



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Στοχαστική μοντελοποίηση της λεμφαγγειογένεσης στον καρκίνο με τη χρήση του Cellular Potts Model

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παναγιωτακοπούλου Μαγδαληνή

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Χαριτίδης

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2012



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Στοχαστική μοντελοποίηση της λεμφαγγειογένεσης στον καρκίνο με τη χρήση του Cellular Potts Model

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παναγιωτακοπούλου Μαγδαληνή

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Χαριτίδης, Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 28η Σεπτεμβρίου 2012.

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

.....

.....

.....

Κωνσταντίνος Χαριτίδης

Δώρος Θεοδώρου

Δημήτρης Κέκος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2012

Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα αναρωτηθεί κανείς βλέποντας το θέμα αυτής της διπλωματικής: «Γιατί ένας χημικός μηχανικός να καταπιαστεί με ένα τόσο εξειδικευμένο βιολογικό θέμα;» Κι όμως, η έρευνα της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας έπαψε προ πολλού να θεωρείται αποκλειστικό «προνόμιο» των βιολόγων και των γιατρών. Η ακριβής περιγραφή και κατανόηση ενός τόσο σύνθετου βιολογικού συστήματος όπως για παράδειγμα ένας καρκινικός όγκος δε μπορεί να γίνει απλά συλλέγοντας και παρατηρώντας τα βιολογικά πειραματικά δεδομένα. Και εδώ έρχεται ο ρόλος του μηχανικού, ο οποίος καλείται να περιγράψει με ακριβή –μαθηματικό- τρόπο τις βιολογικές διεργασίες, να τις ποσοτικοποιήσει, να τις προσωμοιάσει και να τις συστηματοποιήσει. Πολλοί νέοι κλάδοι έχουν προκύψει εκεί που διασταυρώνονται τα ερευνητικά πεδία των βιολόγων/γιατρών και των μηχανικών: η υπολογιστική βιολογία (computational biology), η εμβιο-μηχανική (bio engineering), η νανοβιοτεχνολογία και άλλοι που διαρκώς εμφανίζονται. Βέβαια, πίσω από όλα αυτά τα νέα ονόματα βρίσκονται πάντα οι βασικοί πυλώνες της μηχανικής, στους οποίους φυσικά εντάσσεται και η χημική μηχανική.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Νανοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Χαριτίδη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012. Ευχαριστώ θερμά τον κυριο Χαριτίδη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το θέμα καθώς και για την εμπιστοσύνη του, την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου έδινε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον μεταδιδακτορικό ερευνητή και μαθηματικό κύριο Γιώργο Λώλα για την διαρκή του βοήθεια, την έμπνευση και την αισιοδοξία του, και την (επιστημονική ή ψυχολογική) στήριξή του σε κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε. Ευχαριστώ τον καθηγητή Mark Charlain και την ομάδα του στο τμήμα της Μαθηματικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Dundee, στη Σκωτία, για τη συνεργασία που ξεκινήσαμε με άξονα την κατανόηση της λεμφαγγειογένεσης.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου που στέκονται με αγάπη δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και με βοήθησαν με κάθε τρόπο και σ' αυτό το στάδιο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετάσταση, η εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα όργανα, είναι η βασική αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο. Συχνά τα λεμφαγγεία που εισβάλλουν στον αρχικό όγκο είναι αυτά που μεσολαβούν ώστε να γίνει η μετάσταση, ενώ η παρουσία καρκινικών κυττάρων στους περιφερειακούς του όγκου λεμφαδένες αποτελεί προγνωστικό δείκτη για μεταστάσεις. Έτσι, η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της **λεμφαγγειογένεσης** - δηλαδή της δημιουργίας νέων λεμφαγγείων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του όγκου- και της δημιουργίας νέων όγκων θα προσφέρει πολύτιμη γνώση για τους μηχανισμούς που ελέγχουν τη μεταστατική εξάπλωση του καρκίνου. Μάλιστα, ήδη έχουν προσδιοριστεί μοριακοί στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν για να μπλοκάρουν τη λεμφαγγειογένεση και τη μετάσταση μέσω των λεμφαγγείων.

Η μοριακή ρύθμιση της λεμφαγγειογένεσης γίνεται μέσω μιας σειράς αυξητικών παραγόντων, όπως οι τυροσινικές κινάσες VEGF-C και VEGF-D, οι angiopoetins, οι νευροπιλίνες κ.ο.κ. Ένας άξονας που θεωρείται από τους βασικότερους εκ των πολλών μηχανισμών ρύθμισης της λεμφαγγειογένεσης είναι η σύνδεση του VEGF-C (αυξητικού παράγοντα εκκρινόμενου και φυσιολογικά αλλά και από τον όγκο) με τον υποδοχέα του VEGFR-3, που βρίσκεται στην επιφάνεια των λεμφικών ενδοθηλιακών κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται ένα μοντελο της λεμφαγγειογένεσης με βάση τον άξονα VEGF-C/VEGFR3, βασισμένο στο κυτταρικό μοντέλο του Potts, και το οποίο αναπτύχθηκε με το πρόγραμμα CompuCell3d. Τα μοντέλα που παρουσιάζονται, αν και απλά, αποτελούν τη βάση για την περαιτέρω έρευνα πάνω στη μαθηματική/υπολογιστική μοντελοποίηση της λεμφαγγειογένεσης, που όπως αποδεικνύει η εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα, είναι προς το παρόν ένα «ανέγγιχτο» πεδίο.

Λέξεις κλειδιά: λεμφαγγειογένεση, μετάσταση, αυξητικοί παράγοντες, κυτταρικό μοντέλο Potts

Abstract

Metastasis, the spread of cancer cells to distant organs is the basic cause of death in cancer patients. Often, the lymph veins that invade the primary tumor are those who intervene so that the metastasis is done, and the presence of cancer cells in lymph nodes regional to the tumor is a prognostic marker for metastasis. Consequently, the understanding of the interplay between lymphangiogenesis –which is the creation of lymphatic veins which are associated with tumor growth- and the creation of new tumors will offer precious knowledge for the mechanisms that control the metastatic spread of cancer. Indeed, some molecular targets have already been determined and used as a blockade for lymphangiogenesis and metastasis through lymph veins.

Molecular regulation of lymphangiogenesis is done through a series of growth factors, such as tyrosine kinases VEGF-C and VEGF-D, angiopoetins, neuropilins and so on. An axon which is considered to be the most important among the various mechanisms proposed is binding of VEGF-C to receptor VEGFR-3, which exists on the surface of lymph endothelial cells.

In this diploma theses we present a model of lymphangiogenesis based on the VEGF-C/VEGFR3 axon, using Cellular Potts Model and CompuCell3d interface. The simulations presented are simple but can be the basis of further research on the mathematical/computational modelling of lymphangiogenesis, which, according to current litterature is till now an unexplored field.

Keywords: lymphangiogenesis, metastasis, growth factors, Cellular Potts Model

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Μέρος Α' – Περιγραφή του Βιολογικού προβλήματος	2
A1. Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του λεμφαγγειακού συστήματος.....	3
A2. Λεμφαγγειογένεση.....	8
Μοριακή ρύθμιση της ανάπτυξης του λεμφαγγειακού συστήματος.....	8
Απομόνωση ΛΕΚ.....	10
Μόρια που εμπλέκονται στη φυσιολογική και την παθολογική διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης.....	11
A3. Λεμφαγγειογένεση και καρκίνος.....	23
Λεμφαγγειογένεση και πρόοδος της καρκινικής νόσου.....	28
Λεμφαγγειακές μεταστάσεις έναντι συστηματικών μεταστάσεων σε απομακρυσμένα όργανα.....	36
Σύνοψη.....	38
Βιβλιογραφία Α' Μέρους.....	42
Μέρος Β': Μοντελοποίηση	53
B1. Εισαγωγή.....	54
Υπάρχοντα μοντέλα για τον αυξητικό παράγοντα VEGF.....	55
B2. Κυτταρικό μοντέλο Potts και CompuCell.....	58
B.2.1. Glazier-Graner-Hogeweg (GGH) (Cellular Potts) Model.....	58
B.2.2. CompuCell3d.....	68
B3. Ανάπτυξη του μοντέλου και αποτελέσματα.....	69
Περιορισμοί και βελτιώσεις.....	75
Συμπεράσματα και μελλοντικά βήματα.....	76
Βιβλιογραφία Β' Μέρους.....	79
Παράρτημα: Κώδικας	81

**ΜΕΡΟΣ Α:
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ**

Α.1. ΔΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το λεμφαγγειακό σύστημα περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Gasparo Aselli το 1627 [1]. Για πολύ καιρό, η έρευνα των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στο σχηματισμό και τη λειτουργία των λεμφαγγείων υπολειπόταν σημαντικά, εξαιτίας της απουσίας ειδικών δεικτών και παραγόντων ανάπτυξης για τα λεμφαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (ΛΕΚ). Ωστόσο, η πρόσφατη ανακάλυψη τέτοιων δεικτών, μαζί με μία πληθώρα γενετικών μελετών σε ποντίκια, που αναγνώρισαν μόρια-διαμεσολαβητές του σχηματισμού, διαφοροποίησης και λειτουργίας των λεμφαγγείων, μας βοήθησαν στην καλύτερη κατανόηση του φυσιολογικού και παθοφυσιολογικού ρόλου τους. Συγκεκριμένα, ο ολοένα και πιο αναγνωριζόμενος ρόλος τους στη χρόνια φλεγμονή και μεταστατική καρκινική νόσο έστρεψε τα βλέμματα στο μέχρι τώρα εγκαταλελειμένο πεδίο της λεμφαγγειογένεσης [2].

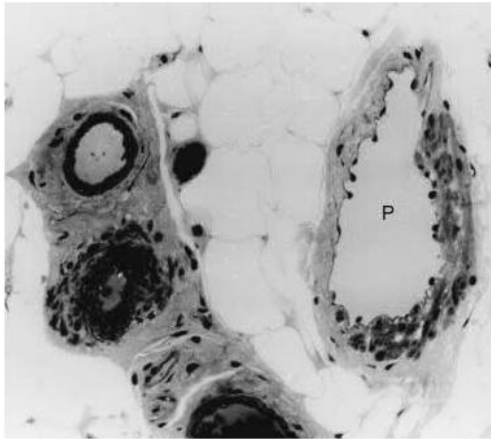
Το λεμφαγγειακό σύστημα είναι συμπληρωματικό του αγγειακού συστήματος, με το να ρυθμίζει την **ομοιόσταση του διαμέσου ιστικού υγρού**, να υποβοηθά τη **μεταφορά των πρωτεϊνών του διαμέσου χώρου** και να συμμετέχει σε διάφορες **ανοσολογικές διαδικασίες**. Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες αγωγών στο λεμφικό σύστημα, που είναι οι εξής:

- τα λεμφικά τριχοειδή (lymphatic capillaries)
- τα αθροιστικά αγγεία (collecting vessels)
- οι λεμφαδένες
- τα λεμφικά στελέχη (lymphatic trunks) και
- οι πόροι.

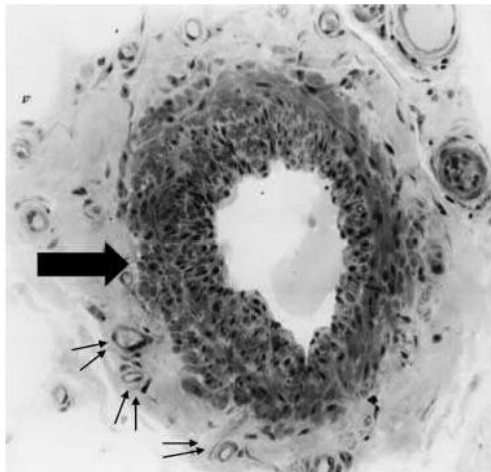
Η διάμετρος αυτών κυμαίνεται απο 10 μm έως 2 mm

Η λέμφος σχηματίζεται όταν διάμεσο υγρό μετακινείται μέσα στα λεμφικά τριχοειδή. Από αυτά φθάνει στα αθροιστικά αγγεία και στη συνέχεια περνά τουλάχιστον από μία και συνηθέστερα από μερικές ομάδες λεμφαδένων. Τα αθροιστικά αγγεία οδηγούν τη λέμφο σε μεγαλύτερα στελέχη κι αυτά με τη σειρά τους στους λεμφικούς πόρους. Τελικά η λέμφος επιστρέφει μέσω των λεμφικών πόρων στη ροή του αίματος. Υγρό και μακρομόρια που εξέρχονται από τα τριχοειδή συλλέγονται από τα λεμφαγγειακά τριχοειδή του διαμέσου χώρου και επιστρέφονται στην συστηματική κυκλοφορία μέσω του δικτύου των μεγαλύτερων λεμφαγγείων. Τα λεμφαγγεία είναι επίσης υπεύθυνα για την **απορρόφηση λίπους από το έντερο** και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση, με το να κατευθύνουν λευκοκύτταρα και αντιγόνα από τους ιστούς στους λεμφαδένες. Παρόλο που το λεμφαγγειακό και αγγειακό σύστημα αποτελούν συμπληρωματικά συστήματα, είναι δομικά και λειτουργικά ξεχωριστές οντότητες [3].

Η **μοριακή υπογραφή** των ΛΕΚ φαίνεται να αντιπροσωπεύει τα μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά τους [4,5,6]. Τα ΛΕΚ φαίνεται να εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό, διαλογή, και διακίνηση πρωτεϊνών [4]. Γονίδια που παρουσίασαν υψηλή έκφραση ήταν αυτά που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν την ειδικότητα με την οποία μαρκάρονται και συντήκονται κυστίδια, όπως μέλη της οικογένειας SNARE, rab GTPases, AAA ATPases, και sec-related πρωτεΐνες [7], γεγονός το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου κυστιδιακής μεταφοράς. Θεωρείται ότι, οι διακυτταρικές σχισμές αποτελούν το βασικότερο μονοπάτι για τη διακίνηση υγρών και πρωτεϊνών εντός των λεμφαγγείων [8]. Ωστόσο, νέα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες αναδεικνύουν την ύπαρξη μοριακών ανιχνευτών (που χορηγήθηκαν στον διάμεσο ιστό) εντός ενδοκυττάρων κυστιδίων των ΛΕΚ [9, 10]. Σε συμφωνία με τις παραπάνω μελέτες, τα αποτελέσματα μελετών γονιδιακού προφίλ, υποδεικνύουν ότι, επιπλέον της διακυτταρικής μεταφοράς, τα διαενδοθηλιακά μονοπάτια αποτελούν ενδεχομένως έναν επιπρόσθετο μηχανισμό εισόδου μορίων στα λεμφαγγεία [5]. Το παραπάνω γεγονός γεννά την υπόθεση ότι τα λεμφαγγεία είναι σε θέση να απομακρύνουν εκλεκτικά 15 μόρια από το διάμεσο ιστό και ως εκ τούτου ελέγχουν ενεργητικά τη σύνθεση της λέμφου και του διαμέσου υγρού [3].

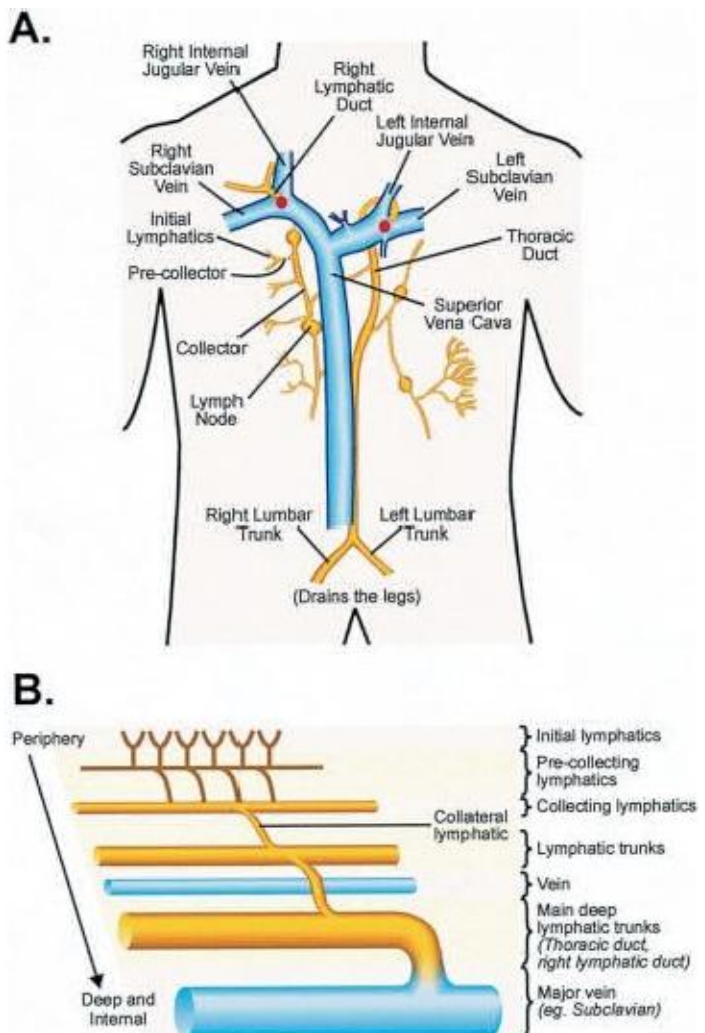


Εικ. 1. Προαθροιστικό λεμφαγγείο ανθρώπινου μοιρού (P δεξιά) και αιμοφόρα αγγεία (αριστερά). Το προαθροιστικό λεμφαγγείο δεν περιβάλλεται από μυικό τοίχωμα στην αριστερή πλευρά, χ200. (από Scavelli C, Weber E, et al., *Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and Lymphangiogenesis*, *J. Anat.* (2004) 204 , pp433–449



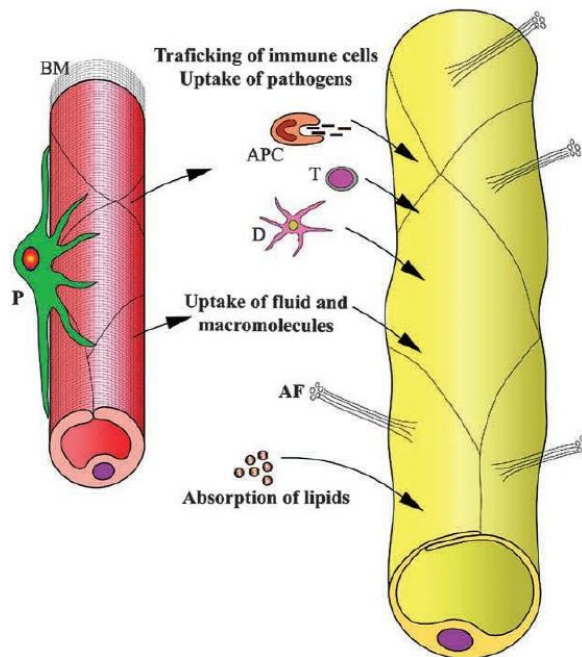
Εικ. 2. Αθροιστικό λεμφαγγείο (τόξο) ανθρώπινου μοιρού περιβαλλόμενο από διάφορα αιμοφόρα αγγεία (διπλά τόξα). Το συνεχές μυικό τοίχωμα μας επιτρέπει να το ξεχωρίσουμε από τα προ-αθροιστικά λεμφαγγεία, χ200. (από Scavelli C, Weber E, et al., *Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and Lymphangiogenesis*, *J. Anat.* (2004) 204 , pp433–449)

Εικ. 3. Α) σχηματική αναπαράσταση του λεμφαγγειακού δικτύου. Β) σχηματική αναπαράσταση των αγγείων του λεμφαγγειακού συστήματος. (από Baldwin M, Stacker S, et al., *Molecular control of Lymphangiogenesis*, *BioEssays* 24: 1030–1040, 2002.)

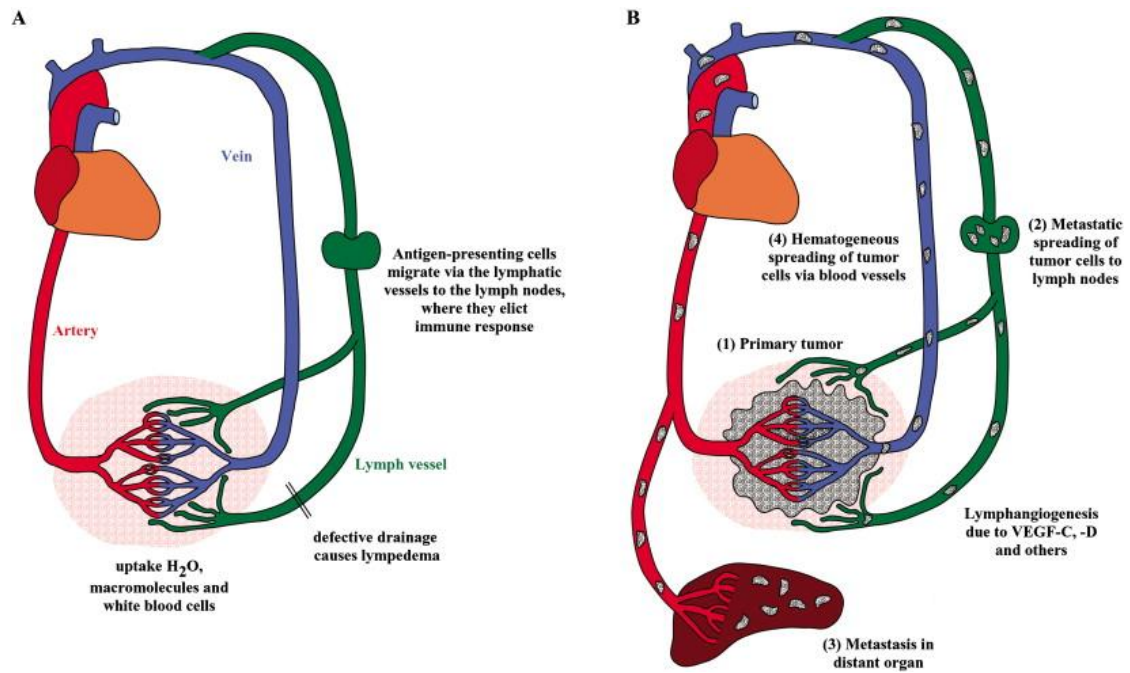


BLOOD CAPILLARY

LYMPHATIC CAPILLARY



Εικ. 4. Χαρακτηριστική δομή και λειτουργία της λεμφαγγειακής μικροκυκλοφορίας. Το λεμφαγγειακό τριχοειδές διακρίνεται από χαρακτηριστική δομή που του επιτρέπει την πρόσληψη υγρών, λιπιδίων, μακρομορίων και κυττάρων από το διάμεσο χώρο. Σε αντίθεση με τα αιμοφόρα τριχοειδή, το λεμφαγγειακό τριχοειδές περιβάλλεται από ατελώς σχηματισμένη βασική μεμβράνη (BM), ενώ δεν περιβάλλεται από περικύτταρα (P). Το λεμφαγγειακό ενδοθήλιο είναι εξαιρετικά αποπλατυσμένο, και τα κύτταρα συνδέονται απευθείας με το κολλαγόνο του διαμέσου χώρου μέσω νηματίων αγκυροβόλησης (AF). T, T cell; D, dendritic cell; APC, antigen presenting cell. (από Pepper M, Skobe, M., *Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties*, *The Journal of Cell Biology*, Volume 163, Number 2, October 27, 2003 209–213)



Εικ. 5. Σε υγιή άτομα, τα λεμφαγγεία παροχετεύουν το εξαγγειωμένο υγρό, τις πρωτεΐνες και κύτταρα στους λεμφαδένες, και δια του θωρακικού πόρου στη φλεβική κυκλοφορία. Κύτταρα ανοσίας όπως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προσλαμβάνουν τα εισερχόμενα στο σώμα αντιγόνα και ταξιδεύουν στους λεμφαδένες, όπου εξελίσσεται η ανοσολογική απόκριση. Λεμφοίδημα αναπτύσσεται όταν η λεμφική αποχέτευση είναι ανεπαρκής, ως αποτέλεσμα πρωτογενούς υποπλασίας, χειρουργικής εξαίρεσης, ακτινοβολίας ή λοίμωξης, όπως η φιλαρίαση κ.λ.π., (από Alitalo K, Carmeliet P, et al., Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease, CANCER CELL : APRIL 2002 · VOL. 1)

A.2. ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ο όρος λεμφαγγειογένεση περιγράφει οποιοδήποτε γεγονός προάγει την ανάπτυξη των λεμφαγγείων, όπως ο **πολλαπλασιασμός** των ΛΕΚ και ο σχηματισμός **σωληνοειδών σχηματισμών** σε πλαστικά μέσα [11], όπως επίσης και τη **διείσδυση** των λεμφαγγείων σε γέλη κολλαγόνου [12].

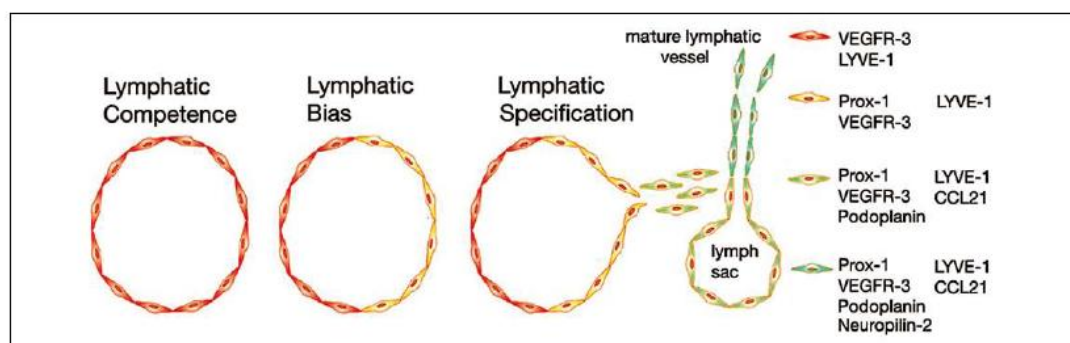
ΜΟΡΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Όσον αφορά στην προέλευση των λεμφαγγείων, η πλέον αποδεκτή θεωρία είναι αυτή του Sabin [13, 14], κατά την οποία, νωρίς στην εμβρυική ανάπτυξη, οι πρωτογενείς λεμφικοί σάκοι σχηματίζονται δι' εκβλαστήσεως από τις εμβρυικές φλέβες. Η υπόθεση αυτή, ότι τα λεμφαγγεία προέρχονται από εμβρυικές φλέβες, και ότι το περιφερικό λεμφαγγειακό σύστημα αναπτύσσεται από πρωτογενείς λεμφικούς σάκους δια της διακλάδωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, φαίνεται να επιβεβαιώνεται μετά από πρόσφατες γενετικές μελέτες του γονιδίου Prox-1 [15]. Σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της εμβρυικής ανάπτυξης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα της κεφαλικής φλέβας εκφράζουν τον υποδοχέα υαλουρονάνης του λεμφαγγειακού ενδοθηλίου, **LYVE-1**, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την ανάπτυξη ευαισθησίας των συγκεκριμένων αυτών κυττάρων σε σήματα που οδηγούν σε λεμφαγγειακή διαφοροποίηση [16].

Μετά από κάποιο ακόμα αδιευκρίνιστο σήμα (μία πρόσφατη μελέτη καταδεικνύει το ρόλο της **ιντερλευκίνης 3** [17]), μερικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της κεφαλικής φλέβας εκφράζουν τον **Prox-1**, γεγονός το οποίο οδηγεί στην εκβλάστηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αρχικά στις σφαγιτιδικές και μεσονεφρικές περιοχές. Ο Prox-1 είναι απαραίτητος για τη λεμφαγγειακή ανάπτυξη, αφού ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί η έκφρασή του, δεν αναπτύσσουν λεμφαγγειακό σύστημα, ενώ αντίθετα το αγγειακό σύστημα δεν επηρεάζεται [15].

Ο **VEGF-C** (Vascular endothelial growth factor-C) φαίνεται να παίζει επίσης

σημαντικό ρόλο κατά την πρώιμη λεμφαγγειακή ανάπτυξη. Ο VEGF-C, που εκφράζεται στο μεσέγχυμα που περιβάλλει τις κεφαλικές φλέβες, ενεργοποιεί τον υποδοχέα VEGF receptor-3 (**VEGFR-3**), ο οποίος εκφράζεται στα πρώιμα εμβρυικά αιμοφόρα αγγεία από τα ΛΕΚ [17]. Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί η έκφραση του VEGF-C, παρουσιάζουν ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία δεσμεύονται προς λεμφαγγειακή διαφοροποίηση, εκβλαστάνουν από τις κεφαλικές φλέβες, αλλά δεν μπορούν να διακλαδιστούν ή να σχηματίσουν λεμφαγγεία [18]. Επίσης, σε VEGF-C knockdown πειράματα έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργική μετανάστευση και εκβλάστηση των πρώιμων λεμφαγγειακών κυττάρων [19]. Γενικά, **η δράση του Prox-1 απαιτείται για τη λεμφαγγειακή διαφοροποίηση** του εμβρυικού φλεβικού ενδοθηλίου, ενώ το σύστημα **VEGF-C/VEGFR-3 παρέχει σήματα απαραίτητα για τη διακλάδωση** των κυττάρων [15, 18]. Επιπρόσθετα μόρια, όπως η γλυκοπρωτεΐνη **ποδοπλανίνη** [20], η **neuropilin-2** [21] και η **angiopoietin-2 (Ang2)** [22] παίζουν σημαντικό ρόλο στην περαιτέρω ωρίμανση του αναπτυσσόμενου λεμφαγγειακού συστήματος. Συμπερασματικά, ο βασικός μηχανισμός για την εμβρυική ανάπτυξη των λεμφαγγείων φαίνεται να είναι η εκβλάστηση από προϋπάρχουσες φλέβες, με μία πιθανή συμβολή μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων.



Εικόνα 6. τρέχον μοντέλο της εμβρυικής ανάπτυξης του λεμφαγγειακού συστήματος. Κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη, όλα τα κύτταρα της κεφαλικής φλέβας εκφράζουν το μόριο LYVE-1 και το VEGFR-3. Μετά από κάποιο ακόμα αδιευκρίνιστο σήμα, μία υποομάδα ενδοθηλιακών κυττάρων εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Prox1, μείζονα ρυθμιστή της λεμφαγγειακής διαφοροποίησης. Αυτά τα Prox-1-positive κύτταρα εκβλαστάνουν και μεταναστεύουν μετά από ερεθισμό από το VEGF-C, για να σχηματίσουν τους πρώιμους λεμφικούς σάκους και στη συνέχεια το ώριμο λεμφαγγειακό δίκτυο. Κατά τη διαδικασία αυτή, ενεργοποιείται η έκφραση επιπρόσθετων δεικτών λεμφαγγειακής διαφοροποίησης. (από Liersch R, Detmar M., Lymphangiogenesis in development and disease, *Thromb Haemost* 2007; 98: 304–310)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΛΕΚ

Στο παρελθον ειχαν γίνει πολλές προσπάθειες απομόνωσης και καλλιέργειας ΛΕΚ από διάφορα είδη [23]. Όλες οι εν λόγω μελέτες περιέγραφαν την απομόνωση ΛΕΚ από μεγάλα λεμφαγγεία και χρησιμοποιούσαν ιδιαίτερα αδρές μηχανικές τεχνικές διαχωρισμού των κυττάρων. Δεδομένου δε ότι τα μεγάλα λεμφαγγεία δέχονται αγγείωση από ένα πλούσιο δίκτυο τροφοφόρων αγγείων, η καθαρότητα των απομονωθέντων κυττάρων τέθηκε σε αμφισβήτηση. Επίσης, δεδομένης της ετερογένειας των πληθυσμών των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μεγάλων λεμφαγγείων είναι μάλλον ακατάλληλα για τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας των λεμφαγγειακών τριχοειδών. Η αναγνώριση δεικτών επιφανείας οι οποίοι αναγνωρίζουν αξιόπιστα το λεμφαγγειακό ενδοθήλιο από αυτό των αιμοφόρων αγγείων [24], οδήγησε στην ανάπτυξη ανώτερων τεχνικών για την απομόνωση ΛΕΚ και ενδοθηλιακών κυττάρων. ΛΕΚ έχουν απονωθεί μέσω θετικής επιλογής, με τη χρήση αντισωμάτων εναντίον της ποδοπλανίνης [25], του VEGFR-3 [26] ή του LYVE-1 [5], και μέσω αρνητικής επιλογής με αντισώματα εναντίον του CD34 [3, 6]. Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι τα ΛΕΚ και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων διατηρούν τους ξεχωριστούς φαινότυπούς τους σε συνθήκες καλλιέργειας. Τα ΛΕΚ ταυτοποιήθηκαν μέσω της εκλεκτικής ευαισθησίας τους στον VEGF-C, όσον αφορά την ανάπτυξη, επιβίωση και μορφογένεσή τους, και τις διαφορετικές απαιτήσεις τους, όσον αφορά στην εξωκυττάρια ουσία, και τη διαφορετική γονιδιακή τους έκφραση. Ωστόσο, η απομόνωση ΛΕΚ με αντίσωμα εναντίον του VEGFR-3 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την επιμόλυνσή τους με ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων, καθώς ο VEGFR-3 εκφράζεται και από τα τελευταία [27]. Τέλος, η απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων υπό διαφορετικές συνθήκες μπορεί να ευθύνεται και για τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στο φαινότυπο των ΛΕΚ. Παραμένει να διευκρινιστεί ποια είναι η ιδανική τεχνική απομόνωσης και διατήρησης των ΛΕΚ [3].

ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Σπουδαίο ρόλο στην κατανόηση της ανάπτυξης των λεμφαγγείων έχει παίξει η ανακάλυψη μίας πλειάδας μοριακών μεσολαβητών. Το μονοπάτι **VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3** φαίνεται να παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των διαδικασιών της εμβρυογένεσης των λεμφαγγείων [28].

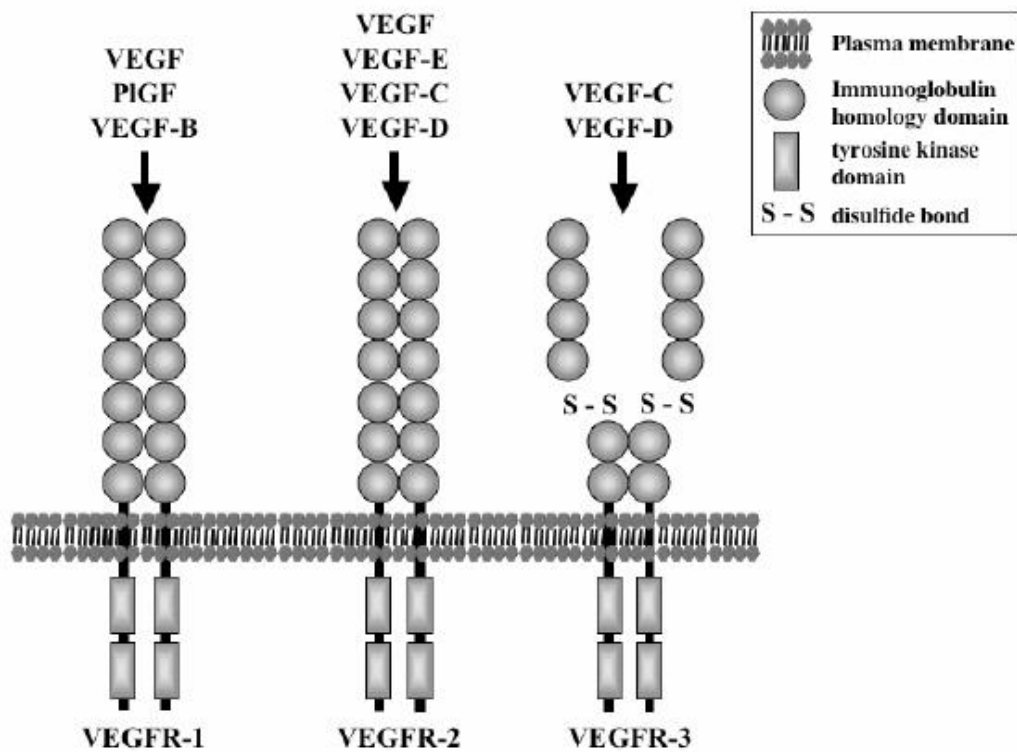
Η οικογένεια των **VEGF** περιλαμβάνει 5 μέλη: τους **VEGF** ή **VEGF-A**, **placenta growth factor (PlGF)**, **VEGF-B**, **VEGF-C**, και **VEGF-D**. Πρόσφατα δυο μη ανθρώπινης προέλευσης growth factors, ο orf virus VEGF ή **VEGF E** και ο snake venom VEGF ή **VEGF-F** προστέθηκαν στην οικογένεια. Οι VEGFs εκκρίνονται ως διμερείς γλυκοπρωτείνες και περιέχουν χαρακτηριστικά, ανά τακτά διαστήματα οκτώ κατάλοιπα κυστείνης. Οι υπομονάδες συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ τους [30].

Το ενδοκυττάριο σήμα των VEGFs διαμεσολαβείται δια των τριών υποδοχέων τους, τυροσινικής κινάσης VEGFR 1, VEGFR-2, και VEGFR-3. Όλοι οι VEGFRs περιέχουν 7 περιοχές ομόλογες της ανοσοσφαιρίνης στο εξωκυττάριο, δεσμευτικό του προσδέματός τους τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Όπως και οι άλλοι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, διμερίζονται και υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση όταν το μόριο ενεργοποίησης προσδεθεί σε αυτούς [30].

VEGF-C και VEGF-D

Ο **VEGF-C**, αναφερόμενος και ως VEGF-related protein (VRP), και ο **VEGF-D**, επίσης αναφερόμενος και ως c-Fos-induced growth factor (FIGF), αποτελούν τους βασικούς λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες [31, 32, 33, 34]. Δεν έχουν αναφερθεί ισομορφές προερχόμενες από εναλλακτικό μάτισμα στον άνθρωπο, ενώ αντίθετα έχουν

αναφερθεί 2 ισομορφές στον ποντικό [35].



Εικ. 7.

Η οικογένεια των VEGFs και οι υποδοχείς τους (από [30])

Οι VEGF-C και VEGF-D παράγονται αρχικά ως **πρόδρομα μόρια**, τα οποία περιέχουν αμινο και καρβοξυτελικά προπεπτίδια εκατέρωθεν της περιοχής ομολογίας των VEGF (τα πρόδρομα μόρια των VEGF-C και VEGF-D ενεργοποιούνται από εκκρινόμενες κονβερτάσες όπως οι **furin, PC5, PC7, plasmin** [31, 32, 36, 37]). Η ενεργοποίηση αυτή λαμβάνει χώρα σε δύο πρωτεολυτικά στάδια [32, 36, 37, 38]. Με τη σταδιακή πρωτεόλυση που υφίστανται τα μόρια VEGF-C και VEGF-D, **αυξάνει η συγγενειά τους για το VEGFR-3**. Επίσης, οι **πλήρως επεξεργασμένες και ώριμες μορφές** (διμερή μόρια συνδεδεμένα με μη σουλφιδρυλικούς δεσμούς [29]) προσδένονται και **ενεργοποιούν και το VEGFR-2** [30].

Επειδή, ο VEGFR-2 εκφράζεται σε πολλούς τύπους ενδοθηλίων και ο VEGF-C εκφράζεται ευρέως, μπορεί να υποθεθεί ότι **η βιοσύνθεση του VEGF-C ως πρόδρομου μορίου εμποδίζει τη μη αναγκαία ενεργοποίηση της αγγειογένεσης** της διαμεσολαβούμενης από το VEGFR-2, και επιτρέπει στο VEGF-C να **ενεργοποιεί τη λεμφαγγειογένεση μέσω του VEGFR-3**, του οποίου η έκφραση εντοπίζεται στο

φλεβικό ενδοθήλιο στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, ενώ περιορίζεται στο λεμφαγγειακό ενδοθήλιο σε μεθύτερα στάδια της αναπτυξιακής διαδικασίας. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η πρωτεολυτική επεξεργασία του VEGF-C θα είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του **ώριμου μορίου**, που μπορεί να **ενεργοποιήσει και το VEGFR-2 και το VEGFR-3**, η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των οποίων απαιτείται για την **πλήρη βιολογική απόκριση στην ενεργοποίηση από το VEGF-C** [32].

Επίσης, αξιοσημείωτο είναι ότι ο προερχόμενος από ποντίκι VEGF-D αποτελεί αποκλειστικό πρόσδεμα του VEGFR-3, ενώ δεν μπορεί να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει το VEGFR-2 [35]. Οι VEGF-C και VEGF-D προσδένονται επίσης και στα μόρια **neuropilin-1 και 2** [39]. Επίσης, αν και τα 2 μόρια, VEGF-C και VEGF-D, μπορούν να επάγουν τον **ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση in vitro** [26, 31, 32, 41], μόνο ο VEGF-C επάγει την **αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας** [32, 38].

Ο VEGF-C εκφράζεται κυρίως στην **καρδιά** και στους **πνεύμονες**, κατά κύριο λόγο από **μεσεγγυματικά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων** [42, 43]. Ο VEGF-C, μαζί με τον VEGFR-3, εκφράζεται επίσης και από **ενεργοποιημένα μακροφάγα** [44]. Ο VEGF-D εκφράζεται στους **πνεύμονες**, στην **καρδιά**, στους **σκελετικούς μυς**, στο **παχύ και στο λεπτό έντερο** [31]. Ο VEGF-C δρα ως λεμφαγγειογενετικός παράγοντας στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη και στο δέρμα διαγονιδιακών ζώων [45, 46]. Επίσης, σε διάφορα είδη όπως τα zebrafish και Xenopus tadpoles, φαίνεται ότι ο VEGF-C είναι απαραίτητος για την αγγειογένεση [19, 50].

Ο VEGF-D έχει αναφερθεί ότι επάγει την **αγγειογένεση** σε ιστούς όπως ο κερατοειδής μυς, αλλά σε άλλα συστήματα όπως το δέρμα ποντικού, ο VEGF-D επάγει **αποκλειστικά και μόνο τη λεμφαγγειογένεση** [34, 48, 51]. Η έκφραση του γονιδίου του VEGF-D επάγεται από το μεταγραφικό παράγοντα **c-fos** [52], και ενδοκυττάρια μονοπάτια που ενεργοποιούνται από **επαφές κυττάρου με κύτταρο**, εξαρτώμενες από την **cadherin 11** [53]. Καθώς, ο c-fos επάγεται από έναν μεγάλο αριθμό όγκων και πολλοί όγκοι χαρακτηρίζονται από υψηλή κυτταρική πυκνότητα, οι παραπάνω μορφές ρύθμισης της έκφρασης του VEGF-D θα μπορούσαν θεωρητικά να παίζουν ρόλο στην επαγωγή της έκφρασής του στα πλαίσια της

καρκινογένεσης. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση του VEGF-D ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα **AP-1** στο ανθρώπινο πλειόμορφο γλοιοβλάστωμα [54].

Στοιχεία υποδεικνύουν ότι η **απόλυτη και σχετική έκφραση των επιπέδων του VEGFR-2 και VEGFR-3** στο ενδοθήλιο μπορεί να επηρεάσει το αν οι VEGF-C και VEGF-D επάγουν αγγειογένεση ή λεμφαγγειογένεση. Επίσης, η επίδραση άλλων θετικών και αρνητικών ρυθμιστών της αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης μπορεί επίσης να τροποποιήσει τα αποτελέσματα της έκφρασης των VEGF-C και VEGF-D. Πρόσφατα στοιχεία δε, υποστηρίζουν ότι **ο VEGF-D δεν παίζει μείζονα ρόλο στη λεμφαγγειακή ανάπτυξη** και ότι ο VEGF-C, ή κάποιος άλλος άγνωστος παράγοντας που ενεργοποιεί τον VEGFR-3, μπορεί να υποκαταστήσει τον VEGF-D κατά τη διάρκεια της λεμφαγγειακής ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, ο **VEGF-D θεωρείται τροποποιητής της επαγόμενης από τον VEGF-C πρώιμης διακλάδωσης και μετανάστευσης των ΛΕΚ** (πειράματα σε αναπτυσσόμενα έμβρυα βατράχων και ποντικών) [55].

	VEGF	PlGF	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D
Gene (GeneAtlas database)	15.9 kb	13.9 kb	3.71 kb	109.2 kb	38.86 kb
Chromosome location	6p12	14q24.3	11q13	4q34	Xp22.31
Protein splice isoforms	VEGF ₁₂₁ , VEGF ₁₄₅ [*] , VEGF ₁₄₈ [*] , VEGF ₁₆₂ [*] , VEGF ₁₆₅ [*] , VEGF ₁₈₃ [*] , VEGF ₁₈₉ [*] , VEGF ₂₀₆ [*]	PlGF-1 (PlGF ₁₃₁), PlGF-2 [*] (PlGF ₁₅₂), PlGF-3 (PlGF ₂₀₃), PlGF-4 [*] (PlGF ₂₇₆)	VEGF-B ₁₆₇ [*] , VEGF-B ₁₈₆	Precursor VEGF-C ₃₈₈ [*]	Precursors VEGF-D ₃₅₈ [*] , VEGF-D ₃₂₆ [*]
Sequence homology		42% sequence identity to VEGF	45% sequence identity to VEGF	30% sequence identity to VEGF	61% sequence identity to VEGF-C; 31% identical to VEGF
Dimerization	Homodimers; heterodimer with VEGF- B and PlGF	Homodimers, heterodimers with VEGF	Homodimers; heterodimers with VEGF	Homodimers; heterodimers with VEGF- D	Homodimers; heterodimers with VEGF- C

Πίνακας 1. Μοριακά χαρακτηριστικά των μελών της οικογένειας του VEGF (από [30])

Ο **VEGFR-3**, γνωστός και ως Flt4 (Fms-like tyrosine kinase 4), είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 195 kDa. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, υφίσταται πρωτεόλυση στην 5^η εξωκυττάρια περιοχή ομολογίας με την ανοσοσφαιρίνη, από όπου προκύπτουν δυο υπομονάδες, μία 120 kDa και μία 75 kDa. Οι δυο αυτές υπομονάδες συνδέονται με **δισουλφιδικό δεσμό** [33, 56]. Έχουν δε απομονωθεί δυο ισομορφές του υποδοχέα που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα.

Η διαφορά εντοπίζεται στο μήκος των κυτταροπλασματικών τους περιοχών και πιθανώς στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται [57]. Η ενεργοποίηση του VEGFR-3 οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση ενδοκυττάρων καταλοίπων τυροσίνης [58]. Τα μόρια **Shc** και **Pyk2** έχουν δειχθεί ότι προσδέονται στον υποδοχέα, γεγονός το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών **ERK** και Jun NH2-terminal kinase (**Jnk**), φωσφορυλίωση της **paxillin** [59], και του μεταγραφικού παράγοντα **NF-kB** [30]. Επίσης, ο VEGFR-3 επάγει την εξαρτώμενη από την **πρωτεϊνική κινάση C** ενεργοποίηση του μονοπατιού **p42/p45 MAPK** και την εξαρτώμενη από την **PI3K** φωσφορυλίωση της **Akt** διαμεσολαβώντας την αύξηση και επιβίωση καλλιεργούμενων ΛΕΚ [26]. Το κατάλοιπο τυροσίνης **Y1068** είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της περιοχής κινάσης του υποδοχέα, ενώ το κατάλοιπο **Y1063** ήταν απαραίτητο για τη σηματοδότηση της κυτταρικής επιβίωσης δια του μονοπατιού **CRK/MKK4/JNK**, ενώ τα κατάλοιπα **Y1230/1231** ενεργοποιούν τα κλασσικά μονοπάτια **PI3K/Akt** και **ERK** με την πρόσδεση του μορίου **GRB2** [60]. Έχει επίσης δειχθεί ότι ο VEGFR-3 μπορεί να **ετεροδιμερίζεται** με τον VEGFR-2, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετική φωσφορυλίωση του υποδοχέα και πιθανή ενεργοποίηση **διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος** σε σύγκριση με τα VEGFR-3 ομοδιμερή [58].

Ο πρώιμος εμβρυϊκός ρόλος του VEGFR-3 σχετίζεται με την **ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος**, καθώς εκφράζεται στο **φλεβικό και λεμφαγγειακό ενδοθήλιο** [2].

Αργότερα, στο ενήλικο άτομο, η έκφραση του VEGFR-3 **περιορίζεται στα ΛΕΚ** [61], όπως επίσης και σε κάποια **ενεργοποιημένα μακροφάγα** και **δενδριτικά κύτταρα** [62, 63]. Η σηματοδότηση δια του VEGFR-3 απαιτείται για το σχηματισμό της λεμφαγγειακής κυκλοφορίας, καθώς η λεμφαγγειογένεση μπορεί να ανασταλεί χρησιμοποιώντας μία διαλυτή μορφή VEGFR-3 [26].

Μόνο συγκεκριμένοι ιστοί διατηρούν την έκφραση του VEGFR-3 στο **φλεβικό ενδοθήλιο** στην ενήλικη ζωή. Τέτοια ενδοθήλια ανευρίσκονται στις φλέβες των αυλάκων του **χόνδρου**, των **σπονδυλικών σωμάτων**, του **μυελού των επινεφριδίων**, και στους **σπληνικούς φλεβώδεις κόλπους**. Διαφορές στην έκφραση του VEGFR-3 παρατηρούνται επίσης μεταξύ συνεχών και ασυνεχών ενδοθηλίων, εκ των οποίων μόνο τα **ασυνεχή ενδοθήλια** είναι θετικά για τον VEGFR-3, υποστηρίζοντας ότι ο υποδοχέας αυτός παίζει ρόλο στις λειτουργίες ενδοθηλιακής μεταφοράς στα θυριδωτά τριχοειδή. Επίσης, έκφραση του VEGFR-3 έχει παρατηρηθεί σε ενδοθήλια, σε μέρη όπου επιτελείται αιμοποίηση, όπως τα **κολποειδή του ήπατος**, του **σπληνός και του μυελού των οστών**, υποστηρίζοντας ότι παίζει ρόλο στη διαενδοθηλιακή μεταφορά αιμοποιητικών κυττάρων. Επίπρόσθετα, μη ενδοθηλιακή έκφραση του VEGFR-3 έχει παρατηρηθεί σε μερικά εμβρυικά **κύτταρα της νωτιαίας χορδής** και στην **τροφοβλάστη** του πλακούντα [36]. Ο VEGFR-3 εκφράζεται επίσης από **αγγεία όγκων** [64]. Τέλος, μη νοηματικές μεταλλάξεις του γονιδίου του VEGFR-3 οδηγούν σε απενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης, η οποία συνδέεται με πρωτοπαθές λεμφοίδημα σε ανθρώπους και ποντίκια [65].

Μία πρόσφατη μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητη η **σηματοδότηση και δια των δυο υποδοχέων**, VEGFR-2 και VEGFR-3, για τη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ΛΕΚ. Όσον αφορά στην οργάνωση των ΛΕΚ σε λειτουργικά λεμφαγγειακά τριχοειδή, απαραίτητη είναι η σηματοδότηση από τουλάχιστον έναν εκ των δύο υποδοχέων [66].

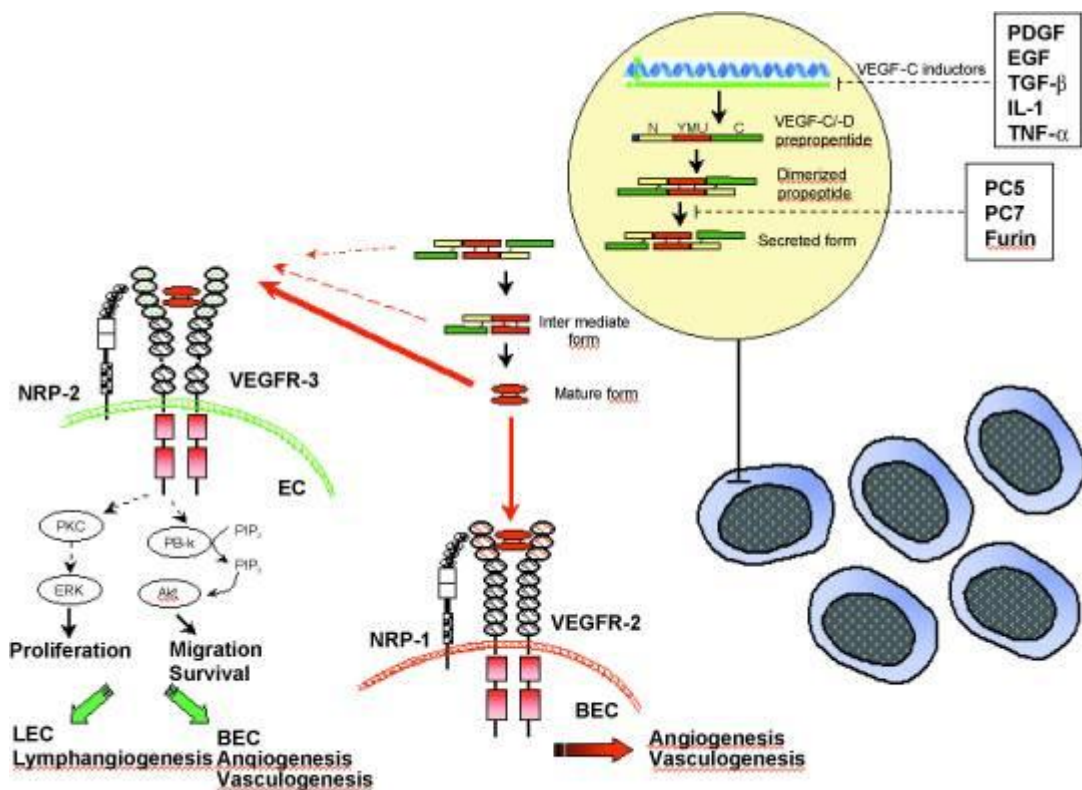
Οι νευροπιλίνες (**NP-1 και NP-2**) αποτελούν ευρέως εκφραζόμενες γλυκοπρωτείνες της κυτταρικής επιφάνειας [67]. Αποτελούν υποδοχείς για τις σεμαφορίνες τρίτης τάξης (Sema3s), οι οποίες είναι εκκρινόμενα μόρια που ενέχονται στην καθοδήγηση των νευραξόνων, όπως επίσης και **συνυποδοχείς** για διάφορα από τα μέλη της οικογένειας των VEGF [68]. Η NP-1 δεσμεύει τα μόρια VEGF165, VEGF-B167, VEGF-B186, PlGF-2, **VEGF-C**, και **VEGF-D**, ενώ ο NP-2 δεσμεύει τα μόρια VEGF165, VEGF145, PlGF-2, **VEGF-C**, και **VEGF-D** [30]. Λόγω της βραχείας κυτταροπλασματικής τους “ουράς”, δε χαρακτηρίζονται πιθανώς από ανεξάρτητη σηματοδοτική λειτουργία. Παρολαυτά, δρουν ως συνυποδοχείς των VEGFR.

Ο **VEGFR-1** αλληλεπιδρά με την **NP-1** και την **NP-2** [68, 69], ενώ ο **VEGFR-2** αλληλεπιδρά με την **NP-1** [70], αλλά όχι με την NP-2 [39]. Ο **VEGFR-3** έχει δειχθεί πως αλληλεπιδρά **και με τις δύο**. Η NP-1 υποστηρίζεται ότι τροποποιεί την αγγειογενετική λειτουργία των VEGF-C και VEGF-D, προσδεμάτων των VEGFR-2 και VEGFR-3 [39].

Και οι δύο νευροπιλίνες εκφράζονται στα **ενδοθηλιακά κύτταρα του λεκιθικού ασκού**, κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του πρώιμου αγγειακού πλέγματος [71]. Αργότερα, η **NP-1** εκφράζεται εκλεκτικά από τα **αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα**, ενώ η **NP-2** εκφράζεται από τα **φλεβικά και λεμφαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα** [21, 71].

Η υπερέκφραση της NP-1 σε διαγονιδιακά ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τον εξεσημασμένο σχηματισμό τριχοειδών, διάταση των αιμοφόρων αγγείων, και εξεσημασμένη αιμορραγία [72]. Ποντίκια στα οποία λείπει η NP-1 πεθαίνουν την E13 με σοβαρές ανωμαλίες του νευρικού συστήματος και διαταραγμένη ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος [73, 74]. Έλλειψη NP-2 είναι συμβατή με τη ζωή, και τα ποντίκια που τη φέρουν παρουσιάζουν μέτριας σοβαρότητας **ανωμαλίες του νευρικού συστήματος**, όπως επίσης και **απουσία των λεμφαγγειακών τριχοειδών**, ενώ τα μεγάλα αγγεία και λεμφαγγεία είναι ακέραια [21, 75, 76]. Διπλό knock-out και για τις δύο νευροπιλίνες οδηγεί σε ανεπάρκεια σχηματισμού του πρωτογενούς

αγγειακού πλέγματος.



Εικ. 8. Επισκόπηση της σηματοδότησης μέσω των VEGFR και NP (από [28]).

Integrins

Οι **ιντεγκρίνες** αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες υποδοχέων κυτταρικής προσκόλλησης και είναι απαραίτητες για την εμβρυική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, επιβίωση, προσκόλληση, διαφοροποίηση και μετανάστευση κυττάρων [77]. Αποτελούν **ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές γλυκοπρωτείνες**, αποτελούμενες από μη ομοιοπολικά συνδεόμενες α και β υπομονάδες. Πολλές διαφορετικές ιντεγκρίνες έχει δειχθεί ότι παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην **επαγόμενη από τον VEGF-A αγγειογένεση** [78, 79, 80].

Η επαγόμενη από τους VEGF-C και VEGF-D μετανάστευση και προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να εξαρτάται από την ιντεγκρίνη **$\alpha 5 \beta 1$** [81]. Τα

συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, κολλαγόνο και φιβρονεκτίνη, είναι σε θέση, δια της πρόσδεσης στη β1 υπομονάδα ιντεγκρινών, να ενεργοποιήσουν τη **φωσφορυλίωση** των καταλοίπων τυροσίνης του **VEGFR-3** και να επάγουν το σχηματισμό του συμπλέγματος **β1 ιντεγκρίνης- VEGFR-3**. Η ιντεγκρίνη **α9** εδείχθη πρόσφατα να εκφράζεται εκλεκτικά από ΛΕΚ και να προσδένεται άμεσα στους **VEGF-C** και **VEGF-D** [29].

Επίσης, η **μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων** φαίνεται να απαιτεί σηματοδότηση από τον ενεργοποιημένο VEGFR-3, όπως επίσης και από την ενεργοποιημένη από την εξωκυττάρια ουσία **β1 ιντεγκρίνη** [82]. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ένα είδος **συνομιλίας** μεταξύ της σηματοδότησης από τον VEGFR-3 και της διαμεσολαβούμενης από τις ιντεγκρίνες προσκόλλησης και μετανάστευσης των ΛΕΚ [82].

Angiopoietins

Η οικογένεια **Tie** (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) περιλαμβάνει τους υποδοχείς **Tie1** και **Tie2**. Η αγγειοποιητίνη-1 (**Ang1**) και ο **Tie2** είναι απαραίτητοι για την **ανάπτυξη του ενδοκαρδίου** όπως επίσης και για την **αναδιαμόρφωση του πρωτογενούς αγγειακού πλέγματος**. Οι αγγειοποιητίνες **προσδένονται στον Tie2**, ενώ η **Ang1 ενεργοποιεί** επιπρόσθετα και τον **Tie1**, αν και δεν κατέστη δυνατή η ανάδειξη της άμεσης πρόσδεσής της στο εξωκυττάριο τμήμα του **Tie1** [83]. Η **Ang2** αποτελεί **ανταγωνιστή** για τον **Tie2**, αν και η δράση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο, διάρκεια της έκθεσης στην **Ang2**, και πιθανώς και στην κυτταρική προέλευση της **Ang2** [84]. Η **Ang3** (από ποντικό) και η **Ang4** (από τον άνθρωπο) θεωρούνται ομόλογα μόρια που δρουν (και τα δύο) ως **αγωνιστές του Tie2** [85]. In vitro και in vivo μελέτες έδειξαν ότι η **ενεργοποίηση του Tie2** απαιτείται για τη διατήρηση **ισχυρών αλληλεπιδράσεων** μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων, περιενδοθηλιακών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας [86, 87]. Αντίθετα, η **Ang2 αποσταθεροποιεί το ενδοθήλιο** [88].

Prox-1

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Prox-1** φαίνεται να απαιτείται για τη δέσμευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στη λεμφαγγειακή σειρά διαφοροποίησης [17, 15]. Η έκφρασή του σε έμβρυα εντοπίζεται σε έναν υποπληθυσμό ενδοθηλιακών κυττάρων στις εμβρυικές φλέβες, τα οποία δεσμεύονται στο λεμφαγγειακό μονοπάτι διαφοροποίησης. Απενεργοποίηση του Prox-1 σε ποντίκια οδηγεί σε **αναστολή της λεμφαγγειακής ανάπτυξης**. Σε ιστούς **ενήλικων** ατόμων, ο Prox-1 εκφράζεται **αποκλειστικά από ΛΕΚ**, ενώ η υπερέκφρασή του σε ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης μεταγράφων ειδικών για αυτά, και υπερέκφραση ειδικών για τα ΛΕΚ μεταγράφων, προσδίδοντας το λεμφαγγειακό φαινότυπο στα κύτταρα αυτά [4, 89].

IGF-1, IGF-2

Το σύστημα των IGF περιλαμβάνει δύο προσδέτες (**IGF-1** και **IGF-2**), δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς (**IGF-1R** και **IGF-2R**), και αρκετές IGF-προσδένουσες πρωτεΐνες (**IGFBPs**). Οι τελευταίες μπορούν να τροποποιούν τη βιολογική δραστηριότητα των IGF [90]. Έχει βρεθεί ότι οι **IGF-1** και **IGF-2** επάγουν τη **λεμφαγγειογένεση** in vivo. Είναι αξιοσημείωτο ότι η επαγόμενη από τον **IGF-1** λεμφαγγειογένεση δεν ήταν σε θέση να ανασταλεί όταν χρησιμοποιήθηκε διαλυτή μορφή του VEGFR-3, ως αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού του, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι **το μονοπάτι του VEGFR-3 δεν είναι απαραίτητο για την επαγωγή της λεμφαγγειογένεσης από τους IGF**. Οι IGF μπορούν να δρουν ως άμεσοι, όπως επίσης και έμμεσοι επαγωγείς της λεμφαγγειογένεσης [91].

PDGF's

Οι Platelet-derived growth factors (PDGF) αποτελούν μία οικογένεια αναπτυξιακών παραγόντων, που υφίστανται ως διμερή μόρια συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα μέλη της οικογένειας είναι: **PDGF-AA, -AB, -BB, -CC**, και **-DD**. και η δράση

τους διαμεσολαβείται μέσω δύο υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, των PDGF α - και β - υποδοχέων. Οι PDGF περιέχουν ανά τακτικά διαστήματα οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία ενέχονται στο σχηματισμό ενδο- και διαμοριακών δεσμών. Ο PDGF-B εκφράζεται κυρίως στο αναπτυσσόμενο αγγειακό σύστημα και κατέχει βασικό ρόλο στην **προσέλκυση περικυττάρων** στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ένα δυνητικό ρόλο για τον **PDGF-BB** στη λεμφαγγειογένεση, καθώς εδείχθη ότι ο PDGF-BB μπορούσε να διεγείρει την ενεργότητα των **MAP** κινασών και την **κινητικότητα** ΛΕΚ. In vivo, ο PDGF-BB μπορούσε να επαγάγει την ανάπτυξη των λεμφαγγείων. Επίσης, η έκφραση του PDGF-BB από κύτταρα ινοσαρκώματος ήταν σε θέση να επαγάγει λεμφαγγειογένεση στον όγκο και να οδηγήσει σε αυξημένο μεταστατικό δυναμικό στους λεμφαδένες [92].

FGF-2

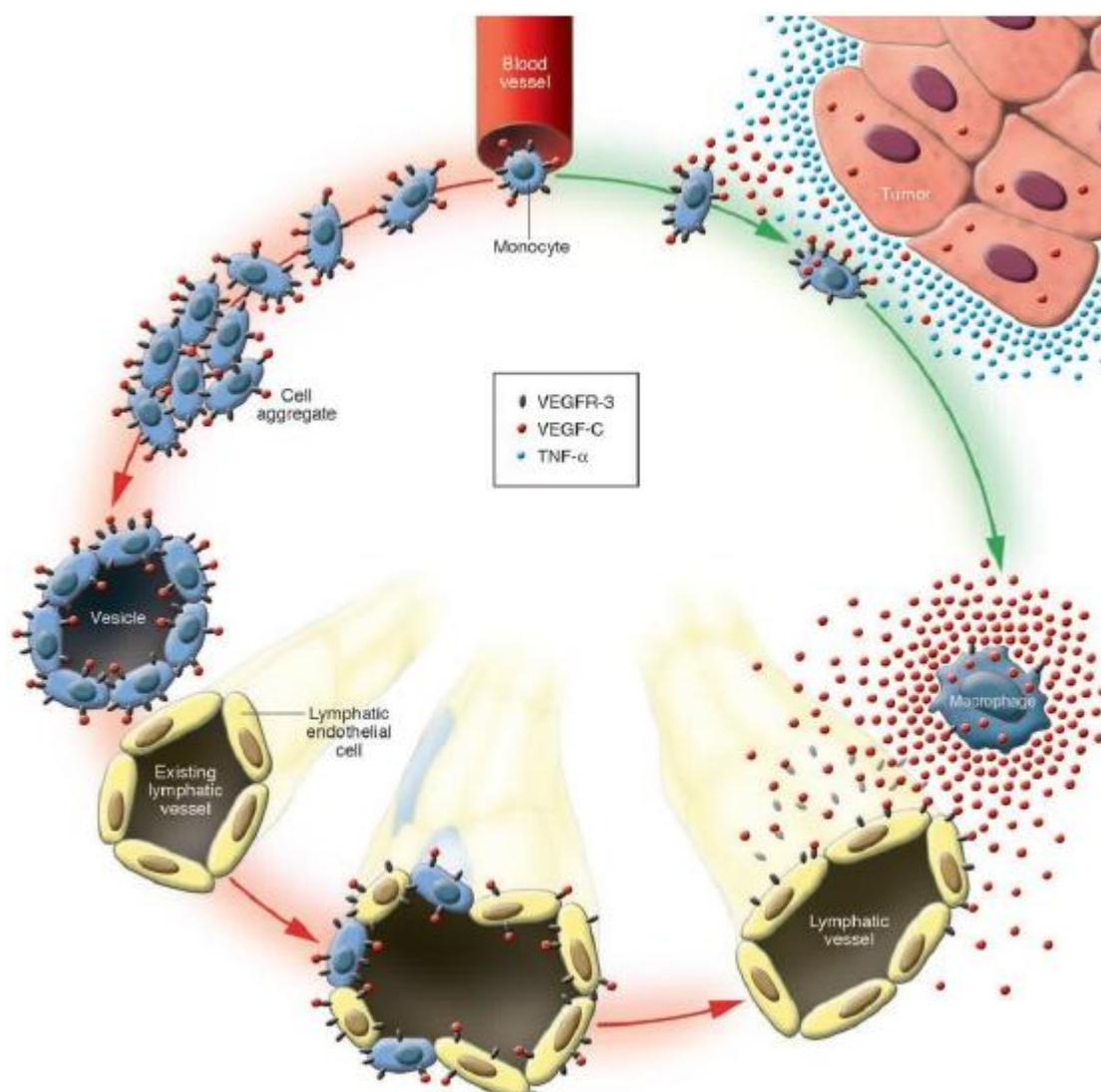
Ο **FGF-2** αποτελεί γνωστό μεσολαβητή της αγγειογένεσης στη φλεγμονή και επούλωση των ιστών. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει μία **δοσο-εξαρτώμενη δράση** του FGF-2, όσον αφορά τη **λεμφαγγειογένεση**, και ότι μπορεί να λάβει χώρα λεμφαγγειογένεση χωρίς προϋπάρχον αγγειακό υπόστρωμα. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι οι **VEGF-C** και **VEGF-D** απαιτούνται για τις λεμφαγγειογενετικές ιδιότητες του FGF-2.

ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Επιπρόσθετα, η **ροή του διαμέσου υγρού** ενέχεται επίσης στη λεμφαγγειογένεση ως ένας **σημαντικός ρυθμιστής** της, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία: 1) κανάλια υγρού σχηματίζονται στο διάμεσο χώρο πριν την οργάνωση των ΛΕΚ σε λεμφαγγεία, και 2) η μετανάστευση των ΛΕΚ, η έκφραση του VEGF-C και η οργάνωση του δικτύου λεμφαγγειακών τριχοειδών λαμβάνει χώρα αρχικά στην **κατεύθυνση ροής** της λέμφου. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός των καναλιών

αποχέτευσης του διαμέσου υγρού προϋπάρχει και πιθανώς **κατευθύνει** τη λεμφαγγειογένεση (σε αντίθεση με την αγγειογένεση, κατά την οποία η ροή του αίματος λαμβάνει χώρα μόνο αφού σχηματιστεί το αγγείο).

Επίσης, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν το δυνητικό ρόλο των **μακροφάγων** στη λεμφαγγειογένεση με δύο πιθανούς τρόπους, είτε με το να διαφοροποιούνται σε ΛΕΚ και να ενσωματώνονται στην ενδοθηλιακή στιβάδα είτε με το να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό προϋπαρχόντων ΛΕΚ [44].



Εικ. 9. Μακροφάγα και λεμφαγγειογένεση (από [44]).

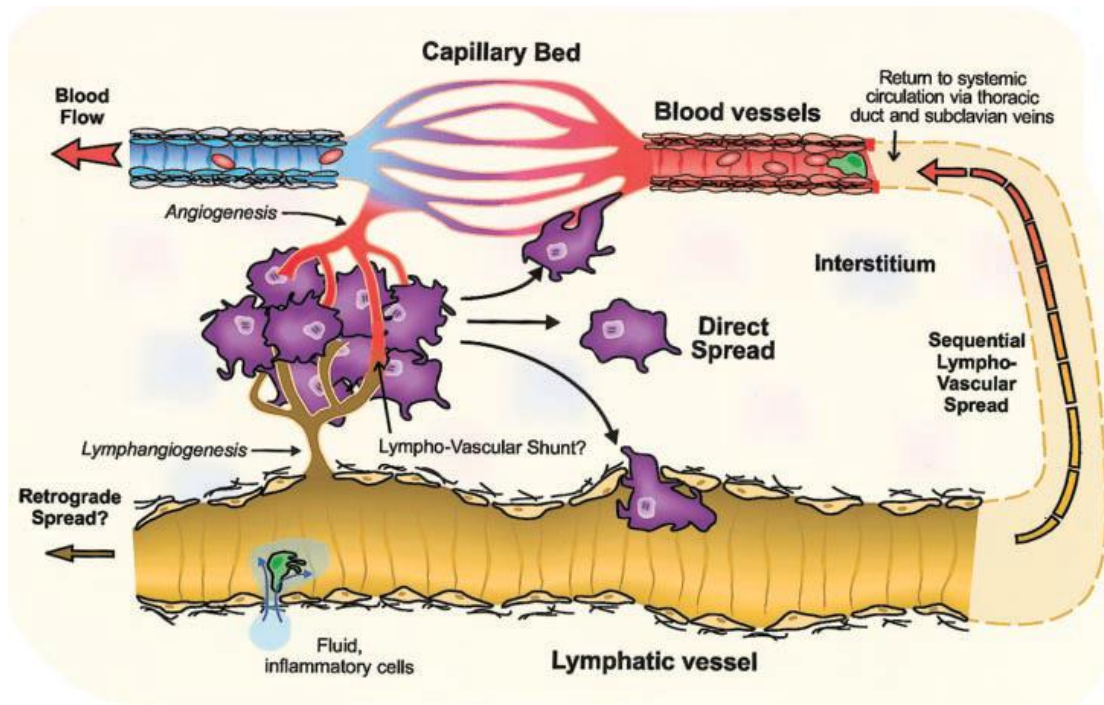
Οι λεμφαγγειογενετικοί παράγοντες και η **εξωκυττάρια ουσία** συνεισφέρουν σε μία σειρά λειτουργιών των ΛΕΚ. Η λεμφαγγειογένεση εξαρτάται από συγκεκριμένες μοριακές αλληλεπιδράσεις των ΛΕΚ και της περιβάλλουσας εξωκυττάριας ουσίας.

Τα ΛΕΚ χρειάζεται να λαμβάνουν τα κατάλληλα σήματα από το **συνεχώς μεταβαλλόμενο μικροπεριβάλλον** τους. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού νέων λεμφαγγείων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα χρειάζεται να αλληλεπιδρούν με εξωκυττάρια ουσίες των οποίων τα συστατικά αλλάζουν συνεχώς. Για να επιτευχθεί το παραπάνω, τα ΛΕΚ χρησιμοποιούν κάθε φορά διαφορετικά σετ μορίων-υποδοχέων, που αναγνωρίζουν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όπως τις **ιντεγκρίνες** που μεταφέρουν σήματα από συγκεκριμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας [81].

A.3. ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των θανάτων από καρκίνο. Τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται από την πρωτοπαθή κακοήγη εστία και διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς και στη συστηματική κυκλοφορία [92, 93]. Η διασπορά αυτή λαμβάνει χώρα είτε δια της άμεσης προσβολής των ιστών ή δια των αιμοφόρων αγγείων (αιματογενής μετάσταση) και λεμφαγγείων (λεμφογενής μετάσταση) ή ακόμα και μέσω διήθησης των κοιλοτήτων του ανθρώπινου σώματος, όπως ο υπεζωκότας και το περιτόναιο.

Τα κύτταρα πρέπει πρώτα να διηθήσουν αιμοφόρα αγγεία ή λεμφαγγεία για να εισέλθουν στη συστηματική κυκλοφορία. Στην περίπτωση των αιμοφόρων αγγείων, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να διεισδύσουν τη βασική μεμβράνη και να μεταναστεύσουν δια των στιβάδων των αγγείων. Αντίθετα, έχει προταθεί ότι η είσοδος των καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία είναι ευκολότερη εξαιτίας της φύσης των λεμφαγγείων, καθώς η λεπτή και ασυνεχής βασική μεμβράνη των λεμφαγγείων δε φαίνεται να αποτελεί σημαντικό φραγμό στην είσοδο των καρκινικών κυττάρων [94, 95].



Εικ. 10. Λεμφαγγειακή δομή και μηχανισμοί καρκινικής διασποράς. Τα λεμφαγγεία χαρακτηρίζονται από λεπτό τοίχωμα και χαμηλές πιέσεις. Αντίθετα, τα αιμοφόρα αγγεία χαρακτηρίζονται από υψηλές πιέσεις και περιβάλλονται από μία καλά σχηματισμένη βασική μεμβράνη και περικύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα αφήνουν την πρωτοπαθή εστία και διεισδύουν άμεσα εντός του περιβάλλοντος ιστού, από όπου και εισέρχονται σε προυπάρχοντα αγγεία και λεμφαγγεία. Εναλλακτικά, ο σχηματισμός νέων αγγείων ή λεμφαγγείων (λεμφαγγειογένεση) παρέχει έναν επιπλέον τρόπο διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την πρωτοπαθή εστία. Τα καρκινικά κύτταρα που διεισδύουν στα λεμφαγγεία εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία δια του θωρακικού πόρου ή δια του σχηματισμού **επικοινωνιών μεταξύ αγγειακού και λεμφαγγειακού συστήματος**. **Ανάστροφη ροή** λόγω απόφραξης λεμφαγγείων θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας επιπλέον τρόπος εισόδου των καρκινικών κυττάρων στη φλεβική κυκλοφορία. Τέτοιου είδους επικοινωνίες υπάρχουν εντός των όγκων. (από [96])

Προηγούμενες μελέτες έχουν υπογραμμίσει το ρόλο της αγγειογένεσης στην ανάπτυξη των συμπαγών όγκων [96], ενώ υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποστηρίζουν άμεση εμπλοκή της αγγειογένεσης στην αιματογενή διασπορά των καρκινικών κυττάρων [97]. Η έναρξη της αγγειογένεσης εντός μικρών συσσωρεύσεων καρκινικών κυττάρων, γνωστής ως αγγειογενετικός διακόπτης, αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για το σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων και για τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων αιματογενώς [98, 99]. Ωστόσο, πολύ λίγα είναι γνωστά όσον αφορά στο ρόλο της λεμφαγγειογένεσης των όγκων στη

διασπορά των καρκινικών κυττάρων [100, 101].

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν διογκωμένα λεμφαγγεία και ενεργό λεμφαγγειογένεση στις περιί του όγκου περιοχές διαφόρων ανθρωπίνων όγκων χρησιμοποιώντας δείκτες για ΛΕΚ [102]. Ο ρόλος των προϋπαρχόντων έναντι νεοσχηματιζόμενων λεμφαγγείων στις λεμφογενείς μεταστάσεις δεν είναι προς το παρόν κατανοητός. Παρόλο που τα προϋπάρχοντα λεμφαγγεία γύρω από τον όγκο είναι μάλλον αρκετά για τη διασπορά του όγκου, είναι λογικό να υποθέσει κάποιος ότι η αύξηση του αριθμού των λεμφαγγείων στην εγγύτητα του όγκου αυξάνουν και την τάση των όγκων να μεθίστανται. Έτσι, αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα ή και παρουσία εντός του όγκου λεμφαγγείων πρέπει να θεωρούνται ως ένα **επιπλέον μονοπάτι για την καρκινική διασπορά**, παρά ως αναγκαία και ικανή συνθήκη για αυτή [3].

Κλινικά και παθολογοανατομικά στοιχεία υποστηρίζουν ότι η **λεμφαγγειακή διασπορά** των όγκων αποτελεί ένα **πρώιμο γεγονός** της μεταστατικής νόσου [102, 103]. Η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων σε λεμφαγγεία και σε επιχώριους λεμφαδένες αποτελούν στοιχεία-κλειδιά για τη σταδιοποίηση των ανθρωπίνων όγκων και καθορίζουν επιπλέον το θεραπευτικό πλάνο [92, 103, 104, 105]. Παρόλο που ένας μεγάλος όγκων αποτελεσμάτων υποδεικνύουν ότι τα λεμφαγγεία παίζουν εξέχοντα ρόλο στην αρχική διασπορά των καρκινικών κυττάρων, οι ακριβείς μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη διαδικασία αυτή παραμένουν άγνωστοι [23, 100].

Η **ύπαρξη λεμφαγγείων εντός του όγκου** φαίνεται να έχει διχάσει τη βιβλιογραφία πάνω στο θέμα [23, 100, 106, 107]. Μέχρι πρόσφατα, τα στοιχεία που συνέδεαν την παρουσία λεμφαγγείων σε συμπαγείς όγκους με την καρκινική διασπορά δεν ήταν αρκετά πειστικά [23]. Αυτό ήταν αποτέλεσμα της έλλειψης κατάλληλων δεικτών για τη διάκριση αιμοφόρων αγγείων από λεμφαγγεία, της δυσκολίας αναγνώρισης των λεμφαγγείων με τεχνικές έγχυσης χρωστικών και της φτωχής γνώσης μας για τη δομή και μορφολογία των λεμφαγγείων. Το γεγονός ότι εντός των όγκων επικρατούν ιδιαίτερα **υψηλές πιέσεις**, έχει χρησιμοποιηθεί για να υποστηριχθεί η θεωρία της **μη ύπαρξη λειτουργικών λεμφαγγείων εντός των όγκων** [108].

Πρόσφατες μελέτες σε ένα πειραματικό μοντέλο σαρκώματος που εξέφραζε τον

VEGF-C και τον VEGFR-3, έδειξε ότι δεν υπάρχουν λειτουργικά λεμφαγγεία εντός του όγκου. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι οι **πιέσεις** που ασκούνται από την αναπτυσσόμενη καρκινική μάζα προκαλούν τη **συμπύεση και σύγκλιση των λεμφαγγείων εντός των συμπαγών όγκων** [108]. Αντίθετα με το προηγούμενο συμπέρασμα, υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι πολλοί όγκοι δεν είναι οιδηματώδεις, γεγονός το οποίο υποστηρίζει θεωρητικά την ύπαρξη λειτουργικών λεμφαγγείων εντός των όγκων [106, 107]. Η σχετική σημασία των **εντός του όγκου** έναντι **περί τον όγκο λεμφαγγείων**, για την ανάπτυξη καρκινικών μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες, παραμένει αδιευκρίνιστη [109]. **Ενεργά πολλαπλασιαζόμενα εντός του όγκου λεμφαγγεία** έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα πειραματικά μοντέλα **αλλογενών μεταμοσχεύσεων καρκινικών κυττάρων**, σε βραδέως αναπτυσσόμενα, χημικά επαγόμενα, **ακανθοκυτταρικά καρκινώματα δέρματος** σε ποντίκια, σε ανθρώπινα πρωτοπαθή **μελανώματα δέρματος** με λεμφαδενικές μεταστάσεις [110, 111, 112, 113], και σε **καρκίνο μαστού** (όπου εκεί τα ενεργά πολλαπλασιαζόμενα εντός του όγκου λεμφαγγεία αντιπροσώπευαν μία μικρή μειοψηφία) [114].

Αντίθετα, τα εντός του όγκου λεμφαγγεία σε πειραματικά μοντέλα όγκων σε ποντίκια μπορεί να μην είναι λειτουργικά, όσον αφορά στη μεταφορά λέμφου [115], και μία πρόσφατη μελέτη έδειξε, ότι σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου προστάτη, παρατηρήθηκαν **λεμφαδενικές μεταστάσεις χωρίς την παρουσία εντός του όγκου λεμφαγγείων** [116, 117]. Επίσης, πειράματα λεμφαγγειογραφίας σε πειραματικά μοντέλα ζώων, όπου όγκοι ανεπτύχθησαν αυτόματα ή εμφυτεύθηκαν, απεκάλυψαν ότι τα **λεμφαγγεία στην περιφέρεια των όγκων** είναι διατεταμένα και παροχετεύουν λέμφο, ενώ **τα εντός του όγκου λεμφαγγεία είναι συμπιεσμένα και μη λειτουργικά** [118]. Μία πιθανή εξήγηση για το παραπάνω είναι ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε ένα δεδομένο χώρο, δημιουργούν μηχανική τάση που συμπιέζει τα νεοσχηματιζόμενα λεμφαγγεία εντός του όγκου, ενώ στη περιφέρεια η περίσσεια VEGF-C προκαλεί τη διάταση των λεμφαγγείων. Τα διατεταμένα αυτά λεμφαγγεία δέχονται τη λέμφο και τα καρκινικά κύτταρα που “διαρρέουν” από την επιφάνεια του όγκου, και ως εκ τούτου υποβοηθούν τη λεμφαδενική μετάσταση [119].

Επίσης, σε μελέτες όπου έγινε **επαγωγή της λεμφαγγειογένεσης** με τη χρήση του VEGF-C, **δεν παρατηρήθηκε μείωση της πίεσης του διαμέσου χώρου των όγκων**, ενώ η αποσυμπίεση των εντός του όγκου λεμφαγγείων με τη χρήση **κυτταροτοξικών** φαρμάκων **δεν κατάφερε να αυξήσει** την αποχέτευση της λέμφου. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα εντός του όγκου λεμφαγγεία δεν ήταν λειτουργικά. Επίπρόσθετα, τα εντός του όγκου λεμφαγγεία βρέθηκαν να φέρουν **ελαττωματικές βαλβίδες**, επιτρέποντας την παλίνδρομη ροή της λέμφου. Επίσης έχει διατυπωθεί και η θεωρία ότι τα ενδο-ογκικά λεμφαγγεία αποτελούν τυφλές δεξαμενές που **δε συνδέονται με το υπόλοιπο λεμφαγγειακό δίκτυο** [120].

Αν και η λειτουργικότητα των λεμφαγγείων όσον αφορά στη μεταφορά λέμφου δεν συνδέεται απαραίτητα με την ικανότητά τους να καθοδηγούν τα καρκινικά κύτταρα στους επιχώριους λεμφαδένες, η πλειοψηφία των μελετών υποστηρίζουν ότι τα **περί του όγκου λεμφαγγεία** είναι υπεύθυνα κατά μείζονα λόγο για την **προώθηση των λεμφαδενικών μεταστάσεων**. Διατεταμένα περί τον όγκο λεμφαγγεία παρατηρούνται συχνά [111, 115, 121], και έχει δειχθεί ότι πολλαπλασιάζονται ενεργά [122]. Η **ποσοτικοποίηση** των “hot spots” λεμφαγγείων **στην περιφέρεια μελανώματος** δέρματος ήταν ο δείκτης εκείνος που προέβλεψε με τη **μεγαλύτερη ακρίβεια τις λεμφαδενικές μεταστάσεις**, συγκρινόμενος με την αξιολόγηση των εντός του όγκου λεμφαγγείων [119].

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα από τις διάφορες μελέτες μπορεί να οφείλονται σε **διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης** για την ποσοτικοποίηση της λεμφαγγειογένεσης, όπως η αξιολόγηση των λεμφαγγείων γύρω από τον όγκο σε σχέση με αυτά εντός του όγκου, η αξιολόγηση των “hot spots” λεμφαγγείων σε αντίθεση με τη συνολική επιφάνεια του όγκου, η χρήση λεμφαγγειακών δεικτών με διαφορετική ειδικότητα ο καθένας, και η έμμεση ανίχνευση λεμφαγγείων μέσω αρνητικών δεικτών (π.χ., CD31-positive/ pathologische anatomie Leiden-endothelium (PAL-E)-negative αγγείων) [119].

ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΟΔΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ανακάλυψη των λεμφαγγειογενετικών παραγόντων VEGF-C και VEGF-D γεννά το ερώτημα κατά πόσο οι παραπάνω παράγοντες εκφράζονται από ανθρώπινες νεοπλασίες, όπως επίσης και κατά πόσο η έκφρασή τους από όγκους είναι υπεύθυνοι για το μεταστατικό δυναμικό τους. Είναι πλέον εμφανές ότι τα μέλη της οικογένειας των VEGF εκφράζονται σε μία πλειάδα ανθρώπινων όγκων. Οι VEGF-C και VEGF-D έχουν ανιχνευθεί σε διάφορους όγκους όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του στομάχου [123,124,125,126,127]. Οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποίησαν είτε ανοσοϊστοχημεία ή RT-PCR για να ανιχνεύσουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, χωρίς βέβαια να λαμβάνουν υπόψιν την ανάγκη για πρωτεολυτική ενεργοποίηση των αναπτυξιακών παραγόντων. Η ανίχνευση του mRNA ή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης μπορεί να μην αντιπροσωπεύει σε όλες τις περιπτώσεις πλήρως δραστικό/ώριμο αναπτυξιακό παράγοντα. Η ανίχνευση της έκφρασης του VEGFR-3 αποτελεί άλλη μία σημαντική παράμετρο που καθορίζει την ευαισθησία των ιστών σε λεμφαγγειογενετικά ερεθίσματα. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι οι VEGF-C και VEGF-D συνεκφράζονται με τον VEGFR-3 σε μελάνωμα [127] και καρκίνο του πνεύμονα [128].

Διάφορες μελέτες διερεύνησαν και τη **συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των VEGF-C και VEGF-D με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους**, που σχετίζονται άμεσα με την ικανότητα των όγκων να διασπείρονται (π.χ., λεμφαδενικές μεταστάσεις, λεμφαγγειακή διήθηση από καρκινικά κύτταρα, δευτερογενείς μεταστάσεις) [128, 129, 130, 131]. Σε πολλές περιπτώσεις οι μελέτες αυτές **ανέδειξαν στατιστική συσχέτιση** μεταξύ της έκφρασης λεμφαγγειογενετικών παραγόντων και της ικανότητας του πρωτοπαθούς όγκου να μεθίσταται [96].

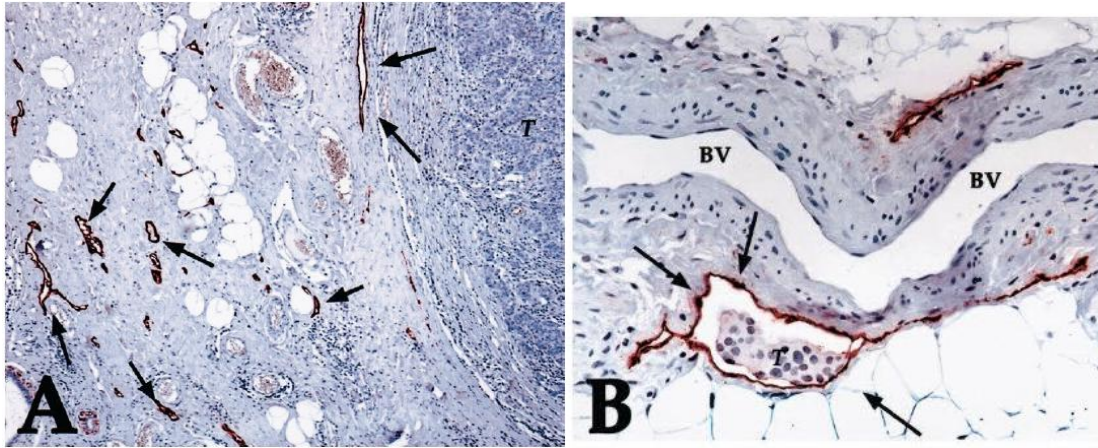
Τα επίπεδα του **VEGF-C** είναι **αυξημένα σε καρκινικούς** ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς [132-139]. Η πλειοψηφία των μελετών (**77%**) έδειξε ότι υπήρχε σημαντικά στατιστική **συσχέτιση** μεταξύ των **λεμφαδενικών μεταστάσεων** και της έκφρασης του **VEGF-C** από τον όγκο, σε όλους τους τύπους των όγκων. Τα επίπεδα του VEGF-C συσχετίστηκαν με λεμφαγγειακές μεταστάσεις σε 14/17 μελέτες

καρκίνου του στομάχου και σε 9/13 μελέτες καρκίνου του παχέος εντέρου [109].

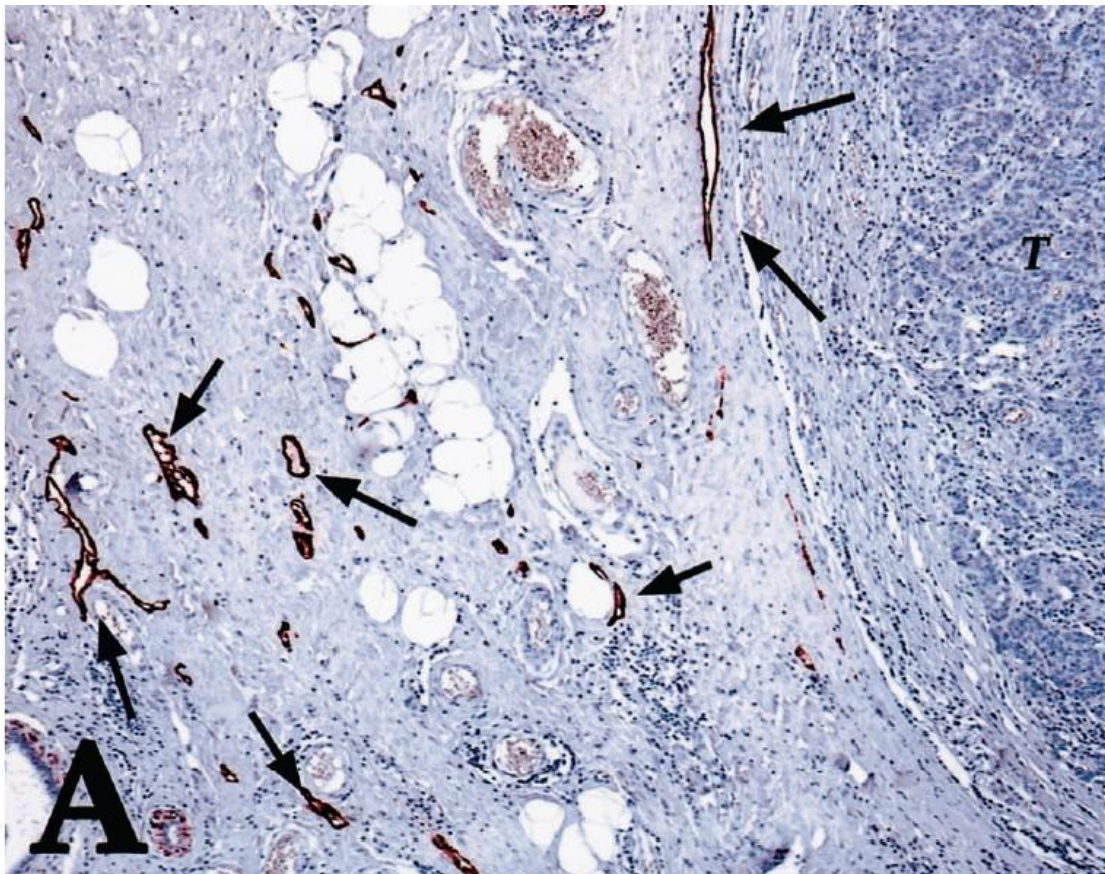
Tumor studied	Markers examined	Technique	Comments
Thyroid tumors	VEGF, VEGF-C	RT-PCR ^a	VEGF-C expression correlates with lymph node invasive tumors
Gastric cancer	VEGF, VEGF-C	RT-PCR	Correlation between grade of VEGF-C expression pattern and the lymph node status
	VEGF, VEGF-C	IHC ^b	VEGF-C expression correlated with lymphatic and venous invasion. VEGF-C expression had a significant negative impact on prognosis in patients which did not express VEGF.
Prostate cancer	VEGF-C	ISH ^c	Higher expression of VEGF-C mRNA in lymph node positive patients
Adenocarcinoma of the lung	VEGF-A, B, C, and D	RT-PCR	Lymph node metastasis associated with high VEGF-C expression levels and low VEGF-D expression levels
Non-small cell lung cancer (NSCLC)	VEGF and VEGF-C	RT-PCR	Expression of both VEGF and VEGF-C in the primary tumor was significantly associated with nodal microdissemination
	VEGF-C	IHC	VEGF-C expression was significantly associated with lymph node metastasis, lymphatic vessel invasion and poor outcome for the patient
Colorectal cancer	VEGF-C	RT-PCR	Expression of VEGF-C mRNA correlated with lymph node metastasis, lymphatic involvement and depth of invasion
Cervical cancer	VEGF, VEGF-C, VEGF-D	RT-PCR, IHC	Expression of VEGF but not VEGF-C and VEGF-D mRNA correlated with lymphatic metastases
	VEGF-C	RT-PCR	VEGF-C expression was found to be the sole independent factor influencing pelvic lymph node metastases
Esophageal cancer	VEGF-C	IHC	VEGF-C expression correlated with depth of tumor invasion, tumor stage, venous invasion, lymphatic invasion and lymph node metastasis
Head and neck squamous cell carcinoma	VEGF, VEGF-C, VEGF-D	RT-PCR	Increased expression of all four isoforms of VEGF, increased expression of VEGF-C, but decreased expression of VEGF-D. Levels of VEGF-C had predictive value for cervical node metastases.
Breast cancer	VEGF-C	RT-PCR, IHC	VEGF-C expression correlated with lymphatic vessel invasion. Disease-free survival of the VEGF-C positive group was significantly poorer

Πίνακας 2. Μελέτες έκφρασης των VEGF-C και VEGF-D και συσχέτισης τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους σε διάφορους ανθρώπινους όγκους. (από [96]- A:RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction. B: Immunohistochemistry. C: In situ hybridization)

Αντίθετα, υπάρχουν πολύ λιγότερες μελέτες που διερευνούν τη σημασία του **VEGF-D** στη δημιουργία μεταστάσεων, και η συσχέτισή του με λεμφαγγειακές μεταστάσεις είναι **πολύ λιγότερο ενυπωσιακή**, συγκρινόμενη με τα στοιχεία που υπάρχουν για τον VEGF-C [109]. Έχουν αναφερθεί επίσης μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο VEGF-D εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό από ανθρώπινους όγκους, σε σχέση με τον VEGF-C, αλλά χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την αποσαφήνιση της παραπάνω παρατήρησης [133, 140].



Εικ. 11. Α, ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς που ενέχονται στη λεμφαγγειογένεση. Β, δέσμευση του VEGF-C/D στο VEGFR3 οδηγεί στη φωσφορυλίωσή του, και στην ενεργοποίηση μονοπατιών που διαμεσολαβούν τον πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και επιβίωση των ΛΕΚ. C, D, ανοσοιστοχημική χρώση λεμφαγγείων με αντίσωμα εναντίον της ποδοπλανίνης σε τομές ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. Αριστερά, λεμφαγγεία στην περιφέρεια του όγκου, δεξιά, κύτταρα αδενοκαρκινώματος εντός του αυλού λεμφαγγείων (από [141]).



εικ. 12. Τομή καρκίνου μαστού με υψηλή λεμφαγγειακή πυκνότητα στη περιφέρεια του όγκου. Απουσία λεμφαγγείων εντός του όγκου (από [143]).

Marker	Detection method	LVD	LVI	LNM	Poor prognosis	Reference	
Malignant melanoma	VEGF-C	IHC	+	nd	+	nd	Dadras et al. (2005)
		IHC	nd	nd	+	nd	Schiroma et al. (2003)
	VEGF-D	ELISA, serum	nd	nd	+	nd	Vhinen et al. (2007)
		IHC	nd	nd	-	nd	Dadras et al. (2005)
		IHC	nd	nd	-	nd	Schiroma et al. (2003)
Colorectal carcinoma	VEGF-C	IHC	+	+	+	+uv (-mv)	Sourmaoro et al. (2006)
		IHC	+	+	+	nd	Fukunaga et al. (2006)
		IHC	nd	+	+	+	Onogawa et al. (2004)
		IHC	nd	nd	+	nd	Ja et al. (2004)
		IHC	nd	nd	+	nd	Maeda et al. (2003)
		IHC	nd	+	+	+	Furudoi et al. (2002)
		IHC/qRT-PCR	nd/nd	+/+	+/+	nd/nd	Kawakami et al. (2003)
		RT-PCR	nd	nd	-	nd	George et al. (2001)
		qRT-PCR	nd	nd	-	nd	Takeuchi et al. (2003)
		RNase protection assay	nd	nd	-	nd	Hanrahan et al. (2003)
	VEGF-D	IHC	nd	-	+uv, -mv	+uv (-mv)	Onogawa et al. (2004)
		IHC	nd	-	+	-	Furuki et al. (2003)
		IHC	nd	-	+	+	White et al. (2002)
		RT-PCR	nd	nd	-	nd	George et al. (2001)
		RNase protection assay	nd	nd	-	nd	Hanrahan et al. (2003)
Gastric cancer	VEGF-C	IHC	+	+	-	+	Da et al. (2008)
		IHC	nd	+	+	nd	Ameka et al. (2002)
		IHC	nd	nd	+	nd	Zhang et al. (2005)
		IHC	nd	+	+	nd	Onogawa et al. (2005)
		IHC	nd	+	+	nd	Yan et al. (2004a)
		IHC	nd	-	+	-	Juttner et al. (2006)
		IHC	nd	+	+	nd	Yan et al. (2004b)
		IHC	nd	+	-	nd	Kabashima et al. (2001)
		IHC	nd	+	+	nd	Ishikawa et al. (2003)
		IHC	nd	+	+	+	Takahashi et al. (2002)
	IHC/qRT-PCR	nd/nd	+/nd	+/+	+	Yonemura et al. (1999)	
	VEGF-D	RT-PCR	nd	+	+	-	Shida et al. (2006)
		RT-PCR	nd	nd	+	nd	Kitadai et al. (2005)
		RT-PCR	nd	nd	+	nd	Liu et al. (2004)
		qRT-PCR	nd	nd	+	nd	Yuanming et al. (2007)
		IHC	nd	-	-	nd	Onogawa et al. (2005)
		IHC	nd	+	+	+	Ishikawa et al. (2003)
IHC		nd	+	+	+	Juttner et al. (2006)	
VEGF-D	RT-PCR	nd	nd	-	nd	Kitadai et al. (2005)	
	RT-PCR	nd	+	-	-	Shida et al. (2006)	
	qRT-PCR	-	nd	-	nd	Yuanming et al. (2007)	

Πίνακας 3. Μελέτες έκφρασης των VEGF-C/VEGF-D και συσχέτισης της με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων. LNM, lymph-node metastasis; LVD, lymphatic vessel density; LVI, lymphatic vessel invasion; mv, multivariate; nd, not determined; uv, univariate; +, statistically significant correlation ($P < 0.05$); -, no significant correlation. + in undifferentiated tumors, -in differentiated tumors (από [109]).

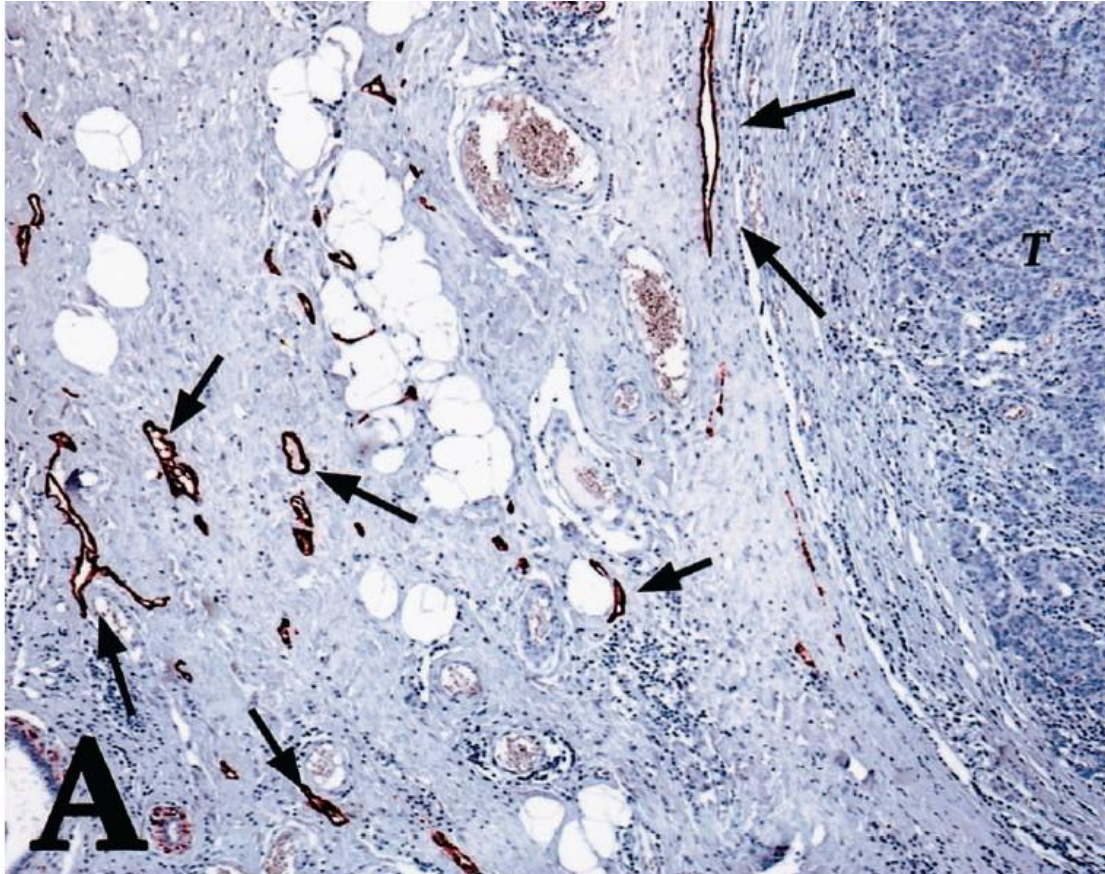
Η μέση τιμή των επιπέδων στους ασθενείς ήταν σημαντικά **αυξημένη** σε σχέση με τους υγιείς. Τα επίπεδα ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στους ασθενείς με **λεμφαδενικές μεταστάσεις**. Οι συγγραφείς εξέτασαν επίσης την εξάρτηση των επιπέδων του VEGF-C από το συνδυασμένο TN status, αλλά δε βρέθηκε καμία συσχέτιση, μάλλον εξαιτίας του μικρού αριθμού ασθενών.

Table 2 Studies on circulating VEGF-C/D in human solid malignancies (clinicopathological association)

Tumor	Marker	Sample	Cases (n)	LNM	Prognostic impact	Ref
Gastric cancer	VEGF-C	Serum	80	$P = 0.001$	$P = 0.001$	67
Esophageal cancer	VEGF-C	Serum	70	$P = 0.022$	ND	102
Esophageal cancer	VEGF-C	Serum	73	(+) ¹	ND	103
Colorectal cancer	VEGF-D	Plasma	59	(-)	ND	38
Colorectal cancer	VEGF-C	Plasma	41	(+) ²	ND	144
Colorectal cancer	VEGF-C	Plasma	120	(-)	ND	145
	VEGF-D			(-)		
Colorectal cancer	VEGF-C	Serum	66	(+)	ND	146
Breast cancer	VEGF-D	Plasma	51	(-)	ND	46
Breast cancer	VEGF-C	Plasma	122	(-)	(-)	47
Breast cancer ³	VEGF-D	Plasma	142			48
Nsc ⁴ lung cancer	VEGF-C	Serum	92	$P = 0.0260$	ND	49
Nsc lung cancer	VEGF-C	Serum	78	$P = 0.0004$	ND	50
Nsc lung cancer	VEGF-C	Serum	116	$P = 0.0007$	ND	51
Cervical cancer	VEGF-C	Serum	78	$P = 0.0001$	$P = 0.0112$	52
Cervical cancer	VEGF-C	Serum	205	(+) ²	(+) ²	53
Prostate cancer	VEGF-D	Plasma	30	$P = 0.0043$	ND	54
HNSCC ⁵	VEGF-C	Plasma	46	(-)	(-)	55

ND: Not determined; ¹Indirect result; ²None statistically significant; ³Post-treatment study; ⁴Non small cell; ⁵Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

Πίνακας 4. Σύνοψη των μελετών των κυκλοφορούντων επιπέδων VEGF-C/D στους ανθρώπινους συμπαγείς όγκους (από [146]).



Εικ. 13. (Α) Φυσιολογικό ήπαρ και (Β–D) χολαγγειοκαρκίνωμα πύλης ήπατος βαμμένα με D2- 40. Α. Το φυσιολογικό ήπαρ δεν παρουσιάζει καθόλου λεμφαγγεία εντός του παρεγχύματος. Τα λεμφαγγεία εμφανίζον ανοιχτούς (Β), αλλά και κλειστούς (συμπιεσμένους)(C) αυλούς. Αντιπροσωπευτικές τομές καρκινικού ιστού με υψηλή (C) και χαμηλή (D) λεμφαγγειακή πυκνότητα (από [147]).

Οι μελέτες που δείχνουν σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA του VEGF-C και κλινικών παραμέτρων υποδεικνύουν ότι οι λεμφαγγειογενετικοί παράγοντες έχουν δυνητικά κάποιο ρόλο στην προαγωγή της καρκινικής διασποράς. Παρολαυτά, μέχρι πρόσφατα καμία άμεση ανάμειξη του VEGF-C ή VEGF-D δεν είχε αναδειχθεί. Μελέτες έκφρασης των VEGF-C και VEGF-D σε διάφορα μοντέλα καρκινογένεσης σε ζώα, παρείχαν ενδείξεις ότι αυτοί οι παράγοντες μπορούν στην πραγματικότητα να προάγουν τη σχετιζόμενη με τον όγκο λεμφαγγειογένεση και την καρκινική διασπορά. Τρεις μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η **υπερέκφραση** πλήρους μήκους **VEGF-C σε καρκινικά κύτταρα**, κατέδειξαν ότι τούτο είχε ως αποτέλεσμα την προαγωγή των **λεμφαδενικών μεταστάσεων** σε επιχώριους

λεμφαδένες (βλ. πίν. 4). Μία μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του VEGF-C στην σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού MBA-MD-435 οδήγησε σε **αυξημένη λεμφαγγειογένεση**, αλλά όχι αγγειογένεση, σε όγκους η οποίοι αναπτύσσονταν σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια [110]. Οι όγκοι αυτοί διεσπάρησαν στους επιχώριους λεμφαδένες και στους πνεύμονες, ενώ στους όγκους control (χωρίς έκφραση VEGF-C) δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο **VEGF-C** μπορεί να προάγει τη **λεμφαδενική και μεταστατική διασπορά** [110].

Tumor type ^a	Lymphangiogenic growth factor studied ^b	Method of protein production ^c	Results/observations
MBA-MD-435	VEGF-C	Overexpression	Increased incidence of metastases from the primary tumor expressing full-length VEGF-C to both the regional lymph node and the lung
Pancreatic β cell tumors	VEGF-C	Rip1Tag2 model	Mice overexpressing VEGF-C produced tumors that spread to the pancreatic lymph nodes via peritumoral lymphatics
293	VEGF-D	Overexpression	Increased lymphangiogenesis and angiogenesis resulting in increased tumor growth and metastatic spread of primary tumors overexpressing VEGF-D to local lymph nodes
MCF-7	VEGF-C	Overexpression	VEGF-C promoted the growth of tumor-associated lymphatics, which were infiltrated with tumor cells
MeWo	VEGF-C	Overexpression	Enhanced tumor angiogenesis, intratumoral lymphatics, and recruitment of macrophages
AZ521	VEGF-C	Overexpression	VEGF-C induced an increase in the number of mice with lymph node metastases and an increase in the number of nodes involved

Πίνακας 5. Σύνοψη μελετών έκφρασης των VEGF-C και VEGF-D σε διάφορα μοντέλα καρκινογένεσης σε ζώα και συσχέτισής της με τη μεταστατική διασπορά των όγκων (από [96]).

Άλλοι μελετητές έχουν χρησιμοποιήσει τα διαγονιδιακά ποντίκια Rip1Tag2 για να αναλύσουν τη δραστηριότητα της υπερέκφρασης του VEGF-C σε ένα μοντέλο ογκογένεσης των β παγκρεατικών νησιδίων [148]. Σε αυτούς τους όγκους, ο VEGF-C προήγαγε την ανάπτυξη **περί του όγκου λεμφαγγείων** και το γεγονός αυτό συσχετίστηκε με τα **αυξημένα ποσοστά μεταστατικής διασποράς** στους επιχώριους παγκρεατικούς λεμφαδένες.

Μελέτες όπου κύτταρα καρκίνου μαστού της σειράς MCF-7 εξέφραζαν ανασυνδυασμένο VEGF-C, και τα οποία εμφυτεύθηκαν σε ποντίκια με ανοσοανεπάρκεια, έδειξαν ότι ο VEGF-C προώθησε την **ανάπτυξη** των σχετιζόμενων

με τον όγκο **λεμφαγγείων**, τα οποία ήταν διηθημένα από κύτταρα του όγκου. Η υπερέκφραση του VEGF-C δεν είχε κανένα αποτέλεσμα όσον αφορά στην αγγειογένεση. Η **αναστολή της ανάπτυξης των νεοσχηματιζόμενων λεμφαγγείων**, χρησιμοποιώντας μία **διαλυτή μορφή** του **VEGFR-3**, ανέδειξε τη δυνατότητα να ανασταλεί η καρκινική ανάπτυξη και διασπορά δια της χρήσεως μορίων που μπλοκάρουν τη σηματοδότηση δια του VEGFR-3 [149]. Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν την κυτταρική σειρά μελανώματος MeWo για να διερευνήσουν τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του VEGF-C στη μεταστατική συμπεριφορά των όγκων που αναπτύσσονται in vivo. Τα αποτελέσματα ήταν ότι η έκφραση του **VEGF-C** είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της **λεμφαγγειογένεσης** και **αγγειογένεσης**, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενα πειράματα έκφρασης του VEGF-C σε πειραματικά μοντέλα όγκων [151]. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει το βαθμό της **πρωτεολυτικής επεξεργασίας** των παραγόντων αύξησης, και εμφανίστηκε και σε μία άλλη μελέτη που μελετούσε την επίδραση του VEGF-D [101, 150]. Η μελέτη αυτή ανέφερε επίσης την **συσσώρευση μακροφάγων** εντός του όγκου σαν αποτέλεσμα της **υπερέκφρασης του VEGF-C**. Η τελευταία παρατήρηση αποκαλύπτει ένα δυνητικό ρόλο των VEGF-C και VEGF-D ως ανοσολογικών τροποποιητών. Σε μία άλλη μελέτη, στην οποία όγκοι υπερεκφράζοντες VEGF-D αναπτύχθηκαν σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια, κατεδείχθη ότι ο **VEGF-D** ήταν σε θέση να επαγάγει τη **λεμφαγγειογένεση** και τη **διασπορά** των καρκινικών κυττάρων στους **επιχώρους λεμφαδένες** [150].

Επίσης, εδείχθη ότι η υπερέκφραση του VEGF-D, σε αντίθεση με τον VEGF-C, είχε ως αποτέλεσμα την **αύξηση της αγγειογένεσης** στους όγκους, μάλλον δια της ενεργοποίησης του VEGFR-2 [150]. Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δράση έχουν μάλλον να κάνουν με το βαθμό της **πρωτεολυτικής επεξεργασίας** των VEGF-C και VEGF-D, η οποία επηρεάζει την ειδικότητα των υποδοχέων για τους παραπάνω παράγοντες. Η υπερέκφραση του **VEGF-C** σε κύτταρα ανθρώπινου **γαστρικού καρκίνου** οδήγησε επίσης σε επαγωγή της ανάπτυξης των **εντός του όγκου λεμφαγγείων** και επάυξε το **μεταστατικό δυναμικό** των κυττάρων αυτών όταν ενέθησαν σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια [152].

Σε ένα πειραμαντικό μοντέλο **γαστρικού καρκίνου**, η έκθεση σε αντισώματα που μπλοκάρουν τον VEGFR-3 ανέστειλε τη σχετιζόμενη με τον όγκο λεμφαγγειογένεση και το σχηματισμό λεμφαδενικών μεταστάσεων [154], ενώ επίσης ανέστειλε τις λεμφαδενικές και συστηματικές μεταστάσεις σε ένα μοντέλο **καρκίνου μαστού** σε ποντίκια [155]. Οι επαγόμενες από τον VEGF-C **λεμφαγγειογένεση** και **μεταστάσεις** ανεστάλησαν από μία **διαλυτή μορφή VEGFR-3** σε ένα μοντέλο αλλογενούς μεταμόσχευσης κυττάρων καρκίνου του μαστού [149], αλλά και σε ένα μοντέλο καρκίνου μαστού σε ποντίκια [156].

Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η μεταφορά **διαλυτής μορφής του VEGFR-3** με ιϊκά σωματίδια, μείωσε τη **λεμφαγγειογένεση** και ανέστειλε τις **λεμφαδενικές μεταστάσεις** σε μοντέλα καρκίνου του **μαστού**, του **προστάτη** και σε **μελάνωμα** σε ποντίκια [157]. Συνακόλουθα αποτελέσματα παρήχθησαν και από μία άλλη μελέτη, όπου η σταθερή υπερέκφραση διαλυτής μορφής VEGFR-3 σε κύτταρα **καρκίνου πνεύμονα** μείωσε το σχηματισμό των σχετιζόμενων με τον όγκο λεμφαγγείων και των λεμφαδενικών μεταστάσεων [158]. Επίσης, η σταθερή διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων με **siRNA** κατά της έκφρασης του **VEGF-C** ανέστειλε τη **λεμφαγγειογένεση** μετά την εμφύτευσή τους σε ποντίκια, όπως επίσης οδήγησε σε μείωση των ποσοστών λεμφαδενικών και πνευμονικών μεταστάσεων [159]. Τέλος, χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια για τη μεταφορά siRNA κατά της έκφρασης του VEGF-C, επετεύχθη σημαντική μείωση της λεμφαγγειογένεσης και των λεμφαδενικών μεταστάσεων σε ένα μοντέλο γαστρικού καρκίνου [160].

ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΕΝΑΝΤΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΕ ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΑ ΟΡΓΑΝΑ

Ο σχηματισμός των λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν προϋποθέτει απαραίτητα τη χρήση των λεμφαγγείων ως διόδου διαφυγής των καρκινικών κυττάρων προς τους λεμφαδένες. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα εντός των λεμφαγγείων μπορούν να

περνούν απευθείας στη συστηματική κυκλοφορία **μέσω λεμφάγγειο-φλεβικών επικοινωνιών**, που έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα όργανα. Μία αύξηση στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα λόγω επαγόμενης από τον όγκο αγγειογένεσης, θα μπορούσαν δυνητικά να υποβοηθήσουν το σχηματισμό λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Σε μία πρόσφατη μελέτη, μία εξαιρετικά μεταστατική σειρά καρκινικών κυττάρων πνεύμονα και η προγονική, χαμηλού μεταστικού δυναμικού σειρά της, χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί ο μηχανισμός των λεμφαδενικών μεταστάσεων. Η επιθετική σειρά κυττάρων παρουσίασε **υψηλή έκφραση VEGF-C**, και **εντός του όγκου λεμφαγγεία**, όπως επίσης και **μεταστάσεις σε επιχώριους λεμφαδένες**. Αν και η λεμφαγγειογένεση και ο σχηματισμός λεμφαδενικών μεταστάσεων αναστάλησαν στην επιθετική σειρά με τη χρήση μίας διαλυτής μορφής VEGFR-3, οι όγκοι παρουσίαζαν ακόμη μεταστάσεις στους πνεύμονες, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα διασπείρονται και μέσω άλλων μηχανισμών και διόδων.

Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν ότι η αναστολή της σηματοδότησης δια του VEGFR-3 μπορεί να αναστείλει τη λεμφαγγειογένεση και το σχηματισμό λεμφαδενικών μεταστάσεων, αλλά όχι απαραίτητα τις πνευμονικές μεταστάσεις, υποδεικνύοντας **διαφορετικούς μηχανισμούς για τα δύο είδη μεταστάσεων** [158]. Η υπερέκφραση του **VEGF-C** φαίνεται να είναι απαραίτητη για τον εκ νέου σχηματισμό λεμφαγγείων, αλλά όχι επαρκής για τη μεταστατική διασπορά των καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες.

Επιπρόσθετα, πρόσφατα εδείχθη in vitro ότι τα ΛΕΚ είναι σε θέση να επάγουν δραστικά τη διαενδοθηλιακή μετανάστευση δενδριτικών και καρκινικών κυττάρων. Η δράση αυτή φάνηκε να διαμεσολαβείται παρακρινώς δια του παραγόμενου από τα ΛΕΚ **CCL-1** και του εκφραζόμενου από τα καρκινικά και δενδριτικά κύτταρα υποδοχέα του, **CCR-8** [120].

Σύνοψη

Η μετάσταση στους περιφερειακούς λεμφαδένες αντιπροσωπεύει το πρώτο βήμα της διάδοσης των όγκων, για μια ποικιλία από κοινούς καρκίνους του ανθρώπου, όπως τα καρκινώματα του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη καθώς και τα μελανώματα. Σήμερα δεν είναι σαφές εάν τα καρκινικά κύτταρα παγιδεύονται από λεμφαδένες, καταλήγοντας στην διάδοση όγκου σε μία ύστερη φάση, εάν οι μεταστάσεις στους λεμφαδένες απλά χρησιμεύουν ως απόδειξη της διέλευσης των καρκινικών κυττάρων μέσω των λεμφαδένων, ή αν οι λεμφαδένες προωθούν την εξάπλωση του κυττάρων του όγκου, μέσω της μεγέθυνσής του, ή αν χρησιμεύουν ως εφελτήριο για την περαιτέρω συστηματική μετάσταση. Η έκταση των λεμφαδενικών μεταστάσεων είναι ο καθοριστικός παράγοντας για το επίπεδο και για την πρόγνωση των περισσότερων ανθρώπινων κακοηθειών, που μας οδηγεί συχνά σε θεραπευτικές αποφάσεις. Παρά το γεγονός αυτό, οι μοριακοί μηχανισμοί της λεμφικής μετάστασης δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως.

Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στο λεμφικό αγγειακό σύστημα εισβάλλοντας σε προϋπάρχοντα λεμφαγγεία στην περιφέρεια του όγκου ή προκαλώντας λεμφαγγειογένεση μέσω της παραγωγής κάποιου αυξητικού παράγοντα. Η πυκνότητα των λεμφικών αγγείων συσχετίζεται με την εμφάνιση της μετάστασης στον λεμφαδένα και την κακή πρόγνωση σε ορισμένους ανθρώπινους καρκίνους. Ωστόσο, μελέτες των σχετικών μηχανισμών έχουν αποκαλύψει ότι τα ενδοογκικά λεμφαγγεία μπορεί να μην είναι πλήρως λειτουργικά, λόγω της υψηλής ενδοογκικής πίεσης, και επομένως δεν είναι απαραίτητα για τη λεμφαγγειακή μετάσταση. Αντιθέτως, τα λεμφαγγεία στην περιφέρεια του όγκου είναι λειτουργικά και μπορούν να αποστραγγίσουν κολλοειδή από τον όγκο. Επιπλέον, λεμφαγγειογεννητικοί αυξητικοί παράγοντες που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα και από μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο, διεγείρουν την ανάπτυξη

και την διαστολή των λεμφικών αγγείων γύρω από τον όγκο, αλλά και διευκολύνουν την είσοδο του όγκου στο κύτταρο, μέσω του λεμφικού ενδοθηλίου .

Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι το κλείδωμα της TGF- β σηματοδότησης εμποδίζει τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού από μεμονωμένη κίνηση in vivo, αλλά δεν αναστέλλει τη συλλογική κίνηση σε ομάδες clusters. Είναι ενδιαφέρον ότι τα κύτταρα που προορίζονται για τη συλλογική εισβολή είναι ικανά για εισβολή στο λεμφικό σύστημα, αλλά όχι για μετάσταση μέσω του αίματος [161].

Επίσης, τα μακροφάγα όπως πιθανώς και άλλα κύτταρα εντός του στρώματος του όγκου εμπλέκονται στην καρκινική λεμφαγγειογένεση και μετάσταση. Για παράδειγμα, τα σχετιζόμενα με τον όγκο ινοβλαστώματα, που παράγουν υψηλά επίπεδα της υαλουρονάνης προώθησαν την καρκινική λεμφαγγειογένεση, πιθανώς διεγείροντας τα κακοήθη κύτταρα ώστε να εκκρίνουν ειδικούς λεμφαγγειογενετικούς παράγοντες [162].

Από την άλλη πλευρά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των λέμφων παράγουν κυτοκίνες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν τα κύτταρα του όγκου προς τα λεμφαγγεία αξιοποιώντας παρόμοιους μηχανισμούς όπως και για την προσέλκυση λευκοκυττάρων. Για παράδειγμα, ο CCL21 που παράγεται από τα LECs φαίνεται να προσελκύει κάποια καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα τους, CCR7.

Ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας των αγγείων, VEGF, είναι απαραίτητος για την αγγειογένεση του όγκου, γι αυτό και μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν στον παράγοντα αυτό έχουν ήδη εγκριθεί για κλινική χρήση στην θεραπεία διαφόρων ανθρώπινων όγκων. Η υπερλειτουργία του VEGF έχει επίσης αποδειχθεί ότι προάγει τη λεμφαγγειογένεση του όγκου και τη λεμφική μετάσταση σε πειραματικά μοντέλα, αλλά είναι δύσκολο να εκτιμηθεί πόσο άμεσα συνδέεται η δραστηριότητα αυτή με το λεμφικό ενδοθήλιο, δεδομένου ότι ο παράγοντας VEGF στρατολογεί αποτελεσματικά διάφορα μακροφάγα, που εκφράζονται με τον παράγοντα VEGFR-1, που με τη σειρά τους μπορούν να παράγουν VEGF-C και VEGF-D. Επιπλέον, το κλείδωμα του VEGFR-2, που είναι ο βασικός δρόμος για την αγγειογένεση, αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση, αλλά όχι

και τη μετάσταση σε λεμφαδένα, όπως παρατηρήθηκε σε ένα μοντέλο όγκου του προστάτη. Παρ' όλα αυτά, ένας συνδυασμός μικρής παρεμβολής RNA (siRNA), που αδρανοποιεί αμφοτέρους τους παράγοντες VEGF-C και VEGF-A, είναι πιο αποτελεσματικός για την καταστολή των μεταστάσεων στους λεμφαδένες και στους πνεύμονες, σε ένα ανοσοεπαρκές μοντέλο μαστικού καρκίνου σε ποντικό, από όσο η “επίθεση” σε ένα μόνο παράγοντα.

Η αναγκαστική έκφραση του VEGF-C ή VEGF-D σε ξενομοσχεύματα και σε διαγονιδιακούς όγκους έχει ως αποτέλεσμα τη λεμφαγγειογένεση του όγκου και την αυξημένη διάδοσή του στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Αυτό ισχύει ακόμη και σε όγκους που συνήθως δεν κάνουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Αντιστρόφως, το κλείσιμο του δρόμου στον παράγοντα VEGFR-3 είτε με παγίδες τύπου VEGF-C / D είτε με αντισώματα αποκλεισμού του VEGFR-3, καταστέλλει περίπου κατά 60% -70% τις μεταστάσεις στους λεμφαδένες σε μία ποικιλία πειραματικών μοντέλων όγκων. Επίσης τα NP-2 αντισώματα αποκλεισμού έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι μειώνουν τη λεμφαγγειογένεση στους όγκους και τη μετάσταση στους λεμφαδένες, εν μέρει τουλάχιστον, μέσω της καταστολής της μετανάστευσης των ΛΕΚ [163].

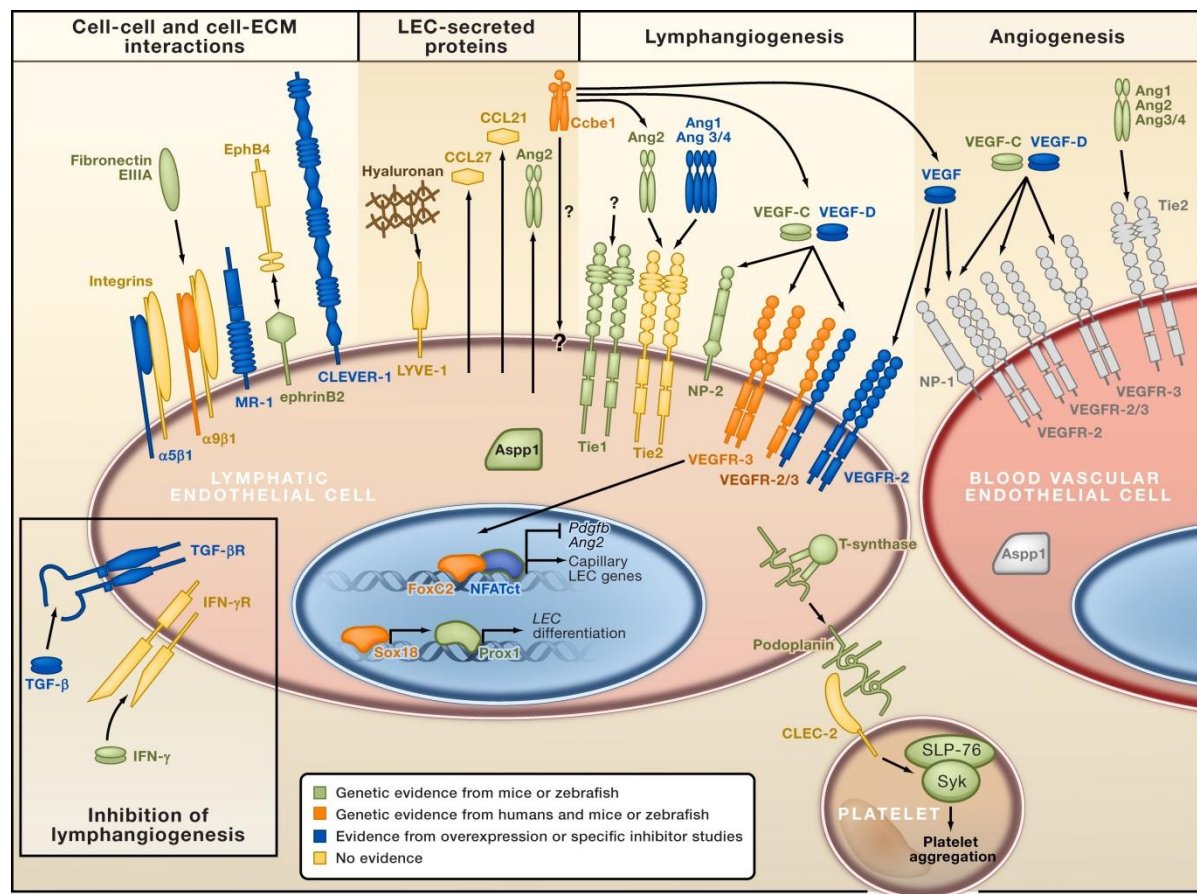
Μελέτες σε ανθρώπινους καρκίνους έχουν δείξει μια άμεση συσχέτιση μεταξύ της συμπεριφοράς των VEGF-C και VEGF-D και της εφόδου στο λεμφικό σύστημα, της μετάστασης στους λεμφαδένες ή και σε μακρινά όργανα, καθώς και της κακής πρόγνωσης επιβίωσης, αλλά όχι και με την πυκνότητα των συναφών με τα λεμφαγγεία όγκων.

Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι VEGF-C και VEGF-D ρυθμίζουν ποιοτικά το λεμφικό αγγειακό σύστημα ώστε να προωθηθεί η μετάσταση όγκων. Πράγματι, μελέτες σε μοντέλα ποντικού χρησιμοποιώντας υψηλής ανάλυσης απεικόνιση δείχνουν ότι η λεμφαγγειογεννητική βλάστηση, που έχει διεγερθεί από τον VEGF-C, κατέληξε στον σχηματισμό διακυτταρικών κενών τα οποία διευκολύνουν την είσοδο καρκινικών κυττάρων του όγκου εντός των λεμφαγγείων.

Ο VEGF-C διευκολύνει επίσης την περιμετρική διεύρυνση των αγγείων συλλογής, οδηγώντας σε αύξηση της ροής της λέμφου και της μεταφοράς των καρκινικών κυττάρων, καθώς και σε μεταφορά των μεγαλύτερων ομάδων καρκινικών κυττάρων

[164]. Πολύ σημαντικό είναι επίσης το ότι τα αγγεία συλλογής λέμφου μπορούν επίσης να δράσουν ως ιστός-ξενιστής για το σχηματισμό δευτερογενούς όγκου, τουλάχιστον σε πειραματικά μοντέλα [164].

Επιπλέον, οι λεμφαγγειογεννητικοί αυξητικοί παράγοντες που δημιουργούνται από τον αρχικό όγκο φαίνεται να δρουν και εξ αποστάσεως ή επάγοντας τη λεμφαγγειογένεση στον “φρουρό-λεμφαδένα”, ακόμη και πριν από την άφιξη των πρώτων μεταστατικών κυττάρων. Έχει προταθεί ότι με τον τρόπο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα προετοιμάζουν το “έδαφος” στο λεμφαδένα, ώστε να καταστεί πιο φιλόξενος για δευτερογενή σχηματισμό όγκων.



Εικ. 14: Σύνοψη των μηχανισμών μοριακής ρύθμισης της λεμφαγγειογένεσης [164].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Α' ΜΕΡΟΥΣ

1. Asellius G. De lactibus sive lacteis venis. JB Bidellium, Milan. 1627
2. Liersch R, Detmar M., Lymphangiogenesis in development and disease, *Thromb Haemost* 2007; 98: 304–310
3. Pepper M, Skobe, M., Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties, *The Journal of Cell Biology*, Volume 163, Number 2, October 27, 2003 209–213
4. Petrova, T.V., T. Makinen, T.P. Makela, J. Saarela, I. Virtanen, R.E. Ferrell, D.N. Finegold, D. Kerjaschki, S. Yla-Herttuala, and K. Alitalo. 2002. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.* 21:4593–4599.
5. Podgrabinska, S., P. Braun, P. Velasco, B. Kloos, M.S. Pepper, D.G. Jackson, and M. Skobe. 2002. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:16069–16074.
6. Hirakawa, S., Y.K. Hong, N. Harvey, V. Schacht, K. Matsuda, T. Libermann, and M. Detmar. 2003. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 162:575–586.
7. Mellman, I., and G. Warren. 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell.* 100:99–112.
8. Schmid-Schönbein, G.W. 1990b. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol. Rev.* 70:987–1028
9. 68. Leak, L.V. 1972. The transport of exogenous peroxidase across the blood- tissue lymph interface. *J. Ultrastruct. Res.* 39:24–42.
10. Leak, L.V. 1976. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. *Fed. Proc.* 35:1863–1871.
11. Leak LV, Jones M (1994) Lymphangiogenesis in vitro: formation of lymphatic capillary-like channels from confluent monolayers of lymphatic endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 30, 512–518.
12. Tan Y (1998) Basic fibroblast growth factor-mediated lymphangiogenesis of lymphatic endothelial cells isolated from dog thoracic ducts: effects of heparin. *Jpn. J. Physiol.* 48, 133–141.
13. Sabin FR (1902) On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.* 1, 367– 391.
14. Sabin FR (1904) On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *Am. J. Anat.* 9, 43–91.
15. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769–778.
16. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 35–45.
17. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. (2002) An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 21, 1505–1513
18. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74–80
19. Ny A, Koch M, Schneider M, et al. A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med* 2005; 11: 998–1004.
20. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/ podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *Embo J* 2003; 22: 3546–3556.

21. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129: 4797–4806.
22. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, et al. Angiopoietin- 2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3: 411–423.
23. Pepper, M.S. 2001. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin. Cancer Res.* 7:462–468.
24. Sleeman, J.P., J. Krishnan, V. Kirkin, and P. Baumann. 2001. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc. Res. Tech.* 55:61– 69.
25. Kriehuber, E., S. Breiteneder-Geleff, M. Groeger, A. Soleiman, S.F. Schoppmann, G. Stingl, D. Kerjaschki, and D. Maurer. 2001. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J. Exp. Med.* 194:797–808.
26. Makinen, T., T. Veikkola, S. Mustjoki, T. Karpanen, B. Catimel, E.C. Nice, L. Wise, A. Mercer, H. Kowalski, D. Kerjaschki, et al. 2001. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 20:4762–4773.
27. Partanen, T.A., K. Alitalo, and M. Miettinen. 1999. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer.* 86:2406–2412.
28. Scavelli C, Weber E, et al., Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and Lymphangiogenesis, *J. Anat.* (2004) 204 , pp433–449
29. Tammela T, Petrova T, Alitalo K, Molecular lymphangiogenesis: new players, *TRENDS in Cell Biology* Vol.15 No.8 August 2005
30. Wirzenius M, VEGFR-2 AND VEGFR-3 SPECIFIC SIGNALING IN LYMPHANGIOGENESIS AND ANGIOGENESIS, ACADEMIC DISSERTATION, Helsinki University Biomedical Dissertations No. 92, 2007
31. Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K., and Stacker, S. A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF- D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 548-553.
32. Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1997). Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 16, 3898-3911.
33. Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Louth, S.-M., Avraham, H., and Wood, W. (1996). Vascular endothelial growth factor related protein: A ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1988-1992.
34. Veikkola, T., Jussila, L., Makinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T. V., Kubo, H., Thurston, G., McDonald, D. M., Achen, M. G., et al. (2001). Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 20, 1223-1231.
35. Baldwin, M. E., Catimel, B., Nice, E. C., Roufail, S., Hall, N. E., Stenvers, K. L., Karkkainen, M. J., Alitalo, K., Stacker, S. A., and Achen, M. G. (2001). The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-D is different in mouse and man. *J Biol Chem* 276, 19166-19171.

36. Siegfried, G. et al. (2003) The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 111, 1723–1732
37. McColl, B.K. et al. (2003) Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J. Exp. Med.* 198, 863–868
38. Stacker, S. A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R. J., Moritz, R., Karpanen, T., et al. (1999). Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 274, 32127-32136.
39. Karpanen, T., Heckman, C. A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., and Alitalo, K. (2006). Functional interaction of VEGF-C and VEGF- D with neuropilin receptors. *Faseb J* 20, 1462-1472.
40. Baldwin, M. E., Halford, M. M., Roufail, S., Williams, R. A., Hibbs, M. L., Grail, D., Kubo, H., Stacker, S. A., and Achen, M. G. (2005). Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 25, 2441-2449.
41. Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 15, 290-298.
42. Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., Jeltsch, M., Jackson, D. G., Talikka, M., Rauvala, H., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5, 74-80.
43. Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., and Alitalo, K. (1996). VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122, 3829-3837.
44. Kerjaschki D, The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis, *J. Clin. Invest.* 115:2316–2319, 2005
45. Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. K., and Alitalo, K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276, 1423-1425.
46. Oh, S. J., Jeltsch, M. M., Birkenhager, R., McCarthy, J. E., Weich, H. A., Christ, B., Alitalo, K., and Wilting, J. (1997). VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Developmental Biology* 188, 96-109.
47. Cao, Y., Linden, P., Farnebo, J., Cao, R., Eriksson, A., Kumar, V., Qi, J.-H., Claesson-Welsh, L., and Alitalo, K. (1998). Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14389-14394.
48. Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M. I., Kholova, I., Kauppinen, R. A., Achen, M. G., Stacker, S. A., et al. (2003). VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 92, 1098-1106.
49. Witzgenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M., Principe, N., Kearney, M., Hu, J.- S., and Isner, J. M. (1998). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 153, 381-394.
50. Ober, E. A., Olofsson, B., Makinen, T., Jin, S. W., Shoji, W., Koh, G. Y., Alitalo, K., and Stainier, D. Y. (2004). Vegfc is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish. *EMBO Rep* 5, 78-84.

51. Marconcini, L., Marchio, S., Morbidelli, L., Cartocci, E., Albini, A., Ziche, M., Bussolino, F., and Oliviero, S. (1999). c-fos- induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9671-9676.
52. Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., and Oliviero, S. (1996) Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11675–11680
53. Orlandini, M., and Oliviero, S. (2001) In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell–cell contact mediated by cadherin- 11. *J. Biol. Chem.* 276, 6576–6581
54. Debinski, W., Slagle-Webb, B., Achen, M. G., Stacker, S. A., Tulchinsky, E., Gillespie, G. Y., and Gibo, D. M. (2001) VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme. *Mol. Med.* 7, 598–608
55. Karpanen T, Alitalo K, VEGF-D: a modifier of embryonic Lymphangiogenesis, Comment on Ny et al, page 1740, *Blood* 1 SEPTEMBER 2008 VOLUME 112, NUMBER 5
56. Pajusola, K., Aprelikova, O., Armstrong, E., Morris, S., and Alitalo, K. (1993). Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 8, 2931- 2937.
57. Borg JP, deLapeyriere O, Noguchi T, Rottapel R, Dubreuil P, Birnbaum D (1995) Biochemical characterization of two isoforms of FLT4, a VEGF receptor-related tyrosine kinase. *Oncogene* 10, 973–984.
58. Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M. J., Wernstedt, C., Alitalo, K., and Claesson-Welsh, L. (2003). Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 278, 40973-40979.
59. Wang, J.-F., Ganju, R., Liu, Z.-Y., Avraham, H., Avraham, S., and Gropman, J. (1997). Signal transduction in human hematopoietic cells by vascular endothelial growth factor related protein, a novel ligand for the FLT4 receptor. *Blood* 90, 3507- 3515.
60. Salameh, A., Galvagni, F., Bardelli, M., Bussolino, F., and Oliviero, S. (2005). Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* 106, 3423-3431.
61. Oliver G, Detmar M. 2002. The rediscovery of the lymphatic system: Old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 16:773–783.
62. Partanen TA, 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.
63. Hamrah P, Chen L, Zhang Q, et al. Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. *Am J Pathol* 2003; 163: 57–68
64. JUSSILA L, ALITALO K, Vascular Growth Factors and Lymphangiogenesis, *Physiol Rev* 82:673-700, 2002.
65. Karkkainen, M. J., Ferrell, R. E., Lawrence, E. C., Kimak, M. A., Levinson, K. L., McTigue, M. A., Alitalo, K., and Finegold, D. N. (2000). Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 25, 153-159.
66. Goldman J, Rutkowski J, et al., Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis, *FASEB J.* 21, 1003–1012 (2007)

67. Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., and Ginty, D. D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
68. Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 12, 13-19.
69. Fuh, G., Garcia, K. C., and de Vos, A. M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem* 275, 26690- 26695. 162. Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem* 276, 18688-18694.
70. Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85, 357-368.
71. Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R., and Neufeld, G. (2001). Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 109, 115-119.
72. Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121, 4309-4318.
73. Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126, 4895-4902.
74. Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005.
75. Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J. A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S. J., Lowenstein, D. H., Skarnes, W. C., Chedotal, A., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25, 43-56.
76. Giger, R. J., Cloutier, J. F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, D. V., Moore, S. E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F. S., et al. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25, 29-41.
77. Brakebusch, C., and Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* 22, 2324-2333.
78. Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Chersesh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502. 1
79. Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., and Varner, J. A. (2000). Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156, 1345-1362.
80. Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., and Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13612-13617.
81. Vlahakis, N. E., Young, B. A., Atakilit, A., and Sheppard, D. (2005). The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J Biol Chem* 280, 4544-4552

82. Wang JF, Zhang XF, Groopman JE. Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem* 2001; 276: 41950–41957.
83. Saharinen, P. et al. (2005) Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J. Cell Biol.* 169, 239–243
84. Maisonpierre, P.C. et al. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55–60
85. Lee, H.J. et al. (2004) Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J.* 18, 1200–1208
86. Jones, N. et al. (2001) Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 257–267
87. Thurston, G. (2003) Role of angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 61–68
88. Fiedler, U. et al. (2004) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 103, 4150–4156
89. Hong YK, Harvey N, Noh YH, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; 225: 351–357.
90. Clemmons, D. R. (1997) *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 45–62.
91. Bjorndahl M, Cao R, et al., Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo, *PNAS*, October 25, 2005, vol. 102, no. 43, 15593–15598
92. Fidler, I. J. (2001) Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In *Cancer Principles and Practice of Oncology* (DeVita, V. T., Jr., Hellman, S., and Rosenberg, S. A., eds) pp. 135–153, Lippincott-Raven, Philadelphia
93. Ruoslahti, E. (1996) How cancer spreads. *Sci. Am.* 275, 72–77
94. Leak, L. V. (1970) Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc. Res.* 2, 361–391
95. Casley-Smith, J. R., and Florey, H. W. (1961) The structure of normal small lymphatics. *Q. J. Exp. Physiol.* 46, 1010–1106
227. Swartz, M. A., and Skobe, M. (2001) Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc. Res. Tech.* 55, 92–99
96. STACKER S, BALDWIN M, ACHEN M., The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread, *FASEB J.* 16, 922–934 (2002)
97. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1–8
98. Hanahan, D., and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364
99. Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995) Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1, 149–153
100. Clarijs, R., Ruiter, D. J., and de Waal, R. M. (2001) Lymphangiogenesis in malignant tumours: does it occur? *J. Pathol.* 193, 143–146
101. Karpanen, T., and Alitalo, K. (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy. *J. Exp. Med.* 194, F37–F42

102. Stacker, S.A., M.G. Achen, L. Jussila, M.E. Baldwin, and K. Alitalo. 2002. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2:573–583.
103. Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T., and Thun, M. (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.* 51, 15–36
104. Dukes, C. E. (1932) The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol.* 35, 323–332
105. Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Cruz, A. B., Foster, R., Gardner, B., Lerner, H., and Margolese, R. (1983) Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52, 1551–1557
106. Witte, M. H., Way, D. L., Witte, C. L., and Bernas, M. (1997) Lymphangiogenesis: mechanisms, significance and clinical implications. In *Regulation of Angiogenesis* (Goldberg, I. D., and Rosen, E. M., eds) pp. 65–112, Birkhäuser Verlag, Basel
107. Reichart, F. L. (1926) The regeneration of the lymphatics. *Arch. Surg.* 13, 871– 881
108. Leu, A. J., Berk, D. A., Lymboussaki, A., Alitalo, K., and Jain, R. K. (2000) Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* **60**, 4324–4327
109. RINDERKNECHT M, DETMAR M, Tumor Lymphangiogenesis and Melanoma Metastasis, *J. Cell. Physiol.* 216: 347–354, 2008.
110. Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K., Detmar, M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 7, 192– 198.
111. Beasley, N. J., Prevo, R., Banerji, S., Leek, R. D., Moore, J., van Trappen, P., Cox, G., Harris, A. L., Jackson, D. G. (2002) Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 62, 1315–1320.
112. Dadras, S. S., Paul, T., Bertocini, J., Brown, L. F., Muzikansky, A., Jackson, D. G., Ellwanger, U., Garbe, C., Mihm, M. C., Detmar, M. (2003) Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am. J. Pathol.* 162, 1951–1960.
113. Hawighorst, T., Oura, H., Streit, M., Janes, L., Nguyen, L., Brown, L. F., Oliver, G., Jackson, D. G., Detmar, M. (2002) Thrombospondin-1 selectively inhibits early- stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene* 21, 7945–7956.
114. Auwera I, Vermeulen P, et al., Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis, *J. Clin. Pathol.* 2004;57;1342-1343
115. Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., Choi, N. C., Mathisen, D., Wain, J., Mark, E. J., Munn, L. L., Jain, R. K. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296, 1883–1886.
116. Wong, S. Y., Haack, H., Crowley, D., Barry, M., Bronson, R. T., Hynes, R. O. (2005) Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res.* 65, 9789–9798.
117. Tobler N, Detmar M, Tumor and lymph node lymphangiogenesis—impact on cancer metastasis, *J. Leukoc. Biol.* 80: 691–696; 2006.
118. Jain, R.K., and Fenton, B.T. (2002). Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 417–421.

119. Alitalo K, Carmeliet P, Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease, CANCER CELL : APRIL 2002 · VOL. 1
120. . Alitalo K, Mohla S, et al., Lymphangiogenesis and Cancer: Meeting Report, CANCER RESEARCH 64, 9225–9229, December 15, 2004
121. Bjorndahl, M. A., Cao, R., Burton, J. B., Brakenhielm, E., Religa, P., Galter, D., Wu, L., Cao, Y. (2005) Vascular endothelial growth factor-A promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 65, 9261–9268.
122. Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiyama, K., Brown, L. F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node
123. Salven, P., Heikkilä, P., and Joensuu, H. (1997) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* **76**, 930–934
124. Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkilä, P., Järvelin, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K., and Joensuu, H. (1998) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am. J. Pathol.* **153**, 103–108
125. Valtola, R., Salven, P., Heikkilä, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R., and Alitalo, K. (1999) VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am. J. Pathol.* **154**, 1381–1390
126. Birck, A., Kirkin, A. F., Zeuthen, J., and Hou-Jensen, K. (1999) Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients. *Melanoma Res.* **9**, 375–381
127. Achen, M. G., Williams, R. A., Minekus, M. P., Thornton, G. E., Stenvers, K., Rogers, P. A. W., Lederman, F., Roufail, S., and Stacker, S. A. (2001) Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J. Pathol.* **193**, 147–154
128. Kajita, T., Ohta, Y., Kimura, K., Tamura, M., Tanaka, Y., Tsunozuka, Y., Oda, M., Sasaki, T., and Watanabe, G. (2001) The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **85**, 255–260
129. Bunone, G., Vigneri, P., Mariani, L., Butti, S., Collini, P., Pilotti, S., Pierotti, M. A., and Bongarzone, I. (1999) Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am. J. Pathol.* **155**, 1967–1976
130. Yonemura, Y., Endo, Y., Fujita, H., Fushida, S., Ninomiya, I., Bandou, E., Taniguchi, K., Miwa, K., Ohoyama, S., Sugiyama, K., and Sasaki, T. (1999) Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1823–1829
131. Akagi, K., Ikeda, Y., Miyazaki, M., Abe, T., Kinoshita, J., Maehara, Y., and Sugimachi, K. (2000) Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br. J. Cancer* **83**, 887–891
132. George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI. 2001. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 3:420–427.
133. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. 2001. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92:556–568.
134. Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB. 2003. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)- A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-

- D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 200;183–194.
135. Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS. 2003. c-MET expression level in primary colon cancer: A predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 9:1480–1488.
 136. Byeon JS, Jung HY, Lee YJ, Lee D, Lee GH, Myung SJ, Yang SK, Hong WS, Kim JH, Min YI, Kim JS. 2004. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C and cyclooxygenase-2 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 19:648–654.
 137. Liu XE, Sun XD, Wu JM. 2004. Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 10:352–355.
 138. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. 2004. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40:13–20.
 139. Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. 2005. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 103:724–730.
 140. Niki, T., Iba, S., Tokunou, M., Yamada, T., Matsuno, Y., and Hirohashi, S. (2000) Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 2431–2439
 141. Rouzaut A, Irigoyen M, et al., Lymphangiogenesis and Lung Cancer, *J Thorac Oncol.* 2007;2: 384–386
 142. Auwera I, Laere S, et al., Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Inflammatory versus Noninflammatory Breast Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Gene Expression Quantification, *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 7965–7971, December 1, 2004
 143. Schoppmann S, Bayer G, et al., Prognostic Value of Lymphangiogenesis and Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer, *Ann Surg* 2004;240: 306–312
 144. Massi D, Puig S, et al., Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case–control study, *J. Clin. Pathol.* 2006;59:166-173
 145. Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohtula T, Salminen JT, Koivistoinen A, Siivola P, Ronnholm R, Ramo JO, Bergman M, Salo JA. Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2971-2979
 146. Tsirlis T, Papastratis G, et al., Circulating lymphangiogenic growth factors in gastrointestinal solid tumors, could they be of any clinical significance?, *World J Gastroenterol* 2008 May 7; 14(17): 2691-2701
 147. Thelen A, Scholz A, et al., Tumor-Associated Lymphangiogenesis Correlates with Lymph Node Metastases and Prognosis in Hilar Cholangiocarcinoma, *Annals of Surgical Oncology* 15(3):791–799, 2008.
 148. Mandriota, S. J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D. G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G., and Pepper, M. S. (2001) Vascular endothelial growth factor-C- mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 20, 672–682
 149. Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M. J., Kubo, H., Ylä-Herttuala, S., Järvelin, M., and Alitalo, K. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 61, 1786–1790

150. Stacker, S. A., Caesar, C., Baldwin, M. E., Thornton, G. E., Williams, R. A., Prevo, R., Jackson, D. G., Nishikawa, S.-I., Kubo, H., and Achen, M. G. (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Med.* **7**, 186–191
151. Skobe M, Hamberg L, et al., Concurrent Induction of Lymphangiogenesis, Angiogenesis, and Macrophage Recruitment by Vascular Endothelial Growth Factor- C in Melanoma, *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 3, September 2001
152. Yanai Y, Furuhata T, Kimura Y, Yamaguchi K, Yasoshima T, Mitaka T, Mochizuki Y, Hirata K. Vascular endothelial growth factor C promotes human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:419–428.
153. Cao R, Bjorndahl M, et al., PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis, *CANCER CELL : OCTOBER 2004 • VOL. 6*
154. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, Kawashima K, Ueda Y, Matsuo K, Awane M, Shimahara Y, Takabayashi A, Yamaoka Y, Satoh S. 2004. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci* 95:328–333.
155. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. 2006. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 66:2650–2657.
156. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wilting J, Sleeman JP. 2003. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 63:713–722.
157. Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. 2005. Inhibition of lymphogenous metastasis using adenoassociated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res* 65:6901–6909.
158. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. 2002. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 94:819–825.
159. Chen Z, Varney ML, Backora MW, Cowan K, Solheim JC, Talmadge JE, Singh RK. 2005. Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res* 65:9004–9011.
160. Παπαναστασόπουλος Π, 2009, Η λεμφαγγειογένεση στην παθοφυσιολογία της καρκινικής νόσου, Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, 20-50, 65-70
161. Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 11: 1287–1296
162. Koyama, H., Kobayashi, N., Harada, M., Takeoka, M., Kawai, Y., Sano, K., Fujimori, M., Amano, J., Ohhashi, T., Kannagi, R., et al. (2008). Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment. *Am. J. Pathol.* **172**, 179–193.
163. Caunt, M., Mak, J., Liang, W.C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R.K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H.B., Ross, J., et al. (2008). Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* **13**, 331–342.

164. T. Tammela and K. Alitalo (2010): "Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise," *Cell*, vol. 140, no. 4, pp. 460–476,

ΜΕΡΟΣ Β: ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

B.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια μεγάλη πρόκληση στη σύγχρονη βιολογία είναι να καταλάβουμε πώς οι μηχανισμοί σε μοριακό επίπεδο οδηγούν σε σύνθετες λειτουργικές δομές στην κλίμακα των ιστών, των οργάνων και των οργανισμών. Παρότι τα πειράματα παρέχουν την απόλυτη επαλήθευση των βιολογικών υποθέσεων, τα μοντέλα και οι υπολογιστικές προσωμοιώσεις είναι όλο και περισσότερο χρήσιμες στο να προτείνουν και τις υποθέσεις και τα πειράματα, ώστε αυτές να επαληθευτούν. Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων που παίζουν βασικό ρόλο στη δημιουργία προτύπων σε κυτταρικό επίπεδο θα βοηθήσει την έρευνα για την θεραπεία αναπτυξιακών ασθενειών όπως ο καρκίνος και για την εύρεση νέων μοριακών τεχνικών.

Σε αντίθεση με τα πειράματα, τα μοντέλα αναπτύσσονται γρήγορα, δεν απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και αλλάζουν εύκολα. Εντούτοις, η αφαίρεση της συνθετότητας των ζωντανών κυττάρων ή των ιστών σε ένα σχετικά απλό μαθηματικό/υπολογιστικό φορμαλισμό είναι δύσκολη. Η δημιουργία μαθηματικών μοντέλων των κυττάρων ή των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων τα οποία μπορούν εύκολα να εισαχθούν σε κάποιο πρόγραμμα απαιτούν δραστικές απλοποιήσεις, διότι κανένα πλήρες μοντέλο δε θα μπορούσε να λυθεί σε μια λογική έκταση χρόνου.

Συνεπώς, η ποιότητα και η αξιοπιστία των μαθηματικών μοντέλων εξαρτάται από το πόσο καλά οι σύνθετες κυτταρικές συμπεριφορές μπορούν να αναπαρασταθούν χρησιμοποιώντας απλοποιημένες μαθηματικές προσεγγίσεις.

Τα μοντέλα σε επίπεδο ιστών εξηγούν πώς οι τοπικές αλληλεπιδράσεις εντός και μεταξύ των κυττάρων οδηγούν στη δημιουργία σύνθετων βιολογικών προτύπων. Οι δύο βασικές προσεγγίσεις στην μοντελοποίηση των ιστών είναι: **(1)** Τα συνεχή μοντέλα, που χρησιμοποιούν πεδία πυκνότητας κυττάρων και μερικές διαφορικές

εξισώσεις (PDE's) για να μοντελοποιήσουν και **(2)** τα μοντέλα βασισμένα σε μοριακούς παράγοντες, τα οποία αναπαριστούν μεμονωμένα κύτταρα και αλληλεπιδράσεις πολύ αναλυτικά. Τα υπολογιστικά πειράματα (in silico experiments) που βασίζονται στην παρακολούθηση αυτών των μοριακών παραγόντων, γίνονται όλο και πιο δημοφιλή επειδή επιτρέπουν τον έλεγχο του επιπέδου της λεπτομέρειας με την οποία το κάθε κύτταρο αναπαρίσταται.

ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΥΞΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF

Ο VEGFR είναι ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης (RTK). Μέσα στα κυτοπλασματικά τους όρια οι RTK έχουν περιοχές, οι οποίες με τη φωσφορυλίωση παρουσιάζουν δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η ενεργοποίηση αυτών των περιοχών, εντούτοις, συμβαίνει μόνο με τον ολιγομερισμό των υποδοχέων. Τα περισσότερα μόρια αυξητικών παραγόντων (στο εξής Α.Π.) είναι πολυσθενείς συνδέτες, δηλαδή ένα μόριο Α.Π. έχει πάνω από μία περιοχή στην οποία μπορεί να συνδεθεί ένας υποδοχέας και άρα μπορεί να συμμετάσχει σε σύνδεση με τόσους υποδοχείς όσες ανάλογες περιοχές διαθέτει[1]. Μαθηματικά μοντέλα πολυσθενών συνδετών/πολυσθενών υποδοχέων (multivalent ligand/multivalent receptor systems) έχουν δημιουργηθεί και αναλυθεί [2,3].

Μία αξιοσημείωτη ιδιότητα που έχουν αυτά τα μοντέλα αφορά την συμπεριφορά της καμπύλης απόκρισης (η οποία, γενικά, αναπαριστά την πιθανότητα ένα κύτταρο μέσα σε ένα κυτταρικό πληθυσμό να ανταποκριθεί σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση συνδέτη). Ενώ η καμπύλη απόκρισης για υποδοχείς που δεν χρειάζονται την ολιγομεροποίηση των υποδοχέων (π.χ. υποδοχείς για G πρωτεΐνες) είναι μονοτονική, ο κορεσμός προς υψηλές συγκεντρώσεις την κάνει με σχήμα καμπάνας; οι κυτταρικές αποκρίσεις απενεργοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις του συνδέτη.

Υπάρχουν πολλές μελέτες πάνω σε μοντέλα αυξητικών παραγόντων/ υποδοχέων

τυροσινικής κινάσης. Οι Mac Gabhann & Popel (2004) μελετούν ένα μοντέλο ανταγωνιστικής πρόσδεσης του VEGF-A και του PlGF (αυξητικός παράγοντας που σχετίζεται με τον πλακούντα) σε παθολογικές περιπτώσεις. Τα μαθηματικά μοντέλα αυτά βοηθούν να γίνει σαφής ο μηχανισμός της συνέργειας αυτής. Τα μοντέλα του Mac Gabhann και Popel (2004) λαμβάνουν υπόψη την ενδοκύτωση των υποδοχέων αλλά όχι το διμερισμό του VEGFR [4]. Σε ένα άρθρο του 2005, οι ίδιοι μελετούν το σύστημα VEGF/VEGF receptor 2 (VEGFR-2)/neuropilin-1 (NRP-1) [5]. Και το VEGFR2 και η νευροπιλίνη 1 όπως ήδη αναλύσαμε στο πρώτο μέρος βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Δεν αλληλεπιδρούν άμεσα αλλά μπορούν να συνδεθούν από ένα ισόμορφο του VEGF το οποίο έχει συνδεδεμένες περιοχές και για τα δύο. Αυτό το μοντέλο λαμβάνει υπόψη τη διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ του VEGFR2 και του NRP-1, αλλά δεν υπολογίζει ούτε την ενδοκύτωση του υποδοχέα ούτε το διμερισμό του VEGFR.

Ένα μοντέλο του PDGF/PDGF υποδοχέα (PDGFR) έχει προταθεί και από τον Park και άλλους [6]. Αυτό το μοντέλο συμπεριλαμβάνει κάποια πρώιμα γεγονότα στην σηματοδοτική αλυσίδα που ενεργοποιείται από την σύνδεση PDGF/PDGFR. Οι συγγραφείς επίσης περιλαμβάνουν ένα εναλλακτικό μοντέλο για το διμερισμό των υποδοχέων, στο οποίο ο διμερισμός συντονίζεται από περιοχές του υποδοχέα που είναι ενεργές ή εκτεθειμένες μόνο όταν οι υποδοχείς είναι προσδεδεμένοι, δημιουργώντας ένα είδος «προ-διμερούς». Ο συνδέτης και ο υποδοχέας θεωρείται ότι συνδέονται και αποσυνδέονται γρήγορα. Η αποσύνδεση ενός από τους προσδέτες από τον υποδοχέα του μέσα σε ένα προ-διμερές οδηγεί στη δημιουργία ενός σταθερού διμερισμένου συμπλόκου.

Το μοντέλο που παρουσιάζεται από τον Park συμφωνεί πολύ με τα πειραματικά δεδομένα. Οι Mac Gabhann & Popel [7] έχουν προτείνει μια στοχαστική ανάλυση της πρόσδεσης του VEGF στους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων. Σε φυσιολογικές περιστάσεις, το VEGF συνήθως βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, συνήθως της τάξεως picomol. Αυτές οι συγκεντρώσεις σημαίνουν λιγότερο από ένα μόριο συνδέτη σε κάθε κυβικό μικρόμετρο υγρού. Τέτοιες χαμηλές

συγκεντρώσεις τους οδηγούν να εξετάσουν την ορθότητα της υπόθεσης της περίσσειας συνδετών και των αποτελεσμάτων αυτών των διακυμάνσεων στην κυτταρική απόκριση, ειδικά σε περιπτώσεις όπου η απόκριση είναι σηματοδοτούμενη από μια συγκέντρωση κατωφλίου (threshold triggered). Υπάρχει συμφωνία ανάμεσα στα στοχαστικά και τα ντετερμινιστικά μοντέλα στο εύρος των συγκεντρώσεων VEGF που συναντάμε σε in vitro πειράματα (της τάξης του nanomol) αλλά σε in vivo περιπτώσεις, δηλαδή, πραγματικά βιολογικά συστήματα, αυτές οι διακυμάνσεις μπορεί να είναι πιο σημαντικές. Ο Alarcon και ο Page επίσης έφτιαξαν μοντέλα τα οποία διαμορφώθηκαν με αλυσίδες Markov και αναλύθηκαν με την Wenzel-Kramers-Brillouin προσέγγιση της δεσπόζουσας εξίσωσης. Συμπεριέλαβαν δε την πρόσδεση, το διμερισμό, και την ενδοκύτωση του συνδέτη και υποδοχέα [1].

Όσον αφορά τη μοντελοποίηση της **λεμφαγγειογένεσης**, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο δύο συνεχή μαθηματικά μοντέλα, το ένα από τους Perper και Lolas [24] και το δεύτερο από τους Friedman και Lolas [25]. Στο πρώτο παρουσιάζεται ένα σύστημα μερικών διαφορικών εξισώσεων που περιγράφει την χωροχρονική εξέλιξη των εξής παραμέτρων: πυκνότητα των ΛΕΚ, πυκνότητα της εξωκυττάριας μήτρας, συγκέντρωση του vegf-c, συγκέντρωση της πλασμίνης της ουροκινάσης και του ενεργοποιητή της. Αυτό το μοντέλο δε λαμβάνει υπόψιν του τον ανταγωνισμό των κυττάρων για χώρο. Στη δεύτερη εργασία [25] παρουσιάζεται επίσης ένα μοντέλο μερικών διαφορικών εξισώσεων και αποδεικνύεται ότι το σύστημα έχει μοναδική λύση για $t > 0$.

B.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ POTTS & COMPUCELL

B.2.1 Glazier-Graner-Hogeweg (GGH) Cellular Potts Model

Το κυτταρικό μοντέλο Potts ή αλλιώς μοντέλο Glazier-Graner-Hogeweg (GGH) [8,9] παρέχει έναν διαισθητικό μαθηματικό φορμαλισμό για να περιγράψει συνολικά τις παρατηρηθείσες κυτταρικές συμπεριφορές και αλληλεπιδράσεις με ένα σχετικά μικρό αριθμό παραμέτρων – πράγμα που το κάνει ελκυστικό και για το χώρο της παραδοσιακής και της υπολογιστικής βιολογίας.

Όπως όλα τα μοντέλα, η GGH τεχνική έχει ένα τυπικό πεδίο εφαρμογής: τη μοντελοποίηση μαλακών ιστών με κινούμενα κύτταρα σε ανάλυση ενός κυττάρου. Το μοντέλο GGH έχει εφαρμοστεί πολλές φορές και επιτυχημένα για να μοντελοποιήσει βιολογικές και βιοϊατρικές διεργασίες, περιλαμβάνοντας: την ανάπτυξη του όγκου [10,11], την αγγειογένεση [12,13], την επούλωση πληγών [14,15,16], την ανάπτυξη αποικιών μυκήτων [17,18] και πολλά ακόμα.

Το GGH μοντέλο αναπαριστά μία περιοχή του χώρου με πολλαπλά κανονικά πλέγματα (το κυτταρικό πλέγμα ή αλλιώς το πλέγμα πεδίου). Τα περισσότερα αντικείμενα στο GGH μοντέλο ζουν σε ένα από αυτά τα πλέγματα. Το πιο θεμελιώδες αντικείμενο στο GGH μοντέλο είναι το γενικευμένο κύτταρο, το οποίο μπορεί να αναπαριστά ένα κύτταρο, ένα υποκυτταρικό κομμάτι, ένα σύνολο κυττάρων, ή ένα κομμάτι μη κυτταρικού υλικού ή αλλιώς το «περιβάλλον μέσο». Κάθε γενικευμένο κύτταρο είναι ένας διευρυμένος χώρος από πιξελ του πλέγματος στο κυτταρικό πλέγμα τα οποία μοιράζονται ένα κοινό δείκτη, που αναφέρεται ως ο κυτταρικός δείκτης σ . Ένα πραγματικό κύτταρο μπορεί να αποτελείται από ένα ή περισσότερα γενικευμένα κύτταρα. Στη δεύτερη περίπτωση το κύτταρο ορίζεται ως

ένα σύνολο γενικευμένων κυττάρων που λέγονται υποκύτταρα, τα οποία μπορούν να περιγράψουν τα μέρη του κυττάρου, σύνθετα κυτταρικά σχήματα, πόλωση κυττάρων κ.ο.κ.

Κάθε γενικευμένο κύτταρο έχει μια σχετική λίστα με ιδιότητες, π.χ. τύπος κυττάρου, μέγεθος επιφάνειας και όγκος, καθώς και πιο σύνθετες ιδιότητες που περιγράφουν την κατάσταση του, τα βιοχημικά δίκτυα, κ.ο.κ. Η περιγραφή αυτών των αλληλεπιδράσεων ορίζουν πώς συμπεριφέρονται τα GGH αντικείμενα.

Η ενεργός ενέργεια (effective energy) H , βλ. Εξίσωση (1), είναι ο πυρήνας των GGH προσωμοιώσεων και λαβαίνει υπ' όψιν τις περισσότερες κυτταρικές ιδιότητες, συμπεριφορές και αλληλεπιδράσεις μέσω όρων περιορισμού στο H . Επειδή η ορολογία έχει οδηγήσει σε συγχύσεις στο παρελθόν, τονίζουμε ότι η ενεργός ενέργεια είναι απλώς ένας τρόπος παραγωγής των επιθυμητών κυτταρικών συμπεριφορών και δεν αποδίδει τη φυσική ενέργεια των κυττάρων. Ένας από τους πιο σημαντικούς όρους της ενεργού ενέργειας περιγράφει τη συνάφεια των κυττάρων. Αν τα κύτταρα δεν «κολλούσαν» το ένα με το άλλο, δε θα υπήρχαν σύνθετοι οργανισμοί. Η συνάφεια παρέχει ένα μηχανισμό για την κατασκευή σύνθετων δομών, αλλά και για τη συγκράτησή τους αφού έχουν δημιουργηθεί.

Για να αναπαραστήσουμε διακυμάνσεις στην ενέργεια λόγω συνάφειας μεταξύ κυττάρων διαφορετικών τύπων ορίζουμε την οριακή ενέργεια που εξαρτάται από το

$J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$, την οριακή ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας ανάμεσα σε δύο

κύτταρα (σ_i, σ_j) δοσμένων τύπων $\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j)$ σε ένα σύνδεσμο (τη διεπιφάνεια ανάμεσα σε δύο γειτονικά πίξελ):

$$H_{boundary} = \sum_{i,j} J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))(1 - \delta(\sigma_i, \sigma_j))$$

Εκτός από την οριακή ενέργεια, οι περισσότερες προσωμοιώσεις περιλαμβάνουν

πειρορισμούς στην κυτταρική συμπεριφορά. Η χρήση περιορισμών για να περιγραφεί μια συμπεριφορά προέρχεται από την κλασική μηχανική. Στα πλαίσια του GGH μοντέλου γράφουμε τις ενέργειες περιορισμού στη γενική ελαστική μορφή

$$H_{\text{constraint}} = \lambda (\text{τιμή} - \text{τιμή στόχος})^2$$

Η ενέργεια περιορισμού είναι μηδέν αν η τιμή = τιμή στόχος, και αυξάνεται όσο η τιμή διαφέρει από την τιμή στόχο. Ο περιορισμός είναι ελαστικός γιατί ο εκθέτης 2 δημιουργεί ένα ιδανικό ελατήριο στα κύτταρα και τα οδηγεί να ικανοποιήσουν τον περιορισμό. Το λ είναι η σταθερά ελατηρίου (πραγματικός θετικός αριθμός), ο οποίος προσδιορίζει το μήκος περιορισμού. Επειδή η ενέργεια περιορισμού μειώνεται αργά μέχρι ένα ελάχιστο όταν ο περιορισμός ικανοποιείται, η δυναμική ελαχιστοποίησης ενέργειας που χρησιμοποιείται στο GGH μοντέλο αυτόματα οδηγεί οποιαδήποτε διαμόρφωση προς αυτή που ικανοποιεί τον περιορισμό. Εντούτοις, εξαιτίας της στοχαστικότητας το πλέγμα των κυττάρων δε χρειάζεται να ικανοποιεί τον περιορισμό ακριβώς σε οποιοδήποτε χρόνο, πράγμα που οδηγεί σε τυχαίες διακυμάνσεις. Επίσης, πολλαπλοί περιορισμοί μπορεί να συγκρούονται, οδηγώντας σε διαμορφώσεις που ικανοποιούν μόνο μερικώς κάποιους από τους περιορισμούς.

Επειδή τα βιολογικά κύτταρα έχουν δεδομένο όγκο κάθε στιγμή, οι περισσότερες προσωμιώσεις GGH χρησιμοποιούν *περιορισμό όγκο*.

Συνοψίζοντας, ένα τυπικό GGH μοντέλο, τα κύτταρα έχουν ορισμένη επιφάνεια, και αλληλεπιδρούν μέσω δυνάμεων συνάφειας επειδή ακουμπούν το ένα στο άλλο, οπότε το H είναι:

$$H = \sum_{\vec{i}, \vec{j}} J(\tau(\sigma_{\vec{i}}), \tau(\sigma_{\vec{j}}))(1 - \delta(\sigma_{\vec{i}}, \sigma_{\vec{j}})) + \sum_{\sigma} [\lambda_{\text{vol}}(\sigma)(v(\sigma) - V_t(\sigma))^2] \quad (1)$$

Το πρώτο άθροισμα, πάνω σε όλα τα ζεύγη των γειτονικών σημείων του πλέγματος \vec{i} και \vec{j} , υπολογίζει την οριακή ή αλλιώς ενέργεια επαφής ανάμεσα σε γειτονικά κύτταρα για να εφαρμόσει συνεκτικές αλληλεπιδράσεις. Η συνάρτηση δέλτα

περιορίζει τη συνεισφορά της ενέργειας επαφής μόνο στις διεπιφάνειες κυττάρου-κυττάρου. Ορίζουμε το $J(\tau(\sigma_i), \tau(\sigma_j))$ ως ένα πίνακα με στοιχεία τα είδη των κυττάρων. Στην πράξη, το εύρος των κυτταρικών τύπων $\tau(\sigma_i)$ είναι αρκετά περιορισμένο, ενώ το εύρος των στοιχείων του πίνακα (σ_i) μπορεί να είναι αρκετά μεγάλο, αφού το σ απαριθμεί όλα τα γενικευμένα κύτταρα στην προσωμοίωση. Υψηλότερες ενέργειες επαφής ανάμεσα στα κύτταρα οδηγούν σε μεγαλύτερη άπωση μεταξύ των κυττάρων και χαμηλότερες σε μεγαλύτερη συνάφεια μεταξύ των κυττάρων.

Ο δεύτερος όρος στην (1), που αφορά όλα τα γενικευμένα κύτταρα υπολογίζει την ενεργό ενέργεια λόγω του περιορισμού όγκου (volume constraint). Οι αποκλίσεις του όγκου του κυττάρου σ από την τιμή-στόχο $V_t(\sigma)$ αυξάνουν την ενεργό ενέργεια. Κατά μέσο όρο, ένα κύτταρο θα καταλάβει έναν αριθμό πίξελ λίγο μικρότερο από τον όγκο-στόχο, λόγω επιφανειακών τάσεων από τις ενέργειες επαφής J . Η παράμετρος λ_{vol} συμπεριφέρεται σαν το μέτρο Young, ή την αντίστροφη συμπιεστότητα, με υψηλές τιμές να μειώνουν τις διακυμάνσεις του όγκου του κυττάρου. Από τον περιορισμό όγκου μπορούμε να ορίσουμε το μέγεθος:

$P = 2\lambda_{vol} (\sigma)(v(\sigma) - V_t(\sigma))$ ως την πίεση εντός του κυττάρου. Με παρόμοιο τρόπο μπορούμε να εφαρμόσουμε περιορισμούς ως προς την επιφάνεια του κυττάρου, δηλαδή την επιφάνεια της μεμβράνης.

Η δυναμική του κυττάρου στο GGH μοντέλο παρέχει μια απλουστευμένη αναπαράσταση της κινητικότητας του κυττάρου λόγω του κυτταροσκελετού του. Χρησιμοποιεί ένα τροποποιημένο στοχαστικό αλγόριθμο Metropolis που αποτελείται από μια σειρά από απόπειρες αντιγραφής της μήτρας (βλ. Εικ.1 και 2). Πριν από κάθε απόπειρα, ο αλγόριθμος διαλέγει τυχαία ένα σημείο-στόχο μέσα στο πλέγμα του κυττάρου \vec{i} , και ένα γειτονικό σημείο-πηγή \vec{i}' . Αν διαφορετικά

γενικευμένα κύτταρα καταλαμβάνουν αυτές τις θέσεις, ο αλγόριθμος θέτει το $\sigma_i = \sigma_i'$ με την πιθανότητα $P(\sigma_i \rightarrow \sigma_i')$ να δίνεται από το λόγο αποδοχής Boltzmann:

$$P(\sigma_i \rightarrow \sigma_i') = \begin{cases} 1 & : \Delta H \leq 0 \\ e^{-\Delta H/T_m} & : \Delta H > 0 \end{cases} \quad (2)$$

Όπου, ΔH είναι η αλλαγή στην αναγκαία ενέργεια αν συμβαίνει η αντιγραφή και T_m είναι μία παράμετρος που περιγράφει το πλάτος κύματος των διακυμάνσεων της κυτταρικής μεμβράνης. Η T_m μπορεί να προσδιοριστεί συνολικά ή να είναι συγκεκριμένη ως προς το κάθε κύτταρο ή τον τύπο του κυττάρου.

Η μέση τιμή του λόγου $\Delta H/T_m$ για ένα δοσμένο γενικευμένο κύτταρο ορίζει το πλάτος κύματος των διακυμάνσεων των τοιχωμάτων των κυττάρων. Υψηλό $\Delta H/T_m$ έχει σαν αποτέλεσμα άκαμπτα, ελάχιστα ή καθόλου κινητικά κύτταρα και μικρή αναδιάταξη των κυττάρων. Για πολύ χαμηλό $\Delta H/T_m$ τα κύτταρα μπορεί να αποκοπούν με την απουσία ενός περιορισμού επαρκούς για να διατηρήσει την ακεραιότητα των συνόρων μεταξύ τους. Επειδή ο $\Delta H/T_m$ είναι ένας λόγος, μπορούμε να πετύχουμε κατάλληλες κινητικότητες των κυττάρων μεταβάλλοντας είτε το T_m ή το ΔH . Μεταβάλλοντας το T_m μπορούμε να διερευνήσουμε τις συνολικές συνέπειες στην κυτταρική δραστηριότητα. Η μεταβολή του ΔH μας επιτρέπει να ελέγξουμε τη σχετική κινητικότητα των τύπων των κυττάρων ή των μεμονωμένων κυττάρων μεταβάλλοντας, παραδείγματος χάριν, την αντίστροφη συμπιεστότητα των κυττάρων (λ_{vol}), τον όγκο αναφοράς (V_t) ή τις ενέργειες επαφής (J).

Ένα αντίγραφο μήτρας που αυξάνει την αναγκαία ενέργεια, π.χ. με την αύξηση των αποκλίσεων από τις τιμές αναφοράς για τον κυτταρικό όγκο ή την περιοχή της επιφάνειας ή αντιπαραβάλλοντας αλληλοαπωθούμενα κύτταρα, είναι απίθανο.

Άρα, η δομή των κυττάρων εξελίσσεται με ένα τρόπο συνεπή με τις σχετικές με τη βιολογία οδηγίες, ενσωματωμένες στην ενέργεια: τα κύτταρα διατηρούν όγκους κοντά στις τιμές αναφοράς τους, αλληλοελκόμενα κύτταρα κολλάνε μεταξύ τους, αλληλοαπωθούμενα κύτταρα διαχωρίζονται κτλ.

Ο αλγόριθμος Metropolis εξελίσσει τη διαμόρφωση του κυτταρικού πλέγματος έτσι ώστε ταυτόχρονα να ικανοποιεί τους περιορισμούς, στο βαθμό που είναι συμβατοί, με τέλεια απόσβεση (δηλ. οι μέσες ταχύτητες είναι ανάλογες στις δυνάμεις που εφαρμόζονται). Άρα, η μέση εξέλιξη στο χρόνο του κυτταρικού πλέγματος ανταποκρίνεται στο ντετερμινιστικά εφικτό χρησιμοποιώντας μεθοδολογίες πεπερασμένων στοιχείων ή κεντρικού μοντέλου με τέλεια απόσβεση.

Ένα βήμα Monte Carlo (MCS) ορίζεται σαν N απόπειρες αντιγραφής μήτρας, όπου N ο αριθμός των περιοχών στο κυτταρικό πλέγμα, και θέτει τη φυσική μονάδα του χρόνου στο μοντέλο. Η μετατροπή μεταξύ MCS και πειραματικού χρόνου εξαρτάται από τη μέση τιμή $\Delta H/Tm$. Σε περιπτώσεις με νόημα για τη βιολογία, το MCS και ο πειραματικός χρόνος είναι ανάλογοι [19,20].

Πέρα από το γενικευμένα κύτταρα, ένα μοντέλο GGH μπορεί να περιέχει και άλλα αντικείμενα όπως *χημικά πεδία* και *βιοχημικά δίκτυα* όπως επίσης και *βοηθητικές εξισώσεις* για να περιγράψει συμπεριφορές όπως η ανάπτυξη των κυττάρων, η διαίρεση και διαφοροποίηση βάση κανόνων. Τα *πεδία* εξελίσσονται λόγω έκχυσης, διάχυσης, αντίδρασης και αποσύνθεσης σύμφωνα με κατάλληλες μερικές διαφορικές εξισώσεις. Παρότι πολύπλοκες συζευγμένες PDE's είναι επιτεύξιμες, τα περισσότερα μοντέλα απαιτούν μόνο έκχυση, διάχυση, αντίδραση και αποσύνθεση. Υποκυτταρικά βιοχημικά δίκτυα συνήθως περιγράφονται από *συνήθεις διαφορικές εξισώσεις (ODE's)* εντός μεμονωμένων γενικευμένων κυττάρων.

Εξοκυτταρικά χημικά πεδία και ενδοκυτταρικά δίκτυα επηρεάζουν τις συμπεριφορές των γενικευμένων κυττάρων τροποποιώντας την συνολική ενέργεια (δηλ. οι αλλαγές στον όγκο του κυττάρου αναφοράς λόγω χημικής απορρόφησης,

χημειότητας σε απόκριση ενός πεδίου συγκέντρωσης ή λόγω κυτταρικής διαφοροποίησης).

Από την πλευρά ενός δημιουργού μοντέλου η τεχνική GGH έχει σημαντικά **πλεονεκτήματα** σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Ένας απλός επεξεργαστής μπορεί να τρέξει μια προσωμοίωση GGH δεκάδων έως εκατοντάδων χιλιάδων κυττάρων σε πλέγματα έως 1024^3 σημείων. Λόγω αυτού του πλέγματος, οι προσωμοιώσεις GGH είναι συχνά πολύ πιο γρήγορες από τις αντίστοιχες προσωμοιώσεις πεπερασμένων στοιχείων, που λειτουργούν στην ίδια χωρική διακριτότητα και στο ίδιο επίπεδο λεπτομέρειας της μοντελοποίησης.

Για μικρότερες προσωμοιώσεις, η ταχύτητα του GGH επιτρέπει τη διερεύνηση των επιπτώσεων των παραμέτρων, τις αρχικές συνθήκες ή τις λεπτομέρειες των βιολογικών μοντέλων. Η πρόσθεση βιολογικών μηχανισμών στη GGH είναι τόσο απλή όσο και η προσθήκη νέων όρων στην ενεργό ενέργεια. Οι λύσεις GGH είναι συνήθως δομικά σταθερές, έτσι ώστε η ακρίβεια να μειώνεται κομψά, όσο η ανάλυση μειώνεται. Η ικανότητα να μοντελοποιούμε τα κύτταρα ως παραμορφώσιμες οντότητες, επιτρέπει στους μοντελιστές να εξερευνήσουν φαινόμενα όπως η ακρορριζική στένωση, που οδηγεί σε κυματισμούς, οι οποίοι είναι πολύ πιο δύσκολο να μοντελοποιηθούν, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, κεντροποιημένα μοντέλα.

Ωστόσο, η παρουσίαση των κυττάρων που βασίζεται σε “πλεγματική” βάση έχει και αυτή κάποια **μειονεκτήματα**.

Η κυτταρική επιφάνεια είναι “πιξελοποιημένη”, πράγμα που περιπλέκει της μετρήσεις της επιφάνειας και της καμπυλότητας. Η προκαθορισμένη διακριτοποίηση κάνει τη μοντελοποίηση των ινών ή των μεμβρανών πολύ ακριβή, αφού η σταθερά του πλέγματος πρέπει να ρυθμιστεί με τη μικρότερη κλίμακα ώστε να αναπαρίσταται με ακρίβεια. Οι διακυμάνσεις επίσης της κυτταρικής μεμβράνης παριστάνονται ως καρικατούρες, ως αποτέλεσμα της σταθερής χωρικής ανάλυσης. Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες εκδόσεις του CC3D υποστηρίζουν ένα στρώμα με

συνδέσεις πεπερασμένων στοιχείων, που έχουν σχεδόν μηδενική διάμετρο. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για να αναπαραστήσουν ίνες ή μεμβράνες, επιτρέποντας στην προσωμοίωση να συνδυάσει τα πλεονεκτήματα και των δύο μεθόδων, με κόστος απλώς αυτό που έχει ένα μοντέλο αυξημένης πολυπλοκότητας.

Επιπλέον, η μέγιστη ταχύτητα με την οποία τα κύτταρα μπορούν να κινούνται στο πλέγμα των κυττάρων είναι περίπου 0,1 pixel ανά MCS, το οποίο διαμορφώνει συχνά μια χρονική ανάλυση λεπτότερη από ό,τι απαιτείται για άλλες διαδικασίες σε μια προσωμοίωση.

Ένα πιο θεμελιώδες ζήτημα είναι ότι τα δημιουργούμενα από την CC3D κύτταρα, κινούνται καταστρέφοντας και δημιουργώντας pixels, με αποτέλεσμα να απουσιάζει η κίνηση άκαμπτου σώματος και η συναγωγή (advection) εκτός εάν εφαρμόζονται ρητά. Το πρόγραμμα CC3D -που θα αναλύσουμε παρακάτω- παρέχει εργαλεία και για τις δύο περιπτώσεις. Οι προσωμοιωτές άκαμπτων σωμάτων στη CC3D είναι όλο και πιο δημοφιλείς, αλλά οι επιλυτές (solvers) για συναγωγή ελάχιστα έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα.

Η διαμόρφωση του GGH προέρχεται από τη στατιστική φυσική. Κατά συνέπεια, μερικές από τις ορολογίες και τις έννοιές του μπορεί αρχικά να φαίνονται αταίριαστες στους βιολόγους. Για να συνδέσουμε πειραματικά μετρούμενες ποσότητες με τις παραμέτρους προσωμοίωσης, χρησιμοποιούμε μια σειρά από πειραματικές και αναλυτικές τεχνικές, ώστε να εξαγάγουμε τις τιμές των παραμέτρων.

Για παράδειγμα, ακόμα και αν δεν είναι προσβάσιμη σε ένα πείραμα η κατά GGH ενδογενής κυτταρική κινητικότητα, η σταθερά διάχυσης των κυττάρων σε συσσωματώματα μπορεί να μετρηθεί και με προσωμοίωση και πειραματικά. Μπορούμε στη συνέχεια να ρυθμίσουμε την κινητικότητα GGH, ώστε να ταιριάζουν οι σταθερές της διάχυσης. Ομοίως, μπορούμε να καθορίσουμε την κατάλληλη μορφή και αντοχή της χημειοτακτικής συμπεριφοράς των κυττάρων, από πειραματικές καμπύλες απόκρισης ανά δόση, της μετακίνησης ενός κυττάρου, ως η

αντίδρασή του στη κλιμακωτή συγκέντρωση κάποιου συγκεκριμένου χημειοτακτικού παράγοντα. Για παράδειγμα, εάν έχουμε ένα κύτταρο δεδομένου τύπου και με δεδομένη βαθμίδα συγκέντρωσης σε ένα δεδομένο περιβάλλον που κινείται με μια δεδομένη ταχύτητα, μπορούμε να εντάξουμε στη συνέχεια τις χημειοτακτικές παραμέτρους του GGH έτσι ώστε τα προσωμοιωμένα κύτταρα να αναπαράγονται με την ίδια ταχύτητα.

Επίσης μπορούν να ρυθμιστούν στο GGH και οι μεταξύ των κυττάρων ενεργειακές ποσότητες διεπαφής, ώστε να παρέχουν πειραματικά προσιτές επιφανειακές εντάσεις μεταξύ των ιστών. Όταν δεν είναι διαθέσιμες οι πειραματικές τιμές των παραμέτρων, εκτελούμε μια σειρά από προσωμοιώσεις μεταβάλλοντας την(ις) άγνωστη(ες) παράμετρο(ες) και εφαρμόζουμε ένα μακροσκοπικό δυναμικό μοτίβο, το οποίο μπορούμε να καθορίσουμε πειραματικά ώστε να ταιριάζει. Για να επιταχυνθεί η εκτέλεση, τα μοντέλα CompuCell3D συχνά μειώνουν τις τρισδιάστατες προσωμοιώσεις στις ανάλογές τους δισδιάστατες.

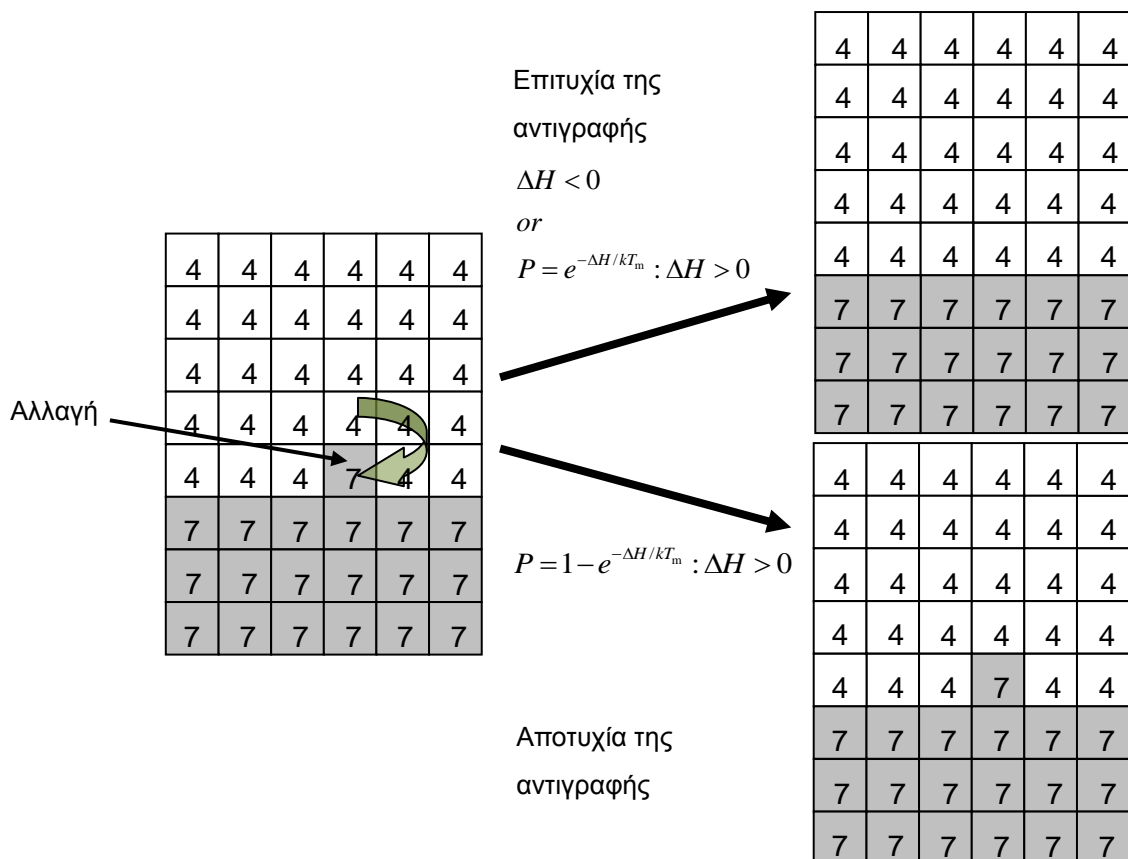
Ενώ η μετάβαση από 3D σε 2D ή το αντίστροφο είναι πολύ πιο εύκολες σε CC3D, από ό,τι σε μια προσαρμοστική προσωμοίωση πεπερασμένης οπτικής διακριτότητας, ο φορμαλισμός των GGH εξακολουθεί να απαιτεί επανακλιμακώσεις των περισσότερων παραμέτρων του μοντέλου. Επί του παρόντος, τέτοια επανακλιμακώσεις πρέπει να γίνονται με το χέρι. Π.χ. σε 2D, ένα pixel σε σύνηθες τετράγωνο πλέγμα έχει 4 πλησιέστερους γείτονες, ενώ σε 3D θα έχει 6 πλησιέστερους γείτονες. Ως εκ τούτου σε όλες τις παραμέτρους που αφορούν επιφάνειες (π.χ. ο περιορισμοί σχετικοί με το εμβαδόν της επιφάνειας, ή με τις ενεργειακές ποσότητες διεπαφής) πρέπει να γίνεται κατάλληλη αναπροσαρμογή των κλιμάκων.

Για την απλοποίηση των υπολογισμών που σχετίζονται με τη διάχυση, εμείς συχνά υποθέτουμε ότι η διάχυση λαμβάνει χώρα ομοιόμορφα παντού στο χώρο, με τα κύτταρα που εκκρίνουν ή την απορροφούν χημικές ουσίες να βρίσκονται στα κέντρα μάζας τους. Αυτή η προσέγγιση δημιουργεί μια καρικατούρα της

πραγματικής διάχυσης, όπου τα χημικά εκκρίνονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και διαχέονται κυρίως στον εξωκυτταρικό χώρο, και η οποία μπορεί η ίδια δημιουργεί ανισότροπη διάχυση, ή ακόμη και να εμποδίζει τη διάχυση.

Δεδομένου δε ότι οι περισσότεροι CC3D προσωμοιώσεις παραβλέπουν μεσοκυττάρια διαστήματα μικρότερα από ένα ή δυο μικρά, προσεγγίζουμε την πραγματική εξωκυτταρική διάχυση με κατάλληλη επιλογή του συντελεστή διάχυσης CC3D, έτσι ώστε το αποτελεσματικό μήκος διάχυσης στην προσωμοίωση να αντιστοιχεί σε αυτό που μετρήθηκε στο πείραμα.

Εικ.1: Αναπαράσταση της απόπειρας αντιγραφής δύο κυττάρων σε ένα διδιάστατο τετράγωνο πλέγμα. Το άσπρο πιξελ (πηγή) επιχειρεί να αντικαταστήσει το γκρι (στόχος). Η πιθανότητα αποδοχής αυτής της αλλαγής δίνεται από την εξίσωση (2)

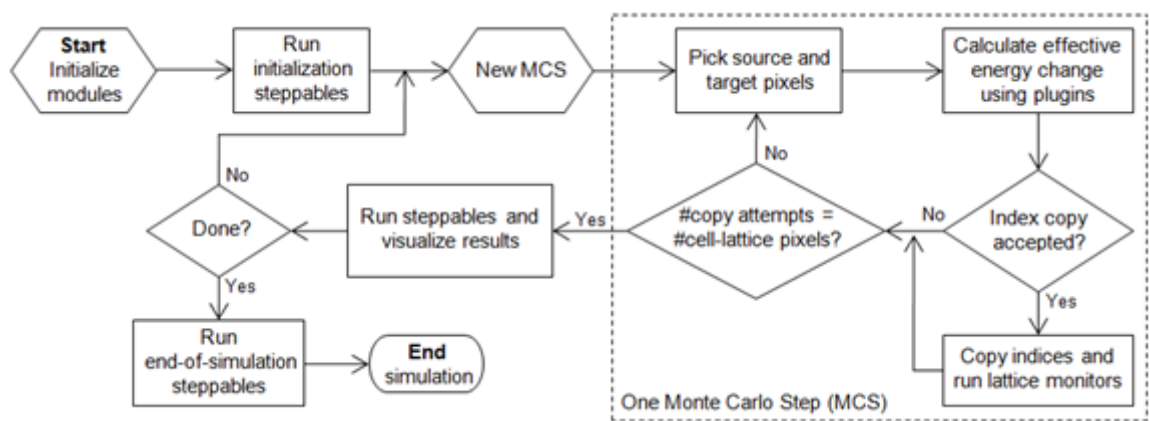


B.2.2 COMPUCELL 3D

Το CompuCell 3d είναι ένα πρόγραμμα που επιτρέπει στους χρήστες να διαμορφώνουν σύνθετα μοντέλα βασισμένα στο κυτταρικό μοντέλο Potts πιο εύκολα και γρήγορα από ό,τι θα γινόταν αν κανείς ξεκινούσε από το μηδέν, διευκολύνει επίσης την επαναχρησιμοποίηση του μοντέλου. Ένα μοντέλο CC3D αποτελείται από CC3DML σενάρια (scripts) σε μορφή XML, σενάρια Python και αρχεία που εξειδικεύουν τις αρχικές συνθήκες οποιωνδήποτε πεδίων και του πλέγματος κυττάρων. Τα CC3DML σενάρια ορίζουν τις βασικές GGH παραμέτρους όπως οι διαστάσεις του πλέγματος, οι τύποι των κυττάρων, οι βιολογικοί μηχανισμοί αλλά και τη σύνδεση με εξωτερικά αρχεία. Τα Python σενάρια ελέγχουν την κατάσταση της προσωμοίωσης και εφαρμόζουν τις αλλαγές στις κυτταρικές συμπεριφορές π.χ. αλλαγή του είδους του κυττάρου με βάση την μερική πίεση του οξυγόνου σε μοντέλο όγκου.

Το CompuCell3d είναι τμηματικό πρόγραμμα (modular), γι αυτό κάθε φορά «φορτώνει» μόνο τα τμήματα που χρειάζονται για ένα συγκεκριμένο μοντέλο. Τα τμήματα που υπολογίζουν τους όρους της ενεργού ενέργειας ή καταγράφουν γεγονότα στο πλέγμα των κυττάρων λέγονται *πρόσθετα* (plugins). Οι υπολογισμοί της ενεργού ενέργειας προκαλούνται σε κάθε απόπειρα αντιγραφής ενός πίξελ της μήτρας, ενώ τα πρόσθετα που παρακολουθούν το πλέγμα τρέχουν κάθε φορά που συμβαίνει μια αντιγραφή στη μήτρα. Επειδή τα πρόσθετα είναι τα πιο συχνά καλούμενα τμήματα του CC3D είναι γραμμένα σε γλώσσα C++ για ταχύτητα. Τα τμήματα που λέγονται *βηματικές* (steppables) συνήθως εκτελούν λειτουργίες στα κύτταρα και όχι στα πίξελ. Οι βηματικές καλούνται σε καθορισμένα διαστήματα μετρημένα σε βήματα Monte Carlo. Οι βηματικές έχουν τρεις χρήσεις: 1) Να αυξομοιώνουν τις κυτταρικές παραμέτρους σε απόκριση των γεγονότων της

προσωμίωσης, 2) να λύνουν μερικές διαφορικές εξισώσεις, 3) να φορτώνουν τις αρχικές συνθήκες ή να σώζουν τα αποτελέσματα των προσωμοιώσεων. Οι περισσότερες βηματικές εκτελούνται σε Python.



Εικ.2 Διάγραμμα ροής του αλγόριθμου GGH όπως εκτελείται στο cc3d [από 21].

B. 3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ & ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα απλό τρισδιάστατο μοντέλο λεμφαγγειογένεσης. Στο μοντέλο μας έχουμε δύο είδη γενικευμένων κυττάρων, τα ενδοθηλιακά, τα καρκινικά και το διάμεσο χώρο.

Οι διατάσεις του πλέγματός μας είναι 70x 70x 100 (τυχαία επιλογή διαστάσεων, αναλύεται παρακάτω). Το κάθε voxel έχει πλευρά που αντιστοιχεί σε 4 μm, άρα ο όγκος του voxel είναι $64\mu\text{m}^3$. Σύμφωνα με τους δημιουργούς του compucell η πυκνότητα του ενδιάμεσου χώρου είναι παρόμοια με αυτή του νερού. Άρα η ολική μάζα του υγρού στην προσωμοίωση είναι $70 \times 70 \times 80 \times (4\mu\text{m})^3 \text{ g/cm}^3 = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ g}$.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου σε πειράματα κινούνται με ταχύτητα περίπου 0.4μm/min και τα κύτταρα στην προσωμοίωση κινούνται με ταχύτητα 0.1 pixel/MCS, άρα στην προσωμοίωσή μας ένα MC βήμα αντιστοιχεί σε 1 min.

Ο καρκινικός όγκος θεωρείται μια σφαίρα με ακτίνα 12 voxel = 48 μm

1^η σειρά προσωμοιώσεων: Έκκριση VEGF από τον όγκο

Στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, ο αυξητικός παράγοντας VEGF εκκρινόταν μόνο από τον όγκο, με ταχύτητα 0,013 (50 pg/(cell h) = 0,013 pg/voxel MCS). Στο πεδίο *Secretion Type* (τύπος έκκρισης) διαλέγουμε Uniform, ώστε κάθε πίξελ ενδοθηλιακού κυττάρου να εκκρίνει το ίδιο ποσόν VEGF με την ίδια ταχύτητα. Το CC3D δεν έχει εγγενείς μονάδες μέτρησης οπότε το ποσό του εκλυόμενου χημικού παράγοντα μπορεί να μεταφραστεί σε μονάδες mole, αριθμό μορίων ή γραμμάρια.

Όσον αφορά το πεδίο της χημειόταξης (*Chemotaxis*) διαλέγουμε μια τιμή Λ ίση με 5000 και τύπο *regular*. Αυτό σημαίνει ότι η απόκριση του κυττάρου στη βαθμίδα συγκέντρωσης είναι γραμμική: η δύναμη της χημειόταξης εξαρτάται από το γινόμενο του Λ και του ρυθμού έκκρισης.

Ο όγκος-στόχος των κυττάρων τίθεται ίσος με 60 voxel, αφού υποθέτουμε ότι τα κύτταρα δεν διαιρούνται ή μεγαλώνουν κατά τη διάρκεια της μορφοποίησης.

Όσον αφορά τις ενέργειες μεταξύ των διάφορων τύπων κυττάρων:

Στα πειράματα, απουσία αυξητικών παραγόντων, δε δημιουργείται δίκτυο λεμφαγγείων και τα κύτταρα προσκολλώνται μεταξύ τους δημιουργώντας ομάδες. Οπότε θέτουμε το $J_{e-e}=5$, το $J_{M-M}=0$ (ουδέτερος διάμεσος χώρος) και το $J_{e-t}=5$ (υποθέτουμε δηλαδή ότι όταν έρθει σε επαφή ο όγκος με το λεμφαγγείο αυτή ευνοείται). Θέτουμε την παράμετρο Neighbor order ίση με 4 που σημαίνει ότι το πρόγραμμα σε κάθε βήμα Monte Carlo λαμβάνει υπόψη του για κάθε κύτταρο τους 4 κοντινότερους γείτονές του.

1^η σειρά- αποτελέσματα

Τρέχοντας την προσωμοίωση με το VEGF να εκκρίνεται μόνο από τον όγκο, παρατηρήσαμε ότι τα λεμφοκύτταρα μετακινούνταν πολύ αργά και **όχι σε μορφή κλάδων** προς τον όγκο. Αυτό μας έκανε να σκεφτούμε ότι η έκκριση VEGF από τον όγκο είναι μεν επαρκής μηχανισμός για την αύξηση του μεγεθους των λεμφοκυττάρων, πράγμα που έχει παρατηρηθεί και πειραματικά, αλλά δεν είναι επαρκής για τη διάταξη των λεμφοκυττάρων σε μορφή κλάδων.

Γι αυτό επιλέξαμε να εξετάσουμε την περίπτωση λεμφαγγειογένεσης μέσω **αυτοκρινούς σηματοδότησης του VEGF-C**. Η δεύτερη περίπτωση, τα ίδια τα λεμφαγγεία να παράγουν VEGF-C και τα ίδια να το καταναλώνουν μέσω της πρόσδεσής του με τον υποδοχέα VEGFR-3 προκαλώντας λεμφαγγειογένεση, έχει παρατηρηθεί σε αρκετά *in vitro* πειράματα [22,23]. Συνήθως ο όγκος σ αυτή την

περίπτωση εκκρίνει κάποιο σηματοδοτικό μόριο (όπως ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP- δ [23]) ο οποίος **επιταχύνει** την παραγωγή VEGF-C από τα λεμφοκύτταρα.

2^η σειρά προσωμοιώσεων: αυτοκρινής σηματοδότηση του VEGF

Στη δεύτερη σειρά εκτελέσεων του προγράμματος λοιπόν γράψαμε τον κώδικα έτσι ώστε το VEGF να εκκρίνεται από τα ίδια τα λεμφοκύτταρα. Στην προσωμοίωσή μας τα λεμφοκύτταρα:

α) εκκρίνουν το χημειοτακτικό παράγοντα, β) κινούνται (με ψευδοπόδια, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων) προς τον παράγοντα αυτό, εκτός αν η παρεμπόδιση λόγω επαφής τοπικά εμποδίζει την ανάπτυξη ψευδοποδίων.

Άρα η σύνδεση κυττάρου-κυττάρου εμποδίζει την ανάπτυξη ψευδοποδίων ενώ οι ασύνδετες επιφάνειες κυττάρων συνεχίζουν να εκτείνουν ψευδοπόδια προς την πηγή του αυξητικού παράγοντα. Στην απλή εφαρμογή του GGH μοντέλου, η ταχύτητα των κυττάρων είναι ανάλογη της «έντασης» της συγκέντρωσης του χημικού παράγοντα, σε γενική συμφωνία με τα πειράματα. Το GGH μοντέλο αναπαριστά φυσικά τη στοχαστική, εξερευνητική συμπεριφορά των μετακινούμενων κυττάρων, μοντελοποιώντας την ως βεβιασμένη δημιουργία και απόσυρση ψευδοποδίων, αντί για την κίνηση των μορίων λόγω μιας δύναμης που ασκείται στο κέντρο της μάζας τους, κάτι που είναι βιολογικά αδύνατον.

Η εξίσωση που περιγράφει το πεδίο συγκέντρωσης του VEGF είναι η εξής:

$$\frac{\partial V(\vec{x})}{\partial t} = D_{\text{VEGF}}^{\text{EC}} \nabla^2 V(\vec{x}) - \gamma_{\text{VEGF}} V(\vec{x}) \delta(\tau(\sigma(\vec{x})), M) + S^{\text{EC}} \delta(\tau(\sigma(\vec{x})), EC)$$

όπου το $\delta(\tau(\sigma_{\vec{x}}), EC) = 1$ μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και 0 οπουδήποτε αλλού

ενώ το $\delta(\tau(\sigma_{\vec{x}}), M) = 1$ μέσα στο διάμεσο χώρο και 0 αλλού. Για τη σταθερά

διάχυσης για το VEGF υπάρχουν πολλές τιμές στη βιβλιογραφία, διαλέγουμε την

τιμή $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ η οποία βρίσκεται σ' αυτό το εύρος και χρησιμοποιείται από τους Perper και Lolás [24]. Με μετατροπή σε voxel παίρνουμε την τιμή 0,1 voxel²/MCS.

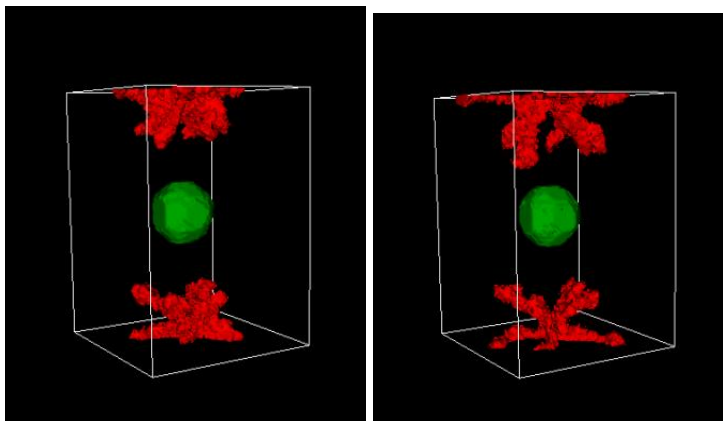
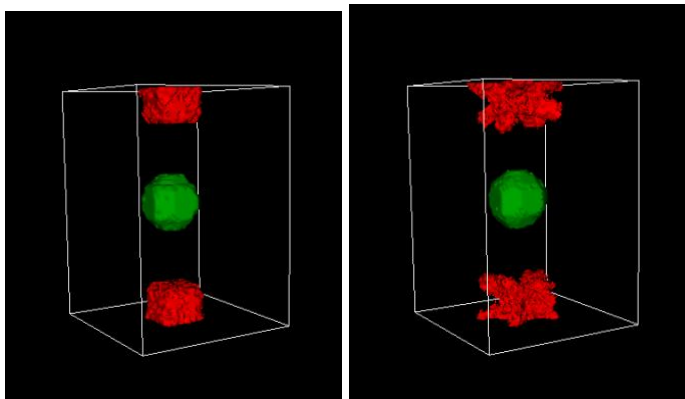
(Σημείωση: Η κίνηση των κυττάρων και οι διακυμάνσεις στις τοπικές σταθερές διάχυσης σημαίνει ότι η διάχυση συμβαίνει σε ένα περιβάλλον με κινούμενες οριακές συνθήκες και συχνά με συναγωγή. Αυτοί οι περιορισμοί αποκλείουν τις εξεζητημένες μεθόδους επίλυσης εξισώσεων και οδήγησαν τους δημιουργούς του CompuCell στη χρήση απλών μεθόδων forward Euler που μπορούν να λειτουργήσουν και μ' αυτούς τους περιορισμούς. Βέβαια, για να έχουμε αποδεκτή ακρίβεια και σταθερότητα πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη Courant-Friedrichs-Lewy, που στην περίπτωσή μας κάνει τη μέθοδο ασταθή για τιμές $D > 0,16$. Αυτό το πρόβλημα όμως μπορεί να λυθεί με πολλαπλό «κάλεσμα» του επιλυτή για κάθε MCS.)

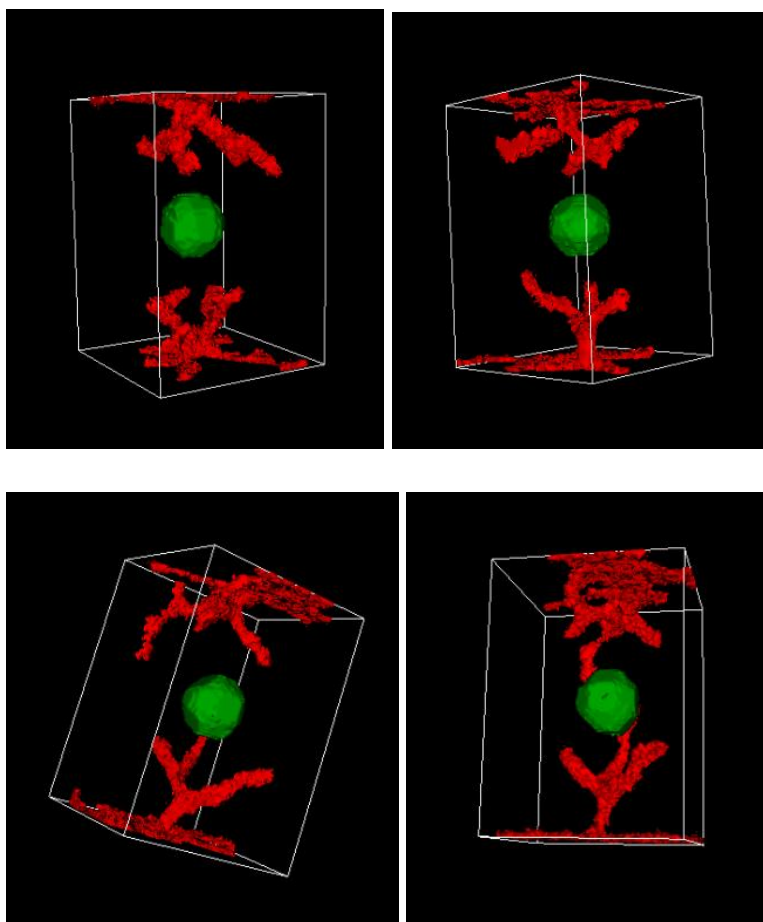
Η σταθερά διάσπασης του VEGF γ λαμβάνεται ίση με 1h^{-1} (δηλαδή 0,016 MCS⁻¹) στα πίκσελ του διάμεσου υγρού και 0 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ταχύτητα έκκρισης VEGF ορίζεται όπως πριν 0,013 pg/(voxel MCS). Στον κώδικα, στο σημείο που περιγράφουμε τον FlexibleDiffusionSolverFE, θέτουμε τις τιμές του <Diffusion Constant> και του <DecayConstant> 0,1 και 0,016 αντίστοιχα. Για να εμποδίσουμε την αποσύνθεση του VEGF μέσα στα λεμφοκύτταρα, προσθέτουμε τη γραμμή <DoNotDecayIn>endo<DoNotDecayIn> μέσα στο κομμάτι Diffusion Data. Αυτές οι τιμές διάχυσης είναι επαρκείς ώστε το vegf να διαχέεται πιο γρήγορα από ό,τι κινούνται τα κύτταρα, ώστε να μπορούμε να αγνοήσουμε φαινόμενα συναγωγής στο διάμεσο χώρο όπως τα κύτταρα σπρώχνουν το υγρό.

Η βασική συμπεριφορά που προκαλεί την μορφοποίηση σε σχήμα αγγείων είναι η χημειότητα «απαγορευτική επαφής». Το VEGF διαχέεται μακριά από τα κύτταρα και αποσυντίθεται στο διάμεσο χώρο γρήγορα, σχηματίζοντας μια απότομη βαθμίδα συγκέντρωσης στη διεπιφάνεια μεταξύ των λεμφοκυττάρων και του διάμεσου χώρου. Επειδή τα κύτταρα κινούνται χημειοτακτικά προς τη βαθμίδα συγκέντρωσης μόνο στη διεπιφάνεια με το μέσο, τα κύτταρα στην επιφάνεια του

συμπλέγματος συμπιέζουν το σύμπλεγμα σε κλάδους και διατηρούν και την μορφή τους.

Αυξάνοντας την τιμή της σταθεράς αποσύνθεσης παρατηρήσαμε ότι επηρεαζόταν η διακλαδισμένη διαμόρφωση των αγγείων, που σημαίνει ότι η απότομη κλίση της συγκέντρωσης VEGF γύρω από τα λεμφοκύτταρα είναι καθοριστικής σημασίας για τη δημιουργία λεμφαγγείων. Παρακατω βλέπουμε εικόνες από την προσωμοίωση για $t = 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 900$ MCS (ή minutes)





Σύμφωνα με το μοντέλο μας η λεμφαγγειογένεση βασίζεται πολύ πιθανόν σε έναν αυτοκρινή μηχανισμό, πιθανόν επιταχυνόμενο από κάποιον παράγοντα που εκκρίνεται από τον όγκο.

Περιορισμοί και βελτιώσεις

Ένα ολοκληρωμένο μοντέλο θα έπρεπε να συμπεριλαμβάνει τη συνέργεια όλων των παραγόντων που αναφέρθηκαν στο Α' Μέρος, κάτι που προς το παρόν είναι αδύνατον διότι δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα για τους υπό συζήτηση μηχανισμούς. Επίσης, απουσιάζει η μοντελοποίηση της εξωκυττάριας μήτρας, η οποία επηρεάζει τη μηχανική συμπεριφορά των κυττάρων και του λεμφικού υγρού, το οποίο αν και κινείται πολύ αργά -σε σχέση με το αίμα για

παράδειγμα- μπορεί να επηρεάζει τη μορφολογία των λεμφαγγείων (βλ. Μέρος Α, «Άλλοι παράγοντες»). Οι τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για τη χημότητα είναι εν πολλοίς εμπειρικές και βασίζονται περισσότερο σε *in silico* παρά σε *in vivo* πειράματα. Τέλος, μέσω του CompuCell 3d και του κυτταρικού μοντέλου Potts δεν είναι προς το παρόν δυνατόν να αναπαρασταθεί η κυλινδροειδής μορφή των αγγείων.

Παρόλ' αυτά, στην προσωμίωσή μας τα λεμφοκύτταρα **δημιουργούν βρόγχους και προσεγγίζουν τον όγκο, ενώ όταν εισέρχονται σ' αυτόν συγκλείνουν** κάτι που συνάδει με την υπόθεση για μη λειτουργικά λεμφαγγεία εντός των όγκων λόγω της μεγάλης του εσωτερικής πίεσης, όπως αναπτύχθηκε στο πρώτο μέρος. Τα λεμφαγγεία του μοντέλου μας έχουν παραπλήσια μορφολογία και ανάπτυξη με τα πραγματικά.

Συμπεράσματα και μελλοντικά βήματα

Σε πολλές πτυχές της βιολογικής ανάπτυξης, αυτό που πραγματικά έχει σημασία είναι οι βιοφυσικές ιδιότητες σε κυτταρικό επίπεδο (δηλ. η φύση και το είδος των σημάτων που εκλύονται και η ανταπόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα), ενώ η εσωτερική λειτουργία του κυττάρου μπορεί να παραβλεφθεί. Έτσι, δύο ξεχωριστά ερωτήματα θα πρέπει να τεθούν: το πρώτο αφορά το πώς η γενετική οδηγεί τη συμπεριφορά των κυττάρων και το δεύτερο, το πώς η συμπεριφορά των κυττάρων οδηγεί σε μορφογένεση.

Όσον αφορά το δεύτερο ερώτημα, η “κυτταροκεντρική” προσέγγιση μοντελοποίησης είναι σίγουρα ένα σημαντικό εργαλείο για τη δημιουργία και τη δοκιμή υποθέσεων στην αναπτυξιακή βιολογία, διότι μας βοηθά να κατανοήσουμε ποιες κυτταρικές συμπεριφορές είναι απαραίτητες για τη δημιουργία ιστών. Οι μελέτες για την αγγειογενετική διαδικασία είναι ένα σημαντικό παράδειγμα αυτής της θεώρησης.

Συνεπώς με τα συνεχή μοντέλα η κυτταροκεντρική προσέγγιση, επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο της χημειοταξής, στην πορεία προς αγγειακούς σχηματισμούς, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επιπλέον, λόγω αυτής της προσέγγισης, μας υποδεικνύεται ότι η συνάφεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ουσιαστικής σημασίας για το σχηματισμό σταθερών αγγειακών δικτύων και ότι η διόγκωση των κυττάρων, επίσης επηρεάζει έντονα τα πολυκυτταρικά μοτίβα .

Από την άποψη αυτή, τα συνεχή μοντέλα έχουν μεγάλη δυσκολία στο να αξιολογήσουν το ρόλο αυτών των παραμέτρων. Έτσι, η κυτταροκεντρική στρατηγική για τη μοντελοποίηση της λεμφαγγειογένεσης, παρουσιάζεται ως ένας καλύτερος τρόπος για να κατευθύνονται συγκεκριμένα πειράματα. Πρόσφατα δε, στο πεδίο της αγγειογένεσης που είναι πιο μελετημένο από αυτό της λεμφαγγειογένεσης, έχουμε αρκετές πειραματικές επικυρώσεις αυτών των προτεινόμενων μοντέλων [22, 23]. Αυτή η προσέγγιση μοντελοποίησης μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ταυτοποίηση των ιδιοτήτων εκείνων του κυττάρου, που αντιπροσωπεύουν πιθανούς στόχους για τη βελτίωση της κατασκευής τεχνητών ιστών ή στις θεραπείες των παθολογιών που σχετίζονται από αγγειογενέσεις.

Για τη βοήθεια των βιολόγων στην εξερεύνηση της ερώτησης που αφορά ποιες μοριακές διεργασίες είναι υπεύθυνες για τις βασικές κυτταρικές συμπεριφορές που οδηγούν σε συγκεκριμένους φαινότυπους σε επίπεδο ιστών ή οργανισμών, μια κυτταροκεντρική προσέγγιση θα απαιτήσει προεκτάσεις και σε μεγαλύτερες αλλά και σε μικρότερες κλίμακες[20]. Η συνένωση μοντέλων της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας με κυτταροκεντρικά μοντέλα φαίνεται δυνατή με δύο τρόπους. Η πρώτη στρατηγική και απλούστερη είναι να χρησιμοποιούμε μικροσκοπικά μοντέλα για να εκτιμούμε τις παραμέτρους που ελέγχουν το κυτταροκεντρικό μοντέλο. Εναλλακτικά, στα πραγματικά υβριδικά μοντέλα οι ενδοκυτταρικές προσωμοιώσεις μπορούν να λειτουργούν ως στοιχεία του κυτταροκεντρικού μοντέλου. Ομοίως τα κυτταροκεντρικά μοντέλα μπορούν να συνδυαστούν με μακροσκοπικά μοντέλα ιστού ή οργάνου, είτε παρέχοντας εκτιμήσεις των ιδιοτήτων των ιστών για συνεχή μοντελα είτε αλληλεπιδρώντας μαζί τους σε ένα υβριδικό μοντέλο. Σ'αυτή την

προσπάθεια, το πλεονέκτημα του να ξεκινάει κανείς από ένα μεσοσκοπικό σημείο αναφοράς, όπως η κυτταροκεντρική προσέγγιση, είναι ότι συχνά χρειάζεται η ελάχιστη πρόσθετη συνθετότητα στον αλγόριθμο καθώς και ο ελάχιστος υπολογιστικός χρόνος για να πετύχουμε αποτελέσματα συνεπή με τα πειραματικά δεδομένα.

Όσον αφορά το δικό μας μοντέλο, στο πνεύμα αυτής της προσέγγισης, τα επόμενα βήματα είναι τα εξής: 1. Προσομοίωση του μηχανισμού εισόδου των καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία, αφού αυτά έχουν προσεγγίσει τον όγκο και 2. Η εισαγωγή στο μοντέλο των διαφορικών εξισώσεων που περιγράφουν την κινητική σύνδεσης και αποσύνδεσης του VEGF-C και της νευροπιλίνης 2 στον υποδοχέα vegfr-3, ώστε να έχουμε ένα μοντέλο πολλαπλής κλίμακας για τη λεμφαγγειογένεση. Εκεί μπορεί να δοκιμαστεί και η επίδραση παρεμποδιστών των διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως φάρμακα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ Β' ΜΕΡΟΥΣ

1. Alarcon, T., Page, K.M. Mathematical models of the VEGF receptor and its role in cancer therapy. *J. Roy. Soc. Interface.* 4, 283-304 (2007)
2. Lauffenburger, D. A. & Linderman, J. J. 1993 Receptors: models for binding, trafficking, and signalling. New York, NY: Oxford University Press.
3. Woolf, P. J. & Linderman, J. 2004 An algebra of dimerization and its implications for G-protein coupled receptor. *J.Theor.Biol.* 229, 157–168.
4. Mac Gabhann, F. & Popel, A. S. 2004 Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H153–H164.
5. Mac Gabhann, F. & Popel, A. S. 2005a Differential binding of VEGF isoforms to VEGF receptor 2 in the presence of neuropilin-1: a computational model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2851–H2860
6. Park, C. H., Schneider, I. C. & Maugh, J. M. 2003 Kinetic analysis of platelet-derived growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in fibroblast. *J. Biol. Chem.* 278, 37 064–37 072.
7. Mac Gabhann, F. & Popel, A. S. 2005b Monte Carlo simulations of VEGF binding to cell surface receptors in vitro. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Res.* 1746, 95–107.
8. Glazier, J. A., and Graner, F. (1992). Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Phys. Rev. Lett.* 69, 2013–2016.
9. Glazier, J. A., and Graner, F. (1993). Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E* 47, 2128–2154.
10. Holm, E. A., Glazier, J. A., Srolovitz, D. J., and Grest, G. S. (1991). Effects of lattice anisotropy and temperature on domain growth in the two-dimensional Potts model. *Phys. Rev. A* 43, 2662–2669. Turner, S., and Sherratt, J. A. (2002). Intercellular adhesion and cancer invasion: a discrete simulation using the extended Potts model. *J. Theor. Biol.* 216, 85–100.
11. Merks, R. M., Perryn, E. D., Shirinifard, A., and Glazier, J. A. (2008). Contact-inhibited chemotactic motility can drive both vasculogenesis and sprouting angiogenesis. *PLoS Comput. Biol.* 4,
12. Merks, R. M., and Glazier, J. A. (2006). Dynamic mechanisms of blood vessel growth. *Nonlinearity* 19,C1–C10
13. Maini, P. K., Olsen, L., and Sherratt, J. A. (2002). Mathematical models for cell-matrix interactions during dermal wound healing. *Int. J. Bifurcation Chaos* 12, 2021–2029
14. Dallon, J., Sherratt, J., Maini, P. K., and Ferguson, M. (2000). Biological implications of a discrete mathematical model for collagen deposition and alignment in dermal wound repair.

- IMA J. Math. Appl. Med. Biol. 17, 379–393.
15. Savill, N. J., and Sherratt, J. A. (2003). Control of epidermal stem cell clusters by Notch-mediated lateral induction. *Dev. Biol.* 258, 141–153
 16. Walther, T., Reinsch, H., Grosse, A., Ostermann, K., Deutsch, A., and Bley, T. (2004). Mathematical modeling of regulatory mechanisms in yeast colony development. *J. Theor. Biol.* 229, 327–338. Nguyen, B., Upadhyaya, A., van Oudenaarden, A., and Brenner, M. P. (2004). Elastic instability in growing yeast colonies. *Biophys. J.* 86, 2740–2747
 17. Alber, M. S., Kiskowski, M. A., Glazier, J. A., and Jiang, Y. (2002). On cellular automation approaches to modeling biological cells. In “Mathematical Systems Theory in Biology, Communication and Finance,” (J. Rosenthal, and D. S. Gilliam, eds.), pp. 1–40. Springer-Verlag, New York
 18. Cickovski, T., Aras, K., Alber, M. S., Izaguirre, J. A., Swat, M., Glazier, J. A., Merks, R. M. H., Glimm, T., Hentschel, H. G. E., and Newman, S. A. (2007). From genes to organisms via the cell: a problemsolving environment for multicellular development. *Comput. Sci. Eng.* 9, 50.
 19. Maciej H. Swat, Julio Belmonte, Randy W. Heiland, Benjamin L. Zaitlen, James A. Glazier, Abbas Shirinifard, Introduction To CompuCell3d, Version 3.6.2, 2011, pp.1-20
 20. R. M. H. Merks, S. V. Brodsky, M. S. Gligorksy, S. A. Newman, and J. A. Glazier, “Cell elongation is key to in silico replication of in vitro vasculogenesis and subsequent remodeling,” *Developmental Biology*, vol. 289, no. 1, pp. 44–54, 2006
 21. D. Guidolin, G. Albertin, E. Sorato, B. Oselladore, A. Mascarin, and D. Ribatti, “Mathematical modeling of the capillary-like pattern generated by adrenomedullin-treated human vascular endothelial cells in vitro,” *Developmental Dynamics*, vol. 238, no. 8, pp. 1951–1963, 2008
 22. Matsuura M, Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Nakano T, Ishibashi H, Shirasuna K, Sueishi K. Autocrine loop between vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 positively regulates tumor-associated Lymphangiogenesis in oral squamoid cancer cells. *Am J Pathol.* 2009;175:1709–1721
 23. Min Y, Ghose S, Boelte K, Li J, Yang L, Lin PC. C/EBP- δ regulates VEGF-C autocrine signaling in lymphangiogenesis and metastasis of lung cancer through HIF-1 α Oncogene. 2011 Dec 8;30(49):4901-9
 24. Pepper M. and Lolas G., “The lymphatic vascular system in lymphangiogenesis, invasion and metastasis. A mathematical approach”, In: Selected Topics in Cancer Modelling, editors N. Bellomo, M. Chaplain and E. De. Angelis, Birkhauser, 2008.
 25. Friedman A. and Lolas G. (2005), “Analysis of a Mathematical Model of Tumor Lymphangiogenesis”, *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 15 (1), 95-107.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΚΩΔΙΚΑΣ

```
<CompuCell3D version="3.6.2">
```

```
<Potts>
```

```
<!-- Basic properties of CPM (GGH) algorithm -->
```

```
<Dimensions x="70" y="70" z="100"/>
```

```
<Steps>10000</Steps>
```

```
<Temperature>20.0</Temperature>
```

```
<NeighborOrder>3</NeighborOrder>
```

```
</Potts>
```

```
<Plugin Name="CellType">
```

```
<!-- Listing all cell types in the simulation -->
```

```
<CellType TypeId="0" TypeName="Medium"/>
```

```
<CellType TypeId="1" TypeName="endo"/>
```

```
<CellType TypeId="2" TypeName="tumor"/>
```

```
</Plugin>
```

```
<Plugin Name="Volume">
```

```
<VolumeEnergyParameters CellType="endo" LambdaVolume="20" TargetVolume="64"/>
```

```
<VolumeEnergyParameters CellType="tumor" LambdaVolume="20"
```

```
TargetVolume="64"/>
```

```
</Plugin>
```

```
<Plugin Name="CenterOfMass">
```

```
<!-- Module tracking center of mass of each cell -->
```

```
</Plugin>
```

```
<Plugin Name="Contact">
```

```
<!-- Specification of adhesion energies -->
```

```
<Energy Type1="Medium" Type2="Medium">0</Energy>
```

```
<Energy Type1="Medium" Type2="endo">12</Energy>
```

```
<Energy Type1="Medium" Type2="tumor">12</Energy>
```

```
<Energy Type1="endo" Type2="endo">5</Energy>
```

```
<Energy Type1="endo" Type2="tumor">15</Energy>
```

```
<Energy Type1="tumor" Type2="tumor">5</Energy>
```

```
<NeighborOrder>4</NeighborOrder>
</Plugin>
```

```
<Plugin Name="Chemotaxis">
```

```
<!-- You may repeat ChemicalField element for each chemical field declared in the PDE
solvers -->
```

```
<!-- Specification of chemotaxis properties of select cell types. -->
```

```
<ChemicalField Name="VEGF" Source="PDE_SOLVER">
```

```
<ChemotaxisByType ChemotactTowards="Medium,tumor" Lambda="5000"
Type="endo"/>
```

```
</ChemicalField>
```

```
<!-- ChemicalField Name="VEGF2" Source="PDE_SOLVER" -->
```

```
<!-- ChemotaxisByType ChemotactTowards="tumor" Lambda="5000" Type="endo"/ -->
```

```
<!-- /ChemicalField -->
```

```
</Plugin>
```

```
<Plugin Name="Secretion">
```

```
<!-- Specification of secretion properties of select cell types. -->
```

```
<!-- You may repeat Field element for each chemical field declared in the PDE solvers -->
```

```
<!-- Specification of secretion properties of individual cells can be done in Python -->
```

```
<Field Name="VEGF">
```

```
<Secretion Type="endo">0.013</Secretion>
```

```
</Field>
```

```
<Field Name="VEGF2">
```

```
<Secretion Type="tumor">0.013</Secretion>
```

```
</Field>
```

```
</Plugin>
```

```
<Steppable Type="FlexibleDiffusionSolverFE">
```

```
<!-- Specification of PDE solvers -->
```

```
<DiffusionField>
```

```
<DiffusionData>
```

```
<FieldName>VEGF</FieldName>
```

```
<DiffusionConstant>0.16</DiffusionConstant>
```

```
<DecayConstant>0.016</DecayConstant>
```

```
<!-- Additional options are: -->
```



```

<!-- <DoNotDiffuseTo>LIST YOUR CELL TYPES HERE</DoNotDiffuseTo> -->
<DoNotDecayIn>endo</DoNotDecayIn>
<!-- <InitialConcentrationExpression>x*y</InitialConcentrationExpression> -->
<!-- <ConcentrationFileName>INITIAL CONCENTRATION FIELD - typically a file with
path Simulation/NAME_OF_THE_FILE.txt</ConcentrationFileName> -->
<!-- To run solver for large diffusion constants you typically call solver multiple times -
ExtraTimesPerMCS to specify additional calls to the solver in each MCS -->
<!-- IMPORTANT: make sure not to mix this setting with the PDESolverCaller module!
See manual for more information -->
<!-- <ExtraTimesPerMCS>0</ExtraTimesPerMCS> -->
<DeltaX>1.0</DeltaX>
<DeltaT>1.0</DeltaT>
</DiffusionData>

```

```

</DiffusionField>

```

```

<DiffusionField>
  <DiffusionData>
    <FieldName>VEGF2</FieldName>
    <DiffusionConstant>0.1</DiffusionConstant>
    <DecayConstant>0.0016</DecayConstant>
    <!-- Additional options are: -->
    <!-- <DoNotDiffuseTo>LIST YOUR CELL TYPES HERE</DoNotDiffuseTo> -->
    <DoNotDecayIn>Medium</DoNotDecayIn>
    <!-- <InitialConcentrationExpression>x*y</InitialConcentrationExpression> -->
    <!-- <ConcentrationFileName>INITIAL CONCENTRATION FIELD - typically a file with
path Simulation/NAME_OF_THE_FILE.txt</ConcentrationFileName> -->
    <!-- To run solver for large diffusion constants you typically call solver multiple times -
ExtraTimesPerMCS to specify additional calls to the solver in each MCS -->
    <!-- IMPORTANT: make sure not to mix this setting with the PDESolverCaller module!
See manual for more information -->
    <!-- <ExtraTimesPerMCS>0</ExtraTimesPerMCS> -->
    <DeltaX>1.0</DeltaX>
    <DeltaT>1.0</DeltaT>
  </DiffusionData>

```

```

</DiffusionField>

```

```

</Steppable>

```

```

<Steppable Type="UniformInitializer">

```

```

<!-- Initial layout of cells in the form of rectangular slab -->
<Region>
  <BoxMin x="25" y="25" z="0"/>

```

```

    <BoxMax x="45" y="45" z="15"/>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>4</Width>
    <Types>endo</Types>
</Region>

<Region>
    <BoxMin x="25" y="25" z="85"/>
    <BoxMax x="45" y="45" z="100"/>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>4</Width>
    <Types>endo</Types>
</Region>
</Steppable>

<Steppable Type="BlobInitializer">

<!-- Initial layout of cells in the form of spherical (circular in 2D) blob -->
<Region>
    <Center x="35" y="35" z="50"/>
    <Radius>12</Radius>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>4</Width>
    <Types>tumor</Types>
</Region>
</Steppable>

</CompuCell3D>

import sys
from os import environ
from os import getcwd
import string

sys.path.append(environ["PYTHON_MODULE_PATH"])

import CompuCellSetup

sim,simthread = CompuCellSetup.getCoreSimulationObjects()

# add extra attributes here

```

```

CompuCellSetup.initializeSimulationObjects(sim,simthread)
# Definitions of additional Python-managed fields go here

#Add Python steppables here
steppableRegistry=CompuCellSetup.getSteppableRegistry()

from thesisSteppables import thesisSteppable
steppableInstance=thesisSteppable(sim,_frequency=1)
steppableRegistry.registerSteppable(steppableInstance)

CompuCellSetup.mainLoop(sim,simthread,steppableRegistry)

from PySteppables import *
import CompuCell
import sys
class thesisSteppable(SteppableBasePy):

    def __init__(self,_simulator,_frequency=1):
        SteppableBasePy.__init__(self,_simulator,_frequency)
    def start(self):
        # any code in the start function runs before MCS=0
        pass
    def step(self,mcs):
        #type here the code that will run every _frequency MCS
        for cell in self.cellList:
            print "cell.id=",cell.id
    def finish(self):
        # Finish Function gets called after the last MCS
        pass

```