



ασθενείς ελεύθερων λεμφαδενικών μεταστάσεων (N0) ή με διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων (N1) (133, 170).

Η προσπάθεια συσχέτισης του VEGF με τον ιστολογικό τύπο, αποτέλεσε εξίσου αντικείμενο πολλών ερευνών. Πρόσφατες μελέτες δεν ανέδειξαν συσχέτιση του VEGF με τον ιστολογικό τύπο. Οι Naumnik et.al. διερεύνησαν τη σχέση όχι μόνο του VEGF αλλά και των ισομορφιών του VEGF C, VEGF D και του υποδοχέα VEGFR-2 με τον ιστολογικό τύπο, χωρίς να όμως να βρουν στατιστικά σημαντική διαφορά (165). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η πιο πρόσφατη μελέτη των Saglam et.al. (133) καθώς και των Park et.al.(168). Συγκεκριμένα οι Saglam et.al. προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF στον ορό 40 ασθενών (31 ασθενείς με ΜΜΚΠ και 9 ασθενείς με ΜΚΠ) πριν την θεραπεία και δεν διαπίστωσαν καμιά συσχέτιση αυτού με τον ιστολογικό τύπο (133).

Η βιολογική κατάσταση του ασθενούς και η συσχέτιση της με τα επίπεδα VEGF στους ασθενείς με ΚΠ, καταγράφεται επίσης σε αρκετές μελέτες. Έτσι, μελέτη των Chakra et al. προσδιόρισε τις τιμές του VEGF σε πολύ μεγάλο αριθμό ασθενών (451 ασθενείς) με ΜΜΚΠ, πριν και μετά τη ΧΜΘ. Οι τιμές του VEGF ήταν πολύ υψηλότερες στους ασθενείς με  $PS \geq 2$  σε σχέση με τους ασθενείς με καλή βιολογική κατάσταση ( $PS=0-1$ ) (136). Σε ανάλογο αποτέλεσμα δεν κατέληξε η μελέτη των Tas et.al., οι οποίοι δεν ανέδειξαν καμιά συσχέτιση του VEGF με την βιολογική κατάσταση του ασθενούς (134)

Επιπλέον, τα επίπεδα του VEGF πριν και μετά τη ΧΜΘ έχουν προσδιοριστεί σε αρκετές μελέτες. Σε κάποιες από αυτές βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα VEGF τα οποία δεν επηρεάστηκαν και δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά τη ΧΜΘ (134, 139), ενώ σε άλλες οι τιμές του VEGF ήταν μικρότερες μετά τη ΧΜΘ (165, 171). Έτσι σε μελέτη των Kido et.al. σε ασθενείς με ΚΠ ανεξάρτητα ιστολογικού τύπου, τα επίπεδα του VEGF μειώθηκαν μετά τη ΧΜΘ στους ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ. Οι μεταβολές δε των τιμών του VEGF (πριν και μετά τη ΧΜΘ) στις δυο ομάδες ασθενών (ασθενείς που ανταποκρίθηκαν και μη ανταποκρινόμενοι) είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά,  $p=0.006$  (171). Από την άλλη, αρκετές είναι και οι μελέτες οι οποίες διερεύνησαν τη σχέση του VEGF με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Σημαντική είναι η μελέτη των Tas et.al. οι οποίοι

προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF και Bcl-2 στον ορό ασθενών με ΜΜΚΠ πριν και μετά τη ΧΜΘ. Οι τιμές και των δύο δεικτών δεν διαφέρανε μετά τη θεραπεία και δεν συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ (134). Σε αντίθετο συμπέρασμα κατέληξε μελέτη των Dudek et. al. οι οποίοι προσδιόρισαν τα επίπεδα του VEGF σε 21 ασθενείς με ΜΜΚΠ και διαπίστωσαν θετική συσχέτιση των επιπέδων του με τη ΧΜΘ. (172)

Στους ασθενείς με ΚΠ η προγνωστική αξία του VEGF αποτέλεσε εκτεταμένο αντικείμενο μελέτης. Τα υψηλά επίπεδα VEGF στον ορό ή η αυξημένη έκφραση του στο καρκινικό ιστό πριν τη θεραπεία (ΧΜΘ ή ΧΜΘ+ΑΚΘ-ακτινοθεραπεία ή χειρουργική εξαίρεση) συσχετίστηκαν με μικρότερη επιβίωση των ασθενών σε αρκετές μελέτες, ανάγοντας τον έτσι σε δείκτη κακής πρόγνωσης (poor prognostic factor). (138, 140, 162, 173, 174). Συγκεκριμένα πρόσφατη ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας η οποία διενεργήθηκε από τους Bremnes et.al (Ιανουάριος 1993-Μάιος 2005) διαπίστωσε την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης του VEGF με την επιβίωση των ασθενών σε 10 από τις 16 υπάρχουσες μελέτες (63%). Εντούτοις, σε τελευταίες μελέτες των Chakra et.al καθώς και των Bonnesen et.al.σε ασθενείς με ΜΜΚΠ δεν βρέθηκε συσχέτιση των υψηλών επιπέδων του VEGF πριν την θεραπεία με την επιβίωση των ασθενών. (136, 157).

Τέλος αρκετές μελέτες αξιολόγησαν περαιτέρω την αξία των επιπέδων του VEGF ως ανεξαρτήτου προγνωστικού δείκτη στους ασθενείς με ΚΠ. Έτσι, σε μελέτη των Imoto et.al. σε ασθενείς με ΜΜΚΠ διαπιστώθηκε η ανεξάρτητη προγνωστική του αξία (167). Σε αντίθετο όμως αποτέλεσμα κατέληξε μελέτη των Tas et.al. η οποία διενεργήθηκε σε 34 ασθενείς με ΜΚΠ και η οποία διαπίστωσε ότι μόνο η απώλεια βάρους και η ανταπόκριση στη ΧΜΘ είχαν ανεξάρτητη προγνωστική αξία (139).

## **2.2.6 Θεραπευτικές παρεμβάσεις**

Πρώτος ο καθηγητής Folkman το 1971 ανέδειξε το σημαντικό ρόλο του VEGF στην ογκογένεση και διατύπωσε την ιστορική πλέον θέση: «για να σταματήσουμε την ανάπτυξη ενός όγκου θα πρέπει να εμποδίσουμε την

αγγείωση του». Από τότε έχουν περάσει δεκαετίες συνεχών και επίπονων ερευνών για την εύρεση αγγειογενετικών αναστολέων. Το 2006 η χορήγηση αντι-VEGF ανασυνδισμένου ανθρώπινου μονοκλωνικού αντισώματος (bevacizumab) αποτελούσε πραγματικότητα. Οι Gridelli et al. σε τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη φάσης III κατέδειξαν την αύξηση της επιβίωσης κατά 4,7 μήνες των ασθενών με καρκίνο παχέως εντέρου οι οποίοι έλαβαν τον συνδυασμό χημειοθεραπείας με bevacizumab έναντι των ασθενών που έλαβαν μόνο ΧΜΘ (175, 176). Η έρευνα συνεχίστηκε και σε ασθενείς με άλλους συμπαγείς όγκους και διαπιστώθηκε η αναγκαιότητα χορήγησης του bevacizumab και σε άλλους καρκίνους μεταξύ των οποίων και ο ΚΠ (176). Συγκεκριμένα σε τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη φάσης III των Sandler et.al. σε ασθενείς με ΜΜΚΠ με εκτεταμένη νόσο (σταδίου IIIB με κακοήγη πλευριτική συλλογή, σταδίου IV ή με υποτροπή νόσου μετά από χειρουργείο) οι οποίοι έλαβαν εκτός της κλασικής ΧΜΘ (cisplatin/paclitaxel) και bevacizumab καταδείχτηκε αύξηση της συνολικής επιβίωσης κατά 33% και αύξηση της ανταπόκρισης στην ΧΜΘ (27.2% έναντι 10%,  $p < 0.0001$ ). Οι παρενέργειες του bevacizumab όπως καταγράφηκαν στην εν λόγω μελέτη είναι «υπολογίσιμες» και περιλαμβάνουν τις αιμορραγίες, την ουδετεροπενία, τον ουδετεροπενικό πυρετό και την θρομβοπενία (177). Ευλόγως λοιπόν, το ερευνητικό ενδιαφέρον το τελευταίο διάστημα έχει στραφεί στην ανάδειξη όλο και περισσότερων καινούργιων, πιο αποτελεσματικών και λιγότερο τοξικών αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Πρόσφατες, πολλά υποσχόμενες μελέτες ερευνούν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* την αποτελεσματικότητα αναστολέων του υποδοχέα VEGFR-2 (118, 121, 175) καθώς και αντι-VEGF εμβολίων (178, 179). Έτσι, σε διάφορους τύπους καρκίνου πολλά φάρμακα έχουν δοκιμαστεί ή είναι υπό δοκιμή, όπως αντισώματα έναντι του VEGF (bevacizumab), του VEGFRs(DC101), των VEGFR/VEGF, καθώς και VEGF-TRAP και αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (BAY-43-9006, SU11248, ZD6474, AZD2171, PTK/ZK) (180). Τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών αναμένονται με μεγάλο ενδιαφέρον με σκοπό την καθιέρωση και νέων αντιαγγειογενετικών παραγόντων στην θεραπευτική φαρμάκων.

### 3 Το οξειδωτικό stress.

Το οξειδωτικό stress (OS) είναι η σοβαρή διαταραχή ισοζυγίου μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών παραγώγων. Ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο ή μια ομάδα ατόμων με ένα ή περισσότερα αζευγάρωτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τροχιά τους. Η οντότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ουδέτερη είτε φορτισμένη. Το αζευγάρωτο ηλεκτρόνιο των ελευθέρων ριζών είναι συνήθως εξαιρετικά ανταλλάξιμο, γεγονός που αποτελεί τη χημική και τη φυσική αιτία για τη δραστηριότητα και την αστάθεια των περισσότερων ελευθέρων ριζών. Στην πραγματικότητα, μια ελεύθερη ρίζα (με ένα αζευγάρωτο ηλεκτρόνιο), ανάλογα με την αναγωγική/οξειδωτική της ικανότητα, τείνει να αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από ένα γειτονικό μόριο για να αποκτήσει δική της σταθερότητα και το μόριο-στόχος, με τη σειρά του, γίνεται μια νέα ρίζα. Γενικά, οι οξειδωτικές ρίζες ταξινομούνται με βάση το χημικό στοιχείο που έχει το αζευγάρωτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τροχιά του. Αν δηλαδή η εξωτερική στιβάδα μιας ελεύθερης ρίζας ανήκει στο χλώριο, η ελεύθερη ρίζα αναφέρεται ως ελεύθερη ρίζα χλωρίου. Οι βιολογικές ρίζες περιλαμβάνουν το οξυγόνο, τον άνθρακα, το άζωτο και το χλώριο.

Είναι γνωστό ότι το οξυγόνο αποτελεί το βασικό χημικό στοιχείο της ζωής, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως κατά τη διάρκεια της αναπνοής, το οξυγόνο είναι ικανό να δημιουργήσει μια σειρά χημικά ενεργών ουσιών που θεωρούνται υπεύθυνες για το οξειδωτικό stress. Τέτοιες ενεργείς ρίζες οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, όπως τη ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{HO}^\cdot$ ) και τη ρίζα του υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^\cdot$ ), αλλά και άλλες οντότητες χωρίς αζευγάρωτα ηλεκτρόνια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και τη μονή ρίζα του οξυγόνου  $^1\text{O}_2^\cdot$ . Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο-στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξείδωση και γι' αυτό δρουν ως οξειδωτικά. Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν όλα τα οργανικά μόρια, όπως υδατάνθρακες, λιπίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και άλλα, προκαλώντας μια σειρά βιοχημικών αλλαγών υπεύθυνων για τις βλάβες

του οξειδωτικού stress που συμβαίνουν συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής (181).

Μέσα στα κύτταρα, οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μεταβολικής δραστηριότητας είτε αυθόρμητα είτε ως αποτέλεσμα αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα ή από μέταλλα μεταφορείς, όπως σίδηρος ή χαλκός. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κάποιοι εξωγενείς παράγοντες είναι ικανοί να αυξήσουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών.

Η κυτταρική μεμβράνη εμπλέκεται στην παραγωγή οξειδωτικών ριζών, κυρίως κατά τη διάρκεια φλεγμονής και λοιμώξεων. Στα ουδετερόφιλα, η μεμβράνη τους φιλοξενεί όχι μόνο την οξειδάση του NADPH, η οποία καταλύει τη δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίου, αλλά και το σύστημα της λιποξυγενάσης, που δημιουργεί ποικίλα υδροϋπεροξειδία (ROOH) ως ενδιάμεσα συστατικά.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια πηγή οξειδωτικών ριζών, γιατί σε αυτά βρίσκεται η αλυσίδα των αναπνευστικών ενζύμων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στην πραγματικότητα, η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στη δημιουργία του μορίου του νερού, ενώ μικρά αλλά σημαντικά ποσά των ηλεκτρονίων (1-2%) μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδία του υδρογόνου (182).

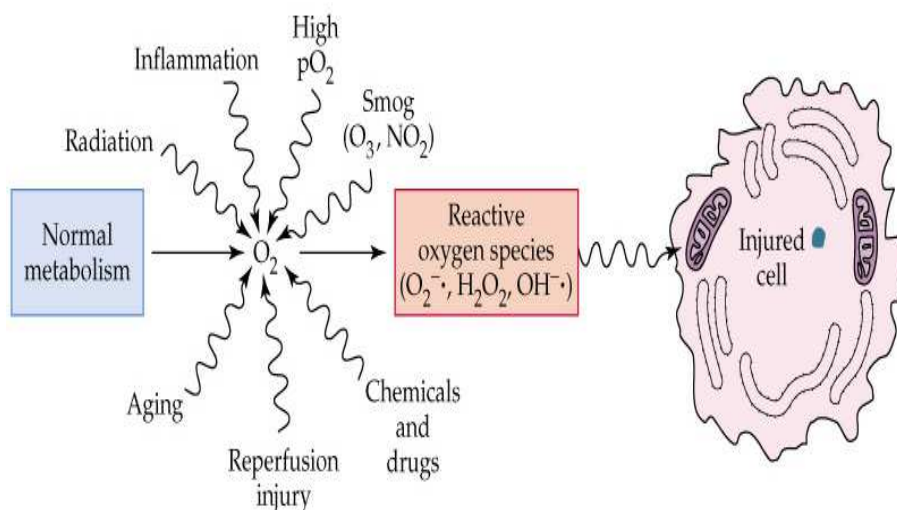
Τα υπεροξεισωμάτια είναι, επίσης, οργανύλια μέσα στα οποία αναπτύσσονται ελεύθερες ρίζες. Συγκεκριμένα, μέσα στα υπεροξεισωμάτια τα λιπαρά οξέα υφίστανται μια ειδική οξειδωτική διαδικασία. Στο πρώτο στάδιο αυτής της διαδικασίας, μια φλαβοπρωτεΐνη αφαιρεί ένα ζευγάρι ατόμων υδρογόνου από ένα μόριο ενεργοποιημένου λιπαρού οξέος (acyl-CoA). Τα δύο άτομα υδρογόνου μεταφέρονται απευθείας στο μοριακό οξυγόνο και παράγεται το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενεργός παραγωγή ριζών γίνεται μέσω του κυτοχρώματος P450, που είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αποτοξίνωσης. Το κυτόχρωμα P450 είναι μια αιμοπρωτεΐνη

που έχει τη δυνατότητα να καταλύει αντιδράσεις υδροξυλίωσης για την παραγωγή ενεργών οξειδωτικών ριζών (183).

Γίνεται σαφές ότι σε κάθε σημείο του κυττάρου η παραγωγή των ριζών έχει μια ειδική λειτουργία, όχι μόνο στο μεταβολισμό του κυττάρου αλλά και σε άλλες διαδικασίες, όπως οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές. Έτσι, για παράδειγμα, υπεροξειδία και άλλες ρίζες παράγονται στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετεροφίλων, επιτίθενται στα μικρόβια και τα εξασθενούν, ώστε να φαγοκυτταρωθούν και να καταστραφούν ολοκληρωτικά πιο εύκολα (184).

Διάφοροι φυσικοί, χημικοί ή βιολογικοί παράγοντες μπορούν να πυροδοτήσουν την έναρξη της παραγωγής ελευθέρων ριζών, ενώ μπορούν ακόμη και να την αυξήσουν. Η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελούν παράδειγμα φυσικού παράγοντα που ευνοεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών, με τη ραδιόλυση και φωτόλυση αντίστοιχα, του νερού, που αποτελεί βασικό συστατικό των ζωντανών οργανισμών. Το όζον αποτελεί χημικό παράγοντα παραγωγής ριζών υδροϋπεροξειδίων, δρώντας σε συστατικά που προέρχονται από τη φαινόλη. Άλλοι χημικοί παράγοντες, όπως οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και μερικά φάρμακα, δρουν με έμμεσο μηχανισμό και, συγκεκριμένα, μέσω ενεργοποίησης του κυτοχρώματος P450. Τέλος, παράδειγμα βιολογικού παράγοντα παραγωγής ριζών είναι τα βακτήρια και άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, καθώς και μερικά αντισώματα (185) ,(Εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Παραγωγή οξειδωτικού stress από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

### 3.1.1 Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα.

Οι ελεύθερες ρίζες (ROS) αποτελούν δυνητικά επικίνδυνους παράγοντες, εναντίον των οποίων δρα το αμυντικό σύστημα. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ένζυμα, βιταμίνες, μικροστοιχεία κ.ά. Η διάκρισή τους γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή υδρόφοβα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική). Καλύτερη ταξινόμηση των παραγόντων του αμυντικού συστήματος γίνεται με βάση τον τρόπο δράσης τους: αναχαιτιστές των αντιοξειδωτικών, εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών, παράγοντες επανόρθωσης, ρυθμιστικοί παράγοντες. Στους αναχαιτιστές των ROS ανήκουν η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η απτοσφαιρίνη, η σερουλοπλασμίνη και η λευκωματίνη. Στους εκκαθαριστές των ROS ανήκουν τα καρωτενοειδή, η υπεροξειδική δισμουτάση, οι καταλάσες, οι γλουταθειονικές υπεροξειδάσες και η γλουταθειονική τρανσφεράση. Στους εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών ανήκουν, ακόμη, το ασκορβικό άλας, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η λευκωματίνη, η τοκοφερόλη και τα καρωτενοειδή. Στους επισκευαστικούς παράγοντες του αμυντικού οξειδωτικού συστήματος ανήκουν διάφορα ένζυμα, όπως λιπάσες, πρωτεάσες, τρανσφεράσες και ένζυμα επισκευής του DNA. Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα μέσα σε ένα

ζωντανό οργανισμό. Στο εξωκυττάριο τμήμα και, συγκεκριμένα, στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια, για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελευθέρων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ και όλα τα εξωγενώς χορηγούμενα διαιτητικά ή φαρμακολογικά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό άλας, η τοκοφερόλη, τα βιοφλαβονοειδή. Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελευθέρων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καρωτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B, βιοφλαβονοειδή, αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η γλουταθειονική υπεροξειδάση και ρεδοκτάση και τα συνένζυμά τους, ή τα προσθετικά στοιχεία, όπως το σελήνιο, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και οι καταλάσες (186).

### **3.1.2 Παθοφυσιολογία του οξειδωτικού stress.**

Το OS ορίζεται ως το χημικό stress που δημιουργείται από την παρουσία ελευθέρων ριζών, η οποία οφείλεται στην υπερβολική παραγωγή ή και την αδυναμία του ζωντανού οργανισμού να εξουδετερώσει τις ρίζες αυτές, που έχουν παραχθεί με οποιονδήποτε τρόπο. Η άνιση αυτή σχέση μεταξύ οξειδωτικού και αμυντικού συστήματος καταλήγει σε μια σειρά λειτουργικών και δομικών κυτταρικών αλλαγών, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση. Όταν οι ανωτέρω βλάβες μεταφέρονται από το κυτταρικό στο ιστικό επίπεδο, τότε είναι υπεύθυνες για την πρόιμη γήρανση και διάφορα νοσήματα όπως εγκεφαλικά επεισόδια, εμφράγματα, σακχαρώδης διαβήτης παχυσαρκία, καρκίνος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Crohn, νόσος του Parkinson κ.ά. Βέβαια, δεν είναι πάντα δυνατόν να εξακριβωθεί αν οι ελεύθερες ρίζες είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα των βλαβών που παρατηρούνται.



Αυξημένη παραγωγή των ROS παρατηρείται μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, περιβαλλοντική μόλυνση, έκθεση σε βαριά μέταλλα, κάπνισμα τσιγάρου, μετά από υπερβολική άσκηση ή το αντίθετο, σε υπερβολικά καθιστική ζωή. Η μειωμένη πρόσληψη ή και η μειωμένη σύνθεση ή η αυξημένη κατανάλωση αντιοξειδωτικών είναι καταστάσεις υπεύθυνες για τη δημιουργία οξειδωτικού stress λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας.

Η αυξημένη ποσότητα των ROS είναι ικανή να δράσει σε οποιοδήποτε κυτταρικό στοιχείο, προκειμένου να του αφαιρέσει ηλεκτρόνια για να αποκτήσει τη σταθερότητά της. Αυτή η διαδικασία πυροδοτεί μια αλυσιδωτή αντίδραση και, αν δεν αναχαιτιστεί θα καταλήξει σε λειτουργική ή δομική βλάβη του κυττάρου. Ένας πολύ καλά μελετημένος και σημαντικός μηχανισμός που εμπλέκεται στην κυτταρική και ιστική βλάβη είναι εκείνος που αφορά στην παραγωγή υδροϋπεροξειδίων (ROOH). Τα συστατικά αυτά ανήκουν και στους ενεργούς μεταβολίτες του οξυγόνου (ROMs). Το πρώτο βήμα στη δημιουργία των υδροϋπεροξειδίων είναι η επίθεση ενός βιομορίου από μια ελεύθερη ρίζα. Μέσα στα κύτταρα, η πλέον επικίνδυνη ρίζα είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>). Όταν η αντιοξειδωτική κυτταρική άμυνα έχει αποτύχει, η ρίζα του υδροξυλίου επιτίθεται σε ένα οργανικό μόριο (συμβολίζεται ως RH<sup>-</sup>), το οποίο μπορεί να είναι λιπίδιο, αμινοξύ, πρωτεΐνη, νουκλεοτίδιο, με στόχο να αφαιρέσει ένα ηλεκτρόνιο για να αποκτήσει τη σταθερότητά της. Με αυτόν τον τρόπο, μια νέα ενεργός ρίζα με κεντρικό άτομο τον άνθρακα (R<sup>\*</sup>) δημιουργείται και ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση παραγωγής νέων ριζών. Με τη σειρά της, η ρίζα αυτή αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και παράγεται μια ρίζα υδροϋπεροξυλίου (ROO<sup>\*</sup>). Σε τρίτη φάση, η ρίζα του υδροϋπεροξυλίου μπορεί να αντιδράσει με ένα νέο οργανικό μόριο (R1H) παράγοντας μια νέα ρίζα (R1<sup>\*</sup>) και το υδροϋπεροξειδίο (ROOH). Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση που πυροδοτήθηκε από το OH<sup>-</sup> θα τερματίσει όταν δύο R1 ενωθούν για να παράγουν R1-R1 ή όταν παρέμβει κάποιο αντιοξειδωτικό. Αν η αλυσιδωτή αντίδραση ξεκινήσει από κάποιο λιπαρό οξύ –όπως το αραχιδονικό οξύ– ως R, τότε θα σχηματιστεί η ρίζα υδροϋπεροξειδίου του λιπαρού οξέος. Τα λιπίδια των βιομεμβρανών είναι εξαιρετικοί στόχοι για τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες. Η ρίζα του υδροϋπεροξυλίου του λιπιδίου έχει ρόλο-κλειδί στην αλυσίδα των

αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, αν κάποιος δότης ηλεκτρονίου (R-H) βρεθεί μέσα στο βιολογικό υλικό, από τη ρίζα αυτή θα δημιουργηθεί ένα υδροϋπεροξειδίο του λιπιδίου. Η παραγωγή ριζών από την οξειδωση των λιπιδίων μπορεί να αυξηθεί ακόμη περισσότερο παράγοντας μαλονδιαλδεΰδη (MDA) και αέρια πεντανίου ή αιθανίου, αν βρεθούν άλλοι δότες υδρογονοκατιόντων, μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το αντιοξειδωτικό σύστημα. Επομένως, τα υδροϋπεροξειδία δημιουργούνται μέσα στο κύτταρο και, σε αντίθεση με τις άλλες ελεύθερες ρίζες, είναι περισσότερο σταθερές, αλλά διατηρούν την οξειδωτική τους ικανότητα. Έτσι, όταν βρεθεί στο δρόμο τους ένα ελεύθερο μέταλλο, όπως σίδηρος ή χαλκός πυροδοτείται η αντίδραση του Fenton και σχηματίζονται ρίζες αλκοξυλίου (RO\*) ή ρίζες υδροϋπεροξυλίου (ROO\*). Αυτές οι ενώσεις ενισχύουν το οξειδωτικό stress ενδοκυττάρια, ενώ τα κύτταρα αποβάλλουν τα υδροϋπεροξειδία στα βιολογικά υγρά, όπως στο πλάσμα του αίματος. Μέσα στα βιολογικά υγρά τα υδροϋπεροξειδία φαίνεται όχι μόνο να ενισχύουν αλλά και να αποτελούν δείκτη της ιστικής βλάβης, αφού εξακολουθούν και μέσα στο πλάσμα να διατηρούν την οξειδωτική τους ικανότητα. Λόγω ακριβώς αυτής της διατήρησης της οξειδωτικής τους ικανότητας μπορούν να πυροδοτήσουν μια αλυσιδωτή αντίδραση αν βρεθεί κάποιο μέταλλο, όπως ο σίδηρος, για να δράσει ως καταλύτης. Ως γνωστόν, ο σίδηρος σχηματίζει χημικές ενώσεις με ειδικές πρωτεΐνες, όπως η τρανσφερίνη. Σε κάποιες καταστάσεις, όπως σε οξειδωση, το άτομο του σιδήρου είναι δυνατόν να απελευθερωθεί και να δράσει ως καταλύτης στην αντίδραση Fenton και να παράγει –όπως ακριβώς μέσα στο κύτταρο– ρίζες αλκοξυλίου και υδροϋπεροξυλίου. Με τη σειρά τους, οι ρίζες μπορούν να προσβάλλουν τις LDL λιποπρωτεΐνες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιδεινώνοντας το οξειδωτικό stress. Όλη αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση, που οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών θα συνεχιστεί όσο υπάρχει μοριακό οξυγόνο και δεν υπάρχουν αντιοξειδωτικά για να τη σταματήσουν (187, 188).

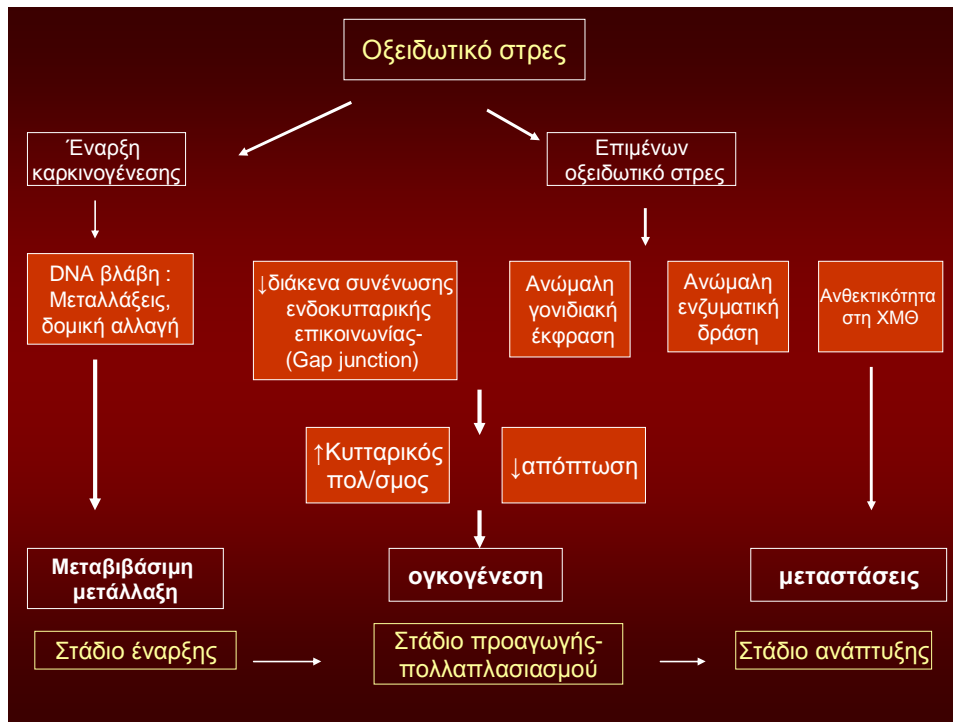
### 3.1.3 Οξειδωτικό stress και καρκινογένεση.

Σύμφωνα με μελέτη των Klaunic et.al. η γένεση ενός όγκου περιλαμβάνει τρία στάδια: το στάδιο έναρξης (initiation stage), το στάδιο προαγωγής ή ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (promotion stage) και το στάδιο προόδου ή επέκτασης-μεταστάσεων (progressive stage). Το οξειδωτικό stress αλληλεπιδρά και στα τρία στάδια (εικόνα 6).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογένεσης και συνεπώς του πρώτου σταδίου είναι η παρουσία γενετικών δομικών αλλαγών (μεταλλάξεις) οι οποίες μπορούν να πυροδοτηθούν από τη παρουσία υψηλών τιμών οξειδωτικού stress και αποτελούν κληρονομήσιμες γενετικές αλλαγές.

Στο στάδιο προόδου η συνεχής επίδραση του οξειδωτικού stress οδηγεί στην ανώμαλη γονιδιακή έκφραση, στην μείωση των διάκενων ενδοκυττάριας επικοινωνίας και στην ανώμαλη έκφραση των δευτερευόντων συστημάτων μεταγωγής σήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή/και την μείωση της απόπτωσης των κυττάρων.

Τέλος στο στάδιο προαγωγής το επιμένον οξειδωτικό stress προκαλεί επιπλέον γενετικές αλλαγές στα αρχικώς εξαλλαγμένα κύτταρα συμβάλλοντας με το τρόπο αυτό σε ανώμαλη ενζυματική δραστηριότητα, μεταστάσεις και ανθεκτικότητα του όγκου στη ΧΜΘ. Οι υψηλές τιμές οξειδωτικού stress προκαλούν ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού συστήματος με αποτέλεσμα το παραγόμενο κατά τη ΧΜΘ οξειδωτικό stress να μην επαρκεί για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου (189).



**Εικόνα 7.** Το οξειδωτικό stress στα τρία στάδια της καρκινογένεσης (189).

Οι γενετικές δομικές αλλαγές που προκαλούνται από τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress (υδροξυλίωση των βάσεων του DNA→μεταλλάξεις) οδηγούν σε ανώμαλη έκφραση των γονιδίων μεταγραφής. Επιπλέον το οξειδωτικό stress προάγει την απόπτωση και τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NFκβ και AP-1 (μέσω της οξειδωσης ή φωσφορυλίωσης αυτών) και αναστέλλοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες bcl-2 και p53. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 αποτελεί σύμπλεγμα πρωτεϊνών (πρωτοογκογονίδια) c-fos, jun-c, jun-B, jun-D τα οποία επάγονται από τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress. Τέλος το οξειδωτικό stress διαταράσσει την ομαλή λειτουργία των συστημάτων μεταγωγής σήματος (signal transfer system) μέσω της οξειδωτικής βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης (λιπιδική υπεροξειδωση), την διαταραχή της ενζυματικής δραστηριότητας (οξειδωση πρωτεϊνών) και/ ή την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων (189).

### **3.1.4 Οξειδωτικό stress και νεοπλασματική αγγειογένεση.**

Το οξειδωτικό stress μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης ως αποτέλεσμα των γενετικών δομικών αλλαγών που επιφέρει αλλά και να συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση του όγκου μέσω της επαγωγής της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά το οξειδωτικό stress αποτελεί από τους πιο σημαντικούς επαγωγείς της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Επάγει τον VEGF μέσω διαφόρων μονοπατιών (Πίνακας 1, κεφάλαιο 2.1.1)

### **3.1.5 Το οξειδωτικό stress στο ΚΠ.**

Ο πνεύμονας αποτελεί έναν εξαιρετο στόχο για το οξειδωτικό stress, λόγω της άμεσης έκθεσής του στις υψηλές πιέσεις οξυγόνου. Είναι γνωστό ότι η μερική πίεση του οξυγόνου στις κυψελίδες είναι πολύ υψηλότερη συγκριτικά με άλλα ζωτικά όργανα, όπως η καρδιά, το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του πνεύμονα είναι η μεγάλη επιφάνειά του (περίπου 70m<sup>2</sup> στον ενήλικα). Λόγω της άμεσης έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα, τα κύτταρα του πνεύμονα υφίστανται οξειδωτικό stress από τα ερεθιστικά του περιβάλλοντος, όπως ο καπνός του τσιγάρου, το όζον, το διοξείδιο του αζώτου και του θείου. Επιπλέον, τα φλεγμονώδη κύτταρα που εμφανίζονται στις περισσότερες παθήσεις του πνεύμονα, παράγουν και απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, ορισμένες θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία, οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, με τον πνεύμονα να είναι το πλέον συχνά εμπλεκόμενο όργανο. Επομένως, ο πνεύμονας αποτελεί το μοναδικό όργανο που είναι άμεσα εκτεθειμένο όχι μόνο στις υψηλές πιέσεις οξυγόνου και τους οξειδωτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος, αλλά και στα οξειδωτικά που παράγονται κατά τη διάρκεια διαφόρων παθήσεων του πνεύμονα και των θεραπειών του. Η πρώτη ενεργός ρίζα οξυγόνου που παράγεται είναι το ανιόν του υπεροξειδίου, το οποίο λαμβάνει μέρος στην παραγωγή άλλων ενεργών μεταβολιτών όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), τη ρίζα του υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του αζώτου.

Το οξειδωτικό stress ευνοεί τη διάσπαση της αλυσίδας της μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, καταλήγοντας είτε στον τραυματισμό των κυττάρων (νέκρωση) είτε στον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Επομένως, ενεργές ρίζες οξυγόνου παράγονται με ποικίλους μηχανισμούς σε διάφορα κυτταρικά σημεία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των παθήσεων του πνεύμονα, μεταξύ των οποίων και στο ΚΠ. Οι οξειδωτικές ρίζες, που σχετίζονται με την καπνιστική συνήθεια, οδηγούν σε πολλαπλές γενετικές μεταβολές των κυττάρων, οι οποίες καταλήγουν στην απενεργοποίηση κατασταλτικών ογκογονιδίων του καρκίνου και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, με τελικό αποτέλεσμα την εκτροπή των κυττάρων από τη φυσιολογική ανάπτυξη (190). Συγκεκριμένα, οι οξειδωτικές ρίζες είναι ικανές να επιδράσουν στην απόπτωση των μιτοχονδρίων, στην κυτταρική απόπτωση που προκαλείται από το p53 γονίδιο και στην ανάπτυξη και γήρανση, που ελέγχονται από άλλα ογκογονίδια, όπως το CKIp21 και το PTEN (191, 192). Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι οι οξειδωτικές ρίζες που παράγονται από την υποξία κατά τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια οδηγούν στην απελευθέρωση του παράγοντα που αυξάνει την αγγειογένεση (VEGF) (193). Επομένως, οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες φαίνεται να εμπλέκονται τόσο στην έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης όσο και στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΠ.

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν τον κύριο προστατευτικό μηχανισμό εναντίον της βλάβης που προκαλείται από τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες, ενώ διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη νοσημάτων που σχετίζονται με την οξείδωση. Οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SODS) είναι τα μόνα ενζυμικά συστήματα που διασπούν τις ρίζες των υπεροξειδίων σε  $H_2O_2$  και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο εναντίον του OS, ειδικά στον πνεύμονα. Υπάρχουν τρία διαφορετικά είδη ανθρώπινων SODS: η ενδοκυττάρια δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου SOD (CuZnSOD), η μιτοχονδριακή δισμουτάση μαγγανίου SOD (MnSOD και η εξωκυττάρια SOD (ECSOD) δισμουτάση (194, 195). Οι SODS εντοπίζονται σε όλα τα κύτταρα του πνεύμονα σε διαφορετικά σημεία και με μεγάλη ποικιλία στην έκφρασή τους. Διάφοροι ενζυμικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στην εξουδετέρωση του  $H_2O_2$  στον πνεύμονα (Οι πλέον σημαντικοί εξουδετερωτές του  $H_2O_2$  είναι η

καταλάση και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης. Χαρακτηριστικό του αντιοξειδωτικού συστήματος στον ανθρώπινο πνεύμονα είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη (περίπου 140 φορές υψηλότερη από αυτή στην κυκλοφορία) και επομένως, η ίδια η γλουταθειόνη και τα ένζυμα που συνδέονται με τη διατήρησή της αποτελούν ένα από τα βασικότερα αντιοξειδωτικά συστήματα του ανθρώπινου πνεύμονα (196, 197). Τα διάφορα κύτταρα του πνεύμονα παρουσιάζουν διαφορετική αντίσταση στο OS και το γεγονός αυτό συνδέεται μερικά με τη διαφορετική έκφραση σ' αυτά των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (τρανσφερίνη, φεριτίνη, σερουλοπλασμίνη, λακτοφερίνη κ.ά.). Μερικές άλλες πρωτεΐνες, όπως η λευκωματίνη, διαθέτουν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων οξειδωτικών ριζών. Τέλος, άλλα αντιοξειδωτικά είναι οι βιταμίνες μικρού μοριακού βάρους, είτε λιποδιαλυτές όπως η βιταμίνη E, είτε υδατοδιαλυτές όπως η βιταμίνη C.

#### **3.1.5.1 Παράγωγα του οξειδωτικού stress στα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ.**

Στο ΚΠ το OS έχει προσδιοριστεί στο πλάσμα, στον ορό, στα ουρά, στον εκπνεόμενο αέρα, σε ιστό και σε καλλιέργειες κυττάρων (Πίνακας 2). Ως δείκτες μέτρησης του OS χρησιμοποιούνταν τα προϊόντα που παράγονται από την οξειδωτική βλάβη: 1. των λιπιδίων 8-isoprostan (8-ισοπροστανόιο), MDA-malondialdehyde (μαλοδιαλδεχίδη), Ethane (Αιθάνη), Peptane (Πεπτάνη), 2. των πρωτεϊνών nitrotyrosine (νιτροτυροσίνη) 3. του DNA 8-OHdG-hydrodeoxyguanosine (8-υδροξυ-οξυγουανοσίνη), καθώς επίσης 4. το επισκευαστικό ένζυμο του DNA (enzyme repairing DNA) OGG1-oxoguanine glycosylase (οξυγουανική γλυκοζυλάση), ο γονότυπος του hOGG1 gene και η πρωτεϊνική του έκφραση hOGGmRNA, 5. το προϊόν οξείδωσης της γουανίνης στο DNA 8 oxodG (oxidation of guanine in DNA) ελεύθερες ρίζες όπως 6. το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. και 7. το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων (overall oxidative stress).

**Πίνακας 2.** Παράγωγα του οξειδωτικού stress στα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ.

<b>Πλάσμα</b>	<p>↓OGG</p> <p>↑MDA</p> <p>PLT και RBC Lipid analyses-πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οξειδωμένες πρωτεΐνες (fibrinogen)</p> <p>↓TRAPS(plasma peroxy radical trapping capacity )</p> <p>↑TBARS (thiobarbituric acid reactive substanses )</p>	<p><i>Paz Elizur et al. 2005</i></p> <p><i>Kaynar et.al. 2005</i></p> <p><i>De Castro et al. 2006</i></p> <p><i>Erhola et al.1997</i></p> <p><i>Look et al. 1994</i></p>
<b>Ούρα</b>	<p>↑ 8 OHdG,</p> <p>↑ 8 OHdG,</p> <p>↑ 8 OHdG,</p>	<p><i>Cooke et. al.2006</i></p> <p><i>Loft et al. 2006</i></p> <p><i>Mizoue et al. 2006</i></p>
<b>Ορό</b>	<p>↑ οξειδωτικό stress ( dROMs test -Diacron)</p> <p>↑8-isoprostane</p>	<p><i>La Torre et al. 1997</i></p> <p><i>Dalaveris et.al.2008</i></p>
<b>Εκπνεόμενο αέρα</b>	<p>↑αλκάνες (monomethylated alkanes),</p> <p>↑ H2O2</p> <p>8-isoprostane</p>	<p><i>Phillips et al. 2003</i></p> <p><i>Lases et al. 2000</i></p> <p><i>Dalaveris et.al.2008</i></p>
<b>Ιστό</b>	<p>↑H2O2</p> <p>↓OGG</p> <p>↑lipid peroxidation products</p>	<p><i>Zieba et al. 2000</i></p> <p><i>Paz Elizur et al. 2005</i></p> <p><i>Zieba et al. 2001</i></p> <p><i>Zieba et al. 2000</i></p>
<b>Καλλιέργεια κυττάρων</b>	<p>↑MDA, LDH, hoGG1mRNA, hoGG1 protein.</p> <p>↓hOGG1 mRNA,↑ 8-oxoG</p>	<p><i>Lin et al. 2006</i></p> <p><i>Mambo et al. 2005</i></p>
<b>DNA-PCR</b>	<p>hOGG1 gene (8 oxoguanine glycosylase ),</p> <p>hOGGmRNA</p>	<p><i>Frosina et al 2006</i></p> <p><i>Mambo et al 2005</i></p>



Σε αρκετές μελέτες στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ, η αξιολόγηση των επιπέδων του OS και της οξειδωτικής βλάβης έγινε μέσω της αξιολόγησης δεικτών όπως MDA, TRAPS TBARS, και OGG. Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (MDA) βρεθήκαν σημαντικά αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ και συσχετίστηκαν με χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (198). Σημαντικά αυξημένα βρεθήκαν και τα ενεργά παράγωγα του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), τα οποία αυξήθηκαν ακόμη περισσότερο στους ασθενείς που έλαβαν ΧΜΘ (199). Από την άλλη οι De Castro et al. προσδιόρισαν το OS μέσω των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης των ερυθροκυτταρών και των αιμοπεταλίων (οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων τους) στο πλάσμα 50 ασθενών με ΜΜΚΠ. Οι ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα των δεικτών αυτών αξιολόγησης του OS (200). Επιπλέον σημαντικός δείκτης αξιολόγησης του OS στους ασθενείς με ΚΠ αποτέλεσε και το επισκευαστικό ένζυμο οξυγουανική γλυκοζυλάση-oxoguanine glycosylase (OGG1). Το ένζυμο OGG1 επιδιορθώνει την βλάβη που προκύπτει από την οξείδωση της βάσης γουανίνης στο DNA (8-oxodG-release of 8 oxoguanine). Το OGG1 προσδιορίστηκε στο πλάσμα, στον ιστό και σε καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τόσο στο πλάσμα όσο και στον ιστό ασθενών με ΜΜΚΠ η ενεργότητα του OGG1 βρέθηκε σημαντικά ελαττωμένη. Συσχετίστηκε δε με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠ στους υγιείς καπνιστές (όσο μικρότερη η ενεργότητα του ενζύμου στους καπνιστές τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ΚΠ) (201). Επιπλέον ελαττωμένη βρέθηκε και η έκφραση του OGG1mRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές 18 ασθενών με ΚΠ έναντι 3 φυσιολογικών κυτταρικών σειρών (202). Επίσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές προσδιορίστηκε και βρέθηκε αυξημένη και η 8-OHdG (8-υδροξυ-οξυγουανοσίνη) ως δείκτης οξειδωτικής βλάβης του DNA (202).

Εκτός από το πλάσμα το OS προσδιορίστηκε και σε άλλα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ. Έτσι, η 8-OHdG προσδιορίστηκε και βρέθηκε αυξημένη σε ούρα (203-205). Επίσης αυξημένα βρεθήκαν και τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και του 8-ισοπροστανίου, ως δείκτες μέτρησης του OS στον ορό (206) και τον εμπνεόμενο αέρα (207) ασθενών με ΚΠ. Τέλος σε μόνο δυο μελέτες το OS προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών με ΚΠ ως το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων (ενδιάμεσα προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων,

πεπτιδίων και αμινοξέων (overall oxidative stress). Σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν εκτιμήθηκε η πιθανή επίδραση του OS στην επιβίωση των ασθενών και η σχέση του με τις διαφορές κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους (206, 208)..

### **3.1.5.2 Το οξειδωτικό stress και ΧΜΘ/ΑΚΘ.**

Η δράση των ΧΜΘ φαρμάκων και η δυνατότητα να οδηγήσουν σε απόπτωση εξαρτάται από το OS (209). Το OS οδηγεί σε αύξηση του  $H_2O_2$ . Μικρή συγκέντρωση  $H_2O_2$  οδηγεί σε απόπτωση μικρού αριθμού κυττάρων ενώ μεγάλη συγκέντρωση  $H_2O_2$  οδηγεί σε πυκνωτική νέκρωση (210-215). Πρόσφατη μελέτη των Lin CS et al. προσδιόρισε τις τιμές του OS πριν και μετά από ΧΜΘ σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και βρήκε συσχέτιση του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Το OS προσδιορίστηκε ως οξειδωτική μιτοχονδριακή βλάβη-oxidative mtDNA damage (8-OHdG στο mtDNA) στον καρκινικό ιστό με PCR. Οι ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ είχαν αυξημένα επίπεδα OS (oxidative mtDNA) (216). Αυξημένες τιμές OS προσδιορίστηκαν και στον ορό ασθενών με συμπαγείς όγκους μεταξύ των οποίων και ασθενείς με ΜΜΚΠ μετά από ΧΜΘ ή ΑΚΘ και ΧΜΘ (206). Επίσης, αυξημένες τιμές OS βρέθηκαν και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΚΠ μετά ΑΚΘ και ΧΜΘ (154). Σε καμία όμως από τις 2 αυτές μελέτες δεν βρέθηκε συσχέτιση του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Έτσι, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η θεραπεία αυξάνει την παραγωγή OS, η δυνατότητα όμως το OS να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---

## 4 ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 81 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα, οι οποίοι διαγνώστηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας το διάστημα Ιανουάριος 2005 – Μάιος 2007.

Οι ασθενείς ήταν 75 άντρες και 6 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $62.48 \pm 0.94$  έτη, (40-79 ετών), 42 καπνιστές, 27 πρώην καπνιστές και 12 μη καπνιστές, σε καλή βιολογική κατάσταση (50 ασθενείς με ECOG performance status (PS)=0 και 31 ασθενείς με PS=1-2. Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών που έλαβαν μέρος πριν την ΧΜΘ ήταν: 51 με ΜΜΚΠ και 30 ασθενείς με ΜΚΠ. Σύμφωνα με την TNM σταδιοποίηση οι ασθενείς με ΜΜΚΠ ήταν : 9 ασθενείς σταδίου I, 3 ασθενείς σταδίου II , 16 ασθενείς σταδίου III και 23 ασθενείς σταδίου IV και με ΜΚΠ: 1 ασθενείς σταδίου I, 2 ασθενείς σταδίου II, 10 ασθενείς σταδίου III και 17 ασθενείς σταδίου IV. Όσον αφορά τον ιστολογικό τύπο των ασθενών με ΜΜΚΠ, σε 12 ασθενείς διαγνώσθηκε αδενοκαρκίνωμα, σε 27 πλακώδες και σε 12 ασθενείς μη ταξινομήσιμο ΜΜΚΠ (Πίνακας 3).

Οι ασθενείς μετά την αρχική εκτίμηση και σταδιοποίηση της νόσου έλαβαν την ενδεδειγμένη θεραπευτική αντιμετώπιση (χειρουργείο, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό τους). Η ΧΜΘ που έλαβαν ήταν συνδυασμός με βάση την πλατίνα και κατά μέσο όρο χορηγήθηκαν 4 κύκλοι (2-6 κύκλοι). Η ανταπόκριση στη ΧΜΘ εκτιμήθηκε με βάση τα WHO κριτήρια. Ακολούθησε τακτική παρακολούθηση των ασθενών με τον απαραίτητο κάθε φορά κλινικοεργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο.

Τόσο ο VEGF όσο και το OS προσδιορίστηκαν και μετά τη ΧΜΘ στον ορό 43 ασθενών. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών ήταν τα ακόλουθα: 26 ασθενείς με ΜΜΚΠ, από τους οποίους 4 με αδενοκαρκίνωμα, 15 με πλακώδες και 7 ασθενείς με μη ταξινομήσιμο ΜΜΚΠ. Όσον αφορά το στάδιο της νόσου: 1 ασθενής ήταν σταδίου I, 0 ασθενής σταδίου II, 14 ασθενείς σταδίου III και 11 ασθενείς σταδίου IV . Επίσης έλαβαν μέρος 17 ασθενείς με ΜΚΠ : 0 ασθενής σταδίου I, 1 ασθενής σταδίου II, 7 ασθενείς

σταδίου III και 9 ασθενείς σταδίου IV. Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών με ΜΜΚΠ ήταν (Πίνακας 3).

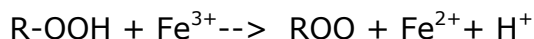
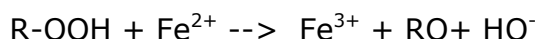
**Πίνακας 3:** Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ, που έλαβε μέρος στην μελέτη καθώς και της υποομάδας των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν και μετά τη ΧΜΘ.

	<b>Σύνολο ασθενών</b>	<b>Υποομάδα ασθενών (πριν και μετά τη ΧΜΘ)</b>
	<b>OS και VEGF</b>	<b>OS και VEGF</b>
Σύνολο	n=81	n=43
Ηλικία (έτη)	62.48 ± 0.94	63.23± 1.38
Φύλο(άνδρας/γυναίκα)	75/6	40/3
Ασθενείς με ΜΜΚΠ	51	26
Αδενοκαρκίνωμα	12	4
Πλακώδες	27	15
Μη ταξινομήσιμο ΜΜΚΠ	12	7
Στάδιο ΜΜΚΠ	9 ασθενείς σταδίου I	1 ασθενής σταδίου I
	3 ασθενείς σταδίου II	0 ασθενείς σταδίου II
	16 ασθενείς σταδίου III	14 ασθενείς σταδίου III
	23 ασθενείς σταδίου IV	11 ασθενείς σταδίου IV
Ασθενείς με ΜΚΠ	30	17
Στάδιο ΜΚΠ	1 ασθενής σταδίου I	0 ασθενής σταδίου I
	2 ασθενείς σταδίου II	1 ασθενής σταδίου II
	10 ασθενείς σταδίου III	7 ασθενείς σταδίου III
	17 ασθενείς σταδίου IV	9 ασθενείς σταδίου IV

## 5 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 Προσδιορισμός του OS.

Για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού stress τα δείγματα του ορού αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρακέντηση και χρησιμοποιήθηκε μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος (d-ROMs test, Diacron, Grosseto, Italy), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί σε δείγμα αίματος. Πρόκειται για μια σπεκτροφωτομετρική μέθοδος, η οποία προσδιορίζει το ολικό οξειδωτικό stress μετρώντας υδροϋπεροξειδία. Τα υδροϋπεροξειδία είναι ενδιάμεσα παράγωγα οξειδωτικής βλάβης σε λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια. Αμέσως μετά την αιμοληψία ο ορός φυγοκεντρείται και 20 μL αυτού εγχέεται σε 1 mL όξινου διαλύματος (pH=4.8, R1 αντιδραστήριο). Τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) αντιδρούν με ιόντα μετάλλων μεταφοράς, που απελευθερώνονται από πρωτεΐνες και μετατρέπονται σε αλκοξύλια (RO) και υπεροξύλια (ROO) σύμφωνα με την αντίδραση Fenton.



Αυτά τα νέα παράγωγα, οι ποσότητες των οποίων είναι ανάλογες των υπεροξειδίων στον ορό, δεσμεύονται από 20 μL χρωμογόνου (N,N-διεθυλπαραφαινυλδιαμίνη, R2 αντιδραστήριο). Το ροζ χρώμα που προκύπτει από την αντίδραση προσδιορίζεται φωτομετρικά (Perkin Elmer λ16 Norwalk, Connecticut, USA) στα 505 nm. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τη συγκεκριμένη μέθοδο εκτιμώνται με Carratelli Units, UCarr, 1 UCarr αντιστοιχεί σε 0.8 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.2 Προσδιορισμός του VEGF.

Τα δείγματα του ορού μετά την φλεβοκέντηση φυγοκεντρήθηκαν άμεσα στις 2000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε eperdorf και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Οι συγκεντρώσεις του VEGF προσδιορίστηκαν με εμπορικά διαθέσιμα kits ( VEGF: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) και σύμφωνα

με τις αρχές του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας. Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης για τον VEGF ήταν 9 pg/mL. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του παραπάνω δείκτη επιτεύχθηκε με την χρήση της ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays, ELISA). Σε ELISA ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου επισυνάπτεται σε μια επιφάνεια, και έπειτα ένα συγκεκριμένο αντίσωμα πλένεται πέρα από την επιφάνεια έτσι ώστε μπορεί να δεσμεύσει στο αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο, και στο τελικό βήμα μια ουσία προστίθεται που το ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα. Κατά συνέπεια στην περίπτωση του φθορισμού ELISA, όταν λάμπουν το φως επάνω στο δείγμα, οποιαδήποτε συγκροτήματα αντιγόνων/αντισωμάτων θα φθορίσουν έτσι ώστε το ποσό αντιγόνου στο δείγμα μπορεί να μετρηθεί. Η εκτέλεση ενός ELISA περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με την ιδιομορφία για ένα ιδιαίτερο αντιγόνο. Το δείγμα με ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου είναι ακινητοποιημένο σε μια στερεά υποστήριξη (συνήθως ένα microtiter πολυστυρολίου πιάτο) είτε μη-συγκεκριμένα (μέσω της προσρόφησης στην επιφάνεια) είτε συγκεκριμένα (μέσω της σύλληψης από ένα άλλο αντίσωμα συγκεκριμένο για το ίδιο αντιγόνο, σε ένα "σάντουιτς" ELISA). Αφότου ακινητοποιείται το αντιγόνο το αντίσωμα ανίχνευσης προστίθεται, διαμορφώνοντας ένα συγκρότημα με το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδεθεί covalently με ένα ένζυμο, ή μπορεί ο ίδιος να ανιχνευθεί από ένα δευτεροβάθμιο αντίσωμα που συνδέεται με ένα ένζυμο μέσω του bioconjugation. Μεταξύ κάθε βήματος το πιάτο πλένεται χαρακτηριστικά με μια ήπια καθαριστική λύση για να αφαιρέσει οποιαδήποτε πρωτεΐνες ή αντισώματα που δεν είναι συγκεκριμένα συνδεδεμένες. Μετά από το τελικό βήμα πλυσίματος το πιάτο αναπτύσσεται με την προσθήκη ενός ενζυματικού υποστρώματος για να παραγάγει ένα ορατό σήμα, το οποίο δείχνει την ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα.

### 5.3 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια των στατιστικών προγραμμάτων GraphPad-Prism (έκδοση 5.0) και Medcalc (έκδοση.8.0)

Ελέγχθηκε η κατανομή των μετρήσεων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές  $\pm$  σφάλμα στατιστικού μέσου (mean  $\pm$  SEM), εκτός εάν έχουν χρησιμοποιηθεί άλλες μεταβλητές οι οποίες και αναφέρονται. Για τη σύγκριση τιμών της ίδιας ποσοτικής παραμέτρου σε δύο ανεξάρτητες ομάδες, χρησιμοποιήθηκε η μη κατά ζεύγη ανάλυση (Unpaired t-test) στην περίπτωση κανονικής κατανομής, ενώ στην περίπτωση μη κανονικής κατανομής εφαρμόστηκε η διαδικασία Mann-Whitney U test. Ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών εκτιμήθηκε με βάση τον συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (κανονική κατανομή τιμών) ή κατά Spearman (μη κανονική κατανομή τιμών). Χρησιμοποιήθηκε η ROC καμπύλη (Receiver operating characteristic) για να καθοριστούν οι διαχωριστικές τιμές (cut off values), η ευαισθησία και η ειδικότητα των τιμών του VEGF και του OS. Η προγνωστική αξία των παραγόντων προσδιορίστηκε με τη μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate analysis). Ορίστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και η σύγκρισή τους έγινε με Log-rank test. Για την εύρεση των παραγόντων με ανεξάρτητη προγνωστική αξία χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate analysis). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του  $p < 0.05$ .

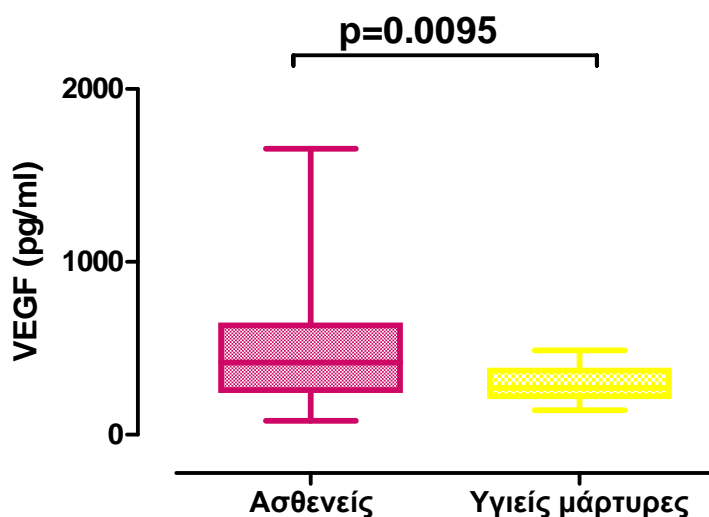
## 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι τιμές του VEGF και του OS σε 81 ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ, πριν από κάθε θεραπεία και διερευνήθηκε η συσχέτιση των επιπέδων τους. Επίσης οι τιμές τους συσχετίστηκαν με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ και με την επιβίωση των ασθενών. Τόσο ο VEGF όσο και το OS προσδιορίστηκαν σε 43 από τους 81 ασθενείς και μετά το πέρας της ΧΜΘ και αξιολογήθηκε κατά πόσο τα επίπεδά τους επηρεάστηκαν από την ΧΜΘ καθώς και η μεταξύ τους συσχέτιση μετά τη θεραπεία.

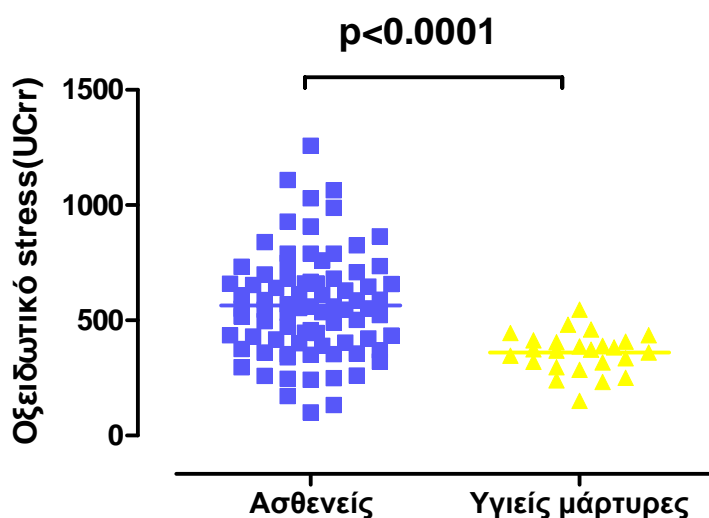
### 6.1 Οι τιμές του VEGF και του OS κατά την διάγνωση.



Οι τιμές του VEGF κατά την διάγνωση ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων (median 418.0 (min 80.43, max 1655) vs median 272.0 (min 142.2, max 487.9)  $p=0.0095$ ) (Εικόνα.8). Σημαντικά αυξημένες ήταν και οι τιμές του OS στους ασθενείς με ΚΠ έναντι των υγιών μαρτύρων ( $564.6 \pm 25.15$  UCarr vs  $360.1 \pm 17.46$  UCarr,  $p<0,0001$ ) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 8.** Οι τιμές του VEGF στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων.



**Εικόνα 9 :** Οι τιμές του OS στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων.

Χρησιμοποιήθηκε η ROC καμπύλη (Receiver operating characteristic) για να καθοριστούν οι διαχωριστικές τιμές ( cut off values) για το VEGF και

το OS. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των τιμών του VEGF στους ασθενείς με ΚΠ ήταν 71.60% (95% CI=60.50% με 81.07%) και 64.00% αντίστοιχα (95% confidence interval=42.52% με 82.03% ), σε διαχωριστική τιμή (cut off value) 304,7pg/ml. Η περιοχή κάτω της καμπύλης βρέθηκε στατιστικά σημαντική (Area under curve=0.6620, standard error=0.05414, 95% confidence interval=0.5558 με 0.7681,  $p=0.015$ ).

Πολύ καλή ευαισθησία και ειδικότητα εμφάνισαν και οι τιμές του OS στους ασθενείς με ΚΠ. Έτσι η ευαισθησία ήταν 74.07% (95% confidence interval = 63.14% με 83.18%) και η ειδικότητα 80.0% αντίστοιχα (95% confidence intervall=59.30% με 93.17%), σε διαχωριστική τιμή (cut off value) 415 pg/ml. Και σε αυτή τη περίπτωση η περιοχή κάτω της καμπύλης βρέθηκε στατιστικά σημαντική. (Area under curve=0.8017, standard error=0.04, 95% confidence interval=0.7206 με 0.8829,  $p<0.0001$ ).

## **6.2 Συσχέτιση του VEGF και του OS με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.**

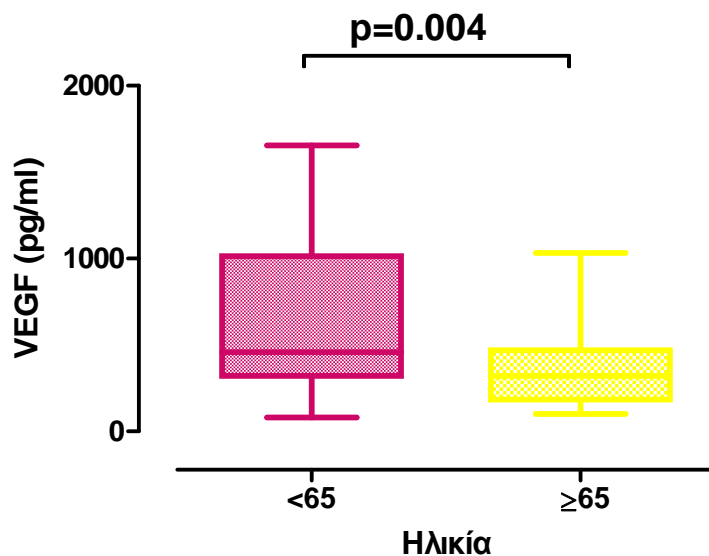
Έγινε συσχέτιση των τιμών του VEGF και του OS με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η καπνιστική συνήθεια, η βιολογική κατάσταση, το T, το N, το M, το στάδιο (σύμφωνα με την σταδιοποίηση TNM) και ο ιστολογικός τύπος. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4:** Τα στατιστικά αποτελέσματα των τιμών του VEGF και του OS με τις διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Σε κανονική κατανομή (unpaired t-test ) σημειώνονται οι μέσες τιμές± σφάλμα μέσου όρου (mean±SEM), ενώ σε μη κανονική κατανομή (Mann Whitney) οι διάμεσες τιμές (median) και η μικρότερη και μεγαλύτερη τιμή (min, max).

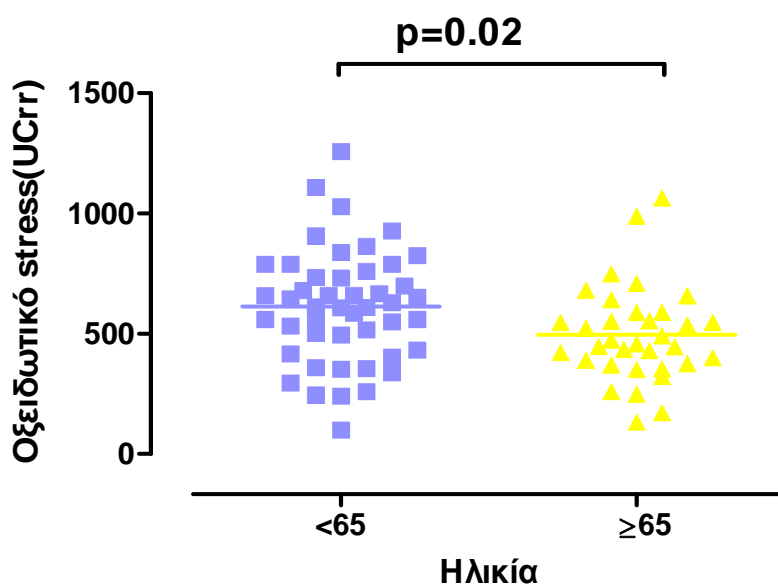
		<b>ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS (UCarr)</b>			<b>VEGF (pg/ml)</b>	
		<b>n</b>	<b>Median (min/max)</b>	<b>p-value</b>	<b>Median (min/max)</b>	<b>p-value</b>
<b>ηλικία</b>	<b>&lt;65</b>	47	<b>Mean±SEM</b> 613.6 ± 34.32	<b>0.0213</b>	457.5 (80.43/1655)	<b>0.0040</b>
	<b>≥65</b>	34	<b>Mean±SEM</b> 497.0 ± 33.84		322.0 (100.6/1032)	
<b>απώλεια βάρους</b>	<b>&lt; 5%</b>	58	<b>Mean±SEM</b> 542.9 ± 28.30	0.1716	426.4 (100.2/1551)	0.9916
	<b>≥ 5%</b>	23	<b>Mean±SEM</b> 619.4 ± 51.76		354.0 (80.43,1655)	
<b>Βιολογική κατάσταση</b>	<b>0</b>	50	<b>Mean±SEM</b> 555.1 ± 33.03	0.6329	376.8 (100.2/1551)	0.1484
	<b>1-2</b>	31	<b>Mean±SEM</b> 580.0 ± 38.99		456.7 (80.43/1655)	
<b>Ιστολογικός τύπος</b>	<b>ΜΜΚΠ</b>	52	546.5 (101.0/1257)	0.3975	450.8 (100.2/1655)	0.0796
	<b>ΜΚΠ</b>	29	609.0 (297.0/929.0)		322.0 (80.43/1551)	
<b>T- στάδιο</b>	<b>T1-T2</b>	29	551.0	0.6665	440.0	0.8981

			(101.0/1064)		(100.2,1568)	
	<b>T3-T4</b>	52	557.5		376.8	
			(132.0/1257)		(80.43/1655)	
<b>N- στάδιο</b>	<b>N0-N1</b>	33	547.0	0.2589	442.0	0.7402
			(132.0/1030)		(100.2/1568)	
	<b>N2-N3</b>	48	588.5		366.8	
			(101.0/1257)		(80.42/1655)	
<b>M -στάδιο</b>	<b>M0</b>	43	533.0	0.9840	442.0	0.3158
			(243.0/1257)		(100.2/1568)	
	<b>M1</b>	38	570.5		372.0	
			(101.0/1030)		(80.42/1655)	
<b>Στάδιο</b>	<b>I-III A</b>	18	561.0	0.7988	469.4	0.1429
			(246.0/1064)		(100.2/1568)	
	<b>III B-IV</b>	63	546.5		80.43	
			(101.0/1257)		(370.0/1655)	

Οι τιμές του VEGF κατά τη διάγνωση βρεθήκαν αυξημένες στους νεότερους ασθενείς (ηλικίας < 65 ετών) σε σχέση με τους ηλικιωμένους ασθενείς, median 457.5 (min 80.43, max 1655) vs median 322 (min 100.6, max 1032), αντίστοιχα,  $p=0.004$  (Εικόνα 10). Μεγαλύτερες βρεθήκαν και οι τιμές του OS στους ασθενείς < 65 ετών ( $613.6 \pm 34.32$ ) σε σχέση με αυτές των ηλικιωμένων ( $497.0 \pm 33.84$ ),  $p=0.02$ . (Εικόνα 11). Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών του VEGF και του OS σε σχέση με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Εντούτοις, οι τιμές του VEGF εμφανίζουν μια τάση συσχέτισης με τον ιστολογικό τύπο καθώς φάνηκε να είναι αρκετά μεγαλύτερες στους ασθενείς με ΜΜΚΠ σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΜΚΠ ( $p=0.07$ ).



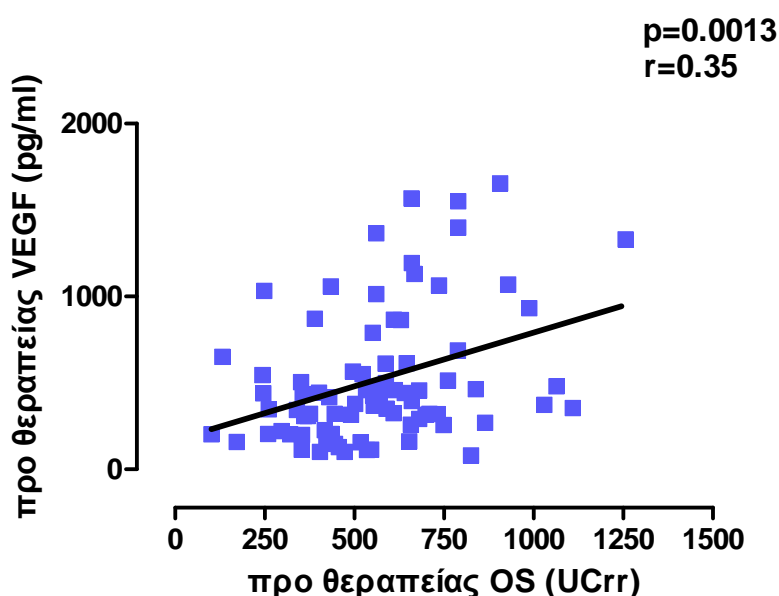
**Εικόνα 10.** Συσχέτιση του VEGF με την ηλικία των ασθενών. Οι τιμές του είναι υψηλότερες στους ασθενείς <65 ετών.



**Εικόνα 11.** Συσχέτιση του OS με την ηλικία των ασθενών. Οι τιμές του OS είναι υψηλότερες στους ασθενείς <65 ετών.

### 6.3 Συσχέτιση του VEGF με το OS κατά την διάγνωση.

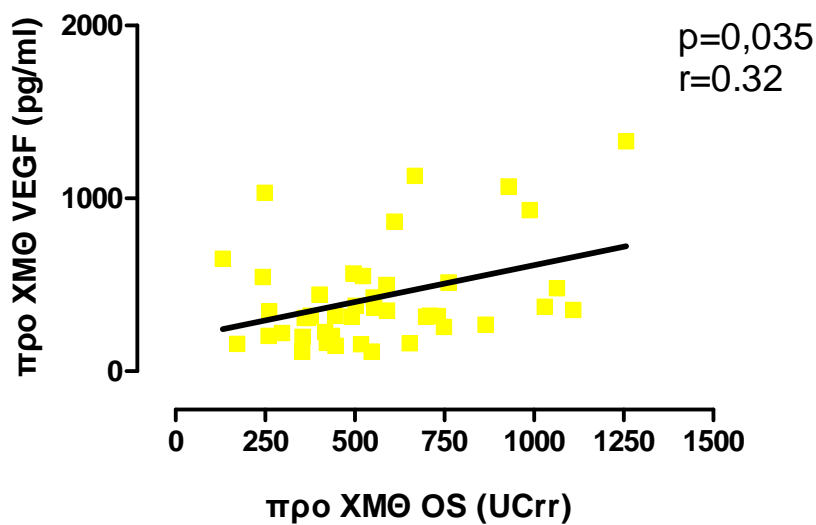
Βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του VEGF και του OS στον ορό των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ πριν από οποιαδήποτε θεραπεία ( $p=0.0013$ ,  $r=0.35$ ) ( Εικόνα 12).



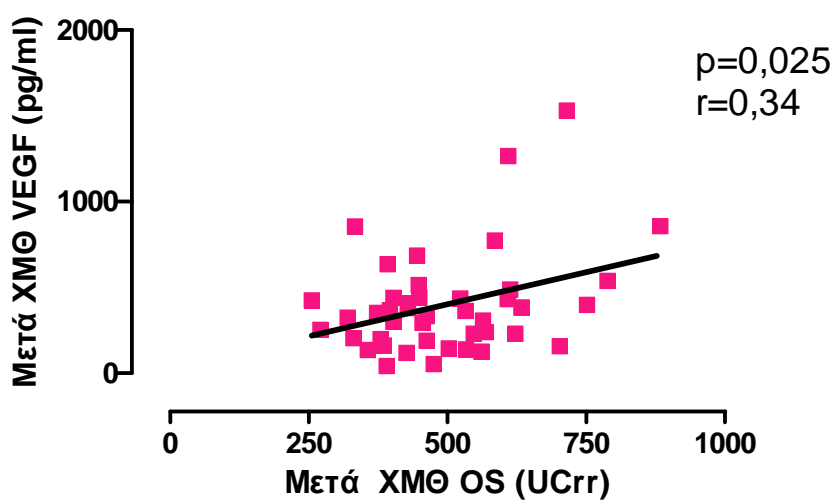
**Εικόνα 12.** Συσχέτιση του VEGF και του OS στους ασθενείς με ΚΠ πριν την θεραπεία.

### 6.4 Συσχέτιση του VEGF με το OS μετά τη ΧΜΘ.

Στο σύνολο των 43 ασθενών οι οποίοι έλαβαν ΧΜΘ με βάση τη πλατίνα, η σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του VEGF με το OS παρατηρήθηκε τόσο πριν ( $p=0.035$ ,  $r=0.032$ ) όσο και μετά την χημειοθεραπεία ( $p=0.025$ ,  $r=0.34$ ) Εικόνες 13Α και 13Β.



**Εικόνα 13Α.** Συσχέτιση του VEGF και του OS στους ασθενείς με ΚΠ προ χημειοθεραπείας.



**Εικόνα 13Β.** Συσχέτιση του VEGF και του OS στους ασθενείς με ΚΠ μετά την χημειοθεραπεία.

## 6.5 Σχέση VEGF και OS με την χορήγηση ΧΜΘ.

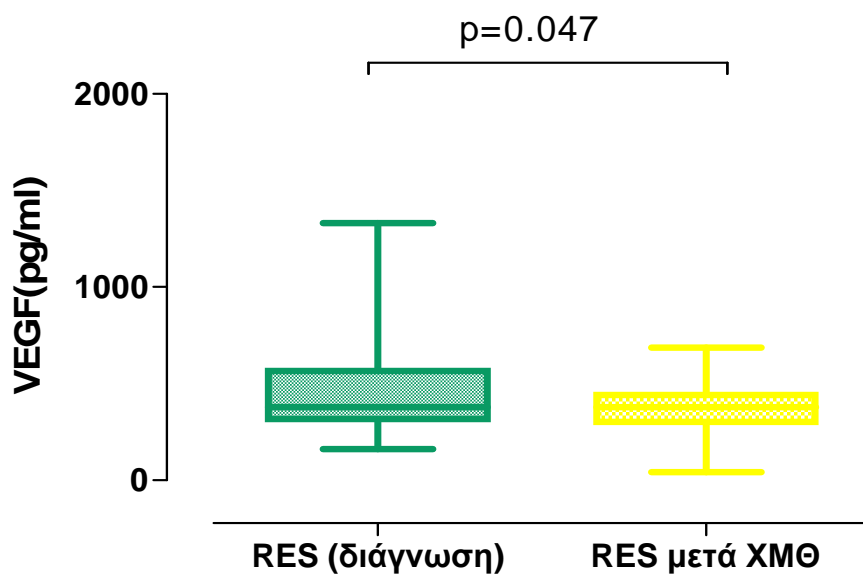
Οι τιμές του VEGF κατά τη διάγνωση δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά με τις τιμές του μετά τη ΧΜΘ,  $p=0.3$ , median 322.0 (min 114.6, max 1331) vs median 352.0 (min 41.58, 1532 max) αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε επίσης και μεταξύ των τιμών του OS κατά τη διάγνωση και μετά τη ΧΜΘ  $p=0.2$ , median 517.0, (min 132.0, max 1257) vs median 462.0 (min 255.0, max 883.0) αντίστοιχα.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση του VEGF και του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ-Responders (πλήρη ή μερική ανταπόκριση) και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν-Non-Responders (ασθενείς με σταθερή νόσο και πρόοδο νόσου). Έτσι, οι τιμές κατά τη διάγνωση, τόσο του VEGF όσο και του OS, στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ (N=19) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τις τιμές τους στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς (N=24),  $p=0.0774$  ( $515.3 \pm 78.71$  vs  $356.3 \pm 47.26$ ) και  $p=0.5799$  ( $587.7 \pm 63.44$  vs  $542.0 \pm 52.90$ ) αντίστοιχα.

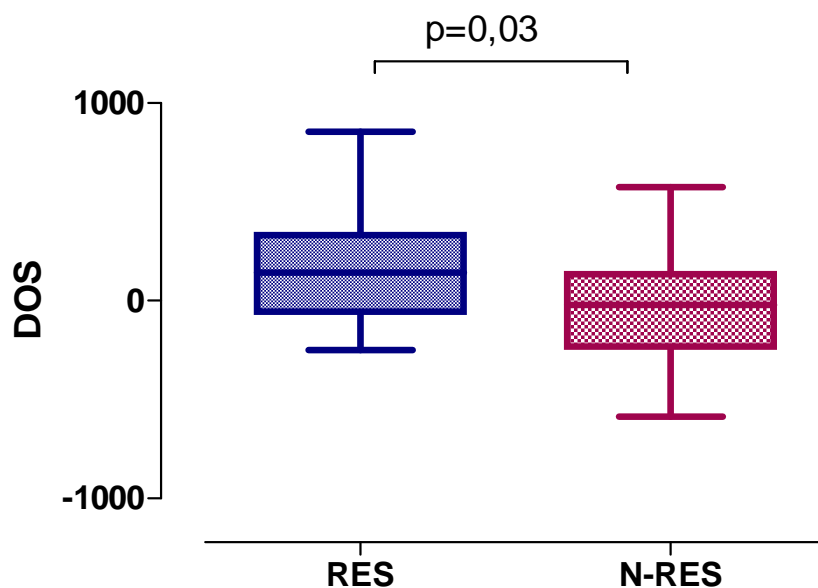
Εντούτοις, η μεταβολή των τιμών του OS (DOS) στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ ήταν μεγαλύτερη από την μεταβολή των τιμών του OS στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ ( $164.9 \pm 66.34$  vs  $-34.14 \pm 60.02$ ,  $p=0,03$  (Εικόνα 15).

Επιπλέον βρέθηκε σημαντική μείωση των τιμών του VEGF στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ μετά το πέρας αυτής ( $p=0.047$ ). (Εικόνα 14), ενώ οι τιμές του OS στους ανταποκρινόμενους στη ΧΜΘ δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.07$ ).





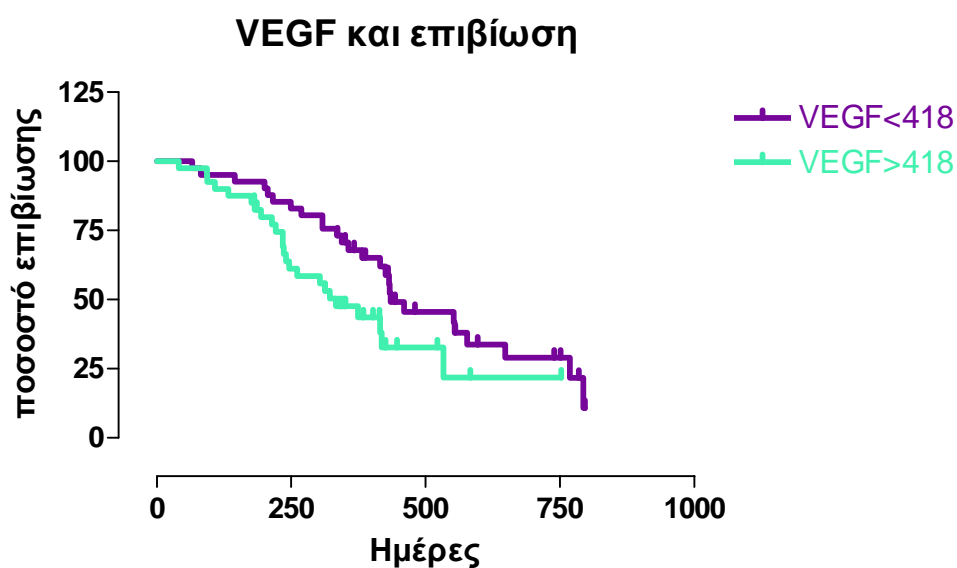
**Εικόνα 14.** Οι τιμές του VEGF στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ είχαν σημαντική μείωση μετά το πέρας αυτής (RESPONDERS-ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ).



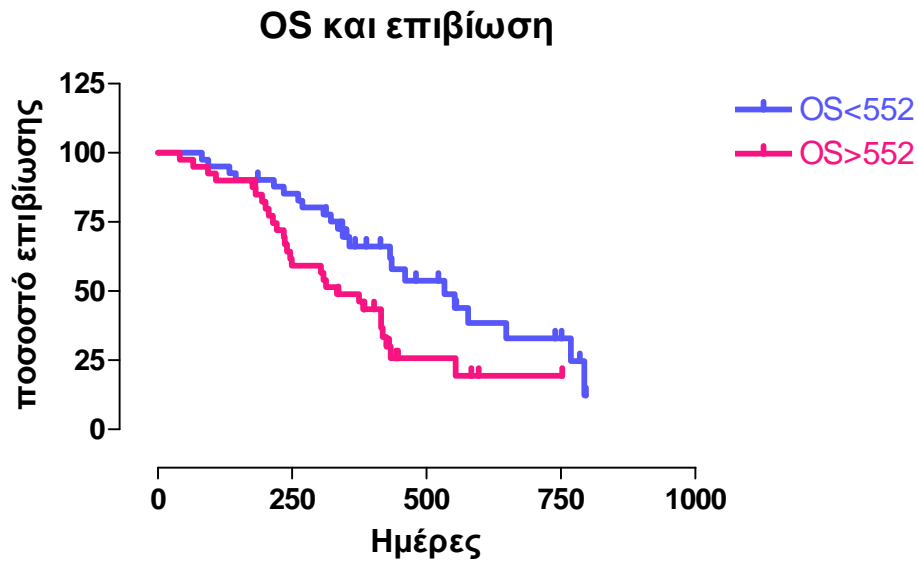
**Εικόνα 15.** Η μεταβολή των τιμών του οξειδωτικού στρες (DOS) στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ ήταν μεγαλύτερη από την μεταβολή των τιμών του OS στους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ (RESPONDERS-ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ, NON RESPONDERS-ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν).

## 6.6 Σχέση του VEGF και του OS με την επιβίωση των ασθενών.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του VEGF με τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Ασθενείς με επίπεδα VEGF > 418 pg/ml (στατιστικός μέσος) είχαν μικρότερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα (333 ημέρες vs 435 ημέρες, αντίστοιχα,  $p=0.0488$ , Log Rank test) (Εικόνα 17). Επίσης αναδείχθηκε η αρνητική προγνωστική αξία και του OS καθώς οι ασθενείς με επίπεδα OS > 552 Ucarr (στατιστικός μέσος) έζησαν λιγότερο από τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα OS (333 ημέρες vs 533 ημέρες, αντίστοιχα,  $p=0.015$ , Log Rank test) (Εικόνα 18)



**Εικόνα 17.** Οι ασθενείς με τιμές VEGF μεγαλύτερες των 418 pg/ml έχουν μικρότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με μικρότερες τιμές (ημέρες 333 vs 435 ημέρες, αντίστοιχα,  $p=0.0488$ , Log Rank test)



**Εικόνα 18.** Οι ασθενείς με τιμές OS μεγαλύτερες των 552 UCrr έχουν μικρότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με μικρότερες τιμές (ημέρες 333 vs 533 ημέρες, αντίστοιχα,  $p=0.015$ , Log Rank test).

Επιπρόσθετα, μονοπαραγοντική ανάλυση (univariate analysis) πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της προγνωστικής αξίας και των άλλων κλινικοεργαστηριακών παραγόντων: απώλεια βάρους, PS, ηλικία, ιστολογικός τύπος, παράγοντας-T, -N και -M καθώς και το στάδιο της νόσου. Τελικά, στη μονοπαραγοντική ανάλυση, αυτοί που φάνηκαν να έχουν προγνωστική αξία ήταν ο VEGF, το OS, η απώλεια βάρους, η ηλικία και το PS όπως φαίνεται στο Πίνακα 5.

Ανάγοντας όμως το VEGF και το OS στο πολυπαραγοντικό (multivariate analysis) μοντέλο μαζί με τους άλλους παράγοντες του μονοπαραγοντικού μοντέλου, που φάνηκαν να έχουν προγνωστική αξία (απώλεια βάρους, ηλικία και PS), ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες φάνηκαν να αποτελούν μόνο ο VEGF και η ηλικία ( $p=0.0291$ , HR= 1.0009, 95% CI = 1.0001 έως 1.0016 και  $p=0.0423$ , HR=0.9781, 95% CI=0.9575 έως 0.9991, αντίστοιχα.)

**Πίνακας 5:** Τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής ανάλυσης (univariate analysis) στους ασθενείς με ΚΠ.

### ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-Univariate analysis

	<b>Ασθενείς</b>	<b>Hazard ratio</b>	<b>95% CI</b>	<b>p value</b>	<b>Μέση Επιβίωση (ημέρες)</b>
<b>OS</b>	40 <552 UCrr 41 >552 UCrr	0.485	0.2706 - 0.8692	0.015	533 333
<b>VEGF</b>	40 <418 pg/ml 41 >418 pg/ml	0.5453	0.2983 - 0.9969	0.049	435 333
<b>Ηλικία</b>	30 ≤65 51 >65	1.891	1.089 - 3.442	0.024	335 533
<b>Απώλεια βάρους</b>	23 (-) 58 (+)	0.4898	0.2006 - 0.8241	0.012	460 335
<b>PS</b>	31 (1-2) 50 (0)	0.5090	0.2662 - 0.8645	0.014	435 356

## 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έχουν διαπιστώσει την σημαντική επαγωγή του VEGF από το OS χωρίς όμως οι μηχανισμοί να είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Στις μελέτες αυτές υποδεικνύεται η επαγωγή του VEGF ως αποτέλεσμα υπερπαραγωγής των ROS. Τα αυξημένα όμως επίπεδα ROS είναι αποτέλεσμα διαταραχής του ισοζυγίου μεταξύ των παραγόμενων επιπέδων ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, συνεπώς του OS. Επίσης υποδεικνύεται η ρύθμιση της αγγειογένεσης από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες με κυριότερο τον NF-kB, η επαγωγή του οποίου ρυθμίζεται από τα επίπεδα του OS. Ο NFkB είναι ο μόνος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενέχεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (ενεργοποιώντας διάφορα ογκογονίδια) και την αναστολή της απόπτωσης, προάγοντας μ' αυτό το τρόπο την αγγείωση του όγκου. Επιπλέον οι ROS καταστέλλουν τον bcl-2 και επάγουν τον p53, έτσι αυξημένα επίπεδα OS αναστέλλουν την κυτταρική απόπτωση και οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σημειώνεται δε, ο σημαντικός ρόλος του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και του NO στην νεοπλασματική αγγειογένεση. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις επάγει το VEGF mRNA, συνεπώς τον ενδοθηλιακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ένα τέλειο «δοσοεξαρτώμενο» μηχανισμό. Το NO επίσης προάγει το πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και είναι σημαντικός ο ρόλος του στην ενεργοποίηση και έκφραση των VEGF γονιδίων. Υπογραμμίζεται συνεπώς η επαγωγή πολλών αγγειογενετικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και του VEGF από τα επίπεδα του OS.

Ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης στηρίχθηκε στην αποδεκτή πλέον βιβλιογραφικά επαγωγή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης από το OS και το VEGF σε μοριακό επίπεδο, με στόχο τη διερεύνηση της μεταξύ τους σχέσης και σε κλινικό επίπεδο στον ΚΠ. Η ανάδειξη της συνεργίας τους στον ΚΠ, επιβεβαιώνει τη ρύθμιση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης από τους δυο αυτούς παράγοντες και σε κλινικό επίπεδο. Αναδεικνύεται έτσι, η πιθανή μελλοντική τους χρήση, μαζί με άλλες κλινικές πληροφορίες, ως δείκτες παρακολούθησης της πορείας των ασθενών με ΚΠ. Επιπρόσθετα, η προσπάθεια διερεύνησης τόσο της προβλεπτικής όσο

και της προγνωστικής τους αξίας, είναι μείζονος ενδιαφέροντος στους ασθενείς με ΚΠ εφόσον η μέχρι σήμερα θεραπευτική αντιμετώπιση δεν έχει προσφέρει τα μέγιστα.

### **Τα επίπεδα του VEGF στο ΚΠ.**

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό ασθενών με ΚΠ. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με το μεγαλύτερο μέρος των μέχρι τώρα μελετών στο ΚΠ (135, 136, 138, 139). Έτσι, οι Takigawa et. al προσδιόρισαν και βρήκαν σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα του VEGF σε σύνολο 70 ασθενών με ΚΠ ανεξάρτητα ιστολογικού τύπου. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και μελέτες στις οποίες ο VEGF προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών τόσο με ΜΜΚΠ και όσο και με ΜΚΠ.

Στη μελέτη μας, δεν αναδεικνύεται συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με καμία από τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους πλὴν της ηλικίας των ασθενών. Στη διεθνή βιβλιογραφία καμία μελέτη δεν βρήκε συσχέτιση του VEGF με το φύλο, την ηλικία και την απώλεια βάρους του ασθενούς, ενώ με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της μελέτη, τα επίπεδα του VEGF βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με ΚΠ <65 ετών. Οι μέχρι τώρα μελέτες σε κλινικό και μοριακό επίπεδο δεν διαπίστωσαν συσχέτιση του VEGF με την ηλικία των ασθενών στο ΚΠ. Εντούτοις, ανάλογο εύρημα παρουσιάζει μελέτη που διενεργήθηκε σε πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, οι Rivard et.al. χρησιμοποίησαν λεία μυϊκά κύτταρα από το αγγειακό τοιχώμα της αορτής ποντικών τα οποία υπέβαλλαν σε συνθήκες υποξίας. Διαπίστωσαν ότι στα νεότερα ποντίκια τα επίπεδα του VEGF ήταν υψηλότερα καθώς και η έκφραση του HIF-1 σε σύγκριση με τα ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας (217).

Επίσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του VEGF με την βιολογική κατάσταση του ασθενούς. Τα επίπεδα του VEGF στους ασθενείς με χειρότερη βιολογική κατάσταση (PS 1-2) δεν διαφέρανε σημαντικά από τα επίπεδα του VEGF στους ασθενείς με καλή βιολογική κατάσταση (PS 0).

Σε μελέτη των Chakra et al. οι οποίοι προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF σε 451 ασθενείς με ΜΜΚΠ, πριν και μετά τη ΧΜΘ, οι τιμές του VEGF ήταν πολύ υψηλότερες στους ασθενείς με  $PS \geq 2$ . (136). Η αδυναμία συσχέτισης του VEGF με το PS στη παρούσα μελέτη, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν συμπεριλήφθησαν ασθενείς με  $PS > 2$ . Ίσως σε ασθενείς με χειρότερη βιολογική κατάσταση ( $PS > 2$ ) τα επίπεδα του VEGF να διαφέρουν σημαντικά.

Επιπλέον τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του VEGF μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ και των ασθενών με ΜΚΠ. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα ευρήματα των πιο πρόσφατων μελετών, σύμφωνα με τα οποία ο VEGF δεν συσχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο στους ασθενείς με ΚΠ (133, 165). Συγκεκριμένα οι Saglam et.al. προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF στον ορό 40 ασθενών (31 ασθενείς με ΜΜΚΠ και 9 ασθενείς με ΜΚΠ) πριν την θεραπεία και δεν διαπίστωσαν καμιά συσχέτιση αυτού με τον ιστολογικό τύπο (133). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Naumnik et.al. οι οποίοι διερεύνησαν τη σχέση όχι μόνο του VEGF αλλά και των ισομορφών του VEGF C, VEGF D και του υποδοχέα VEGFR-2 με τον ιστολογικό τύπο χωρίς όμως να βρουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση (165). Στο σημείο όμως αυτό θα πρέπει να αναφερθεί μια τάση συσχέτισης του VEGF με τον ιστολογικό τύπο των ασθενών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας οι ασθενείς με ΜΜΚΠ είχαν υψηλότερα επίπεδα VEGF εάν και μη στατιστικά αξιολογήσιμα. Προς αυτή όμως τη κατεύθυνση απαιτούνται αρκετές ακόμη μελέτες με μεγαλύτερο εύρος ασθενών.

Επιπρόσθετα, στη παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του VEGF με την λεμφαγγειακή διασπορά. Η μελέτη μας είναι σύμφωνη με πρόσφατη μελέτη των Kaya et al. οι οποίοι δεν διαπιστώνουν υψηλότερα επίπεδα VEGF σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις  $N \geq 2$  σε σχέση με τους ασθενείς ελεύθερων λεμφαδενικών μεταστάσεων ή με N1 επιχώριους λεμφαδένες. Εντούτοις υπάρχουν αρκετές παλαιότερες μελέτες που καταλήγουν στο αντίθετο αποτέλεσμα (164, 169). Συγκεκριμένα οι Tamura et.al. προσδιόρισαν τόσο τις τιμές του VEGF όσο και της ισομορφής του VEGF-C στον ορό 91 ασθενών με ΜΜΚΠ και διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα αυτών στους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (164). Στο ίδιο

αποτέλεσμα κατέληξαν οι Ohta et.al. οι οποίοι προσδιόρισαν εκτός από τα επίπεδα του VEGF στον ορό και την έκφραση του VEGFmRNA στους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (169). Ίσως μονό τα επίπεδα της VEGF-C ισομορφή του, η οποία ενέχεται αποκλειστικά στην ανάπτυξη λεμφαδενικών μεταστάσεων σύμφωνα με *in vitro* μελέτες (218), να συσχετίζονται με την λεμφαγγειακή διασπορά στους ασθενείς με ΚΠ. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγει τελευταία μελέτη των Donnem et al η οποία πραγματοποιήθηκε σε καρκινικό ιστό ασθενών με ΜΜΚΠ και κατέδειξε την αυξημένη έκφραση της VEGF-C ισομορφής στους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις τόσο σε επιχώριους όσο και σε απομακρυσμένους λεμφαδένες (219).

Επιχειρήθηκε επίσης, η ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του VEGF. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των τιμών του VEGF με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Τα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι αντικρουόμενα. Σε αρκετές μελέτες δεν αναγνωρίστηκε η προβλεπτική αξία του VEGF (134, 139, 220). Οι Tas et.al. προσδιόρισαν τις τιμές του VEGF και Bcl-2 στον ορό ασθενών με ΜΜΚΠ πριν και μετά τη ΧΜΘ. Οι τιμές και των δυο δεικτών δεν συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση στη θεραπεία (134). Η ίδια ομάδα ερευνητών σε μια δεύτερη μελέτη προσδιόρισε τις τιμές του VEGF και της IL-8 στον ορό ασθενών με ΜΚΠ πριν και μετά τη ΧΜΘ καταλήγοντας στο ίδιο συμπέρασμα (139). Και πάλι η ίδια ερευνητική ομάδα το 2008 σε ασθενείς με ΜΜΚΠ καταδεικνύει την μη συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Οι ασθενείς είχαν διαχωριστεί σε ασθενείς που έλαβαν μέγιστη δόση ΧΜΘ (*maximum-tolerated doses*, MTD) και ασθενείς που έλαβαν χαμηλή δόση ΧΜΘ (*low-dose metronomic chemotherapy*, LDM). Το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο και στις δυο ομάδες. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι υπάρχουν και μελέτες που κατέληξαν σε αντίθετο από το δικό μας συμπέρασμα καθώς διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση του VEGF με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ (171, 172, 174, 221, 222). Σε αυτές συγκαταλέγεται η μελέτη των Dudek et. al. οι οποίοι προσδιόρισαν εκτός από τα επίπεδα του VEGF και τα επίπεδα της ενδοστατίνης, του bFGF και της TSP σε 21 ασθενείς με ΜΜΚΠ και διαπίστωσαν θετική συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με τη ΧΜΘ (172).



Επιπλέον η μελέτη μας ανάδειξε ότι η χορήγηση ΧΜΘ δεν είχε επίδραση στα επίπεδα του VEGF. Έτσι οι τιμές του VEGF πριν τη ΧΜΘ δεν διαφέρανε σημαντικά από τις τιμές του μετά τη ΧΜΘ, στο σύνολο όμως των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με τα ευρήματα και άλλων μελετών (134, 139). Εντούτοις, στη παρούσα μελέτη βρέθηκε σημαντική μείωση των τιμών του VEGF στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με μελέτη των Kido et.al. οι οποίοι δεν βρήκαν συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με την ανταπόκριση στη θεραπεία διαπίστωσαν όμως σημαντική μείωση των επιπέδων του VEGF στους ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ (171).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη εν λόγω μελέτη εμφανίζει η συσχέτιση των τιμών του VEGF με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με αρκετές μελέτες στις οποίες τα υψηλά επίπεδα VEGF ή η αυξημένη έκφραση του στο καρκινικό ιστό πριν τη θεραπεία συσχετίστηκαν με μικρότερη επιβίωση των ασθενών ανάγοντας τον έτσι σε δείκτη κακής πρόγνωσης (poor prognostic factor) (138, 140, 162, 173, 174). Σε ανάλογο συμπέρασμα δεν κατέληξε η πρόσφατη μελέτη των Chakra et al., όπου δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων του VEGF πριν την θεραπεία με την επιβίωση των ασθενών με ΜΜΚΠ (136).

Σημαντικό επίσης εύρημα της μελέτης είναι η ανάδειξη του VEGF ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα και είναι σύμφωνο με πρόσφατη μελέτη των Imoto et.al. (167). Ανάλογο αποτέλεσμα δεν διαπιστώθηκε σε μελέτη των Tas et.al. (139). Η ανάδειξη του VEGF σε προγνωστικό δείκτη στους ασθενείς με ΚΠ είναι ιδιαίτερου κλινικού ενδιαφέροντος και μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο μελλοντικό εργαλείο στις θεραπευτικές αποφάσεις και παρεμβάσεις των κλινικών ιατρών.

### **Τα επίπεδα του OS στο ΚΠ.**

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν αυξημένα επίπεδα OS στον ορό ασθενών με ΚΠ ενώ παράλληλα τον ανέδειξαν ως ένα διαγνωστικό δείκτη με καλή ευαισθησία και ειδικότητα. Σε όλες τις μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας στο ΚΠ τα επίπεδα των δεικτών μέτρησης του OS ήταν αυξημένα όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 1.4.3. Πρέπει όμως να

τονιστεί ότι σε δυο μόνο μελέτες το OS προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών με ΚΠ ως το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων (ενδιάμεσα προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων, πεπτιδίων και αμινοξέων (overall oxidative stress)). Τα επίπεδα του OS και στις δυο μελέτες ήταν πολύ υψηλά. Έτσι, οι Gencer et al. προσδιόρισαν τις τιμές του OS σε ασθενείς με διαφορετικό ιστολογικό τύπο ΚΠ και εκτιμήσανε την διαγνωστική του αξία (208) ενώ, οι La Torre et al. προσδιόρισαν τα επίπεδα του OS πριν και μετά τη ΑΚΘ/ΧΜΘ. Στην τελευταία όμως μελέτη συμπεριλήφθηκαν και ασθενείς με άλλους συμπαγείς όγκους έκτος των ασθενών με ΚΠ (206). Η καθολική διαπίστωση της αύξησης του OS στο καρκίνο, από όλες της μελέτες της διεθνής βιβλιογραφίας και η ευχρηστία της D-ROMs μεθόδου καθιστά το OS σε ένα εν δυνάμει μελλοντικό διαγνωστικό δείκτη στο ΚΠ. Όπως προαναφέρθηκε όμως ο αριθμός των μελετών που προσδιόρισαν το OS στον ορό με τη μέθοδο αυτή είναι πολύ μικρός και χρειάζονται πολλές ακόμη μελέτες προς την κατεύθυνση αυτή.

Επιπρόσθετα, έγινε προσπάθεια συσχέτισης του OS με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Συσχέτιση του OS βρέθηκε μόνο με την ηλικία των ασθενών. Ασθενείς ηλικίας <65 ετών είχαν υψηλότερα επίπεδα OS. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι σε καμία από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν εκτιμήθηκε η σχέση του OS με τις διαφορές κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

Επιπλέον, ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της σχέσης του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης οι τιμές του OS δεν συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση στη θεραπεία παρά μόνο η μεταβολή του οξειδωτικού στρες (-DOS). Έτσι, οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ μεταβάλανε τα επίπεδα τους καθώς τα αύξησαν ενώ οι άλλοι παρουσίασαν μια μικρή μείωση. Αυτό υποδεικνύει ότι η ΧΜΘ αυξάνει το OS στους ασθενείς που ανταποκρίνονται, όταν με άλλα λόγια είναι «αποτελεσματική». Μια λογική εξήγηση στο ανωτέρω αποτελεί η βιβλιογραφικά πλέον τεκμηριωμένη *in vitro* κυτταροτοξικότητα της ΧΜΘ με βάση την πλατίνα, η οποία στους ασθενείς που ανταποκρίνονται οδηγεί σε παραγωγή ROS, σε επίπεδα ικανά να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση (αναλόγως των επιπέδων τους) των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης των

JNK/p38 μονοπατιών (223). Πρόσφατη μελέτη των Lin CS et al. προσδιόρισε τις τιμές του OS μετά από ΧΜΘ σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και βρήκε συσχέτιση του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Στην εν λόγω όμως μελέτη το OS προσδιορίστηκε ως οξειδωτική μιτοχονδριακή βλάβη-oxidative mtDNA damage (8-OHdG στο mtDNA) στογ καρκινικό ιστό με PCR. Έτσι οι ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ είχαν αυξημένα επίπεδα OS (oxidative mtDNA) (216). Επίσης οι La Torre et al. βρήκαν αυξημένες τιμές OS στον ορό καρκινοπαθών μετά από ΧΜΘ ή ΑΚΘ και ΧΜΘ. Στη μελέτη όμως αυτή συμπεριλαμβάνονται και ασθενείς με άλλους συμπαγείς όγκους εκτός των ασθενών με ΚΠ (206). Τέλος οι Beinert et al. βρήκαν επίσης αυξημένες τιμές OS μετά ΑΚΘ και ΧΜΘ στο βρογχοκυψελιδικό όμως έκπλυμα ασθενών με ΚΠ (154). Έτσι, η δυνατότητα το OS να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία στο ΚΠ βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης, είναι η συσχέτιση του OS με την συνολική επιβίωση των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ, η οποία για πρώτη φορά αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Τα υψηλά επίπεδα OS πριν τη θεραπεία συσχετίστηκαν με μικρότερη συνολική επιβίωση των ασθενών ,ανάγοντας τον έτσι σε δείκτη κακής πρόγνωσης (poor prognostic factor). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί η μη ανάδειξη ανεξάρτητης προγνωστικής αξίας του OS στην πολυπαραγοντική ανάλυση.

### **Η συσχέτιση του OS και του VEGF πριν και μετά τη ΧΜΘ.**

Από τους σημαντικότερους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν, η διερεύνηση της σχέσης του OS με το VEGF, σε κλινικό επίπεδο, στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ. Συμφώνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της μελέτης υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των δυο αυτών δεικτών τόσο πριν όσο και μετά τη ΧΜΘ. Οι μέχρι τώρα μελέτες ανέδειξαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των δυο αυτών δεικτών στην επαγωγή της καρκινογένεσης και πιο συγκεκριμένα της νεοπλασματικής αγγειογένεσης, σε μοριακό όμως επίπεδο (με μηχανισμούς όχι πλήρως κατανοητούς) και χωρίς να διερευνηθεί η μεταξύ τους συσχέτιση. Μόνο μια μελέτη στην

διεθνή βιβλιογραφία προσδιόρισε το OS ως το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων (ενδιάμεσα προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων, πεπτιδίων και αμινοξέων-overall oxidative stress) και διερεύνησε τη σχέση του με το VEGF σε κλινικό επίπεδο (154). Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής είναι σύμφωνο με τη παρούσα. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι τα επίπεδα του OS και του VEGF προσδιορισθήκαν όχι στο αίμα αλλά στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ και η συσχέτιση αυτών μελετήθηκε μόνο μετά τη θεραπεία (μετά ΧΜΘ ή μετά ΧΜΘ και ΑΚΘ). Συνεπώς για πρώτη φορά με τη παρούσα μελέτη διαπιστώνεται η σημαντική συσχέτιση του OS (ως το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων) με το VEGF στον ορό ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ πριν και μετά τη θεραπεία. Η σημαντική αυτή συσχέτιση του OS με το VEGF καταδεικνύει τη συνέργεια των δυο αυτών δεικτών στην επαγωγή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης και θα μπορούσε να αποκτήσει μελλοντικό κλινικό ενδιαφέρον.

### **Συμπεράσματα και προοπτικές.**

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταβληθεί πάρα πολλές προσπάθειες για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο επάγεται η νεοπλασματική αγγειογένεση από το OS και το VEGF. Ωστόσο, πολλοί μηχανισμοί δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί και πολλά ερωτήματα παραμένουν ακόμη αναπάντητα. Οι μέχρι τώρα κλινικές μελέτες για το VEGF στον καρκίνο, αποσκοπούσαν στον προσδιορισμό των επιπέδων του σε διάφορα βιολογικά υλικά και στην ανάδειξη της πιθανής προβλεπτικής και προγνωστικής του αξίας. Από την άλλη ο αριθμός των κλινικών μελετών για το OS είναι πολύ μικρός και ανεπαρκής. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη διαγνωστική και κυρίως προγνωστική αξία του VEGF και του OS και διαπίστωσε την σημαντική συσχέτιση των επιπέδων τους στον ορό των ασθενών με ΚΠ

Στις μέρες μας ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η αναγνώριση της προβλεπτικής αξίας του VEGF καθώς ένας αντι VEGF παράγοντας (Bevacizumab) ήδη χρησιμοποιείται ως πρώτης γραμμής ΧΜΘ σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών με ΜΜΚΠ ενώ πολλοί άλλοι παράγοντες με αντιαγγειογενετική δράση βρίσκονται υπό μελέτη. Είναι σημαντικό αν μπορούμε να γνωρίζουμε ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος από τη

χορήγηση των συγκεκριμένων φαρμάκων, αφενός μεν για την επίτευξη της βέλτιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία και αφετέρου για την αύξηση της επιβίωσής τους. Απαιτείται όμως αρκετή μελλοντική έρευνα προς αυτή τη κατεύθυνση.

Επιπρόσθετα, διαπιστώνεται η προγνωστική αξία των δυο αυτών δεικτών στους ασθενείς με ΚΠ. Σημειώνεται δε, ότι η παρούσα μελέτη αναδεικνύει για πρώτη φορά βιβλιογραφικά τη προγνωστική αξία του OS. Ο προσδιορισμός προγνωστικών δεικτών στον ΚΠ θεωρείται μείζονος προτεραιότητας, εφόσον η μέχρι σήμερα θεραπευτική αντιμετώπιση δεν έχει προσφέρει τα μέγιστα. Η αναγνώριση κατά τη διάγνωση, των ασθενών με κακή πρόγνωση, θα μπορούσε ίσως να συντελέσει στην τροποποίηση της προσέγγισής τους, συμβάλλοντας στη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής τους αντιμετώπισης, αποσκοπώντας με το τρόπο αυτό στην ουσιαστική αύξηση της επιβίωσής τους. Επιπλέον η συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων του OS με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ υποδεικνύει και τη πιθανή προβλεπτική του αξία και υπογραμμίζει το μελλοντικό κλινικό του ενδιαφέρον. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και αξιολόγηση των δεικτών αυτών στο πλαίσιο καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός** της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων του OS και του VEGF στον ορό ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ, η διερεύνηση της μεταξύ τους σχέσης, η συσχέτιση τους με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους καθώς και η εκτίμηση της προβλεπτικής και προγνωστικής τους αξίας.

**Υλικό και μέθοδοι :** Το υλικό της μελέτης αποτελέσαν 81 ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ και 25 υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς ήταν 75 άντρες και 6 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $62.48 \pm 0.94$  έτη, (40-79 ετών), Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών ήταν 51 με ΜΜΚΠ (12 με αδenoκαρκίνωμα, 27 με πλακώδες και 12 με μη ταξινομήσιμο ΜΜΚΠ) και 30 με ΜΚΠ. Το στάδιο νόσου των ασθενών με ΜΜΚΠ και ΜΚΠ ήταν: 9/I, 3/II, 16/III, 23/IV και 1/I, 2/II, 10/III, 17/IV αντίστοιχα. Ο VEGF και το OS προσδιορίστηκαν και μετά τη ΧΜΘ στον ορό 43 από τους 81 ασθενείς. Τα επίπεδα του OS προσδιορίστηκαν με τη σπεκτροφωτομετρική μέθοδο D-ROMS (D-ROMS test, Diacron, Grossetto, Italy) και του VEGF με την χρήση της ανοσοπροσοφνητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays, ELISA).

**Αποτελέσματα:** Τα επίπεδα του VEGF ήταν αυξημένα στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων (median 418.0 min 80.43, max 1655 vs. median 272.0, min 142.2, max 487.9pg/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0095$ ). Επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του OS στους ασθενείς με ΚΠ και των υγιών μαρτύρων ( $564.6 \pm 25.15$  UCarr vs  $360.1 \pm 17.46$  UCarr, αντίστοιχα,  $p<0.0001$ ). Τα επίπεδα των δύο αυτών δεικτών συσχετίστηκαν θετικά μεταξύ τους τόσο πριν όσο και μετά τη ΧΜΘ ( $p=0.0013$ ,  $r=0.35$  vs  $p=0.025$ ,  $r=0.34$ , αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, η μεταβολή των τιμών του οξειδωτικού στρες (DOS) συσχετίστηκε σημαντικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία ( $p=0.03$ ). Επίσης, παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα και των δύο δεικτών σε σχέση με την ηλικία των ασθενών (VEGF  $p=0.004$  και OS  $p=0.02$  αντίστοιχα). Δεν διαπιστώθηκε όμως συσχέτιση των δεικτών αυτών με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Τέλος, αναγνωρίστηκε η συσχέτιση των επιπέδων τους με την συνολική επιβίωση

των ασθενών (VEGF  $p=0.048$  και OS  $p=0.015$  αντίστοιχα) και αναδείχθηκε η αρνητική προγνωστική τους αξία. Ανεξάρτητη προγνωστική αξία βρέθηκε να έχει μόνο ο VEGF και η ηλικία των ασθενών ( $p=0.0291$ , και  $p=0.0423$ , αντίστοιχα)

**Συμπεράσματα:** Διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα VEGF και OS στους ασθενείς με ΚΠ και αναγνωρίστηκε η αρνητική προγνωστική τους αξία. Η ανάδειξη για πρώτη φορά της συσχέτισης των επιπέδων τους, μπορεί να αποκτήσει στο μέλλον ιδιαίτερο κλινικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον.

## ABSTRACT

### A.Katsabeki-katsafli

Department of Respiratory Medicine; School of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Greece.

**OBJECTIVE:** The aim of the present study was to determine OS and VEGF levels, to investigate if there is any association between them and with other clinipathological factors and to assess the relevance of these levels to disease outcome.

**Materials and Methods:** We measured serum OS and VEGF levels in 81 patients (age  $62.48 \pm 0.94$  SEM) with primary lung cancer before any treatment (51 NSCLC; 9 patients stage I, 3 stage II, 16 stage III and 23 stage IV and 30 SCLC; 1 patients stage I, 2 stage II, 10 stage III and 17 stage IV) and in 25 normal subjects. The histological type of NSCLC was: 12/adenocarcinoma, 27/squamous cell carcinoma and 12 with no differentiated NSCLC. We also measured OS and VEGF levels after cisplatin based treatment in 43 of those 81 patients. The serum VEGF levels were measured with enzyme linked immunosorbent assay. Serum oxidative stress levels were detected by a commercially available assay (D-ROMs test, Diacron, Grosseto, Italy).

**Results:** The levels of VEGF were higher than those in normal subjects (median 418.0 min 80.43, max 1655 vs median 272.0, min 142.2, max 487.9pg/ml, respectively,  $p=0.0095$ ). Additionally, a significant difference was found in serum OS levels between lung cancer patients and healthy control subjects ( $564.6 \pm 25.15$  UCarr vs  $360.1 \pm 17.46$  UCarr, respectively,  $p<0.0001$ ). VEGF presented a significant correlation with OS levels before ( $p=0.0013$ ,  $r=0.35$  vs) and after therapy ( $p=0.025$ ,  $r=0.34$ ). There was no relevance of pretreatment serum VEGF and OS levels in response to therapy. Although, in the responders there was a significant decrement in serum VEGF levels after chemotherapy and a greater OS variation ( $p=0.03$ ). Also, it was found a significant



association between VEGF and OS levels and age of Lung cancer patients ( $p=0.004$  and  $p=0.02$ , respectively). Nevertheless, there was no relevance with the others clinopathological factors. Patients with an OS serum level higher than the median serum level (552 UCarr) had a significantly shorter overall survival than those with a lower serum level ( $p=0.015$ , Log Rank Test). Also, shorter overall survival had patients with VEGF serum levels higher than the median (418pg/ml) serum level ( $p=0.048$ , Log Rank Test). Independent prognostic factors were found only VEGF and age of Lung cancer patients ( $p=0.0291$ , HR= 1.0009, 95% CI = 1.0001 to 1.0016 and  $p=0.0423$ , HR=0.9781, 95% CI=0.9575 to 0.9991, respectively).

**Conclusions:** High pre-treatment OS and VEGF levels may predict worse survival. Additionally, the correlation between these markers might implicate new aspects of lung cancer therapy and in conjunction with other clinical data, might be used for monitoring the patients with lung cancer.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16(3):481-8.
2. Kanavos P. The rising burden of cancer in the developing world. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 8:viii15-viii23.
3. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
4. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3 Suppl):29S-55S.
5. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001;18(6):1059-68.
6. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111(6):1710-7.
7. Mao L. Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. *Lung Cancer* 2001;34 Suppl 2:S27-34.
8. Carmeliet P. Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999;401(6754):657-8.
9. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6(4):389-95.
10. Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* 2001;128(10):1717-30.
11. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 2001;220(1):1-17.
12. Underwood PA, Bean PA, Whitelock JM. Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation by extracellular matrix from vascular smooth muscle cells: role of type V collagen. *Atherosclerosis* 1998;141(1):141-52.
13. Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(7):1589-94.
14. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408(6808):92-6.

15. Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Betsholtz C. Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 1998;9(5):407-11.
16. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997;277(5323):242-5.
17. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994;8(16):1875-87.
18. Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G. Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 1993;8(6):1631-7.
19. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(20):9355-8.
20. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6(4):460-3.
21. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277(5322):55-60.
22. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998;78(11):1385-94.
23. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 1999;6(8):R217-24.
24. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9(6):653-60.
25. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2(11):826-35.
26. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983-5.
27. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:59-83.
28. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85(3):221-8.

29. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
30. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988;167(6):1883-93.
31. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258(5089):1798-801.
32. Wakabayashi Y, Shono T, Isono M, Hori S, Matsushima K, Ono M, et al. Dual pathways of tubular morphogenesis of vascular endothelial cells by human glioma cells: vascular endothelial growth factor/basic fibroblast growth factor and interleukin-8. *Jpn J Cancer Res* 1995;86(12):1189-97.
33. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1(2):149-53.
34. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2(6):689-92.
35. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79(2):315-28.
36. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88(2):277-85.
37. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265(5178):1582-4.
38. Monte M, Davel LE, Sacerdote de Lustig E. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Eur J Cancer* 1997;33(4):676-82.
39. Koch AE, Cho M, Burrows JC, Polverini PJ, Leibovich SJ. Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free-radical scavengers. *Cell Biol Int Rep* 1992;16(5):415-25.
40. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991;10(8):2247-58.
41. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072(2-3):129-57.

42. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* 1993;12(5):2005-15.
43. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):301-10.
44. Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3(3):221-7.
45. Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, et al. Involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol* 1996;16(8):4231-9.
46. Witzendichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998;273(29):18514-21.
47. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359(6398):843-5.
48. Sasaki H, Fukuda S, Otani H, Zhu L, Yamaura G, Engelman RM, et al. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(3):335-48.
49. Ray PS, Estrada-Hernandez T, Sasaki H, Zhu L, Maulik N. Early effects of hypoxia/reoxygenation on VEGF, ang-1, ang-2 and their receptors in the rat myocardium: implications for myocardial angiogenesis. *Mol Cell Biochem* 2000;213(1-2):145-53.
50. Kuo NT, Benhayon D, Przybylski RJ, Martin RJ, LaManna JC. Prolonged hypoxia increases vascular endothelial growth factor mRNA and protein in adult mouse brain. *J Appl Physiol* 1999;86(1):260-4.
51. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195(2):1005-10.
52. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994;71(3):374-9.
53. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995;95(4):1798-807.
54. Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996;97(2):469-76.

55. Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(7):1311-21.
56. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):38-47.
57. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
58. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284(5422):1994-8.
59. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18(38):5356-62.
60. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249-57.
61. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29(6 Suppl 16):3-9.
62. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991;51(3):794-8.
63. Fidelus RK. The generation of oxygen radicals: a positive signal for lymphocyte activation. *Cell Immunol* 1988;113(1):175-82.
64. Das DK, Maulik N, Moraru, II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(1):181-93.
65. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;77(3):638-43.
66. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270(22):13333-40.
67. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998;12(2):149-62.
68. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 1998;17(11):3005-15.
69. Poulaki V, Mitsiades CS, McMullan C, Sykoutri D, Fanourakis G, Kotoula V, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5392-8.

70. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999;274(35):25130-5.
71. Kypta RM, Goldberg Y, Ulug ET, Courtneidge SA. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 1990;62(3):481-92.
72. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(14):6374-8.
73. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* 2002;16(11):1361-70.
74. Rak J, Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Semin Cancer Biol* 2004;14(2):93-104.
75. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5(1):24-33.
76. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268(34):25568-76.
77. DeForge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992;90(5):2123-9.
78. Tang FY, Meydani M. Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. *Nutr Cancer* 2001;41(1-2):119-25.
79. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):10193-7.
80. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994;269(18):13289-95.
81. Oliveira IC, Mukaida N, Matsushima K, Vilcek J. Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF-kappa B site. *Mol Cell Biol* 1994;14(8):5300-8.
82. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68(1):1-8.

83. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262(5137):1274-7.
84. Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM, Jr. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 1995;14(2):303-15.
85. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1371-9.
86. Rauh R, Kahl S, Boechzelt H, Bauer R, Kaina B, Efferth T. Molecular biology of cantharidin in cancer cells. *Chin Med* 2007;2:8.
87. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67(5):879-88.
88. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57(1):79-88.
89. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183(4):1533-44.
90. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397(6718):441-6.
91. Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrmann J, Brisbay S, Tari AM, et al. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 1997;15(23):2767-72.
92. Mirkovic N, Voehringer DW, Story MD, McConkey DJ, McDonnell TJ, Meyn RE. Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene* 1997;15(12):1461-70.
93. Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T, et al. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(3):208-13.
94. Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(5):1321-30.
95. Watanabe Y, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. *Exp Cell Res* 1997;233(2):340-9.
96. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25(8):891-7.



97. Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, et al. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci* 1999;64(4):249-58.
98. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996;21(3):335-48.
99. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 5):853-65.
100. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
101. Weinstein BM. What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev Dyn* 1999;215(1):2-11.
102. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Exs* 2005(94):209-31.
103. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.
104. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65(3):550-63.
105. 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(10):1024-8.
106. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-13.
107. Frenkel-Denkberg G, Gershon D, Levy AP. The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice. *FEBS Lett* 1999;462(3):341-4.
108. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(5):588-94.
109. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407(6801):242-8.
110. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376(6535):62-6.
111. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376(6535):66-70.
112. Boock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its

- receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(7):506-16.
113. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, Kowalczyk P, Laudone VP, Albertsen PC, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999;54(3):567-72.
114. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999;188(4):369-77.
115. Zhang EL, Qin QS, Xia SH. [The research and application of vascular endothelial factor]. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2002;18(2):124-6.
116. Wey JS, Gray MJ, Fan F, Belcheva A, McCarty MF, Stoeltzing O, et al. Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 2005;93(2):233-41.
117. Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors. *J Neurooncol* 2000;50(1-2):109-20.
118. Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61(6):2413-9.
119. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13(1):9-22.
120. Ke LD, Shi YX, Yung WK. VEGF(121), VEGF(165) overexpression enhances tumorigenicity in U251 MG but not in NG-1 glioma cells. *Cancer Res* 2002;62(6):1854-61.
121. Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, et al. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 2003;63(24):8890-8.
122. Saleh M, Vasilopoulos K, Stylli SS, Kaye AH, Wilks AF. The expression of antisense vascular endothelial growth factor (VEGF) sequences inhibits intracranial C6 glioma growth in vivo by suppressing tumour angiogenesis. *J Clin Neurosci* 1996;3(4):366-72.
123. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362(6423):841-4.
124. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367(6463):576-9.
125. Scavelli C, Vacca A, Di Pietro G, Dammacco F, Ribatti D. Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia* 2004;18(6):1054-8.

126. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005;31(2):117-21.
127. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J* 2002;21(7):1505-13.
128. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, et al. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(17):9671-6.
129. Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998;79(5):255-65.
130. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7(2):186-91.
131. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005;201(7):1089-99.
132. Ilhan N, Ilhan N, Deveci F. Functional significance of vascular endothelial growth factor and its receptor (receptor-1) in various lung cancer types. *Clin Biochem* 2004;37(9):840-5.
133. Saglam DA, Ursavas A, Karadag M, Yilmaztepe Oral A, Coskun F, Gozu RO. [The evaluation to relationship between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level, metastases and other tumor markers in patients with lung cancer]. *Tuberk Toraks* 2008;56(1):50-5.
134. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and bcl-2 levels in advanced stage non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(6):576-80.
135. Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, Eguchi K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998;18(2B):1251-4.
136. Chakra M, Pujol JL, Lamy PJ, Bozonnet MC, Quantin X, Jacot W, et al. Circulating serum vascular endothelial growth factor is not a prognostic factor of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008;3(10):1119-26.
137. Pircher A, Kahler CM, Skvortsov S, Dlaska M, Kawaguchi G, Schmid T, et al. Increased numbers of endothelial progenitor cells in peripheral blood and tumor specimens in non-small cell lung cancer: a methodological challenge and an ongoing debate on the clinical relevance. *Oncol Rep* 2008;19(2):345-52.
138. Goudar RK, Vlahovic G. Hypoxia, angiogenesis, and lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2008;10(4):277-82.
139. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(5):492-6.

140. Hasegawa Y, Takanashi S, Okudera K, Kumagai M, Hayashi A, Morimoto T, 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.
141. Mall JW, Schwenk W, Philipp AW, Meyer-Kipker C, Mall W, Muller J, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels correlate better with tumour stage in small cell lung cancer than albumin, neuron-specific enolase or lactate dehydrogenase. *Respirology* 2002;7(2):99-102.
142. Tamura M, Ohta Y, Kajita T, Kimura K, Go T, Oda M, et al. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001;8(5):1097-102.
143. Tamura M, Ohta Y, Nakamura H, Oda M, Watanabe G. Diagnostic value of plasma vascular endothelial growth factor as a tumor marker in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2002;17(4):275-9.
144. Jankowska R, Porebska I, Dyla T. [Evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neoplastic and tuberculosis effusions--preliminary results]. *Pneumonol Alergol Pol* 2002;70(5-6):258-64.
145. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, Iwami F, Kawabata M, Arimura K, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000;118(4):948-51.
146. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB, Jr., et al. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999;5(11):3364-8.
147. Hamed EA, El-Noweih AM, Mohamed AZ, Mahmoud A. Vasoactive mediators (VEGF and TNF-alpha) in patients with malignant and tuberculous pleural effusions. *Respirology* 2004;9(1):81-6.
148. Momi H, Matsuyama W, Inoue K, Kawabata M, Arimura K, Fukunaga H, et al. Vascular endothelial growth factor and proinflammatory cytokines in pleural effusions. *Respir Med* 2002;96(10):817-22.
149. Ziora D, Sielska-Spytek E, Dworniczak S, Oklek K, Kozielski J. [VEGF (vascular endothelial growth factor) concentration in serum and pleural fluid of patients with pleural malignancy and pleural tuberculosis]. *Pneumonol Alergol Pol* 2002;70(9-10):458-67.
150. Clifford CA, Hughes D, Beal MW, Henry CJ, Drobotz KJ, Sorenmo KU. Vascular endothelial growth factor concentrations in body cavity effusions in dogs. *J Vet Intern Med* 2002;16(2):164-8.
151. Jin HY, Lee KS, Jin SM, Lee YC. Vascular endothelial growth factor correlates with matrix metalloproteinase-9 in the pleural effusion. *Respir Med* 2004;98(2):115-22.
152. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory and malignant pleural effusions. *Thorax* 1999;54(8):707-10.

153. Beinert T, Binder D, Oehm C, Ziemer S, Priem F, Schweigert M, et al. Increased levels of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage of patients with bronchial carcinoma effect of tumour activity and oxidative stress due to radio-chemotherapy? *Eur J Med Res* 1999;4(8):328-34.
154. Beinert T, Binder D, Oehm C, Ziemer S, Priem F, Stuschke M, et al. Further evidence for oxidant-induced vascular endothelial growth factor up-regulation in the bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients undergoing radio-chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(6):352-6.
155. Cressey R, Wattananupong O, Lertprasertsuke N, Vinitketkumnuen U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis. *BMC Cancer* 2005;5:128.
156. Donnem T, Al-Shibli K, Al-Saad S, Delghandi MP, Busund LT, Bremnes RM. VEGF-A and VEGFR-3 correlate with nodal status in operable non-small cell lung cancer: Inverse correlation between expression in tumor and stromal cells. *Lung Cancer* 2009;63(2):277-83.
157. Bonnesen B, Pappot H, Holmstav J, Skov BG. Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: Relation to prognosis. *Lung Cancer* 2009.
158. Saintigny P, Kambouchner M, Ly M, Gomes N, Sainte-Catherine O, Vassy R, et al. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in non-small-cell lung cancer: concurrent expression in cancer cells from primary tumour and metastatic lymph node. *Lung Cancer* 2007;58(2):205-13.
159. Takizawa H, Kondo K, Fujino H, Kenzaki K, Miyoshi T, Sakiyama S, et al. The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006;95(1):75-9.
160. Kojima H, Shijubo N, Yamada G, Ichimiya S, Abe S, Satoh M, 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;104(8):1668-77.
161. Li J, Hong M, Pan T. Clinical significance of VEGF-C and VEGFR-3 expression in non-small cell lung cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26(5):587-90.
162. Zhang HZ, Wei YP, Li HG, Wang M, Liu JG, Wu C. [Expressions of vascular endothelial growth factor C and matrix metalloproteinases-2 and prognosis of non-small cell lung carcinoma]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006;26(9):1307-10.
163. Tamura M, Oda M, Matsumoto I, Tsunozuka Y, Kawakami K, Ohta Y, et al. The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* 2004;11(10):928-33.
164. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98(6):1217-22.

165. Naumnik W, Izycki T, Swidzinska E, Ossoliniska M, Chyczewska E. Serum levels of VEGF-C, VEGF-D, and sVEGF-R2 in patients with lung cancer during chemotherapy. *Oncol Res* 2007;16(9):445-51.
166. Guo X, Chen Y, Xu Z, Xu Z, Qian Y, Yu X. Prognostic significance of VEGF-C expression in correlation with COX-2, lymphatic microvessel density, and clinicopathologic characteristics in human non-small cell lung cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009;41(3):217-22.
167. Imoto H, Osaki T, Taga S, Ohgami A, Ichiyoshi Y, Yasumoto K. Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115(5):1007-14.
168. Park SH, Lee SS. The relationship between serum VEGF concentration and prognosis of lung cancer. *Korean J Intern Med* 2003;18(4):207-11.
169. Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S, Oda M, Hayashi Y, Nonomura A, et al. Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer* 1997;76(8):1041-5.
170. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, Poyraz BM, Celik G, Sen E, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004;98(7):632-6.
171. Kido Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum concentration changes during chemotherapy in patients with lung cancer. *Kurume Med J* 2001;48(1):43-7.
172. Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer Invest* 2005;23(3):193-200.
173. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51(2):143-58.
174. Ustuner Z, Saip P, Yasasever V, Vural B, Yazar A, Bal C, et al. Prognostic and predictive value of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 levels in the sera of small cell lung cancer patients. *Med Oncol* 2008;25(4):394-9.
175. Gridelli C, Rossi A, Maione P. New antiangiogenetic agents and non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(1):76-86.
176. Verhoef C, de Wilt JH, Verheul HM. Angiogenesis inhibitors: perspectives for medical, surgical and radiation oncology. *Curr Pharm Des* 2006;12(21):2623-30.
177. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 2):4258s-4262s.

178. Li XH, Tang L, Liu D, Sun HM, Zhou CC, Tan LS, et al. [Antitumor effect of recombinant T7 phage vaccine expressing xenogenic vascular endothelial growth factor on Lewis lung cancer in mice]. *Ai Zheng* 2006;25(10):1221-6.
179. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, Ryffel B, et al. VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(8):2837-42.
180. Baka S, Clamp AR, Jayson GC. A review of the latest clinical compounds to inhibit VEGF in pathological angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2006;10(6):867-76.
181. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 1996;24(4):1023-7.
182. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757(5-6):509-17.
183. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
184. Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J. [Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]. *Pol Merkur Lekarski* 2007;23(134):131-6.
185. Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 1996;44(1):6-13.
186. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
187. Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep* 2009;14(3):102-8.
188. Miguel F, Augusto AC, Gurgueira SA. Effect of acute vs chronic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free Radic Res* 2009;43(4):340-7.
189. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 1:289-95.
190. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health* 2009;6(2):445-62.
191. Chuang YY, Chen Y, Gadisetti, Chandramouli VR, Cook JA, Coffin D, et al. Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(21):6246-54.

192. Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti B, Borrello S, et al. Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res* 2000;60(16):4654-60.
193. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000;88(5):1880-9.
194. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(24):7634-8.
195. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248(13):4793-6.
196. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000;16(3):534-54.
197. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987;63(1):152-7.
198. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005;227(2):133-9.
199. Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* 1994;40(1):8-15.
200. de Castro J, Hernandez-Hernandez A, Rodriguez MC, Llanillo M, Sanchez-Yague J. Comparison of changes in erythrocyte and platelet fatty acid composition and protein oxidation in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(4):339-45.
201. Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(17):1312-9.
202. Mambo E, Chatterjee A, de Souza-Pinto NC, Mayard S, Hogue BA, Hoque MO, et al. Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. *Oncogene* 2005;24(28):4496-508.
203. Mizoue T, Kasai H, Kubo T, Tokunaga S. Leanness, smoking, and enhanced oxidative DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(3):582-5.
204. Loft S, Svoboda P, Kasai H, Tjonneland A, Vogel U, Moller P, et al. Prospective study of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2006;27(6):1245-50.
205. Cooke MS, Rozalski R, Dove R, Gackowski D, Siomek A, Evans MD, et al. Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. *Biol Chem* 2006;387(4):393-400.
206. La Torre F, Orlando A, Silipigni A, Giacobello T, Pergolizzi S, Aragona M. [Increase of oxygen free radicals and their derivatives in chemo- and radiation treated neoplasm patients]. *Minerva Med* 1997;88(4):121-6.



207. Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulianis KI, et al. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008.
208. Gencer M, Ceylan E, Aksoy N, Uzun K. Association of serum reactive oxygen metabolite levels with different histopathological types of lung cancer. *Respiration* 2006;73(4):520-4.
209. Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2007;67(3):1282-90.
210. Mi L, Chung FL. Binding to protein by isothiocyanates: a potential mechanism for apoptosis induction in human non small lung cancer cells. *Nutr Cancer* 2008;60 Suppl 1:12-20.
211. Das U. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit* 2002;8(4):RA79-92.
212. Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, et al. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1997;22(1-2):73-83.
213. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24(2):203-14.
214. Lee YJ, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 1999;274(28):19792-8.
215. Park JH, Kim EJ, Jang HY, Shim H, Lee KK, Jo HJ, et al. Combination treatment with arsenic trioxide and sulindac enhances apoptotic cell death in lung cancer cells via activation of oxidative stress and mitogen-activated protein kinases. *Oncol Rep* 2008;20(2):379-84.
216. Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2008;7(6):954-8.
217. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000;275(38):29643-7.
218. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007;109(3):1010-7.
219. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund LT, Bremnes RM. Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2009.
220. Tas F, Duranyildiz D, Soydinc HO, Cicin I, Selam M, Uygun K, et al. Effect of maximum-tolerated doses and low-dose metronomic chemotherapy on serum vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels in patients with

advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(5):721-5.

221. Swidzinska E, Ossolinska M, Naumnik W, Izycki T, Kucejko W, Chyczewska E. [Circulating VEGF and its soluble receptor sVEGFR-1 in patients with lung cancer]. *Pneumonol Alergol Pol* 2004;72(9-10):389-94.

222. Yoshimoto A, Kasahara K, Nishio M, Hourai T, Sone T, Kimura H, et al. Changes in angiogenic growth factor levels after gefitinib treatment in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35(5):233-8.

223. Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 2001;21(20):6913-26.