



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΔΙΑΝΗΣ**

---

**Διδακτορική Διατριβή**

***"Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗΣ***  
***ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ"***

υπό

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ Π. ΚΑΖΑΚΟΥ**

Ειδικού Πνευμονολόγου - Φυματιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Π. ΚΑΖΑΚΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1<sup>η</sup>/19-10-2016 ΓΣΕΕΣ):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)**      **Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**  
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Ζωή Δανιήλ**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Ανδρέας Τσακάλωφ**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Αναστάσιος Γερμενής**  
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Νικόλαος Τσιλιμίγκας**  
Καθηγητής Χειρουργικής Θώρακα-Καρδιάς-Αγγείων, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Σωτήριος Ζαρογιάννης**  
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής**      **Δρ. Δημοσθένης Μακρής**  
Επίκουρος Καθηγητής Εντατικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της διδακτορικής διατριβής, σεβαστό μου Καθηγητή Πνευμονολογίας και Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κκ Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη. Ήταν, από τα φοιτητικά μου ακόμη χρόνια και μετέπειτα στην αρχή και στην πορεία της σταδιοδρομίας μου, ο άνθρωπος που μου ενέπνευσε ό,τι «καλό κ' αγαθό» στην άσκηση της καθ' ημέρα πράξης στην Ιατρική: από την αγάπη για συνεχή εκπαίδευση και μάθηση ως τη ζεστή και ανθρώπινη προσέγγιση στον πάσχοντα συνάνθρωπο. Τον ευχαριστώ από βάθους καρδιάς.

Τις θερμές ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους εκφράζω επίσης, στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Πνευμονολογικής Κλινικής του Παν. Θεσσαλίας κκ. Ζωή Δανιήλ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας του Παν. Θεσσαλίας κκ. Ανδρέα Τσακάλωφ.

Ανεκτίμητη υπήρξε και η βοήθεια της φίλης και συναδέλφου Πνευμονολόγου κκ. Μάρθας Λαδά και της κκ. Ειρήνης Τσιλιώνη από το Βιοχημικό τμήμα της Πνευμονολογικής Κλινικής του Παν. Θεσσαλίας, χωρίς τη συνδρομή των οποίων θα ήταν ημιτελής αυτή η προσπάθεια.

Δεν θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω τη συνεισφορά της Επίκουρου Καθηγήτριας της Πνευμονολογικής Κλινικής του Παν. Θεσσαλίας, κκ Θεοδώρας Κερενίδη, σε όλα τα στάδια αυτής της επίπονης προσπάθειας: από τη σύλληψη της ιδέας και τη συλλογή του απαραίτητου υλικού, μέχρι τη βήμα προς βήμα ολοκλήρωση της συγγραφής της διατριβής. Ήταν ο άνθρωπος που έδωσε «σάρκα και οστά» στο όραμά μου να ενασχοληθώ με τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και ήταν, με τη στάση της, φωτεινό παράδειγμα για μένα. Η υπομονή και η πίστη της στο άτομό μου, ακόμα και τις στιγμές που όλα φαίνονταν ακατόρθωτα, με έκαναν να ορθώνω το βήμα μου και να προχωρώ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ για τους ασθενείς και τους συγγενείς τους, της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που, μέσα στις δυσκολίες τους δέχτηκαν με χαρά να συμμετάσχουν στην παρούσα ερευνητική μελέτη.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω να αποδώσω στους γονείς και τα αδέρφια μου, οι οποίοι τόσα χρόνια, ο καθένας από το δικό του «μετερίζι», παρέχουν τη δική τους

ουσιαστική υποστήριξη και βοήθεια σε κάθε βήμα της ζωής μου. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα προχωρήσει. Κλείνοντας, θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην ευλογημένη, σίγουρα, ύπαρξη στη ζωή μου: το σύντροφο και συνοδοιπόρο μου, που σε κάθε μικρό ή μεγάλο σταθμό της πορείας μου ήταν εκεί. Άλλοτε πιο αθόρυβα, άλλοτε πιο έντονα, η στήριξή του ήταν και είναι η «βακτηρία» σε κάθε μου βήμα. Θα συνεχίσω να προσπαθώ, κάθε μέρα, γι' αυτόν και τα παιδιά μας.

Αικατερίνη Π. Καζάκου

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

**Επίθετο:** Καζάκου

**Όνομα:** Αικατερίνη

**Πατρώνυμο:** Παναγιώτης

**Ημερομηνία Γεννήσεως:** 15/03/1977

**Τόπος γεννήσεως:** Θεσσαλονίκη

**Υπηκοότητα:** Ελληνική

**Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμη (παντρεμένη με τον Φουντούλη Γεώργιο, Ειδικό Ακτινοδιαγνωστικής), μητέρα 2 παιδιών (12 και 10 ετών)

**Διεύθυνση κατοικίας:** Θεσσαλονίκης 23, ΜΗΧΑΝΙΩΝΑ, 57004

Τηλ.: +302392021256, +306939611956

**Διεύθυνση εργασίας:** Ιδιωτικό Ιατρείο - 28<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 11, ΜΗΧΑΝΙΩΝΑ

Τηλ.: +302392036999

**E-mail:** kazakou\_k@yahoo.com

### ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

**2010 - 2016:** Υποψήφια διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Τομέας Επιστημών Υγείας, Ιατρικής Σχολής Λάρισας

**06/12/2012:** Απόκτηση Τίτλου Ιατρικής Ειδικότητας «Πνευμονολογίας - Φυματιολογίας»

**05/12/2011 - 15/06/2012:** Κέντρο Επαγγελματικής Κατάρτισης, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πιστοποιητικό εξειδίκευσης και κατάρτισης στη «Διαγνωστική Νοσημάτων του Αναπνευστικού Συστήματος

(Επίλυση Κλινικών προβλημάτων)», διάρκειας 300 ωρών

**30/10/2002:** Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος, Αρ. Πρωτ.: 8316, Νομαρχία Λάρισας

**1996 - 2002:** Λάρισα Θεσσαλίας

Απόφοιτος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τομέας Επιστημών Υγείας,  
Ιατρική Σχολή Λάρισας  
Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (6,95)  
Επιλεγόμενα μαθήματα: Πνευμονολογία, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών

**1991 - 1994:** *N. Μηχανιώνα Θεσσαλονίκης*

Απόφοιτος Λυκείου Νέας Μηχανιώνας  
Βαθμός απολυτηρίου: 18 και 4/11

**Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές:** *Κάτοχος ECDL Progress, 2007*

(Βασικές έννοιες Πληροφορικής, Χρήση Η/Υ και Διαχείριση Αρχείων, Επεξεργασία Κειμένου, Υπολογιστικά Φύλλα, Βάσεις Δεδομένων, Παρουσιάσεις, Διαχείριση Πληροφοριών και Επικοινωνίες)

**Μουσική:** δίπλωμα ανώτερων θεωρητικών μουσικής «*Ειδικό Αρμονίας*»

Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς,  
3ετής Φοίτηση, «Μακεδονικό Ωδείο», 1995

**Ξένες γλώσσες:** *Αγγλική*

Πολύ καλή γνώση - κάτοχος Cambridge First Certificate in English, 1992  
Βαθμός πτυχίου: “A”

## **I. ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ**

- 1) **04/02/2013 - σήμερα:** Ιδιωτικό Πνευμονολογικό Ιατρείο, Νέα Μηχανιώνα - Θεσσαλονίκης
- 2) **20/09/2012 - 14/11/2012:** Υπεράριθμη Ειδικευόμενη Ιατρός, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας
- 3) **22/11/2007 - 19/09/2012:** Ειδικευόμενη Ιατρός Πνευμονολογίας - Φυματιολογίας, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Ο χρόνος της ειδίκευσής μου στην Παθολογία (12 μήνες) που απαιτείται για την ειδικότητα της Πνευμονολογίας, πραγματοποιήθηκε στην Παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Αντίστοιχα, ο χρόνος ειδίκευσής μου στην Εντατική Θεραπεία (6 μήνες) πραγματοποιήθηκε στην ΚΕΘ (Κλινική Εντατικής Θεραπείας) του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

- 4) **19/05/2003 - 18/05/2004**: Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου, Κ.Υ. Ελασσόνας, Π.Ι. Πραιτωρίου
- 5) **18/02/2003 - 17/05/2003**: Τρίμηνη άσκηση Υπηρεσίας Υπαίθρου, Γ.Ν. Λάρισας

## **II. ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ - ΣΥΝΕΔΡΙΑ - ΗΜΕΡΙΑΕΣ**

### **A. ΕΚΠΑΙΔΕΥΟΜΕΝΗ**

- 1) «2° Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος & Παθήσεων Από Το Περιβάλλον», Θεσσαλονίκη, 10 - 13/11/2016
- 2) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2016», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος, 06 - 08/05/2016
- 3) «24° Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο», Αθήνα, 26 - 29/11/2015
- 4) «Πρόληψη και θεραπεία του Καρκίνου του Πνεύμονα» - διαδικτυακή παρακολούθηση, Κατερίνη, 02 - 03/10/2015
- 5) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2015», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος, 24 - 26/04/2015
- 6) «23° Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο και 79<sup>th</sup> Regional Meeting of Asthma: Αθήνα, 05 - 08/11/2014
- 7) «Συνεχιζόμενη εκπαίδευση - Η συμβολή της Ακτινολογίας στην Κλινική Πνευμονολογία», Θεσσαλονίκη, 04/10/2014
- 8) «22° Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο», Αθήνα, 05 - 07/12/2013
- 9) Παρακολούθηση του προγράμματος συνεχιζόμενης εκπαίδευσης στην Πνευμονολογία της Εταιρείας Μελέτης Πνευμονοπαθειών και Επαγγελματικών Παθήσεων Θώρακος (2013 - 2016)
- 10) Εκπαιδευτικό Σεμινάριο για το ΑΣΘΜΑ με θέμα: «Από τις σύγχρονες οδηγίες στην κλινική πράξη», Αθήνα, 06 - 07/04/2013
- 11) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2012», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λίμνη Πλαστήρα, 28 - 30/09/2012
- 12) «Annual ERS Congress 2012», Vienna, Austria, European Respiratory Society, 01 - 05/09/2012
- 13) «1<sup>st</sup> HERMES Summer School», Hellenic Thoracic Society & European Respiratory Society, Fodele, Heraklion, Crete, 05 - 08/07/2012
- 14) «2° Μεταπτυχιακό Σεμινάριο στην Ακτινολογία Θώρακος», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Αθήνα, 09 - 11/03/2012
- 15) «1° Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Διαθωρακικού Υπερήχου», Αθήνα, 24/11/2011



- 16) «20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο», Αθήνα, 24 - 27/11/2011
- 17) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2011», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τσαγκαράδα Πηλίου, 09 - 11/09/2011
- 18) «7<sup>ο</sup> Εκπαιδευτικό Φροντιστήριο - Εκπαίδευση στην Πνευμονολογία: Συνδυάζοντας την τεκμηριωμένη θεωρία με την κλινική πράξη - Pulmonary Board Review Refreshing Course», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Ναύπλιο, 05 - 08/05/2011
- 19) «1<sup>ο</sup> Μεταπτυχιακό Σεμινάριο στην Ακτινολογία Θώρακος», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Αθήνα, 15 - 16/01/2011
- 20) Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Συνεχιζόμενη εκπαίδευση Επαγγελματιών Υγείας για την Οργάνωση Ιατρικών Διακοπής Καπνίσματος», Λάρισα, 12 - 14/03/2010
- 21) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2009», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, 18 - 19/09/2009
- 22) «Updates in Lung and Head & Neck Cancers», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Ελληνική Εταιρεία Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας και Ογκολογική Μονάδα Νοσοκομείου Σωτηρία, Μύκονος, 07 - 10/05/2009
- 23) Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «Διαταραχές Οξεοβασικής Ισορροπίας και Ηλεκτρολυτών», Λάρισα, 17 - 18/10/2008
- 24) «2<sup>ο</sup> Εκπαιδευτικό Φροντιστήριο - Εκπαίδευση στην Πνευμονολογία: Συνδυάζοντας την τεκμηριωμένη θεωρία με την κλινική πράξη - Pulmonary Board Review Refreshing Course», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Λουτράκι, 29/05 - 01/06/2008
- 25) «16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος», Αθήνα, 06 - 09/12/2007
- 26) «1<sup>ο</sup> Σεμινάριο Ακτινολογίας (Σπονδυλική Στήλη & Αρθρώσεις)», Λάρισα, 06/10/2007
- 27) «Αντιβιοτικά: Δράση - Αντοχή - θεραπεία με βάση τις ενδείξεις» - 1<sup>ος</sup> Μετεκπαιδευτικός κύκλος Εξειδίκευσης/ IBET 2007-2008, Λάρισα, 27/09/2007 - 15/05/2008
- 28) «Ημέρες Πνευμονολογίας 2007», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Βόλος, 21 - 23/09/2007
- 29) BLS/AED Provider Course (European Resuscitation Council): 11/12/2005, Trikala, Greece
- 30) ATLS (Advanced Trauma Life Support) του American College of Surgeons, 10/2003 - 10/2007, Larissa, Greece
- 31) «8<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας», Ιωάννινα, 19 - 21/04/2002
- 32) «7<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας», Λάρισα, 27 - 29/04/2001
- 33) «3<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος», Λάρισα, 01 - 03/12/2000
- 34) «2<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος», Λάρισα, 03 - 05/12/1999
- 35) «1<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος», Λάρισα, 04 - 05/12/1998
- 36) «4<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας», Ιωάννινα, 03 - 05/04/1998

## **B. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ - ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΗ ΟΜΙΛΗΤΡΙΑ**

- 1) «Προστατεύοντας την υγεία μας», προσκεκλημένη ομιλήτρια, 1<sup>ο</sup> Δημοτικό Σχολείο Νέας Μηχανιώνας, 24/02/2016
- 2) «Καπνί...ζουμε χωρίς όρια», προσκεκλημένη ομιλήτρια του Συλλόγου Γονέων & Κηδεμόνων, με θέμα το κάπνισμα, 1<sup>ο</sup> Δημοτικό Σχολείο Νέας Μηχανιώνας, 16/12/2015
- 3) «Έλεγχος του άσθματος με μια μόνο συσκευή: Παραδείγματα από την εφαρμογή της Θεραπευτικής Στρατηγικής SMART στην Κλινική Πράξη», Εκδήλωση της Astra Zeneca, Makedonia Palace Hotel, Θεσσαλονίκη, 16/09/2015
- 4) «Λοιμώξεις αναπνευστικού: μπορούμε να τις προλάβουμε;», προσκεκλημένη ομιλήτρια του Κ.Α.Π.Η. Νέας Μηχανιώνας, 03/12/2013
- 5) «Λοιμώξεις αναπνευστικού», προσκεκλημένη ομιλήτρια του Συλλόγου Καρκινοπαθών Νέας Μηχανιώνας «Παναγία Φανερωμένη», 11/04/2013
- 6) «Προγράμματα Πρόληψης Νεοπλασματικών Παθήσεων - Καρκίνος Πνεύμονα», Ζ' Κύκλος Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων, Τομέας Χειρουργικής, Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μικρό Αμφιθέατρο Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ΒΙΟΠΟΛΙΣ, Λάρισα, 22/05/2012
- 7) “*Obstructive Sleep Apnoea: From pathogenesis to treatment: Current controversies and future directions*”, Βιβλιογραφική ενημέρωση: Obstructive Sleep Apnoea, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 22/03/2012
- 8) “*Screening for Lung Cancer*”, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 08/03/2012
- 9) «Πνευμονία Κοινότητας - Παραπνευμονικές συλλογές», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 01/03/2012
- 10) “*Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI)*”- Βιβλιογραφική ενημέρωση: βρογχικό άσθμα, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 13/10/2011
- 11) «Ενδιαφέροντα Κλινικά περιστατικά», Ημέρες Πνευμονολογίας 2011, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τσαγκαράδα Πηλίου, 09/09/2011
- 12) «Αυχεναλγία - Θωρακαλγία από 2μήνου, δεκατική πυρετική κίνηση και αιμοδιές κάτω άκρων (Νευροσαρκοείδωση)», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 24/02/2011
- 13) «Κλινικές εκδηλώσεις & χρήσιμες εργαστηριακές εξετάσεις σε πλευριτικές συλλογές», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 18/11/2010
- 14) «Ακτινολογική εξέταση των παθήσεων του υπεζωκότα», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 11/11/2010
- 15) «Πνευμονία Κοινότητας - Παραπνευμονικές συλλογές», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 21/09/2010

- 16) «Πνευμονία Κοινότητας - Παραπνευμονικές συλλογές», Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 03/03/2008
- 17) «Διαφορική διαγνωστική σκίασης πνεύμονα με κοιλότητα» & «Αίτια πνευμονικού αποστήματος», στα πλαίσια του επιλεγόμενου «Κλινική Άσκηση Φοιτητών Στην Πνευμονολογία» - 6<sup>ο</sup> Έτος, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 22/11/2001

### III. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) Προφορική ανακοίνωση σε ελληνικό συνέδριο: Μαραγκοζίδης Π., Παπαναστάση Ε., Παπαδόπουλος Δ., **Καζάκου Α.**, Del Vescovo V., Denti M., Κερενίδη Θ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μπαλατσός Ν., «Μελέτη της βιολογικής σημασίας των ανθρώπινων αποαδενυλασών και ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα», 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα 18 - 21/10/2012
- 2) Αναρτημένη ανακοίνωση σε διεθνές συνέδριο: **Kazakou A.**, Kerenidi T., Lada M., Tsilioni I., Dalaveris E., Gourgoulisianis K.I. "Clinical significance of serum osteopontin levels in lung cancer", *European Respiratory Journal* 2012 (P4210)
- 3) Προφορική ανακοίνωση σε ελληνικό συνέδριο: **Καζάκου Α.**, Κερενίδη Θ., Λαδά Μ., Τσιλιώνη Ε., Λαμπροδήμου Γ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., «Η διαγνωστική και προγνωστική αξία της οστεοποντίνης (OPN) στον καρκίνο πνεύμονα», 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, 25/11/2011 (ΠΑ16)
- 4) 7<sup>ο</sup> «Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας», *Στρογγυλή τράπεζα Γυναικολογίας (Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή)*- Εισήγηση: «Φυσιολογία αναπαραγωγής, Στεριρότητα - αίτια, ενδείξεις υποβοηθούμενης αναπαραγωγής», Λάρισα, 27/04/2001

### IV. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 1) Έπαινος για την καλύτερη επιστημονική ανακοίνωση στον καρκίνο του πνεύμονα, 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα 2012, για την εργασία «Μελέτη της βιολογικής σημασίας των ανθρώπινων αποαδενυλασών και ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα», Μαραγκοζίδης Π., Παπαναστάση Ε., Παπαδόπουλος Δ., **Καζάκου Α.**, Del Vescovo V., Denti M., Κερενίδη Θ., Γουργουλιάνης Κ.Ι., Μπαλατσός Ν.
- 2) Συμμετοχή στη ερευνητική εργασία με τίτλο «Μελέτη της βιολογικής σημασίας των ανθρώπινων αποαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα» που έλαβε κλινική ερευνητική υποτροφία της Ελληνικής Πνευμονολογικής εταιρείας, (15,000 €) για το έτος 2011

## ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- 1) **11/2015 - σήμερα:** Μέλος της ομάδας ιατρών του Κοινωνικού Ιατρείου Δήμου Θερμαϊκού για την παροχή ιατρικών υπηρεσιών σε αναξιοπαθόντες συμπολίτες
- 2) **11/2014 - σήμερα:** Μέλος της ομάδας ιατρών του Εθνικού Δικτύου Εθελοντών για την Υποστήριξη Διακοπής του Καπνίσματος
- 3) **31/10/2015, 07/11/2015 & 14/11/2015:** Σπироμετρήσεις προληπτικού ελέγχου νοσημάτων αναπνευστικού συστήματος, σε συνεργασία με το Δήμο Θερμαϊκού στο Δημοτικό Διαμέρισμα Ν. Μηχανιώνας
- 4) **05/10/2013 - σήμερα:** Παρακολούθηση μαθημάτων σχολής γονέων «Ι.Ν.Αγίου Παντελεήμονα» με θέμα: «Εκκλησία και Νέες Τεχνολογίες στη σύγχρονη κοινωνία»
- 5) **16 - 18/01/2013:** «Συμβουλευτική Ανάλυσης Επιχειρηματικών Πρωτοβουλιών», ΚΠΑ2 25<sup>ης</sup> ΜΑΡΤΙΟΥ
- 6) **01 - 31/05/2012:** Συμμετοχή στο ερευνητικό πρωτόκολλο **EuLuCA** (European Lung Cancer Audit) για τον καρκίνο του πνεύμονα
- 7) **2011:** Συμμετοχή στο πρόγραμμα σπироμετρήσεων της Πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας «Πρόγραμμα έγκαιρης διάγνωσης της ΧΑΠ» (Ν. Ιωνία Βόλου, Κ.Υ. Γόννων, Άγιος Γεώργιος Φερών)
- 8) **27 - 29/04/2001:** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 7<sup>ου</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας (Υπεύθυνη καλλιτεχνικού προγράμματος), Λάρισα
- 9) **10/07/2000 - 31/07/2000:** Συμμετοχή στο πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών του *IFMSA* (International Federation of Medical Students' Associations) με πλήρη συμμετοχή στις δραστηριότητες του *Surgical Department, St Luke's Hospital, Valetta, Malta*

## ΜΕΛΟΣ ΣΥΛΛΟΓΩΝ – ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- 1) European Respiratory Society
- 2) Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία
- 3) Εταιρεία Μελέτης Πνευμονοπαθειών & Επαγγελματικών Παθήσεων Θώρακος
- 4) Εταιρεία Αναπνευστικών Διαταραχών και Βαριάς Νόσου
- 5) Πανελλήνιος Ιατρικός Σύλλογος
- 6) Ιατρικός Σύλλογος Θεσσαλονίκης

**"Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗΣ  
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ"**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Π. ΚΑΖΑΚΟΥ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπων**)
2. **Δρ. Ζωή Δανιήλ**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Ανδρέας Τσακάλωφ**, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



## Περίληψη

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Η οστεοποντίνη (OPN) είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη, που ανευρίσκεται σε διάφορους ιστούς και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιολογίας του καρκίνου.

**ΣΚΟΠΟΣ:** Ο σκοπός της μελέτης ήταν α) ο προσδιορισμός των επιπέδων της OPN στον ορό αίματος ασθενών με καρκίνο πνεύμονα και σύγκριση με δείγματα υγιών εθελοντών, β) η συσχέτιση των, προ θεραπείας, επιπέδων OPN, αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) στον ορό ασθενών με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική επιβίωση και γ) η αναζήτηση ενδεχόμενης συσχέτισης των επιπέδων OPN με τα κυκλοφορούντα επίπεδα VEGF και MMP-9.

**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ:** Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 90 ασθενείς - μέσης ηλικίας  $66,22 \pm 9,09$  έτη - με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα (70 με Μη Μικροκυτταρικό Καρκίνο Πνεύμονα και 20 με Μικροκυτταρικό Καρκίνο Πνεύμονα), πριν από τη λήψη οποιασδήποτε θεραπείας και 40 υγιείς εθελοντές, ως ομάδα ελέγχου. Οι μετρήσεις των επιπέδων OPN, VEGF και MMP-9 στον ορό αίματος έγιναν με τη μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Τα επίπεδα OPN ήταν αυξημένα στους ασθενείς έναντι των υγιών μαρτύρων ( $52,10$  ng/ml έναντι  $22,98$  ng/ml,  $p < 0.0001$ ). Επιπλέον, οι καπνιστές ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα OPN και MMP-9 από τους μη καπνιστές και τους πρώην καπνιστές ( $p = 0.012$  και  $p = 0.008$ , αντίστοιχα). Επίσης, οι ασθενείς με χειρότερη γενική κατάσταση επέδειξαν υψηλότερα επίπεδα OPN, VEGF και MMP-9 ( $p = 0.0036$ ,  $p < 0.0001$  και  $p = 0.0004$ , αντίστοιχα). Όσοι είχαν σημαντική απώλεια βάρους, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα OPN ( $p = 0.0003$ ). Ακόμη, οι ασθενείς χωρίς μεταστατική νόσο στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες

είχαν χαμηλότερες τιμές τόσο του VEGF, όσο και της MMP-9 ( $p=0.0101$  και  $p=0.0144$ , αντίστοιχα). Δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN, VEGF και MMP-9 με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Οι ασθενείς με τιμές κυκλοφορούσης OPN πάνω από τη διάμεση τιμή είχαν χειρότερη συνολική επιβίωση (39 εβδομάδες έναντι 64,6 εβδομάδων,  $p=0.0018$ , log-rank test). Επιπλέον, η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι τα επίπεδα OPN ορού παρουσίαζαν μια τάση στο να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση ( $p=0.0656$ , 95% CI 0.9723-2.6563). Ομοίως χειρότερη συνολική επιβίωση, παρουσίαζαν τα άτομα με τιμές VEGF πάνω από τη διάμεση τιμή (43,30 εβδομάδες έναντι 62,90 εβδομάδων,  $p=0.0065$ ). Τα επίπεδα OPN ορού συσχετίστηκαν θετικά τόσο με τις τιμές του VEGF, όσο και με τις τιμές της MMP-9 ( $p=0.0008$ , Spearman  $r=0.36$ , και  $p<0.0001$ , Spearman  $r=0.42$ , αντίστοιχα).

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ:** Στους ασθενείς με ΚΠ, η OPN αποτελεί πιθανό προγνωστικό βιοδείκτη και η συσχέτιση ανάμεσα σε OPN και VEGF και MMP-9 υπαινίσσεται νέα δεδομένα στη διαδικασία της καρκινικής αγγειογένεσης.

## Abstract

**INTRODUCTION:** Osteopontin (OPN) is a multifunctional glycoprotein found in various tissues. It plays an important role in physiological and pathological processes, including cancer biology.

**PURPOSE:** The aim of this study was a) to evaluate OPN serum levels in lung cancer patients in comparison with samples from healthy volunteers, b) to correlate pre-treatment OPN serum levels with clinicopathological parameters, response to therapy and overall survival and c) to seek any possible association of OPN levels with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).



**MATERIALS AND METHODS:** In the present study, 90 patients with primary lung cancer were enrolled - mean age  $66.22 \pm 9.09$  years (70 with Non Small Cell Lung Cancer and 20 with Small Cell Lung Cancer) - and 40 healthy subjects were used as a control group. The serum levels of OPN, VEGF and MMP-9 were measured by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

**RESULTS:** OPN serum levels were elevated in lung cancer patients compared to healthy subjects (52.10 ng/ml vs. 22.98 ng/ml,  $p < 0.0001$ ). In addition, smoker patients showed significantly higher levels of OPN and MMP-9 than non-smokers and ex-smokers ( $p = 0.012$  and  $p = 0.008$ , respectively). Also, patients with worse performance status exhibited higher levels of OPN, VEGF and MMP-9 ( $p = 0.0036$ ,  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0004$ , respectively). Those who had significant weight loss, displayed higher levels of OPN ( $p = 0.0003$ ). Furthermore, patients without evidence of metastatic disease in the lymph nodes, had lower levels of VEGF and MMP-9 ( $p = 0.0101$  and  $p = 0.0144$ , respectively). There was no association of OPN, VEGF and MMP-9 serum levels with response to chemotherapy. Patients with OPN circulating levels above the median value had worse overall survival (39 weeks vs. 64.6 weeks,  $p = 0.0018$ , log-rank test). In addition, logistic regression analysis demonstrated that OPN serum levels trended towards being an independent prognostic factor for overall survival ( $p = 0.0656$ , 95% CI 0.9723-2.6563). Similarly worse overall survival, was found for the individuals with values of VEGF above the median value (43.30 weeks vs. 62.90 weeks,  $p = 0.0065$ ). Finally, OPN serum levels were positively correlated with both VEGF and MMP-9 levels ( $p = 0.0008$ , Spearman  $r = 0.36$ , and  $p < 0.0001$ , Spearman  $r = 0.42$ , respectively).

**CONCLUSION:** In lung cancer patients, OPN might serve as a prognostic biomarker. Furthermore, the positive correlation between OPN and both VEGF and MMP-9 could implicate new insights in tumour angiogenesis.

## Πίνακας Περιεχομένων

Συνοπτομογραφίες .....	20
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>23</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....</b>	<b>25</b>
Σύνδεση OPN με κύτταρα και σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών.....	36
Σύνδεση OPN με κύτταρα και σηματοδότηση μέσω CD44 .....	37
Ενδοκυττάρια OPN .....	37
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>81</b>
Κεφάλαιο 5 Υλικό.....	83
Κεφάλαιο 6 Μέθοδος.....	86
Κεφάλαιο 7 Στατιστική ανάλυση.....	88
Κεφάλαιο 8 Αποτελέσματα .....	89
8.1 Επίπεδα Οστεοποντίνης στον ορό.....	92
8.2 Συσχέτιση επιπέδων OPN, VEGF και MMP-9 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους .....	92
8.3 Συσχέτιση επιπέδων OPN, VEGF και MMP-9 με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την επιβίωση των ασθενών .....	99
8.4 Συσχέτιση επιπέδων OPN με επίπεδα VEGF και MMP-9 .....	101
Κεφάλαιο 9 Συζήτηση.....	102
Βιβλιογραφία.....	117

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΚΠ:	καρκίνος πνεύμονα
ΜΜΚΠ:	μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
ΜΚΠ:	μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
TNM:	( <b>T</b> umour <b>L</b> ymph <b>N</b> ode <b>M</b> etastasis) σύστημα σταδιοποίησης με βάση το μέγεθος του κύριου όγκου, την ενδεχόμενη διήθηση επιχώριων λεμφαδένων και την ενδεχόμενη ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης
ΧΜΘ:	χημειοθεραπεία
ΑΚΘ:	ακτινοθεραπεία
EGFR:	(epidermal growth factor receptor) υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
complementary DNA (cDNA):	συμπληρωματικό DNA
IL:	ιντερλευκίνη (1β, 6, ...)

NF-κB:	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
FAK:	(focal adhesion kinase) εστιακή κινάση σύμφυσης
MAPK:	(mitogen-activated protein kinase) πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνο
MMPs:	(matrix metalloproteinases) μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (2, 9, ...)
ILK:	integrin linked kinase
uPA:	πλασμινογόνο της ουροκινάσης
VEGF:	(vascular endothelial growth factor) αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
ERK:	extracellular signal-regulated kinases
NO:	μονοξείδιο αζώτου
MET:	πρωτο-ογκογονίδιο MET, υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
OS:	(overall survival) συνολική επιβίωση
DFS:	(disease free survival) επιβίωση ελεύθερη νόσου
PFS:	(progression-free survival) επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου
bFGF:	(basic fibroblast growth factor) βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα
HIF-1α:	(Hypoxia-inducible factor 1-alpha) επαγόμενου παράγοντα υποξίας 1-α

**Αφιερωμένη  
στον Αντώνη και τον Παναγιώτη**



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



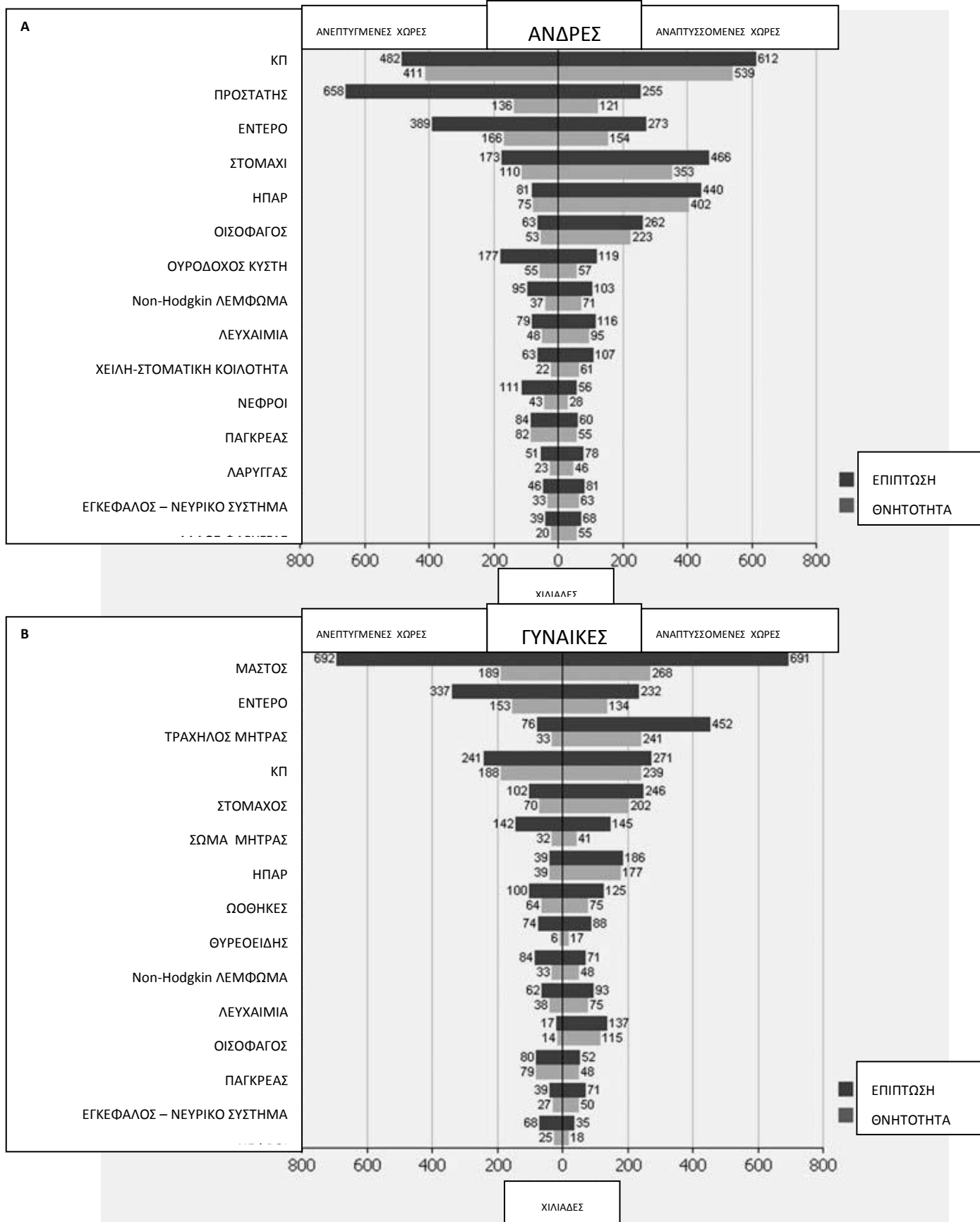


## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Ο καρκίνος του πνεύμονα (ΚΠ) αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια σε παγκόσμιο επίπεδο συνολικά, τόσο σε ό,τι αφορά τον αριθμό των νέων περιπτώσεων (επίπτωση: 1,6 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις, 12,7% στο σύνολο καρκίνων) όσο και σε αριθμό θανάτων (θνητότητα: 1,4 εκατομμύρια θάνατοι, 18,2% στο σύνολο θανάτων από καρκίνο). Στους άνδρες παραμένει η πιο συχνή κακοήθεια παγκοσμίως. Στις γυναίκες, ωστόσο, η επίπτωση γενικά είναι χαμηλότερη, αποτελώντας πλέον την τέταρτη συχνότερη κακοήθεια σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο <sup>[1]</sup> (Εικόνα 1).

Η πιο κοινή αιτία ΚΠ είναι η μακροχρόνια καπνιστική συνήθεια, καθώς το 85-90% των περιπτώσεων ΚΠ αποδίδεται στο κάπνισμα, με το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξής του σε έναν καπνιστή να είναι 10-30 φορές μεγαλύτερος απ' ό,τι σε έναν μη καπνιστή, ενώ 1 καπνιστής στους 10 θα νοσήσει από ΚΠ. Ωστόσο, το 12% των ατόμων που εκδηλώνουν καρκίνο του πνεύμονα δεν υπήρξαν ποτέ καπνιστές. Σε άλλες περιπτώσεις, ο ΚΠ αποδίδεται σε συνδυασμό γενετικών παραγόντων, σε επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, όπως ο αμίαντος, σε ατμοσφαιρική ρύπανση, στο παθητικό κάπνισμα, κ.ά. <sup>[2]</sup>. Ειδικά για το παθητικό κάπνισμα, διαπιστώνεται μια 20-30% αύξηση στην πιθανότητα ΚΠ από δευτεροπαθή έκθεση σε καπνό, όταν κανείς διαβεί με καπνιστή <sup>[3]</sup>.

Ιστολογικά, ο ΚΠ διακρίνεται σε δύο ευρύτερους ιστολογικούς τύπους, με διαφορετική παθολογοανατομική εικόνα και βιολογική συμπεριφορά: τον μη μικροκυτταρικό τύπο (ΜΜΚΠ), που αναλογεί στο 80-85% των περιπτώσεων ΚΠ και στο μικροκυτταρικό τύπο (ΜΚΠ), στο υπόλοιπο των περιπτώσεων. Ο ΜΜΚΠ περιλαμβάνει τους



**Εικόνα 1.** Εκτιμώμενα νούμερα (σε χιλιάδες) νέων περιπτώσεων καρκίνου (επίπτωση) και θανάτου (θνητότητα) Α. σε άνδρες και Β. σε γυναίκες σε ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες του κόσμου (2008) <sup>[1]</sup>.

ιστολογικούς τύπους: αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες και μεγαλοκυτταρικό <sup>[4]</sup>. Η διάγνωση τίθεται με ιστολογική ή κυτταρολογική επιβεβαίωση, μετά από βρογχοσκόπηση ή βιοψία με βελόνη (FNB). Η σταδιοποίηση των ασθενών με ΚΠ, με βάση το TNM σύστημα, πραγματοποιείται με τη βοήθεια αρχικά απλής ακτινογραφίας θώρακος, και εν συνεχεία με αξονική τομογραφία θώρακος και κοιλίας, μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και σπινθηρογράφημα οστών. Στη διαγνωστική φαρέτρα, όμως, έχουν προστεθεί και νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι (όπως π.χ. PET - τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, PET/CT - τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων/ αξονική τομογραφία) και επεμβατικές τεχνικές (EBUS bronchoscopy - βρογχοσκόπηση με χρήση ενδοβρογχικού υπερήχου, αυτοφθορίζουσα βρογχοσκόπηση, EMN bronchoscopy - βρογχοσκόπηση με ηλεκτρομαγνητική πλοήγηση), με στόχο τη διάγνωση του ΚΠ σε πρωιμότερο στάδιο.

Ιστορικά, η σταδιοποίηση του ΚΠ και κατ' επέκταση ο σχεδιασμός της θεραπείας βασιζόταν αποκλειστικά στην ανατομική έκταση του καρκίνου. Φυσικά, η ανατομία εξακολουθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση του ΚΠ και η σταδιοποίηση με βάση την ανατομία θα εξακολουθήσει να παραμένει σημαντική. Όμως, οι διαρκώς αυξανόμενες γνώσεις σχετικά με τη βιολογία του καρκίνου παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση, οι οποίες σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να υπερτερούν αυτών από την ανατομική έκταση της νόσου <sup>[4]</sup>.

Έτσι, η απλή διάκριση ανάμεσα σε ΜΚΠ και ΜΜΚΠ δεν θεωρείται πλέον ικανοποιητική από μόνη της για να υπαγορεύσει θεραπευτικές επιλογές, ειδικά σε προχωρημένη νόσο. Σήμερα, ο ΜΜΚΠ θεωρείται μια ετερογενής ομάδα νόσων, για τις οποίες απαιτούνται διαφορετικοί τύποι θεραπείας, ανάλογα με τον ιστολογικό υποτύπο και γονότυπο. Οι παθολογοανατομικές εκθέσεις πλέον είναι, όσο το δυνατόν, πιο λεπτομερείς στο να κατατάσσουν σε ιστολογικούς υποτύπους και να δίνουν πληροφορίες σχετικά με ενεργές γενετικές μεταβολές.

Θεραπευτικά και ανάλογα με το στάδιο της νόσου, ο ασθενής με ΚΠ μπορεί να αντιμετωπισθεί με χειρουργική εξαίρεση του όγκου, χημειοθεραπεία (ΧΜΘ) ή ακτινοθεραπεία (ΑΚΘ), καθώς και με συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων. Παρά τις εντατικές προσπάθειες να ελεγχθεί η θνητότητα του ΚΠ, η 5ετής επιβίωση μόλις πρόσφατα βελτιώθηκε στο 17% με τις υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις <sup>[5]</sup>. Η πλειοψηφία των ασθενών βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο κατά τη διάγνωση της νόσου· η πτωχή πρόγνωση πιθανότατα είναι πολυπαραγοντική και θα μπορούσε να αποδοθεί στην επιθετική βιολογική συμπεριφορά του ίδιου του ΚΠ, στη μη έγκαιρη διάγνωσή του, καθώς και στα περιορισμένα - σε αποτελεσματικότητα - μέσα αντιμετώπισής του.

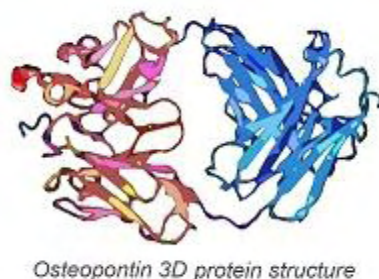
Πεδίο εντατικής έρευνας αποτελεί τα τελευταία χρόνια η ανίχνευση και αξιολόγηση μοριακών παραγόντων πρώιμης διάγνωσης και παρακολούθησης ασθενών με ΚΠ, σε μια προσπάθεια βελτίωσης της επιβίωσης των ασθενών αυτών. Η σύγχρονη πρόοδος στην κατανόηση της καρκινικής βιολογίας διευκόλυνε την αναζήτηση νέων βιολογικών δεικτών. Σε άλλους τύπους καρκίνου έχουν ανευρεθεί βιολογικοί δείκτες που βοηθούν στη διάγνωση, δείχνουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και χρησιμεύουν ως δείκτες υποτροπής. Στην περίπτωση του ΚΠ έχουν μελετηθεί μια πλειάδα βιολογικών δεικτών, οι περισσότεροι από τους οποίους στερούνται κλινικής χρησιμότητας, με εξαίρεση τις μεταλλάξεις του EGFR και τις αναδιατάξεις του ALK (anaplastic lymphoma kinase - κινάση αναπλαστικού λεμφώματος), που έχουν πλέον τη θέση τους ως προβλεπτικοί βιοδείκτες για στοχευμένη θεραπεία κυρίως σε αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα.

Πολλοί μελετητές αναδεικνύουν τη συμμετοχή πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην καρκινογένεση, υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η χρόνια φλεγμονή προάγει την ανάπτυξη των όγκων. Ακόμη, η αγγειογένεση αποτελεί μία διαδικασία πρωταρχικής σημασίας στην πορεία της ογκογένεσης, με την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα να θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη

συμπαγών όγκων. Ένας από τους παράγοντες για τον οποίο έχει πρόσφατα αποδειχθεί η συμβολή του στην καρκινογένεση, μέσω διαφόρων οδών είναι η *οστεοποντίνη* (Osteopontin - OPN).

## 2. ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗ

Η OPN είναι μια φωσφορυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη, που έχει εντοπιστεί σε όλα τα υγρά του σώματος όπως γάλα, αίμα και ούρα, ως ακινητοποιημένο εξωκυττάριο μόριο σε ποικίλους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, αλλά και ως πρωτεΐνη - δομικό συστατικό των επιμεταλλωμένων ιστών <sup>[6]</sup> (Εικόνα 2). Εκφράζεται από κύτταρα πολλών ιστών, όπως από τη θεμέλιο ουσία των οστών, την οστεΐνη και την οδοντίνη, αλλά και από κύτταρα σε αυλοειδείς επιθηλιακές επιφάνειες του γαστρεντερικού σωλήνα, της χοληδόχου κύστεως, του παγκρέατος, του ουροποιητικού και αναπαραγωγικού συστήματος, του πνεύμονα, του μαστού και των σιαλογόνων και ιδρωτοποιών αδένων <sup>[7]</sup>, καθώς και από ινοβλάστες, οστεοκλάστες, οστεοβλάστες, λεία μυϊκά κύτταρα, κύτταρα Kupffer, δενδριτικά κύτταρα, ενεργοποιημένα μακροφάγα, T-λεμφοκύτταρα, B-λεμφοκύτταρα και NK-κύτταρα <sup>[8]</sup>.



**Εικόνα 2.** Τρισδιάστατη δομή οστεοποντίνης (OPN).

Αρχικά, προσδιορίστηκε ως βασική σιαλοπρωτεΐνη, που εκκρίνεται από επιθηλιακά κύτταρα της θεμέλιας ουσίας των οστών, σχετιζόμενη με κακοήθη μετατροπή τους <sup>[9]</sup>. Το όνομα «οστεοποντίνη», που ετυμολογικά σημαίνει «οστική γέφυρα», προτάθηκε από τους Oldberg και συν. το 1986 όταν απομονώθηκε ως οστική σιαλοπρωτεΐνη από κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος αρουραίου. Η πρωτεΐνη λειτουργούσε ως γέφυρα ανάμεσα σε οστικά κύτταρα και υδροξυαπατίτη, μέσω μοτίβων αργινίνης - γλυκίνης - ασπαρτικού οξέος (RGD), που ανακαλύφθηκαν στην πρωταρχική αλληλουχία της πρωτεΐνης <sup>[10]</sup>. Στη συνέχεια, οι Smith και Denhardt κλωνοποίησαν ένα συμπληρωματικό DNA (cDNA) που ονομάστηκε «2ar» στην JB6 καρκινική κυτταρική σειρά επιδερμικών κυττάρων ποντικού <sup>[11]</sup>. Τελικά, οι Craig και συν. έδειξαν ότι η, προερχόμενη από τα οστά, OPN είναι η ίδια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον κλώνο «2ar» <sup>[12]</sup>. Η αλληλουχία αυτής της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε το 1989 από τους Prince και συν., μελέτη στην οποία συζητήθηκαν και αποσαφηνίστηκαν διάφορα δομικά χαρακτηριστικά της, δίνοντας στοιχεία σχετικά με τη λειτουργία της <sup>[13]</sup>. Ωστόσο, το ίδιο γονιδιακό παράγωγο έχει αναγνωριστεί ως υποθετική λεμφοκίνη παραγόμενη από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, καλούμενη πρωτεΐνη πρώιμης ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων (Eta-1: early T-lymphocyte activation-1 protein) <sup>[14]</sup>. Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη ονομάζεται και εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (Spp1: secreted phosphoprotein 1), ένα όνομα που αντανάκλα τον ευρύτερο λειτουργικό της ρόλο <sup>[14]</sup>. Υπάρχει, λοιπόν, μια πληθώρα εναλλακτικής ονοματολογίας για την πρωτεΐνη, όπως 2ar οστεοποντίνη (2ar osteopontin), οστική σιαλοπρωτεΐνη 1 (bone sialoprotein 1), 44-kDa οστική φωσφοπρωτεΐνη (44-kDa bone phosphoprotein), νεφροποντίνη (nephropontin), ογκο-εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη (tumor-secreted phosphoprotein), ανάλογα με τον ιστό προέλευσής της.

Πρόκειται για πρωτεΐνη που επιδεικνύει πολυσύνθετο ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, όπως στο μεταβολισμό των οστών και άλλων επιμεταλλωμένων

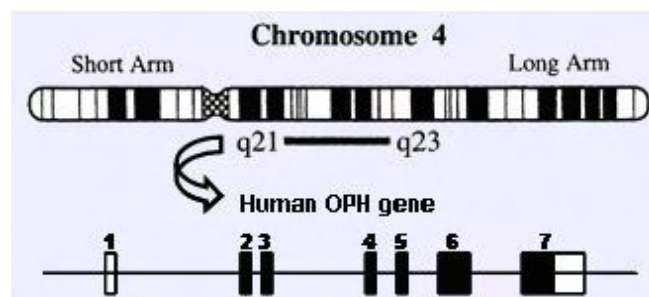
ιστών, στην κυτταρικά επαγόμενη ανοσιακή απάντηση, στην επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης στη διάρκεια φλεγμονωδών διεργασιών, στην αγγειογένεση, στην επαναστένωση των στεφανιαίων αγγείων, στην επιβίωση των κυττάρων σε ιστική βλάβη και στη βιολογία του καρκίνου <sup>[15]</sup>.

## **2.1 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗΣ**

Στον άνθρωπο, στο χρωμόσωμα 4, μέσα σε μια περιοχή 600 kb υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες της οικογένειας των SIBLINGs (Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins), που περιλαμβάνει την OPN, την οστική σιαλοπρωτεΐνη (BSP), την θεμέλιο πρωτεΐνη 1 (DMP1), την οδοντική σιαλοπρωτεΐνη (DSPP), και τη θεμέλιο εξωκυττάριο φωσφογλυκοπρωτεΐνη (MEPE) <sup>[16]</sup>. Πρόκειται για πρωτεΐνες με κοινά γενικά, γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά (παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή των εξωνίων, αλλά και παρόμοια μετα-μεταφραστικά τροποποιημένα μοτίβα), που ωστόσο διαφέρουν στη λειτουργία.

Το ανθρώπινο γονίδιο της OPN είναι ένα ενιαίο αντίγραφο γονιδίου, που εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 4 (4q13) <sup>[17]</sup> (Εικόνα 3). Έχει μήκος περίπου 8 kb και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης αποτελείται από 942 νουκλεοτίδια, από το κωδικόνιο έναρξης (στο εξώνιο 2) μέχρι το κωδικόνιο λήξης (στο εξώνιο 7) <sup>[18]</sup>. Αποτελείται από 7 εξώνια και 6 εσώνια. Το πρώτο εξώνιο αντιστοιχεί σε μη κωδικοποιούμενη περιοχή (5' UTR), ενώ η 3' μη κωδικοποιούμενη περιοχή αποτελεί το τελευταίο τμήμα του εξωνίου 7 <sup>[19]</sup>. Το εξώνιο 2 κωδικοποιεί ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, δηλαδή τα πρώτα δύο αμινοξέα στην ώριμη πρωτεΐνη, και αποτελείται από 17 αμινοξέα συνολικά. Τα εξώνια 3 και 5 έχουν τις δύο χαρακτηριστικές σερίνη - σερίνη - γλουταμινικό οξύ - γλουταμινικό οξύ αλληλουχίες φωσφορυλίωσης και 13 και 14 αμινοξέα αντίστοιχα. Το εξώνιο 4 έχει τα δύο αντιδραστικά γλουταμινικά υπολείμματα τρανσγλουταμινάσης και περιέχει 27 αμινοξέα. Το εξώνιο 6

κωδικοποιεί μια, πλούσια σε ασπαρτικό οξύ, αλληλουχία και 108 αμινοξέα, ενώ το εξώνιο 7 είναι το μεγαλύτερο, κωδικοποιώντας κατά προσέγγιση τη μισή πρωτεΐνη (134 αμινοξέα), συμπεριλαμβανομένου του μοτίβου RGD <sup>[20]</sup> (Εικόνα 2). Το γονίδιο της OPN έχει πολλά αλληλόμορφα γονίδια <sup>[21]</sup>, δεν είναι όμως γνωστό αν η ύπαρξη αυτών των αλληλομόρφων έχει κάποια λειτουργική σημασία στο ανθρώπινο είδος, όπως συμβαίνει σε άλλα είδη, στους ποντικούς παραδείγματος χάριν, όπου τα αλληλόμορφα σχετίζονται με αντίσταση στη λοίμωξη από ρικέτσια <sup>[8]</sup>.

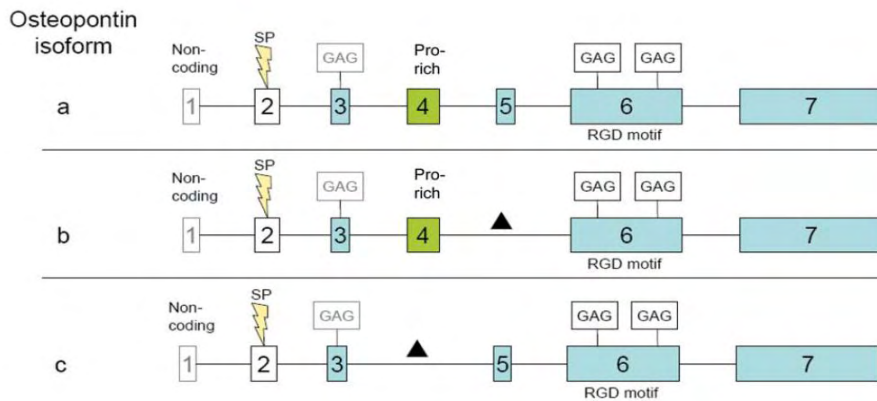


**Εικόνα 3.** Το γονίδιο της OPN στο χρωμόσωμα 4

Από το πρότυπο του DNA της OPN στον πυρήνα των κυττάρων, με τη διαδικασία της μεταγραφής προκύπτει το precursor mRNA (pre-mRNA, πρόδρομο mRNA). Στη συνέχεια, με τη διαδικασία που καλείται μάτισμα RNA (RNA splicing), οπότε και απομακρύνονται τα εσώνια, προκύπτει το ώριμο RNA της OPN.

Υπάρχουν διάφορα δεδομένα σχετικά με το μάτισμα του RNA και έχουν ανιχνευθεί 3 διαφορετικά cDNA OPN, έτοιμα προς μετάφραση στην πρωτεΐνη, η OPNa, η OPNb και η OPNc. Η OPNa (945 bp) κωδικοποιεί την πλήρους μήκους πρωτεΐνη (OPN-FL)· η OPNb (903 bp cDNA) παρουσιάζει έλλειψη μιας αλληλουχίας 14 αμινοξέων (του εξωνίου 5) και η OPNc παρουσιάζει έλλειψη 27 αμινοξέων (του εξωνίου 4). Η λειτουργική σημασία της έλλειψης αυτών των αλληλουχιών αμινοξέων δεν είναι γνωστή <sup>[21]</sup> (Εικόνα 4).





**Εικόνα 4.** Παραλλαγές ματίσματος της OPN <sup>[22]</sup>.

Στη διαδικασία της μετάφρασης του mRNA της OPN σε πρωτεΐνη, οπότε αντιστοιχίζονται τα κωδικόνια με αμινοξέα, έχει αποδειχθεί ότι η OPN είναι μια περίπτωση στην οποία από το πλήρους μήκους mRNA, μπορούν να προκύψουν, με εναλλακτική μετάφραση, πολλαπλές παραλλαγές της πρωτεΐνης <sup>[23]</sup>.

Βέβαια, η έκφραση της OPN μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως ορμόνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Τέτοιες ουσίες μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφή του γονιδίου, την επεξεργασία του mRNA, τη σταθερότητα και τη διαδικασία της μετάφρασης, αλλά να προξενήσουν και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της OPN. Η πλειοψηφία των μελετών αναφέρει ότι ο έλεγχος ασκείται στο επίπεδο της μεταγραφής <sup>[24]</sup>.

Η αλληλουχία του υποκινητή της OPN παρέχει στοιχεία για την κατανόηση της μοριακής βάσης της μεταγραφικής ρύθμισης. Διάφορες μελέτες έχουν αποκαλύψει πολλές πιθανές θέσεις αλληλεπίδρασης της OPN με μεταγραφικούς παράγοντες <sup>[18]</sup>, αλλά και έναν αυξανόμενο αριθμό παραγόντων που επιδρούν στην μεταγραφή της OPN. Έχουν διαπιστωθεί συγκεκριμένες πολυμορφικές παραλλαγές στον υποκινητή της OPN, οι οποίες έχουν συσχετισθεί με πρόοδο νόσου σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και στον ΚΠ <sup>[25]</sup>, με επιβίωση και οστικές μεταστάσεις σε ΜΜΚΠ <sup>[26]</sup> και με ανταπόκριση στη θεραπεία σε προχωρημένο ΜΜΚΠ <sup>[27]</sup>. Μεταξύ των άλλων, ως τέτοιοι παράγοντες έχουν αναγνωριστεί η

προγεστερόνη, τα γλυκοκορτικοειδή, η 1α,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>, και αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF).

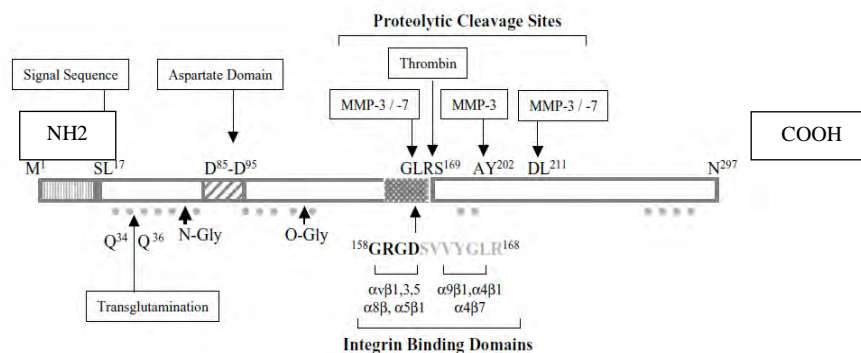
Έτσι, έχει δειχθεί *in vitro* σε οστικά κύτταρα αρουραίου ότι η φωσφορυλίωση και η θείωση της OPN, που συμβαίνει στις εξαιρετικά φωσφορυλιωμένες μορφές της OPN, εντείνουν τα ανιονικά χαρακτηριστικά επιφανείας της πρωτεΐνης, τροποποιώντας τη δομή και τις ιδιότητές της <sup>[28]</sup>. Ακόμη, εκτεταμένη γλυκοζυλίωση της OPN μπορεί να επηρεάσει την ευελιξία της πρωτεΐνης και μπορεί να αποτρέψει τη φωσφορυλίωσή της <sup>[24]</sup>.

Η πρωτεΐνη της OPN στον άνθρωπο περιέχει 314 αμινοξέα με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 35 KDa (Εικόνα 5). Η πρωτεΐνη, εκκρινόμενη από ποικίλους ιστούς, παρουσιάζει ηλεκτροφορητική σταθερότητα, συμβατή με πρωτεΐνη μοριακού βάρους μεταξύ 44 και 75 KDa. Αυτό μπορεί πιθανά να εξηγηθεί από τη σημαντική μετα-μεταγραφική τροποποίηση που υφίσταται, συμπεριλαμβανομένης φωσφορυλίωσης και N-συνδεδεμένης (N-linked) γλυκοζυλίωσης, όπως εξηγήθηκε ανωτέρω <sup>[29]</sup>. Άλλα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης είναι ότι πρόκειται για όξινη, υδρόφιλη και αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη, με χαρακτηριστικά εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Ανήκει στις λεγόμενες εγγενώς διαταραγμένες πρωτεΐνες (IDPs: Intrinsically Disordered Proteins), ομάδα που αφορά μια κατηγορία βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών που δεν διαθέτουν καθορισμένη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή <sup>[30]</sup>. Όταν η πρωτεΐνη υποστεί κάθαρση και απομονωθεί σε διάλυμα, έχει βρεθεί ότι είναι ευμετάβλητη, αλλά δεν παραμένει διαρκώς έτσι, διότι αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες θέσεις πρόσφυσης, οπότε, ανάλογα με τις θέσεις πρόσφυσης, παίρνει συγκεκριμένη δομή <sup>[31]</sup>.

Η OPN θεωρείται πρωτεΐνη που μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας και την κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία, και σε πολλές περιπτώσεις αυτή η επικοινωνία οδηγεί σε προσκόλληση ή στοχευμένη μετανάστευση των κυττάρων. Έτσι, δομικά, υπάρχουν αρκετές ενδιαφέρουσες περιοχές στο μόριο της OPN. Αυτές

περιλαμβάνουν τα NH<sub>2</sub>-τελικά και COOH-τελικά τμήματά της, μια αλληλουχία από 9-10 ασπαρτικά υπολείμματα, που θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν μια αλληλουχία δέσμευσης υδροξυαπατίτη, μία θέση για δέσμευση ασβεστίου - με άγνωστη λειτουργική σημασία στα κύτταρα - και δύο θέσεις δέσμευσης ηπαρίνης, επίσης με άγνωστη λειτουργική σημασία [8, 10, 29].

Πολύ σημαντικές λειτουργικά περιοχές στη δομή της OPN είναι η περιοχή κατάτμησης θρομβίνης (RSK), και κοντά στο NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα η γλυκίνη - αργινίνη - γλυκίνη - ασπαρτικό οξύ - σερίνη (GRGDS ή απλούστερα RGD) αλληλουχία, όσο και η σερίνη - βαλίνη - βαλίνη - τυροσίνη - γλυκίνη - λευκίνη - αργινίνη (SVVYGLR) αλληλουχία [6]. Η περιοχή κατάτμησης θρομβίνης (RSK) είναι σημαντική, διότι όταν η θρομβίνη τέμνει την OPN σ' αυτήν την θέση παράγει δύο τεμάχια σχεδόν ισότιμου μεγέθους. Αυτή η διατημημένη από τη θρομβίνη OPN (OPN-R) εκθέτει τις περιοχές όπου γίνεται η δέσμευση ιντεγκρινών (συγκεκριμένα τις RGD και SVVYGLR αλληλουχίες) και CD44 γλυκοπρωτεϊνών [32]. Υπάρχουν, όμως, και θέσεις κατάτμησης της OPN, στις οποίες μπορούν να επιδράσουν και συγκεκριμένες μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Έχουν διαπιστωθεί τρεις θέσεις κατάτμησης για την MMP-3 και άλλες δύο είναι ευαίσθητες στην κατάτμηση από την MMP-7 [29] (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Σχηματική παρουσίαση της δομής της πρωτεΐνης της OPN, όπου αναγνωρίζονται θέσεις σύνδεσης με ιντεγκρίνες και MMPs, θέσεις διάσπασης και θέσεις φωσφορυλίωσης και γλυκοζυλίωσης [29].

- θέσεις φωσφορυλίωσης

## Σύνδεση OPN με κύτταρα και σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς, διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας με μη ομοιοπολικά σχετιζόμενες  $\alpha$  και  $\beta$  υποομάδες. Αυτή η οικογένεια υποδοχέων έχει μια δεσμευτική ειδικότητα για διάφορες ουσίες, όπως η βιτρονεκτίνη, η φμπρονεκτίνη, το ινωδογόνο, η θρομβοσπονδίνη και η OPN που λειτουργούν ως συνδέτες <sup>[6]</sup>. Γενικά, υποδοχείς ιντεγκρινών είναι παρόντες σε κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, όπως μαστοκύτταρα, ουδετερόφιλα, T-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα και σε λεία μυϊκά και επιθηλιακά κύτταρα <sup>[33]</sup>. Έχειδειχθεί ότι η σύνδεση της OPN με τις ιντεγκρίνες ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλλά και την ανοσιακή απόκριση των κυττάρων.

Έτσι, η αλληλουχία GRGDS περιέχει μια λειτουργική RGD δεσμευτική περιοχή που συνενώνεται με τις  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  <sup>[24, 34]</sup>,  $\alpha_9\beta_1$  <sup>[35]</sup>,  $\alpha_8\beta_1$  <sup>[36]</sup> και  $\alpha_5\beta_1$  ιντεγκρίνες <sup>[21]</sup>. Ο πιο καλά μελετημένος υποδοχέας OPN είναι η  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη, που διευκολύνει την επαγόμενη από την RGD αλληλουχία προσκόλληση της OPN σε οστεοκλάστες <sup>[34]</sup>, σε λεία μυϊκά κύτταρα <sup>[37]</sup> και σε καρκινικά κύτταρα <sup>[38]</sup>. Μετά τη διάσπαση από τη θρομβίνη, το NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα της OPN που περιέχει την RGD αλληλουχία είναι συγκεκριμένα αυτό που ενισχύει την προσκόλληση και μετανάστευση των κυττάρων, και όχι το COOH-τελικό τμήμα της ή η πλήρους μήκους, μη διασπασμένη πρωτεΐνη (OPN-FL) <sup>[39]</sup>.

Ακόμη, από την OPN-FL, με διάσπαση της πρωτεΐνης από τη θρομβίνη, αποκαλύπτεται και μια απόκρυφη αλληλουχία με ξεχωριστές ιδιότητες, η SVVYGLR στο NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα, μεταξύ της RGD αλληλουχίας και της περιοχής κατάτμησης θρομβίνης. Η SVVYGLR αλληλουχία της OPN είναι μια δεύτερη περιοχή σύνδεσης με ιντεγκρίνες, και συγκεκριμένα για τις  $\alpha_9\beta_1$  <sup>[10, 35]</sup> και  $\alpha_4\beta_1$  ιντεγκρίνες <sup>[40]</sup>. Ειδικά για τη σύνδεση με την  $\alpha_9\beta_1$  ιντεγκρίνη απαιτείται η OPN-R μορφή της πρωτεΐνης (διασπασμένη από θρομβίνη). Ωστόσο,

έχει αποδειχθεί ότι η σύνδεση της OPN με την  $\alpha_4\beta_1$ , που συμμετέχει στη διαδικασία διαπίδυσης λευκοκυττάρων διαμέσου των αγγείων στη διάρκεια φλεγμονώδους απόκρισης, δεν απαιτεί τη διάσπασή της από τη θρομβίνη<sup>[40]</sup>.

#### Σύνδεση OPN με κύτταρα και σηματοδότηση μέσω CD44

Η OPN μπορεί ακόμη να αλληλεπιδρά με έναν μη-ιντεγκρινικό υποδοχέα κυτταρικής επιφανείας, το CD44. Για την ακρίβεια, πρόκειται για την οικογένεια των CD44, που είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας, οι οποίες λειτουργούν ως μόρια προσκόλλησης σε κυτταρο-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας. Η οικογένεια των CD44 περιλαμβάνει πολλαπλά αλληλόμορφα (CD44v6-15), ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος (του γονιδίου CD44), τα οποία συνδέονται με μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως με το υαλουρονικό οξύ, αλλά και με την OPN. Φαίνεται, όμως, ότι ειδικά τα v6 και/ή τα v7 αλληλόμορφα είναι αυτά που απαιτούνται για αλληλεπίδραση με την OPN<sup>[41]</sup>. Ακόμη, έχει προταθεί ότι η αλληλεπίδραση της OPN με τις CD44 περιλαμβάνει πρωτίστως σύνδεση στις  $\beta_1$  ιντεγκρίνες, αντί για απευθείας με τις CD44 και ότι είναι ανεξάρτητη από το RGD μοτίβο<sup>[41]</sup>. Έτσι, η σύνδεση OPN και CD44 επάγει κυτταρικές αποκρίσεις παρόμοιες με αυτές των ιντεγκρινών, συμπεριλαμβανομένων πρόσφυσης, μετανάστευσης και διέγερσης φυσιολογικών, αλλά και κακοήθων κυττάρων<sup>[24]</sup>.

#### Ενδοκυττάρια OPN

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η εναλλακτική μετάφραση του mRNA της OPN μπορεί να δώσει γένεση σε διάφορες ισομορφές της OPN, και συγκεκριμένα την εξωκυττάρια-

εκκρινόμενη OPN (OPN-s) και την ενδοκυττάρια OPN (OPN-i). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι δύο ισομορφές έχουν μικρή διαφορά μοριακού βάρους (5 kDa) και στην OPN-i απουσιάζει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, που επιτρέπει στην πρωτεΐνη να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και όχι στο σύμπλεγμα Golgi. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα είναι πλούσια σε OPN-i <sup>[42]</sup>, η οποία έχει συσχετισθεί με το σύμπλεγμα CD44 στη μετανάστευση ινοβλαστών <sup>[43]</sup> και μεταστατικών κυττάρων από καρκίνο μαστού <sup>[44]</sup>, καθώς και ενεργοποιημένων μακροφάγων <sup>[45]</sup>. Από την άλλη μεριά, η OPN-s είναι σημαντική στην ενεργοποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών και την επακόλουθη ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων <sup>[46]</sup>. Ακόμη, φαίνεται πως τα T-λεμφοκύτταρα έχουν την τάση να εκκρίνουν OPN και αυτή η OPN-s επηρεάζει την κυτταρική απόκριση <sup>[42]</sup>.

## **2.2 ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ**

Είναι αλήθεια ότι οι πρώιμες μελέτες σχετικές με την OPN επικεντρώνουν στη συσχέτισή της με τον οστικό μεταβολισμό. Σημαντική, ωστόσο, ήταν η μελέτη των Brown και συν. <sup>[7]</sup>, που μελέτησε την έκφραση και κατανομή της OPN σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς σε μη οστικές θέσεις, και συγκεκριμένα σε αυλοειδείς επιθηλιακές επιφάνειες. Έτσι, στο φυσιολογικό πνεύμονα, η OPN εκφράζεται από βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και διάσπαρτα κυψελιδικά μακροφάγα, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως γνωστή η λειτουργική σημασία της. Αν και η OPN έχει ανιχνευθεί στη θεμέλια ουσία των οστών, δεν υπάρχουν δεδομένα ότι η OPN αποτελεί μέρος, μη οστικής προέλευσης, θεμέλιας ουσίας *in vivo*.

Στη διάρκεια παθολογικών διεργασιών στον πνεύμονα, η OPN εκφράζεται από επιθήλιο που έχει υποστεί βλάβη, από T-λεμφοκύτταρα και από πνευμονικό αγγειακό

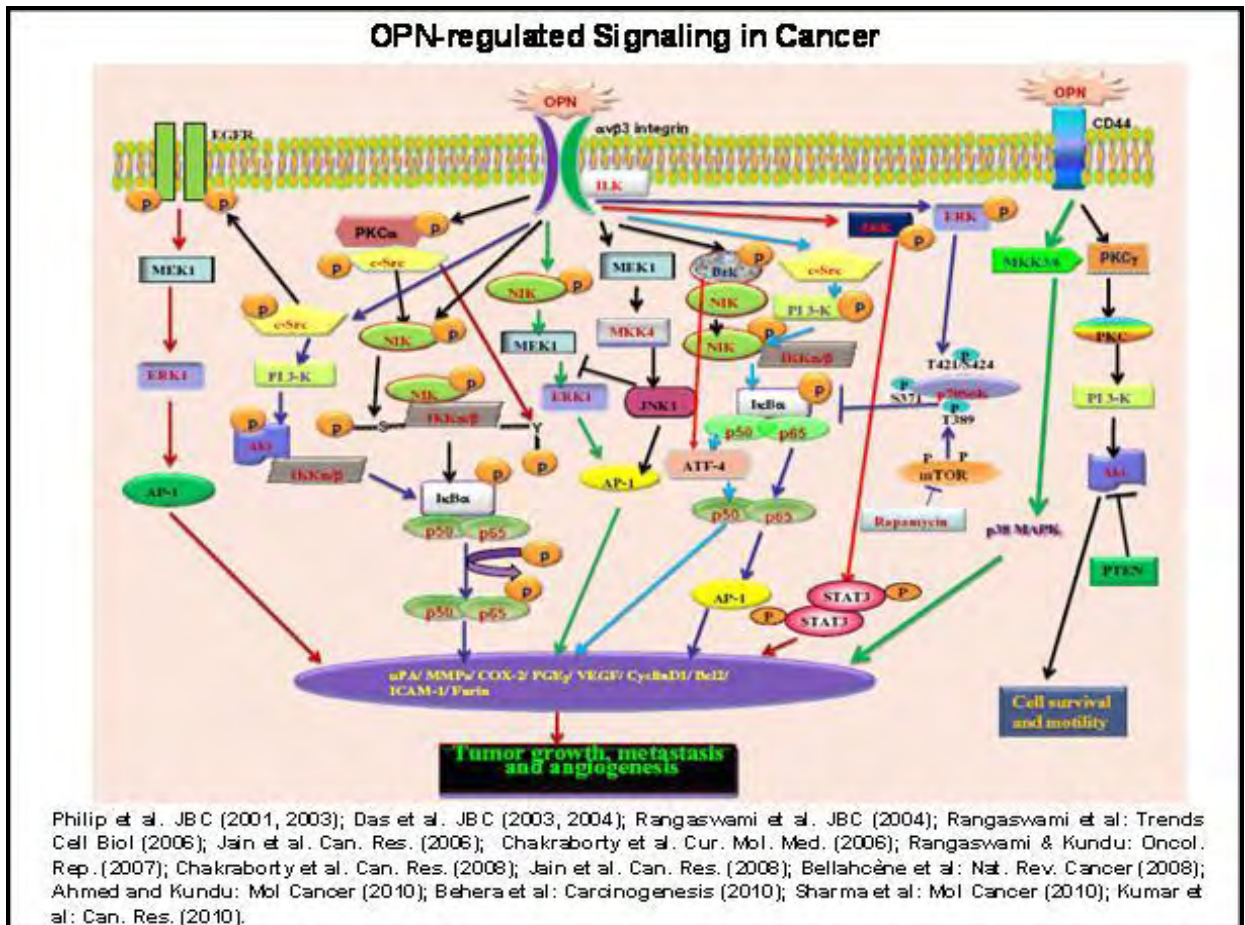
ενδοθήλιο <sup>[47]</sup>. Σε νόσους του πνεύμονα στον άνθρωπο φαίνεται πως οι ινοβλάστες δεν εκφράζουν OPN, αν και έχει δείχθει κάτι τέτοιο σε ινοβλάστες καρδιακού ιστού αρουραίου <sup>[48]</sup>. Σε πνευμονικές νόσους όπου εμπλέκονται φλεγμονώδεις διεργασίες, η έκφραση της OPN αυξάνει και ρυθμίζει τη στρατολόγηση των μακροφάγων (κυψελιδικών και μακροφάγων του διαμέσου ιστού) και την τύπου-1 ή κυτταρικά επαγόμενη ανοσιακή αντίδραση υπερευαισθησίας. Η φλεγμονώδης πνευμονική νόσος μπορεί στη συνέχεια είτε να λυθεί, είτε να εξελιχθεί σε ίνωση. Πρόοδος σε ίνωση έχει συσχετισθεί με περαιτέρω αύξηση της έκφρασης OPN και θεωρείται ότι ρυθμίζει την κολλαγονική ινιδιογένεση και αναδιαμόρφωση. Σε απουσία ίνωσης, φαίνεται ότι η έκφραση OPN μειώνεται σε φυσιολογικό επίπεδο <sup>[21]</sup>.

### **2.3 ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται διάφορους σηματοδοτικούς μηχανισμούς προκειμένου να επάγουν την αυτονομία τους. Έτσι, παρουσιάζουν μια επάρκεια στην προαγωγή αυξητικών σημάτων, αλλά και έλλειψη ευαισθησίας σε ανασταλτικά σήματα της ανάπτυξης. Επίσης, κατορθώνουν να διαφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και να έχουν απεριόριστη αντιγραφική προοπτική, που διατηρείται με την αγγειογένεση. Όλα τα ανωτέρω συνεισφέρουν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Μέχρι στιγμής, δεν είναι πλήρως κατανοητός ο ειδικός λειτουργικός ρόλος της OPN στην παθοφυσιολογία της καρκινογένεσης. Ωστόσο, η OPN θεωρείται ότι εμπλέκεται σε πολλαπλούς και πολύπλοκους μηχανισμούς καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένων αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, μονοπάτια αυξητικών παραγόντων και πρωτεασών. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις της OPN με υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση ποικίλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων, οι πρωτεΐνες των οποίων

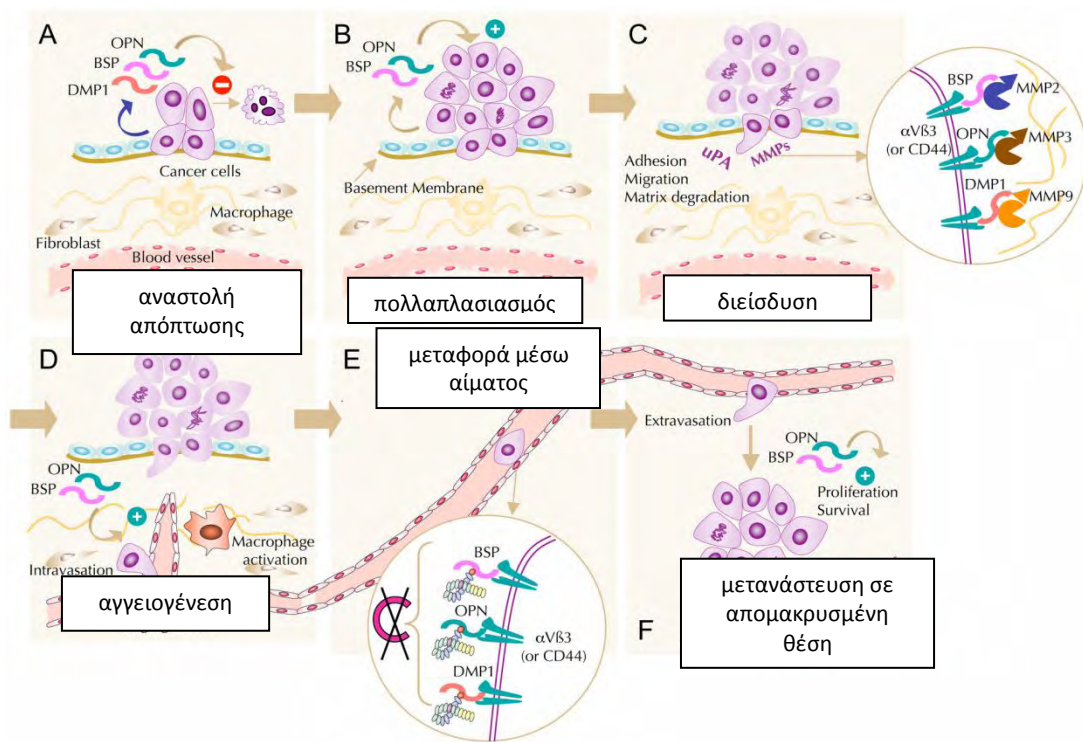
συνεισφέρουν σε τροποποιημένη κυτταρική συμπεριφορά, συμπεριλαμβανομένων κυτταρικής μετανάστευσης και εισβολής. Η εκφραζόμενη σε διάφορους τύπους κακοηθειών OPN συνδέεται είτε με ιντεγκρίνες, είτε με CD44 υποδοχείς και μέσω της φωσφορύλιωσης διαφόρων κινασών, επάγει την ενεργοποίηση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων [49] (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. OPN και μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Οι λειτουργίες της OPN στην παθοφυσιολογία του καρκίνου θα μπορούσαν να συνοψισθούν στις ακόλουθες επιδράσεις της στα καρκινικά κύτταρα: α) αναστολή της απόπτωσης, β) πολλαπλασιασμός, γ) διείσδυση, δ) αγγειογένεση, ε) μεταφορά μέσω αίματος, στ) πρόσφυση και μετανάστευση τους σε απομακρυσμένη θέση. Όλα αυτά αναδεικνύουν την OPN ως πιθανό στόχο στη θεραπεία του καρκίνου (Εικόνα 7).





Εικόνα 7. OPN και παθοφυσιολογία του καρκίνου [50].

Πιο αναλυτικά, η OPN έχει συσχετισθεί με:

#### A. Αναστολή της απόπτωσης

Φυσιολογικά, τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση αφότου χάσουν επαφή με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, μια διαδικασία κυτταρικού θανάτου που αποκαλείται *apoptosis* [51]. Η αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, η πρόληψη της απόπτωσης και η προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης είναι σημαντικά βήματα στη διάρκεια της εξέλιξης της καρκινογένεσης. Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ανεπαρκή αποπτωτική ρύθμιση, γεγονός που οδηγεί σε εξέλιξη των μεταλλαγμένων κυττάρων και η OPN έχει φανεί ότι ασκεί ισχυρή επίδραση στην αποτροπή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων [49].

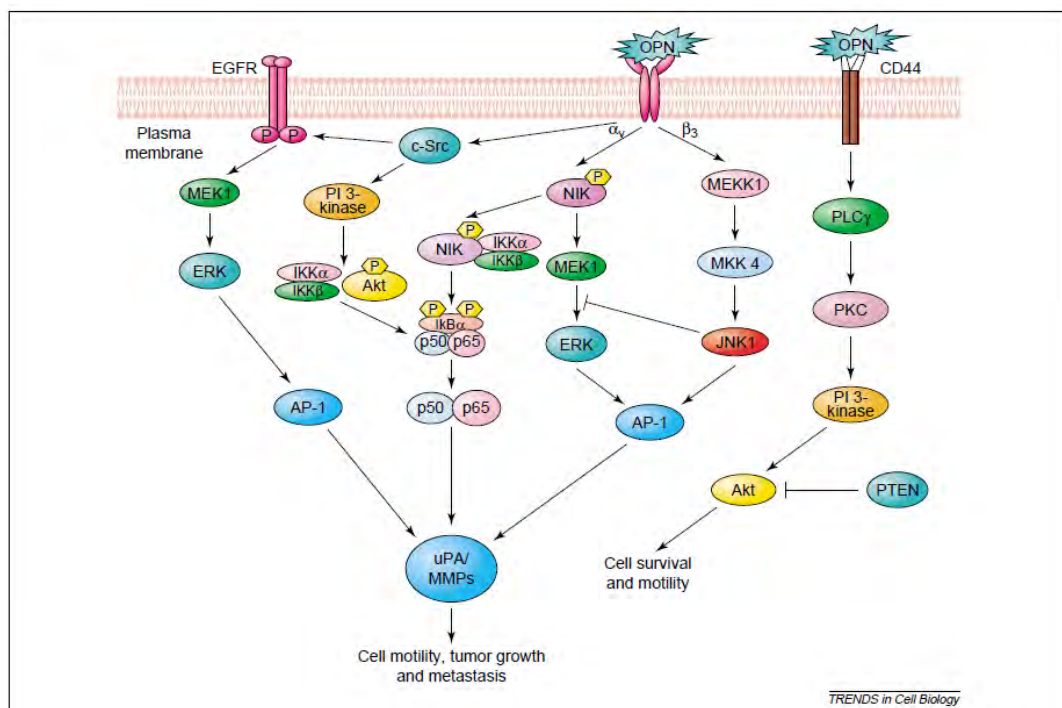
Έτσι, σε proB κυτταρική σειρά επίμυος έχει φανεί ότι η σύνδεση OPN-CD44 συνεισφέρει στην αντι-αποπτωτική δραστηριότητα της IL-3 και του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), μέσω του PI3K-Akt (φωσφατιδυλο-ϊνοσιτόλη 3 κινάση-πρωτεϊνική κινάση B) σηματοδοτικού μονοπατιού<sup>[52]</sup>. Επιπλέον, η OPN επάγει τη δραστηριότητα της PI3-κινάσης και της PI3-κινάση εξαρτώμενης Akt φωσφορυλίωσης, μέσω της  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης σε καρκινικά κύτταρα μαστού, ρυθμίζοντας έτσι την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου<sup>[38]</sup> (Εικόνα 6 και 8).

Ακόμη, υπάρχουν δεδομένα σε ανθρώπινο καρκίνο στομάχου με βάση τα οποία οι αντι-αποπτωτικές ιδιότητες της OPN αποδίδονται κυρίως στην αλληλεπίδραση του COOH-τελικού τμήματος της OPN με παραλλαγές εναλλακτικού ματίσματος της οικογένειας CD44v, ειδικά τις v6 και v7 παραλλαγές ματίσματος και λιγότερο στην αλληλεπίδραση της RGD αλληλουχίας με ιντεγκρίνες<sup>[53]</sup>. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η αλληλεπίδραση της OPN με τον υποδοχέα CD44 ενεργοποιεί την από έσω προς τα έξω σηματοδότηση, επαγόμενη από την Src τυροσινική κινάση, γεγονός που ενισχύει την ικανότητα για αντίσταση στην απόπτωση<sup>[54]</sup>.

Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι αντι-αποπτωτικές ιδιότητες της OPN σχετίζονται με το μονοπάτι NF-kB, διαμέσου της RGD ακολουθίας, τόσο σε *in vivo*, όσο και σε *in vitro* μελέτες<sup>[55]</sup>. Αρχικά μελετήθηκε το πώς η σύνδεση της OPN με  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνες, μέσω ενεργοποίησης του NF-kB προσέφερε αυξημένη επιβίωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής αρουραίου<sup>[56]</sup>. Στη συνέχεια, η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού και η συνακόλουθη αναστολή της απόπτωσης από την OPN έχει δειχθεί και σε πειραματικά μοντέλα χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων (όπως σε ρευματοειδή αρθρίτιδα)<sup>[57]</sup>, αλλά και σε *in vitro*, *in vivo* μοντέλα ηπατοκυτταρικού καρκίνου<sup>[58]</sup>. Ακόμη, η αναστολή της OPN οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο, μειωμένη σύνδεση με τον NF-kB και αυξημένα επίπεδα του αναστολέα IκBα (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor,

alpha) <sup>[58]</sup>. Αντίστοιχα, σε συνθήκες υποξίας κυττάρων, η αναστολή της NF-kB δραστηριότητας καταστέλλει την επαγόμενη από την OPN προστασία στην απόπτωση <sup>[55]</sup>. Στη διάρκεια υποξίας και επανοξυγόνωσης, η καταστολή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων από την OPN απενεργοποιείται διαμέσου της ενδοκυττάριας πρωτεολυτικής τομής της από την caspase-8 <sup>[59]</sup>. Ακολούθως, το προϊόν της τομής επάγει τον κυτταρικό θάνατο, μέσω μείωσης της συσσώρευσης της p53 πρωτεΐνης, που ασκεί προστατευτική δράση για το γονιδίωμα <sup>[59]</sup>.

Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων της μελέτης των Courter και συν. έδειξε ότι οι κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν αλληλόμορφα OPN, μέσω της RGD αλληλουχίας, παρουσιάζουν μειωμένο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, διαμέσου ενεργοποίησης και άλλου μονοπατιού. Τέτοιο μονοπάτι είναι μέσω φωσφορυλίωσης της FAK ως απάντηση στη σύνδεση της OPN με τις  $\alpha_v\beta_1$  και  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνες <sup>[55]</sup>, όπως είχε δείξει και προηγούμενη μελέτη <sup>[60]</sup>.



**Εικόνα 8.** Μοριακοί μηχανισμοί και μονοπάτια αλληλεπίδρασης OPN στην παθοφυσιολογία του καρκίνου <sup>[49]</sup>.

## **B. Πολλαπλασιασμός**

Εύλογα το πιο θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων θεωρείται η ικανότητά τους να διατηρούν μακροχρόνιο πολλαπλασιασμό. Η ικανότητα αυτή είναι αποτέλεσμα μιας δυναμικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε παράγοντες που επάγουν θετικά ή αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Έτσι, έχει φανεί ότι η επαγόμενη από την OPN απόκριση προς πολλαπλασιασμό συμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης του EGFR σε κύτταρα καρκίνου προστάτη στον άνθρωπο <sup>[61]</sup> (Εικόνα 8). Άλλοι ερευνητές σε καρκίνο νεφρού εκ διαυγών κυττάρων συσχέτισαν θετικά την αυξημένη έκφραση του γονιδίου του EGFR με την έκφραση OPN και τη σηματοδότηση NF-κΒ, ενώ σε επίπεδο έκφρασης πρωτεϊνών φάνηκε αντίστροφη συσχέτιση, πιθανά αντικατοπτρίζοντας τις δυναμικές μεταβολές που υφίσταται ο EGFR αφότου ενεργοποιηθεί <sup>[62]</sup>. Επίσης, η ενδοκυττάρια σηματοδότηση ιονισμένου  $Ca^{2+}$  που επάγεται από την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της οστικής θεμέλιας ουσίας όπως η OPN, φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην αύξηση και στην πρόοδο μεταστατικού καρκίνου προστάτη <sup>[63]</sup>. Ακόμη, η OPN διεγείρει το γρήγορο πολλαπλασιασμό ανθρώπινης κυτταρικής σειράς καρκίνου προστάτη όταν μεταφερθεί σε μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού <sup>[64]</sup>.

Άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην πολλαπλασιαστική επίδραση της OPN σε καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι το MAPK μονοπάτι, στη διάρκεια της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη και την OPN και το σχηματισμό του επαγόμενου από τη Src κινάση συμπλόκου, με αποτέλεσμα την πρόοδο της καρκινικής αύξησης <sup>[50]</sup> (Εικόνα 8).

### Γ. Διείσδυση και αποδόμηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας

Βήμα-κλειδί στη διαδικασία της καρκινογένεσης είναι η απόσπαση των καρκινικών κυττάρων από την αρχική καρκινική μάζα και, καθώς πρόκειται για κύτταρα με αυξημένες προσκολλητικές και μεταναστευτικές ιδιότητες, η επακόλουθη αποδόμηση της βασικής μεμβράνης, ώστε να διεισδύουν στο στρώμα. Συνεπώς, επόμενο σημαντικό βήμα στην καρκινογένεση είναι η αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η OPN φαίνεται να ρυθμίζει τη δραστηριότητα δύο τουλάχιστον ομάδων πρωτεϊνών που αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMPs) και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου της ουροκινάσης (uPA) (Εικόνα 8).

Σε πειραματικό μοντέλο GCT23 κυττάρων γιγαντοκυτταρικού όγκου φάνηκε ότι η OPN, μεταξύ των άλλων πεπτιδίων, επάγει την ενεργοποίηση της MMP-2 <sup>[65]</sup>. Οι Philip και συν. έχουν δείξει ότι η OPN ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση της pro-MMP2, διαμέσου του μονοπατιού του NF-kB σε κύτταρα μελανώματος επίμυος <sup>[66]</sup>. Άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση MMP-2 είναι η επαγωγή της OPN μέσω COX-2 (κυκλοοξυγενάση-2) και η θετική προαγωγή της PGE2 (προσταγλανδίνης E2) <sup>[67]</sup>. Επίσης, η OPN ενεργοποιεί την MMP-9, διαδικασία που είναι NIK-NF-kB επαγόμενη, μέσω IKKa/b και MAPK εξαρτώμενων μονοπατιών σε κύτταρα μελανώματος επίμυος <sup>[68]</sup>. Ακόμη, σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο έχει φανεί ότι η MMP-9 έχει την ιδιότητα να διασπάσει την OPN σε τμήματα, ένα εκ των οποίων είναι διαφορετικό της RGD περιοχής και ενισχύει τη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων <sup>[69]</sup>.

Επιπλέον, σε ανθρώπινο καρκίνο μαστού έχει δειχθεί ότι η OPN αυξάνει την κυτταρική διείσδυση, μέσω της διέγερσης του uPA <sup>[70]</sup>. Το uPA σύστημα φαίνεται ότι είναι ενεργοποιημένο σε υψηλά επίπεδα σε περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο μαστού με παρουσία οστικών μεταστάσεων και κακή πρόγνωση <sup>[71]</sup>. Οι Das και συν. στη μελέτη τους το 2003 επιβεβαίωσαν ότι η σχετιζόμενη με την OPN έκκριση της uPA είναι επαγόμενη από την NF-

kB/IkBa/IKK και εξαρτάται από τη δραστηριότητα της PI3-κινάση εξαρτώμενης Akt φωσφορυλίωσης<sup>[38]</sup>. Ακόμη, μέσω της ILK και του AP-1 (activator protein 1, ενεργοποιού πρωτεΐνης 1) σήματος, η OPN ρυθμίζει προς τα πάνω τη δραστηριότητα της uPA και της MMP-2 στη διάρκεια διείσδυσης επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων καρκίνου μαστού ποντικού<sup>[72]</sup>.

#### Δ. Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση ως διαδικασία προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου και τη μεταστατική διασπορά του, διαμέσου μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ μεσολαβητών αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με θετικό και αρνητικό ρόλο, και των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και της στρατολόγησης αγγειακού δικτύου.

Υπάρχουν δεδομένα ότι η  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη είναι ένας υποδοχέας-κλειδί στην αγγειογένεση, που ρυθμίζεται προς τα πάνω στην επιφάνεια ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει δειχθεί *in vitro* ότι η OPN εμπλέκεται στην αγγειογένεση μέσω της σύνδεσής της στο RGD μοτίβο της με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη<sup>[37]</sup>. Σε *in vivo* μοντέλο καρκίνου στομάχου φάνηκε ότι η OPN συντελεί στη γένεση νέων τριχοειδών -νεοαγγείωση- στον καρκινικό ιστό<sup>[73]</sup>.

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η OPN επάγει θετικά την έκφραση δύο μελών της οικογένειας των διακυτταρικών σηματοδοτικών πρωτεϊνών CCN, του CYR61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61) και του CTGF (connective tissue growth factor) σε *in vivo* μοντέλα<sup>[74]</sup>. Τόσο η OPN, όσο και η CYR61 μπορούν έπειτα να αλληλεπιδρούν με τους  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρινικούς υποδοχείς στην επιφάνεια ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων διευκολύνοντας την αγγειογένεση<sup>[75]</sup>. Ακόμη, βασική υπερέκφραση OPN σε νευροβλάστωμα επίμυος και σε κύτταρα καρκίνου μαστού επάγει την νεοαγγειογένεση *in vivo*<sup>[76, 77]</sup>.

Οι δύο προηγούμενες μελέτες <sup>[76, 77]</sup>, αλλά και αρκετές άλλες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την OPN με αγγειογενετικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Έτσι, έχειδειχθεί ότι η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων διεγείρεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο VEGF, την OPN και την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη <sup>[76]</sup>. Επιπλέον, η έκφραση των VEGF, OPN και  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη έχει συσχετισθεί με την αγγειογένεση σε γλοιοβλάστωμα <sup>[78]</sup>. Επιπρόσθετα, σε *in vitro* μελέτη που αφορούσε ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο, επαγόμενος από την OPN, VEGF ενεργοποιεί το PI3K-Akt και το ERK  $\frac{1}{2}$  μονοπάτι, ως σήμα θετικής ανατροφοδότησης <sup>[79]</sup>. Ακόμη, φαίνεται ότι η OPN πυροδοτεί την επαγόμενη από VEGF ανάπτυξη και αγγειογένεση σε καρκίνο μαστού, μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών και η OPN επάγει την έκφραση VEGF μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών Brk/NF-kB/ATF-4 (breast tumor kinase/nuclear factor-kappaB/activating transcription factor-4) <sup>[77]</sup>.

Η νεοαγγειογενετική διαδικασία που επάγουν τα ανωτέρω μόρια (OPN, VEGF και  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη) πιθανά σχετίζεται και με ενεργοποίηση μονοκυττάρων προς απελευθέρωση και κυκλοφορία προ-αγγειογενετικών κυτταροκινών, αλλά και με αποτροπή της απόπτωσης ενδοθηλιακών κυττάρων <sup>[80]</sup>. Έχειδειχθεί ότι η OPN προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από απόπτωση, πιθανά μέσω ενεργοποίησης του NF-kB. Οι Scatena και συν. σε ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής αρουραίου, έδειξαν ότι η πρόσδεση της OPN στην  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-kB μονοπατιού (ενός προστατευτικού για τα κύτταρα μονοπατιού), το οποίο μάλιστα είναι Ras και Src επαγόμενο <sup>[56]</sup>. Ακόμη, οι Khan και συν. αναφέρουν ότι η OPN αποτρέπει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του NF-kB μονοπατιού <sup>[81]</sup>. Περαιτέρω ανάλυση του  $\alpha_v\beta_3$ -NF-kB μονοπατιού ενδοθηλιακής κυτταρικής επιβίωσης έδειξε ότι οι μοριακοί μεσολαβητές είναι οι IκBα, IKKβ και NIK κινάσες και η προσθήκη ενός εξουδετερωτικού αντι- $\beta_3$  αντισώματος παρουσία OPN «μπλόκαρε» την NF-

kB δραστηριότητα και προκάλεσε το θάνατο ενδοθηλιακών κυττάρων <sup>[82]</sup>. Επιπρόσθετα, η έκφραση οστεοπροτεγερίνης, ενός υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου, που επάγεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ OPN και  $\alpha_v\beta_3$ , φαίνεται πως προστατεύει ενδοθηλιακά κύτταρα από απόπτωση <sup>[83]</sup>.

### **Ε. Μεταφορά μέσω αίματος**

Η κυκλοφορία του αίματος αποτελεί μάλλον ένα περιοριστικό βήμα στη μεταφορά των καρκινικών κυττάρων και στη διαδικασία της μετάστασής τους σε απομακρυσμένα όργανα, εξαιτίας της ύπαρξης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αναπτύξουν ανοσοκατασταλτικές στρατηγικές για να αποφύγουν τόσο τα κύτταρα της μη ειδικής άμυνας (NK-κύτταρα, μακροφάγα), όσο και κύτταρα της ειδικής άμυνας, όπως τα B- και T-λεμφοκύτταρα.

Έχει δειχθεί ότι η OPN παράγεται τόσο από κύτταρα του στρώματος του ξενιστή, όσο και από καρκινικά κύτταρα, και απ' ό,τι φαίνεται ο ρόλος της OPN στη διαδικασία της μετάστασης εξαρτάται από τη θέση παραγωγής <sup>[84]</sup>. Έτσι, υπάρχει η παραγόμενη από τον ξενιστή OPN (host-derived OPN, hdOPN) και η παραγόμενη από τον όγκο OPN (tumour-derived OPN, tdOPN). Η hdOPN, που σχετίζεται με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και είναι η συσσωρευμένη μορφή, θα μπορούσε να θεωρηθεί αντι-μεταστατική, καθώς ελκύει τα μακροφάγα με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και την επιβίωση του ασθενούς <sup>[85]</sup>. Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι η OPN που εκκρίνεται από τα μακροφάγα αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου *in vivo* <sup>[86]</sup>. Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει την εκφραζόμενη από τα μακροφάγα OPN ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για συνολική επιβίωση (OS) και επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS) σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, ειδικά σταδίου I <sup>[87]</sup>. Αντίθετα, η tdOPN φαίνεται ότι είναι διαλυτή, δεν σχετίζεται με τη φимπρονεκτίνη ή τη βιτρονεκτίνη και αναστέλλει τη λειτουργία των μακροφάγων και την τοξικότητά τους έναντι



του όγκου, όποτε με αυτό τον τρόπο ενισχύει την αύξηση, διείσδυση και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία <sup>[88]</sup>. Ακόμη, η tdOPN παρουσιάζει διαφορετική μετα-μεταφραστική τροποποίηση από την hdOPN και είναι λιγότερο φωσφορυλιωμένη, γεγονός που φαίνεται να προωθεί την πρόοδο του καρκίνου <sup>[74]</sup>.

Σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό επιτήρησης των όγκων από τον οργανισμό θεωρείται ότι διαδραματίζει το συμπλήρωμα, διαμέσου των δύο μονοπατιών του, το κλασικό και το εναλλακτικό. Γενικά, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι ρυθμίζουν προς τα πάνω γονίδια που τα βοηθούν να ελέγχουν αυτήν τη διάσταση της ανοσιακής επιτήρησης.

Έχει φανεί ότι η εκφραζόμενη από τα καρκινικά κύτταρα OPN δρα προστατευτικά από την επαγόμενη από το συμπλήρωμα διαδικασία λύσης <sup>[74]</sup>. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της OPN στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης ή/και CD44. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε απομόνωση του παράγοντα Η στην κυτταρική επιφάνεια και σε αναστολή της επαγόμενης από το συμπλήρωμα διαδικασίας λύσης <sup>[89]</sup>. Κατά την ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του συμπληρώματος και προωθώντας την αποδόμηση του συμπλόκου C3bBb, το σύμπλεγμα OPN και ενεργοποιημένου παράγοντα Η «αχρηστεύει» το σχηματισμό του συμπλέγματος προσβολής μεμβράνης (MAC) και την επακόλουθη λύση των καρκινικών κυττάρων <sup>[50]</sup>.

Ακόμη, φαίνεται ότι η OPN προκρίνει τη διείσδυση του όγκου και τη μετάσταση μεταβάλλοντας τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή <sup>[90]</sup>. Έτσι, σε διάφορα ζωικά μοντέλα ανοσιακών κυττάρων του ξενιστή έχει φανεί ότι η OPN μειώνει τη δραστηριότητα της οξειδάσης του κυτοχρώματος C <sup>[91]</sup>. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που παράγουν αυξημένα ποσά OPN μπορούν να περιορίσουν την «έκρηξη» του οξειδωτικού stress, να αναστείλουν την παραγωγή NO και έτσι να προστατεύσουν τους εαυτούς τους από καταστροφή από ειδικά κύτταρα της άμυνας του ξενιστή <sup>[90]</sup>. Υπάρχουν δεδομένα ότι η OPN

θα μπορούσε να ενισχύει την επιβίωση καρκινικών κυττάρων, μέσω αναστολής της επαγόμενης συνθάσης του νιτρικού οξέος στο τοπικό μικροπεριβάλλον<sup>[92]</sup>.

## **ΣΤ. Πρόσφυση καρκινικών κυττάρων και μετανάστευση σε απομακρυσμένη θέση**

Άλλη καίρια στρατηγική των καρκινικών κυττάρων στη διαδικασία της μετάστασης είναι η κυτταρο-θεμέλια πρόσφυση και μετανάστευση μέσω της εξοκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Φαίνεται ότι η κυτταρική μετανάστευση που ρυθμίζεται από την OPN είναι εξαρτώμενη από τον EGF και τον HGF (hepatocyte growth factor, ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας) και τους υποδοχείς τους, EGFR και HGFR αντίστοιχα. Η OPN επάγει την έκφραση του mRNA του EGFR, τη δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης του EGFR, την έκφραση του MET mRNA και της πρωτεϊνικής έκφρασης του HGFR και αυξάνει τη δραστηριότητα της MET κινάσης στη διάρκεια μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων σε σειρές ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου μαστού<sup>[93]</sup>.

Συνήθως η OPN προσφύεται στα κύτταρα μέσω ποικίλων ιντεγκρινών· το ετεροδιμερές των ιντεγκρινών που συσχετίζεται πιο πολύ με τις κακοήθειες ιδιότητες της OPN είναι η  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη<sup>[74]</sup>. Ακόμη, έχει προταθεί μηχανισμός πρόσφυσης και μετανάστευσης κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου που περιγράφει την επαγωγή CD44 μέσω έκφρασης ιντεγκρινών, είτε απευθείας μέσω του CD44, είτε μέσω του HGF και του υποδοχέα του c-MET<sup>[94]</sup>. Έτσι, η αλληλεπίδραση μεταξύ OPN και παραλλαγών των CD44, αλλά και ιντεγκρινών που περιέχουν την  $\beta_1$  υποομάδα, προάγει την πρόσφυση καρκινικών κυττάρων, ανεξάρτητα από το RGD μοτίβο, ως σημαντικό βήμα στον «καταρράκτη» της καρκινογένεσης<sup>[41]</sup>.

Ακόμη, η OPN, όπως και η βιτρονεκτίνη, προάγει την πρόσφυση ανθρώπινων κακοήθων κυττάρων αστροκυτώματος, γεγονός που φάνηκε ότι αναστέλλεται με θεραπεία με αντι-ιντεγκρινικά μονοκλωνικά αντισώματα <sup>[95]</sup>. Επιπλέον, σε κυτταρική σειρά μελανώ-ματος B16 έχει δειχθεί ότι η επαγόμενη από OPN μετανάστευση είναι MAPK/ERK εξαρτώμενη <sup>[96]</sup>. Επιπρόσθετα, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της OPN του τύπου της φωσφορυλίωσης προσδίνουν διαφορετικές ιδιότητες πρόσφυσης σε διάφορους τύπους ras-μετασχηματισμένων ινοβλαστών και οστεοβλαστών επίμυος <sup>[97]</sup>.

Συνολικά, λοιπόν, η OPN, μέσω ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πρόοδο γενικά του καρκίνου και στη μετάσταση.

## **2.4 ΟΣΤΕΟΠΟΝΤΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Εκτεταμένες μελέτες των τελευταίων ετών έχουν υποστηρίξει ότι η OPN είναι μια πρωτεΐνη υψηλά εκφραζόμενη σε ποικίλους τύπους καρκίνου, μεταξύ αυτών και του πνεύμονα.

Ειδικά σε ό,τι αφορά την παρουσία των επιμέρους παραλλαγών ματίσματος OPN στον καρκίνο πνεύμονα, υπάρχουν μελέτες που παραθέτουν μάλλον αντικρουόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Blasberg και συν., η υπερέκφραση OPNa και OPNb συσχετίστηκε με αυξημένες αγγειογενετικές ιδιότητες, ενώ η OPNc είχε αντίθετο ρόλο <sup>[98]</sup>. Η ίδια ομάδα συμπέρανε, σε άλλη μελέτη, ότι η υπερέκφραση της OPNa προσδίδει πιο επιθετικό φαινότυπο MMΚΠ, σε αντίθεση με την υπερέκφραση OPNc που δείχνει να μειώνει τον πολλαπλασιασμό και τη διεισδυτική προοπτική σε MMΚΠ <sup>[99]</sup>. Ακόμη, έχει φανεί ότι η RGD περιοχή τόσο της OPNa, όσο και της OPNb προωθεί την καρκινική αύξηση και μετάσταση, κυρίως προστατεύοντας τα καρκινικά κύτταρα (πνεύμονα μεταξύ των άλλων) από απόπτωση <sup>[55]</sup>. Επιπλέον, η έκφραση της OPNb παραλλαγής εναλλακτικού ματίσματος

φάνηκε να επιδρά στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, ενώ η έκφραση της OPNc έδειξε ισχυρή συσχέτιση με διηθητική συμπεριφορά <sup>[100]</sup>. Άλλη πρόσφατη μελέτη, με χρήση RT-PCR (real time polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο), έδειξε ότι η OPNb ήταν αυξημένη σε αίμα ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου πνεύμονα, με τα επίπεδα OPNc να συσχετίζονται με το βαθμό παθολογοανατομικής διαφοροποίησης <sup>[101]</sup>. Έχει φανεί ότι καμία παραλλαγή ματίσματος της OPN δεν είναι ειδική στον καρκίνο πνεύμονα· παρόλα αυτά, η OPNa είναι σημαντικά αυξημένη σε πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, ενώ οι OPNb και OPNc είναι στα ίδια επίπεδα σε υγιείς και σε ασθενείς με ΜΜΚΠ <sup>[102]</sup>.

Μέχρι στιγμής, δεν έχει δοθεί μια σαφής παθοφυσιολογική ερμηνεία των παραπάνω παρατηρήσεων. Αρκετοί όμως ερευνητές θεωρούν ότι η έλλειψη των εξωνίων 5 (OPNb) και 4 (OPNc) δεν επιφέρει απλά αλλαγές στη μοριακή δομή των παραλλαγών ματίσματος, αλλά τροποποιεί και τις ιδιότητές τους <sup>[103]</sup>. Στο εξώνιο 5 υπάρχουν φωσφο-ρυλιωμένα υπολείμματα που μπορεί να είναι σημαντικά στο να αποδίδουν στην OPN τις φυσιολογικές της ιδιότητες· έτσι, η έλλειψη του εξωνίου 5 στην OPNb πιθανόν να αποδίδει σ' αυτή αντι-αποπτωτικές ιδιότητες <sup>[104]</sup>. Ακόμη, το εξώνιο 4 κωδικοποιεί μια περιοχή τρανσγλουταμινάσης, που επάγει τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης και πιθανά η πολυμερισμένη μορφή είναι πιο αποτελεσματική στο να προάγει την πρόσφυση κυττάρων και την εξάπλωσή τους <sup>[105]</sup>. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, ωστόσο, για να διαλευκανθεί ποια είναι η ακριβής λειτουργική σημασία των επιμέρους παραλλαγών εναλλακτικού ματίσματος της OPN στις περιπτώσεις καρκίνου. Φαίνεται πάντως, ότι η μικρότερη παραλλαγή ματίσματος -η OPNc- παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδικότητα για τον καρκίνο από την πλήρους μήκους μορφή, διότι η OPNc δεν έχει ανευρεθεί σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα ή ιστούς <sup>[106]</sup>.

#### **2.4.1 Οστεοποντίνη και μελέτες *in vitro*, *in vivo* στον καρκίνο πνεύμονα**

Οι *in vitro*, *in vivo* μελέτες που αφορούν στον ΚΠ έχουν προσπαθήσει να διευκρινίσουν τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια μέσω των οποίων η OPN συσχετίζεται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης στον ΚΠ. Η μελέτη των Cui και συν. έδειξε ότι η OPN συνεισφέρει στην όλη διαδικασία ανάπτυξης ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια και την αγγειογένεση, μέσω αλληλεπιδράσεων με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη<sup>[107]</sup>. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι με την προσθήκη ενός αντι- $\alpha_v\beta_3$  αντισώματος μπλοκάρεται η αλληλεπίδραση μεταξύ OPN και  $\alpha_v\beta_3$  και αναστέλλεται η αγγειογένεση, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται αντίστοιχα και η ανάπτυξη του ΚΠ στα ποντίκια. Παρόμοια, πρόσφατη ερευνητική μελέτη σε κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ, συμπεριλαμβανομένων κυττάρων A549 σημειώνει ότι η OPN προκαλεί την έκφραση της ROCK1, μέσω του μονοπατιού των FAK/PI3K/Akt, γεγονός απαραίτητο για την αύξηση της κυτταρικής διείσδυσης<sup>[108]</sup>.

Ακόμη, σημαντική ήταν η προσπάθεια συσχέτισης της OPN με την ανάπτυξη κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής σε ποντίκια με ΚΠ. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη μελέτη, με τεχνική εξουδετέρωσης OPN, φάνηκε ότι η απουσία OPN μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής. Ωστόσο, η εξουδετέρωση της OPN δε φάνηκε να αναστέλλει *in vivo* την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων 3LL σε ποντικούς<sup>[109]</sup>. Σε κυτταρική σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων αδενοκαρκινώματος πνεύμονος (A549) φάνηκε ότι η προς τα κάτω ρύθμιση της OPN προκάλεσε διακοπή της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, με συνέπεια την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου<sup>[100]</sup>. Επιπλέον, η σίγηση της OPN σε A549 καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ελαττώνει σημαντικά τόσο τη μετανάστευση, όσο και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, και μάλιστα προκαλεί μείωση της S φάσης (κατά την οποία η αντιγραφή του DNA

λαμβάνει χώρα) και αύξηση των κυττάρων που σταμάτησαν τόσο σε G0/G1, όσο και στις G2/M φάσεις <sup>[110]</sup>.

Πρόσφατη μελέτη, με τεχνική εξουδετέρωσης της OPN, διερεύνησε τόσο την ικανότητα για διείσδυση σειράς καρκινικών κυττάρων MMKΠ, όσο και την ικανότητα για κυτταρική μετανάστευση και πολλαπλασιασμό. Η μελέτη ανέδειξε ότι η εξουδετέρωση του γονιδίου της OPN είχε διαφορετική επίδραση στις δύο διαδικασίες: προκλήθηκε καταστολή της διείσδυσης, αλλά υπήρξε ελάχιστη επίδραση στη μετανάστευση και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της MMP-2 και της uPA, με επιπτώσεις τόσο στην *in vitro* διείσδυση, όσο και στην *in vivo* δυνατότητα για μετάσταση των εν λόγω καρκινικών κυττάρων <sup>[111]</sup>. Η σύγκριση των ιδιοτήτων της OPN «άγριου» τύπου με OPN τριπλά μεταλλαγμένη σε θέση γλυκοζυλίωσης, έδειξε ότι ο «άγριος» τύπος είναι υπεύθυνος για την αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με αγγειογένεση, διείσδυση και μετανάστευση, όπως οι MMP-9, FGF-2, VEGF, uPA και COX-2 <sup>[112]</sup>. Συνδυαστική μελέτη που αφορούσε την εξουδετέρωση των γονιδίων τριών πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και της OPN, ανέδειξε ότι το γεγονός της εξουδετέρωσης κατέστειλε τη μετάσταση ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου πνεύμονα *in vitro* και *in vivo* <sup>[113]</sup>. Ακόμη, η πρόσφατη μελέτη των Lin και συν. σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα και μαστού, έδειξε ότι όταν καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε ανόργανο φώσφορο, προάγεται η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, πιθανά μέσω ενεργοποίησης της OPN και άλλων προ-αγγειογενετικών γονιδίων <sup>[114]</sup>.

Επιπλέον, έχουν γίνει και κάποιες *in vitro*, *in vivo* μελέτες που αφορούν θεραπευτικά πρωτόκολλα που συσχετίζουν την OPN με την καρκινογένεση. Έτσι, σε *in vitro* μελέτη, φαίνεται ότι η OPN συσχετίζεται με ανάπτυξη χημειοαντίστασης στη σισπλατίνη, μέσω καταστολής της Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) πρωτεΐνης από «μπλοκάρισμα» της, εξαρτώμενης από την caspase-9 και caspase-3, κυτταρικής απόπτωσης <sup>[115]</sup>. Ακόμη, σε *in vitro* μελέτη με

κύτταρα MMKΠ χορηγήθηκε το Endostar, μια ανασυνδυασμένη ενδοστατίνη, και καταδείχθηκε αναστολή της διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων, με μηχανισμούς που αφορούσαν τόσο την προς τα κάτω ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων CD44v6 και  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης, όσο και την αναστολή των μονοπατιών επαγωγής σήματος, διαμέσου μελών της οικογένειας των MMPs (MMP-2 και MMP-9) <sup>[116]</sup>. Επιπλέον σε ποντίκια με MMKΠ, έγινε προσπάθεια να εφαρμοστεί θεραπεία με υψηλής συγγένειας μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-OPN ή/και σε συνδυασμό με καρβοπλατίνα και υπήρξε σημαντική αναστολή στην ανάπτυξη των όγκων. Ο μηχανισμός που προκρίθηκε αφορούσε τη σύνδεση του εν λόγω αντισώματος με την αλληλουχία SVVYGLRSKS, δηλαδή την ακριβώς παρακείμενη με την RGD αλληλουχία, οπότε ουσιαστικά επρόκειτο για παρεμπόδιση σύνδεσης της OPNa ή OPN-FL (full-length OPN) με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$  (σύνδεση με OPN: GRGDS ακολουθία), αλλά και παρεμπόδιση της κατάτμησης από τη θρομβίνη (σύνδεση με OPN: RSK ακολουθία), που παράγει ένα τμήμα OPN περισσότερο ενεργό από την OPN-FL <sup>[117]</sup>.

#### **2.4.2 Οστεοποντίνη και μελέτες έκφρασης σε ιστό καρκίνου πνεύμονα**

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία που έχουν ασχοληθεί με την έκφραση της OPN στον καρκινικό πνευμονικό ιστό, με χρήση διαφόρων μεθόδων. Έτσι, υπήρξαν μελέτες που έδειξαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA της OPN ή/και της πρωτεΐνης σε καρκινικό ιστό σε σχέση με υγιή ιστό που χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου mRNA: <sup>[118-124]</sup> και πρωτεΐνη: <sup>[118, 119, 121, 123-128]</sup>. Σε ό,τι αφορά τη θέση έκφρασης της OPN, πρώιμες μελέτες διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση OPN στα μακροφάγα πλησίον του όγκου και κοντά σε περιοχές νέκρωσης του όγκου <sup>[120, 121]</sup>, ενώ νεότερες μελέτες μιλούν κυρίως για αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα <sup>[118, 126, 127, 129-132]</sup>.

Οι μελέτες έκφρασης της OPN στον ΚΠ φαίνεται να συμφωνούν γενικά ότι αυξημένη έκφραση OPN, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης,

παρατηρείται κυρίως στον ΜΜΚΠ έναντι του ΜΚΠ. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η OPN σε επίπεδο mRNA εκφράζεται στο 37,5% των ΜΜΚΠ και στο 11,1% των ΜΚΠ <sup>[131]</sup>. Άλλοι ερευνητές βρήκαν μεταγραφική έκφραση (mRNA OPN) στο 71,9% των ΜΜΚΠ, ενώ αναδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται στο 57,9% των περιπτώσεων. Τα ποσοστά στις περιπτώσεις ΜΚΠ είναι 25% και 10%, αντίστοιχα <sup>[123]</sup>. Ανάλογα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης OPN μεταξύ ΜΜΚΠ και ΜΚΠ καταγράφει άλλη μελέτη (67% στους ΜΜΚΠ και 6,9% στους ΜΚΠ) <sup>[133]</sup>.

Διάφορες ομάδες μελετητών προσπάθησαν να αξιολογήσουν την έκφραση OPN στους επιμέρους τύπους ΜΜΚΠ και τα αποτελέσματα είναι μάλλον διαφορούμενα. Κάποιες ομάδες βρήκαν ότι η OPN εκφράζεται περισσότερο στον πλακώδη τύπο ΚΠ <sup>[119, 131, 133]</sup>, ενώ άλλες βρήκαν ότι η OPN παρουσιάζει αυξημένη έκφραση κυρίως σε αδenoκαρκινώματα πνεύμονα <sup>[134-136]</sup>. Υπάρχουν όμως και αρκετές ομάδες που βρήκαν ότι η έκφραση OPN ήταν ανεξάρτητη του ιστολογικού υποτύπου <sup>[123, 124, 126-128, 132]</sup>.

Η προσπάθεια ανεύρεσης συσχέτισης μεταξύ έκφρασης OPN και μεγέθους όγκου στον ΚΠ έδειξε ότι η έκφραση OPN στην πλειοψηφία των μελετών είναι ανεξάρτητη του μεγέθους του όγκου <sup>[126-128, 132, 136]</sup>. Ωστόσο, η πρόσφατη μετα-ανάλυση των Zhang και συν. συμπέρανε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση OPN ανάμεσα σε όγκους διαφορετικού μεγέθους <sup>[137]</sup>. Ακόμη, η έκφραση OPN συσχετίστηκε σημαντικά με την ύπαρξη προχωρημένου σταδίου νόσου (III-IV) σε μερικές μελέτες <sup>[124, 126-128]</sup>, υπήρχαν όμως και άλλες μελέτες στις οποίες δε διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση με το στάδιο της νόσου <sup>[122, 130, 133]</sup>. Σε ό,τι αφορά άλλες παθολογοανατομικές παραμέτρους, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση OPN είναι αυξημένη σε περιπτώσεις ΜΜΚΠ χαμηλής διαφοροποίησης <sup>[126-128]</sup>, ενώ άλλες μελέτες δεν κατάφεραν να δείξουν συσχέτιση της έκφρασης OPN με το βαθμό διαφοροποίησης του ΜΜΚΠ <sup>[133, 138]</sup>. Επιπλέον, η πλειοψηφία των μελετών που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο θέμα συμπεραίνει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα



στην έκφραση OPN και την ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες <sup>[119, 123-129, 138, 139]</sup> ενώ λίγες είναι οι ομάδες που δεν βρήκαν σχέση ανάμεσα στην έκφραση OPN και τη μεταστατική Ν νόσο <sup>[136, 140]</sup>. Οι περισσότερες μελέτες που ασχολήθηκαν με άλλες κλινικές παραμέτρους δεν έδειξαν συσχέτιση με φύλο, ηλικία ή οστικές μεταστάσεις, εκτός από τη μελέτη των Boldrini και συν. που έδειξε χαμηλότερη έκφραση στα θήλεα άτομα <sup>[140]</sup> και τη μελέτη των Zhang και συν. που έδειξε υψηλότερη έκφραση στους ασθενείς άνω των 70 ετών <sup>[139]</sup>.

Επιπλέον, σημαντικός είναι ο όγκος των μελετών στη βιβλιογραφία που ασχολήθηκαν με το κατά πόσο η έκφραση της OPN μπορεί να αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη στον ΚΠ. Ήδη από τη μελέτη των Chambers και συν. το 1996, φάνηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της OPN και την επιβίωση των ασθενών <sup>[121]</sup>. Επιπρόσθετα, υπάρχουν μελέτες που συμφωνούν ότι οι ασθενείς σταδίου I MMΚΠ που έχουν υψηλή έκφραση OPN έχουν χαμηλότερη OS και DFS <sup>[140, 141]</sup>. Στη συνέχεια, άλλη μελέτη βρήκε ότι η ομάδα των ασθενών που εξέφραζε την OPN είχε σημαντικά μειωμένη βετή OS και DFS <sup>[129]</sup>. Υπάρχουν, τέλος, πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι η έκφραση της OPN σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) και OS σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου μετά από ΧΜΘ. Φαίνεται σε αυτές τις μελέτες ότι για τους ασθενείς αρχικών σταδίων που δεν εξέφραζαν OPN, η OS και η PFS ήταν σημαντικά υψηλότερες <sup>[118]</sup>, ενώ σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου, η έκφραση OPN συσχετίστηκε μόνο με τη OS <sup>[118, 139]</sup>.

### **2.4.3 Μελέτες ανίχνευσης οστεοποντίνης στο περιφερικό αίμα (πλάσμα, ορός) σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα**

Οι μελέτες που ασχολήθηκαν με την ανίχνευση της OPN στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ χρησιμοποίησαν κατά βάση ως μέθοδο την ELISA (ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου) προκειμένου να προσδιορίσουν τα επίπεδα OPN του πλάσματος. Σχεδόν αποκλειστικά οι υπάρχουσες μελέτες που αφορούν δείγματα πλάσματος, ασχολήθηκαν με ασθενείς που έπασχαν από ΜΜΚΠ, με εξαίρεση τη μελέτη των Hu και συν. που πραγματοποίησε συγκριτικό έλεγχο μεταξύ των συγκεντρώσεων OPN στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, με ΜΚΠ και ομάδας ελέγχου <sup>[142]</sup>. Πάντως, το σύνολο των μελετητών που συνέκριναν τα επίπεδα OPN στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ με τα επίπεδα OPN υγιών εθελοντών, συμφωνούν ότι σε αυτούς τους ασθενείς η OPN πλάσματος είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς <sup>[142-144]</sup>.

Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα OPN στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, φαίνεται ότι τα μέσα επίπεδα πλάσματος OPN είναι σχετικά χαμηλότερα σε ασθενείς αρχικών σταδίων ΜΜΚΠ <sup>[144, 145]</sup> και υψηλότερα σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο ΜΜΚΠ <sup>[146-148]</sup>. Υπάρχουν βέβαια και λιγότερο ομοιογενείς μελέτες που περιλαμβάνουν ασθενείς όλων των σταδίων και κάνουν λόγο για άλλη μέση τιμή OPN στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ <sup>[142, 143]</sup>. Σχετικά με το αν η OPN πλάσματος μπορεί να είναι ένας βιοδείκτης ύπαρξης μεταστάσεων στο ΜΜΚΠ, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν πράγματι ότι οι ασθενείς με μεταστατική νόσο έχουν υψηλότερα επίπεδα OPN πλάσματος σε σχέση με τους ασθενείς ελεύθερους μετάστασης <sup>[143, 146, 149, 150]</sup> και μόνο μία μελέτη δεν έδειξε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN πλάσματος και μεταστατικής νόσου <sup>[147]</sup>.

Επιπρόσθετα, έχει γίνει προσπάθεια συσχέτισης της OPN στο πλάσμα με διάφορους ιστολογικούς υποτύπους σε ασθενείς με ΜΜΚΠ. Προκύπτει ότι όλοι οι μελετητές που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο θέμα συμφωνούν ότι δεν υπάρχει διαφορά των επιπέδων

OPN στο πλάσμα ανάμεσα στους επιμέρους ιστολογικούς τύπους MMKΠ [25, 142-144, 147, 148, 150].

Η ενδεχόμενη προβλεπτική αξία της OPN στο πλάσμα ασθενών με MMKΠ έχει μελετηθεί σε λίγες μελέτες. Η μόνη έρευνα που διερεύνησε τις μεταβολές της OPN πλάσματος σε σχέση με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς MMKΠ ήταν αυτή των Mack και συν., που έδειξε ότι οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν χαμηλότερες τιμές OPN και ότι τα χαμηλά επίπεδα OPN πλάσματος προ ΧΜΘ συσχετίζονται με καλύτερη OS [147]. Ακόμη, υπάρχουν μελέτες σε ασθενείς με MMKΠ υπό παρακολούθηση (follow-up), οι οποίες συσχέτισαν τα αυξημένα επίπεδα OPN πλάσματος με υποτροπή [144, 146, 150].

Υπήρξε μελέτη που διαπίστωσε ότι τα χαμηλά επίπεδα OPN πλάσματος προ θεραπείας (ΧΜΘ) και ως συνεχής μεταβλητή, συσχετίζονται με καλύτερη OS και PFS [147]. Σε άλλη μελέτη, ασθενείς με αυξημένα επίπεδα OPN πλάσματος (τιμές μεγαλύτερες από τη διάμεση τιμή) προ ακτινοθεραπείας, είχαν σημαντικά μειωμένη OS και η OS και η DFS ήταν καλύτερες σε ασθενείς με μειωμένα επίπεδα OPN μετά ΑΚΘ [146]. Ακόμη, φάνηκε ότι ο τριπλός συνδυασμός επιπέδων πλάσματος OPN, VEGF και CA IX αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την OS [148]. Υπάρχει βέβαια και ο αντίλογος: σε μελέτη 53 ασθενών MMKΠ κυρίως προχωρημένων σταδίων, η OS δε διέφερε ανάμεσα σε ασθενείς με υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα OPN πλάσματος [143].

Είναι γεγονός ότι η OPN υφίσταται πρωτεολυτική κατάτμηση από τη θρομβίνη στη διάρκεια της διαδικασίας πήξης, με αποτέλεσμα τα μετρούμενα επίπεδα OPN ορού να είναι περίπου στο 50% των αντίστοιχων μετρούμενων τιμών στο πλάσμα. Η πρώτη βιβλιο-γραφικά μελέτη που ασχολήθηκε με ανίχνευση OPN στον ορό ασθενών με ΚΠ ήταν η μελέτη των Fedarko και συν., στην οποία διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα OPN στον ορό ασθενών με διάφορους τύπους κακοήθειας, μεταξύ αυτών και ΚΠ [151]. Η πλειοψηφία των μελετών που

προσδιόρισαν επίπεδα OPN στον ορό ασθενών με ΚΠ αφορούσαν ασθενείς με ΜΜΚΠ, πλην μιας μελέτης που συμπεριέλαβε και ασθενείς με ΜΚΠ <sup>[152]</sup>. Πάντως, όλες οι μελέτες που συνέκριναν επίπεδα OPN στον ορό ασθενών με ΜΜΚΠ και υγιών εθελοντών, βρήκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα OPN ορού στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου <sup>[151-153]</sup>.

Ένα ερώτημα που θέλησαν οι ερευνητές να απαντήσουν είναι κατά πόσο τα επίπεδα OPN ορού σχετίζονται με το στάδιο της νόσου των ασθενών με ΚΠ. Τα αποτελέσματα είναι διαφορούμενα: υπάρχουν μελέτες που δε διαπιστώνουν διαφορά στα επίπεδα OPN ορού ανάμεσα στα στάδια νόσου ΜΜΚΠ <sup>[154, 155]</sup>, ωστόσο υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν ότι όσο πιο προχωρημένο το στάδιο της νόσου, τόσο υψηλότερα τα επίπεδα OPN ορού <sup>[152, 153]</sup>. Άλλος παράγοντας με τον οποίο ασχολήθηκαν οι μελέτες των επιπέδων OPN στον ορό ασθενών με ΚΠ είναι ο ιστολογικός τύπος, χωρίς ωστόσο να μπορεί να βγει ένα ασφαλές συμπέρασμα ως προς το αν τα επίπεδα OPN είναι περισσότερο αυξημένα στον έναν έναντι του άλλου τύπου.

Η προβλεπτική αξία των επιπέδων OPN ορού έχει μελετηθεί σε μία μόνο μέχρι στιγμής μελέτη, στην οποία δε διαπιστώθηκε διαφορά επιπέδων OPN ορού ανάμεσα σε ασθενείς που παρουσίασαν ανταπόκριση στη ΧΜΘ και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν <sup>[154]</sup>.

Η πλειοψηφία των μελετών που ασχολήθηκαν με τα επίπεδα OPN ορού σε ασθενείς με ΜΜΚΠ διερεύνησε και ενδεχόμενη προγνωστική αξία του δείκτη. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι ασθενείς με ΜΜΚΠ που έχουν αυξημένα επίπεδα OPN ορού, παρουσιάζουν βραχύτερο χρόνο για πρόοδο νόσου <sup>[152, 153]</sup>. Άλλη ομάδα διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ και χαμηλά επίπεδα OPN ορού έχουν καλύτερη OS και PFS <sup>[154]</sup>. Παράλληλα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ αρχικών σταδίων (I, II και III) και χαμηλά επίπεδα OPN ορού είχαν καλύτερη 5ετή επιβίωση, και μάλιστα αυτό φάνηκε να

ισχύει ειδικά σε ασθενείς με αδενικού τύπου ΜΜΚΠ <sup>[155]</sup>. Τέλος, ερευνητική ομάδα που μελέτησε τόσο την έκφραση, όσο και τα επίπεδα OPN ορού, αναφέρει ότι η αυξημένη έκφραση OPN (και όχι τα αυξημένα επίπεδα OPN ορού) σχετίζεται με OS και RFS (relapse free survival) <sup>[132]</sup>.

#### **2.4.4 Οστεοποντίνη και συνδυασμός με άλλους δείκτες στον καρκίνο πνεύμονα**

Υπάρχουν αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια που προσπάθησαν να διερευνήσουν την υπόθεση ότι οι συνδυασμοί βιοδεικτών θα μπορούσαν να έχουν καλύτερη διαγνωστική ή προγνωστική προοπτική από ό,τι οι μεμονωμένοι δείκτες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η OPN έχει μελετηθεί σε συνδυασμό με μια πλειάδα άλλων δεικτών, είτε στο περιφερικό αίμα, είτε στον καρκινικό ιστό.

Έτσι, φάνηκε ότι στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ υπάρχει σημαντικά αυξημένη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN και ALP <sup>[25]</sup>. Η μελέτη των Terpos και συν. που συμπεριέλαβε διάφορους δείκτες οστικού μεταβολισμού στον ορό ασθενών με ΜΜΚΠ, μεταξύ αυτών OPN και ALP, δεν έδειξε απευθείας συσχέτιση μεταξύ των δεικτών αυτών, αντίθετα τα αυξημένα επίπεδα TRACP-5b (Tartrate-resistant acid phosphatase 5b) και OPN στον ορό κατά τη διάγνωση συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για πρόοδο νόσου <sup>[153]</sup>. Άλλη ομάδα που ασχολήθηκε με δείκτες οστικού μεταβολισμού έδειξε ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ και οστικές μεταστάσεις παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα οστεοκαλσίνης (OC) και υψηλά επίπεδα OPN και RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) στον ορό αίματος <sup>[152]</sup>.

Ακόμη, άλλη ερευνητική προσπάθεια που συμπεριέλαβε μέσες τιμές OPN και βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (basic fibroblast growth factor, bFGF) σε ορό ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ οι οποίοι έλαβαν ΧΜΘ, βρήκε σε πολυπαραμετρικό μοντέλο ανάλυσης ότι οι ασθενείς με μειωμένες τιμές OPN και αυξημένες τιμές bFGF είχαν

σημαντικά καλύτερες OS και PFS σε σχέση με τους ασθενείς με αυξημένα επίπεδα OPN και μειωμένα επίπεδα bFGF <sup>[154]</sup>. Αναδρομική μελέτη στη συνέχεια, εκτίμησε ασθενείς αρχικών σταδίων (I-IIIΑ) ΜΜΚΠ που υπεβλήθησαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου και συνέκρινε τα επίπεδα OPN πλάσματος, προ- και μετεγχειρητικά με αυτά της αλβουμίνης και της κρεατινίνης αυτών των ασθενών. Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις προεγχειρητικές τιμές OPN πλάσματος και τις τιμές αλβουμίνης και κρεατινίνης <sup>[144]</sup>.

Άλλη μελέτη που συμπεριέλαβε ασθενείς πρώιμων σταδίων ΜΜΚΠ που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή, διερεύνησε πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στη συνέκφραση OPN και SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine - οστεονεκτίνη). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα SPARC σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα OPN στον καρκινικό ιστό ήταν σημαντικός αρνητικός προγνωστικός παράγοντας, καθώς σχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση <sup>[122]</sup>. Άλλοι μελετητές με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε διάφορους υποτύπους ΚΠ διαπίστωσαν ότι η OPN συνεκφράζεται με τον Ras-p21 στο 100% των περιπτώσεων πλακώδους τύπου ΜΜΚΠ, αλλά μόνο στο 30% των περιπτώσεων αδενοκαρκινώματος πνεύμονα <sup>[131]</sup>. Πάλι σε καρκινικό ιστό, η ομάδα των Rud και συν. διαπίστωσε ότι οι πρωτεΐνες S100A4, ephrin-A1 και OPN εκφράζονται σε υψηλό βαθμό σε διάφορους τύπους καρκινικού ιστού ΜΜΚΠ <sup>[132]</sup>. Σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα, φάνηκε ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση των επιπέδων OPN συσχετίζεται με τα επίπεδα p-ERK και MMP-9 <sup>[135]</sup>. Ακόμη, σε ιστό ασθενών με ΜΜΚΠ που υπεβλήθησαν σε πλήρη εκτομή εκτιμήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση της OPN και της BSP σε σχέση με την ύπαρξη οστικών μεταστάσεων· στη μελέτη αυτή, μόνο η έκφραση της BSP συσχετίστηκε με την ύπαρξη οστικών μεταστάσεων <sup>[156]</sup>.

Σε μελέτη όπου συμπεριελήφθησαν δείγματα από ασθενείς με ΜΜΚΠ πρώιμων σταδίων, τόσο από καρκινικό ιστό, όσο και από πλάσμα, βρέθηκε ότι γενικά οι πιο υποξικοί

όγκοι έχουν υψηλότερα επίπεδα OPN και «βάφουν» θετικά για τον παράγοντα CA-IX (καρβονική ανυδράση 9) από τους λιγότερο υποξικούς. Τα επίπεδα OPN στο πλάσμα συσχετίζονται σημαντικά με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του CD44v6 και προβλέπουν μεγαλύτερη πιθανότητα για υποτροπή <sup>[145]</sup>. Μια πιο πρόσφατη μελέτη που συμπεριέλαβε κυρίως ασθενείς προχωρημένων σταδίων MMKΠ και μελέτησε τα επίπεδα του παράγοντα CA-IX και της OPN στο πλάσμα, δεν εντόπισε διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα του παράγοντα CA-IX στο πλάσμα ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα της OPN ήταν αυξημένα και ειδικά στους ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις <sup>[143]</sup>. Ακόμη, στη μελέτη των Ostheimer και συν., όπου μελετήθηκε η ενδεχόμενη συσχέτιση των OPN, VEGF και CA-IX με διάφορους κλινικοεργαστηριακούς παράγοντες και την επιβίωση σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου που έλαβαν ΑΚΘ, φάνηκε ότι τα υψηλά επίπεδα καθενός από τους δείκτες σχετίζονται με πτωχή επιβίωση. Όταν χρησιμοποιήθηκε διπλός συνδυασμός δεικτών, ο κίνδυνος θανάτου αυξήθηκε κατά 2 φορές, ενώ ο τριπλός συνδυασμός απέδωσε 5,9 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου <sup>[148]</sup>.

Επιπλέον, σε καρκινικό ιστό, η μελέτη των Shijubo και συν. βρήκε, μεταξύ των άλλων, ότι τα OPN και VEGF θετικά αδενοκαρκινώματα πνεύμονα σταδίου I παρουσιάζουν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση, καθώς έχουν υψηλότερα επίπεδα μετεγχειρητικής υποτροπής <sup>[134]</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη που συμπεριέλαβε 146 ασθενείς με MMKΠ πρώιμων σταδίων βρέθηκε τόσο στη μονοπαραγοντική, όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση, ότι το στάδιο της νόσου, η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων και η πρωτεϊνική έκφραση OPN και VEGF αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την έκβαση ασθενών με MMKΠ <sup>[157]</sup>. Άλλη σημαντική μελέτη που μελέτησε την έκφραση OPN σε καρκινικό ιστό MMKΠ, όσο και τα επίπεδα OPN, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) και VEGF σε πλάσμα ασθενών με MMKΠ προ και μετά ΧΜΘ, έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα πλάσματος προ θεραπείας της OPN, του VEGF και του PAI-1 <sup>[147]</sup>.

### **3. ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ**

#### **ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ**

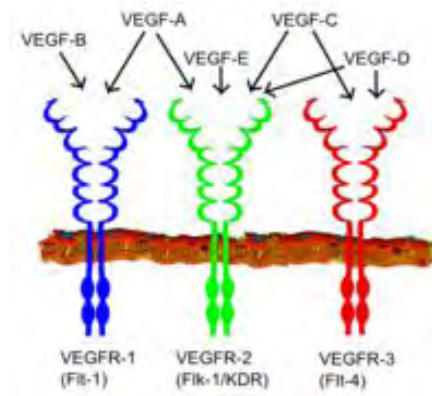
Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη σηματοδότησης που παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων. Αρχικά, ανακαλύφθηκε για την ικανότητά του να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα <sup>[158]</sup>, ενώ αργότερα χαρακτηρίστηκε ως ένας από τους πιο ισχυρούς επαγωγείς αγγειογένεσης (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Τρισδιάστατη δομή VEGF.

Για την ακρίβεια, πρόκειται για οικογένεια παραγόντων, η οποία στα θηλαστικά περιλαμβάνει 5 αυξητικούς παράγοντες (VEGFA ως D και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα - placental growth factor, PGF) και 3 διαμεμβρανικούς υποδοχείς (VEGFR1 ως 3) <sup>[159]</sup>. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποτύπων VEGF και των υποδοχέων τους, κινητοποιούν πολλαπλούς «καταρράκτες» μονοπατιών σηματοδότησης, τα οποία συντονίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και τη μετανάστευσή τους στη διεργασία παραγωγής νέων αγγείων, ειδικά κατά την καρκινογένεση <sup>[160]</sup> (Εικόνα 10).





**Εικόνα 10.** Επιμέρους αγγειακοί ενδοθηλιακοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους.

Το γονίδιο του VEGF εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και αποτελείται από 9 εξώνια <sup>[161]</sup>. Υπάρχουν 6 γνωστές ισομορφές του VEGFA στον άνθρωπο (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 και VEGF206), ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του mRNA του <sup>[162]</sup>. Οι 3 εκκρινόμενες ισομορφές (VEGF121, VEGF145 και VEGF165) επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση *in vivo*. Από την άλλη μεριά, οι ισομορφές VEGF189 και VEGF206 βρίσκονται δεσμευμένες σε πρωτεογλυκάνες και μπορούν να απελευθερώνουν άλλους παράγοντες, όπως είναι ο bFGF, οι οποίοι βρίσκονται αποθηκευμένοι σε μόρια θειικής ηπαρίνης του εξωκυτταρικού υλικού <sup>[163]</sup>.

Έχουν διαπιστωθεί τρεις διαμεμβρανικοί VEGF υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης: οι VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3. Ο υποδοχέας VEGFR2 συνδέεται με τους παράγοντες VEGFC, VEGFD και VEGFA και φαίνεται πως είναι ο πιο σημαντικός στη διαδικασία αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από το VEGF <sup>[164]</sup>. Ο ρόλος του υποδοχέα VEGFR1 είναι λιγότερο καλά προσδιορισμένος: πιθανά δρα ρυθμιστικά κατά τη σηματοδότηση του VEGFR2 <sup>[165]</sup>. Παρουσιάζει, ωστόσο, μεγαλύτερη συνάφεια με τον VEGFA. Ο υποδοχέας VEGFR3 συνδέεται με τους VEGFC και VEGFD και διαφέρει από

τους άλλους δύο, αφού εκφράζεται στα κύτταρα των λεμφαγγείων, οπότε ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση αυτών των κυττάρων <sup>[166]</sup> (Εικόνα 10).

### **3.1 ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Η αγγειογένεση, ως διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων, περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε προ- και αντι-αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες και θεωρείται απαραίτητη διαδικασία για τη συνολική ανάπτυξη, πρόοδο και επιβίωση στην περίπτωση του καρκίνου. Ανάμεσα στην πλειάδα των παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την αγγειογένεση στον καρκίνο, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η οικογένεια του VEGF· συγκεκριμένα ο VEGFA, και ειδικά η κυρίαρχη ισομορφή VEGF165, η οποία υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνων, θεωρείται αγγειογενετικός παράγοντας-κλειδί στη βιολογία του καρκίνου <sup>[160]</sup>. Σε επίπεδο υποδοχέων, έχει βρεθεί ότι οι VEGFR1 και VEGFR2 υπερεκφράζονται στο καρκινικό αγγειακό δίκτυο <sup>[167]</sup>.

Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από διάφορους μηχανισμούς και συγκεκριμένους παράγοντες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η υποξία αποτελεί βασικό ρυθμιστή της έκφρασης του VEGF, με αύξηση της μεταγραφής του mRNA του και με αύξηση της σταθερότητας του μορίου του, διαμέσου του μονοπατιού του επαγόμενου παράγοντα υποξίας (HIF-1α)/ von Hippel-lindau tumor (VHL) κατασταλτικού γονιδίου <sup>[168]</sup>. Παρόμοια, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως του p53, επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση, καθώς το ογκογονίδιο p53 προάγει την πρωτεασωματική διάσπαση του HIF-1α και ως εκ τούτου επηρεάζει και την έκφραση του mRNA του VEGF <sup>[169]</sup>. Ακόμη, ενεργοποίηση του ογκογονιδίου ras (K-ras και H-ras) έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης (TSP1), ενός αναστολέα της αγγειογένεσης <sup>[170]</sup>. Ο VEGFA μπορεί να επάγει την έκφραση και

ενεργοποίηση τόσο του NO, όσο και της προστακυκλίνης εντός του όγκου, με αποτέλεσμα τοπική αγγειοδιαστολή και αυξημένη τοπική αιμάτωση. Αναστολή της σηματοδότησης του VEGF έχει φανεί ότι μειώνει τα επίπεδα NO και έχει ως αποτέλεσμα αγγειοσύσπαση και συρρίκνωση του όγκου <sup>[171]</sup>.

Εκτός από την υποξία, αρκετοί αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες επιδρούν θετικά στην αντιγραφή του mRNA του VEGF, όπως ο αυξητικός παράγοντας επαγόμενος από αιμοπετάλια (PDGF), ο EGF, ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF), ο κερατινοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (KGF), ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1), ο TGF $\alpha$  και  $\beta$ 1, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), η IL-1 $\beta$  και η IL-6 <sup>[172]</sup>. Ο κατάλογος των παραγόντων που επιδρούν στην έκφραση του VEGF περιλαμβάνει και την υπεριώδη ακτινοβολία B (UVB) και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>[173]</sup>. Έπειτα από την ενεργοποίηση κινάσης του υποδοχέα VEGFR2, αρκετά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται, όπως προ-αγγειογενετικά ογκογονίδια συμπεριλαμβανομένων των Src, c-Myc, Fos και Bcl-2 <sup>[174]</sup>.

Ο VEGF έχει ενεργό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης στον καρκίνο. Η πολύπλοκη διαδικασία της αγγειογένεσης εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα σε διάφορους παράγοντες, οι οποίοι εκκρίνονται τόσο από κύτταρα του ξενιστή όσο και από καρκινικά κύτταρα, και οι οποίοι προκαλούν μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων. Η επιστράτευση ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε του ίδιου του όγκου, είτε του παρακείμενου παρεγχύματος εντός νεοσχηματιζόμενων μικρο-αγγειακών θυλάκων είναι ένα πρωταρχικό βήμα, με τον VEGF να έχει «μιτογόνο» ιδιότητα σε καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων <sup>[175]</sup>. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ενσωμάτωση κυττάρων μυελού των οστών εντός των θυλάκων αυτών, διαδικασία η οποία σχετίζεται με την έκκριση VEGF από τον όγκο και με την κινητοποίηση κυκλοφορούντων προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία επάγεται από το VEGF <sup>[171]</sup>. Ο εκκρινόμενος από τον όγκο VEGF, μέσω επαγωγής της παραγωγής PGE<sub>2</sub>, πιθανά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της

προ-μεταστατικής νησίδας <sup>[176]</sup>. Δημιουργούνται έτσι οι συνθήκες για να γίνει μια αγγειακή νησίδα, όπου αλληλεπιδρούν καρκινικά κύτταρα με κύτταρα του ξενιστή. Όσο όμως αυξάνεται η κυτταρική μάζα, αυξάνονται οι ανάγκες των κυττάρων για οξυγόνο, αλλά αυξάνονται και οι αποστάσεις από τα τροφοφόρα αγγεία, με συνέπεια τη χαμηλή παροχή σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο <sup>[177]</sup>. Η περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου καθίσταται εφικτή μόνο όταν «ανοίξει» ο αγγειογενετικός διακόπτης (angiogenic switch), δηλαδή υπερεκφράζονται τα προ-αγγειογενετικά μόρια, όπως ο VEGF <sup>[51]</sup>.

Ακολούθως, η επίδραση του VEGFA στο αγγειακό δίκτυο προκαλεί διάμεσο οίδημα και απόσπαση περικυττάρων <sup>[178]</sup>. Η πρωτεολυτική διάσπαση του εξωκυττάρου χώρου και της βασικής μεμβράνης είναι βασική προϋπόθεση για τη μεταστατική δυναμική του όγκου και εξαρτάται από την επίδραση μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και πρωτεασών σερίνης που εκκρίνονται από τα διάσπαρτα και άναρχα τοποθετημένα ενδοθηλιακά κύτταρα των αναπτυσσόμενων αγγείων, κάτω από την επίδραση του VEGFA. Όλη αυτή η άναρχη δομή του αγγειακού δικτύου των όγκων επιδεινώνει το ιστικό διάμεσο οίδημα, με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενίσχυση της επίδρασης του HIF-1α στο VEGF <sup>[179]</sup>. Γενικά, η αύξηση της δραστηριότητας των πρωτεασών σε σχέση με τους αναστολείς τους, έχει ως αποτέλεσμα ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την πρόοδο του όγκου.

### **3.2 ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Στον άνθρωπο, ο παράγοντας VEGF και οι υποδοχείς του εκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού <sup>[180]</sup>, του παχέος εντέρου <sup>[181]</sup>, των ωοθηκών <sup>[182]</sup>, του τραχήλου μήτρας <sup>[183]</sup> και του πνεύμονα <sup>[184, 185]</sup>. Συγκεκριμένα, στον ΚΠ τα επίπεδα VEGF έχουν μετρηθεί στον καρκινικό ιστό, στο αίμα (ορός και πλάσμα),

στο πλευριτικό υγρό <sup>[186]</sup>, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) <sup>[187]</sup>, σε προκλητά πτύελα <sup>[188]</sup> και στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα (EBC) <sup>[189]</sup>.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες προσπάθειες συσχέτισης του VEGF με ποικίλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Έτσι, υπάρχουν μελέτες όπου τα επίπεδα του δείκτη στον ορό έχουν συσχετισθεί με το στάδιο της νόσου, και στις οποίες διαπιστώθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του VEGF σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο ΚΠ σε σχέση με αυτούς που ήταν σε αρχικό στάδιο (ΜΜΚΠ+ΜΚΠ <sup>[187, 189-192]</sup>, ΜΜΚΠ <sup>[193-197]</sup> και ΜΚΠ <sup>[198-200]</sup>). Υπάρχουν όμως και οι μελέτες στις οποίες δε βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων του δείκτη με το στάδιο νόσου (ΜΜΚΠ+ΜΚΠ <sup>[201-203]</sup>, ΜΜΚΠ <sup>[204-207]</sup> και ΜΚΠ <sup>[208]</sup>).

Αρκετές έρευνες είχαν ως αντικείμενό τους την ενδεχόμενη συσχέτιση του VEGF ορού με συγκεκριμένο ιστολογικό τύπο και η πλειοψηφία τους δεν κατάφερε να δείξει τέτοια συσχέτιση (ΜΜΚΠ+ΜΚΠ <sup>[192, 201, 203]</sup>, ΜΜΚΠ <sup>[204-206, 209]</sup>). Η μοναδική ομάδα που διαπίστωσε υψηλότερα επίπεδα VEGF στον ορό σε ασθενείς με πλακώδες ΜΜΚΠ έναντι αδenoκαρκινώματος πνεύμονα, είναι αυτή των Shimanuki και συν. <sup>[210]</sup>. Ακόμη, σε ό,τι αφορά τη συσχέτιση με τη βιολογική κατάσταση των ασθενών, η μελέτη των Katsabeki-Katsafli και συν., δείχνει στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα VEGF ορού σε ασθενείς με ΚΠ και κακή βιολογική κατάσταση (PS >2) <sup>[191]</sup>.

Ως προς την προβλεπτική αξία του VEGF σε περιπτώσεις ασθενών με ΜΜΚΠ, υπάρχουν μελέτες που συνηγορούν ότι τα χαμηλά επίπεδα VEGF σχετίζονται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία (έκφραση του mRNA <sup>[211, 212]</sup>, ορός <sup>[213, 214]</sup>, πλάσμα <sup>[214-217]</sup>). Αντίθετα, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες δε φάνηκε προβλεπτική αξία των επιπέδων VEGF (έκφραση του mRNA <sup>[218]</sup>, ορός <sup>[207, 208, 219]</sup> και πλάσμα <sup>[220]</sup>).

Η πρώτη αναφορά σχετικά με την έκφραση VEGF σε περιπτώσεις ΜΜΚΠ ήταν αυτή των Mattern και συν., όπου φάνηκε αρνητική προγνωστική αξία της έκφρασης του VEGF σε καρκίνο πνεύμονα <sup>[184]</sup>. Από τότε έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών

που δείχνουν αυξημένη έκφραση VEGF σε πρώιμα στάδια MMΚΠ, και την συσχετίζουν με πτωχή επιβίωση <sup>[134, 185, 193, 221-230]</sup>. Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση με την επιβίωση (είτε OS, είτε PFS) και συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του VEGF και στη μικροαγγειακή πυκνότητα <sup>[231-235]</sup>.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότερες μελέτες βρήκαν αρνητική προγνωστική αξία της έκφρασης VEGF στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα· ωστόσο, ο VEGF δεν ήταν ανεξάρτητη προγνωστική παράμετρος στην πολυπαραγοντική ανάλυση <sup>[193, 230, 236, 237]</sup>. Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που δεν έδειξαν συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του VEGF και την επιβίωση <sup>[238, 239]</sup>. Πάντως, σε μετα-αναλύσεις που έγιναν σχετικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης του VEGF στο MMΚΠ, φάνηκε ότι μπορεί να θεωρηθεί δυσμενής προγνωστικός παράγοντας <sup>[240-242]</sup>.

Εκτός από την ανοσοϊστοχημική εκτίμηση αγγειογενετικών παραγόντων όπως του VEGF, η μέτρηση των επιπέδων τους στο αίμα κερδίζει συνεχώς έδαφος λόγω των συγκριτικών πλεονεκτημάτων της: σχετικά μη επεμβατική και λιγότερο χρονοβόρα διαδικασία, επαναληψιμότητα, μικρότερο κόστος, με υψηλή διαθεσιμότητα. Έτσι, μετά την πρώτη αναφορά του Kondo και συν. <sup>[243]</sup> σχετικά με την προοπτική χρήσης του VEGF ως διαγνωστικού δείκτη στον ορό ασθενών με κακοήθεια, έχουν ακολουθήσει αρκετές μελέτες σχετικά με τη σημασία των επιπέδων κυκλοφορούντος VEGF σε ασθενείς με MMΚΠ. Υπάρχει ικανός αριθμός μελετών στη βιβλιογραφία που υποστηρίζει ότι οι ασθενείς με αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα VEGF έχουν χειρότερη επιβίωση <sup>[194, 244-247]</sup>, ωστόσο άλλες μελέτες δεν έδειξαν τέτοια συσχέτιση <sup>[195, 202, 204, 207]</sup>. Πάντως, σε πρόσφατη μετα-ανάλυση φάνηκε ότι τα υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντος VEGF προβλέπουν πτωχή OS στους ασθενείς με ΚΠ, αλλά δεν προβλέπουν πτωχή PFS <sup>[248]</sup>, ενώ άλλη πρόσφατη μετα-ανάλυση που αφορά Ασιατικό πληθυσμό, έδειξε ότι τα επίπεδα VEGF στον ορό είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης για να προβλεφθεί η ακτινοευαισθησία και η πρόγνωση σε Ασιάτες ασθενείς με

ΜΜΚΠ <sup>[249]</sup>. Συνεπώς, τα δεδομένα σχετικά με την προγνωστική αξία των επιπέδων VEGF στο αίμα στους ασθενείς με ΜΜΚΠ είναι ετερογενή και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

#### 4. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ 9

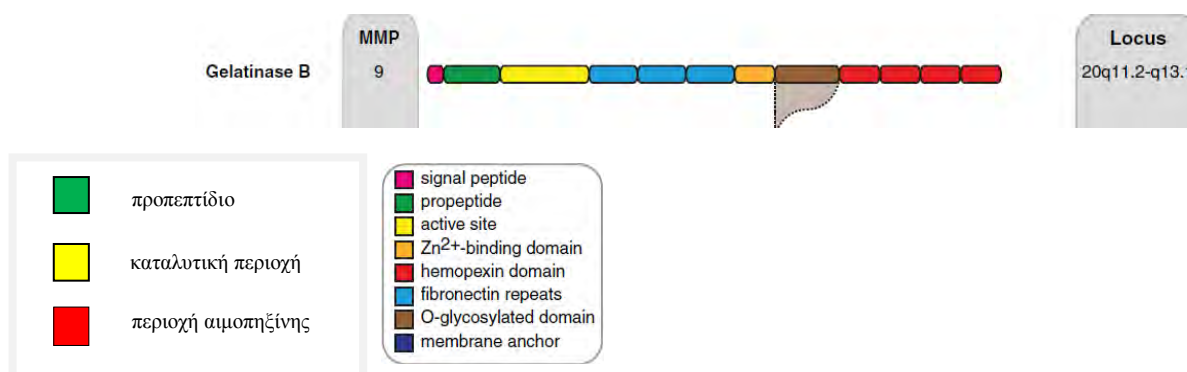
Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases - MMPs) είναι μια οικογένεια δομικά και λειτουργικά σχετιζόμενων ενδοπεπτιδασών που περιέχουν ψευδάργυρο, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά στη βιβλιογραφία από τους Gross και Lapiere το 1962 <sup>[250]</sup>. Είναι τάξη ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία αποδόμησης και απομάκρυνσης μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας από τους ιστούς, όπου αυτό είναι απαραίτητο. Στον άνθρωπο εκφράζονται 23 μέλη της οικογένειας των MMPs, που κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της αρχιτεκτονικής τους δομής.

Οι MMPs, μέσω πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφανείας, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διαδικασίες, μεταξύ αυτών και στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η έκφραση τους υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και κυτταροκίνες. Παρόλα αυτά, η όλη διαδικασία της πρωτεόλυσης από τις MMPs *in vivo* εξαρτάται από την τοπική ισορροπία ανάμεσα σ' αυτές και στους ειδικούς αναστολείς τους. Στο πλάσμα, ο κύριος αναστολέας τους είναι η α<sub>2</sub>-μακροσφαιρίνη <sup>[251]</sup>, ενώ στους ιστούς η αναστολή γίνεται κατά κύριο λόγο από τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs), που συνιστούν μια οικογένεια τεσσάρων αναστολέων πρωτεασών και περιλαμβάνει τις TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 και TIMP-4 <sup>[252]</sup>. Οι TIMPs μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με ενεργοποιημένα ή μη ενεργοποιημένα ένζυμα και συνδέονται με τις MMPs σε αναλογία 1:1, προκειμένου να αποτρέψουν την ενζυματική δραστηριότητα.

Η μεταλλοπρωτεϊνάση της θεμέλιας ουσίας 9 (MMP-9), ή αλλιώς γνωστή ως 92 kDa τύπου IV κολλαγενάση, 92 kDa γελατινάση ή γελατινάση Β είναι μέλος της οικογένειας των MMPs και στον άνθρωπο το γονίδιό της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20 <sup>[253]</sup> (Εικόνα 11). Έχει ενεργό ρόλο σε φυσιολογικές διεργασίες, καθώς ανευρίσκεται σε διάφορους τύπους



φυσιολογικών κυττάρων, αλλά εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η καρκινογένεση [254].



**Εικόνα 11.** Μοριακή δομή MMP-9 [254].

Το δομικό της σχέδιο περιλαμβάνει τρεις περιοχές που είναι κοινές σε όλες σχεδόν τις MMPs: το προ-πεπτίδιο, την καταλυτική περιοχή και την περιοχή αιμοπηξίνης (Εικόνα 11). Αρχικά, παράγεται ως προ-ένζυμο, όπως όλες οι MMPs και στη συνέχεια, προκειμένου το ένζυμο να γίνει πρωτεολυτικά ενεργό, είναι απαραίτητος ο μηχανισμός που καλείται «κυστεϊνικός διακόπτης» (cysteine switch) [255]. Εκτός από τον «κυστεϊνικό διακόπτη», έχει βρεθεί ότι στην ενεργοποίηση της MMP-9 έχουν ρόλο και άλλες MMPs, όπως η MMP-2, η MMP-3, η MMP-26 και οι μεπρίνες α και β, καθώς και πρωτεάσες, όπως η τρυψίνη, η πλασμίνη, η ανθρώπινη ουδετεροφιλική ελαστάση, η σχετιζόμενη με καλλικρεΐνη πεπτιδάση 7 (KLK7) και ο uPA [254]. Ως αναστολείς της MMP-9 έχει βρεθεί ότι, εκτός από την α<sub>2</sub>-μακροσφαιρίνη και τους TIMPs, δρουν λιπαρά οξέα και τετρακυκλίνες. Επίσης, όπως όλα τα ένζυμα, η MMP-9 υπόκειται σε επιδράσεις του pH και της θερμοκρασίας [254].

Η MMP-9 συμμετέχει στη διάσπαση του κολλαγόνου τύπου IV και V, της φιβρονεκτίνης, της εκτακτίνης και της ελαστίνης. Επίσης, αλληλεπιδρώντας με κυτταροκίνες και χημειοκίνες, όπως η pro-IL-1b και η IL-8, προάγει την ανοσιακή απόκριση. Αντίθετα, αλληλεπιδρώντας με τη CTAP-III, τη PF-4 και τη GROα καταστέλλει την

ανοσιακή απόκριση <sup>[256]</sup>. Είναι ενδιαφέρον ότι η MMP-9 ρυθμίζει επιπλέον και ένα ευρύ φάσμα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που εδράζονται στα μιτοχόνδρια, στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα <sup>[257]</sup>.

#### **4.1 ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ 9 ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Η βασική μεμβράνη και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες παρέχουν σήματα σχετικά με την κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη. Απώλεια αυτών των σημάτων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο ή την καταστολή του πολλαπλασιασμού τόσο των φυσιολογικών, όσο και των εξαλλαγμένων κυττάρων.

Γενικά, οι MMPs και συγκεκριμένα η MMP-9 φαίνεται ότι εμπλέκονται ακόμη από τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου. Η MMP-9 είναι γελατινάση που έχει την ικανότητα να δημιουργεί χάσματα στη βασική μεμβράνη, διευκολύνοντας έτσι τη διείσδυση και τη μεταστατική διασπορά. Με την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την απελευθέρωση - ενεργοποίηση άλλων παραγόντων που προάγουν την καρκινογένεση (π.χ. αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και χημειοκινών, μορίων κυτταρικής πρόσφυσης), συνεισφέρει στη δημιουργία ενός ιδανικού περιβάλλοντος για περαιτέρω ανάπτυξη του καρκίνου <sup>[258]</sup>. Σε επόμενα στάδια της καρκινογένεσης έχει βρεθεί ότι προωθεί τη μετάσταση μέσω ιντεγκρινών, οι οποίες τροποποιούν τα καρκινικά κύτταρα <sup>[259]</sup>. Με την πρωτεόλυση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, προωθείται η κυτταρική μετανάστευση και κατ' επέκταση η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η MMP-9 παρουσιάζει μη καταλυτικές σηματοδοτικές ιδιότητες στην κυτταρική απόπτωση <sup>[260]</sup>.

Αρχικά, η έμφαση στην έρευνα γύρω από το ρόλο της MMP-9 στο καρκινικό μικροπεριβάλλον είχε δοθεί στα καρκινικά κύτταρα και είχε φάνει ότι οι παράγοντες που προωθούν την καρκινογένεση (π.χ. ογκογονικές πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες) μπορούν να ρυθμίζουν την παραγωγή MMP-9 από διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων

<sup>[261]</sup>. Την τελευταία δεκαετία, όμως, υπάρχει μια στροφή προς τη μελέτη των κυττάρων του στρώματος, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος και τον ενδεχόμενο ρόλο τους στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Έτσι, έχει βρεθεί ότι καρκινικά κύτταρα μπορούν να επάγουν την έκφραση της MMP-9 στις ινοβλάστες που περιβάλλουν τον όγκο <sup>[262]</sup>, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε φλεγμονώδη κύτταρα <sup>[263]</sup>. Ακόμη, η MMP-9 είναι ένα παράγωγο των στρατολογημένων ουδετεροφίλων και μακροφάγων και θεωρείται ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αυτή την MMP-9 ως μέσο για διείσδυση και μετάσταση <sup>[264]</sup>, αλλά και στη διαδικασία της νεοαγγειογένεσης. Ειδικά τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα απελευθερώνουν προ-MMP-9 σε μορφή ελεύθερη TIMP (TIMP-free form), μορφή που σχετίζεται με αυξημένη αγγειογενετική δραστηριότητα <sup>[265]</sup>.

Η συμμετοχή των MMPs στη διαδικασία της αγγειογένεσης θεωρείται ότι είναι ποικιλότροπη. Η MMP-9 και οι υπόλοιπες MMPs αφενός διασπών το φράγμα του συνδετικού ιστού επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση αγγειακών δομικών παραγόντων, και αφετέρου δρουν ρυθμίζοντας την πρόσφυση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους <sup>[266]</sup>. Η MMP-9 μπορεί έμμεσα να επηρεάζει τη συμπεριφορά των ενδοθηλιακών κυττάρων με την απελευθέρωση προ-αγγειογενετικών παραγόντων, με την αποδόμηση αγγειογενετικών αναστολέων ή με γένεση θραυσμάτων του πλασμινογόνου ή του κολλαγόνου που αναστέλλουν την αγγειογένεση, όπως η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη <sup>[254]</sup>. Συγκεκριμένα, η MMP-9 μετατρέπει το πλασμινογόνο σε αγγειοστατίνη, ένα δυνητικό αγγειογενετικό αναστολέα <sup>[267]</sup>.

Η MMP-9 που εκκρίνεται από κύτταρα του στρώματος προερχόμενα από το μυελό των οστών, ενισχύει την απελευθέρωση VEGF, με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα VEGF και περαιτέρω προσέλκυση παρόμοιων κυττάρων. Θεωρείται πλέον ότι η απομάκρυνση της MMP-9 από το μικροπεριβάλλον του όγκου διακόπτει τον κύκλο VEGF-μυελού των οστών-

MMP-9 και οδηγεί σε ελαττωμένα επίπεδα VEGF, και άρα ελαττώνει την αγγειογένεση και την μυελοποίηση <sup>[254]</sup>. Στη θεωρία αυτή στηρίχθηκε η επιτυχής χρήση αμινοδιφωσφονικών αναστολέων <sup>[268]</sup>.

Ακόμη, έχει φανεί ότι η MMP-9 με συγκεκριμένους μηχανισμούς, ρυθμίζει τις ανοσιακές αποκρίσεις στον καρκίνο. Συγκεκριμένα, σε δείγματα ιστού από καρκίνο τραχήλου μήτρας, η επαγόμενη από καρκινικά κύτταρα MMP-9, μπορεί να αναστείλει την πολλαπλασιαστική λειτουργία των σχετιζόμενων με τον όγκο T-λεμφοκυττάρων <sup>[269]</sup>, και γενικά, φαίνεται ότι μέσω της πρωτεολυτικής διαδικασίας, η MMP-9 δρα ως διακόπτης και καταλύτης, τόσο για την φυσική, όσο και για την επίκτητη ανοσία <sup>[270]</sup>. Ακόμη, η MMP-9 μπορεί να ρυθμίσει και αρνητικά την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, με περιορισμό του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, διαμέσου διακοπής της σηματοδότησης της IL-2Ra <sup>[271]</sup>.

Συνεπώς, φαίνεται ότι η MMP-9 εμπλέκεται σε πολλαπλά βήματα στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

#### **4.2 ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ 9 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν δείξει θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των MMPs και τη δυνατότητα για διείσδυση και μετάσταση σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του λάρυγγα <sup>[272]</sup>, του προστάτη <sup>[273]</sup>, του τραχήλου μήτρας <sup>[274]</sup> και του μαστού <sup>[275]</sup>. Μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η υπερέκφραση MMP-9 συνεισφέρει στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου. Έτσι, καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο ικανά να αποικίζουν τους πνεύμονες ποντικών με έλλειψη MMP-9 (MMP-9 - deficient mice) σε σχέση με τους πνεύμονες των «άγριου» τύπου ποντικών, και ως αποτέλεσμα τα ποντίκια με έλλειψη MMP-9 αναπτύσσουν λιγότερους καρκίνους <sup>[276]</sup>.

Σε ό,τι αφορά επιμέρους μηχανισμούς καρκινογένεσης που σχετίζονται με την MMP-9 στην περίπτωση ΚΠ, σημαντικό ρόλο στη διεισδυτική συμπεριφορά του ΜΜΚΠ φαίνεται ότι διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του EGFR, μέσω συγκεκριμένης προς τα πάνω ρύθμισης της MMP-9 σε ασθενείς με ΜΜΚΠ πρώιμων σταδίων <sup>[277]</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η έκφραση MMP-9 ρυθμίζεται από την ILK σε κύτταρα ΚΠ, και αντίστροφα, η αναστολή της MMP-9 έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της επαγόμενης από την ILK κυτταρικής διείσδυσης. Ακόμη, φάνηκε ότι ο NF-κΒ σχετίζεται με την επαγόμενη από την ILK προς τα πάνω ρύθμιση της MMP-9 σε κύτταρα ΚΠ <sup>[278]</sup>.

Τα επίπεδα MMP-9 σε περιπτώσεις ΚΠ έχουν μετρηθεί σε μια πλειάδα υλικών, όπως στο EBC <sup>[279]</sup>, στο πλευριτικό υγρό <sup>[280]</sup>, στο BAL <sup>[281]</sup> και σε προκλητά πτύελα <sup>[282]</sup>. Η πλειοψηφία των μελετών, ωστόσο, έχει γίνει σε ιστό ΚΠ και διερευνά την ενδεχόμενη προγνωστική αξία των επιπέδων της. Αν και κάποιες μελέτες έκφρασης MMP-9 στον καρκινικό ιστό δεν ανέδειξαν προγνωστική αξία της MMP-9 <sup>[267, 283]</sup>, εντούτοις στις περισσότερες αναφορές τα υψηλά επίπεδα έκφρασης MMP-9 σε ιστό καρκίνου πνεύμονα σχετίζονται με κακή πρόγνωση <sup>[277, 284-290]</sup>. Πράγματι, από πρόσφατη μετα-ανάλυση με 2029 περιπτώσεις ΜΜΚΠ από 17 μελέτες, βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με όγκους που έχουν θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση MMP-9 εμφανίζουν χειρότερη επιβίωση από τους ασθενείς χωρίς έκφραση MMP-9 <sup>[291]</sup>.

Οι μελέτες που αφορούν στη μέτρηση των επιπέδων MMP-9 στο αίμα σε ασθενείς με ΚΠ, γενικά συμφωνούν ότι τα επίπεδα MMP-9 στο πλάσμα είναι υψηλότερα στους ασθενείς με ΜΜΚΠ έναντι της ομάδας ελέγχου <sup>[292-296]</sup>. Παρόμοια, υψηλότερες τιμές MMP-9 ορού έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με ΜΜΚΠ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου <sup>[281, 297-300]</sup>.

Η ομάδα των Iizasa και συν. που συμπεριέλαβε 73 ασθενείς ΜΜΚΠ πρώιμων σταδίων, διαπίστωσε διαφορές στις τιμές MMP-9 ορού ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους (υψηλότερες τιμές στην ομάδα με αδenoκαρκίνωμα έναντι πλακώδους

ΚΠ και στην ομάδα με αδενοκαρκίνωμα έναντι μεγαλοκυτταρικού) <sup>[296]</sup>. Από την άλλη μεριά, οι περισσότερες ομάδες δε διαπιστώνουν συσχέτιση των κυκλοφορούντων επιπέδων MMP-9 με τον ιστολογικό τύπο <sup>[247, 281, 295, 297, 299]</sup>.

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει στην πρόσφατη ερευνητική προσπάθεια των Zhang και συν., με 332 ασθενείς με ΜΜΚΠ, διαφόρων σταδίων, όπου μετρήθηκαν επίπεδα ορού VEGF και MMP-9. Στην υποομάδα των ασθενών που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή της βλάβης, τα επίπεδα των πρωτεϊνών προ θεραπείας βρέθηκαν υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα μετεγχειρητικά, και μάλιστα οι ασθενείς προχωρημένων σταδίων είχαν υψηλότερα επίπεδα VEGF και MMP-9 στον ορό συγκρινόμενα με ασθενείς πρώιμων σταδίων <sup>[297]</sup>. Με το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και η μελέτη των Bugdayci και συν., στην οποία οι τιμές της MMP-9 είναι αυξημένες τόσο στο πλάσμα, όσο και στο BAL ατόμων με ΜΜΚΠ <sup>[292]</sup>, αλλά και η μελέτη των Fiorelli και συν., όπου οι αυξημένες τιμές MMP-9 διαπιστώνονται στον ορό, αλλά όχι στο BAL ατόμων με ΜΜΚΠ <sup>[281]</sup>. Αντίθετα, άλλες μελέτες δε διαπιστώνουν συσχέτιση των επιπέδων MMP-9 στο πλάσμα με το στάδιο του καρκίνου <sup>[295, 299]</sup>.

Ακόμη, στη μελέτη των Zhang και συν., τα επίπεδα τόσο του VEGF, όσο και της MMP-9 συσχετίστηκαν με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων στους προ-θεραπείας ασθενείς <sup>[297]</sup>. Παρόμοια, άλλη μελέτη έδειξε ότι με τριπλό συνδυασμό δεικτών (VEGF-C στον ορό, MMP-9 στο πλάσμα και έκφραση VEGF) ανιχνεύεται με μεγαλύτερη ακρίβεια η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων σε ΜΜΚΠ από ό,τι με μέτρηση ενός μόνο δείκτη <sup>[301]</sup>. Ωστόσο, η μελέτη των Zhang και συν. δε διαπιστώνει συσχέτιση των επιπέδων VEGF και MMP-9 με άλλους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες, αλλά καταλήγει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραγόντων <sup>[297]</sup>.

Η προγνωστική αξία της κυκλοφορούσης MMP-9 έχει επίσης διερευνηθεί. Η μελέτη των Zhang και συν. δε βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση ανάμεσα σε

ασθενείς με αυξημένα και σε αυτούς με μειωμένα επίπεδα MMP-9 στον ορό <sup>[297]</sup>. Σε παρόμοια αποτελέσματα καταλήγει και η μελέτη των Shimanuki και συν. με μικρότερο αριθμό ασθενών <sup>[210]</sup>. Η μοναδική μελέτη που βρήκε ότι χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούσης MMP-9 σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση σε ασθενείς με ΚΠ ήταν των Ylisirniö και συν., στην οποία φάνηκε ότι οι ασθενείς με τιμή MMP-9 στο πλάσμα <30 ng/ml είχαν 1 έτος επιβίωση 56% έναντι 31% των ασθενών με υψηλότερη τιμή MMP-9 <sup>[302]</sup>.

Τέλος, είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι τα επίπεδα ορού της MMP-9 μειώνονται μετά τη ΧΜΘ <sup>[298, 303, 304]</sup>. Αντιθέτως, η μικρή μελέτη των Hiura και συν., με 21 ασθενείς που έπασχαν από μη πλακώδες ΜΜΚΠ και έλαβαν χημειοθεραπευτικό σχήμα με paclitaxel, carboplatin και bevacizumab, δε βρήκε διαφορά στα επίπεδα MMP-9 ορού ανάμεσα σε ασθενείς που παρουσίασαν ανταπόκριση έναντι αυτών που δεν ανταποκρίθηκαν στη συγκεκριμένη θεραπεία <sup>[305]</sup>.





## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 5. ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 90 ασθενείς με κυτταρολογική ή ιστολογική επιβεβαίωση πρωτοπαθούς καρκίνου πνεύμονα, που διαγνώστηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά τα έτη 2010 ως 2012, χωρίς να έχουν λάβει προηγουμένως οποιαδήποτε θεραπεία. Ακόμη, 40 υγιείς εθελοντές παρόμοιας ηλικίας, φύλου και καπνιστικής συνήθειας αποτέλεσαν την ομάδα έλεγχου της μελέτης. Τόσο οι ασθενείς, όσο και η ομάδα ελέγχου ήταν ενήμεροι σχετικά με την παρούσα μελέτη και είχαν συμπληρώσει έντυπο συγκατάθεσης.

Από τους 90 ασθενείς, 82 ήταν άντρες και 8 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $66,22 \pm 9,09$  έτη, 58 καπνιστές, 24 πρώην καπνιστές και 8 μη καπνιστές. Η γενική τους κατάσταση προσδιορίστηκε με βάση το Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) (22 ασθενείς με PS 0, 55 με PS 1 και 13 με PS 2). Ως απώλεια βάρους ορίστηκε η απώλεια πάνω από 5% του προ διάγνωσης βάρους σώματος τους προηγούμενους 3 μήνες, οπότε 40,0% των ασθενών παρουσίαζαν απώλεια βάρους. Σε 20 από τους ασθενείς (22,0%) διαπιστώθηκε ΜΚΠ, ενώ στους 70 (78,0%) τέθηκε η διάγνωση ΜΜΚΠ· ειδικότερα, 48,5% έπασχαν από πλακώδες ΜΜΚΠ, 32,8% από αδenoκαρκίνωμα, 2,8% από μεγαλοκυτταρικό τύπο και 15,7% από μη αλλιώς προσδιορισμένο ΜΜΚΠ (NOS).

Η σταδιοποίηση των ασθενών έγινε με βάση το σύστημα σταδιοποίησης της American Joint Committee on Cancer (AJCC), 7ος αναθεωρημένος ορισμός της σταδιοποίησης κατά TNM. Τέσσερις ασθενείς (4,5%) κατηγοριοποιήθηκαν ως σταδίου I, τρεις (3,3%) ως σταδίου II, είκοσι επτά (30,0%) ως σταδίου III και πενήντα έξι (62,2%) ήταν ήδη σε προχωρημένο στάδιο κατά τη διάγνωση (κλινικό στάδιο IV). Σε ό,τι αφορά την έκταση της νόσου (T στάδιο), δύο ασθενείς (2,2%) είχαν μέγεθος όγκου 3 εκ. ή λιγότερο στη μέγιστη διάσταση, χωρίς βρογχοσκοπική ένδειξη διήθησης εγγύτερα του σύστοιχου λοβαίου βρόγχου (T1), τριάντα τρεις ασθενείς (36,6%) είχαν T2 νόσο, δεκαοχτώ ασθενείς (20,0%)

είχαν T3 νόσο και τριάντα επτά ασθενείς (41,1%) είχαν T4 νόσο. Σε ό,τι αφορά τη διήθηση λεμφαδένων, στη μελέτη συμπεριελήφθησαν είκοσι πέντε (27,8%) ασθενείς χωρίς ένδειξη μετάστασης στους λεμφαδένες (N0), δύο (2,2%) ασθενείς με διήθηση των πυλαίων λεμφαδένων (N1), σαράντα επτά (52,2%) με μετάσταση στους σύστοιχους μεσοθωρακικούς και/ ή στους υποκλείδιους λεμφαδένες (N2) και δεκαέξι (17,8%) με διήθηση σε ετερόπλευρες ομάδες λεμφαδένων (N3). Ως προς την ύπαρξη μετασταστικής νόσου, 56 από τους 90 (62%) ασθενείς παρουσίαζαν μεταστάσεις ήδη από τη στιγμή της διάγνωσης: συνολικά οι 19 στους 90 (21%) είχαν οστικές μεταστάσεις.

Οι ασθενείς, μετά την αρχική εκτίμηση και σταδιοποίηση της νόσου, έλαβαν την ενδεδειγμένη θεραπευτική αντιμετώπιση (χειρουργείο, ΧΜΘ, ΑΚΘ ή συνδυασμό τους). Οι ασθενείς σταδίου IV (56 ασθενείς - 62,2% επί του συνόλου) έλαβαν διάφορα ΧΜΘ σχήματα (διπλέτες συνδυασμού με βάση την πλατίνα) ως θεραπεία 1<sup>ης</sup> γραμμής (κατά μέσο όρο: 4 κύκλοι ΧΜΘ), ενώ η ανταπόκρισή τους ορίστηκε με βάση τα RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) κριτήρια. Έτσι, οι ασθενείς που είχαν μερική ανταπόκριση (Partial Response-PR: n = 32, 35,5% επί του συνόλου) ή πλήρη ανταπόκριση (Complete Response-CR: n = 3, 3,3% επί του συνόλου) στο τέλος της θεραπείας 1<sup>ης</sup> γραμμής χαρακτηρίστηκαν ως ανταποκρινόμενοι, ενώ αυτοί που είχαν σταθερή νόσο (Stable Disease-SD: n = 12, 13,3% επί του συνόλου) ή πρόοδο νόσου (Progressive Disease-PD: n = 9, 10% επί του συνόλου) θεωρήθηκαν μη ανταποκρινόμενοι. Ακολούθησε τακτική παρακολούθηση των ασθενών με τον απαραίτητο κάθε φορά κλινικοεργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο. Αναλυτικά, τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 1.

Η ομάδα των 40 υγιών εθελοντών περιελάμβανε 37 άνδρες και 7 γυναίκες, μέσης ηλικίας 65,28±9,77 έτη, χωρίς ιστορικό χρόνιας αποφρακτικής νόσου ή άλλης πάθησης του αναπνευστικού. Από τους υγιείς μάρτυρες αξίζει να σημειωθεί ότι 27 άτομα ήταν καπνιστές, 10 πρόην καπνιστές και 3 μη καπνιστές.

**Πίνακας 1.** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΚΠ.

<b>Χαρακτηριστικά ασθενών</b>	<b>N</b>
<b>Σύνολο</b>	<b>90</b>
<b>Ηλικία (έτη)</b>	
66,22±9,09	(μέση τιμή±τυπική απόκλιση)
≤65	40
>65	50
<b>Φύλο</b>	
Άνδρες	82
Γυναίκες	8
<b>Κάπνισμα</b>	
Μη καπνιστές (ΜΚ)	8
Πρώην καπνιστές (ΠΚ)	24
Καπνιστές (Κ)	58
<b>Απώλεια βάρους</b>	
≤5%	54
>5%	36
<b>ECOG PS</b>	
0	22
1	55
2	13
<b>Ιστολογικός τύπος</b>	
Πλακώδες	34
ΑδενοCa	23
NOS ΜΜΚΠ	11
Μεγαλοκυτταρικό	2
ΜΚΠ	20
<b>Στάδιο</b>	
Στάδιο I	4
Στάδιο II	3
Στάδιο III	27
Στάδιο IV	56
<b>T</b>	

T1	2
T2	33
T3	18
T4	37
<b>N</b>	
N0	25
N1	2
N2	47
N3	16
<b>M</b>	
M0	34
M1	56
<b>Οστικές μεταστάσεις</b>	
Όχι	71
Ναι	19

## 6. ΜΕΘΟΔΟΣ

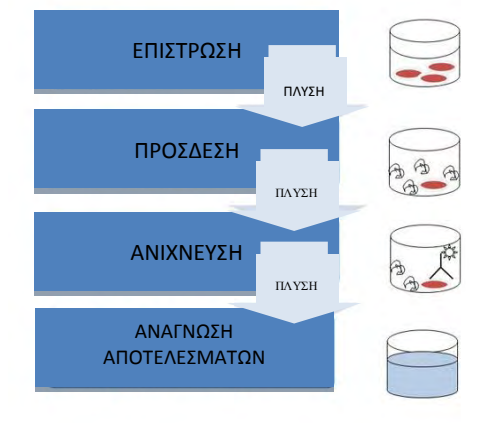
Για τον προσδιορισμό των επιπέδων OPN, VEGF και MMP-9, ασθενείς και υγιείς εθελοντές προσήλθαν για φλεβοκέντηση, αφού παρέμειναν νηστικοί για διάστημα τουλάχιστον 12 ωρών και ξάπλωναν για τουλάχιστον είκοσι λεπτά. Οι αιμοληψίες από περιφερική φλέβα πραγματοποιήθηκαν κατά τις πρωινές ώρες μεταξύ 8.00 με 9.00 π.μ. και τα δείγματα στους ασθενείς ελήφθησαν πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Ελήφθησαν 10 ml φλεβικού αίματος, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν άμεσα στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε μικροσωληνίσκους (microtubes), που αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους για OPN, VEGF και MMP-9. Όλα τα δείγματα της δοκιμασίας «έτρεξαν» διπλά για κάθε βιολογική παράμετρο. Σε περίπτωση που υπήρχε διαφορά στα διπλότυπα αποτελέσματα ενός δείγματος της τάξεως άνω του 5%, η διαδικασία για το συγκεκριμένο δείγμα επαναλαμβανόταν.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω δεικτών στον ορό αίματος ασθενών και υγιών εθελοντών πραγματοποιήθηκε με εμπορικά διαθέσιμα kits ELISA, σύμφωνα με τις αρχές του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας (R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης για OPN, VEGF και MMP-9 ήταν 0,011 ng/mL, 0,156 ng/mL και 9 pg/mL, αντίστοιχα.

Η μέθοδος ELISA επιτρέπει την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων αντιγόνων, όπως πρωτεϊνών, πεπτιδίων και ορμονών. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται η βασική ανοσολογική αρχή της σύνδεσης ενός αντιγόνου με ένα ειδικό αντίσωμα. Ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου επισυνάπτεται σε μια επιφάνεια, και έπειτα ένα συγκεκριμένο αντίσωμα «πλένεται» πέρα από την επιφάνεια έτσι ώστε να μπορεί να δεσμεύσει το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο, και στο τελικό βήμα προστίθεται μια ουσία, την οποία το ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα. Κατά συνέπεια στην περίπτωση του φθορισμού ELISA κατά την εκπομπή του φωτός επάνω στο δείγμα, οποιαδήποτε σύμπλοκα αντιγόνων/αντισωμάτων θα φθορίσουν έτσι ώστε το ποσό αντιγόνου στο δείγμα να μπορεί να μετρηθεί.

Το αντιγόνο σε υγρή φάση, ακινητοποιείται και προστίθεται σε δίσκους μικροτιτλοδότησης, συνήθως 96 φρεατίων. Εκεί, προσκολλάται στα φρεάτια και το πρωτεύον αντίσωμα συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα ενζυμικά συνδεδεμένο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αντιδρά με ένα χρωμογόνο, παράγοντας έτσι μια ανιχνεύσιμη αλλαγή χρώματος για την ποσοτική ή ποιοτική ανίχνευση του αντιγόνου. Το στάδιο-κλειδί στη δοκιμασία ELISA είναι η άμεση ή έμμεση ανίχνευση του αντιγόνου, μέσω συγκόλλησης ή ακινητοποίησης του αντιγόνου ή του ειδικού για το αντιγόνο σύλληψης αντίσωμα (antigen-specific capture antibody), αντίστοιχα απευθείας πάνω στην επιφάνεια του φρεατίου. Μεταξύ κάθε βήματος, ο δίσκος μικροτιτλοδότησης «πλένεται» με ένα ήπιο καθαριστικό, προκειμένου να αφαιρεθούν οποιεσδήποτε πρωτεΐνες ή αντισώματα δεν είναι συγκεκριμένα συνδεδεμένες. Μετά από το τελικό βήμα πλυσίματος, με την προσθήκη ενός

ενζυματικού υποστρώματος, παράγεται ένα ορατό σήμα, το οποίο δείχνει την ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική επισκόπηση διαγράμματος ροής ELISA.

## 7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πραγματοποιήθηκε μια προοπτική μελέτη κοορτής (prospective cohort study). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού MedCalc, έκδοση 12.1.4. Ο προσδιορισμός της κατανομής των δεδομένων μας ανέδειξε ότι οι περισσότερες μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, όπως αξιολογήθηκε βάσει του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Ως εκ τούτου, όλες οι μεταβλητές εκφράστηκαν ως διάμεσες τιμές ( $25^{\text{th}}$  -  $75^{\text{th}}$  εκατοστιαία θέση), εκτός κι αν αναφέρεται διαφορετικά. Όλοι οι έλεγχοι ήταν αμφίπλευροι (two-sided).

Όλες οι συγκρίσεις των επιπέδων OPN, VEGF και MMP-9 στον ορό μεταξύ των ομάδων επιτελέστηκαν με τη χρήση μη παραμετρικών ελέγχων, όπως το Mann-Whitney U test και το Kruskal-Wallis H test με μια κατάλληλη post hoc δοκιμασία. Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman (μη κανονική κατανομή τιμών) χρησιμοποιήθηκε για συσχετίσεις ποσοτικών δεδομένων όταν αυτό ήταν απαραίτητο. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) για την εκτίμηση των λόγων πιθανοτήτων (odds



ratio) και των διαστημάτων εμπιστοσύνης (Confidence Intervals, CIs) για τις συσχετίσεις με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως τιμή του  $p < 0.05$ .

Οι καμπύλες επιβίωσης απεικονίστηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier και οι Log-rank δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν για τις διαφορές στην επιβίωση. Η ανάλυση της επιβίωσης με συμμεταβλητές έγινε με παλινδρόμηση Cox (Cox regression) με σκοπό να διακριθούν ποιες παράμετροι εμφάνισαν ανεξάρτητη προγνωστική αξία για την επιβίωση.

## **8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Στη παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι τιμές της OPN σε 90 ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ, πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Επίσης οι τιμές τόσο της OPN, όσο και του VEGF και της MMP-9, συσχετίστηκαν με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ και με την επιβίωση των ασθενών. Οι τρεις βιολογικοί δείκτες προσδιορίστηκαν στους ασθενείς πριν και μετά το πέρας της ΧΜΘ και αξιολογήθηκε κατά πόσο τα επίπεδά τους επηρεάστηκαν από αυτήν. Ακόμη, επιχειρήθηκε να αναδειχθεί ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ των τριών δεικτών. Συνολικά τα επίπεδα των δεικτών σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

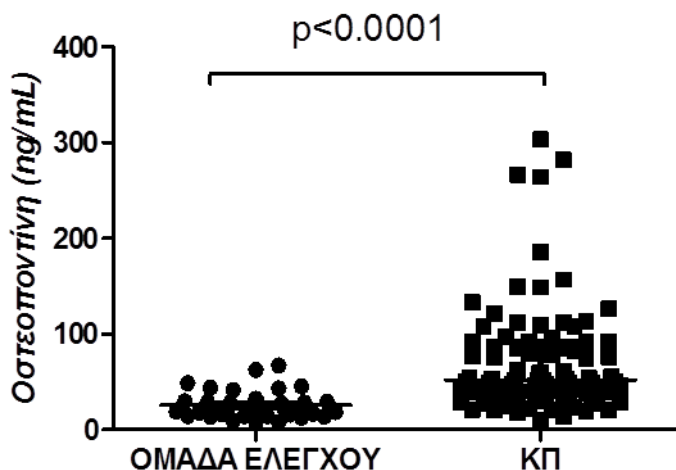
**Πίνακας 2.** Επίπεδα OPN, VEGF και MMP-9 στον ορό ασθενών με ΚΠ σε σχέση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Χαρακτηριστικά ασθενών		N	OPN (ng/ml)		VEGF (pg/mL)		MMP-9 (ng/ml)	
			Διάμεση τιμή (25 <sup>η</sup> – 75 <sup>η</sup> εκατοστιαία θέση)	P	Διάμεση τιμή (25 <sup>η</sup> – 75 <sup>η</sup> εκατοστιαία θέση)	P	Διάμεση τιμή (25 <sup>η</sup> – 75 <sup>η</sup> εκατοστιαία θέση)	P
Ηλικία	≤65	40	48,25 (33,73-8109)	0,076	365,5 (262,0-784,7)	0,1790	838,2 (514,7-1164)	0,6937
	>65	50	60,50 (37,95-107,5)		546,2 (333,2-872,8)		797,1 (487,7-1216)	
Φύλο	♂	82	52,45 (37,95-92,50)	0,071	450,6 (300,4-872,8)	0,4872	824,5 (538,6-1258)	0,0929
	♀	8	37,85 (29,46-66,69)		488,7 (245,1-639,7)		519,2 (278,4-972,1)	
Κάπνισμα	Μη καπνιστές (ΜΚ)	8	34,40 (22,94-42,50)	ΜΚ vs. Κ **και ΠΚ vs. Κ* <b>0.0012</b>	394,0 (245,1-526,7)	0,4780	312,5 (154,4-654,0)	ΜΚ vs. Κ** και ΜΚ vs. ΠΚ* <b>0.008</b>
	Πρώην καπνιστές (ΠΚ)	24	40,43 (29,38-76,33)		471,4 (210,0-1013)		855,7 (509,1-1347)	
	Καπνιστές (Κ)	58	57,08 (42,50-108,2)		461,1 (313,0-753,3)		868,2 (588,3-1216)	
Απόλεια βάρους	≤5%	54	45,80 (30,70-63,29)	<b>0.0003</b>	442,8 (287,0-678,1)	0,1759	684,9 (487,7-1105)	0,1562
	>5%	36	82,35 (44,68-130,10)		543,7 (285,8-1005)		936,7 (556,3-1325)	
ECOG-PS	0	22	39,20 (29,80-51,24)	PS 0 vs. PS 2 <b>0.0036</b>	283,0 (161,7-447,7)	PS 0 vs. PS 1*, PS 1 vs. PS2* και PS 0 vs. PS2*** <b>&lt;0.0001</b>	582,9 (281,9-796)	PS 0 vs. PS 1*, PS 1 vs. PS2* και PS 0 vs. PS2*** <b>0.0004</b>
	1	55	52,20 (35,10-92,25)		480,0 (316,0-795,0)		835,9 (524,2-1204)	
	2	13	80,10 (56,20-135,2)		754,0 (665,2-1511)		1509 (881,1-2559)	
Ιστολογικός τύπος	Πλακώδες	34	52,80 (34,78-107,5)	0,342	553,7 (347,9-979,6)	0,1380	868,6 (609,1-1310)	0,1361
	ΑδενοCa	23	43,70 (30,10-77,90)		423,9 (231,5-654,6)		748,6 (274,2-1171)	

	<b>ΜΚΠ</b>	20	43,80 (34,98-72,96)		391,9 (265,9-855,5)		602,8 (269,5-1165)	
	<b>ΜΚΠ</b>	20	43,80 (34,98-72,96)	0.329	391,9 (265,9-855,5)	0.6871	602,8 (269,5-1165)	0.0980
	<b>ΜΜΚΠ</b>	70	52,80 (36,68-92,50)		480,5 (299,8-795,9)		824,5 (573,2-1199)	
<b>Στάδιο</b>	<b>I-IIIΑ</b>	18	54,75 (36,53-122,9)	0.353	442,8 (292,5-768,8)	0.8997	923,7 (580,4-1259)	0.4708
	<b>IIIΒ-IV</b>	72	51,05 (35,28-86,18)		472,9 (287,7-831,7)		798,1 (475,8-1196)	
<b>T</b>	<b>T1-2</b>	35	49,60 (33,70-92,25)	0.403	443,6 (287,0-684,9)	0.6283	701,4 (504,1-1144)	0.4563
	<b>T3-4</b>	55	52,90 (40,20-91,88)		481,0 (308,0-871,9)		875,5 (492,6-1311)	
<b>N</b>	<b>N0-1</b>	27	43,80 (33,80-82,95)	0.285	374,0 (204,0-675,8)	<b>0.0101</b>	614,3 (291,0-1047)	<b>0.0144</b>
	<b>N2-3</b>	63	52,70 (37,20-95,40)		531,4 (332,0-966,0)		877,1 (592,7-1311)	
<b>M</b>	<b>M0</b>	34	49,25 (33,05-92,00)	0.583	432,9 (252,9-1026)	0.8222	796,4 (519,2-1118)	0.6988
	<b>M1</b>	56	52,80 (38,33-92,16)		505,9 (317,5-773,4)		824,5 (475,8-1284)	
<b>Οστικές μεταστάσεις</b>	<b>Όχι</b>	71	50,35 (37,00-91,88)	0.996	-		-	
	<b>Ναι</b>	19	54,40 (28,90-92,50)		-		-	

## 8.1 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Τα επίπεδα της OPN στον ορό κατά τη διάγνωση ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με την ομάδα έλεγχου [52,10 (36,53-91,97) ng/ml έναντι 22,98 (15,85-29,65) ng/ml,  $p < 0.0001$ , Εικόνα 13].



**Εικόνα 13.** Επίπεδα OPN ορού σε υγιείς και ασθενείς με ΚΠ.

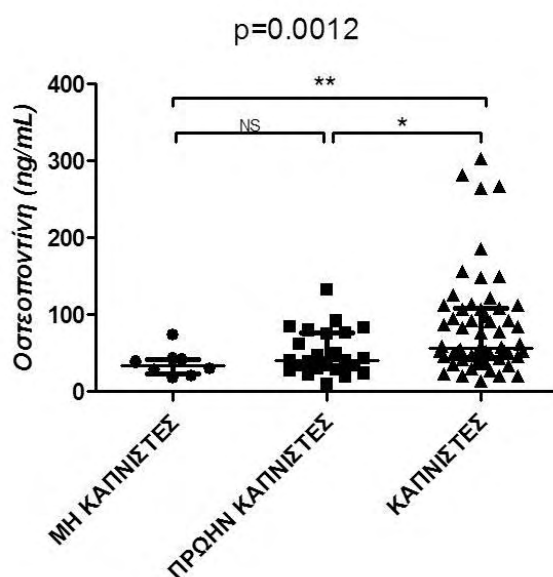
Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

## 8.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΡΝ, VEGF ΚΑΙ MMP-9 ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

Έγινε συσχέτιση των τιμών της OPN, του VEGF και της MMP-9 με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, και συγκεκριμένα με την ηλικία, το φύλο, την καπνιστική συνήθεια, την απώλεια βάρους, τη γενική κατάσταση (ECOG-PS), τον ιστολογικό τύπο, το στάδιο της νόσου και τα cT, cN, cM (σύμφωνα με την σταδιοποίηση TNM). Οι τιμές OPN συσχετίστηκαν επιπρόσθετα με την ύπαρξη ή όχι οστικών

μεταστάσεων. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

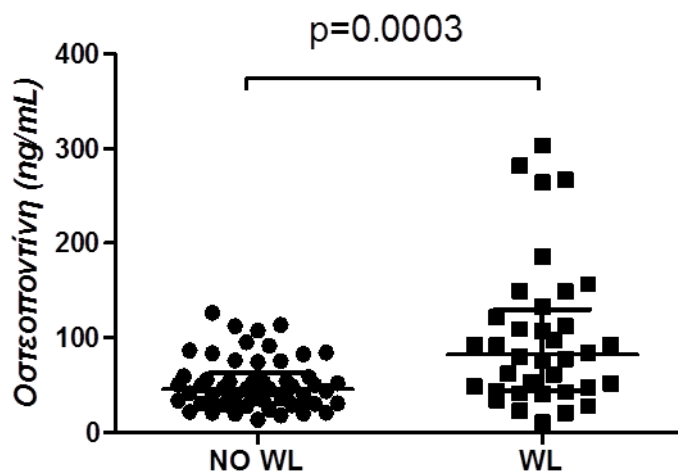
Σύμφωνα με την ανάλυση των δεδομένων, οι καπνιστές ασθενείς παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερα επίπεδα OPN σε σχέση με τους πρώην καπνιστές και τους μη καπνιστές [57,08 (45,20-108,20) ng/ml έναντι 40,43 (29,38-76,33) ng/ml και έναντι 34,40 (22,94-42,50) ng/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0012$ , Εικόνα 14].



**Εικόνα 14.** Επίπεδα OPN ορού σε μη καπνιστές, πρώην καπνιστές και καπνιστές ασθενείς με ΚΠ.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

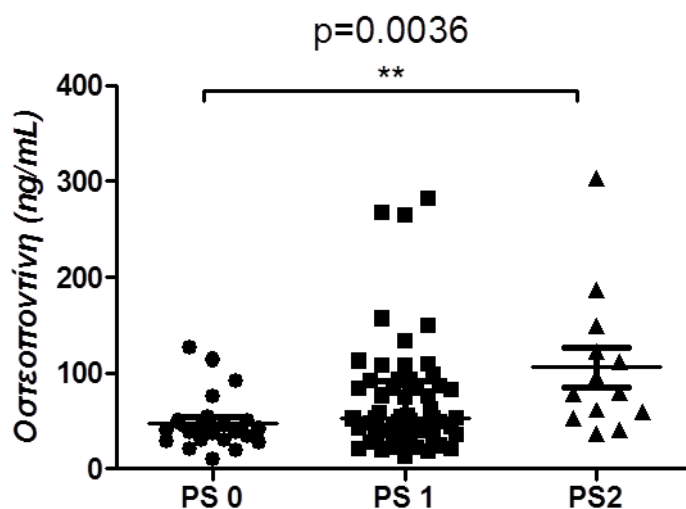
Ακόμη, στατιστικώς σημαντική διαφορά προέκυψε στα επίπεδα OPN μεταξύ των ασθενών με απώλεια βάρους και των ασθενών χωρίς απώλεια βάρους [82,35 (44,68-130,10) ng/ml έναντι 45,80 (30,70-63,29) ng/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0003$ , Εικόνα 15].



**Εικόνα 15.** Επίπεδα OPN ορού σε ασθενείς με ΚΠ που παρουσίαζαν απώλεια βάρους και σε ασθενείς χωρίς απώλεια βάρους.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

Επιπρόσθετα, οι ασθενείς με ECOG-PS 0 είχαν χαμηλότερα επίπεδα OPN ορού σε σχέση με αυτούς με ECOG-PS 2 [39,20 (29,80-51,24) ng/ml έναντι 80,10 (56,20-135,20) ng/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0036$ , Εικόνα 16].

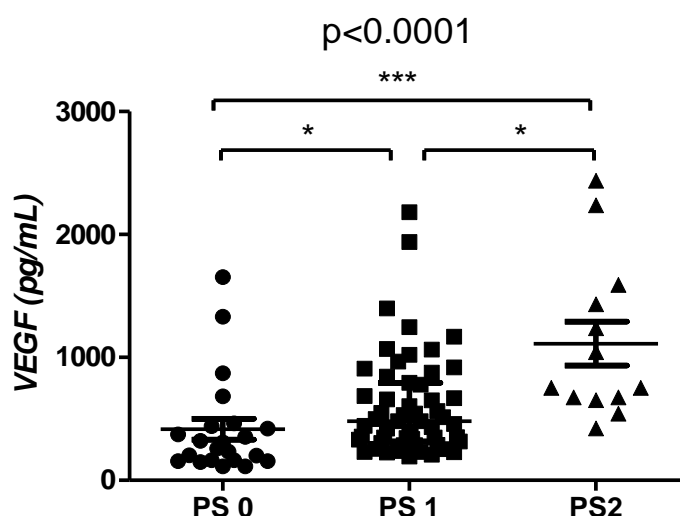


**Εικόνα 16.** Επίπεδα OPN ορού σε ασθενείς με ΚΠ και ECOG-PS 0, ECOG-PS 1 και ECOG-PS 2.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα OPN σχετικά με τις ηλικιακές ομάδες ( $p=0.076$ ), το φύλο ( $p=0.071$ ), τον ιστολογικό τύπο ( $p=0.342$ ), το στάδιο της νόσου ( $p=0.353$ ), την T ( $p=0.403$ ), N ( $p=0.285$ ), ή M ( $p=0.583$ ) κατάταξη και την ύπαρξη ή όχι οστικών μεταστάσεων ( $p=0.996$ ).

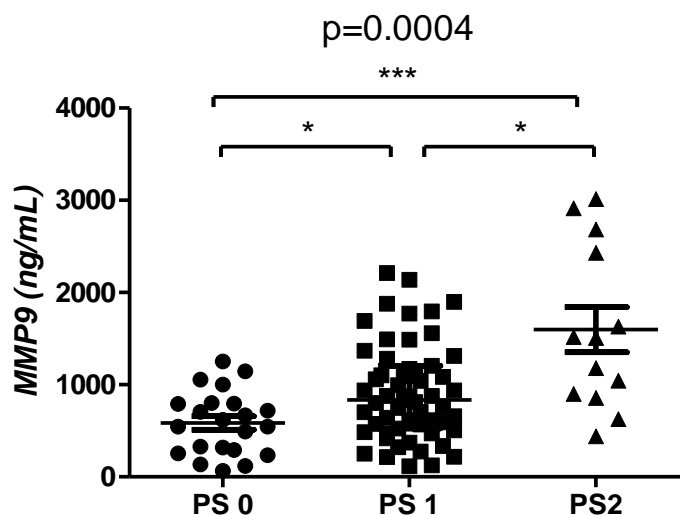
Σε ό,τι αφορά τις μετρήσεις του VEGF, οι ασθενείς με ECOG-PS 0 είχαν χαμηλότερα επίπεδα ορού σε σχέση με τους ασθενείς με ECOG-PS 1 και 2 [283,0 (161,7-447,7) έναντι 480,0 (316,0-795,0) και 754,0 (665,2-1511) pg/mL, αντίστοιχα,  $p<0.0001$ , Εικόνα 17].



**Εικόνα 17.** Επίπεδα VEGF ορού σε ασθενείς με ΚΠ και PS 0, PS 1 και PS2.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

Παρόμοια διαφορά στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας, παρατηρήθηκε στα επίπεδα MMP-9 ορού ανάμεσα σε ασθενείς με ECOG-PS 0 και ECOG-PS 1 και 2 [582,9 (281,9-796) έναντι 835,9 (524,2-1204) και 1509 (881,1-2559) ng/ml, αντίστοιχα,  $p= 0.0004$ , Εικόνα 18].

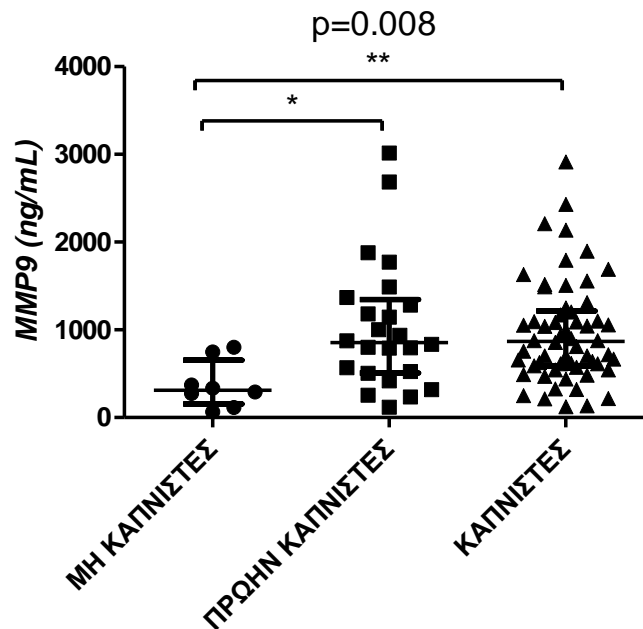


**Εικόνα 18.** Επίπεδα MMP-9 ορού σε ασθενείς με ΚΠ και PS 0, PS 1 και PS2.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

Επιπλέον, οι μη καπνιστές είχαν χαμηλότερα επίπεδα MMP-9 στον ορό από τους πρώην και τους νυν καπνιστές [312,5 (154,4-654,0) ng/ml έναντι 855,7 (509,1-1347) ng/ml έναντι 868,2 (588,3-1216) ng/ml, αντίστοιχα,  $p=0.008$ , Εικόνα 19].

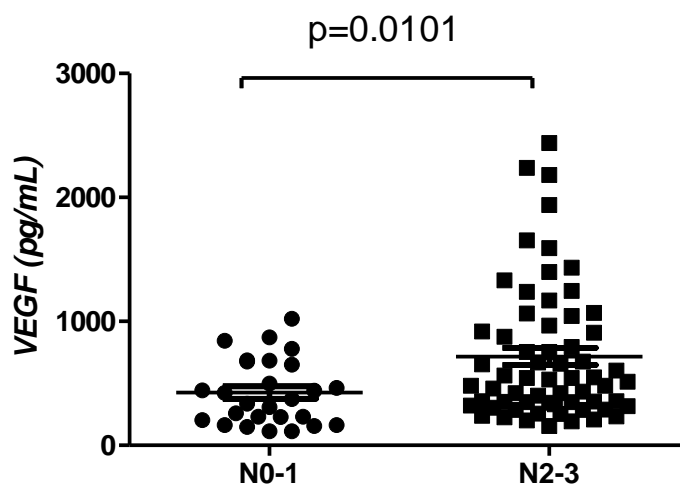




**Εικόνα 19.** Επίπεδα MMP-9 ορού σε μη καπνιστές, πρώην καπνιστές και καπνιστές ασθενείς με ΚΠ.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

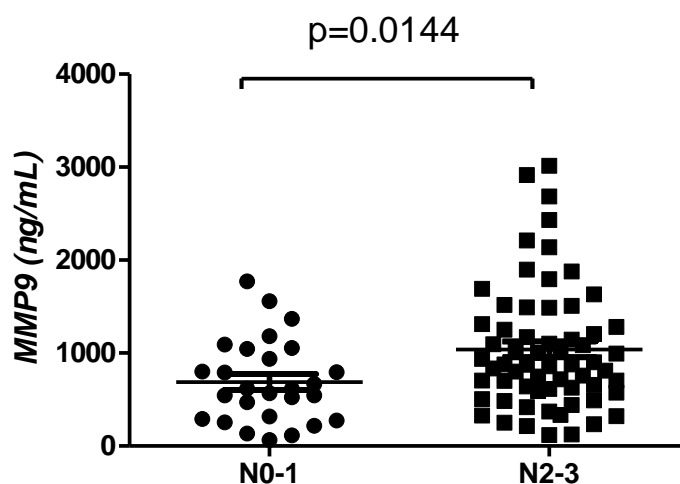
Ακόμη, οι ασθενείς χωρίς μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες (N0) ή με μετάσταση στους πυλαίους λεμφαδένες (N1) είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές VEGF σε σχέση με τους ασθενείς με μετάσταση στις λεμφαδενικές ομάδες του μεσοθωρακίου (N2-N3) [374,0 (204,0-675,8) pg/ml έναντι 531,4 (332,0-966,0) pg/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0101$ , Εικόνα 20].



**Εικόνα 20.** Επίπεδα VEGF ορού ασθενών με ΚΠ σε σχέση με Ν στάδιο.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

Ομοίως και για τις τιμές MMP-9 ορού σε σχέση με απουσία ή παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων [614,3 (291,0-1047) ng/ml έναντι 877,1 (592,7-1311) ng/ml, αντίστοιχα,  $p=0.0144$ , Εικόνα 21].



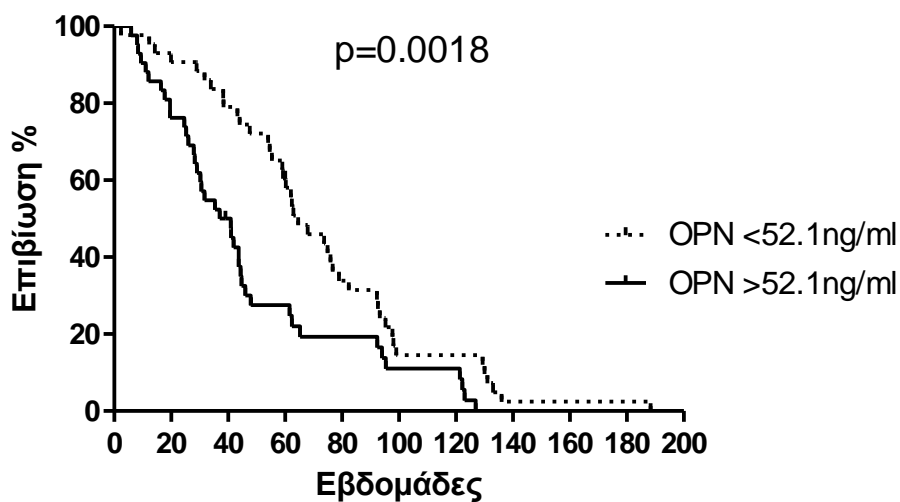
**Εικόνα 21.** Επίπεδα MMP-9 ορού ασθενών με ΚΠ σε σχέση με Ν στάδιο.

Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο και οι οριζόντιες γραμμές στη μέση συμβολίζουν τις διάμεσες τιμές OPN στον ορό. Οι οριζόντιες γραμμές πάνω και κάτω από τις διάμεσες τιμές αντιπροσωπεύουν την 25<sup>η</sup> και την 75<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση.

### **8.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ OPN, VEGF ΚΑΙ MMP-9 ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

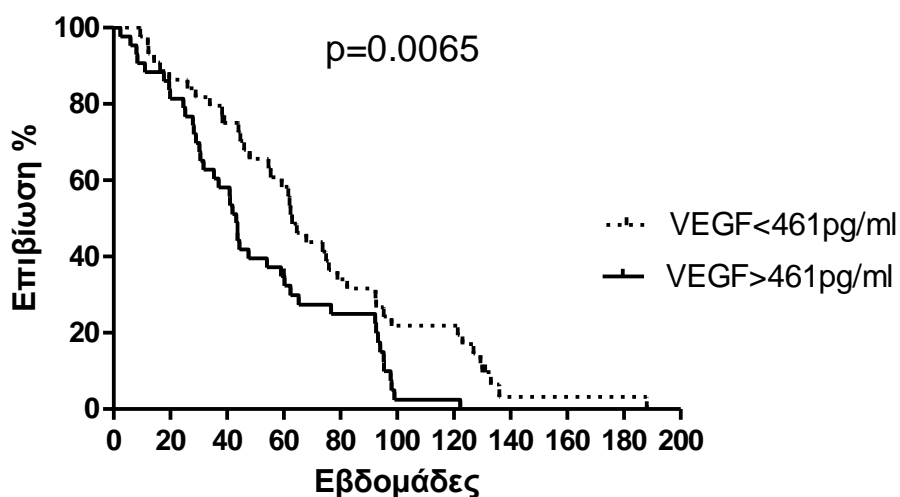
Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές OPN κατά τη διάγνωση ανάμεσα στους ανταποκρινόμενους και στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς ( $p=0.3942$ ), καθώς επίσης και στις προ θεραπείας τιμές του VEGF ( $p=0.7837$ ) και της MMP-9 ( $p=0.5765$ ) -Fisher's exact test- στις ίδιες ομάδες ασθενών. Ακόμη, η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis) δεν ανέδειξε συσχετίσεις των προ-θεραπείας επιπέδων της OPN, του VEGF και της MMP-9 με την ανταπόκριση στην 1<sup>η</sup> γραμμής χημειοθεραπεία.

Σύμφωνα με την μονοπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης (Univariate Cox regression analysis), τα επίπεδα της OPN και του VEGF στον ορό είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη συνολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα. Συγκεκριμένα και σε ό,τι αφορά την OPN, η ομάδα των ασθενών χωρίστηκε σε δύο υποομάδες όσον αφορά στην επιβίωσή τους, με βάση τη διάμεση τιμή των 52,10 ng/ml. Οι ασθενείς με επίπεδα OPN ορού μικρότερα από την προαναφερθείσα διάμεση τιμή, φάνηκε ότι συνοδεύονταν και από καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα OPN [64,60 εβδομάδες έναντι 39 εβδομάδων,  $p=0.0018$ , HR 0,4687 (95% CI 0,2912-0,7545), log-rank test; Εικόνα 22]. Ειδικά για τους ασθενείς με χαμηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα OPN, βρέθηκε ότι είχαν σημαντικά καλύτερη 1 έτους επιβίωση σε σχέση με τα άτομα με υψηλότερα επίπεδα (70% έναντι 27,5%).



Εικόνα 22. Επίπεδα OPN ασθενών σε σχέση με την επιβίωσή τους.

Στην αντίστοιχη ανάλυση των τιμών του VEGF, οι ασθενείς με επίπεδα ορού μεγαλύτερα από τη διάμεση τιμή των 461 pg/ml, φάνηκε επίσης ότι συνοδεύονταν από μικρότερη διάμεση επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα VEGF [43,30 εβδομάδες έναντι 62,90 εβδομάδων,  $p=0.0065$ , HR 0,5238 (95% CI 0,3287-0,8346), log-rank test; Εικόνα 23]. Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση των τιμών της MMP-9 δεν έδειξε κάποια συσχέτιση με τη συνολική επιβίωση των ασθενών ( $p=0.1571$ ).

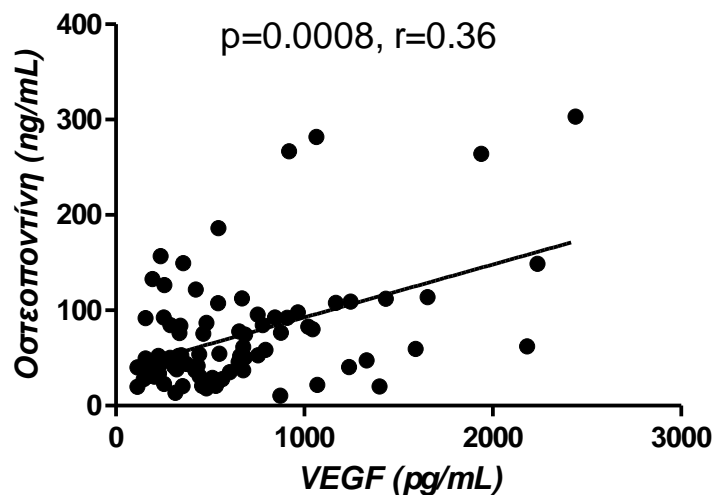


Εικόνα 23. Επίπεδα VEGF ασθενών σε σχέση με την επιβίωσή τους.

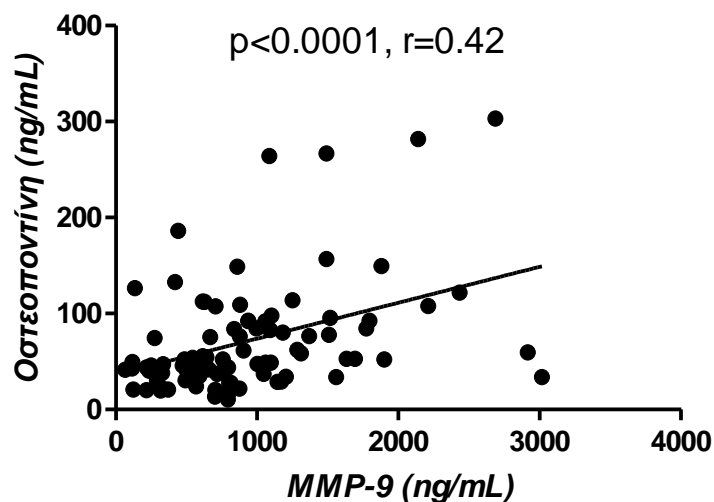
Τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν από την εφαρμογή μοντέλων πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης (multiple logistic regression models) μετά από προσαρμογή για γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες (ηλικία, απώλεια βάρους, ECOG PS, ιστολογικός τύπος και στάδιο νόσου), ανέδειξαν ότι τα επίπεδα OPN ορού παρουσίαζαν μια τάση στο να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση ( $p=0.0656$ , 95% CI 0,9723-2,6563), αλλά δεν έφτασαν στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας.

#### 8.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ OPN ΟΡΟΥ ΜΕ ΕΠΙΠΕΔΑ VEGF ΚΑΙ MMP-9

Η μελέτη μας ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων OPN στον ορό ασθενών με ΚΠ, τόσο με τον VEGF ( $p=0.0008$ , Spearman  $r=0.36$ , Εικόνα 24), όσο και με την MMP-9 ( $p<0.0001$ , Spearman  $r=0.42$ , Εικόνα 25).



**Εικόνα 24.** Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN και VEGF.  
Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο.



**Εικόνα 25.** Θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN και MMP-9. Κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα άτομο.

## 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα προοπτική μελέτη κούρτης αξιολογήθηκε η πιθανή διαγνωστική και προγνωστική αξία της OPN και η ενδεχόμενη συσχέτιση των επιπέδων της στον ορό με γνωστούς αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο VEGF και η MMP-9, σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα.

Αναδείχθηκαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούσης OPN στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Ακόμη, διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN ορού και συγκεκριμένες κλινικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της καπνιστικής συνήθειας, της απώλειας βάρους και της γενικής κατάστασης των ασθενών. Επιπλέον, φάνηκε ότι οι ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα OPN είχαν καλύτερη επιβίωση. Μέχρι στιγμής, είναι η πρώτη φορά που διαπιστώνεται μια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων OPN ορού με τα επίπεδα τόσο του VEGF, όσο και της MMP-9 σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα.

Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει συσχέτιση ανάμεσα στην OPN και στον καρκίνο τα τελευταία χρόνια. Η πρώτη ένδειξη για αυτήν τη συσχέτιση ήταν και η πρώτη ουσιαστικά αναφορά στην OPN με τη μελέτη των Senger και συν., όπου περιγράφηκε μια εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη από καλλιέργεια κυτταρικής σειράς που είχε υποστεί κακοήθη εξαλλαγή <sup>[9]</sup>. Σε *in vitro* μελέτη που αφορούσε πολλαπλούς τύπους, διαφόρων σταδίων καρκίνου δέρματος ποντικού, διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης OPN <sup>[306]</sup>. Η συσχέτιση της OPN με κακοήθεια υποστηρίχθηκε και από το γεγονός ότι ο *ras*-μετασχηματισμός των NIH 3T3 μη καρκινικών κυττάρων τους έδωσε μεταστατική ικανότητα <sup>[307]</sup>. Επίσης, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου της OPN στα *ras*-μετασχηματισμένα κύτταρα δείχνει απευθείας συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της OPN και την απόκτηση μεταστατικού φαινοτύπου από αυτά τα κύτταρα <sup>[308]</sup>. Υπάρχουν, συνεπώς, σημαντικές πειραματικές μελέτες που υποδηλώνουν σαφώς ότι η OPN παίζει ρόλο στην καρκινογένεση και τη μεταστατική ικανότητα των όγκων.

Ειδικά για τον καρκίνο πνεύμονα, η πρακτική εφαρμογή των επιπέδων OPN ως βιοδείκτης στην κλινική πράξη έχει αποτελέσει θέμα εντατικής έρευνας. Η διάμεση τιμή OPN ορού των ασθενών στη μελέτη μας, στην οποία έλαβαν μέρος ασθενείς πρώιμων και προχωρημένων σταδίων, τόσο MMKΠ, όσο και MKΠ, βρέθηκε στα 52,10 ng/ml, που είναι συγκρίσιμη με τιμές που έχουν διαπιστώσει και άλλοι ερευνητές. Μάλιστα, η τιμή αυτή είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ομάδα των υγιών εθελοντών, ενισχύοντας την αρχική μας υπόθεση ότι η OPN μπορεί να έχει διαγνωστικό ρόλο στην περίπτωση ΚΠ, όπως έχει υποστηριχθεί και από άλλους μελετητές. Σημαντικά δεδομένα προσέφερε η μελέτη των Brown και συν., στην οποία, σε διάφορους τύπους καρκίνων, μεταξύ αυτών και πνεύμονα, στην ομάδα των ασθενών διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα OPN ορού συγκρινόμενα με τις αντίστοιχες τιμές στον παρακείμενο υγιή ιστό <sup>[120]</sup>. Το γεγονός αυτό είναι σε συνάφεια με άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αργότερα και αφορούν δείγματα ορού <sup>[151-153]</sup> και πλάσματος <sup>[142-144]</sup> σε ασθενείς με ΚΠ. Γενικά, όσες ερευνητικές ομάδες

ασχολήθηκαν είτε με έκφραση OPN, είτε με κυκλοφορούντα επίπεδα OPN σε ασθενείς με ΚΠ βρήκαν αυξημένα επίπεδα αυτής συγκρινόμενα με δείγματα από υγιείς εθελοντές. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αφορούν τη σύνδεση της OPN με ιντεγκρίνες ή CD44 γλυκοπρωτεΐνες και ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης, όπως της PI3K ή της MAPK. Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται ποικίλοι μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των NF-kB και AP-1, οπότε αυξάνονται τα επίπεδα παραγόντων που προάγουν την απόπτωση και την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας <sup>[49]</sup>.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Isa και συν., η διάμεση τιμή OPN ορού ήταν 69,00 ng/ml, ωστόσο οι ασθενείς σε αυτή τη μελέτη έλαβαν συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα και επρόκειτο αποκλειστικά για ασθενείς προχωρημένων σταδίων ΜΜΚΠ, Ιαπωνικής καταγωγής <sup>[154]</sup>. Στην ανάλυση άλλης ομάδας, όπου η διάμεση τιμή OPN ορού ήταν 59,3 ng/ml, ο πληθυσμός των ασθενών ήταν αποκλειστικά άτομα ΜΜΚΠ που είχαν ήδη, ή εμφάνισαν στην πορεία, οστικές μεταστάσεις <sup>[153]</sup>. Άλλη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ και οστικές μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης είχαν διάμεση τιμή OPN ορού στα 92,7 ng/ml, ενώ οι ασθενείς με ΜΜΚΠ χωρίς οστικές μεταστάσεις είχαν 40,5 ng/ml και οι ασθενείς με ΜΚΠ είχαν 43,2 ng/ml <sup>[152]</sup>. Πρόκειται δηλαδή για μελέτη που εξέτασε επιμέρους τις τιμές OPN ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι οστικών μεταστάσεων στους ασθενείς με ΚΠ. Ωστόσο, σε πρόσφατες μελέτες με παρόμοιο, μεταξύ τους, προφίλ ασθενών (ασθενείς ΜΜΚΠ πρώιμων σταδίων), η μέση τιμή OPN ορού που καταγράφηκε στη μια μελέτη ήταν 87,6 ng/ml <sup>[155]</sup> και 32,9 ng/ml στην άλλη <sup>[132]</sup>. Οι όποιες διαφορές στις τιμές των επιπέδων OPN ορού που καταγράφονται στις διάφορες μελέτες μπορούν πιθανώς να ερμηνευθούν από το διαφορετικό σχεδιασμό τους.

Η συσχέτιση των τιμών της OPN στους ασθενείς μας με ΚΠ με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους έδειξε αρκετά ενδιαφέροντα ευρήματα.



Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τιμές OPN ορού μεταξύ των καπνιστών ασθενών και των πρώην και μη καπνιστών ασθενών. Είναι εδραιωμένη η άποψη ότι το κάπνισμα επάγει τη φλεγμονή και το οξειδωτικό stress και η OPN αποτελεί έναν καλά τεκμηριωμένο δείκτη φλεγμονής, του οποίου μάλιστα τα επίπεδα στον ορό παρουσιάζουν πτωτική πορεία μετά τη διακοπή καπνίσματος <sup>[309]</sup>. Οι μελέτες που προσπάθησαν να προσδιορίσουν τα επίπεδα OPN ορού σε σχέση με την καπνιστική συνήθεια των ασθενών ήταν δύο. Η πρώτη έδειξε ότι οι καπνιστές ασθενείς με MMΚΠ προχωρημένων σταδίων τείνουν να έχουν πιο αυξημένα επίπεδα OPN ορού <sup>[154]</sup>. Με βάση τη δεύτερη, δεν βρέθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα OPN ορού ανάμεσα σε καπνιστές και μη καπνιστές ασθενείς με MMΚΠ που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή <sup>[155]</sup>. Σε δείγματα πλάσματος ασθενών με MMΚΠ, η ομάδα των Chang και συν. βρήκε ότι οι πρώην καπνιστές είχαν υψηλότερα επίπεδα OPN πλάσματος από τους μη και τους νυν καπνιστές <sup>[25]</sup>. Αυτό το εύρημα βέβαια αφορά αποκλειστικά δείγματα σε ασθενείς με νόσο σταδίου IV, ενώ στη δική μας μελέτη δεν έγινε ξεχωριστή ανάλυση ανά στάδιο νόσου.

Επιπλέον, οι ασθενείς μας με κλινικά σημαντική απώλεια βάρους είχαν υψηλότερα επίπεδα OPN ορού σε σχέση με αυτούς χωρίς απώλεια βάρους, αποτέλεσμα που είναι σύμφωνο με άλλες σύγχρονες μελέτες που αφορούν όμως αποκλειστικά ασθενείς με MMΚΠ <sup>[153, 310]</sup>. Σε δείγματα OPN πλάσματος ασθενών με MMΚΠ, τα επίπεδα του δείκτη δεν παρουσίασαν κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των ασθενών που είχαν και εκείνων που δεν είχαν σημαντική απώλεια βάρους <sup>[147]</sup>. Επίσης, στη μελέτη μας βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων OPN ορού με τη βιολογική κατάσταση των ασθενών. Ομοίως, η μελέτη των Mack και συν., που αφορούσε δείγματα πλάσματος ασθενών με προχωρημένο MMΚΠ που έλαβαν συγκεκριμένο ΧΜΘ σχήμα με βάση την πλατίνα, έδειξε

ότι ασθενείς με ECOG-PS >0 έχουν υψηλότερα επίπεδα OPN από εκείνους με ECOG-PS 0 [147].

Στη μελέτη μας, δεν αναδεικνύεται συσχέτιση των επιπέδων της OPN με καμία από τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Αντίστοιχα με τη μελέτη των Isa και συν., δε διαπιστώθηκε διαφοροποίηση στα επίπεδα OPN ορού ανάλογα με τις ηλικιακές ομάδες [154], όπως επίσης και σε άλλη μελέτη όπου μετρήθηκε OPN πλάσματος [147]. Σχετικά με το φύλο των ασθενών, πρόσφατη μελέτη που συμπεριέλαβε 244 ασθενείς πρώιμων σταδίων που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή κατέληξε ότι οι άντρες ασθενείς με ΜΜΚΠ είχαν υψηλότερα επίπεδα OPN ορού σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς [155]. Η μελέτη αυτή, ωστόσο έρχεται σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες μελέτες που δε βρήκαν διαφορά στα επίπεδα κυκλοφορούσης OPN ανάμεσα στα δύο φύλα [147, 154], όπως και με τη δική μας.

Η προσπάθεια συσχέτισης των τιμών της OPN ορού με τον ιστολογικό τύπο αποτέλεσε αντικείμενο κάποιων ερευνών. Έτσι, οι Takenaka και συν. βρήκαν ότι οι ασθενείς με πλακώδες ΜΜΚΠ είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα OPN ορού σε σχέση με ασθενείς με αδενικού τύπου ΜΜΚΠ [155]. αντίθετα, άλλη μελέτη δε διαπίστωσε συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα OPN ορού και τους επιμέρους ιστολογικούς τύπους [154], όπως και η μελέτη των Rud και συν. που βρήκε διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα OPN στους ασθενείς με μεγαλοκυτταρικό και πλακώδες ΜΜΚΠ σε σχέση με ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα, χωρίς ωστόσο να φτάσει στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας [132]. Αντίστοιχα και στη δική μας μελέτη δε βρέθηκε ανάλογη συσχέτιση. Παρόλα αυτά, όσες μελέτες συμπεριέλαβαν δείγματα πλάσματος συμφωνούν ότι υπάρχουν συγκρίσιμα μεταξύ τους επίπεδα OPN ανάμεσα σε αδενικού τύπου και πλακώδους τύπου ΜΜΚΠ [25, 143, 144, 147].

Σε αρκετές μελέτες που αφορούν δείγματα πλάσματος OPN δεν καταγράφεται διαφοροποίηση των επιπέδων ανάλογα με το στάδιο της νόσου [143, 144, 146-148]. Υπάρχουν

ωστόσο κάποιοι ερευνητές που βρήκαν, σε προγενέστερες κατά βάση μελέτες, ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένων σταδίων (σταδίων ΙΙΙ-ΙV) παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ΟΡΝ πλάσματος έναντι ασθενών πρώιμων σταδίων (σταδίων Ι-ΙΙ) <sup>[25, 142, 150]</sup>. Συγκεκριμένα, ως προς το Τ-στάδιο, οι Ostheimer και συν. έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ και μεγαλύτερους όγκους (δηλαδή πιο προχωρημένο Τ-στάδιο) είχαν υψηλότερα επίπεδα ΟΡΝ πλάσματος <sup>[146]</sup>, σε αντίθεση με προγενέστερη μελέτη, που δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ΟΡΝ ανάλογα με το Τ-στάδιο <sup>[25]</sup>. Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα ΟΡΝ και τη συσχέτισή τους με την ύπαρξη ή όχι διήθησης επιχώριων λεμφαδένων, η προαναφερθείσα μελέτη προέκρινε ότι οι ασθενείς με Ν3 νόσο είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ΟΡΝ πλάσματος σε σχέση με ασθενείς με Ν0-Ν2 νόσο <sup>[25]</sup>, ενώ άλλη μελέτη δε διαπιστώνει διαφορά στα επίπεδα ΟΡΝ πλάσματος ανάλογα με τη διήθηση λεμφαδενικών ομάδων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ <sup>[144]</sup>.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν αναδεικνύεται συσχέτιση των επιπέδων ΟΡΝ σε δείγματα με ΚΠ με το στάδιο της νόσου. Μικρός εξάλλου είναι ο όγκος των μελετών που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο ερώτημα της διαφοροποίησης ή μη των επιπέδων ΟΡΝ ορού σε σχέση με την TNM σταδιοποίηση. Μία είναι η μελέτη που κάνει λόγο για αύξηση των τιμών ΟΡΝ ορού ασθενών ΜΜΚΠ ανάλογα με το μέγεθος του όγκου παθολογοανατομικά, αλλά και στις περιπτώσεις ΜΜΚΠ χαμηλής διαφοροποίησης <sup>[132]</sup>. Άλλη ομάδα αναφέρει αυξημένα επίπεδα ΟΡΝ ορού σε ασθενείς με μετάσταση στα επινεφρίδια τη στιγμή της διάγνωσης <sup>[153]</sup>.

Καθώς η ΟΡΝ είναι πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον οστικό μεταβολισμό, έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες διερεύνησης της μεταστατικής δυναμικής της, ειδικά σε ό,τι αφορά οστικές μεταστάσεις. Ωστόσο, στη δική μας μελέτη δε βρήκαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ΟΡΝ μεταξύ των ασθενών που είχαν και εκείνων που δεν είχαν οστικές μεταστάσεις, χωρίς να γίνει ξεχωριστή ανάλυση ανά στάδιο νόσου. Η μελέτη των Terpos και

συν. διαπίστωσε ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ και οστικές μεταστάσεις κατά τη διάγνωση είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα OPN ορού έναντι των ασθενών με ΜΜΚΠ που παρουσίασαν οστικές μεταστάσεις στην πορεία της νόσου, αλλά και έναντι εκείνων στους οποίους δεν προέκυψαν οστικές μεταστάσεις στη διάρκεια της νόσου <sup>[153]</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα OPN ορού σε ασθενείς ΜΜΚΠ και με ύπαρξη ή όχι οστικών μεταστάσεων ανέδειξε και άλλη σύγχρονη μελέτη <sup>[152]</sup>, όπως και πρόσφατη ερευνητική εργασία, η οποία συμπεριέλαβε ασθενείς, τόσο με ΜΜΚΠ, όσο και με ΜΚΠ <sup>[311]</sup>. Αντίθετα, στη μελέτη των Chang και συν. που αφορά πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, αν και συνολικά οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις είχαν υψηλότερα επίπεδα OPN πλάσματος, εντούτοις όταν έγινε επιμέρους ανάλυση που αφορούσε τους ασθενείς σταδίου IV, δε βρέθηκε διαφορά στις τιμές ανάμεσα σε όσους είχαν και σε όσους δεν είχαν οστικές μεταστάσεις <sup>[25]</sup>. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα.

Ακολούθησε η συσχέτιση του VEGF και της MMP-9 με επιμέρους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες.

Στους ασθενείς με ΚΠ και ECOG-PS 2 αναγνωρίστηκαν υψηλότερα επίπεδα VEGF και MMP-9 έναντι των ασθενών με ECOG-PS 0. Πράγματι, η βιολογική κατάσταση των ασθενών και η συσχέτιση της με τα επίπεδα VEGF στους ασθενείς με ΚΠ έχει καταγραφεί σε κάποιες μελέτες, και μάλιστα διαπιστώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα VEGF ορού στην ομάδα των ασθενών με καλύτερο ECOG-PS, γεγονός σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες <sup>[191, 195]</sup>. Αντίστοιχα, σε μελέτη που αφορούσε χειρουργικά δείγματα ΜΜΚΠ σταδίου IA, τα επίπεδα έκφρασης της MMP-9 συσχετίστηκαν με το ECOG-PS <sup>[288]</sup>.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν τα επίπεδα ορού της MMP-9 σε σχέση με την καπνιστική συνήθεια των ασθενών και βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τιμές των νυν, πρώην και μη καπνιστών. Στη βιβλιογραφία δεν εντοπίστηκε μελέτη στην οποία να τέθηκε αυτό το ερώτημα σε δείγματα ορού ασθενών με ΚΠ, το αποτέλεσμά μας

αυτό όμως φαίνεται λογικό και πιθανά απορρέει από την επαγόμενη από το κάπνισμα αυξημένη έκφραση της MMP-9, μέσω της ενεργοποίησης του NF-kB μονοπατιού σε κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος πνεύμονα <sup>[312]</sup>.

Σε ό,τι αφορά το N στάδιο της νόσου, υπάρχει ταύτιση των αποτελεσμάτων μας με τα αντίστοιχα άλλων συγγραφέων που διαπιστώνουν ότι τα επίπεδα ορού VEGF και MMP-9 είναι υψηλότερα σε ασθενείς με μεταστατική νόσο στο μεσοθωράκιο (N2-N3) σε σχέση με αυτούς με N0-N1 νόσο <sup>[191, 297]</sup>, υποδηλώνοντας ενδεχόμενη εμπλοκή τόσο του VEGF όσο και της MMP-9 στη διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα OPN ορού ανάμεσα στους ασθενείς που παρουσίασαν ανταπόκριση και σε εκείνους που δεν παρουσίασαν ανταπόκριση μετά την 1<sup>η</sup> γραμμής ΧΜΘ. Αναζητώντας τη βιβλιογραφία, δύο είναι μέχρι στιγμής οι μελέτες που διερεύνησαν την προβλεπτική αξία των επιπέδων κυκλοφορούσης OPN. Πρόκειται για δύο φάσης III κλινικές μελέτες, που συμπεριέλαβαν αποκλειστικά πληθυσμό ασθενών προχωρημένων σταδίων ΜΜΚΠ, που έλαβαν συγκεκριμένα ΧΜΘ σχήματα. Η πρώτη από τις δύο που συμπεριέλαβε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών, έδειξε ότι πράγματι οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ είχαν χαμηλότερα επίπεδα OPN πλάσματος προ θεραπείας συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών <sup>[147]</sup>, ενώ η δεύτερη μελέτη που αφορούσε δείγματα ορού ασθενών, δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών <sup>[154]</sup>. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη προβλεπτική αξία των επιπέδων κυκλοφορούσης OPN στις περιπτώσεις ΚΠ.

Αντίστοιχα, οι τιμές VEGF και MMP-9 προ θεραπείας ήταν παρόμοιες στους ανταποκρινόμενους και στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς μετά ΧΜΘ. Ειδικά για τις μετρήσεις VEGF ορού προ και μετά θεραπεία τα αποτελέσματά της βιβλιογραφίας είναι αντιφατικά, καθώς υπάρχουν μελέτες που δείχνουν διαφορά στις τιμές ανάλογα με την

ανταπόκριση στη θεραπεία <sup>[213, 214]</sup>, αλλά και άλλες που δε δείχνουν διαφορά <sup>[207, 208, 219]</sup>. Σε ό,τι αφορά την εκτίμηση των επιπέδων ορού της MMP-9 ως προβλεπτικού δείκτη, τα δεδομένα είναι μάλλον περιορισμένα και επίσης διφορούμενα. Υπάρχει μελέτη που αναφέρει υψηλότερα επίπεδα MMP-9 προ ΧΜΘ σε σχέση με τα μετά ΧΜΘ σε ασθενείς με PR και παρόμοια στους ασθενείς με SD ή PD <sup>[298]</sup>. Άλλη ομάδα ανευρίσκει χαμηλότερα επίπεδα MMP-9 προ θεραπείας στους ασθενείς με PR <sup>[304]</sup>, ενώ σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι αύξηση των επιπέδων MMP-9 στη διάρκεια ΧΜΘ προβλέπει την πρόοδο της νόσου <sup>[303]</sup>. Πάντως, πρόσφατα η ομάδα των Hiura και συν. δεν έδειξε διαφοροποίηση στα επίπεδα MMP-9 ορού ανάμεσα στην ομάδα των ανταποκρινόμενων και των μη ανταποκρινόμενων ασθενών μετά ΧΜΘ σε ασθενείς με προχωρημένο, μη πλακώδη τύπο ΜΜΚΠ <sup>[305]</sup>.

Επιπλέον, οι ασθενείς μας με αυξημένα επίπεδα OPN ορού είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη OS, γεγονός που φαίνεται να συμφωνεί με πρόσφατες μετα-αναλύσεις που συμπεριέλαβαν μελέτες όπου μετρήθηκαν η έκφραση της OPN στον καρκινικό ιστό ή τα επίπεδα κυκλοφορούσης OPN σε ασθενείς με ΜΜΚΠ <sup>[313-315]</sup>. Παρόλα αυτά, στην πολυπαραγοντική ανάλυση μας που συμπεριέλαβε και άλλους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες όπως η ηλικία, η απώλεια βάρους, το ECOG-PS, ο ιστολογικός τύπος και το στάδιο της νόσου, τα επίπεδα OPN ορού δεν αποδείχτηκαν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό ασθενών της μελέτης μας ή σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην OPN και στους προαναφερθέντες παράγοντες.

Οι μελέτες που συμπεριλαμβάνουν δείγματα ορού ασθενών με ΚΠ και διαπραγματεύονται την προγνωστική αξία της OPN, δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα OPN κατά τη διάγνωση προβλέπουν βραχύτερο χρόνο για πρόοδο νόσου <sup>[152-154]</sup>. Παρόμοια, η καλά σχεδιασμένη, μεγάλη μελέτη των Takenaka και συν., που όμως συμπεριέλαβε μόνο ασθενείς πρώιμων σταδίων ΜΜΚΠ, καταλήγει ότι τα χαμηλότερα επίπεδα OPN ορού

σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση <sup>[155]</sup>. Είναι γεγονός ότι τόσο τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης, όσο και η αυξημένη έκφραση της OPN στον καρκινικό ιστό σχετίζονται με πτωχή επιβίωση <sup>[122, 140]</sup>. Σε ό,τι αφορά μελέτες που διερεύνησαν τον προγνωστικό ρόλο των επιπέδων OPN πλάσματος σε ασθενείς με ΚΠ, τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα: η ομάδα των Han και συν. δεν έδειξε κάποια διαφορά στη συνολική επιβίωση ανάλογα με την OPN πλάσματος <sup>[143]</sup>, ενώ η ομάδα των Mack και συν. βρήκε ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της OPN στο πλάσμα, τόσο χειρότερη είναι η επιβίωση των ασθενών <sup>[147]</sup>.

Σε ό,τι αφορά την επιβίωση, οι ασθενείς μας με επίπεδα VEGF ορού χαμηλότερα από τη διάμεση τιμή είχαν καλύτερη επιβίωση. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι συγκεχυμένα σε ό,τι αφορά την προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων επιπέδων VEGF, εντούτοις πρόσφατη μετα-ανάλυση δείχνει ότι υψηλά κυκλοφορούντα επίπεδα VEGF πράγματι προβλέπουν πτωχή OS σε ασθενείς με ΚΠ <sup>[248]</sup>. Η μελέτη μας έδειξε ότι τα επίπεδα MMP-9 ορού δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με την επιβίωση, γεγονός σύμφωνο με τις μελέτες των Zhang και συν. και Shimanuki και συν. που αφορούν δείγματα κυκλοφορούσης MMP-9 <sup>[210, 297]</sup>. Ωστόσο, δεν φαίνεται να ισχύει κάτι τέτοιο σε ό,τι αφορά την έκφραση MMP-9 στο ΜΜΚΠ <sup>[291]</sup>.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, ότι τα επίπεδα OPN ορού συσχετίζονται, σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, τόσο με τα αντίστοιχα επίπεδα του VEGF, όσο και με τα επίπεδα της MMP-9 στον ορό ασθενών με καρκίνο πνεύμονα.

Πολλαπλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, μέσω αλληλεπίδρασης με ποικίλους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση, κινητικότητα και εν τέλει στη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων. Η OPN, είτε ως πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, είτε ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη, αλληλεπιδρά με διάφορους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας και έχει ενεργό ρόλο στην πολύπλοκη διαδικασία της καρκινογένεσης, όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα νωρίτερα. Ο VEGF και η

MMP-9 εμπλέκονται σε αρκετές φάσεις της προόδου του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της διείσδυσης, της μετάστασης και της αγγειογένεσης. Η αυξημένη αγγειογένεση είναι κομβικό σημείο στη διαδικασία του κακοήθους μετασχηματισμού, επιτρέποντας την ανάπτυξη του όγκου και διευκολύνοντας την είσοδο των κακοήθων κυττάρων στην κυκλοφορία.

Η πρώτη προσπάθεια συσχέτισης της OPN με τον VEGF σε ασθενείς με ΚΠ έγινε το 1999 από την ομάδα του Shijubo και συν. Στη μελέτη αυτή, με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (IHC), βρέθηκε ότι η OPN συνεκφράζεται με τον VEGF στην επαγωγή της αγγειογένεσης σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονος σταδίου I, όχι όμως σε ασθενείς με πλακώδες ΜΜΚΠ <sup>[134]</sup>. Σε *in vitro* μελέτη που αφορούσε ενδοθηλιακά κύτταρα, φάνηκε ότι η διαδικασία της αγγειογένεσης μέσω του VEGF επάγεται περαιτέρω με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση της OPN <sup>[79]</sup>. Άλλοι ερευνητές σε πειραματικό μοντέλο με κυτταρική σειρά ΚΠ επίμυος, διαπίστωσαν ότι η εξουδετέρωση της OPN μείωσε σημαντικά την πιθανότητα σχηματισμού κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής, με τα επίπεδα του VEGF στην κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή να εμφανίζονται μειωμένα. Πιθανά η OPN εμπλέκεται σ' αυτή τη διαδικασία μέσω προώθησης της έκκρισης VEGF από αγγειακά ενδοθηλιακά ή μεσοθηλιακά κύτταρα <sup>[109]</sup>. Η ομάδα των Blasberg και συν. προσπάθησε να διευκρινίσει αν και κατά πόσο κάθε ισομορφή της OPN παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες στην αγγειογένεση σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ΚΠ. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η OPNa ενισχύει την αγγειογένεση ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα, με επακόλουθη αύξηση της έκκρισης VEGF από τα καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, η OPNc έχει αντίθετη δράση και η OPNb φαίνεται ότι ενεργοποιεί μεν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά δεν αυξάνει την έκκριση VEGF από τα καρκινικά κύτταρα <sup>[98]</sup>. Η μελέτη των Ostheimer και συν., δείχνει ότι τα επίπεδα πλάσματος OPN, VEGF και CA IX συσχετίζονται γραμμικά μεταξύ τους σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ που έλαβαν ΑΚΘ ή συνδυασμό ΧΜΘ-ΑΚΘ <sup>[148]</sup>. Πρόσφατα,



η ταυτόχρονη πρωτεϊνική έκφραση OPN και VEGF σε ασθενείς με MMKΠ συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση <sup>[157]</sup>. Εντούτοις, σε μια φάσης III μελέτη ασθενών οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπευτικό συνδυασμό καρβοπλατίνης/ paclitaxel με ή χωρίς tirapazamine, βρέθηκε ότι τα επίπεδα OPN στο πλάσμα, αλλά όχι τα αντίστοιχα του PAI1 ή του VEGF έχουν προβλεπτική αξία, διότι το 40% των ασθενών με χαμηλά επίπεδα OPN έδειξαν ανταπόκριση στη θεραπεία, σε αντίθεση με το 25% των ασθενών με υψηλά επίπεδα OPN <sup>[147]</sup>.

Υπάρχουν διάφορες συνδυαστικές αναλύσεις που αφορούν την OPN και τη MMP-9 και πρόκειται καταρχήν για κάποιες πειραματικές μελέτες. Η ομάδα των Rangaswami και συν. έχει χρησιμοποιήσει *in vitro* και *in vivo* μοντέλα που αφορούν μελάνωμα σε επίμυες και έχει αποδείξει τη συσχέτιση OPN και MMP-9 στην ανάπτυξη του καρκίνου <sup>[68, 316]</sup>. Επιπλέον, σε *in vitro* μελέτη που αφορά ηπατοκυτταρικό καρκίνο φαίνεται ότι η OPNc προάγει την εξωκυττάρια κατάτμηση της OPN από την MMP-9, ώστε να προκύπτει μια διακριτή περιοχή της OPN που σχετίζεται με τη μεταστατική δυναμική αυτού του τύπου καρκίνου <sup>[69]</sup>. Ακόμη, η μελέτη των Ni και συν. σε A549 κυτταρική σειρά ανθρώπινου ΚΠ δείχνει ότι η επαγόμενη από την OPN έκφραση και ενεργοποίηση των MMP-2 και MMP-9 αναστέλλεται με τη χορήγηση μιας ανασυνδυασμένης ενδοστατίνης <sup>[116]</sup>. Σε *in vivo* και *in vitro* μοντέλα ανθρώπινου καρκίνου μαστού, η ενεργοποίηση της OPN αύξησε κατά 5 φορές την έκφραση MMP-9 από μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος <sup>[317]</sup>. Κλινικές μελέτες που αφορούν OPN και MMP-9 δείχνουν ότι τα επίπεδα των ενζύμων στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο προστάτη παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση <sup>[318]</sup> και σε περιπτώσεις ασθενών με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα η OPN μπορεί να ρυθμίσει προς τα πάνω την έκφραση της MMP-9, κάτι που δεν ισχύει σε ασθενείς πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα <sup>[135]</sup>.

Η συσχέτιση μεταξύ VEGF και MMP-9, στα πλαίσια της αγγειογενετικής διεργασίας της καρκινογένεσης, έχει φανεί σε πειραματικές μελέτες που αφορούν καρκίνο παγκρέατος <sup>[319]</sup>, προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών με σχηματισμό ασκίτη <sup>[320]</sup> και πρόσφατα σε A549

κυτταρική σειρά ανθρώπινου ΚΠ <sup>[321]</sup>. Θεωρείται ότι η MMP-9 είναι ένας τύπος αγγειογενετικού παράγοντα που εμπλέκεται στο σηματοδοτικό σύστημα του VEGF-VEGFR <sup>[322]</sup>. Τέλος, η πρωτεϊνική έκφραση τόσο του VEGF, όσο και της MMP-9 <sup>[323]</sup>, αλλά και τα επίπεδά τους στον ορό δρουν συνεργικά στην αγγειογενετική διαδικασία κατά την ανάπτυξη ΜΜΚΠ <sup>[247, 297, 324]</sup>.

Αναζητώντας τα παθοφυσιολογικά μονοπάτια που συνδέουν τα τρία ένζυμα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η OPN και ο VEGF συχνά συνεκφράζονται στη διάρκεια της αγγειογένεσης, τόσο από καρκινικά κύτταρα, όσο και από ενεργοποιημένα μακροφάγα σχετιζόμενα με ισχαιμία και νέκρωση. Η διαδικασία αυτή είναι αμφίδρομη, αφού έχει βρεθεί ότι ο VEGF προάγει την κατάτμηση της OPN από τη θρομβίνη *in vivo* και η κατατμημένη OPN, μέσω αλληλεπιδράσεων με την  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνη, προάγει σε έντονο βαθμό τη μετανάστευση των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων <sup>[325]</sup>. Αυτό φάνηκε να ισχύει και στις περιπτώσεις ΜΜΚΠ, ειδικά για συγκεκριμένες ισομορφές OPN <sup>[98]</sup>. Η ενεργοποίηση της  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης, με τη σειρά της ενεργοποιεί τα μονοπάτια των FAK, PI3K, Akt, ERK και NF-kB σε πειραματικά μοντέλα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος πνεύμονα <sup>[60]</sup>. Ακόμη σε ανάλογη πειραματική μελέτη καρκίνου του μαστού, η OPN προάγει την αγγειογένεση του VEGF μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών Brk/NF-kB/ATF-4 <sup>[77]</sup>.

Είναι γνωστό ότι οι ταχέως αναπτυσσόμενοι όγκοι έχουν συχνά υποξικές περιοχές, γεγονός που ενεργοποιεί την παραγωγή του HIF-1 $\alpha$  και των συνακόλουθων μονοπατιών. Έτσι, σε κύτταρα καρκίνου μαστού αυξάνει η εκφραζόμενη OPN, διαμέσου της HIF-1 $\alpha$  επαγόμενης από τον VEGF αγγειογένεσης <sup>[326]</sup>. Φαίνεται, δε, ότι η MMP-9 είναι σημαντική στη διαδικασία έναρξης της αγγειογένεσης σε κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος ποντικών, απελευθερώνοντας τον απομονωμένο VEGF και καθιστώντας τον βιοδιαθέσιμο στον υποδοχέα του VEGFR2 <sup>[327]</sup>.

Η αυξημένη έκφραση OPN έχει συσχετιστεί με την έκφραση της MMP-9, διαμέσου του μονοπατιού του EGFR, ειδικά σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα <sup>[135]</sup>. Ήδη βέβαια η MMP-9 είχε συσχετιστεί με το μονοπάτι του EGFR σε καλά τεκμηριωμένες προηγηθείσες μελέτες που αφορούσαν χειρουργικά δείγματα πρώιμων σταδίων ΜΜΚΠ <sup>[277]</sup>, αλλά και σε πειραματικές μελέτες που αφορούν κυτταρικές σειρές καρκίνου κεφαλής και τραχήλου <sup>[328]</sup>, καρκίνου μαστού <sup>[329]</sup> και καρκίνου δέρματος σε ποντικούς <sup>[330]</sup>. Η μελέτη των Jin και συν. κατέληξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεϊνικής έκφρασης των VEGF, EGFR και MMP-9 σε περιπτώσεις ΜΜΚΠ <sup>[323]</sup>.

Επιπρόσθετα σε κύτταρα μελανώματος σε επίμυες, η OPN ενεργοποιεί την MMP-9, διαμέσου IKKα/b και MAPK-επαγόμενων μονοπατιών, διαδικασία που εξαρτάται από το NF-kB πρωτεϊνικό σύμπλοκο, στη διάρκεια της αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της καρκινικής διείσδυσης <sup>[68]</sup>. Η ίδια ομάδα, σε άλλη μελέτη, αναφέρει ότι η OPN επάγει την ανάπτυξη μελανώματος και συνακόλουθες πνευμονικές μεταστάσεις, διαμέσου NIK/MEKK1-εξαρτώμενων μονοπατιών ενεργοποίησης της MMP-9 <sup>[316]</sup>. Πρόσφατη *in vitro* μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε A549 κυτταρική σειρά ανθρώπινου ΜΜΚΠ, έδειξε ότι ο VEGFB μπορεί να ενεργοποιεί την MMP-9 διαμέσου του ERK/MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού και αντίστροφα η MMP-9 μπορεί να ενεργοποιεί τον VEGFB διαμέσου του PI3K/Akt σηματοδοτικού μονοπατιού ενισχύοντας τη νεοαγγειογένεση <sup>[321]</sup>. Πιθανότατα, λοιπόν, το NF-kB σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ο κοινός σύνδεσμος ανάμεσα σε OPN, VEGF και MMP-9 στο φαύλο κύκλο της προαγωγής της αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, της καρκινικής διείσδυσης και της αγγειογένεσης.

Η παρούσα μελέτη έχει κάποιους περιορισμούς. Καταρχήν, δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα VEGF και MMP-9 στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Ακόμη, συμπεριλάβαμε σχετικά μικρό αριθμό ασθενών, που ήταν κυρίως προχωρημένων σταδίων, τόσο ΜΜΚΠ, όσο και ΜΚΠ, χωρίς να έχει ακολουθήσει επιμέρους ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι δύο

ευρύτεροι τύποι ΚΠ είναι γνωστό ότι έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά, γεγονός που ενδέχεται να έχει διαφοροποιήσει τα αποτελέσματά μας.

Διαπιστώθηκαν, συνεπώς, αυξημένα επίπεδα OPN στον ορό ασθενών με ΚΠ, προ θεραπείας, έναντι υγιούς πληθυσμού εθελοντών. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα OPN ορού βρέθηκαν σε ασθενείς καπνιστές, με κακή γενική κατάσταση και απώλεια σωματικού βάρους. Ακόμη, ασθενείς με αυξημένα επίπεδα OPN παρουσίασαν χειρότερη επιβίωση. Αναδεικνύεται, επομένως, η πιθανή διαγνωστική και προγνωστική χρησιμότητα του βιοδείκτη στην καθ'ημέρα κλινική πράξη. Η διαπίστωση, δε, θετικής συσχέτισης ανάμεσα σε OPN, VEGF και MMP-9 πιθανώς επιβεβαιώνει τις σύνθετες πτυχές της αγγειογενετικής διαδικασίας στον καρκίνο. Είναι γεγονός, όμως, ότι για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων απαιτούνται περαιτέρω μεγάλες και καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες, προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν η χρήση των συγκεκριμένων βιοδεικτών μπορεί να αποτελέσει ένα ακόμη όπλο στην καταπολέμηση του καρκίνου.

## **Βιβλιογραφία**

- [1] **Ferlay J.; Shin H.R.; Bray F.; Forman D.; Mathers C.; Parkin D.M.** "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008". *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
- [2] **Alberg A.J.; Brock M.V.; Ford J.G.; Samet J.M.; Spivack S.D.** "Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines". *Chest* 2013;143:e1S-29S.
- [3] ["http://surgeongeneral.gov/library/reports/smokeexposure/fullreport.pdf"](http://surgeongeneral.gov/library/reports/smokeexposure/fullreport.pdf).
- [4] **Edge S.B.; Compton C.C.** "The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM". *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-1474.
- [5] **Siegel R.; Naishadham D.; Jemal A.** "Cancer statistics, 2013". *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
- [6] **Wai P.Y.; Kuo P.C.** "Osteopontin: regulation in tumor metastasis". *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:103-118.
- [7] **Brown L.F.; Berse B.; Van de Water L., et al.** "Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces". *Mol Biol Cell* 1992;3:1169-1180.
- [8] **Patarca R.; Saavedra R.A.; Cantor H.** "Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene". *Crit Rev Immunol* 1993;13:225-246.
- [9] **Senger D.R.; Wirth D.F.; Hynes R.O.** "Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins". *Cell* 1979;16:885-893.
- [10] **Oldberg A.; Franzen A.; Heinegard D.** "Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8819-8823.
- [11] **Smith J.H.; Denhardt D.T.** "Molecular cloning of a tumor promoter-inducible mRNA found in JB6 mouse epidermal cells: induction is stable at high, but not at low, cell densities". *J Cell Biochem* 1987;34:13-22.
- [12] **Craig A.M.; Nemir M.; Mukherjee B.B.; Chambers A.F.; Denhardt D.T.** "Identification of the major phosphoprotein secreted by many rodent cell lines as 2ar/osteopontin: enhanced expression in H-ras-transformed 3T3 cells". *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:166-173.
- [13] **Prince C.W.** "Secondary structure predictions for rat osteopontin". *Connect Tissue Res* 1989;21:15-20.
- [14] **Fet V.; Dickinson M.E.; Hogan B.L.** "Localization of the mouse gene for secreted phosphoprotein 1 (Spp-1) (2ar, osteopontin, bone sialoprotein 1, 44-kDa bone phosphoprotein, tumor-secreted phosphoprotein) to chromosome 5, closely linked to Ric (Rickettsia resistance)". *Genomics* 1989;5:375-377.
- [15] **Giacopelli F.; Marciano R.; Pistorio A., et al.** "Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity". *Physiol Genomics* 2004;20:87-96.

- [16] **Fisher L.W.; Torchia D.A.; Fohr B.; Young M.F.; Fedarko N.S.** "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin". *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:460-465.
- [17] **Young M.F.; Kerr J.M.; Termine J.D., et al.** "cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)". *Genomics* 1990;7:491-502.
- [18] **Hijiya N.; Setoguchi M.; Matsuura K.; Higuchi Y.; Akizuki S.; Yamamoto S.** "Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter". *Biochem J* 1994;303 ( Pt 1):255-262.
- [19] **Kiefer M.C.; Bauer D.M.; Barr P.J.** "The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin". *Nucleic Acids Res* 1989;17:3306.
- [20] **Crosby A.H.; Edwards S.J.; Murray J.C.; Dixon M.J.** "Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II". *Genomics* 1995;27:155-160.
- [21] **O'Regan A.; Berman J.S.** "Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation". *Int J Exp Pathol* 2000;81:373-390.
- [22] **Weidle U.H.; Maisel D.; Klostermann S.; Weiss E.H.; Schmitt M.** "Differential splicing generates new transmembrane receptor and extracellular matrix-related targets for antibody-based therapy of cancer". *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8:211-226.
- [23] **Shinohara M.L.; Kim H.J.; Kim J.H.; Garcia V.A.; Cantor H.** "Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7235-7239.
- [24] **Sodek J.; Ganss B.; McKee M.D.** "Osteopontin". *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:279-303.
- [25] **Chang Y.S.; Kim H.J.; Chang J.; Ahn C.M.; Kim S.K.** "Elevated circulating level of osteopontin is associated with advanced disease state of non-small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2007;57:373-380.
- [26] **Chen Y.; Liu H.; Wu W.; Li Y.; Li J.** "Osteopontin genetic variants are associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients and bone metastasis". *J Exp Clin Cancer Res* 2013;32:45.
- [27] **Hao Y.; Liu J.; Wang P., et al.** "OPN Polymorphism Is Related to the Chemotherapy Response and Prognosis in Advanced NSCLC". *Int J Genomics* 2014;2014:846142.
- [28] **Nagata T.; Todescan R.; Goldberg H.A.; Zhang Q.; Sodek J.** "Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation". *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:234-240.
- [29] **O'Regan A.** "The role of osteopontin in lung disease". *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:479-488.
- [30] **Kurzbach D.; Platzer G.; Schwarz T.C.; Henen M.A.; Konrat R.; Hinderberger D.** "Cooperative unfolding of compact conformations of the intrinsically disordered protein osteopontin". *Biochemistry* 2013;52:5167-5175.
- [31] **Rodrigues L.R.; Teixeira J.A.; Schmitt F.L.; Paulsson M.; Lindmark-Mansson H.** "The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1087-1097.

- [32] **Senger D.R.; Perruzzi C.A.** "Cell migration promoted by a potent GRGDS-containing thrombin-cleavage fragment of osteopontin". *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:13-24.
- [33] **Hynes R.O.** "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion". *Cell* 1992;69:11-25.
- [34] **Hu D.D.; Lin E.C.; Kovach N.L.; Hoyer J.R.; Smith J.W.** "A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5". *J Biol Chem* 1995;270:26232-26238.
- [35] **Smith L.L.; Cheung H.K.; Ling L.E., et al.** "Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin". *J Biol Chem* 1996;271:28485-28491.
- [36] **Denda S.; Reichardt L.F.; Muller U.** "Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis". *Mol Biol Cell* 1998;9:1425-1435.
- [37] **Liaw L.; Lindner V.; Schwartz S.M.; Chambers A.F.; Giachelli C.M.** "Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro". *Circ Res* 1995;77:665-672.
- [38] **Das R.; Mahabeleshwar G.H.; Kundu G.C.** "Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells". *J Biol Chem* 2003;278:28593-28606.
- [39] **Takahashi K.; Takahashi F.; Tanabe K.K.; Takahashi H.; Fukuchi Y.** "The carboxyl-terminal fragment of osteopontin suppresses arginine-glycine-aspartic acid-dependent cell adhesion". *Biochem Mol Biol Int* 1998;46:1081-1092.
- [40] **Barry S.T.; Ludbrook S.B.; Murrison E.; Horgan C.M.** "Analysis of the alpha4beta1 integrin-osteopontin interaction". *Exp Cell Res* 2000;258:342-351.
- [41] **Katagiri Y.U.; Sleeman J.; Fujii H., et al.** "CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis". *Cancer Res* 1999;59:219-226.
- [42] **Shinohara M.L.; Jansson M.; Hwang E.S.; Werneck M.B.; Glimcher L.H.; Cantor H.** "T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17101-17106.
- [43] **Suzuki K.; Zhu B.; Rittling S.R., et al.** "Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts". *J Bone Miner Res* 2002;17:1486-1497.
- [44] **Zohar R.; Suzuki N.; Suzuki K., et al.** "Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration". *J Cell Physiol* 2000;184:118-130.
- [45] **Zhu B.; Suzuki K.; Goldberg H.A., et al.** "Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin". *J Cell Physiol* 2004;198:155-167.

- [46] **Hahnel A.; Wichmann H.; Kappler M., et al.** "Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells". *Radiat Oncol* 2010;5:82.
- [47] **O'Regan A.W.; Chupp G.L.; Lowry J.A.; Goetschkes M.; Mulligan N.; Berman J.S.** "Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro". *J Immunol* 1999;162:1024-1031.
- [48] **Ashizawa N.; Graf K.; Do Y.S., et al.** "Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction". *J Clin Invest* 1996;98:2218-2227.
- [49] **Rangaswami H.; Bulbule A.; Kundu G.C.** "Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression". *Trends Cell Biol* 2006;16:79-87.
- [50] **Bellahcene A.; Castronovo V.; Ogbureke K.U.; Fisher L.W.; Fedarko N.S.** "Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer". *Nat Rev Cancer* 2008;8:212-226.
- [51] **Hanahan D.; Weinberg R.A.** "Hallmarks of cancer: the next generation". *Cell* 2011;144:646-674.
- [52] **Lin Y.H.; Yang-Yen H.F.** "The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway". *J Biol Chem* 2001;276:46024-46030.
- [53] **Lee J.L.; Wang M.J.; Sudhir P.R.; Chen G.D.; Chi C.W.; Chen J.Y.** "Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms: OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells". *Cancer Res* 2007;67:2089-2097.
- [54] **Lee J.L.; Wang M.J.; Sudhir P.R.; Chen J.Y.** "CD44 engagement promotes matrix-derived survival through the CD44-SRC-integrin axis in lipid rafts". *Mol Cell Biol* 2008;28:5710-5723.
- [55] **Courter D.; Cao H.; Kwok S., et al.** "The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways". *PLoS One* 2010;5:e9633.
- [56] **Scatena M.; Almeida M.; Chaisson M.L.; Fausto N.; Nicosia R.F.; Giachelli C.M.** "NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival". *J Cell Biol* 1998;141:1083-1093.
- [57] **Fan K.; Dai J.; Wang H., et al.** "Treatment of collagen-induced arthritis with an anti-osteopontin monoclonal antibody through promotion of apoptosis of both murine and human activated T cells". *Arthritis Rheum* 2008;58:2041-2052.
- [58] **Zhao J.; Dong L.; Lu B., et al.** "Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis". *Gastroenterology* 2008;135:956-968.
- [59] **Kim H.J.; Lee H.J.; Jun J.I., et al.** "Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15326-15331.
- [60] **Fong Y.C.; Liu S.C.; Huang C.Y., et al.** "Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway". *Lung Cancer* 2009;64:263-270.



- [61] **Angelucci A.; Festuccia C.; Gravina G.L., et al.** "Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the epidermal growth factor in human prostate cancer cells". *Prostate* 2004;59:157-166.
- [62] **Matusan-Ilijas K.; Damante G.; Fabbro D., et al.** "EGFR expression is linked to osteopontin and Nf-kappaB signaling in clear cell renal cell carcinoma". *Clin Transl Oncol* 2013;15:65-71.
- [63] **Lecrone V.; Li W.; Devoll R.E.; Logothetis C.; Farach-Carson M.C.** "Calcium signals in prostate cancer cells: specific activation by bone-matrix proteins". *Cell Calcium* 2000;27:35-42.
- [64] **Khodavirdi A.C.; Song Z.; Yang S., et al.** "Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer". *Cancer Res* 2006;66:883-888.
- [65] **Teti A.; Farina A.R.; Villanova I., et al.** "Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape change dependent". *Int J Cancer* 1998;77:82-93.
- [66] **Philip S.; Bulbule A.; Kundu G.C.** "Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells". *J Biol Chem* 2001;276:44926-44935.
- [67] **Jain S.; Chakraborty G.; Kundu G.C.** "The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinase C alpha/c-Src/IkappaB kinase alpha/beta-dependent prostate tumor progression and angiogenesis". *Cancer Res* 2006;66:6638-6648.
- [68] **Rangaswami H.; Bulbule A.; Kundu G.C.** "Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation". *J Biol Chem* 2004;279:38921-38935.
- [69] **Takafuji V.; Forgues M.; Unsworth E.; Goldsmith P.; Wang X.W.** "An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma". *Oncogene* 2007;26:6361-6371.
- [70] **Tuck A.B.; Hota C.; Chambers A.F.** "Osteopontin(OPN)-induced increase in human mammary epithelial cell invasiveness is urokinase (uPA)-dependent". *Breast Cancer Res Treat* 2001;70:197-204.
- [71] **Fisher J.L.; Field C.L.; Zhou H.; Harris T.L.; Henderson M.A.; Choong P.F.** "Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases--a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases". *Breast Cancer Res Treat* 2000;61:1-12.
- [72] **Mi Z.; Guo H.; Wai P.Y.; Gao C.; Kuo P.C.** "Integrin-linked kinase regulates osteopontin-dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells". *Carcinogenesis* 2006;27:1134-1145.
- [73] **Tang H.; Wang J.; Bai F., et al.** "Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer". *Biochem Cell Biol* 2007;85:103-110.
- [74] **Shevde L.A.; Das S.; Clark D.W.; Samant R.S.** "Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis". *Curr Mol Med* 2010;10:71-81.

- [75] **Cook A.C.; Tuck A.B.; McCarthy S., et al.** "Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six "hallmarks of cancer" in a model of breast cancer progression". *Mol Carcinog* 2005;43:225-236.
- [76] **Takahashi F.; Akutagawa S.; Fukumoto H., et al.** "Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice". *Int J Cancer* 2002;98:707-712.
- [77] **Chakraborty G.; Jain S.; Kundu G.C.** "Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms". *Cancer Res* 2008;68:152-161.
- [78] **Takano S.; Tsuboi K.; Tomono Y.; Mitsui Y.; Nose T.** "Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression". *Br J Cancer* 2000;82:1967-1973.
- [79] **Dai J.; Peng L.; Fan K., et al.** "Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells". *Oncogene* 2009;28:3412-3422.
- [80] **Kalegasioglu F.; Berger M.R.** "SIBLINGs and SPARC families: their emerging roles in pancreatic cancer". *World J Gastroenterol* 2014;20:14747-14759.
- [81] **Khan S.A.; Lopez-Chua C.A.; Zhang J.; Fisher L.W.; Sorensen E.S.; Denhardt D.T.** "Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors". *J Cell Biochem* 2002;85:728-736.
- [82] **Rice J.; Courter D.L.; Giachelli C.M.; Scatena M.** "Molecular mediators of alphavbeta3-induced endothelial cell survival". *J Vasc Res* 2006;43:422-436.
- [83] **Malyankar U.M.; Scatena M.; Suchland K.L.; Yun T.J.; Clark E.A.; Giachelli C.M.** "Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells". *J Biol Chem* 2000;275:20959-20962.
- [84] **Chong H.C.; Tan C.K.; Huang R.L.; Tan N.S.** "Matricellular proteins: a sticky affair with cancers". *J Oncol* 2012;2012:351089.
- [85] **Crawford H.C.; Matrisian L.M.; Liaw L.** "Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo". *Cancer Res* 1998;58:5206-5215.
- [86] **Takahashi K.; Takahashi F.; Hirama M.; Tanabe K.K.; Fukuchi Y.** "Restoration of CD44S in non-small cell lung cancer cells enhanced their susceptibility to the macrophage cytotoxicity". *Lung Cancer* 2003;41:145-153.
- [87] **Li Y.; Sun B.S.; Pei B., et al.** "Osteopontin-expressing macrophages in non-small cell lung cancer predict survival". *Ann Thorac Surg* 2015;99:1140-1148.
- [88] **Rittling S.R.; Chen Y.; Feng F.; Wu Y.** "Tumor-derived osteopontin is soluble, not matrix associated". *J Biol Chem* 2002;277:9175-9182.
- [89] **Jain A.; Karadag A.; Fohr B.; Fisher L.W.; Fedarko N.S.** "Three SIBLINGs (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) enhance factor H's cofactor activity enabling MCP-like cellular evasion of complement-mediated attack". *J Biol Chem* 2002;277:13700-13708.
- [90] **Denhardt D.T.; Chambers A.F.** "Overcoming obstacles to metastasis--defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells". *J Cell Biochem* 1994;56:48-51.

- [91] **Gao C.; Guo H.; Wei J.; Kuo P.C.** "Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages". *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:120-125.
- [92] **Wai P.Y.; Guo L.; Gao C.; Mi Z.; Guo H.; Kuo P.C.** "Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation". *Surgery* 2006;140:132-140.
- [93] **Tuck A.B.; Hota C.; Wilson S.M.; Chambers A.F.** "Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways". *Oncogene* 2003;22:1198-1205.
- [94] **Fujisaki T.; Tanaka Y.; Fujii K., et al.** "CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins". *Cancer Res* 1999;59:4427-4434.
- [95] **Ding Q.; Stewart J., Jr.; Prince C.W., et al.** "Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin". *Cancer Res* 2002;62:5336-5343.
- [96] **Hayashi C.; Rittling S.; Hayata T., et al.** "Serum osteopontin, an enhancer of tumor metastasis to bone, promotes B16 melanoma cell migration". *J Cell Biochem* 2007;101:979-986.
- [97] **Christensen B.; Kazanek C.C.; Petersen T.E.; Rittling S.R.; Denhardt D.T.; Sorensen E.S.** "Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties". *J Biol Chem* 2007;282:19463-19472.
- [98] **Blasberg J.D.; Goparaju C.M.; Pass H.I.; Donington J.S.** "Lung cancer osteopontin isoforms exhibit angiogenic functional heterogeneity". *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:1587-1593.
- [99] **Goparaju C.M.; Pass H.I.; Blasberg J.D.; Hirsch N.; Donington J.S.** "Functional heterogeneity of osteopontin isoforms in non-small cell lung cancer". *J Thorac Oncol* 2010;5:1516-1523.
- [100] **Zhao B.; Sun T.; Meng F., et al.** "Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer". *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1061-1070.
- [101] **Hartung F.; Weber G.F.** "RNA blood levels of osteopontin splice variants are cancer markers". *Springerplus* 2013;2:110.
- [102] **Wu J.; Pungaliya P.; Kraynov E.; Bates B.** "Identification and quantification of osteopontin splice variants in the plasma of lung cancer patients using immunoaffinity capture and targeted mass spectrometry". *Biomarkers* 2012;17:125-133.
- [103] **Yan W.; Qian C.; Zhao P., et al.** "Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells". *Neuro Oncol* 2010;12:765-775.
- [104] **Tang X.; Li J.; Yu B., et al.** "Osteopontin splice variants differentially exert clinicopathological features and biological functions in gastric cancer". *Int J Biol Sci* 2013;9:55-66.
- [105] **Chae S.; Jun H.O.; Lee E.G., et al.** "Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines". *Int J Oncol* 2009;35:1409-1416.

- [106] **Weber G.F.; Lett G.S.; Haubein N.C.** "Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker". *Oncol Rep* 2011;25:433-441.
- [107] **Cui R.; Takahashi F.; Ohashi R., et al.** "Abrogation of the interaction between osteopontin and alphavbeta3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice". *Lung Cancer* 2007;57:302-310.
- [108] **Kang C.G.; Han H.J.; Lee H.J.; Kim S.H.; Lee E.O.** "Rho-associated kinase signaling is required for osteopontin-induced cell invasion through inactivating cofilin in human non-small cell lung cancer cell lines". *Bioorg Med Chem Lett* 2015;25:1956-1960.
- [109] **Cui R.; Takahashi F.; Ohashi R., et al.** "Osteopontin is involved in the formation of malignant pleural effusion in lung cancer". *Lung Cancer* 2009;63:368-374.
- [110] **Polat B.; Wohlleben G.; Katzer A.; Djuzenova C.S.; Technau A.; Flentje M.** "Influence of osteopontin silencing on survival and migration of lung cancer cells". *Strahlenther Onkol* 2013;189:62-67.
- [111] **Sun B.S.; You J.; Li Y.; Zhang Z.F.; Wang C.L.** "Osteopontin knockdown suppresses non-small cell lung cancer cell invasion and metastasis". *Chin Med J (Engl)* 2013;126:1683-1688.
- [112] **Minai-Tehrani A.; Chang S.H.; Park S.B.; Cho M.H.** "The Oglycosylation mutant osteopontin alters lung cancer cell growth and migration in vitro and in vivo". *Int J Mol Med* 2013;32:1137-1149.
- [113] **Wang X.M.; Li J.; Yan M.X., et al.** "Integrative analyses identify osteopontin, LAMB3 and ITGB1 as critical pro-metastatic genes for lung cancer". *PLoS One* 2013;8:e55714.
- [114] **Lin Y.; McKinnon K.E.; Ha S.W.; Beck G.R., Jr.** "Inorganic phosphate induces cancer cell mediated angiogenesis dependent on forkhead box protein C2 (FOXC2) regulated osteopontin expression". *Mol Carcinog* 2014;54:926-934.
- [115] **Gu T.; Ohashi R.; Cui R., et al.** "Osteopontin is involved in the development of acquired chemo-resistance of cisplatin in small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2009;66:176-183.
- [116] **Ni Q.; Ji H.; Zhao Z.; Fan X.; Xu C.** "Endostar, a modified endostatin inhibits non small cell lung cancer cell in vitro invasion through osteopontin-related mechanism". *Eur J Pharmacol* 2009;614:1-6.
- [117] **Shojaei F.; Scott N.; Kang X., et al.** "Osteopontin induces growth of metastatic tumors in a preclinical model of non-small lung cancer". *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:26.
- [118] **Yan C.H.; Lv M.; Li H., et al.** "Osteopontin is a novel prognostic biomarker in early-stage non-small cell lung cancer after surgical resection". *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:1371-1378.
- [119] **Hu Z.; Xiao T.; Lin D.M., et al.** "[Over-expression of osteopontin in non-small cell lung cancers: its clinical significance]". *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2007;29:591-595.
- [120] **Brown L.F.; Papadopoulos-Sergiou A.; Berse B., et al.** "Osteopontin expression and distribution in human carcinomas". *Am J Pathol* 1994;145:610-623.
- [121] **Chambers A.F.; Wilson S.M.; Kerkvliet N.; O'Malley F.P.; Harris J.F.; Casson A.G.** "Osteopontin expression in lung cancer". *Lung Cancer* 1996;15:311-323.

- [122] **Schneider S.; Yochim J.; Brabender J., et al.** "Osteopontin but not osteonectin messenger RNA expression is a prognostic marker in curatively resected non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 2004;10:1588-1596.
- [123] **Gui S.Y.; Li H.H.; Zuo L.; Zhou Q.; Wu Q.; Wang Y.** "[Protein and mRNA expression of osteopontin in lung cancer and clinical significance thereof]". *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87:3219-3223.
- [124] **Li T.; Zhou J.; Deng Z., et al.** "[Expression of FGF-2 and osteopontin in non-small cell lung cancer]". *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009;34:1114-1119.
- [125] **Zhang X.; Xue S.; Zheng J.; Liu S.** "[Correlation between OPN and P21 in non-small cell lung cancer]". *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2007;10:288-290.
- [126] **Jin Y.; Tong D.Y.; Chen J.N., et al.** "Overexpression of osteopontin, alphavbeta3 and Pim-1 associated with prognostically important clinicopathologic variables in non-small cell lung cancer". *PLoS One* 2012;7:e48575.
- [127] **Jin Y.; Tong D.Y.; Tang L.Y., et al.** "Expressions of Osteopontin (OPN), alphanubeta3 and Pim-1 Associated with Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC)". *Chin J Cancer Res* 2012;24:103-108.
- [128] **Yu T.T.; Han Z.G.; Shan L., et al.** "Expression of osteopontin in non-small cell lung cancer and correlative relation with microvascular density". *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:29-32.
- [129] **Sun B.S.; Li Y.; Zhang Z.F.; You J.; Wang C.L.** "Osteopontin combined with CD44v6, a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer undergoing curative resection". *Ann Thorac Surg* 2013;96:1943-1951.
- [130] **Coppola D.; Szabo M.; Boulware D., et al.** "Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies". *Clin Cancer Res* 2004;10:184-190.
- [131] **Zhang J.; Takahashi K.; Takahashi F., et al.** "Differential osteopontin expression in lung cancer". *Cancer Lett* 2001;171:215-222.
- [132] **Rud A.K.; Boye K.; Oijordsbakken M., et al.** "Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer". *BMC Cancer* 2013;13:540.
- [133] **Guldur M.E.; Kibar Y.; Deniz H.; Bakir K.** "Comparison of osteopontin, beta-catenin and hnRNP B1 expression in lung carcinomas". *Pathol Oncol Res* 2010;16:55-59.
- [134] **Shijubo N.; Uede T.; Kon S., et al.** "Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma". *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1269-1273.
- [135] **Frey A.B.; Wali A.; Pass H.; Lonardo F.** "Osteopontin is linked to p65 and MMP-9 expression in pulmonary adenocarcinoma but not in malignant pleural mesothelioma". *Histopathology* 2007;50:720-726.
- [136] **Stemberger C.; Matusan-Ilijas K.; Avirovic M., et al.** "Osteopontin is associated with decreased apoptosis and alphav integrin expression in lung adenocarcinoma". *Acta Histochem* 2014;116:222-229.
- [137] **Zhang T.; Zhang D.M.; Zhao D., et al.** "The prognostic value of osteopontin expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis". *J Mol Histol* 2014;45:533-540.

- [138] **Yu J.; Pan T.; Li J., et al.** "[Expression and clinicopathologic significance of OPN, CD44v6 and MMP-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung]". *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2006;9:325-328.
- [139] **Zhang T.; Zhang D.M.; Zhao D.; Hou X.M.; Yang T.N.** "Osteopontin expression is associated with platinum-based chemotherapy response and prognosis of patients with advanced non small cell lung cancer". *J BUON* 2014;19:742-748.
- [140] **Boldrini L.; Donati V.; Dell'Omodarme M., et al.** "Prognostic significance of osteopontin expression in early-stage non-small-cell lung cancer". *Br J Cancer* 2005;93:453-457.
- [141] **Donati V.; Boldrini L.; Dell'Omodarme M., et al.** "Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 2005;11:6459-6465.
- [142] **Hu Z.; Lin D.; Yuan J., et al.** "Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 2005;11:4646-4652.
- [143] **Han S.S.; Lee S.J.; Kim W.J., et al.** "Plasma osteopontin is a useful diagnostic biomarker for advanced non-small cell lung cancer". *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2013;75:104-110.
- [144] **Blasberg J.D.; Pass H.I.; Goparaju C.M.; Flores R.M.; Lee S.; Donington J.S.** "Reduction of elevated plasma osteopontin levels with resection of non-small-cell lung cancer". *J Clin Oncol* 2010;28:936-941.
- [145] **Le Q.T.; Chen E.; Salim A., et al.** "An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers". *Clin Cancer Res* 2006;12:1507-1514.
- [146] **Ostheimer C.; Bache M.; Guttler A.; Reese T.; Vordermark D.** "Prognostic information of serial plasma osteopontin measurement in radiotherapy of non-small-cell lung cancer". *BMC Cancer* 2014;14:858.
- [147] **Mack P.C.; Redman M.W.; Chansky K., et al.** "Lower osteopontin plasma levels are associated with superior outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: SWOG Study S0003". *J Clin Oncol* 2008;26:4771-4776.
- [148] **Ostheimer C.; Bache M.; Guttler A.; Kotzsch M.; Vordermark D.** "A pilot study on potential plasma hypoxia markers in the radiotherapy of non-small cell lung cancer : Osteopontin, carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor". *Strahlenther Onkol* 2013;190:276-282.
- [149] **Liang Y.; Li H.; Hou S.C., et al.** "[The expression of galectin-3 and osteopontin in occult metastasis of non-small cell lung cancer]". *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2009;47:1061-1063.
- [150] **Liang Y.; Li H.; Hu B., et al.** "Elevated circulating levels of osteopontin are associated with metastasis in advanced non-small cell lung cancer". *Chin J Cancer Res* 2011;23:64-68.
- [151] **Fedarko N.S.; Jain A.; Karadag A.; Van Eman M.R.; Fisher L.W.** "Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer". *Clin Cancer Res* 2001;7:4060-4066.

- [152] **Karapanagiotou E.M.; Terpos E.; Dilana K.D., et al.** "Serum bone turnover markers may be involved in the metastatic potential of lung cancer patients". *Med Oncol* 2009;27:332-338.
- [153] **Terpos E.; Kiagia M.; Karapanagiotou E.M., et al.** "The clinical significance of serum markers of bone turnover in NSCLC patients: surveillance, management and prognostic implications". *Anticancer Res* 2009;29:1651-1657.
- [154] **Isa S.; Kawaguchi T.; Teramukai S., et al.** "Serum osteopontin levels are highly prognostic for survival in advanced non-small cell lung cancer: results from JMTO LC 0004". *J Thorac Oncol* 2009;4:1104-1110.
- [155] **Takenaka M.; Hanagiri T.; Shinohara S., et al.** "Serum level of osteopontin as a prognostic factor in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer". *Clin Lung Cancer* 2013;14:288-294.
- [156] **Zhang L.; Hou X.; Lu S., et al.** "Predictive significance of bone sialoprotein and osteopontin for bone metastases in resected Chinese non-small-cell lung cancer patients: a large cohort retrospective study". *Lung Cancer* 2010;67:114-119.
- [157] **Lin Q.; Guo L.; Lin G., et al.** "Clinical and prognostic significance of OPN and VEGF expression in patients with non-small-cell lung cancer". *Cancer Epidemiol* 2015;39:539-544.
- [158] **Senger D.R.; Galli S.J.; Dvorak A.M.; Perruzzi C.A.; Harvey V.S.; Dvorak H.F.** "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid". *Science* 1983;219:983-985.
- [159] **Crino L.; Metro G.** "Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer". *Eur Respir Rev* 2014;23:79-91.
- [160] **Hicklin D.J.; Ellis L.M.** "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis". *J Clin Oncol* 2005;23:1011-1027.
- [161] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422>".
- [162] **Bremnes R.M.; 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;51:143-158.
- [163] **Ferrara N.; Gerber H.P.; LeCouter J.** "The biology of VEGF and its receptors". *Nat Med* 2003;9:669-676.
- [164] **Carmeliet P.; Moons L.; Luttun A., et al.** "Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions". *Nat Med* 2001;7:575-583.
- [165] **Karkkainen M.J.; Petrova T.V.** "Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis". *Oncogene* 2000;19:5598-5605.
- [166] **Partanen T.A.; Arola J.; Saaristo A., et al.** "VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues". *FASEB J* 2000;14:2087-2096.
- [167] **Senger D.R.; Van de Water L.; Brown L.F., et al.** "Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology". *Cancer Metastasis Rev* 1993;12:303-324.
- [168] **Bos R.; Zhong H.; Hanrahan C.F., et al.** "Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis". *J Natl Cancer Inst* 2001;93:309-314.

- [169] **Hanahan D.; Folkman J.** "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis". *Cell* 1996;86:353-364.
- [170] **Udagawa T.; Fernandez A.; Achilles E.G.; Folkman J.; D'Amato R.J.** "Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy". *FASEB J* 2002;16:1361-1370.
- [171] **French K.J.; Frazier K.S.** "The Role of VEGF and VEGF Receptors in Carcinogenesis". *J Carcinogene Mutagene* 2011:S2.
- [172] **Ferrara N.; Davis-Smyth T.** "The biology of vascular endothelial growth factor". *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- [173] **Brauchle M.; Funk J.O.; Kind P.; Werner S.** "Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes". *J Biol Chem* 1996;271:21793-21797.
- [174] **Podar K.; Anderson K.C.** "The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications". *Blood* 2005;105:1383-1395.
- [175] **Holash J.; Maisonpierre P.C.; Compton D., et al.** "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF". *Science* 1999;284:1994-1998.
- [176] **Liu S.; Jiang M.; Zhao Q., et al.** "Vascular endothelial growth factor plays a critical role in the formation of the pre-metastatic niche via prostaglandin E<sub>2</sub>". *Oncol Rep* 2014;32:2477-2484.
- [177] **Axelson H.; Fredlund E.; Ovenberger M.; Landberg G.; Pahlman S.** "Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors". *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:554-563.
- [178] **Hasumi Y.; Klosowska-Wardega A.; Furuhashi M.; Ostman A.; Heldin C.H.; Hellberg C.** "Identification of a subset of pericytes that respond to combination therapy targeting PDGF and VEGF signaling". *Int J Cancer* 2007;121:2606-2614.
- [179] **Heldin C.H.; Rubin K.; Pietras K.; Ostman A.** "High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy". *Nat Rev Cancer* 2004;4:806-813.
- [180] **Brown L.F.; Berse B.; Jackman R.W., et al.** "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer". *Hum Pathol* 1995;26:86-91.
- [181] **Brown L.F.; Berse B.; Jackman R.W., et al.** "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract". *Cancer Res* 1993;53:4727-4735.
- [182] **Olson T.A.; Mohanraj D.; Carson L.F.; Ramakrishnan S.** "Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries". *Cancer Res* 1994;54:276-280.
- [183] **Guidi A.J.; Abu-Jawdeh G.; Berse B., et al.** "Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia". *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1237-1245.
- [184] **Mattern J.; Koomagi R.; Volm M.** "Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma". *Br J Cancer* 1996;73:931-934.



- [185] **Ohta Y.; Endo Y.; Tanaka M., et al.** "Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer". *Clin Cancer Res* 1996;2:1411-1416.
- [186] **Gkiozos I.; Tsagouli S.; Charpidou A., et al.** "Levels of vascular endothelial growth factor in serum and pleural fluid are independent predictors of survival in advanced non-small cell lung cancer: results of a prospective study". *Anticancer Res* 2015;35:1129-1137.
- [187] **Rozman A.; Silar M.; Kosnik M.** "Angiogenin and vascular endothelial growth factor expression in lungs of lung cancer patients". *Radiol Oncol* 2012;46:354-359.
- [188] **Rovina N.; Hillas G.; Dima E., et al.** "VEGF and IL-18 in induced sputum of lung cancer patients". *Cytokine* 2011;54:277-281.
- [189] **Dalaveris E.; Kerenidi T.; Katsabeki-Katsafli A., et al.** "VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer". *Lung Cancer* 2009;64:219-225.
- [190] **Matsuyama W.; Hashiguchi T.; Mizoguchi A., et al.** "Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer". *Chest* 2000;118:948-951.
- [191] **Katsabeki-Katsafli A.; Kerenidi T.; Kostikas K., et al.** "Serum vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer". *Lung Cancer* 2008;60:271-276.
- [192] **Akin Kabalak P.; Ciledag A.; Demir N., et al.** "Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and Angiopoietin-2 in patients with lung cancer". *Tuberk Toraks* 2015;63:71-77.
- [193] **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;115:1007-1014.
- [194] **Kaya A.; Ciledag A.; Gulbay B.E., et al.** "The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients". *Respir Med* 2004;98:632-636.
- [195] **Chakra M.; Pujol J.L.; Lamy P.J., et al.** "Circulating serum vascular endothelial growth factor is not a prognostic factor of non-small cell lung cancer". *J Thorac Oncol* 2008;3:1119-1126.
- [196] **Naumnik W.; Nilklinska W.; Ossolinska M.; Chyczewska E.** "Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy". *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:703-709.
- [197] **Song G.; Ouyang G.; Mao Y.; Ming Y.; Bao S.; Hu T.** "Osteopontin promotes gastric cancer metastasis by augmenting cell survival and invasion through Akt-mediated HIF-1alpha up-regulation and MMP9 activation". *J Cell Mol Med* 2009;13:1706-1718.
- [198] **Mall J.W.; Schwenk W.; Philipp A.W., 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;7:99-102.
- [199] **Wojcik E.; Jakubowicz J.; Skotnicki P.; Sas-Korczynska B.; Kulpa J.K.** "IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients". *Anticancer Res* 2010;30:1773-1778.
- [200] **Lin Q.; Xue L.; Tian T., et al.** "Prognostic value of serum IL-17 and VEGF levels in small cell lung cancer". *Int J Biol Markers* 2015;30:e359-363.

- [201] **Saglam D.A.; Ursavas A.; Karadag M.; Yilmaztepe Oral A.; Coskun F.; Gozu R.O.** "[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;56:50-55.
- [202] **Park S.H.; Lee S.S.** "The relationship between serum VEGF concentration and prognosis of lung cancer". *Korean J Intern Med* 2003;18:207-211.
- [203] **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;18:1251-1254.
- [204] **Choi J.H.; Kim H.C.; Lim H.Y., et al.** "Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts". *Lung Cancer* 2001;33:171-179.
- [205] **Brattstrom D.; Bergqvist M.; Larsson A., et al.** "Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients". *Anticancer Res* 1998;18:1123-1127.
- [206] **Trape J.; Buxo J.; de Olaguer J.P.** "Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in advanced non-small cell lung cancer". *Clin Chem* 2003;49:523-525.
- [207] **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;24:576-580.
- [208] **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;24:492-496.
- [209] **Liu S.G.; Yuan S.H.; Wu H.Y.; Liu J.; Huang C.S.** "The Clinical Research of Serum VEGF, TGF-beta1, and Endostatin in Non-small Cell Lung Cancer". *Cell Biochem Biophys* 2015;72:165-169.
- [210] **Shimanuki Y.; Takahashi K.; Cui R., et al.** "Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer". *Lung* 2005;183:29-42.
- [211] **Li J.; Hu Y.M.; Du Y.J., et al.** "Expressions of MUC1 and vascular endothelial growth factor mRNA in blood are biomarkers for predicting efficacy of gefitinib treatment in non-small cell lung cancer". *BMC Cancer* 2014;14:848.
- [212] **Tang X.P.; Li J.; Yu L.C., et al.** "Clinical significance of survivin and VEGF mRNA detection in the cell fraction of the peripheral blood in non-small cell lung cancer patients before and after surgery". *Lung Cancer* 2013;81:273-279.
- [213] **Yoshimoto A.; Kasahara K.; Nishio M., et al.** "Changes in angiogenic growth factor levels after gefitinib treatment in non-small cell lung cancer". *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:233-238.
- [214] **Dudek A.Z.; Mahaseth H.** "Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival". *Cancer Invest* 2005;23:193-200.
- [215] **Lissoni P.; Rovelli F.; Malugani F.; Brivio F.; Fumagalli L.; Gardani G.S.** "Changes in circulating VEGF levels in relation to clinical response during chemotherapy for metastatic cancer". *Int J Biol Markers* 2003;18:152-155.

- [216] **Natale R.B.; Bodkin D.; Govindan R., et al.** "Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a two-part, double-blind, randomized phase ii study". *J Clin Oncol* 2009;27:2523-2529.
- [217] **Hanrahan E.O.; Lin H.Y.; Kim E.S., et al.** "Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer". *J Clin Oncol* 2010;28:193-201.
- [218] **Ludovini V.; Gregorc V.; Pistola L., et al.** "Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2004;46:77-85.
- [219] **Kido Y.** "Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum concentration changes during chemotherapy in patients with lung cancer". *Kurume Med J* 2001;48:43-47.
- [220] **Jantus-Lewintre E.; Sanmartin E.; Sirera R., et al.** "Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC". *Lung Cancer* 2011;74:326-331.
- [221] **Huang C.; Liu D.; Masuya D., et al.** "Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancers". *Br J Cancer* 2005;92:1231-1239.
- [222] **Tanaka F.; Ishikawa S.; Yanagihara K., et al.** "Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer". *Cancer Res* 2002;62:7124-7129.
- [223] **Nakashima T.; Huang C.L.; Liu D., et al.** "Expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C as prognostic factors for non-small cell lung cancer". *Med Sci Monit* 2004;10:BR157-165.
- [224] **Yuan A.; Yu C.J.; Luh K.T.; Kuo S.H.; Lee Y.C.; Yang P.C.** "Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer". *J Clin Oncol* 2002;20:900-910.
- [225] **Yuan A.; Yu C.J.; Shun C.T., et al.** "Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients". *Int J Cancer* 2005;115:545-555.
- [226] **Yuan A.; Yu C.J.; Kuo S.H., et al.** "Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer". *J Clin Oncol* 2001;19:432-441.
- [227] **Ohta Y.; Tanaka Y.; Watanabe G.; Minato H.** "Predicting recurrence following curative surgery in stage I non-small cell lung cancer patients using an angiogenesis-associated factor". *J Exp Clin Cancer Res* 2007;26:301-305.
- [228] **Fontanini G.; Vignati S.; Boldrini L., et al.** "Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma". *Clin Cancer Res* 1997;3:861-865.
- [229] **Giatromanolaki A.; Koukourakis M.I.; Kakolyris S., et al.** "Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 1998;4:3017-3024.
- [230] **O'Byrne K.J.; Koukourakis M.I.; Giatromanolaki A., et al.** "Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer". *Br J Cancer* 2000;82:1427-1432.

- [231] **Kadota K.; Huang C.L.; Liu D., et al.** "The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients". *Eur J Cancer* 2008;44:1057-1067.
- [232] **Han H.; Silverman J.F.; Santucci T.S., et al.** "Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis". *Ann Surg Oncol* 2001;8:72-79.
- [233] **Shibusu T.; Shijubo N.; Abe S.** "Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma". *Clin Cancer Res* 1998;4:1483-1487.
- [234] **Oshika Y.; Nakamura M.; Tokunaga T., et al.** "Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer". *Int J Oncol* 1998;12:541-544.
- [235] **Takahama M.; Tsutsumi M.; Tsujiuchi T., et al.** "Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small-cell lung cancers". *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:176-181.
- [236] **Volm M.; Koomagi R.; Mattern J.** "Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer". *Int J Cancer* 1997;74:64-68.
- [237] **Mattern J.; Koomagi R.; Volm M.** "Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density". *Anticancer Res* 1997;17:2249-2252.
- [238] **Baillie R.; Carlile J.; Pendleton N.; Schor A.M.** "Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer". *J Clin Pathol* 2001;54:116-120.
- [239] **Liao M.; Wang H.; Lin Z.; Feng J.; Zhu D.** "Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2001;33:125-132.
- [240] **Zheng C.L.; Qiu C.; Shen M.X., et al.** "Prognostic impact of elevation of vascular endothelial growth factor family expression in patients with non-small cell lung cancer: an updated meta-analysis". *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:1881-1895.
- [241] **Zhan P.; Wang J.; Lv X.J., et al.** "Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis". *J Thorac Oncol* 2009;4:1094-1103.
- [242] **Delmotte P.; Martin B.; Paesmans M., et al.** "[VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis]". *Rev Mal Respir* 2002;19:577-584.
- [243] **Kondo S.; Asano M.; Matsuo K.; Ohmori I.; Suzuki H.** "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients". *Biochim Biophys Acta* 1994;1221:211-214.
- [244] **Laack E.; Scheffler A.; Burkholder I., et al.** "Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)". *Lung Cancer* 2005;50:51-58.
- [245] **Brattstrom D.; Bergqvist M.; Hesselius P., et al.** "Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients". *Lung Cancer* 2002;37:57-63.

- [246] **Brattstrom D.; Bergqvist M.; Hesselius P.; Larsson A.; Wagenius G.; Brodin O.** "Serum VEGF and bFGF adds prognostic information in patients with normal platelet counts when sampled before, during and after treatment for locally advanced non-small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2004;43:55-62.
- [247] **Laack E.; Kohler A.; Kugler C., et al.** "Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer". *Ann Oncol* 2002;13:1550-1557.
- [248] **Hu P.; Liu W.; Wang L.; Yang M.; Du J.** "High circulating VEGF level predicts poor overall survival in lung cancer". *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:1157-1167.
- [249] **Fu Z.Z.; Sun X.D.; Li P., et al.** "Relationship between serum VEGF level and radiosensitivity of patients with nonsmall cell lung cancer among asians: a meta-analysis". *DNA Cell Biol* 2014;33:426-437.
- [250] **Gross J.; Lapiere C.M.** "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:1014-1022.
- [251] **Baker A.H.; Edwards D.R.; Murphy G.** "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities". *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727.
- [252] **Brew K.; Dinakarpanthian D.; Nagase H.** "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function". *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-283.
- [253] "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4318>".
- [254] **Vandooren J.; Van den Steen P.E.; Opdenakker G.** "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade". *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48:222-272.
- [255] **Van Wart H.E.; Birkedal-Hansen H.** "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family". *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5578-5582.
- [256] **Van den Steen P.E.; Proost P.; Wuyts A.; Van Damme J.; Opdenakker G.** "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact". *Blood* 2000;96:2673-2681.
- [257] **Cauwe B.; Opdenakker G.** "Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases". *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:351-423.
- [258] **Overall C.M.; Lopez-Otin C.** "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era". *Nat Rev Cancer* 2002;2:657-672.
- [259] **Ranuncolo S.M.; Matos E.; Loria D., et al.** "Circulating 92-kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma". *Cancer* 2002;94:1483-1491.
- [260] **Redondo-Munoz J.; Ugarte-Berzal E.; Terol M.J., et al.** "Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain". *Cancer Cell* 2010;17:160-172.
- [261] **Van den Steen P.E.; Dubois B.; Nelissen I.; Rudd P.M.; Dwek R.A.; Opdenakker G.** "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)". *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37:375-536.

- [262] **Stuelten C.H.; DaCosta Byfield S.; Arany P.R.; Karpova T.S.; Stetler-Stevenson W.G.; Roberts A.B.** "Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta". *J Cell Sci* 2005;118:2143-2153.
- [263] **Egeblad M.; Werb Z.** "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression". *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.
- [264] **Masson V.; de la Ballina L.R.; Munaut C., et al.** "Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes". *FASEB J* 2005;19:234-236.
- [265] **Ardi V.C.; Kupriyanova T.A.; Deryugina E.I.; Quigley J.P.** "Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20262-20267.
- [266] **Stetler-Stevenson W.G.** "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention". *J Clin Invest* 1999;103:1237-1241.
- [267] **Kim S.J.; Rabbani Z.N.; Dewhirst M.W., et al.** "Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer". *Lung Cancer* 2005;49:325-335.
- [268] **Melani C.; Sangaletti S.; Barazzetta F.M.; Werb Z.; Colombo M.P.** "Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma". *Cancer Res* 2007;67:11438-11446.
- [269] **Sheu B.C.; Hsu S.M.; Ho H.N.; Lien H.C.; Huang S.C.; Lin R.H.** "A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression". *Cancer Res* 2001;61:237-242.
- [270] **Opdenakker G.; Van den Steen P.E.; Van Damme J.** "Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions". *Trends Immunol* 2001;22:571-579.
- [271] **Biswas M.H.; Du C.; Zhang C.; Straubhaar J.; Languino L.R.; Balaji K.C.** "Protein kinase D1 inhibits cell proliferation through matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 secretion in prostate cancer". *Cancer Res* 2010;70:2095-2104.
- [272] **Uloza V.; Liutkevicius V.; Pangonyte D.; Saferis V.; Lesauskaite V.** "Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in recurrent respiratory papillomas and laryngeal carcinoma: clinical and morphological parallels". *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268:871-878.
- [273] **Trudel D.; Fradet Y.; Meyer F.; Harel F.; Tetu B.** "Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry". *Hum Pathol* 2008;39:731-739.
- [274] **Libra M.; Scalisi A.; Vella N., et al.** "Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review)". *Int J Oncol* 2009;34:897-903.
- [275] **Decock J.; Paridaens R.; Ye S.** "Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer". *Clin Genet* 2008;73:197-211.
- [276] **Sternlicht M.D.; Werb Z.** "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior". *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
- [277] **Cox G.; Jones J.L.; O'Byrne K.J.** "Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 2000;6:2349-2355.

- [278] **Zhao M.; Gao Y.; Wang L., et al.** "Overexpression of integrin-linked kinase promotes lung cancer cell migration and invasion via NF-kappaB-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9". *Int J Med Sci* 2013;10:995-1002.
- [279] **Carpagnano G.E.; Palladino G.P.; Martinelli D.; Lacedonia D.; Orlando S.; Foschino-Barbaro M.P.** "Exhaled matrix metalloproteinase-9 in lung cancer". *Rejuvenation Res* 2012;15:359-365.
- [280] **Vatansever S.; Gelisgen R.; Uzun H.; Yurt S.; Kosar F.** "Potential role of matrix metalloproteinase-2,-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1,-2 in exudative pleural effusions". *Clin Invest Med* 2009;32:E293-300.
- [281] **Fiorelli A.; Rizzo A.; Messina G., et al.** "Correlation between matrix metalloproteinase 9 and 18F-2-fluoro-2-deoxyglucose-positron emission tomography as diagnostic markers of lung cancer". *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:852-860.
- [282] **Beeh K.M.; Beier J.; Ernst M.; Kornmann O.; Buhl R.** "Platinum-based, leukocyte-depleting chemotherapy does not alter induced sputum markers of neutrophilic inflammation in COPD patients with unresectable non-small cell lung cancer". *Respiration* 2003;70:166-171.
- [283] **Leinonen T.; Pirinen R.; Bohm J.; Johansson R.; Ropponen K.; Kosma V.M.** "Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer. Relation to clinicopathological factors, beta-catenin and prognosis". *Lung Cancer* 2006;51:313-321.
- [284] **Grossi F.; Spizzo R.; Bordo D., et al.** "Prognostic stratification of stage IIIA pN2 non-small cell lung cancer by hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data: an Alpe Adria Thoracic Oncology Multidisciplinary Group study (ATOM 014)". *J Thorac Oncol* 2010;5:1354-1360.
- [285] **Hoikkala S.; Paakko P.; Soini Y.; Makitaro R.; Kinnula V.; Turpeenniemi-Hujanen T.** "Tissue MMP-2 and MMP-9 [corrected] are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2--complex or TIMP-1 [corrected] in stage [corrected] I-III lung carcinoma". *Cancer Lett* 2006;236:125-132.
- [286] **Martins S.J.; Takagaki T.Y.; Silva A.G.; Gallo C.P.; Silva F.B.; Capelozzi V.L.** "Prognostic relevance of TTF-1 and MMP-9 expression in advanced lung adenocarcinoma". *Lung Cancer* 2009;64:105-109.
- [287] **Pinto C.A.; Carvalho P.E.; Antonangelo L., et al.** "Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung". *Clin Cancer Res* 2003;9:3098-3104.
- [288] **Shao W.; Wang W.; Xiong X.G., et al.** "Prognostic impact of MMP-2 and MMP-9 expression in pathologic stage IA non-small cell lung cancer". *J Surg Oncol* 2011;104:841-846.
- [289] **Sienel W.; Hellers J.; Morresi-Hauf A., et al.** "Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer". *Int J Cancer* 2003;103:647-651.
- [290] **Zheng S.; Chang Y.; Hodges K.B., et al.** "Expression of KISS1 and MMP-9 in non-small cell lung cancer and their relations to metastasis and survival". *Anticancer Res* 2010;30:713-718.
- [291] **Peng W.J.; Zhang J.Q.; Wang B.X.; Pan H.F.; Lu M.M.; Wang J.** "Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in patients with non-small cell lung cancer". *Clin Chim Acta* 2012;413:1121-1126.

- [292] **Bugdayci G.; Kaplan T.; Sezer S., et al.** "Matrix metalloproteinase-9 in broncho-alveolar lavage fluid of patients with non-small cell lung cancer". *Exp Oncol* 2006;28:169-171.
- [293] **Yang S.F.; Hsieh Y.S.; Lin C.L., et al.** "Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients". *Clin Chim Acta* 2005;354:91-99.
- [294] **Susskind H.; Hymowitz M.H.; Lau Y.H., et al.** "Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:1161-1169.
- [295] **Farias E.; Ranuncolo S.; Cresta C., et al.** "Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients". *Int J Cancer* 2000;89:389-394.
- [296] **Iizasa T.; Fujisawa T.; Suzuki M., et al.** "Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients". *Clin Cancer Res* 1999;5:149-153.
- [297] **Zhang Y.; Wu J.Z.; Zhang J.Y., et al.** "Detection of circulating vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in non-small cell lung cancer using Luminex multiplex technology". *Oncol Lett* 2014;7:499-506.
- [298] **Ertan E.; Soydinc H.; Yazar A.; Ustuner Z.; Tas F.; Yasasever V.** "Matrix metalloproteinase-9 decreased after chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer". *Tumori* 2011;97:286-289.
- [299] **Koc M.; Ediger D.; Budak F., et al.** "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) elevated in serum but not in bronchial lavage fluid in patients with lung cancer". *Tumori* 2006;92:149-154.
- [300] **Hrabec E.; Strek M.; Nowak D.; Hrabec Z.** "Elevated level of circulating matrix metalloproteinase-9 in patients with lung cancer". *Respir Med* 2001;95:1-4.
- [301] **Tamura M.; Oda M.; Matsumoto I., 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;11:928-933.
- [302] **Ylisirnio S.; Hoyhtya M.; Turpeenniemi-Hujanen T.** "Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker". *Anticancer Res* 2000;20:1311-1316.
- [303] **Mihaylova Z.; Ludovini V.; Gregorg V., et al.** "Serum level changes of matrix metalloproteinases 2 and 9, vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor during platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients". *J BUON* 2007;12:105-111.
- [304] **Reckamp K.L.; Gardner B.K.; Figlin R.A., et al.** "Tumor response to combination celecoxib and erlotinib therapy in non-small cell lung cancer is associated with a low baseline matrix metalloproteinase-9 and a decline in serum-soluble E-cadherin". *J Thorac Oncol* 2008;3:117-124.
- [305] **Hiura K.; Shiraishi A.; Suzuki C., et al.** "MMP-9/ANC score as a predictive biomarker for efficacy of bevacizumab plus platinum doublet chemotherapy in patients with advanced or recurrent non-squamous non-small cell lung cancer". *Cancer Biomark* 2015;15:433-440.



- [306] **Craig A.M.; Bowden G.T.; Chambers A.F., et al.** "Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multi-stage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts". *Int J Cancer* 1990;46:133-137.
- [307] **Chambers A.F.; Behrend E.I.; Wilson S.M.; Denhardt D.T.** "Induction of expression of osteopontin (OPN; secreted phosphoprotein) in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells". *Anticancer Res* 1992;12:43-47.
- [308] **Chambers A.F.; Tuck A.B.** "Ras-responsive genes and tumor metastasis". *Crit Rev Oncog* 1993;4:95-114.
- [309] **Bishop E.; Theophilus E.H.; Fearon I.M.** "In vitro and clinical studies examining the expression of osteopontin in cigarette smoke-exposed endothelial cells and cigarette smokers". *BMC Cardiovasc Disord* 2012;12:75.
- [310] **Karadag F.; Gulen S.T.; Karul A.B., et al.** "Osteopontin as a marker of weight loss in lung cancer". *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:690-694.
- [311] **Ayan A.K.; Erdemci B.; Orsal E., et al.** "Is there any correlation between levels of serum osteopontin, CEA, and FDG uptake in lung cancer patients with bone metastasis?". *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2015;35:102-106.
- [312] **Shishodia S.; Aggarwal B.B.** "Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9". *Cancer Res* 2004;64:5004-5012.
- [313] **Liu Y.; Gu X.; Lin Q., et al.** "Prognostic significance of osteopontin in patients with non-small cell lung cancer: results from a meta-analysis". *Int J Clin Exp Med* 2015;8:12765-12773.
- [314] **Wang Y.; Yang J.; Liu H., et al.** "The association between osteopontin and survival in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis of 13 cohorts". *Onco Targets Ther* 2015;8:3513-3521.
- [315] **Zou X.L.; Wang C.; Liu K.E.; Nie W.; Ding Z.Y.** "Prognostic significance of osteopontin expression in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis". *Mol Clin Oncol* 2015;3:633-638.
- [316] **Rangaswami H.; Kundu G.C.** "Osteopontin stimulates melanoma growth and lung metastasis through NIK/MEKK1-dependent MMP-9 activation pathways". *Oncol Rep* 2007;18:909-915.
- [317] **Mi Z.; Bhattacharya S.D.; Kim V.M.; Guo H.; Talbot L.J.; Kuo P.C.** "Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis". *Carcinogenesis* 2011;32:477-487.
- [318] **Castellano G.; Malaponte G.; Mazzarino M.C., et al.** "Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression". *Clin Cancer Res* 2008;14:7470-7480.
- [319] **Bergers G.; Brekken R.; McMahon G., et al.** "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis". *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744.
- [320] **Belotti D.; Paganoni P.; Manenti L., et al.** "Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation". *Cancer Res* 2003;63:5224-5229.

- [321] **Liu G.; Xu S.; Jiao F.; Ren T.; Li Q.** "Vascular endothelial growth factor B coordinates metastasis of non-small cell lung cancer". *Tumour Biol* 2015;36:2185-2191.
- [322] **Hiratsuka S.; Nakamura K.; Iwai S., et al.** "MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis". *Cancer Cell* 2002;2:289-300.
- [323] **Jin Y.; Li J.P.; Tang L.Y., et al.** "Protein expression and significance of VEGF, EGFR and MMP-9 in non-small cell lung carcinomas". *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:1473-1476.
- [324] **Zhang Y.; Yu L.K.; Xia N.** "Evaluation of serum and pleural levels of endostatin and vascular epithelial growth factor in lung cancer patients with pleural effusion". *Asian Pac J Trop Med* 2012;5:239-242.
- [325] **Senger D.R.; Ledbetter S.R.; Claffey K.P.; Papadopoulos-Sergiou A.; Peruzzi C.A.; Detmar M.** "Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin". *Am J Pathol* 1996;149:293-305.
- [326] **Raja R.; Kale S.; Thorat D., et al.** "Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1alpha-mediated VEGF-dependent angiogenesis". *Oncogene* 2013;33:2053-2064.
- [327] **Du R.; Lu K.V.; Petritsch C., et al.** "HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion". *Cancer Cell* 2008;13:206-220.
- [328] **O-Charoenrat P.; Rhys-Evans P.; Modjtahedi H.; Court W.; Box G.; Eccles S.** "Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion". *Int J Cancer* 2000;86:307-317.
- [329] **Reddy K.B.; Krueger J.S.; Kondapaka S.B.; Diglio C.A.** "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells". *Int J Cancer* 1999;82:268-273.
- [330] **Llorens A.; Rodrigo I.; Lopez-Barcons L., et al.** "Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression". *Lab Invest* 1998;78:1131-1142.