



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΟΧΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ-ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ (CELLULAR Potts MODEL) ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ (CCL21) ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΩΝ (ANG-1 ΚΑΙ ANG-2) ΣΤΗΝ ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

ΜΙΧΑΗΛ ΒΛΥΣΙΔΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ

Αθήνα 2012

# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Χαριτίδη για την ευκαιρία και εμπιστοσύνη μου έδειξε αναθέτωντάς μου την ενασχόληση με ένα πρωτότυπο θέμα, όπως είναι η λεμφαγγειογένεση. Επίσης, τον ευχαριστώ πάρα πολύ για το πολύ καλό κλίμα που μου πρόσφερε, ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω την εργασία μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Δρα Γεώργιο Λώλα για την βοήθεια και την στήριξη, που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου και σε επιστημονικό και σε προσωπικό επίπεδο. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν καταλυτική.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Mark Chaplain και τον Δρα Gibin Powathil για την βοήθεια που μου πρόσφεραν, κυρίως στον υπολογιστικό τόμεα της εργασίας.

Ευχαριστώ τους Πέτρο Βασιλάκο και Dmitry Pozharskiy για τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου πρόσφεραν όχι μόνο για την προπτυχίακη αλλά και για τη μεταπτυχιακή μου πορεία.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις εκ βαθέων ευχαριστίες μου στη οικογένεια μου, και ιδιαίτερα στον πατέρα μου Βλυσίδη Αντώνη, τη μητέρα μου Μισέρου Σταυρούλα και στη θεία μου Βλυσίδου Ευτυχία, για όλη τη στήριξη, συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

Την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να την αφιερώσω στον παππού μου, Βλυσίδη Μιχάλη-Ζαννή, που πλέον δε βρίσκεται μαζί μας, για όλες τις αξίες και την αγάπη που μου πρόσφερε όσο ζούσε.

# Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου στις Η.Π.Α. και στην Ευρώπη. Παρότι εκατομμύρια ανθρώπων προσβάλλονται παγκοσμίως από την ασθένεια αυτή, αρκετοί από τους μηχανισμούς οι οποίοι συντελούν στην ανάπτυξη της ασθένειας δεν έχουν γίνει ακόμα γνωστοί. Μια πολύ σημαντική παράμετρος, που δυσκολεύει την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η ικανότητά του να δημιουργεί μεταστάσεις. Για να πραγματοποιηθεί η μετάσταση όμως πρέπει να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί της αγγειογένεσης ή της λεμφαγγειογένεσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετώνται συγκεκριμένοι μηχανισμοί που συντελούν στη δημιουργία της λεμφαγγειογένεσης. Ειδικότερα, μελετούνται δύο είδη πρωτεΐνων, οι χημειοκίνες (Chemokines) και οι αγγειοποιητίνες (Angiopoietins). Από την οικογένεια των χημειοκινών μελετάται η CCL21 και από την οικογένεια των αγγειοποιητίνων μελετούνται η αγγειοποιητίνη-1 (Angiopoietin-1 (Ang-1)) και η αγγειοποιητίνη-2 (Angiopoietin-2 (Ang-2)).

Αρχικά παρουσιάζεται η χημική κινητική των προαναφερθέντων χημειοκινών και αγγειοποιητίνων. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν πρωτότυπα στοχαστικά χωροχρονικά μοντέλα με τη μέθοδο Cellular Potts Model (CPM) με τη χρήση του προγράμματος CompuCell 3D. Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω μοντέλων είναι η χρήση τους για την ανάπτυξη φαρμάκων που αναστέλουν τις συγκεκριμένες χημειοκίνες και αγγειοποιητίνες στην λεμφαγγειογένεση.

# Abstract

Cancer is the second most deadly illness all around the world. We use word "cancer" to describe the wrong growth of the cells. Although, millions of people are sickening because of cancer, there are many cancer's mechanisms, which is unknown by the scientific community. One critical property of cancer is the tumor metastasis, which makes more difficult the creation of a cure for cancer. Angiogenesis and lymphangiogenesis are the only ways for cancer to create its metastasis.

This work focuses on the mechanisms which lead to the lymphangiogenesis. The first one is related with chemokines and especially the CCL21 (a chemokine of C-C family of chemokines). The other mechanism is based on angiopoietins, and the role of the first (Angiopoietin-1, Ang-1) and the second (Angiopoietin-2, Ang-2) angiopoietin.

Firstly, in this work we search the stability of these proteins using ordinary differential equations. Also, we develop novel stochastic models through the Cellular Potts Model (CPM) on the CompuCell 3D program. The results are going to be used for the development of drugs, which can block those chemokines and angiopoietins.

# Περιεχόμενα

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I Θεωρία</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1 Βιολογικό υπόβαθρο</b>                               | <b>7</b>  |
| 1.1 Καρκίνος . . . . .                                    | 7         |
| 1.2 Λεμφαγγειογένεση . . . . .                            | 10        |
| 1.3 Χημειοκίνες (Chemokines) . . . . .                    | 12        |
| 1.4 Αγγειοποιητίνες (Angiopoietins) . . . . .             | 17        |
| <b>2 Μοντελοποίηση στην αγγειογένεση</b>                  | <b>25</b> |
| 2.1 Προηγούμενες Δημοσιεύσης . . . . .                    | 25        |
| 2.2 Διαφορές<br>Αγγειογένεσης-Λεμφαγγειογένεσης . . . . . | 25        |
| <b>II ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>3 Τρισδιάστατο μοντέλο</b>                             | <b>28</b> |
| 3.1 Γενικά για το CompuCell 3D . . . . .                  | 28        |
| 3.2 Δημιουργία Μοντέλου . . . . .                         | 29        |
| 3.3 Ο κώδικας του μοντέλου . . . . .                      | 30        |
| 3.4 Αποτελέσματα . . . . .                                | 33        |
| 3.5 Παραδοχές του μοντέλου . . . . .                      | 38        |
| 3.6 Επιπρόσθετες μοντελοποιήσεις . . . . .                | 39        |
| <b>4 Διαφορική επίλυση</b>                                | <b>41</b> |
| 4.1 Δημιουργία διαφορικών συστημάτων . . . . .            | 41        |
| 4.2 Συζήτηση των διαφορικών εξισώσεων . . . . .           | 48        |
| <b>5 Συμπεράσματα</b>                                     | <b>49</b> |
| 5.1 Συμπεράσματα . . . . .                                | 49        |
| 5.2 Μελλοντικές Ενέργειες . . . . .                       | 49        |

---

|                     |    |
|---------------------|----|
| A' Σταθερές Ουσιών  | 51 |
| B' Κάδικας του CC3D | 53 |

Μέρος Ι

Θεωρία

# Κεφάλαιο 1

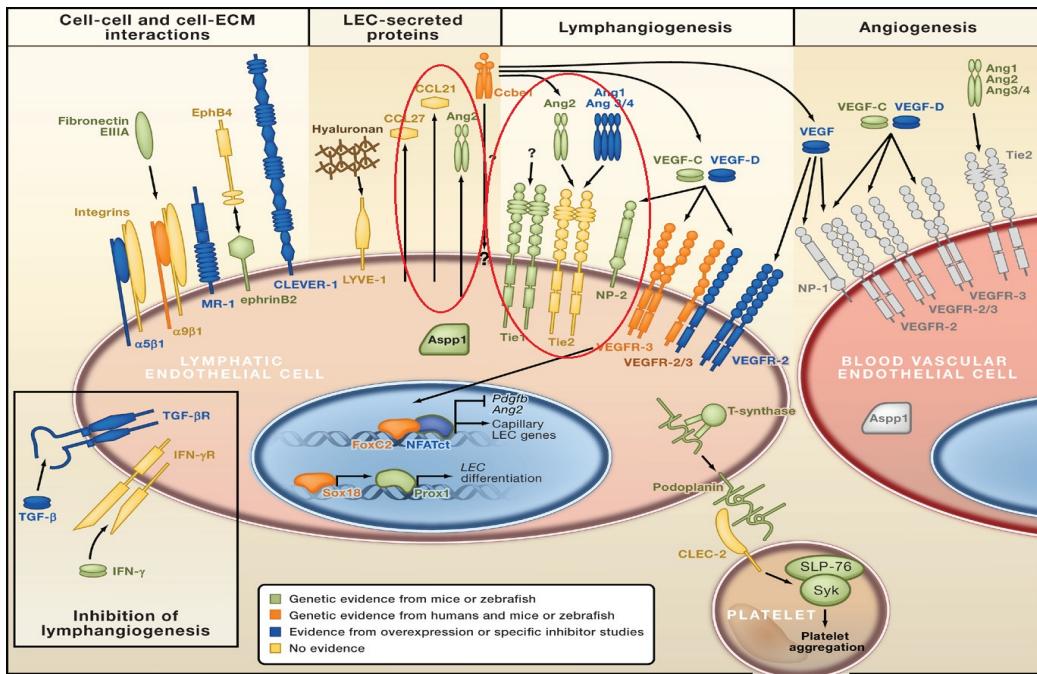
## Βιολογικό υπόβαθρο

Η βασική ιδέα για τη πραγματοποίηση της μελέτης εντοπίσθηκε στη δημοσίευση των T. Tammela και K. Alitalo: "Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise" [1]. Η συγκεκριμένη δημοσιέυση αναφέρεται στην λεμφαγγειογένεση όπου καταγράφονται ελάχιστα πράγματα για τις αγγειοποιητίνες και τις χημειοκίνες. Ασφαλώς δεν υπάρχει η πρόθεση από τους συγγραφείς για τη δημιουργία μοντέλου στο συγκεκριμένο αντικείμενο. Παρ' όλα αυτά, εμπειρίχονται αρκετοί από τους μηχανισμούς της λεμφαγγειογένεσης και της αγγειογένεσης στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 1.1). Το σχήμα αυτό μας ενέπνευσε να ασχοληθούμε με τη λεμφαγγειογένεση, καθώς και με τις χημειοκίνες και τις αγγειοποιητίνες.

### 1.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος οφείλεται σε κύτταρα τα οποία διαιρούνται συνεχώς και μεταναστεύουν σε άλλους υγιείς ιστούς, έχοντας αρχικά ξεφύγει από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης.

Το ανθρώπινο σώμα διαθέτει την εκπληκτική ικανότητα να ανανεώνεται και να επουλώνεται. Όμως, είναι πιθανόν να απορρυθμιστούν οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτές τις διαδικασίες. Ο καρκίνος αποτελεί τη σημαντικότερη ανωμαλία αυτών των μηχανισμών. Το κύτταρο πρέπει να διαιρείται, όταν είναι απαραίτητο, και να σταματάει η διαίρεσή του, όταν η διαδικασία αυτή δεν είναι πλέον απαραίτητη. Επίσης, είναι αναγκαίο να θανατώνεται, όταν αυτό έχει διατελέσει την εργασία του. Για να μη συμβεί αυτό, θα πρέπει το κύτταρο να έχει υποστεί μια γενετική τροποποίηση που να του δίνει τη δυνατότητα να επιβιώνει παρ' ότι δε θα έπρεπε. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην αποδιοργάνωση του ιστού με σημαντικές περαιτέρω επιπτώσεις και για τον ιστό, αλλά και για το υπόλοιπο



Σχήμα 1.1: Δράσης ουσιών σε λυμφατικό κύτταρο [1].

σώμα. Αυτή η εξέλιξη παρατηρείται στον καρκίνο.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν δύο σημαντικές ιδιότητες: α) αναπαράγονται χωρίς περιορισμούς (συγχριτικά με τα υγειή κύτταρα) και β) μπορούν να μετακινούνται και να επιβιώνουν σε άλλους ιστούς. Υπάρχουν κύτταρα που έχουν μόνο τη πρώτη ιδιότητα και δεν έχουν τη δεύτερη. Τα κύτταρα αυτά, καθώς αυξάνονται, σχηματίζουν μια ενιαία μάζα η οποία έχει την ικανότητα να αυξάνεται, αλλά δε μπορεί να μεταναστεύει σε άλλους ιστούς. Η μάζα που σχηματίζεται από τα κύτταρα αυτά δημιουργεί έναν όγκο (tumor). Εάν ένας όγκος έχει και τη δεύτερη ικανότητα, δηλαδή να μπορεί να μεταναστεύει σε άλλους ιστούς, τότε ονομάζεται καρκινικός. Τα κύτταρα ενός καρκινικού όγκου έχουν την ικανότητα να αποκολλώνται από τον όγκο και να μεταναστεύουν σε άλλο σημείο του σώματος. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μετακίνηση, θα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου. Όταν τα καρκινικά κύτταρα μεταφερθούν σε άλλους ιστούς, σχηματίζουν νέους όγκους που ονομάζονται μεταστάσεις.

Όπως έχει προαναφερθεί ο καρκίνος είναι νόσημα του οργανισμού. Όμως, ο καρκίνος δεν είναι λοιμώδες νόσημα, είναι γενετικό νόσημα. Ο καρκίνος προκύπτει από μεταβολές στην αλληλουχία του DNA των κυττάρων. Υπάρχουν πολλές ασθένειες που οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις του DNA. Η μεγάλη διαφορά του καρκίνου είναι ότι αυτός οφείλεται σε σωματικές μεταλλάξεις, δη-

---

λαδή μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται τυχαία σε διάφορα κύτταρα και δεν μεταβιβάζονται στους απογόνους του ατόμου. Σ' ένα φυσιολογικό κύτταρο, κατά την αναπαραγωγή του, υπάρχουν  $10^{-7}$  με  $10^{-6}$  πιθανότητες να συμβεί μια μετάλλαξη σε κάθε γονιδιό του. Αυτές οι πιθανότητες οφείλονται στους περιορισμούς της αντιγραφής του DNA. Εάν, αναλογιστούμε ότι κατά τη διάρκεια ζωής ένος μέσου ανθρώπου πραγματοποιούνται  $10^{16}$  κυτταρικές διαιρέσεις, τότε συμπεραίνουμε ότι σε κάθε γονιδιό του οργανισμού συμβαίνουν  $10^9$  μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Από την άποψη αυτή, υπάρχουν πιθανότητες ένας οργανισμός να αναπτύξει καρκίνο, χωρίς καμία επιρροή από το εξωτερικό περιβάλλον. Βέβαια, για να δημιουργηθεί ο καρκίνος, πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλές διαδοχικές μεταλλάξεις. Σε αυτό σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι επιρροές από το εξωτερικό περιβάλλον. Δεν είναι γνωστός ο αριθμός των μεταλλάξεων που απαιτούνται για τη δημιουργία του καρκίνου. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως επηρεάζουν την αντιγραφή του DNA ή τους μηχανισμούς επιδιόρθωσής της.

Πέρα από τις βασικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων που προαναφέρθηκαν υπάρχουν και κάποια άλλα χαρακτηριστικά τους τα οποία τους προσδίδουν αξιοσημείωτη ιδιαιτερότητα. Για την επιβίωση και την αναπαραγωγή τους, τα καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται ελάχιστα από τα γειτονικά κύτταρα και λειτουργούν αυτόνομα. Αυτό βρίσκεται σε πλήρη αντίθεση με τη λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται όσες φορές θέλουν. Αντίθετα, τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να διαιρούνται μέχρι έναν συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων. Μια άλλη ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ότι είναι ανθεκτικά σε θάνατο με απόπτωση, δηλαδή στη διαδικασία καταστροφής του κυττάρου από δικούς του μηχανισμούς, όταν πλέον αυτό δεν είναι χρήσιμο στον οργανισμό. Τα καρκινικά κύτταρα είναι γενετικά ασταθή και, για αυτό το λόγο, υφίστανται πολλές μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Μια πολύ σημαντική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ότι μπορούν να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε ξένους ιστούς, εν αντιθέσει με τα φυσιολογικά κύτταρα που μπορούν να ζουν μόνο στο δικό τους ιστό.

Για να καταπολεμήσουμε το καρκίνο και τις μεταστάσεις τους, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να μετασταθούν. Δυστυχώς όμως, κάτι τέτοιο δεν είναι εύκολο γιατί το κάθε είδος καρκίνου οφείλεται σε διαφορετικές μεταλλάξεις και σε διαφορετικό συνδυασμό των μεταλλάξεων αυτών [2].

---

## 1.2 Λεμφαγγειογένεση

Μια από τις πιο επικίνδυνες ιδιότητες του καρκίνου είναι η ικανότητά του να δημιουργεί μεταστάσεις. Για να δημιουργήσουν τα καρκινικά κύτταρα μια μετάσταση, όμως, πρέπει να διασχίσουν τον βασικό υμένα, να μεταφερθούν στο συνδετικό ιστό και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου. Για να σχηματίσουν, όμως, τα καρκινικά κύτταρα μια αποικία, όμως, πρέπει να έχουν την ικανότητα να μπορούν να εισέρχονται και να εξέρχονται από τη λέμφο και από την κυκλοφορία του αίματος, καθώς και να μπορούν να εγκαθίστανται και να επιβιώνουν σε διαφορετικούς ιστούς[2].

Τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται τους μηχανισμούς της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης, για να δημιουργούν τις μεταστάσεις τους. Αγγειογένεση ονομάζεται η ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων από ήδη υπάρχοντα κύτταρα, και είναι μια απολύτως φυσιολογική διαδικασία του οργανισμού [3], [4]. Σε ένα φυσιολογικό οργανισμό, η αγγειογένεση πραγματοποιείται μόνο σε ενήλικους, κατά την επούλωση τραυμάτων, κατά την έμμηνο ρύση ή κατά την κύηση. Σε οποιαδήποτε άλλη λειτουργία του οργανισμού υπάρχουν παράγοντες του οργανισμού (αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες) που κρατάνε σε κατάσταση ηρεμίας τα ενδομηλικά κύτταρα που συντελούν στην αγγειογένεση [3]. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να προσελκύουν τα αιμοφόρα αγγεία, ώστε αυτά να σχηματίσουν νέα αιμοφόρα αγγεία γύρω από τον όγκο. Έτσι, ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αγγειογένεσης για λογαριασμό του καρκινικού όγκου. Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζουν ένα πλέγμα γύρω από τον όγκο και έτσι, ο καρκινικός όγκος χρησιμοποιώντας τα υρεπτικά συστατικά του αίματος, έχει την δυνατότητα να αναπτυχθεί και μέσω των οδών του αίματος να μεταναστεύσει σε άλλα όργανα του σώματος.

Αν και η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος είναι μια σημαντική δίοδος για τη δημιουργία μεταστάσεων, οι περισσότεροι τύποι καρκίνου χρησιμοποιούν το λεμφικό σύστημα και την ανάπτυξη των λεμφαγγείων για να δημιουργήσουν μεταστάσεις. Βέβαια, παρά το γεγονός ότι το λεμφικό και το αγγειακό σύστημα είναι δύο τελείως διαφορετικά συστήματα, αλληλοσυνδέονται και αλληλεπιδρούν, ώστε να διαφυλάσσεται η σωστή και ομαλή λειτουργία των ιστών και του οργανισμού. Οι σημαντικότερες λειτουργίες του λεμφικού συστήματος είναι η συμμετοχή του στους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του οργανισμού και η μεταφορά πρωτεΐνων από το διάμεσο χώρο. Η δυσλειτουργία του λεμφικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε πολλών ειδών ασθένειες, από ένα απλό οίδημα μέχρι και δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Δυστυχώς, παρ' ότι το λεμφικό σύστημα είναι εξίσου σημαντικό με το αγγειακό, έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο από το αυτό. Το λεμφικό σύστημα αποτελείται από πέντε (5) τμήματα: α) τα λεμφικά τριχοειδή, β) τα αυθροιστικά

---

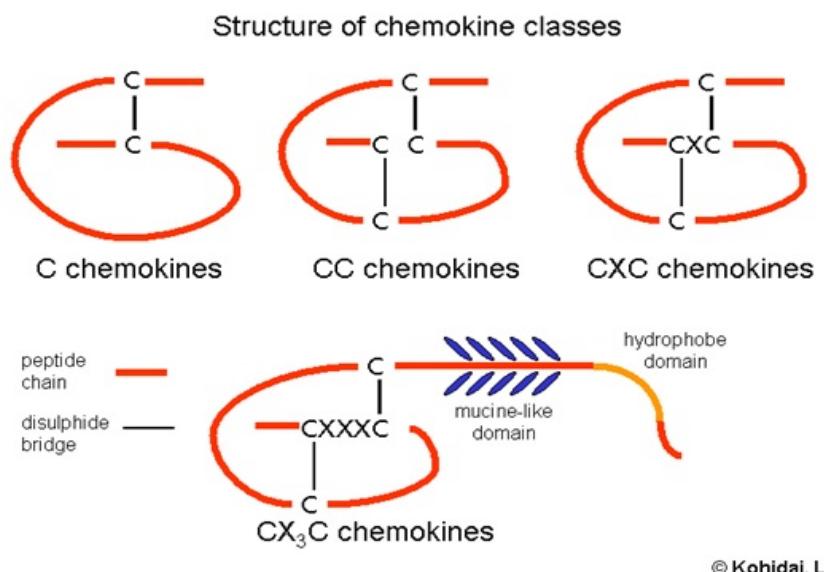
αγγεία, γ) τους πόρους, δ) τα λεμφικά στελέχη και ε) τους λεμφαδένες. Για να δημιουργηθεί η λέμφος θα πρέπει να μετακινηθεί διάμεσο υγρό μέσα σε λεμφικά τριχοειδή. Στη συνέχεια, η λέμφος οδηγείται μέσω των ανθροιστικών αγγείων στους λεμφικούς πόρους. Τελικά, η λέμφος καταλήγει στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του λεμφικού συστήματος. Μεταξύ, των ανθροιστικών αγγείων και των λεμφικών πόρων παρεμβάλονται αρκετοί λεμφαδένες, τους οποίους πρέπει να διαπεράσει η λέμφος, για να καταλήξει στην κυκλοφορία του αίματος. Η λεμφαγγειογένεση συνίσταται στο σχηματισμό νέων λεμφικών αγγείων (λεμφαγγείων), τα οποία συνδέονται με το κύριο μέρος του λεμφικού συστήματος. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των λεμφαγγείων, συγχριτικά με το αγγειακό σύστημα, είναι ότι τα κύτταρά τους δεν έχουν ισχυρές συνδέσεις μεταξύ τους. Επιπρόσθετα, η σύνθεση των λεμφαγγείων με τους γειτονικούς ιστούς γίνεται μέσω λεπτών ινών. Τα κυριότερα όργανα του σώματος στα οποία υπάρχουν λεμφαγγεία είναι οι πνεύμονες και ο γαστρικός σωλήνας. Επίσης, υπάρχουν πολλά λεμφαγγεία στο ανθρώπινο δέρμα. Ένας τομέας όπου οι επιστήμονες διαφωνούν είναι για το αν σχηματίζονται λεμφαγγεία μέσα στους καρκινούς όγκους ή όχι. Υπάρχουν επιστημονικά άρθρα που υποστηρίζουν την μία άποψη και υπάρχουν και επιστημονικά άρθρα που υποστηρίζουν την άλλη [5].

Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη λεμφαγγειογένεση για να δημιουργήσουν μεταστάσεις. Μέσω της λεμφαγγειογένεσης, δημιουργούνται νέα λεμφαγγεία, τα οποία (μέσω μηχανισμών που θα αναλυθούν εκτενώς στη συνέχεια) προσελκύουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στη λέμφο και, έτσι, μπορούν να δημιουργήσουν μεταστάσεις σε διάφορους ιστούς του οργανισμού, είτε μέσω του λεμφικού συστήματος στους ιστούς αυτούς, είτε μέσω του αγγειακού συστήματος (αφού η λέμφος καταλήγει στο αγγειακό σύστημα). Ο ρόλος της αγγειογένεσης και, κυρίως, της λεμφαγγειογένεσης είναι τόσο σημαντικός που αρκετές μελέτες για την καταπολέμηση των μεταστάσεων του καρκίνου (άρα και του ίδιου του καρκίνου) βασίζονται σε διεργασίες που εμποδίζουν τη λεμφαγγειογένεση (κάθως και την αγγειογένεση) [2]. Βέβαια, ακόμα η επιστημονική κοινότητα δεν έχει καταλήξει σε αδιάσειστα δεδομένα, ότι η παρεμπόδιση της λεμφαγγειογένεσης και της αγγειογένεσης μπορεί να εξαφανίσει τις μεταλλάξεις [5]. Αυτό συμβαίνει, γιατί δεν είναι γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί που οδηγούν σε μεταστάσεις. Πρέπει να τονιστεί ότι η μετάσταση στους λεμφαδένες είναι το πρώτο βήμα για τη διάδοση πολλών ειδών καρκίνου, όπως εκείνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη κ.α., καθώς και ένας σημαντικός παράγοντας για την πρόγνωση διάδοσης του [6].

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η λεμφαγγειογένεση, οι μηχανισμοί που την δημιουργούν, καθώς και οι μηχανισμοί που οδηγούν από τη λεμφαγγειογένεση στην καρκινική μετάσταση.

## 1.3 Χημειοκίνες (Chemokines)

Οι χημειοκίνες (chemokines) είναι μικρές πρωτεΐνες που ελέγχουν την κυτταρική μετανάστευση και συνιστούν μια υποκατηγορία των κυτταροκινών. Στα θηλαστικά υπάρχει μια εκτεταμένη οικογένεια χημειοκινών, η οποία απαριθμεί περίπου 50 μέλη. Την οικογένεια αυτή μπορούμε να τη χωρίσουμε σε τέσσερις (4) μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τη δομή των μορίων τους και, συγκεκριμένα, από τους δεσμούς που περιλαμβάνονται μεταξύ των κυτταρικών τους (N-Terminalcysteines). Οι κατηγορίες αυτές είναι οι C χημειοκίνες, οι CC χημειοκίνες, οι CXC χημειοκίνες και οι CX<sub>3</sub>C χημειοκίνες [7]. Οι C χημειοκίνες έχουν έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυτταρικών τους, οι CC χημειοκίνες έχουν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυτταρικών τους, οι CXC χημειοκίνες έχουν δύο δισουλφιδικούς δέσμους μεταξύ των κυτταρικών τους και μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλεται κατάλοιπο διαφορετικού αμινοξέος, ενώ στις CX<sub>3</sub>C χημειοκίνες παρεμβάλλονται 3 κατάλοιπα διαφορετικού αμινοξέος [8]. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.2) φαίνονται και οι τέσσερις κατηγορίες.



Σχήμα 1.2: Τα τέσσερα είδη χημειοκινών.

Στη παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με μια χημειοκίνη από την οικογένεια των CC χημειοκινών, και συγκεκριμένα με την CCL21 (CC chemokine ligand 21). Μια άλλη ευρέως διαδεδομένη ονομασία για τη CCL21 είναι SLC. Έχει ανακαλυφθεί ότι η CCL21 εκτός από τον ανθρώπινο οργανισμό υπάρ-

---

χει και σε ποντίκια και σε μαϊμούδες. Συνήθως, οι CC χημειοκίνες περιέχουν τέσσερις κυστείνες, όμως η CCL21 περίεχει 6 κυστείνες στο μόριο της. Το ιδιαίτερο στοιχείο για το μόριο της είναι ότι οι δύο επιπλέον κυστείνες της βρίσκονται στο Γ-τερματικού έλικα (C-terminal helix) [7].

Η CCL21 ανήκει στις ομοιοστατικές CCL χημειοκίνες, παράγεται από τα κύτταρα του λεμφικού ιστού και έχει καταλυτικό ρόλο στη δημιουργία μεταστάσεων μέσω του λεμφικού συστήματος. Στα υγιή κύτταρα, η κύρια λειτουργίας της είναι να καθοδηγεί τα T-κύτταρα (T-cells) και τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells) μέσα στο λεμφικό ιστό [7].

Έχει διαπιστωθεί ότι η έκχριση της CCL21 στα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα (ΛΕΚ) ρυθμίζεται από το VEGF-C [9], [10]. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας C (Vascular Endothelial Growth Factor C, VEGF-C) είναι μια πρωτεΐνη της οικογένειας των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [11], [12]. Οι VEGF είναι πρωτεΐνες που αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα [12].

Η ακριβής συμβολή της CCL21 στη λεμφαγγειογένεση δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αλλά υπάρχει μια ευρέως διαδεδομένη άποψη στην επιστημονική κοινότητα για τη λειτουργία της. Σύμφωνα με αυτή, η CCL21 παράγεται από τα ΛΕΚ και εκχρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η CCL21 συνδέεται με τον υποδοχέα 7 των CC χημειοκινών (CC receptor 7, CCR7) και έχει την ικανότητα να τον ελκύει προς το μέρος της. Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Έτσι, όταν τα ΛΕΚ παράγουν την CCL21, αυτή προσελκύει τον CCR7 που βρίσκεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή προσελκύει τα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια, η CCL21 συνδέεται με τον υποδοχέα CCR7 και τα καρκινικά κύτταρα διαπερνούν το λεμφικό ιστό και δημιουργούν μεταστάσεις [3], [9], [10], [13], [14], [15]. Με βάση το μηχανισμό αυτό, θα μπορούσε να δημιουργηθεί μια πρόσθετη θεραπευτική στρατηγική, η οποία θα έχει ως στόχο την παρεμπόδιση της σύνδεσης της CCL21 με το CCR7 [16], είτε παρεμποδίζοντας την CCL21 είτε τον CCR7 [9].

Στη λειτουργία της CCL21 σημαντικό ρόλο παίζει, επίσης, η ηπαρίνη (heparin). Και πιο συγκεκριμένα, το θειικό άλας της ηπαρίνης (Heparan sulfate, HS) προτεογλυκάνης (proteoglycan), που είναι μια γλυκοζαμινογλυκάνη (glycosaminoglycan), δηλαδή είδος πολυσακχαρίτη και εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο και στην επιφάνεια κυττάρων. Το HS είναι γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από θειικά τροποποιημένους επαναλαμβανόμενους δισακχαρίτες που επιτρέπουν στη γλυκάνη να αλληλεπιδρά και να δεσμεύει αρκετές ουσίες, όπως οι χημειοκίνες, οι κυτοσίνες, οι VEGF κ.α. [17]. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ηπαρίνες έχουν την ικανότητα να προσδένονται και να αλλάζουν τις λειτουργίες των χημειοκινών (καθώς και των άλλων ουσιών με τις οποίες προσδένονται) [18]. Το HS φαίνεται ότι έχει καθοριστικό ρόλο στη ολοκλήρωση της λειτουργίας της CCL21. Συγκεκριμένα, συμμετέχει με δύο

---

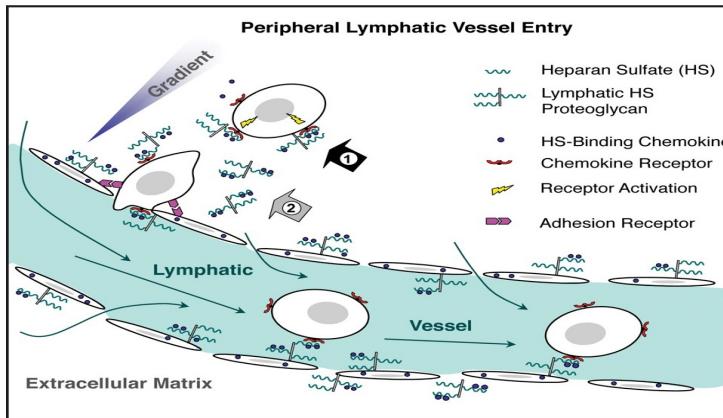
διαφορετικούς τρόπους: α) μέσω του HS που παράγεται από τα λεμφαγγεία και λειτουργεί ως υποδοχέας (co-receptor) του συμπλόκου CCL21–CCR7, οδηγώντας έτσι, τα καρκινικά κύτταρα (πάνω στα οποία βρίσκεται το σύμπλοκο CCL21–CCR7) στα λεμφαγγεία και β) μέσω του HS που βρίσκεται στην επιφάνεια του λεμφικού ενδοθηλίου και συγκεντρώνει τη CCL21 γύρω από το ενδοθήλιο, “φανερώντας” έτσι τη θέση των λεμφαγγείων στον καρκίνο. [17].

Να σημειωθεί, ότι ο Γ-τερματικού ύλικας της CCL21 είναι πλούσιος σε αμινοξέα και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το HS προσδένεται στη CCL21. Όπως, έχει αναφερθεί υπάρχουν δύο είδη του HS, αυτό που παράγεται από τα λεμφαγγεία και αυτό που βρίσκεται στην επιφάνεια του λεμφικού ενδοθηλίου. Το HS του μεσοκυττάριου χώρου (υο οποίο παράγεται από τα λεμφαγγεία) έχει την ικανότητα να συνδέεται με τη CCL21 και με το σύμπλοκο CCL21–CCR7. Όπως, έχει αναφερθεί το σύμπλοκο CCL21–CCR7 βρίσκεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Όταν το HS συνδέεται με το σύμπλοκο αυτό, οδηγεί τα καρκινικά κύτταρα προς τα λεμφαγγεία. Έτσι, το HS ουσιαστικά υποβοηθά τη δράση της CCL21 και καθορίζει την κατεύθυνση της κίνησης των καρκινικών κυττάρων. Το HS που βρίσκεται στην επιφάνεια του λεμφικού ενδοθηλίου έχει ένα διαφορετικό αλλά εξίσου σημαντικό ρόλο. Πρώτα από όλα το HS αυτό συνδέεται με τις ελέυθερες CCL21 του μεσοκυττάριου χώρου. Αυτό βοηθάει σε δύο τομείς. Πρώτον, βοηθάει τη CCL21 να συνδέεται με ελεύθερα καρκινικά κύτταρα και δεύτερον συγκεντρώνει τη CCL21 γύρω από το ενδοθήλιο. Το γεγόνος ότι γύρω από το ενδοθήλιο η συγκέντρωση της CCL21 είναι αυξημένη, “προδίδει” τη θέση των λεμφαγγείων στον καρκινικό όγκο και βοηθά το σύμπλοκο HS–CCL21–CCR7 να κατευθύνει πιο γρήγορα τον καρκινικό όγκο στα λεμφαγγεία. Επιπρόσθετα, το HS της επιφάνειας των κυττάρων του ενδοθυλίου βοηθάει τα καρκινικά κύτταρα να προσδεθούν στα λεμφικά κύτταρα και έτσι η είσοδος του καρκινικού όγκου στο λεμφικό σύστημα γίνεται πιο εύκολα και πιο ομαλά [17].

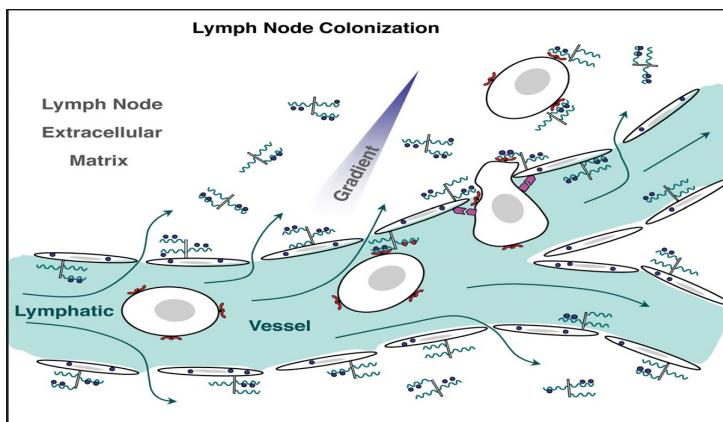
Το HS συνδέεται και με άλλες ουσίες του μεσοκυττάριου χώρου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δέσμευση σημαντικών ποσοτήτων του HS και ουσιαστικά να επιρρεάσει τη δράση της CCL21. Η συμμετοχή του HS στη μετάσταση του καρκίνου φαίνεται πλήρως στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 1.3).

Να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο HS–CCL21–CCR7 δε συμμετέχει μόνο στο να εισέλθουν τα καρκινικά κύτταρα στο λεμφικό σύστημα, αλλά τα βοηθάει και στο να εξέλθουν από αυτό [17] (σχήμα 1.4).

Στη δημοσιέυση των X. Yin, J. Truty κ.α. : “A critical role for lymphatic endothelial heparan sulfate in lymph node metastasis” ([17]) παρατηρήθηκε ότι όταν εμποδιζόταν η δράση του HS τότε δεν πραγματοποιούνταν εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο λεμφικό σύστημα. Η αναστολή της δράσης του HS πραγματοποιούνταν με επεξεργασία του λεμφικού συστήματος με ηπαρινάση. Η ηπαρινάση (heparinase) είναι ένζυμο της οικογένειας των λυασών το οποίο έχει



Σχήμα 1.3: Η δράση του HS σε συνδυασμό με τη CCL21 [17].



Σχήμα 1.4: Η έξοδος του καρκίνου από το λεμφικό σύστημα με τη βοήθεια του HS και της CCL21 [17].

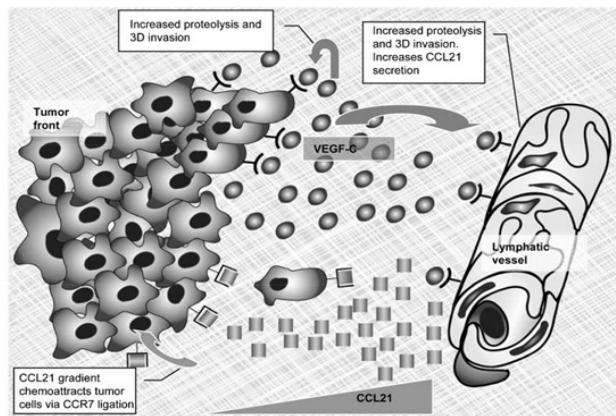
την ικανότητα να καταστρέψει τις ηπαρίνες, και στη συγκεκριμένη περίπτωση το HS. Τα αποτελέσματα της δημοσίευσης αυτής αφορούν στο καρκίνωμα των πνευμόνων (lung carcinoma), αλλά μπορούν κάλιστα να γενικευτούν για τη γενικότερη λειτουργία του HS και της CCL21.

Συμπερασματικά, τα καρκινικά κύτταρα, για να καταφέρουν να πλησιάσουν στα λεμφαγγεία παράγουν το VEGF-C, που, με τη σειρά του, αναγκάζει τα λεμφικά κύτταρα να παράγουν τη CCL21, η οποία προσελκύει τα καρκινικά κύτταρα προς το μέρος της μέσω του υποδοχέα CCR7. Ουσιαστικά, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν την CCL21 (μέσω της σύνδεσής της με το HS) ως οδηγό για να εντοπίσουν την ακριβή θέση των λεμφαγγείων. Επιπρόσθετα, για να καταφέρουν να παραχθεί η CCL21, παράγουν VEGF-C.

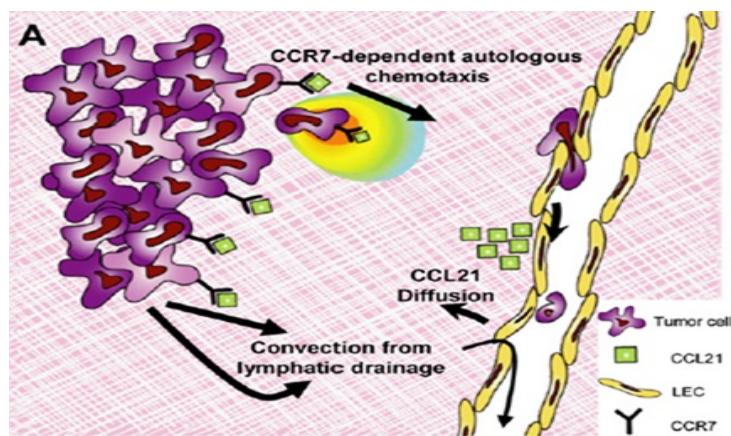
Λόγω της σύνδεσης του CCR7 με τη CCL21, έχει αποδειχθεί, ότι τα καρ-

κινικά κύτταρα χρησιμοποιούν το CCR7 ως ένα μηχανισμό για να ανιχνεύουν τη ροή των λεμφικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση του CCR7 και η σύνδεση του με τη CCL21 ρυθμίζεται μέσω των δενδριτικών κυττάρων. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι χωρίς την παρουσία δενδριτικών κυττάρων, αποτυγχάνει η μετάσταση μέσω του λεμφικού συστήματος, επειδή το CCR7 δεν συνδέεται με τη CCL21 [9].

Τέλος, η CCL21 έχει συνδεθεί με τη μετάσταση στους λεμφαδένες του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του μαστού, του οισοφάγου, των πνευμόνων και του προστάτη [9]. Στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 1.5 και 1.6) φαίνεται ξεκάθαρα ο ρόλος του VEGF-C, και χυρίως ο ρόλος της CCL21 και του CCR7 στην προσέλκυση του καρκινικού όγκου από τα λεμφαγγεία.



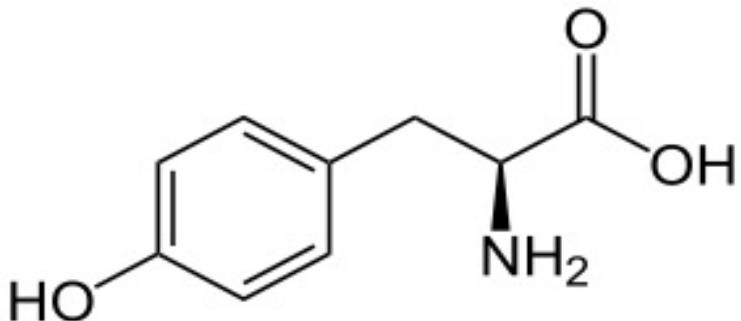
Σχήμα 1.5: Πώς λειτουργούν οι χημειοκίνες (1) [9].



Σχήμα 1.6: Πώς λειτουργούν οι χημειοκίνες (2) [15].

## 1.4 Αγγειοποιητίνες (Angiopoietins)

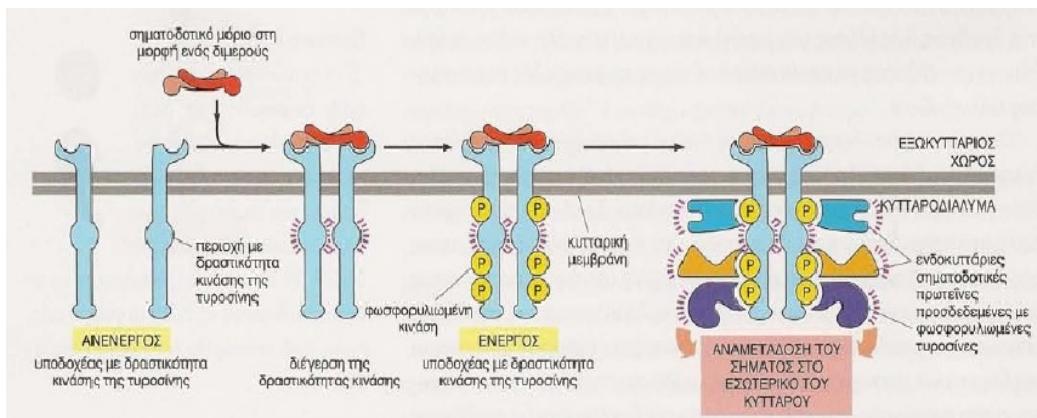
Στους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην λεμφαγγειογένεση σημαντικό ρόλο παίζουν οι αγγειοποιητίνες (angiopoietins) 1 (Ang-1) και 2 (Ang-2), καθώς και ο υποδοχέας τους Tie-2 (ο δεύτερος υποδοχέας της οικογένειας Tie, υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης) (ο Tie-2 είναι γνωστός και ως TEK). Η τυροσίνη (tyrosine, σχήμα 1.7) ή 4-υδροξυφαινυλαλανίνη (4-hydroxyphenylalanine) είναι ένα αμινοξύ που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για τη σύνθεση των πρωτεΐνων. Η κινάση είναι ένζυμο το οποίο έχει την ικανότητα να μεταφέρει φωσφορικές ομάδες από μεγαλής ενέργειας μόρια σε συγκεκριμένα υποστρώματα, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται φωσφοριλάση. Βεβαία, οι κινάσες παρ' ότι συμμετέχουν σημαντικά στην φωσφοριλάση δεν έχουν καμία σχέση με τις φωσφορυλάσες. Η σημαντικότερη κατηγορία κινασών είναι οι κινάσες πρωτεΐνων, οι οποίες διαφοροποιούν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων πρωτεΐνων.



Σχήμα 1.7: Τυροσίνη (Tyrosine).

Οι υποδοχείς με ενεργότητα της κινάσης της τυροσίνης (tyrosine kinases receptors) συνδέονται με πρωτεΐνες (ή ένζυμα) και έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλίουν πλευρικές αλυσίδες της τυροσίνης και η κυτταροπλασματική περιοχή τους λειτουργεί ως κινάση της τυροσίνης. Η οικογένεια των Tie υποδοχέων εκφράζεται, κυρίως, από λεμφικά και αγγειακά κύτταρα. Το κύριο μέρος των υποδοχέων βρίσκεται εντός του κυτταροπλάσματος των κυττάρων. Όμως, για να είναι σε θέση να μπορούν να συνδέονται με τις πρωτεΐνες πρέπει να επικοινωνούν με τον εξωτερικό χώρο του κυττάρου. Γι' αυτό το λόγο, οι υποδοχείς διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και το πάνω τμήμα τους βρίσκεται εκτός κυττάρου. Τα διασυνδετικά μόρια των υποδοχέων έρχονται προς τους υποδοχείς ως σύμπλεγμα δύο μορίων. Για να μπορέσει ο υποδοχέας να συνδεθεί με το μόριο αυτό, πρέπει δύο μόρια του υποδοχέα να έρθουν κοντά και να δημιουρ-

γήσουν ένα διμερές. Το γεγονός ότι δύο μόρια υποδοχέων έρχονται κοντά έχει ως αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η δράση της κινάσης, η οποία φωσφοριλιώνει τις ουρές των υποδοχέων. Οι φωσφοριλιούμενες ουρές ελκύουν πρωτεΐνες, που βρίσκονται μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο, και, έτσι, δημιουργείται ένα σύμπλοκο πρωτεΐνων γύρω από τους υποδοχείς. Το σύμπλοκο αυτό στέλνει διάφορα σήματα στο κύτταρο (ακόμα και προς τον πυρήνα του κυττάρου) και λειτουργεί ο καταλύτης για να δημιουργήθουν διάφορες βιοχημικές διεργασίες εντός του κυττάρου. Για να τερματιστεί η λειτουργία του υποδοχέα-συμπλόκου, το κύτταρο διαθέτει διάφορους μηχανισμούς. Στον πιο συνήθη μηχανισμό για αυτή τη διαδικασία, οι υποδοχείς οδηγούνται στο εσωτερικό του κυττάρου και εκεί καταστρέφονται με μηχανισμούς πέψης [2]. Η δλη διαδικασία φαίνεται λεπτομερώς στο σχήμα 1.8.

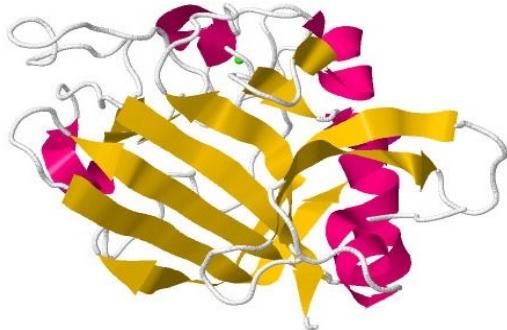


Σχήμα 1.8: Πώς λειτουργούν οι υποδοχείς της κινάσης [2].

Οι αγγειοποιητίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν μια ανθρακική σπείρα συνδεδεμένη με ένα αμιδικό άκρο και ένα ινωδιγόνο ενωμένο με ένα καρβοξυλικό άκρο (amino-terminal coiled-coil domain and carboxy-terminal fibrinogen-like domain) μέσω του οποίου συνδέονται με τους υποδοχείς τους [19]. Οι αγγειοποιητίνες είναι παράγοντες ανάπτυξης (growth factors) και έχουν καταλυτικό ρόλο στην αγγειογένεση και στη λεμφαγγειογένεση. Οι δύο αγγειοποιητίνες που συμμετέχουν στη λεμφαγγειογένεση είναι η αγγειοποιητίνη 1 (Ang-1) και 2 (Ang-2, σχήμα 1.9), ή Angpt-1 και Angpt-2, όπως αλλοίως ονομάζονται αντίστοιχα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αγγειοποιητίνες για να συνδέονται με τους υποδοχείς τους συνδέονται πρώτα με ιντεγκρίνες (integrins) και στη συνέχεια στέλνουν τα απαραίτητα σήματα για να γίνει η διασύνδεση με τους υποδοχείς. Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς που μεσολαβούν μεταξύ ενός κυττάρου και των ιστών που το περιβάλλουν (κυρίως του εξωκυττάριου χώρου). Έχουν σημαντική συμμετοχή στη μεταφορά σημάτων μεταξύ του εξωκυττάριου

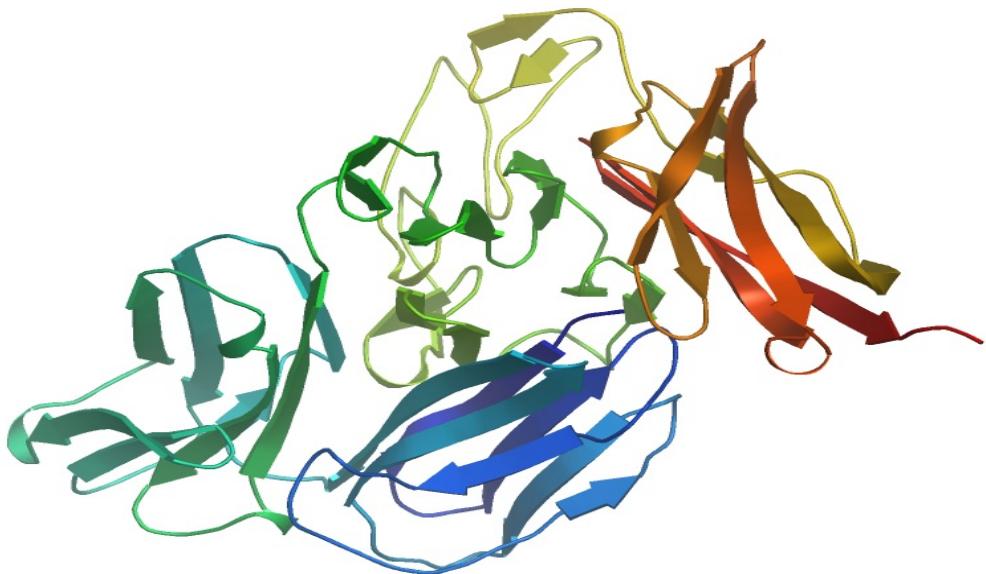
---

χώρου και του κυττάρου.



Σχήμα 1.9: Η αγγειοποιητίνη 2 (Ang-2) [20].

Ο κύριος υποδοχέας που συνδέονται οι Ang-1 και Ang-2 είναι ο Tie-2 (σχήμα 1.10), ο οποίος παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει παρατηρηθεί ότι η Ang-1 ενεργοποιεί πιο δυνατά τον Tie-2 σε σχέση με την Ang-2. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι εάν υπάρχει μόνο ένα διμερές του υποδοχέα Tie-2 και ένα μόριο από την Ang-1 και ένα μόριο της Ang-2, τότε θα εκφραστεί η Ang-1 και όχι η Ang-2. Επιπρόσθετα, για να εκφραστεί η Ang-2 θα πρέπει να έχει απενεργοποιηθεί ή να έχει απομακρυνθεί η Ang-1 [6].



Σχήμα 1.10: Ο υποδοχέας Tie-2 [21].

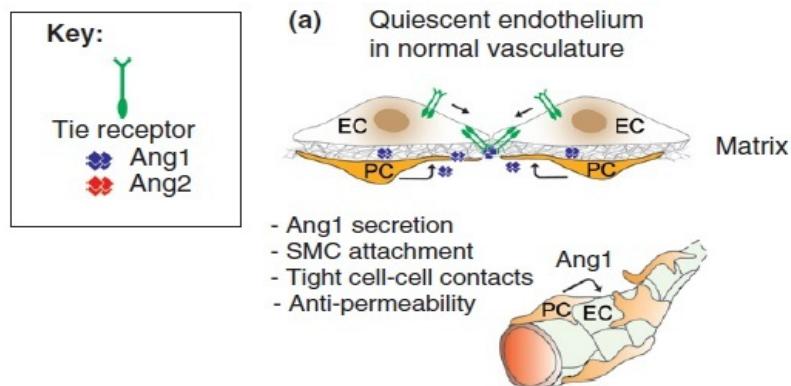
Στη λειτουργία των Ang-1 και Ang-2 στη λεμφαγγειογένεση σημαντικό ρόλο παίζουν τα περικύτταρα (Pericytes, PCs). Τα PCs είναι κύτταρα που

---

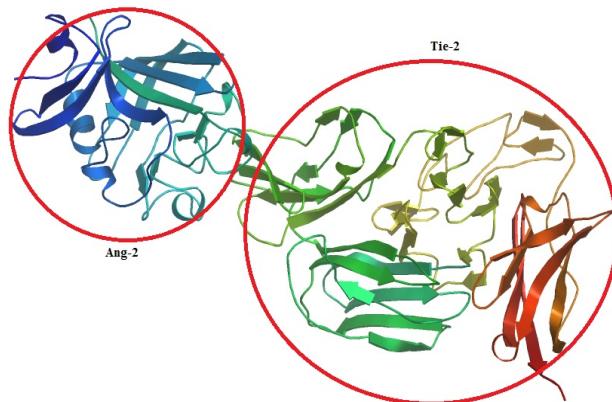
βρίσκονται γύρω από τα ΛΕΚ και τα αιμοφόρα αγγεία και έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν τον φαινότυπο των γειτονικών τους κυττάρων. Τα PCs (μαζί με τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vascular smooth muscle cells, SMCs) ) είναι η βασική πηγή παραγωγής Ang-1. Ενώ, η Ang-2 βρίσκεται αποθηκευμένη στα Weibel-Palade σώματα, τα οποία την εκχρίνουν ανάλογα με τα σήματα που δέχονται από το κύτταρο. Τα Weibel-Palade είναι αποθηκευτικοί χώροι (storage granule) των ενδοιθηλιακών κυττάρων [6]. Τα ενδοιθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, ECs) είναι μια λεπτή στρώση κυττάρων που περιβάλλουν τα λεμφαγγεία (καθώς, και τα αιμοφόρα αγγεία). Τα ενδοιθηλιακά κύτταρα του λεμφαγγειακού συστήματος ονομάζονται “λεμφικά ενδοιθηλιακά κύτταρα” (Lymphatic endothelium cells, LECs), ενώ τα αντίστοιχα των αιμοφόρων αγγείων συνήθως αναφέρονται ως απλώς “ενδοιθηλιακά κύτταρα”. Αν μια ουσία περάσει από τα λεμφικά ενδοιθηλιακά κύτταρα τότε εισέρχεται στο λεμφικό σύστημα χωρίς περατέρω εμπόδια, καθώς τα ενδοιθηλιακά κύτταρα αποτελούν το τελευταίο εμπόδιο για κάποια ουσία που θέλει να εισέλθει στο λεμφικό σύστημα. Το σύνολο των ενδοιθηλιακών κυττάρων αποτελεί το ενδοθήλιο (Endothelium). Επιπρόσθετα, ορισμένοι όγκοι έχουν την ικανότητα να παράγουν Ang-1, ενώ η Ang-2 παράγεται από περιορισμένο αριθμό κυττάρων του όγκου [6].

Τα PCs βρίσκονται πάνω στα ενδοιθηλιακά κύτταρα. Όσο, τα PCs βρίσκονται στα ενδοιθηλιακά κύτταρα, αυτά δεν είναι διαπερατά από καρκινικούς όγκους. Αντίθετα, όταν τα PCs έχουν απομακρυνθεί από τα ενδοιθηλιακά κύτταρα, τότε ο καρκινικός όγκος μπορεί να προσπεράσει το ενδοθήλιο και να εισχωρήσει στο λεμφαγγειακό σύστημα, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μεταστάσεων [6]. Η πρόσδεση της Ang-1 στον Tie-2 έχει ως αποτέλεσμα τα PCs να παραμένουν προσδεμένα στα ECs. Αντίθετα, όταν η Ang-2 προσδένεται στον Tie-2, τότε τα PCs αποκολλούνται από τα ECs. Όπως, φαίνεται και στο σχήμα 1.11 στην κατάσταση ηρεμίας των ECs (φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου), τα PCs εκχρίνουν Ang-1, η οποία προσδένεται στον Tie-2. Όταν γίνει η πρόσδεση, το σύμπλοκο Ang-1-Tie-2 μεταφέρεται στην επιφανεία που συνδέει τα ενδοιθηλιακά κύτταρα. Έτσι, επιτυγχάνεται η πρόσδεση μεταξύ των κυττάρων του ενδοθηλίου και εξασφαλίζεται η επιβίωση και η σταθερότητα των ενδοιθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, τα ενδοιθηλιακά κύτταρα γίνονται αδιαπέραστα σε εξωκυττάριες ουσίες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η πρόσδεση αυτή έχει την ικανότητα να περιορίζει την λεμφαγγειογένεση. Αντίθετα, η Ang-2 εκχρίνεται από τα Weibel-Palade κατά τη διάρκεια της αγγειακής αναδιάρθωσης. Στη διαδικασία αυτή έχουμε μια μετατόπιση του Tie-2 σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας. Ενώ, στην κατάσταση ηρεμίας ο Tie-2 βρίσκεται μεταξύ των κυττάρων για να εξασφαλίσει την πρόσδεσή τους, στην παρούσα κατάσταση βρίσκεται μεταξύ του κυττάρου και του εξωκυττάριου χώρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πρόσδεση της Ang-2 στον Tie-2 (σχήμα 1.12) να οδηγεί στην

μερική καταστροφή της συνοχής και της ομοιομορφίας του ενδοθηλίου, καθώς και στην αποκόλληση των PCs από αυτό. Η δράση του συμπλόκου έχει και άλλες συνέπειες, όπως την ανάπτυξη υποξίας, την παραγωγή του VEGF και την έναρξη της λεμφαγγειογένεσης. Η Ang-2 ουσιαστικά ανταγωνίζεται τη δράση του συμπλόκου Ang-1–Tie-2 και οδηγεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα να είναι διαπερατά (σχήμα 1.13) [6].

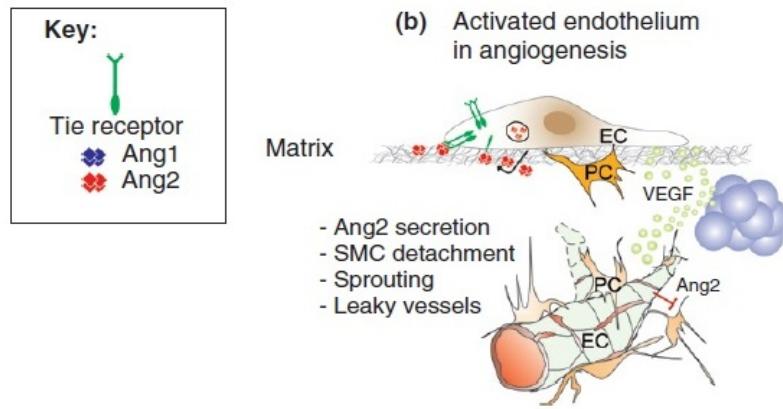


Σχήμα 1.11: Πώς δρα το σύμπλοκο Ang-1–Tie-2 [6].



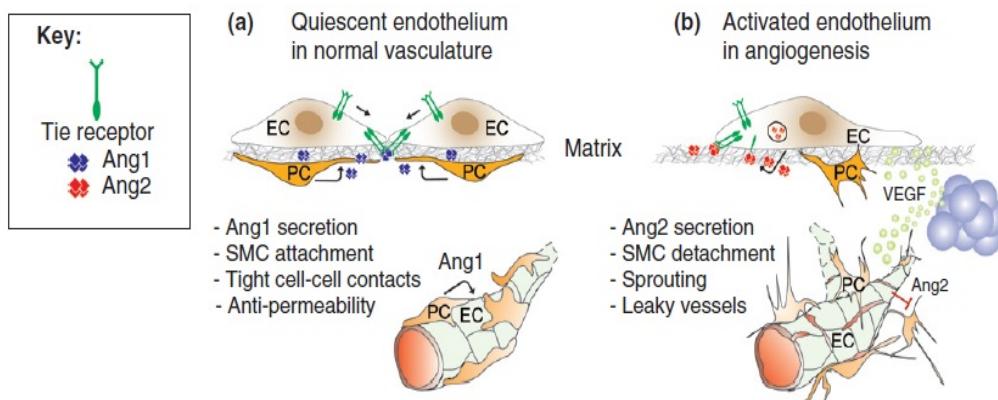
Σχήμα 1.12: Το σύμπλοκο Ang-2–Tie-2 [21].

Σημειωτέον ότι οι μηχανισμοί δράσης των αγγειοποιητίνων (οι οποίες φαίνονται συγκεντρωτικά στο σχήμα 1.14) που περιγράφηκαν ανωτέρω βασίζονται χυρίως στη δημοσίευση των P. Saharinen, K. Alitalo κ.α. : “VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis” [6]. Όμως, στο συγκεκριμένο άρθρο οι μηχανισμοί αναφέρονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος. Παρ' όλα αυτά, οι ίδιοι επιστήμονες σε επόμενο άρθρο



Σχήμα 1.13: Πώς δρα το σύμπλοκο Ang-2–Tie-2 [6].

τους ("Effects of Angiopoietin-2-Blocking Antibody on Endothelial Cell–Cell Junctions and Lung Metastasis" [22]), αναφέρουν ότι επιστημονικά πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η δράση της Ang-2 στη λεμφαγγειογένεση έχει τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που αναμένονταν στην αγγειογένεση. Με βάση τις αναφορές αυτές έχει περιγραφεί ο ανωτέρω μηχανισμός για τη δράση των Ang-1 και Ang-2. Ο ισχυρισμός αυτός ενισχύεται από το γεγονός πως στο ίδιο άρθρο παρατηρήθηκε, ότι εμποδίζοντας την Ang-2 μειώνεται η λεμφαγγειογένεση και η ικανότητα του όγκου να κάνει μεταστάσεις μέσω του λεμφαγγειακού συστήματος. Ωστόσο, είναι δεδόμενο ότι χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί πλήρως η δράση των Ang-1 και Ang-2 στην λεμφαγγειογένεση.



Σχήμα 1.14: Πώς λειτουργούν οι Ang-1 και Ang-2 μαζί με τον Tie-2 [6].

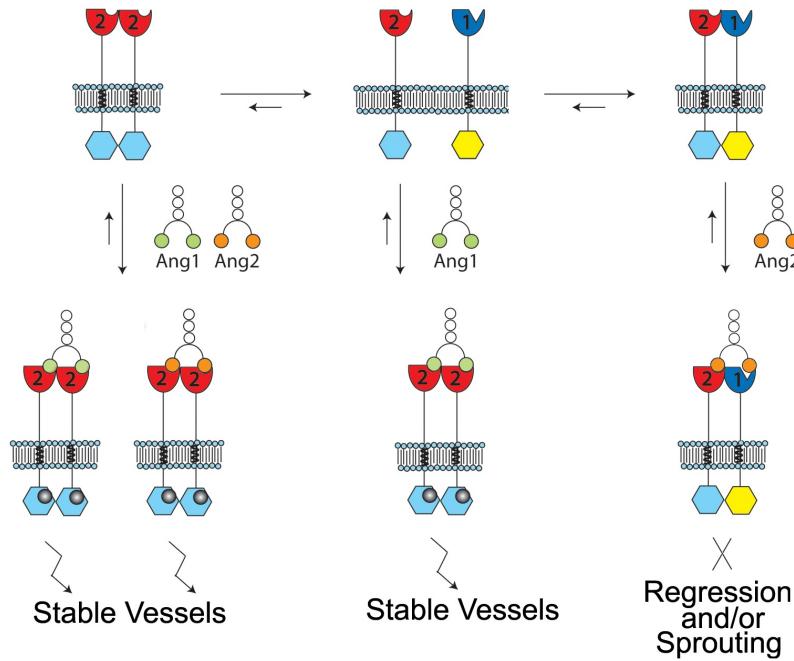
Στην επιστημονική κοινότητα υπάρχει μια διαφωνία αν ο ρόλος της Ang-2 ως προς τον Tie-2 είναι αγωνιστικός ή ανταγωνιστικός. Ο όρος "άγωνιστης"

---

(agonist) χρησιμοποιείται, για να περιγράψει μια ουσία η οποία προσδένεται σε έναν υποδοχέα και μέσω της πρόσδεσης αυτής στέλνει σήματα στο κύτταρο για να εκτελεστεί μια συγκεκριμένη λειτουργία του. Αντίθετα, ανταγωνιστής (antagonist) είναι μια ουσία που έχει την δυνατότητα να συνδέεται με έναν υποδοχέα, αλλά δεν παράγει κάποιο σήμα ή δεν συμμετέχει στην παραγωγή μίας ουσίας στο κύτταρο, αλλά η λειτουργία της συνίσταται στο να εμποδίζει τη φυσιολογική λειτουργία και σηματοδότηση του υποδοχέα, και ουσιαστικά τον εξουδετερώνει. Σύμφωνα με τους ανωτέρω ορισμούς και με την ανάλυση που έχει προηγηθεί για τη λειτουργία των Ang-1 και Ang-2, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η Ang-1 λειτουργεί ως αγωνιστής ως προς τον Tie-2. Αντίθετα, η Ang-2 λειτουργεί ως ανταγωνιστής ως προς τον Tie-2. Πολλά άρθρα υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία ([23], [24]). Όμως, υπάρχουν αρκετά άρθρα που προσπαθούν να διερευνήσουν αν υπάρχει αγωνιστική δράση της Ang-2 ως προς τον Tie-2. Ένα, από αυτά τα άρθρα είναι και αυτό των S.-H. Song και W. Suh κ.α. : “Tie1 regulates the Tie2 agonistic role of angiopoietin-2 in human lymphatic endothelial cells” [25]. Σύμφωνα με το άρθρο αυτό παρατηρήθηκε ότι γενικά η Ang-2 έχει ανταγωνιστική δράση ως προς τον Tie-2. Όμως, καθώς στο πείραμα μεταβαλλόταν η συγκέντρωση του Tie-1, παρατηρήθηκε ότι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις η Ang-2 λειτουργεί αγωνιστικά ως προς τον Tie-2. Παρόλο που υπάρχουν αυτά τα σημαντικά ευρήματα ακόμα παραμένει άγνωστη η αγωνιστική λειτουργία της Ang-2 ως προς τον Tie-2. Για αυτό τον λόγο στη παρούσα εργασία θεωρείται ότι η Ang-2 έχει μόνο ανταγωνιστική δράση ως προς τον Tie-2 [25].

Εκτός από τον υποδοχέα Tie-2, οι Ang-1 και Ang-2 έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τον υποδοχέα Tie-1 (ο πρώτος υποδοχέας της οικογένειας των Tie υποδοχέων). Όμως, υπάρχουν λεμφικά κύτταρα που εκφράζουν μόνο τον Tie-2 και όχι τον Tie-1. Βέβαια, υπάρχουν και κύτταρα που εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς. Μέχρι στιγμής δεν έχουν ανακαλυφθεί κύτταρα που να εκφράζουν μόνο τον Tie-1 και όχι τον Tie-2. Υπό κανονικές συνθήκες, οι αγγειοποιητίνες συνδέονται με ένα διμερές είτε από Tie-2 είτε από Tie-1 και έχουμε κανονικά την έκφραση του συμπλόκου της εκάστοτε περίπτωσης. Όμως, στα κύτταρα που εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς παρατηρούνται υποδοχείς-ετεροδιμερή Tie-1-Tie-2. Σε αυτή τη περίπτωση, οι δύο αγγειοποιητίνες (Ang-1 και Ang-2) συμπεριφέρονται διαφορετικά. Συγκεκριμένα, όταν η Ang-1 πάει να συνδεθεί με το ετεροδιμερές ενεργοποιούνται ορισμένοι μηχανισμοί, οι οποίοι οδηγούν στην διάλυση του ετεροδιμερούς. Το μονομερές του Tie-1 απομακρύνεται και στη θέση του έρχεται ένα μονομερές του Tie-2. Έτσι, δημιουργείται ένα διμερές από υποδοχείς τύπου Tie-2. Η Ang-1 συνδέεται με το διμερές και έτσι, έχουμε την έκφραση του συμπλόκου Ang-1-Tie-2. Αντίθετα, όταν η Ang-2 συναντά το ετεροδιμερές Tie-1-Tie-2, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή και η αγγειοποιητίνη συνδέεται κανονικά με το διμερές. Σε αυτή τη περίπτωση δεν

εκφράζεται το σύμπλοκο του Ang-2–Tie-2 (ούτε και το Ang-2–Tie-1). Έτσι, ουσιαστικά όταν υπάρχουν ετεροδιμερή Tie-1–Tie-2 ή Ang-2 απενεργοποιείται και έχουμε μόνο έκφραση της Ang-1 [26]. Η δόλη διαδικασία παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.15).



Σχήμα 1.15: Πιθανές συνδέσεις του ετεροδιμερούς Tie-1–Tie-2 [26].

Ο ρόλος που παίζει ο Tie-1 στην λεμφαγγειογένεση δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Και μάλιστα εντός της επιστημονικής κοινότητας υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για τους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχει και με ποιό τρόπο [26]. Για το λόγο αυτό, στη παρούσα εργασία τα λεμφικά κύτταρα που θα μελετηθούν θεωρείται ότι δεν εκφράζουν καθόλου των υποδοχέα Tie-1, παρά μόνο των Tie-2.

Είναι σαφές ότι οι γνώσεις μας γύρω από τη λεμφαγγειογένεση είναι περιορισμένες, ενώ η συμβολή της στην υπάρξη μεταστάσεων και διάδοσης του καρκίνου είναι ιδιαίτερως σημαντική. Τη δεδομένη περίοδο, υπάρχουν αρκετές ερευνητικές ομάδες οι οποίες ασχολούνται με αυτό τον τομέα και πραγματοποιούνται μια σειρά από μελέτες και πειράματα για να κατανοηθεί η συμβολή διαφόρων ουσιών (όπως οι αγγειοποιητίνες) στην λεμφαγγειογένεση.

## Κεφάλαιο 2

### Μοντελοποίηση στην αγγειογένεση

#### 2.1 Προηγούμενες Δημοσιεύσης

Η μοντελοποίηση της λεμφαγγειογένεσης είναι ένα σχετικά καινούργιο πεδίο, στο οποίο όσον αφορά τα συνεχή μοντέλα η μοναδική προσπάθεια έχει γίνει από τους A. Friedman και Γ. Λώλα ([27]) και από τους M. Pepper και Γ. Λώλα ([28]). Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετά άρθρα τα οποία ασχολούνται με τη μοντελοποίηση της αγγειογένεσης. Παραδείγματα των οποίων αποτελούν οι δουλειές των M. A. J. Chaplain και A. R. A. Anderson ([29]) και των M. A. J. Chaplain και H. Enderling ([30]). Παράλληλα, η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη γνωστή προσπάθεια μοντελοποίησης της λεμφαγγειογένεσης με τη χρήση στοχαστικού μοντέλου.

#### 2.2 Διαφορές Αγγειογένεσης-Λεμφαγγειογένεσης

Όπως, έχει αναφερθεί το λεμφικό και το αγγειακό σύστημα, όπως και τα μοντέλα που τα περιγράφουν, έχουν κοινά στοιχεία. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν κάποιες σημαντικές διαφορές στη μοντελοποίηση των δύο συστημάτων:

- Τα πειραματικά αποτελέσματα στη λεμφεγγειογένεση είναι σχετικά πρόσφατα και πολύ λιγότερα, συγχριτικά με αυτά της αγγειογένεσης. Για αυτό το λόγο σε ορισμένα σημεία το μοντέλο βασίζεται σε στοιχεία της αγγειογένεσης μέσω προέκτασης που έγινε για αυτά στη λεμφαγγειογένεση.

---

Έτσι, καθώς, νέα πειραματικά δεδομένα γίνονται διαθέσιμα, στο μοντέλο μπορούν να προστεθούν νέα στοιχεία.

- Τα μοντέλα διαφορικών εξισώσεων και στη λεμφαγγειογένεση και στην αγγειογένεση περιγράφουν μόνο τις συγκεντρώσεις για τα αντίστοιχα ενδιθηλιακά κύτταρα. Αυτό δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τα μοντέλα της λεμφαγγειογένεσης, αλλά έχει μεγάλη επίπτωση σε αυτά της αγγειογένεσης, καθώς το σύστημα του αίματος είναι ένα κλειστό σύστημα (και έτσι τα μοντέλα της αγγειογένεσης πρέπει να περιέχουν έναν όρο για την αναστόμωση), ενώ αντίθετα το λεμφικό σύστημα είναι ένα ανοιχτό σύστημα (καταλήγει στο αίμα) και, επομένως, δεν απαιτεί αναστόμωση. Ο όρος “άναστόμωση” (anastomosis) αναφέρεται στην επανασύνδεση και ανάμιξη δύο διαφορετικών ρευματών, που προηγουμένως είχαν διαχωριστεί, και, χυρίως, εμφανίζεται στα αιμοφόρα αγγεία.
- Τα λεμφικά αγγεία έχουν την ικανότητα να παραμένουν άθικτα για 6 μήνες (σε μερικά πειράματα ακόμα και 1 χρόνο), ενώ τα αιμοφόρα αγγεία αρχίζουν και ελαττώνονται περίπου 2 εβδομάδες, αφ' ότου έχουν εξαντληθεί οι αυξητικοί παράγοντες. Κατά συνέπεια, ένα μοντέλο λεμφαγγειογένεσης διαρκεί περισσότερο από ένα μοντέλο αγγειογένεσης.

# Μέρος II

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

# Κεφάλαιο 3

## Τρισδιάστατο μοντέλο

### 3.1 Γενικά για το CompuCell 3D

Στην παρούσα εργασία οι μηχανισμοί των χημειοκινών μελετήθηκαν και σε τρισδιάστατο επίπεδο με τη βοήθεια του προγράμματος CompuCell 3D. Το CompuCell 3D (CC3D) είναι ένα υπολογιστικό περιβάλλον επίλυσης προβλημάτων, βασισμένο σε γλώσσα C++ τριών διαστάσεων, που επικεντρώνεται σε προβλήματα βιοσυνθετότητας τα οποία περιέχουν πολλαπλά μαθηματικά μοντέλα. Για την επίλυση των προβλημάτων του, το CC3D χρησιμοποιεί τη μέθοδο Cellular Potts Model (CPM). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιεί επιλύτες μερικών διαφορικών εξισώσεων, όπως για παράδειγμα για την επίλυση των μηχανισμών διάχυσης εξωκυττάριων ουσιών. Με όλους αυτούς τους επιλύτες το CC3D έχει την δυνατότητα να επιλύει μοντέλα κυτταρικών αντιδράσεων και αποκρίσεων. Παρότι το CC3D είναι δομημένο σε γλώσσα C++, η γραφή των μοντέλων πραγματοποιείται σε γλώσσα Python. Επιπλέον, το CC3D επιτρέπει στο χρήστη να κάνει προγραμματισμό σε γλώσσα XML, (eXtensible Markup Language) ή να γράψει το μοντέλο του σε XML και σε Python συνδυάζοντας τα [31].

Το μοντέλο CPM (Cellular Potts Model) είναι μια υπολογιστική μέθοδος μοντέλοποιήσης η οποία βασίζεται στη δημιουργία και επίλυση πλεγμάτων και κυριώς χρησιμοποιείται σε βιολογικά μοντέλα. Η CPM είναι επίσης γνωστή ως “Glazier and Graner model” καθώς, η τελική της μορφή σχεδιάστηκε το 1992 από τους James Glazier και Francois Graner (το μοντέλο πρώτος το περιέγραψε ο Renfrey Potts στην διατριβή του). Στην CPM χρησιμοποείται ο όρος “κύτταρο” για να περιγράψει περιοχές από pixels που έχουν το ίδιο id. Αυτό το “κύτταρο” μπορεί να αντιστοιχεί σε ένα πραγματικό κύτταρο, σε ένα μέρος κυττάρου ή μια περιοχή που περιέχει μια συγκεκριμένη ουσία. Κάθε κύτταρο

---

έχει 4 διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αυτά είναι ο όγκος του (target volume), η ελαστικότητα του όγκου (volume elasticity), η επιφάνειά του (target surface area) και η ελαστικότητα της μεμβράνης (membrane elasticity). Η μέθοδος (επομένως και το πρόγραμμα) έχει ως στόχο, στην επίλυσή του, την ελαχιστοποίηση της ενέργειας μεταξύ των κυττάρων. Η κύρια λειτουργία της μεθόδου είναι η εύρεση της Χαμιλτονιανής της ενέργειας, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μεταβολής των ιδιοτήτων των κυττάρων. Στον υπολογισμό της Χαμιλτονιανής σημαντικό ρόλο παίζει η διαμόρφωση του πλέγματος, καθώς και των γειτονικών πλεγμάτων και υποπλεγμάτων [31].

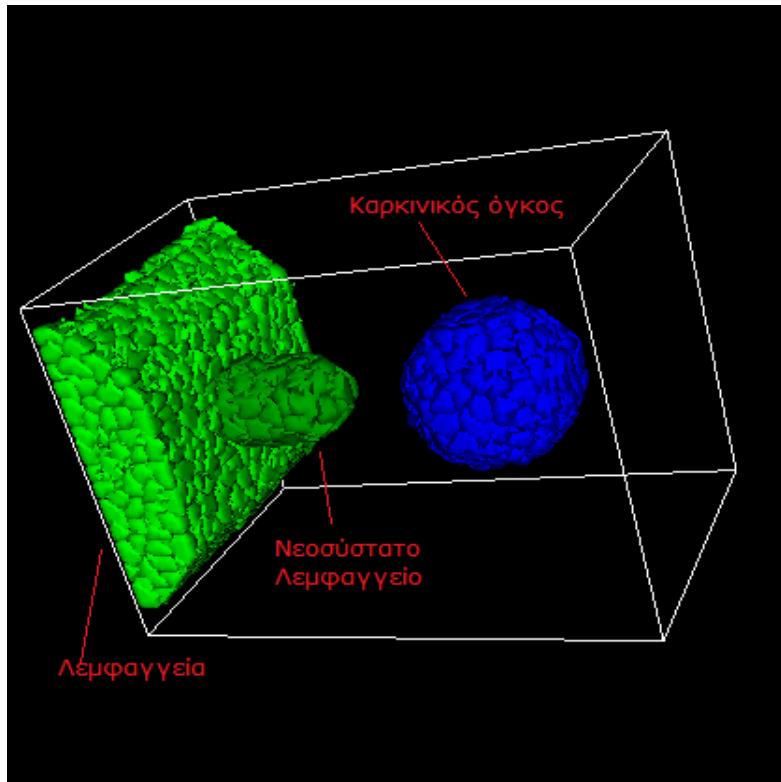
## 3.2 Δημιουργία Μοντέλου

Στο μοντέλο που δημιουργήθηκε μελετάται η λειτουργία των χημειοκινών και συγκεκριμένα της CCL21. Επειδή όπως έχει αναφερθεί η CCL21 δρα αφού έχει πραγματοποιηθεί η λεμφαγειογένεση, στο παρόν μοντέλο έχουμε θεωρήσει ότι έχει ήδη πραγματοποιηθεί η λεμφαγγειογένεση και ύστερα ξεκινά η έκκριση της CCL21. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε ένα ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο. Το χωρίο μας περιέχει ένα τμήμα των λεμφαγγείων, μία προέκταση τους από νεοσύστατα λεμφικά κύτταρα (τα οποία προέκυψαν από τη λεμφαγγειογένεση) και έναν όγκο. Η γεωμετρία των κυττάρων που συμμετέχουν επιλέχθηκε με βάση τα βιολογικά θεωρητικά δεδομένα της βιβλιογραφίας. Τα λεμφαγγεία καταλαμβάνουν τη μία έδρα του παραλληλεπιπέδου μας και έχουν ημικυλινδρικό σχήμα. Το νεοσύστατο λεμφαγγείο έχει κυλινδρικό σχήμα και είναι κάθετο στα λεμφαγγεία. Τέλος, ο καρκινικός όγκος έχει σχήμα σφαίρας. Η γεωμετρία του μοντέλου φαίνεται στο σχήμα 3.1.

Στο σχήμα 3.1 με πράσινο ανοιχτό χρώμα παρουσιάζονται τα λεμφαγγεία, με σκούρο πράσινο το νεοσύστατο λεμφαγγείο και με μπλε χρώμα ο καρκινικός όγκος.

Τα νέα λεμφαγγεία έχουν την ικανότητα και παράγουν CCL21. Όταν, η συγκέντρωση της CCL21 κοντά στον καρκίνο ξεπεράσει ένα όριο, τότε κάποια καρκινικά κύτταρα αρχίζουν και φεύγουν από τον όγκο και εισέρχονται στο λεμφαγγειακό σύστημα. Να σημειωθεί ότι στο πρόγραμμα υπάρχει όρος ώστε τα καρκινικά κύτταρα να μη φεύγουν από τον όγκο από κάποιο σημείο και μετά, καθώς στην όλη βιολογική διαδικασία ο όγκος δεν αποσυντίθεται. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διαδικασία, εισάγαμε στο πρόγραμμα:

- α) όρο για την έκκριση (secretion) της CCL21 από το λεμφαγγείο, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η παραγωγής της,
- β) όρο για τη διάχυση (diffusion) της CCL21, έτσι ώστε να μπορεί η CCL21



Σχήμα 3.1: Η γεωμετρία του μοντέλου

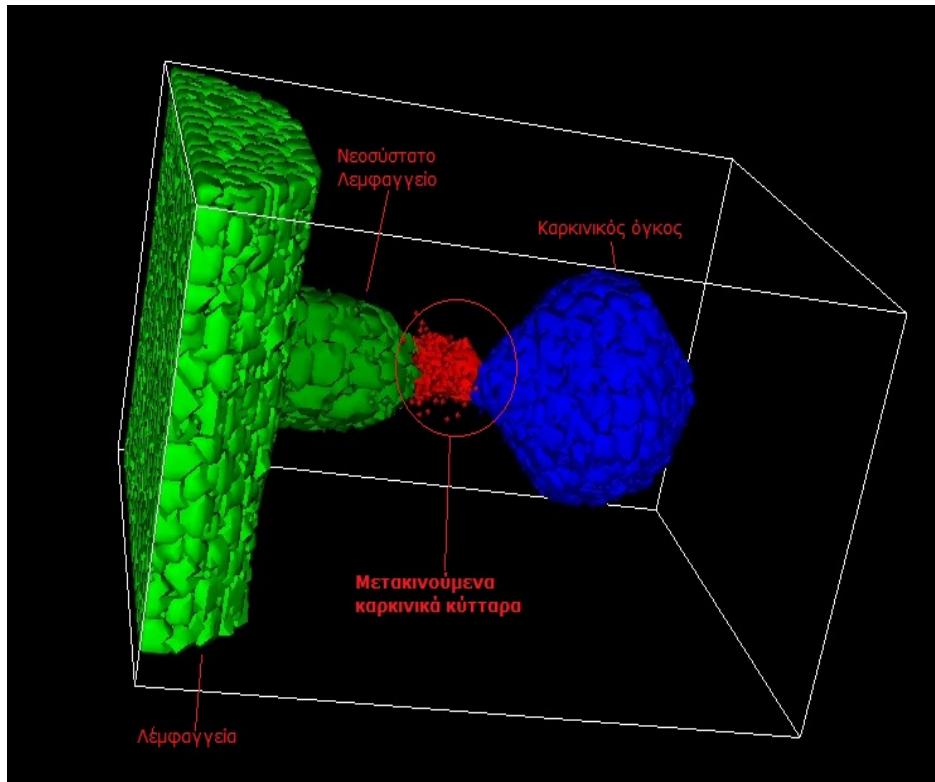
να εξαπλωθεί μέσα στον εξωκυττάριο χώρο και

- γ) όρο χημειοταξίας (Chemotaxis), έτσι ώστε να είναι ικανά τα καρκινικά κύτταρα να κινηθούν προς τη CCL21.

Στο σχήμα 3.2 φαίνεται ένα στιγμιότυπο της όλης διεργασίας, κατά το οποίο ορισμένα καρκινικά κύτταρα (κόκκινο χρώμα) έχουν φύγει από τον όγκο και κινούνται προς τα λεμφαγγεία.

### 3.3 Ο κώδικας του μοντέλου

Στη συνέχεια θα αναφερθούν τα πιο σημαντικά μπλοκ εντολών (Plugins) που χρησιμοποιήθηκαν στον XML κώδικα του προγράμματος. Να σημειωθεί ότι ο κώδικας της Python του προγραμμάτος περιέχει εντολή μόνο για τη μίτωση των καρκινικών κυττάρων.



Σχήμα 3.2: ένα στιγμιότυπο της διαδικασίας

Για να δημιουργήσουμε την επιθυμητή γεωμετρία χρησιμοποιήσαμε τις εντολές UniformInitializer και BlobInitializer. Το UniformInitializer είναι ένα μπλοκ εντολών, το οποίο επιτρέπει στο χρήστη να καθορίζει ορθογώνιες περιοχές με κύτταρα μέσα στο πεδίο επίλυσης. Στο συγκεκριμένο μπλοκ εισάγαμε πλήρως την επιθυμητή θέση των κυττάρων, καθώς και το μέγεθός τους. Με την εντολή αυτή καθορίστηκε το σχήμα των λεμφαγγείων και των νεοσχηματισθέντων λεμφαγγείων. Με την εντολή BlobInitializer ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει μια σφαιρική περιοχή κύτταρων. Στη συγκεκριμένη εντολή εισαγάγαμε το μέγεθός του κάθε κυττάρου, το κέντρο και την ακτίνα της σφαίρας. Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό του σχήματος του όγκου.

Για να καθοριστούν οι δυνάμεις που συνδέουν τα κύτταρα μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε το μπλοκ εντολών Contact. Για να πραγματοποιήσει το CC3D τους απαραίτητους ενεργειακούς υπολογισμούς χρειάζεται, να του δωθούν οι ενεργειακοί δεσμοί μεταξύ των κυττάρων. Στη παρούσα μοντελοποίηση το ρόλο αυτό διαδραματίζει το μπλοκ εντολών Contact. Μέσω της εντολής αυτής το CC3D για να πραγματοποιήσει του απαιτούμενους υπολογισμούς λύνει την ε-

---

ξίσωση:

$$E_{Adhesion} = \sum_{i,j,neighbors} J(\tau_{\sigma(i)}, \tau_{\sigma(j)})(1 - \delta_{\sigma(i), \sigma(j)})$$

Στη παραπάνω εξίσωση, τα  $i$  και  $j$  είναι δύο γειτονικές θέσεις πλέγματος, το  $\sigma$  δηλώνει την ταυτότητα του κάθε χυτάρου και το  $\tau$  το είδος του χυτάρου.

Στη συνέχεια προσθέσαμε, ακόμα μία εντολή για τις χυταρικές ιδιότητες (και ουσιαστικά ακόμα έναν ενεργειακό όρο στην Χαμιλτονιανή της ενέργειας). Ο όρος που προσθέσαμε είναι το μπλοκ εντολών Volume. Το μπλοκ αυτό εξασφαλίζει ότι ο όγκος των χυτάρων είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερος στον Target Volume (τιμή που δίνεται από το χρήστη). Ο ενεργειακός όρος του Volume έχει τη μορφή:

$$E_{volume} = \lambda_{volume}(V_{cell} - V_{target})^2$$

Τα  $\lambda_{volume}$  και  $V_{target}$  καθορίζονται από τον χρήστη και  $V_{cell}$  είναι ο όγκος του εκάστοτε χυτάρου.

Για την επίλυση των φαινομένων διάχυσης, χρησιμοποιήθηκε το μπλοκ εντολών FlexibleDiffusionSolverFE. Το συγκεριμένο μπλοκ αποτελεί μία από τις βασικότερες και πιο σημαντικές ενότητες στα μοντέλα του CC3D. Όπως προαναφέρθηκε το μπλοκ αυτό ρυθμίζει τα φαίνομενα διάχυσης του μοντέλου, καθώς και την έκκριση ουσιών, επειδή στο CC3D ο όρος της έκκρισης ουσιών θεωρείται μέρος της γενικής εξίσωσης διάχυσης.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c + kc + secretion$$

όπου  $k$  είναι η σταθερά αποσύνθεσης της ουσίας με συκέντρωση  $c$ ,  $D$  η σταθερά διάχυσης και ο όρος "secretion" αναφέρεται στο ρυθμό με τον οποίο παράγεται η ουσία από τα αντίστοιχα κύτταρα. Στο συγκεκριμένο μπλοκ ο χρήστης καθορίζει όλες τις μεταβλητές της εξίσωσης. Επιπρόσθετα, ο χρήστης προσθέτει τις παραμέτρους (DeltaT, DeltaX), οι οποίες δείχνουν τη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ του χρόνου και της μονάδας μήκους του προγράμματος με τις αντίστοιχες τιμές των πραγματικών παραμέτρων.

Επιπρόσθετα, έχει χρησιμοποιηθεί η εντολή CenterOfMass η οποία υποχρεώνει το πρόγραμμα, όταν αναφέρεται σε κάθε κύτταρο, να αναφέρεται στο κέντρο του χυτάρου και όχι σε ένα τυχαίο σημείο του. Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιεί τις εξισώσεις:

$$x_{CM} = \sum_i x_i, y_{CM} = \sum_i y_i, z_{CM} = \sum_i z_i$$

---

όπου  $i$  είναι τα pixel του κάθε κύτταρο και  $x, y, z$  οι διαστάσεις του χώρου. Το κέντρο του κυττάρου για κάθε μία από τις διαστάσεις υπολογίζεται ως εξής:

$$X_{CM} = \frac{x_{CM}}{V}, Y_{CM} = \frac{y_{CM}}{V}, Z_{CM} = \frac{z_{CM}}{V}$$

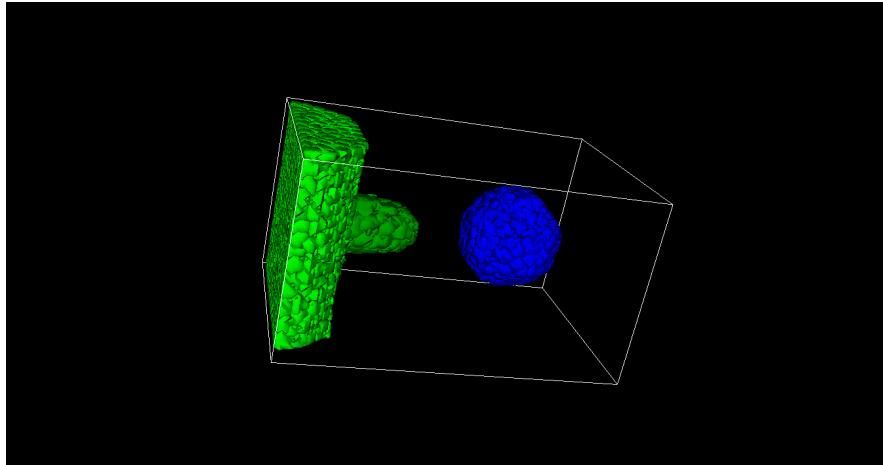
Για να προσθέσουμε τη χημειόταξη στο πρόγραμμά μας προσθέσαμε στον XML κώδικα την εντολή Chemotaxis. Στη συγκεκριμένη εντολή καθορίσαμε το πόσο ισχυρά έλκονται τα κυρκινικά κύτταρα από τη CCL21. Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποεί την παρακάτω εξίσωση για την χημειόταξη:

$$\Delta E_{chem} = \lambda(c(\vec{x}_{neighbor}) - c(\vec{x}))$$

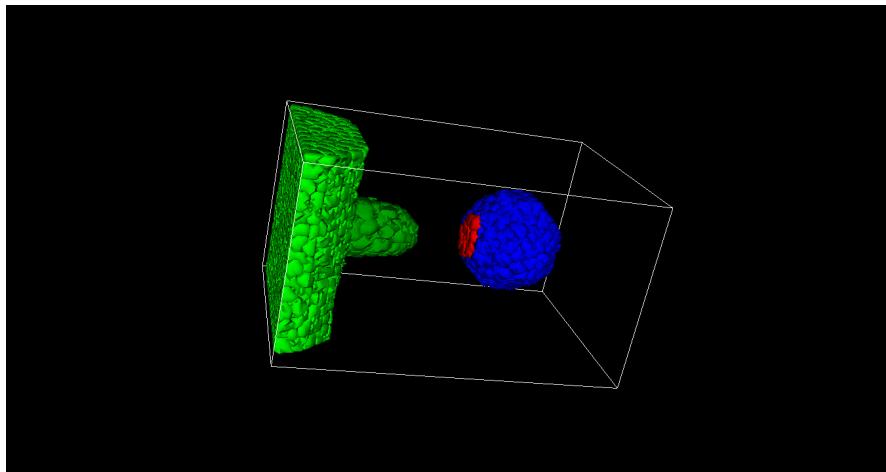
όπου  $c(\vec{x}_{neighbor})$  και  $c(\vec{x})$  τη συγκέντρωση στην πηγή και σε ένα pixel αντίστοιχα [31]. Ο κώδικας του μοντέλου παρατείνεται στο παρότατμα B'.

### 3.4 Αποτελέσματα

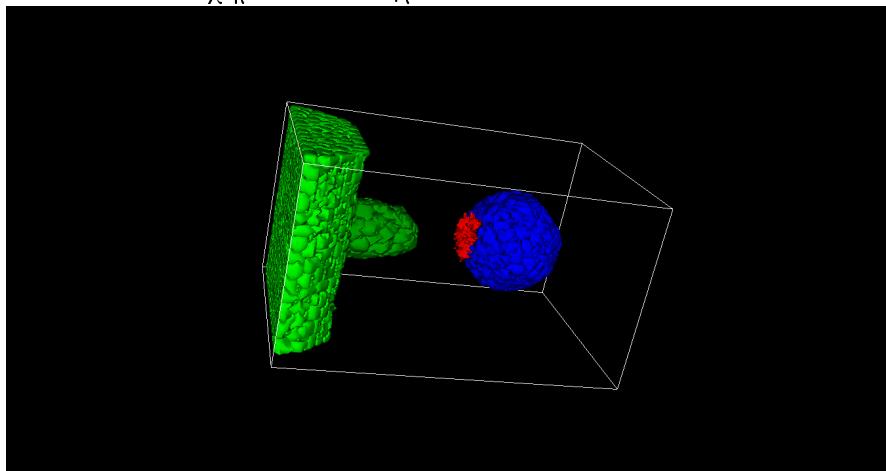
Τα αποτελέσματα του μοντέλου φαίνονται στα παρακάτω σχήματα:



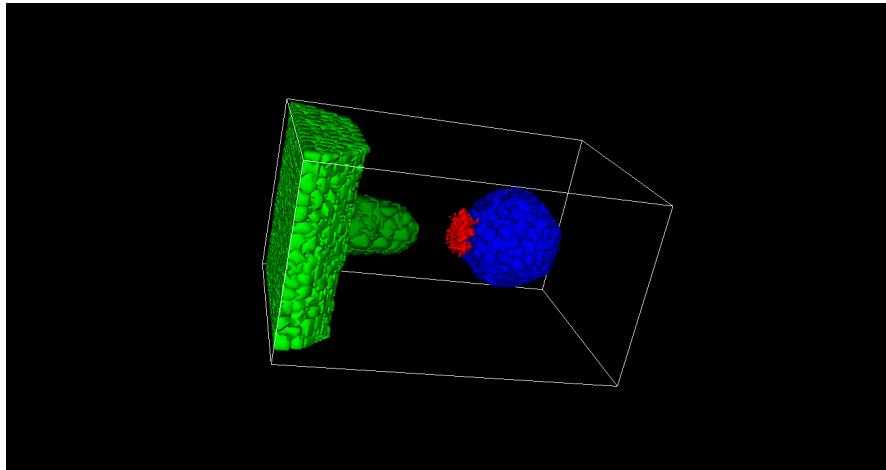
Σχήμα 3.3: Στιγμιότυπο στα 300 MCS.



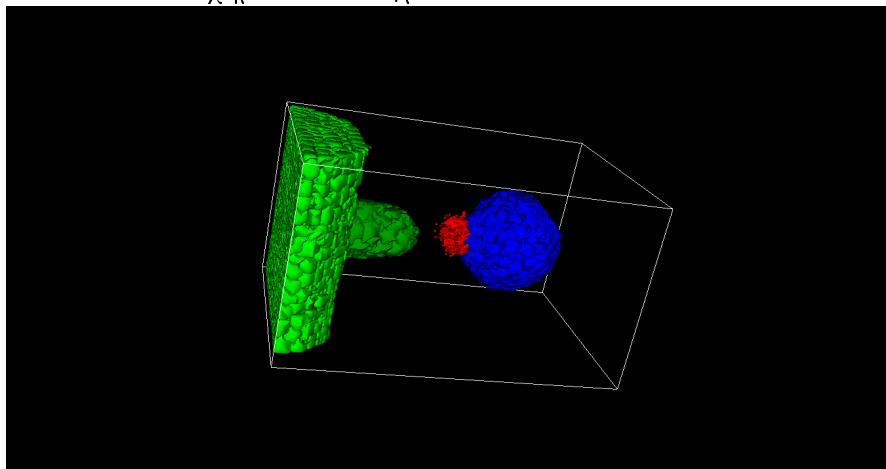
Σχήμα 3.4: Στιγμιότυπο στα 450 MCS.



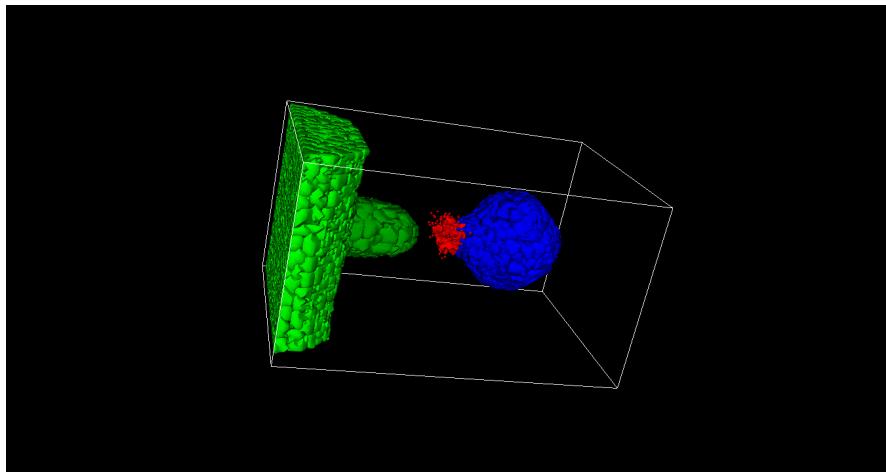
Σχήμα 3.5: Στιγμιότυπο στα 455 MCS.



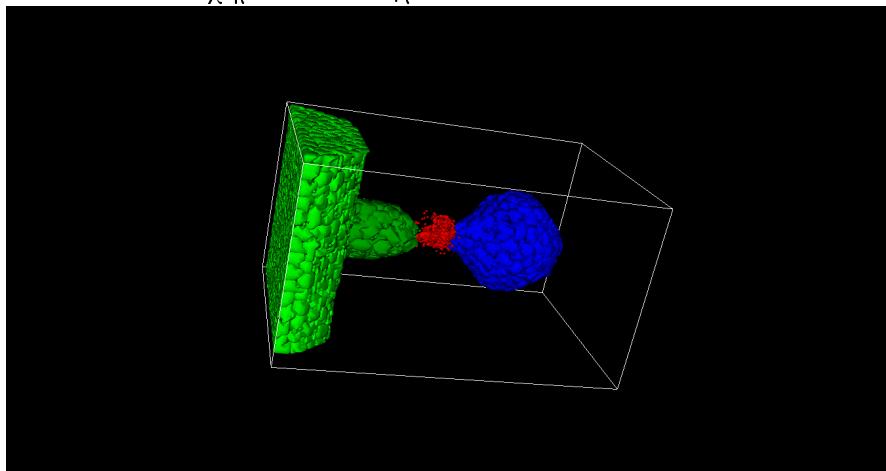
Σχήμα 3.6: Στιγμιότυπο στα 464 MCS.



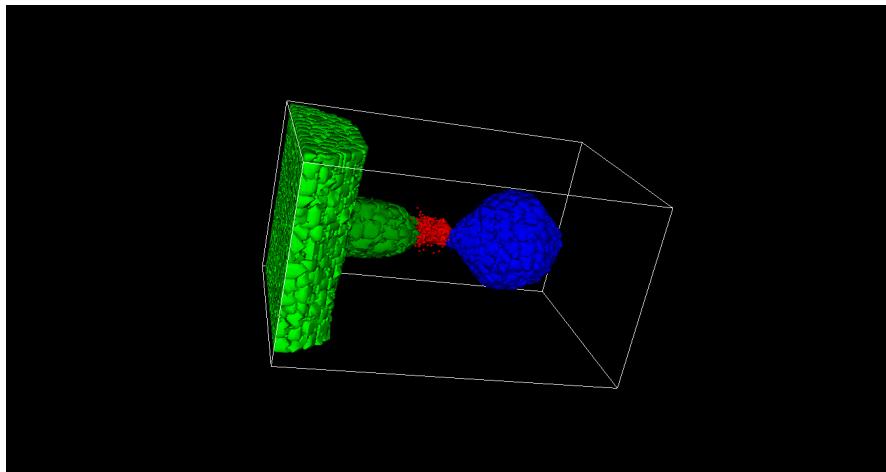
Σχήμα 3.7: Στιγμιότυπο στα 473 MCS.



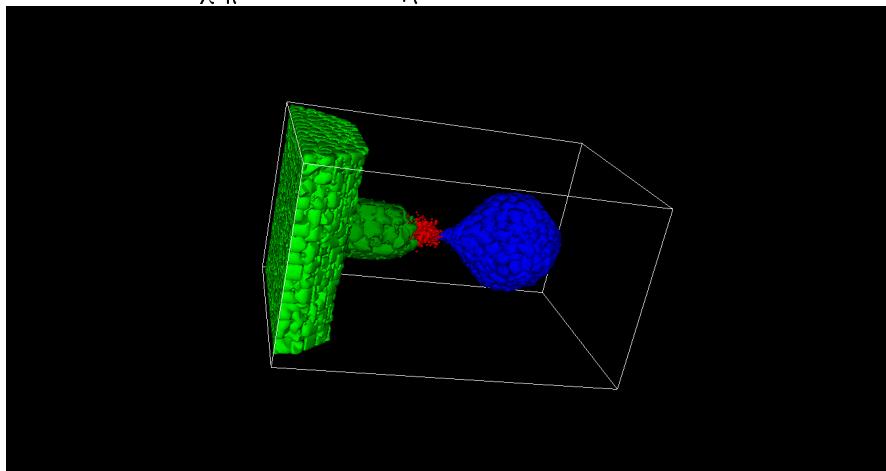
Σχήμα 3.8: Στιγμιότυπο στα 485 MCS.



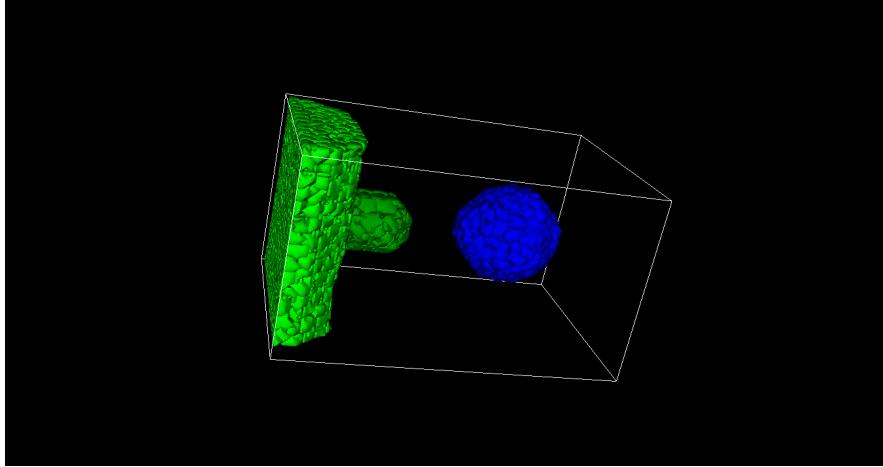
Σχήμα 3.9: Στιγμιότυπο στα 499 MCS.



Σχήμα 3.10: Στιγμιότυπο στα 510 MCS.



Σχήμα 3.11: Στιγμιότυπο στα 521 MCS.



Σχήμα 3.12: Στιγμιότυπο στα 606 MCS.

Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματά μας είναι αρκετά κόντα στα βιβλιογραφικά δεδομένα της διαδικασίας, όπως αυτή έχει περιγραφεί στο θεωρητικό τμήμα της εργασίας. Ο χρόνος που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί η όλη διαδικασία (από τότε που ξεκινάει το πρώτο καρκινικό κύτταρο να φεύγει από τον όγκο, μέχρι να εισέλθει το τελευταίο καρκινικό κύτταρο στα λεμφαγγεία) είναι 1 ώρα και 55 λεπτά (115 MCS). Επίσης, τα πρώτα καρκινικά κύτταρα ξεκίνησαν να μεταναστεύουν στις 7.5 ώρες (450 MCS).

### 3.5 Παραδοχές του μοντέλου

Για την επίλυση του προβλήματος μας, έπρεπε να κάνουμε κάποιες παραδοχές. Οι πρώτες παραδοχές που έπρεπε να γίνουν αφορούσαν την αντιστοίχιση του πραγματικού χρόνου και μήκους με τα αντίστοιχα του προγράμματος. Θεωρήσαμε ότι 1 λεπτό (min) πραγματικού χρόνου ισοδυναμεί με 1 βήμα επίλυσης (MCS) · αυτή είναι μια τυπική παραδοχή για το χρόνο που έχει πραγματοποιηθεί και σε προηγούμενες μοντελοποιήσεις στο CC3D. Επιπρόσθετα, θεωρήσαμε ότι 1 μονάδα μήκους στο πρόγραμμα (voxel (lenth)) ισοδυναμεί με 10  $\mu\text{m}$  πραγματικού μήκους.

Στο πρόγραμμα οι σημαντικές σταθερές που εισάγονται είναι η σταθερά διάχυσης (diffusion constant) της CCL21, ο ρυθμός παραγωγής της CCL21 από το νεοσύστατο λεμφαγγείο, καθώς και πόσο δυνατά έλκονται τα καρκινικά κύτταρα από τη CCL21. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ([32], [15], πίνακας A'.1) η σταθερά διάχυσης της CCL21 είναι περίπου  $140 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Η τιμή αυτή με βάση τις παραδοχές που έχουμε κάνει για το μήκος και το χρόνο του προ-

---

γράμματος μετατρέπεται σε  $83 \frac{voxel(length)^2}{MCS}$  ( $140 \frac{\mu m^2}{s} = 140 \cdot \frac{(0.1 voxel(length))^2}{0.0167 MCS} = 83 \frac{voxel(length)^2}{MCS}$ ). Όμως, το πρόγραμμα από μόνο του θέτει περιορισμό για τη σταθερά διάχυσης, η οποία δεν μπορεί να ξεπεράσει την τιμή  $0,16 \frac{voxel(length)^2}{MCS}$ . Για να επιλύσουμε αυτό το πρόβλημα προσθέσαμε έναν όρο έτσι ώστε το μπλοκ που αφορά τη διάχυση να επαναλαμβάνεται 523 φορές σε κάθε βήμα επίλυσης ( $523 = \frac{83}{0.16}$ ).

Για την έκκριση της CCL21 και τη χημειόταξη της δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα. Για το λόγο αυτό οι τιμές των παραμέτρων αυτών προστέθηκαν με βάση τις αντίστοιχες τιμές σε άλλες μοντελοποιήσεις στο CC3D. Να σημειωθεί ότι στο πρόγραμμα υπάρχει όρος σύμφωνα με τον οποίο η μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων θα ξεκινήσει από κάποια συγκέντρωση της CCL21 και μετά. Αυτός ο όρος εισάχθηκε γιατί στην πραγματικότητα η όλη διαδικασία απαιτεί μια ελάχιστη συγκέντρωση της CCL21 για να ξεκινήσει. Όμως, η τιμή της συγκέντρωσης αυτής έχει επιλεγεί αυθαίρετα, καθώς δεν υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα για αυτή.

Να τονιστεί ότι στο πρόγραμμα δεν έχουν εισαχθεί οι δύο υποδοχείς της CCL21 (CCR7 και HS). Παρ' όλα αυτά η δράση τους εκδηλώνεται μέσα από τα μπλοκ εντολών του προγράμματος και των τιμών ορισμένων παραμέτρων. Επιπρόσθετα, για να μειωθεί η υπολογιστική δύναμη που απαιτείται για να επιλύσει το πρόγραμμα όλες οι τιμές που εισέρχονται σε αυτό έχουν διαιρεθεί με το πέντε. Επομένως, όλα τα αποτελέσματα είναι σε κλίμακα 1:5.

### 3.6 Επιπρόσθετες μοντελοποιήσεις

Λόγο των προαναφερθέντων παραδοχών πραγματοποιήθηκαν κάποιες επιπλέον προσομοιώσεις έτσι ώστε να μελετηθεί κατά πόσον οι παραδοχές μας επηρεάζουν το αποτέλεσμα του μοντέλου μας. Να σημειωθεί ότι κάθε φορά αλλάζαμε μία παράμετρο και οι υπόλοιπες παρέμεναν ίδιες με το βασικό μοντέλο.

Δοκιμάσαμε μία μοντελοποίηση στην οποία έχει αυξηθεί ο ρυθμός παραγωγής της CCL21 από τα λεμφαγγεία κατά 33.3%. Παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της όλης διαδικασίας παρέμεινε ο ίδιος (1 ώρα και 55 λεπτά), αλλά μειώθηκε ο χρόνος έναρξης της διαδικασίας κατά 2.5 ώρες (150 MCS, περίπου 33.3%). Αυτό ήταν ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς όσο αυξάνεται ο ρυθμός παραγωγής της CCL21, τόσο πιο γρήγορα θα φτάσει η συγκέντρωση της στο απαιτούμενο για τη διαδικασία επίπεδο. Το γεγονός ότι η ώρα που απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας παραμένει ίδια, είναι απολύτως φυσιολογικό καθώς, ο χρόνος αυτός επηρεάζεται κυρίως από τη χημειόταξη της ουσίας ως προς τα καρκινικά κύτταρα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε μία άλλη μοντελοποίηση στην οποία έχει μειωθεί η χημειόταξη της CCL21 ως προς τα καρκινικά κύτταρα κατά 20%.

---

Παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της όλης διαδικασίας αυξήθηκε κατά 11 λεπτά (10% περίπου), αλλά ο χρόνος έναρξης της διαδικασίας παρέμεινε σταθερός. Τα αποτελέσματα είναι πλήρως κατανοητά καθώς όσο μειώνεται η χημειόταξη, τόσο λιγότερο δυνατά έλκονται τα καρκινικά κύτταρα από τη CCL21 και άρα απαιτείται περισσότερος χρόνος για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Επιπρόσθετα, ο χρόνος έναρξης της διαδικασίας επηρεάζεται από το ρυθμό έκχρισης της CCL21 και όχι από τη χημειόταξή της, για αυτό δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλάγη σε αυτόν.

Τέλος, πραγματοποιήσαμε μια εκτέλεση του προγράμματος έχοντας μειώσει την απαιτούμενη συγκέντρωση για την έναρξη της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων κατά 20%. Παρατηρήθηκε, ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της όλης διαδικασίας παρέμεινε ο ίδιος (1 ώρα και 55 λεπτά) αλλά μειώθηκε ο χρόνος έναρξης της διαδικασίας κατά 2.5 ώρες (περίπου 33.3%). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, γιατί αφού μειώθηκε η απαιτούμενη συγκέντρωση, η μετανάστευση θα αρχίσει πιο πριν με δεδομένο ότι η συγκέντρωση της CCL21 ζεπερνά το απαραίτητο όριο πιο γρήγορα.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και με το γεγονός ότι έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές παραδοχές, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο πραγματικός χρόνος πιθανώς να απέχει από το χρόνο που χρειάστηκε στο μοντέλο μας για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία. Δυστυχώς, δεν υπάρχει κανένα πειραματικό δεδομένο πάνω στις χημειοκίνες και έτσι δεν μπορούμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας με το πραγματικό χρόνο της διαδικασίας.

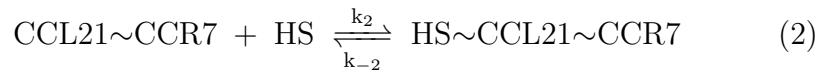
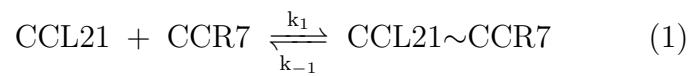
## Κεφάλαιο 4

### Διαφορική επίλυση

#### 4.1 Δημιουργία διαφορικών συστημάτων

- Σύστημα της CCL21

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο σύστημα αυτό είναι οι εξής:



Στη συνέχεια της ανάλυσης ως χρησιμοποιηθούν κάποιες συντομογραφίες για την καλύτερη κατανόηση των υπολογισμών:

- \* L=CCL21
- \* R=CCR7
- \* LR=CCL21~CCR7
- \* HSLR=HS~CCL21~CCR7
- \*  $\mu$ =σταθερά αποσύνθεσης της CCL21
- \* b=σταθερά παραγωγής της CCL21

Στο χρόνο μηδέν έχουμε το σημείο:  $(L_0, R_0, LR_0, HS_0, HSLR_0)$ , όπου προφανώς:

---

✓  $LR_0 = 0$

✓  $HSLR_0 = 0$

Με βάση την αρχή διατήρησης της μάζας το σύστημα των αντιδράσεων μετατρέπεται σε:

$$\frac{dL}{dt} = -k_1 \cdot L \cdot R + k_{-1} \cdot LR \quad (4.1)$$

$$\frac{dR}{dt} = -k_1 \cdot L \cdot R + k_{-1} \cdot LR \quad (4.2)$$

$$\frac{dLR}{dt} = k_1 \cdot L \cdot R - k_{-1} \cdot LR - k_2 \cdot LR \cdot HS + k_{-2} \cdot HSLR \quad (4.3)$$

$$\frac{dHS}{dt} = -k_2 \cdot HS \cdot LR + k_{-2} \cdot HSLR \quad (4.4)$$

$$\frac{dHSLR}{dt} = k_2 \cdot HS \cdot LR - k_{-2} \cdot HSLR \quad (4.5)$$

όπου με συνδυασμό τους έχουμε:

$$(4.1) - (4.2) = 0 \mapsto \frac{dL}{dt} - \frac{dR}{dt} = 0 \mapsto R = L - L_0 + R_0 \quad (4.6)$$

$$(4.4) + (4.5) = 0 \mapsto \frac{dHS}{dt} + \frac{dHSLR}{dt} = 0 \mapsto HS = -HSLR + HS_0 \quad (4.7)$$

$$(4.3) + (4.1) + (4.5) = 0 \mapsto \frac{dLR}{dt} + \frac{dL}{dt} + \frac{dHSLR}{dt} = 0 \\ \mapsto LR = -L - HSLR + L_0 \quad (4.8)$$

Οι σημαντικές ουσίες του συστήματος είναι η CCL21 και το σύμπλοκο HS–CCL21–CCR7. Στη συνέχεια ακολουθεί η αποδιαστασιολόγιση του συστήματος, με τη βοήθεια της συγκέντρωσης αναφοράς της CCL21  $L'$ . Έτσι, έχουμε:

→

$$\begin{aligned}
 (4.1), (4.6), (4.8) \longmapsto \frac{dL}{dt} &= -k_1 \cdot L \cdot (L - L_0 + R_0) + k_{-1} \cdot (-L - HSLR + L_0) = \\
 &= -k_1 \cdot L^2 + k_1 \cdot L_0 \cdot L - k_1 \cdot R_0 \cdot L - k_{-1} \cdot L - k_{-1} \cdot HSLR + k_{-1} \cdot L_0 - \\
 &\quad \underset{\text{oρος αποσυνθεσης}}{-\widehat{\mu \cdot L}} \quad \underset{\text{oρος παραγωγης}}{+\widehat{b \cdot L}} = \\
 &= -k_1 \cdot L^2 - (-k_1 \cdot L_0 + k_1 \cdot R_0 + k_{-1} + \mu - b) \cdot L - k_{-1} \cdot HSLR + k_{-1} \cdot L_0
 \end{aligned} \tag{4.9}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{\frac{dL}{L'}}{dt \cdot k_{-1}} &= -\frac{k_1}{k_{-1}} \cdot \frac{L}{L'} \cdot \frac{L \cdot L'}{L'} - \frac{(-k_1 \cdot L_0 + k_1 \cdot R_0 + k_{-1} + \mu - b)}{k_{-1}} \cdot \frac{L}{L'} - \\
 &\quad - \frac{k_{-1}}{k_{-1}} \cdot \frac{HSLR}{L'} + \frac{k_{-1}}{k_{-1}} \cdot \frac{L_0}{L'}
 \end{aligned} \tag{4.10}$$

Στην εξίσωση 4.9 προσθέσαμε δύο επιπλέον όρους. Έναν όρο για τη παραγώγη της CCL21 από τα λεμφαγγεία και έναν για το ρυθμό αποσύνδεσής της. Για τη μετάβαση από την εξίσωση 4.9 στην εξίσωση 4.10 διαιρέσαμε κάθε όρο της εξίσωσης με το γινόμενο  $L' \cdot k_{-1}$ , έτσι ώστε να δημιουργήσουμε αδιάστατους όρους.

→

$$\begin{aligned}
 (4.5), (4.7), (4.8) \longmapsto \frac{dHSLR}{dt} &= k_2 \cdot (-HSLR + HS_0) \cdot (-L - HSLR + L_0) - \\
 &- k_{-2} \cdot HSLR = k_2 \cdot L \cdot HSLR + k_2 \cdot HSLR^2 - k_2 \cdot L_0 \cdot HSLR - k_2 \cdot HS_0 \cdot L - \\
 &\quad - k_2 \cdot HS_0 \cdot HSLR + k_2 \cdot HS_0 \cdot L_0 - k_{-2} \cdot HSLR = \\
 &= k_2 \cdot HSLR^2 - k_2 \cdot HS_0 \cdot L - (k_2 \cdot L_0 + k_2 \cdot L_0 + k_{-2}) \cdot HSLR + k_2 \cdot L \cdot HSLR + \\
 &\quad + k_2 \cdot HS_0 \cdot L_0
 \end{aligned} \tag{4.11}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{\frac{dHSLR}{L'}}{dt \cdot k_{-2}} &= \frac{k_2}{k_{-2}} \cdot \frac{HSLR}{L'} \cdot \frac{HSLR \cdot L'}{L'} - \frac{k_2 \cdot HS_0}{k_{-2}} \cdot \frac{L}{L'} + \frac{k_2}{k_{-2}} \cdot \frac{L}{L'} \cdot \frac{HSLR \cdot L'}{L'} - \\
 &\quad - \frac{(k_2 \cdot L_0 + k_2 \cdot L_0 + k_{-2})}{k_{-2}} \cdot \frac{HSLR}{L'} + \frac{k_2 \cdot HS_0 \cdot L_0}{L' \cdot k_{-2}}
 \end{aligned} \tag{4.12}$$

---

Για τη μετάβαση από την εξίσωση 4.11 στην εξίσωση 4.12 διαιρέσαμε κάθε όρο της εξίσωσης με το γινόμενο  $L' \cdot k_{-2}$ , έτσι ώστε να δημιουργήσουμε αδιάστατους όρους.

Τελικώς:

❖

$$\boxed{\frac{dL^*}{dt^*} = a_{1,1} \cdot L^{*2} + a_{1,2} \cdot L^* + a_{1,3} \cdot HSLR^* + a_{1,4}}$$

$$\underline{a_{1,1} = -\frac{k_1 \cdot L'}{k_{-1}}, \quad a_{1,2} = -\frac{(-k_1 \cdot L_0 + k_1 \cdot R_0 + k_{-1} + \mu - b)}{k_{-1}}, \quad a_{1,3} = -1, \quad a_{1,4} = \frac{L_0}{L'}}$$

❖

$$\boxed{\frac{dHSLR^*}{dt^*} = a_{2,1} \cdot HSLR^{*2} + a_{2,2} \cdot L^* + a_{2,3} \cdot L^* \cdot HSLR^* + a_{2,4} \cdot HSLR^* + a_{2,5}}$$

$$\underline{a_{2,1} = -\frac{k_1 \cdot L'}{k_{-1}}, \quad a_{2,2} = -\frac{k_2 \cdot HS_0}{k_{-2}}, \quad a_{2,3} = \frac{k_2}{k_{-2}}, \quad a_{2,4} = -\frac{(k_2 \cdot L_0 + k_2 \cdot L_0 + k_{-2})}{k_{-2}}}$$

$$\underline{a_{2,5} = \frac{k_2 \cdot HS_0 \cdot L_0}{L' \cdot k_{-2}}}$$

όπου  $L^* = \frac{L}{L'}$ ,  $HSLR^* = \frac{HS_0}{L'}$ ,  $t^* = \frac{t}{k_{-1}}$  στην πρώτη εξίσωση και  $t^* = \frac{t}{k_{-2}}$  στη δεύτερη.

---

- Σύστημα των Ang-1 - Ang-2

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο σύστημα αυτό είναι οι εξής:

$$\text{Ang-1} + \text{Tie-2} \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} \text{Ang-1} \sim \text{Tie-2} \quad (3)$$

$$\text{Ang-2} + \text{Tie-2} \xrightleftharpoons[k_{-4}]{k_4} \text{Ang-2} \sim \text{Tie-2} \quad (4)$$

Στη συνέχεια της ανάλυσης ως χρησιμοποιηθούν κάποιες συντομογραφίες για την καλύτερη κατανόηση των υπολογισμών:

- \* A1=Ang-1
- \* A2=Ang-2
- \* T=Tie-1
- \* TA1=Ang-1~Tie-2
- \* TA2=Ang-2~Tie-2
- \*  $\mu_1$ =σταθερά αποσύνθεσης της Ang-1
- \*  $\mu_2$ =σταθερά αποσύνθεσης της Ang-2
- \*  $b_1$ =σταθερά παραγωγής της Ang-1
- \*  $b_2$ =σταθερά παραγωγής της Ang-2

Στο χρόνο μηδέν έχουμε το σημείο:  $(A1_0, A2_0, T_0, TA1_0, TA2_0)$ , όπου προφανώς:

✓  $TA1_0 = 0$

✓  $TA2_0 = 0$

Με βάση την αρχή διατήρησης της μάζας το σύστημα των αντιδράσεων μετατρέπεται σε:

$$\frac{dA1}{dt} = -k_3 \cdot A1 \cdot T + k_{-3} \cdot TA1 \quad (4.13)$$

---


$$\frac{dA2}{dt} = -k_4 \cdot A1 \cdot T + k_{-4} \cdot TA2 \quad (4.14)$$

$$\frac{dT}{dt} = -k_3 \cdot A1 \cdot T + k_{-3} \cdot TA1 - k_4 \cdot A1 \cdot T + k_{-4} \cdot TA2 \quad (4.15)$$

$$\frac{dT A1}{dt} = k_3 \cdot A1 \cdot T - k_{-3} \cdot TA1 \quad (4.16)$$

$$\frac{dT A2}{dt} = k_4 \cdot A1 \cdot T - k_{-4} \cdot TA2 \quad (4.17)$$

όπου με συνδυασμό τους έχουμε:

$$(4.13) + (4.16) = 0 \mapsto \frac{dA1}{dt} + \frac{dT A1}{dt} = 0 \mapsto TA1 = -A1 + A1_0 \quad (4.18)$$

$$(4.14) + (4.17) = 0 \mapsto \frac{dA2}{dt} + \frac{dT A2}{dt} = 0 \mapsto TA2 = -A2 + A2_0 \quad (4.19)$$

$$(4.15) + (4.16) + (4.17) = 0 \mapsto \frac{dT}{dt} + \frac{dT A1}{dt} + \frac{dT A2}{dt} = 0 \\ \mapsto T = -TA1 - TA2 + T_0 \xrightarrow{(4.18),(4.19)} T = A1 + A2 - A1_0 - A2_0 + T_0 \quad (4.20)$$

Οι σημαντικές ουσίες του συστήματος είναι οι Ang-1 και Ang-2. Στη συνέχεια ακολουθεί η αποδιαστασιολόγιση του συστήματος, με τη βοήθεια των συγκέντρωσης αναφοράς της Ang-1  $A1'$  και της Ang-2  $A2'$ . Έτσι, έχουμε:

→

$$(4.13), (4.18), (4.20) \mapsto \frac{dA1}{dt} = -k_3 \cdot A1 \cdot (A1 + A2 - A1_0 - A2_0 + T_0) + \\ + k_{-3} \cdot (-A1 + A1_0) = \\ -k_3 \cdot A1^2 - k_3 \cdot A1 \cdot A2 + k_3 \cdot A1_0 + k_3 \cdot A2_0 - k_3 \cdot T_0 - k_{-3} \cdot A1 + k_{-3} \cdot A1_0 - \\ - \underbrace{k_3 \cdot A1}_{\text{oρος αποσυνθεσης}} + \underbrace{k_{-3} \cdot A1}_{\text{oρος παραγωγης}} = \\ = -k_3 \cdot A1^2 - k_3 \cdot A1 \cdot A2 - (k_{-3} + \mu_1 - b_1) \cdot A1 + (k_3 \cdot A1_0 + k_3 \cdot A2_0 - k_3 \cdot T_0 + k_{-3} \cdot A1_0) \quad (4.21)$$

---


$$\begin{aligned} \frac{\frac{dA_1}{A'1}}{dt \cdot k_{-3}} &= -\frac{k_3}{k_{-3}} \cdot \frac{A_1}{A'1} \cdot \frac{A'1 \cdot A_1}{A'1} - \frac{k_3}{k_{-3}} \cdot \frac{A_1}{A'1} \cdot \frac{A'2 \cdot A_2}{A'2} - \\ &- \frac{(k_{-3} + \mu_1 - b_1)}{k_{-3}} \cdot \frac{A_1}{A'1} + \frac{(k_3 \cdot A_{10} + k_3 \cdot A_{20} - k_3 \cdot T_0 + k_{-3} \cdot A_{10})}{A'1 \cdot k_{-3}} \end{aligned} \quad (4.22)$$

→

$$\begin{aligned} (4.14), (4.19), (4.20) \mapsto \frac{dA_2}{dt} &= -k_4 \cdot A_2 \cdot (A_1 + A_2 - A_{10} - A_{20} + T_0) + \\ &+ k_{-4} \cdot (-A_1 + A_{10}) = \\ -k_4 \cdot A_2^2 - k_4 \cdot A_1 \cdot A_2 + k_4 \cdot A_{10} + k_4 \cdot A_{20} - k_4 \cdot T_0 - k_{-4} \cdot A_2 + k_{-4} \cdot A_{20} - \\ &\quad \underbrace{- \frac{\mu_2 \cdot A_2}{A'2 \cdot k_{-4}}}_{\text{ορος αποσυνθεσης}} + \underbrace{\frac{b_2 \cdot A_2}{A'2 \cdot k_{-4}}}_{\text{ορος παραγωγη}} = \\ &= -k_4 \cdot A_2^2 - k_4 \cdot A_1 \cdot A_2 - (k_{-4} + \mu_2 - b_2) \cdot A_2 + (k_4 \cdot A_{10} + k_4 \cdot A_{20} - k_4 \cdot T_0 + k_{-4} \cdot A_{20}) \end{aligned} \quad (4.23)$$

$$\begin{aligned} \frac{\frac{dA_2}{A'2}}{dt \cdot k_{-4}} &= -\frac{k_4}{k_{-4}} \cdot \frac{A_2}{A'2} \cdot \frac{A'2 \cdot A_2}{A'2} - \frac{k_4}{k_{-4}} \cdot \frac{A'1 \cdot A_1}{A'1} \cdot \frac{A_2}{A'2} - \frac{1}{A'2} \cdot A_2 \\ &- \frac{\mu_2}{A'2 \cdot k_{-4}} \cdot A_2 + \frac{b_2}{A'2 \cdot k_{-4}} \cdot A_2 - \\ &- \frac{(k_{-4} + \mu_2 - b_2)}{k_{-4}} \cdot \frac{A_2}{A'2} + \frac{(k_4 \cdot A_{10} + k_4 \cdot A_{20} - k_4 \cdot T_0 + k_{-4} \cdot A_{20})}{A'2 \cdot k_{-4}} \end{aligned} \quad (4.24)$$

Στην εξίσωση 4.21 και στην εξίσωση 4.23 προσθέσαμε δύο επιπλέον όρους, στην κάθε μία. Έναν όρο για τη παραγώγη της Ang-1 και της Ang-2 αντίστοιχα και έναν για το ρυθμό αποσύνδεσής των ουσιών αυτών.

Για τη μετάβαση από την εξίσωση 4.21 στην εξίσωση 4.22 διαιρέσαμε κάθε όρο της εξίσωσης με το γινόμενο  $A'1 \cdot k_{-3}$ , έτσι ώστε να δημιουργήσουμε αδιάστατους όρους. Και αντίστοιχα, για τη μετάβαση από την εξίσωση 4.23 στην εξίσωση 4.24 διαιρέσαμε κάθε όρο της εξίσωσης με το γινόμενο  $A'2 \cdot k_{-4}$ , έτσι ώστε να δημιουργήσουμε αδιάστατους όρους.

Τελικώς:

❖

$$\boxed{\frac{dA^*1}{dt^*} = a_{3,1} \cdot A^*1^2 + a_{3,2} \cdot A^*1 \cdot A^*2 + a_{3,3} \cdot A^*1 + a_{3,4}}$$

$$\frac{a_{3,1} = -\frac{A'1 \cdot k_3}{k_{-3}}, \quad a_{3,2} = -\frac{A'2 \cdot k_3}{k_{-3}}, \quad a_{3,3} = -\frac{(k_{-3} + \mu_1 - b_1)}{k_{-3}}}{a_{3,4} = \frac{(k_3 \cdot A1_0 + k_3 \cdot A2_0 - k_3 \cdot T_0 + k_{-3} \cdot A1_0)}{A'1 \cdot k_{-3}}}$$

❖

$$\boxed{\frac{dA^*2}{dt^*} = a_{4,1} \cdot A^*2^2 + a_{4,2} \cdot A^*1 \cdot A^*2 + a_{4,3} \cdot A^*2 + a_{4,4}}$$

$$\frac{a_{4,1} = -\frac{A'2 \cdot k_4}{k_{-4}}, \quad a_{4,2} = -\frac{A'1 \cdot k_4}{k_{-4}}, \quad a_{4,3} = -\frac{(k_{-4} + \mu_2 - b_2)}{k_{-4}}}{a_{4,4} = \frac{(k_4 \cdot A1_0 + k_4 \cdot A2_0 - k_4 \cdot T_0 + k_{-4} \cdot A2_0)}{A'2 \cdot k_{-4}}}$$

όπου  $A1^* = \frac{A1}{A'1}$ ,  $A2^* = \frac{A2}{A'2}$ ,  $T^* = \frac{T}{T'}$ ,  $t^* = \frac{t}{k_{-3}}$  στην πρώτη εξίσωση και  $t^* = \frac{t}{k_{-4}}$  στη δεύτερη.

## 4.2 Συζήτηση των διαφορικών εξισώσεων

Απώτερος στόχος των παραπάνω διαφορικών εξισώσεων είναι η χρήση τους στο πρόγραμμα CC3D, έτσι ώστε να δημιουργηθεί ένα πολυκλιμακούμενο(multi-scale) - μοριακό-κυτταρικό μοντέλο. Μέχρι στιγμής, αρκετές από τις σταθερές δεν είναι ακόμα διαθέσιμες, ύστερα από ενδελεχή βιβλιογραφική αναζήτηση. Κάποιες από τις σταθερές που δεν είναι γνωστές είναι οι αρχικές συγκεντρώσεις των CCL21 ( $L_0$ ), CCR7 ( $R_0$ ), HS ( $HS_0$ ), Ang-1 ( $A1_0$ ), Ang-2 ( $A2_0$ ) και Tie-2 ( $T_0$ ), όπως και ο ρυθμός παραγωγής ( $b$ ) και αποσύνθεσης ( $\mu$ ) της CCL21. Η μελοντική έρευνα μας περιλαμβάνει την ανάλυση των παραπάνω δυναμικών συστημάτων και τη χρήση τους για τη δημιουργία του πολυκλιμακούμενου μοντέλου · έρευνα η οποία ξεπερνά τα όρια μιας πτυχιακής εργασίας.

# Κεφάλαιο 5

## Συμπεράσματα

### 5.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η λεμφαγγειογένεση και συγκεκριμένα η δράση της CCL21 και των Ang-1, Ang-2. Αρχικά, υπήρξε μια παρουσίαση του βιολογικού υποβάθρου και της δράσης των ουσιών αυτών.

Στη συνέχεια, μοντελοποιήθηκε με βάση της μέθοδο Cellular Potts Model, μέσω του προγράμματος CompuCell 3D, το σύστημα της CCL21. Κύριος στόχος του μοντέλου στην παρούσα εργασία είναι να εξηγήσουμε πως απλά στοχαστικά μοντέλα, όπως παρουσιάστηκαν στην εργασία αυτή, περιγράφουν τη συμπεριφορά των χημειοκινών και μπορούν να δημιουργήσουν ένα πλήθος φαινομένων που σχετίζονται με τη λεμφαγγειογένεση. Για παράδειγμα, δείξαμε στο κεφάλαιο 3.6, πως ένας απλός εκχριτικός παράγοντας (όπως αυτός της CCL21) μπορεί να επηρεάσει τη λεμφαγγειογένεση. Τέλος, υπήρξε μια βασική ανάλυση σε όρους διαφορικών εξισώσεων και των δύο συστημάτων.

Τα αποτελέσματα του μοντέλου ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα θεωρητικά βιολογικά δεδομένα. Παρατηρήθηκε, ότι η CCL21 ξεκινά να δρα στις 7.5 περίπου ώρες, και η δράση της διαρκεί 2 ώρες περίπου (σε πραγματικό χρόνο). Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε ότι κάποιες από τις παραδοχές του μοντέλου μπορεί να επηρεάζουν το χρονικό αποτέλεσμα του. Όμως, για τη διόρθωσή τους χρειάζονται επιπλέον βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστά στην επιστημονική κοινότητα.

### 5.2 Μελλοντικές Ενέργειες

Είναι δεδομένο ότι η συγκεκριμένη εργασία έχει αρκετές μελλοντικές προοπτικές. Αρχικά, το μοντέλο των χημειοκινών θα μπορούσε να εμπλουτιστεί με δεδομένα, που πιθανώς να προκύψουν στο μέλλον από βιολογικά πειράματα

---

για το σύστημα αυτό, καθώς τα τωρινά δεδομένα είναι περιορισμένα. Επιπλέον, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί μια προσομοίωση η οποία θα αφορά το σύστημα των αγγειοποιητινών. Το θεωρητικό υπόβαθρο, καθώς και οι σημαντικές παράμετροι του συστήματος (παράρτημα A', πίνακας A'.2) είναι ήδη γνωστές, επομένως υπάρχουν αρκετές πιθανότητες να πραγματοποιηθεί το μοντέλο αυτό. Επιπρόσθετα, το παρόν μοντέλο (για τις χημειοκίνες) θα μπορούσε να συνδυαστεί με αυτό των αγγειοποιητινών (όταν πραγματοποιηθεί), για να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη μοντελοποίηση της διαδικασίας της λεμφαγγειογένεσης.

Ακόμα, μια μελλοντική ενέργεια που θα πραγματοποιηθεί είναι η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων των δύο συστημάτων (με την προϋπόθεση ότι οι απαιτούμενες σταθερές θα υπολογιστούν στο μέλλον). Στη συνέχεια, οι διαφορικές εξισώσεις αυτές μπορούν να προστεθούν στα αντίστοιχα προγράμματα στο CompuCell 3D και να δημιουργηθούν πολυκλιμακούμενα μοντέλα. Τέλος, τα μοντέλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εφαρμογή φαρμάκων, για την αντιμετώπιση και την αναστολή της λεμφαγγειογένεσης, με απώτερο σκοπό τη αναστολή της καρκινικής μετάστασης.

# Παράρτημα A'

## Σταθερές Ουσιών

| Παράμετρος                               | Τιμή   | Αναφορά      |
|--|--|--------------|
| Ρυθμός σύνδεσης του CCL-21 με το CCR-7   | $150 \pm 30 mM$  | [38]         |
| Σταθερά σύνδεσης του CCL-21 με την HS    | $9.3 \cdot 10^4 (M \cdot s)^{-1}$                              | [15]         |
| Σταθερά αποσύνδεσης του CCL-21 με την HS | $1.2 \cdot 10^{-4} s^{-1}$                                     | [15]         |
| Συντελεστής διάχυσης του Ang-2           | $130 - 160 \mu m^2 \cdot s^{-1}$<br>$140 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ | [32]<br>[15] |

Πίνακας A'.1: Σταθερές για τις χημειοκίνες.

---

| Παράμετρος   | Τιμή   | Αναφορά                          |
|--|--|----------------------------------|
| Συντελεστής διάχυσης της Ang-2                         | $3,6 \cdot 10^{-4} mm^2 \cdot h^{-1}$<br>$4,5 \cdot 10^{-3} mm^2 \cdot h^{-1}$ | [33]<br>[34]                     |
| Ρυθμός παραγωγής της Ang-1 από τα EC                   | $0,01 \cdot h^{-1}$  | [33]                             |
| Ρυθμός παραγωγής της Ang-2 από τα EC                   | $0,08 \cdot h^{-1}$<br>$15 \cdot 10^{-5} (M_{cells} \cdot h)^{-1} \cdot mm^2$  | [33]<br>[34]                     |
| Ρυθμός παραγωγής της Ang-2 από τα υποξυγονούχα κύτταρα | $0.05 \cdot h^{-1}$  | [33]                             |
| Ρυθμός παραγωγής της Ang-1 από τα καρκινικά κύτταρα    | $3 \cdot 10^{-4} (M_{cells} \cdot h)^{-1} \cdot mm^2$                          | [34]                             |
| Ρυθμός αποσύνθεσης της Ang-1                           | $0.003 \cdot h^{-1}$   | [33]                             |
| Ρυθμός αποσύνθεσης της Ang-2                           | $0.002 \cdot h^{-1}$   | [33]                             |
| Σταθερά σύνδεσης της Ang-1 με το Tie-2                 | $36 \cdot (\mu M \cdot h)^{-1}$  | [33]                             |
| Σταθερά αποσύνδεσης της Ang-1 με το Tie-2              | $0.1332 \cdot h^{-1}$  | [33]                             |
| Ρυθμός σύνδεσης της Ang-1 με το Tie-2                  | 3,7 nM<br>2,5 nM<br>3 nM   | [33], [35]<br>[36], [37]<br>[34] |
| Σταθερά σύνδεσης της Ang-2 με το Tie-2                 | $41,7 \cdot (\mu M \cdot h)^{-1}$  | [33]                             |
| Σταθερά αποσύνδεσης της Ang-2 με το Tie-2              | $0.108 \cdot h^{-1}$   | [33]                             |
| Ρυθμός σύνδεσης της Ang-1 με το Tie-2                  | 2,59nM<br>3nM  | [33]<br>[34]                     |

Πίνακας A'.2: Σταθερές για τις αγγειοποιητίνες.

# Παράρτημα B'

## Κώδικας του CC3D

```
<CompuCell3D>

    <!-- Basic properties of CPM (GGH) algorithm -->
    <Potts>
        <Dimensions x="60" y="50" z="85"/>
        <Steps>10000</Steps>
        <Temperature>20</Temperature>
        <NeighborOrder>3</NeighborOrder>
    </Potts>

    <!-- Listing all cell types in the simulation -->
    <Plugin Name="CellType">
        <CellType TypeId="0" TypeName="Medium"/>
        <CellType TypeId="1" TypeName="Lymph"/>
        <CellType TypeId="2" TypeName="Tumour"/>
        <CellType TypeId="3" TypeName="NewLymph"/>
        <CellType TypeId="4" TypeName="Tumour2"/>
    </Plugin>

    <Plugin Name="Contact">
        <Energy Type1="Medium"
               Type2="Medium">0</Energy>

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

---

```

Type2="Lymph">5</Energy>

<Energy Type1="Medium"
Type2="Tumour">12</Energy>
<Energy Type1="Lymph"
Type2="Tumour">15</Energy>
<Energy Type1="Tumour"
Type2="Tumour">5</Energy>

<Energy Type1="Medium"
Type2="Tumour2">12</Energy>
<Energy Type1="Lymph"
Type2="Tumour2">15</Energy>
<Energy Type1="Tumour"
Type2="Tumour2">10</Energy>
<Energy Type1="Tumour2"
Type2="Tumour2">5</Energy>

<Energy Type1="Medium"
Type2="NewLymph">12</Energy>
<Energy Type1="Lymph"
Type2="NewLymph">20</Energy>
<Energy Type1="Tumour"
Type2="NewLymph">10</Energy>
<Energy Type1="Tumour2"
Type2="NewLymph">5</Energy>
<Energy Type1="NewLymph"
Type2="NewLymph">5</Energy>
<NeighborOrder>4</NeighborOrder>
</Plugin>

<Plugin Name="Volume">
  <VolumeEnergyParameters CellType="Lymph"
    LambdaVolume="20" TargetVolume="40"/>
  <VolumeEnergyParameters CellType="Tumour"
    LambdaVolume="20" TargetVolume="40"/>
  <VolumeEnergyParameters CellType="NewLymph"
    LambdaVolume="30" TargetVolume="50"/>
  <VolumeEnergyParameters CellType="Tumour2"
    LambdaVolume="20" TargetVolume="40"/>
</Plugin>
```

---

```

<Plugin Name="CenterOfMass"/>

<!--Plugin Name="NeighborTracker"-->

<Plugin Name="PixelTracker"/>

<Steppable Type="FlexibleDiffusionSolverFE">
  <DiffusionField>
    <DiffusionData>
      <FieldName>CCL21</FieldName>
      <ConcentrationFileName>
        </ConcentrationFileName>
      <DiffusionConstant>0.16
      </DiffusionConstant>
      <DecayConstant>0.00016
      </DecayConstant>
      <DoNotDecayIn>Medium</DoNotDecayIn>
      <ExtraTimesPerMCS>100</ExtraTimesPerMCS>
      <DeltaX>2.0</DeltaX>
      <DeltaT>1.0</DeltaT>
    </DiffusionData>

    <SecretionData>
      <Secretion Type="NewLymph">1.8
      </Secretion>
    </SecretionData>
  </DiffusionField>

</Steppable>

<Plugin Name="Chemotaxis">

  <ChemicalField
    Source="FlexibleDiffusionSolverFE"
    Name="CCL21">
    <ChemotaxisByType Type="Tumour2"
      Lambda="1000"/>
  </ChemicalField>

```

```
</Plugin>

<Plugin Name="ConnectivityGlobal">
  <Penalty Type='Tumour'>500</Penalty>
</Plugin>

<Steppable Type="UniformInitializer">
  <Region>
    <BoxMin x="14" y="0" z="0"/>
    <BoxMax x="46" y="50" z="4"/>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>2</Width>
    <Types>Lymph</Types>
  </Region>

  <Region>
    <BoxMin x="28" y="23" z="4"/>
    <BoxMax x="32" y="27" z="36"/>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>2</Width>
    <Types>NewLymph</Types>
  </Region>

</Steppable>

<Steppable Type="BlobInitializer">
  <Region>
    <Gap>0</Gap>
    <Width>2</Width>
    <Radius>8</Radius>
    <Center x="30" y="25" z="58"/>
    <Types>Tumour</Types>
  </Region>
</Steppable>
```

---

```
|</CompuCell3D>
```

---

### Κώδικας XML

```
from PySteppables import *
import CompuCell
import sys
from copy import deepcopy

from PySteppablesExamples import MitosisSteppableBase

class MitosisSteppable(MitosisSteppableBase):
    def __init__(self, _simulator, _frequency=1):
        MitosisSteppableBase.__init__(
            self, _simulator, _frequency)

    def step(self, mcs):
        field1=CompuCell.getConcentrationField
        (self.simulator,"CCL21")
        for cell in self.cellList:
            pixelList=CellPixelList
            (self.pixelTrackerPlugin, cell)

            if cell.type==2:

                minFieldCell=1e12
                maxFieldCell=0.0

                for pixelData in pixelList:
                    Pt=pixelData.pixel
                    concentration=field1.get(Pt)
                    #CCL21
                    if concentration>maxFieldCell:
                        maxFieldCell=concentration
                    if concentration<minFieldCell:
                        minFieldCell=concentration
```

---

```
if mcs<460 and maxFieldCell>=5:  
    cell.type=4  
  
from PySteppables import *  
import CompuCell  
import sys  
  
from PlayerPython import *  
import CompuCellSetup  
from math import *  
from XMLUtils import dictionaryToMapStrStr as d2mss  
from XMLUtils import CC3DXMListPy
```

Κώδικας python

# Βιβλιογραφία

- [1] T. Tammela and K. Alitalo, *Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise*, Cell, 2010.
- [2] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας*, Ιατρικές εκδόσεις π. χ. Πασχαλίδης, 2nd volume, 2nd edition, 2003.
- [3] T. Tammela and K. Alitalo, *Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise*, Cell, 2010.
- [4] M. Nagahashi, S. Ramachandran, O. M. Rashid, K. Takabe, *Lymphangiogenesis: A new player in cancer progression*, World Journal of Gastroenterology, 2011.
- [5] Α. Νόννη και Ε. Πατσούρης, *Λεμφικό Σύστημα: Λεμφαγγειογένεση και Λεμφογενής Διασπορά του Καρκίνου*, Ά Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεμιστημάτου Αθηνών, 2005.
- [6] P. Saharinen, L. Eklund, K. Pulkki, P. Bono and K. Alitalo, *VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis*, Cell Press, 2011.
- [7] K. J. Laing and C. J. Secombes, *Chemokines*, Developmental and Comparative Immunology, 2003.
- [8] Α. Ψαρρά, *Κυτταροκίνες - Γενικά χαρακτηριστικά*, Χημικός, Τμήμα Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός».
- [9] A. Issa, T. X. Le, A. N. Shoushtari, J. D. Shields and M. A. Swartz, *Vascular Endothelial Growth Factor-C and C-C Chemokine Receptor 7 in Tumor Cell-Lymphatic Cross-talk Promote Invasive Phenotype*, Cancer Research, 2009.
- [10] K. Alitalo, *The lymphatic vasculature in disease*, Nature Medicine, 2011.

- 
- [11] S. Takahashi, *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Receptors and Their Inhibitors for Antiangiogenic Tumor Therapy*, Pharmaceutical Society of Japan, 2011.
  - [12] W. M. Maniscalco and C. T. D'Angio, *Vascular Endothelial Growth Factor*, Elsevier, 2006.
  - [13] I. Albrecht and G. Christofori, *Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer*, The International Journal of Developmental Biology, 2006.
  - [14] J. D. McAllaster and M. S. Cohen, *Role of the lymphatics in cancer metastasis and chemotherapy applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2011.
  - [15] J. D. Shields, M. E. Fleury, C. Yong, A. A. Tomei, G. J. Randolph and M. A. Swartz, *Autologous Chemotaxis as a Mechanism of Tumor Cell Homing to Lymphatics via Interstitial Flow and Autocrine CCR7 Signaling*, Cell Press, 2007.
  - [16] C. Norrmén, T. Tammela, T. V. Petrova and K. Alitalo, *Biological Basis of Therapeutic Lymphangiogenesis*, Journal of American Heart Association, 2011.
  - [17] X. Yin, J. Truty, R. Lawrence, S. C. Johns, R. S. Srinivasan, T. M. Handel and M. M. Fuster, *A critical role for lymphatic endothelial heparan sulfate in lymph node metastasis*, Molecular Cancer, 2010.
  - [18] K. Uchimura, M. Morimoto-Tomita, A. Bistrup, J. Li, M. Lyon, J. Gallagher, Z. Werb and S. D. Rosen, *HSulf-2, an extracellular endoglycosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokine: effects on VEGF, FGF-I, and SDF-1*, BMC Biochemistry, 2006.
  - [19] H. G. Augustin, G. Y. Koh, G. Thurston and K. Alitalo, *Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system*, Molecular Cell Biology, 2009.
  - [20] W. A. Barton, D. Tzvetkova and D. B. Nikolov, *Structure of the Angiopoietin-2 Receptor Binding Domain and Identification of Surfaces Involved in Tie2 Recognition*, Elsevier, 2005.

- 
- [21] W. A. Barton, D. Tzvetkova-Robev, E. P. Miranda, K.R. Rajashankar, J.P. Himanen and D. B. Nikolov, *Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex*, Nature Structural and Molecular Biology, 2006.
  - [22] T. Holopainen, P. Saharinen, G. D'Amico, A. Lampinen, L. Eklund, R. Sormunen, A. Anisimov, G. Zarkada, M. Lohela, H. Heloterä, T. Tammela, L. E. Benjamin, S. Ylä-Herttuala, C. C. Leow, G. Y. Koh and K. Alitalo, *Effects of Angiopoietin-2-Blocking Antibody on Endothelial Cell-Cell Junctions and Lung Metastasis*, Oxford University Press, 2012.
  - [23] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos, *Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis*, Science, 1997.
  - [24] E. Fagiani, P. Lorentz, L. Kopfstein and G. Christofori, *Angiopoietin-1 and -2 Exert Antagonistic Functions in Tumor Angiogenesis, yet Both Induce Lymphangiogenesis*, Cancer Research, 2011.
  - [25] S.-H. Song, K. L. Kim, K.-A. Lee and W. Suh, *Tie1 regulates the Tie2 agonistic role of angiopoietin-2 in human lymphatic endothelial cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012.
  - [26] T. C.M. Seegar, B. Eller, D. Tzvetkova-Robev, M. V. Kolev, S. C. Henderson, D. B. Nikolov and W. A. Barton, *Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands*, NIH Public Access, 2011.
  - [27] A. Friedman and G. Lolas, *Analysis of a Mathematical Model of Tumor Lymphangiogenesis*, Mathematical Models and Methods in Applied Sciences, 2005.
  - [28] M. Pepper and G. Lolas, *The lymphatic vascular system in lymphangiogenesis, invasion and metastasis. A mathematical approach*, Selected Topics in Cancer Modelling, editors N. Bellomo, M. Chaplain and E. De Angelis, Birkhauser, 2008.
  - [29] A. R. A. Anderson and M. A. J. Chaplain, *Continuous and Discrete Mathematical Models of Tumor-induced Angiogenesis*, Bulletin of Mathematical Biology, 1998.

- 
- [30] H. Enderling, M. A.J. Chaplain, A. R.A. Anderson and J. S. Vaidya, *A mathematical model of breast cancer development, local treatment and recurrence*, Journal of Theoretical Biology, 2007.
  - [31] M. H. Swat, S. D. Hester, R. W. Heiland, B. L. Zaitlen, J. A. Glazier, A. Shirinifard, *CompuCell3D Manual and Tutorial*, Version 3.6.1.
  - [32] M. E. Fleury, K. C. Boardman and M. A. Swartz, *Autologous Morphogen Gradients by Subtle Interstitial Flow and Matrix Interactions*, Biophysical Journal, 2006.
  - [33] J. L. Gevertz and S. Torquato, *Modeling the effects of vasculature evolution on early brain tumor growth*, Journal of Theoretical Biology, 2005.
  - [34] F. Billy, B. Ribba, O. Saut, H. Morre-Trouillet, T. Colin, D. Bresch, J.-P. Boissel, E. Grenier and J.-P. Flandrois, *A pharmacologically based multiscale mathematical model of angiogenesis and its use in investigating the efficacy of a new cancer treatment strategy*, Journal of Theoretical Biology, 2009.
  - [35] S. Davis, T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonnier, and G. D. Yancopoulos, *Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning*, Cell, Vol. 87, 1161–1169, December 27, 1996.
  - [36] L. L. Y. Chiu and M. Radisic, *Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues*, Biomaterials, 2009.
  - [37] C.-H. Cho, R. A. Kammerer, H. J. Lee, M. O. Steinmetz, Y. S. Ryu, S. H. Lee, K. Yasunaga, K.-T. Kim, I. Kim, H.-H. Choi, W. Kim, S. H. Kim, S. K. Park, G. M. Lee and G. Y. Koh, *COMP-Ang1 A designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity*, PNAS, 2003.
  - [38] M. Love, J. L. Sandberg, J. J. Ziarek, K. P. Gerarden, R. R. Rode, D. R. Jensen, D. R. McCaslin, F. C. Peterson and C. T. Veldkamp, *Solution Structure of CCL21 and Identification of a Putative CCR7 Binding Site*, Biochemistry, American Chemical Society, 2012.