

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

Έκφραση υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFr) και επίδραση ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης EGF στην ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου επιμύων

ΣΚΟΠΟΣ Ο σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-r) και των ρυθμών ανάπτυξης στον ορθοκολικό καρκίνο, καθώς και η επίδραση της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) σε ποντίκια, στο ρυθμό ανάπτυξης, σε ένα μοντέλο ορθοκολικού καρκίνου. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν επτά καλά χαρακτηρισμένες, αποστειρωμένες συμπαγείς και κυτταρικές καρκινικές σειρές. Οι όγκοι αυτοί δημιουργήθηκαν μετά από ενέσεις 1,2-dimethylhydrazine, ενός γνωστού καρκινογόνου που προκαλεί πειραματικό ορθοκολικό καρκίνο, σε ποντίκια NMRI. Όζοι από τους πρωτοπαθείς όγκους μεταμοσχεύτηκαν πάλι σε NMRI ποντίκια ενδοπεριτοναϊκά και υποδόρια καθώς και σε ιστοκαλλιέργεια και παρήχθησαν καρκινικές σειρές διαφόρων ιστολογικών τύπων και αναπτυξιακών χαρακτηριστικών (MAC15, MAC15Aip, MAC15A T/C, MAC15A S/C, MAC29, MAC30T, MAC31). Οι χρόνοι διπλασιασμού του όγκου τους κυμαίνονταν από 0,9 (MAC15A T/C κυτταρική σειρά) έως 8 ημέρες (MAC31 συμπαγής σειρά). Οι όγκοι αυτοί παρήχθησαν στην Ογκολογική Μονάδα του Πανεπιστημίου του Bradford στη Βρετανία και μεταφέρθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Έγινε ραδιοανοσομέτρηση και ανάλυση κατά Scatchard του πληθυσμού των EGF-r στους πειραματικούς καρκίνους. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφώς ότι στους συμπαγείς όγκους υφίσταται μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης των EGF-r και του χρόνου διπλασιασμού των όγκων. Οι σειρές MAC15A επίσης παρουσίασαν διαφορετική έκφραση EGF-r, εύρημα το οποίο συνηγορεί υπέρ της πιθανότητας η έκφραση των EGF-r να επηρεάζεται δραστικά από το διαφορετικό περικυτταρικό περιβάλλον. Εξωγενής ενδοπεριτοναϊκή έγχυση 5 μM EGF προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης του ταχέως αναπτυσσόμενου όγκου MAC15A S/C, ενώ η ίδια δόση προκάλεσε παρομοίως αναστολή της ανάπτυξης του βραδέως αναπτυσσόμενου όγκου MAC31. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου παγκοσμίως από καρκίνο. Ακόμη δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική συστηματική θεραπεία και οι παρούσες διαγνωστικές δυνατότητες ανιχνεύουν λιγότερους από τους μισούς καρκίνους που είναι χειρουργικά ιάσιμοι. Αν και η υπερέκφραση των EGF-r μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην καρκινογένεση, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μια πιθανή θεραπευτική μέθοδος μέσω ορμονο- ή ανοσοθεραπείας.

Ένας ιστός αναπτύσσεται κυρίως ως αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των κυττάρων, δηλαδή η γενική ανάπτυξη φυσιολογικών και καρκινικών ιστών εξαρτάται από την τελική αύξηση στον αριθμό των κυττάρων, που

προκύπτει από το γεγονός ότι περισσότερα κύτταρα δημιουργούνται παρά καταστρέφονται. Τα νεοπλασματικά κύτταρα απαιτούν πολύ λιγότερο θρεπτικό υλικό για να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες απ' ό,τι τα αντίστοιχα

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(5):634-646
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(5):634-646

Π. Μπουλουγούρης,
Γ. Κωνσταντουδάκης,
Σ. Χριστοδούλου,
Γ. Γιαννόπουλος,
Κ. Πετροπούλου,
Δ. Σαμπάνης,
Μ. Σαφιολέας

Δ' Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο
«Αττικόν», Αθήνα

Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-r) and the effects of exogenous intraperitoneal infusion of EGF on growth rates in murine adenocarcinoma of the colon

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

EGF υποδοχείς
Ορθοκολικός καρκίνος επιμύων
Περικυτταρικό περιβάλλον

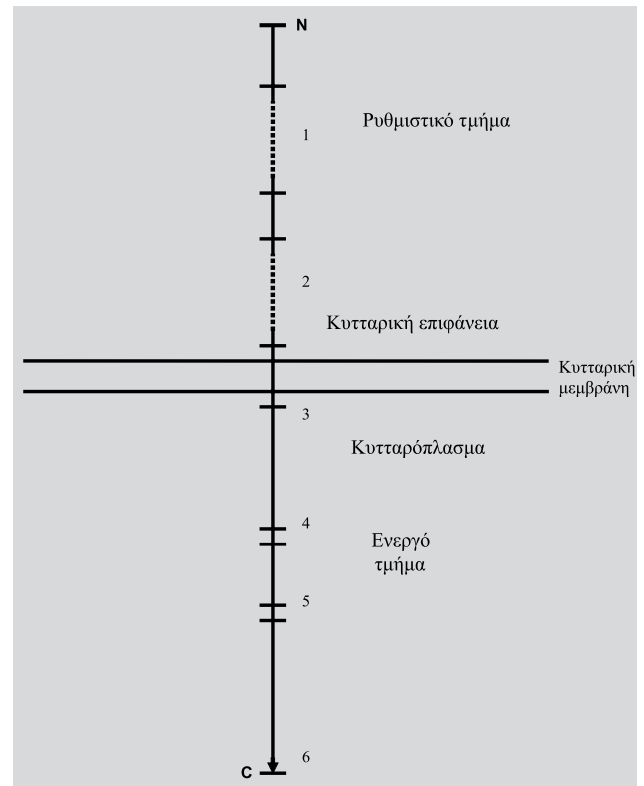
Υποβλήθηκε 12.6.2008
Εγκρίθηκε 30.8.2008

φυσιολογικά. Η σχετικά αυτόνομη φύση των κακοήθων κυττάρων είναι γνωστή εδώ και χρόνια. Για να ερμηνευτεί αυτό το φαινόμενο, έχει προταθεί ότι τα κύτταρα μπορούν να γίνουν κακοήθη από την ενδογενή παραγωγή πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων (polyperptide growth factors, PGF), οι οποίοι δρουν στα κύτταρα απ' όπου παράγονται μέσω λειτουργικών εξωτερικών υποδοχέων, επιτρέποντας τη διέγερση και, συνεπώς, οδηγώντας σε περαιτέρω φαινοτυπική έκφραση του πεπτιδίου από το ίδιο το κύτταρο που το παράγει.¹ Αυτή η διαδικασία έχει ονομαστεί αυτοκρινής έκκριση,² η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί ένα μηχανισμό ειδοποίησης και, τελικά, οδηγεί σε μιτογενή απάντηση.

Η οικογένεια του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) περιλαμβάνει τον EGF, το μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα άλφα (TGF- α), την αμφιρεγκιουλίνη και το συνδεδεμένο με ηπαρίνη EGF. Οι μοριακές δομές όλων αυτών των παραγόντων έχουν κατά 35–40% ομοιότητα με τον EGF.³ Οι πρωτεΐνες της οικογένειας του EGF έχουν όλες μια αλληλουχία αμινοξέων με έξι μόρια κυστεΐνης και συνδέονται αποκλειστικά με έναν ειδικό υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 170.000 kDa.

Τα βιολογικά αποτελέσματα των EGF και TGF- α ρυθμίζονται από τη διάδραση με ένα συγκεκριμένο υποδοχέα της επιφάνειας του κυττάρου που εντοπίζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, τα οποία προέρχονται και από τις τρεις βλαστικές σειρές. Ο αριθμός των υποδοχέων αυτών ποικίλλει από 20.000–200.000 ανά κύτταρο.^{4,5} Μετά από την κλωνοποίηση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) για το EGF-r RNA, έχει αναγνωριστεί πλέον η πρωταρχική δομή της πρωτεΐνης.^{6–8} Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGF-r) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με ενδογενή δράση πρωτεϊνικής φωσφοτρανσφεράσης.⁹ Αυτή η πρωτεΐνη των 1.186 αμινοξέων συντίθεται από μια πρωταρχική αλυσίδα⁷ 24 αμινοξέων. Το αμινικό άκρο των 621 αμινοξέων βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου και περιλαμβάνει την περιοχή αναγνώρισης των EGF και TGF- α . Ο 170 kDa ολο-υποδοχέας περιλαμβάνει περίπου 40 kDa υδατανθρακικές πλάγιες αλυσίδες. Στο εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα βρίσκονται 12 δυναμικές περιοχές για γλυκοζυλίωση σχετιζόμενη με αμινομάδες, από τις οποίες τουλάχιστον 11 φαίνεται ότι είναι λειτουργικές¹⁰ (εικ. 1).

Το εξωκυτταρικό τμήμα του EGF-r αποτελείται από 51 μόρια κυστεΐνης, συγκρινόμενα με τα 9 μόνο μόρια κυστεΐνης, από τα οποία αποτελείται το καρβοξυλικό ενδοκυτταρικό μέρος του υποδοχέα.⁷ Αυτά τα μόρια κυστεΐνης βρίσκονται κυρίως σε δύο εξωκυτταρικές περιοχές, στα



Εικόνα 1. Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGF-r).

τμήματα 134–313 και 446–612. Μια υδρόφοβη περιοχή, η οποία αποτελείται από 23 αμινοξέα, συνιστά το διαμεμβρανικό τμήμα που διαχωρίζει το εξωκυτταρικό τμήμα από το 542 αμινοξέων καρβοξυλικό ενδοκυτταρικό τμήμα.⁷ Η δομή αυτού του ενδοκυτταρικού τμήματος μπορεί να προσομοιάζει με τη ρετροϊκή πρωτεΐνη τυροσινική κινάση και με το καταλυτικό υποτμήμα της c-AMP εξαρτημένης πρωτεϊνικής κινάσης.

Όταν ο αυξητικός παράγοντας συνδέεται με τον υποδοχέα, συντελείται μια αλλαγή στη διαμόρφωση του εξωκυτταρικού τομέα.¹¹ Όταν ο υποδοχέας δεν είναι συνδεδεμένος, είναι εν πολλοίς μονομερής, η σύνδεση όμως του υποδοχέα με αυξητικό παράγοντα φαίνεται ότι δημιουργεί και σταθεροποιεί τα διμερή του.¹² Ο διμερής υποδοχέας έχει υψηλότερο ουδό κατάλυσης από το μονομερή και επίσης φωσφορυλιώνεται ταχύτατα στα τμήματα τυροσίνης στις περιοχές 3 και 4 της αυτο-φωσφορυλιωτικής καρβοξυλικής αλυσίδας. Η μορφή αυτή του υποδοχέα είναι εκείνη που σχετίζεται και φωσφορυλιώνει ένζυμα, όπως τη φωσφολιπάση C, μεταβάλλοντας την καταλυτική τους δράση και την υποκυτταρική τους διανομή.¹³ Έτσι, η ισχύς του ερεθίσματος, η οποία γίνεται αντιληπτή από την τοπική συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα στον εξωκυτταρικό χώρο, μετατρέπεται σε

άλλης μορφής ενζυμική δράση μέσα στο κύτταρο. Ο EGF-r μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιηθεί από τον EGF, τον TGF- α , καθώς και από ποικίλους ιογενώς κωδικοποιημένους αυξητικούς παράγοντες και την αμφιρεγκιουλίνη. Διέγερση από οποιοδήποτε από τα παραπάνω σε συνδυασμό με άλλους ενεργοποιημένους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο insulin growth factor-1 (IGF-1), μπορεί να αυξήσει την αντιγραφή του DNA, ακολουθούμενη από κυτταρική διαίρεση. Αυτό το σύστημα φαίνεται ότι είναι ένας από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη των επιθηλιακών και πιθανότατα και άλλων κυτταρικών τύπων.

Τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι ο EGF όχι απλά διαδρά σε μια on-off διαδικασία με τον υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου, αλλά ότι μια περίπλοκη σειρά γεγονότων ακολουθεί τη δημιουργία των συμπλεγμάτων EGF-EGF-r. Πολλαπλά πειράματα σε αυτούς τους υποδοχείς έδειξαν ότι το μεταβολικό μονοπάτι που καταλήγει στην αποδόμηση του EGF αρχίζει με την εσωτερίκευση του κυτταρικός συνδεδεμένου αυξητικού παράγοντα μέσω μιας διαδικασίας ενδοκυττάρωσης, που δημιουργεί ενδοκυτταρικές κύστες στο κυτταρόπλασμα. Αυτές οι κύστες ενώνονται στη συνέχεια με λυσοσώματα, προκαλώντας γενικευμένη αποδόμηση του εν λόγω αυξητικού παράγοντα.

Το πρώτο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί στην παρούσα έρευνα ήταν εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των EGF-r και του ρυθμού ανάπτυξης στον ορθοκολικό καρκίνο πειραματοζώων που έχει ομοιότητες με τον ορθοκολικό καρκίνο του ανθρώπου. Για να βρεθεί αυτό, έπρεπε να υπολογιστεί ο πληθυσμός των EGF-r ορθοκολικών καρκινικών σειρών, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μεθοδολογία, που αναλύεται στο κεφάλαιο «Υλικό και μέθοδος». Το δεύτερο ερώτημα ήταν κατά πόσο το διαφορετικό «μικροπεριβάλλον» μιας δεδομένης καρκινικής σειράς επιδρούσε στην έκφραση των EGF-r της σειράς αυτής. Πολλοί ερευνητές μέχρι τώρα έχουν ανακοινώσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με την έκφραση των EGF-r σε διάφορες ανθρώπινες και κυτταρικές καρκινικές σειρές, ενώ οι πλέον εκτεταμένα μελετημένες είναι η σειρά A431 επιδερμοειδής καρκινική σειρά, η T-47-D καρκινική σειρά μαστού και διάφορες σειρές ινοβλαστών, αλλά κανένας μέχρι τώρα, απ' ό,τι είναι γνωστό, δεν έχει μελετήσει την έκφραση των EGF-r στον ορθοκολικό καρκίνο ποντικών, εφαρμόζοντας ραδιοανοσολογικές τεχνικές. Εξάλλου, αποτελέσματα από τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των EGF-r στην προαγωγή ή την αναστολή ανάπτυξης καρκινικών σειρών στον άνθρωπο έχουν επίσης ανακοινωθεί. Στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της εξωγενούς χορήγησης EGF στην ανάπτυξη του ορθοκολικού καρκίνου, που βασίζονται κυρίως στις αρχές αλληλεπίδρασης ορμόνης-υποδοχέα, στο μεταβολισμό και

στην αποδόμηση του συμπλέγματος EGF.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Τα ζώα σπάνια αναπτύσσουν αυτόματους εντερικούς καρκίνους. Πριν από το 1965 δεν υπήρχε κάποιο ικανοποιητικό ζωικό μοντέλο ορθοκολικού καρκίνου και επομένως δεν είχε αναπτυχθεί κάποια έρευνα σε αυτόν τον τομέα. Η έρευνα σε μοντέλα καρκινογένεσης ουσιαστικά άρχισε όταν ανακαλύφθηκε ότι η 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMH) παρήγαγε εκλεκτικά όγκους στο λεπτό έντερο και στο κόλον σε αρουραίους. Λόγω της χημικής σταθερότητας και του σχετικά μικρού χρόνου καρκινογένεσης, η 1,2-DMH και οι συγγενικές με αυτή χημικές ενώσεις αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες καρκινογόνες ουσίες σε πειραματικό και ερευνητικό επίπεδο.¹⁴

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθούμε από την αρχή στο πειραματικό μεταμοσχευτικό μοντέλο ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος των Double και Bibby (Πανεπιστήμιο Bradford, Βρετανία)¹⁵ σε ποντίκια NMRI. Τα NMRI χρησιμοποιούνται στην ηλικία των 6–12 εβδομάδων. Πρωτοπαθείς ορθοκολικοί όγκοι παράγονται μετά από 17 εβδομαδιαίες ενέσεις με 1,2-DMH και τα ποντίκια θυσιάζονται μετά από την τελευταία θεραπεία. Όλοι οι πολύποδες αφαιρούνται από το κόλον και τοποθετούνται σε ειδική ιστοκαλλιέργεια που περιέχει πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Οι πολύποδες μεταμοσχεύονται στο υποδόριο της κοιλιακής χώρας νέων NMRI με τη βοήθεια trocar. Όταν οι λήπτες NMRI αναπτύξουν οζίδια, μεγέθους τουλάχιστον 5 × 5 mm, οι όγκοι μεταμοσχεύονται και πάλι σε νέες γενεές.

Επτά συμπαγείς και κυτταρικές καρκινικές σειρές ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος ποντικών (mouse adenocarcinoma of the colon, MAC) χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες αυτής της ερευνητικής εργασίας. Όλες παρήχθησαν στην Ογκολογική Μονάδα του Πανεπιστημίου Bradford της Βρετανίας και εισήχθησαν στο Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Ο καθορισμός, ο βαθμός διαφοροποίησης, το φύλο του φιλοξενούντος πειραματοζώου και ο ρυθμός αύξησης (χρόνος διπλασιασμού) των διαφόρων καρκινικών σειρών φαίνονται στον πίνακα 1.

Εδώ θα πρέπει να γίνει ιδιαίτερη μνεία για τη σειρά MAC15A, που αποτελεί την ασκτική μορφή της σειράς MAC15 και που διατηρεί τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αρχικού αδενοκαρκινώματος MAC15. Συμπαγή τμήματα όγκων της σειράς MAC15 τοποθετήθηκαν στο περιτόναιο NMRI ποντικών ηλικίας 6–8 εβδομάδων με τη βοήθεια trocar. Μετά από δύο εβδομάδες ήταν προφανές ότι τα πειραματοζώα ανέπτυξαν καρκινικό ασκίτη, ο οποίος αποδείχθηκε στη λαπαροτομή. Τα ασκτικά κύτταρα (MAC15Aip) μεταφέρθηκαν σε καλλιέργεια TC 199 medium για να δημιουργηθεί η σειρά MAC15A T/C και σε νέα πειραματοζώα με υποδέρμα έγχυση στην κοιλιακή χώρα για να δημιουργηθεί η σειρά MAC15A S/C.

Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 1.000 rpm για 5 min στους 20 °C. Το ίζημα που δημιουργήθηκε ξηλώθηκε δύο φορές με 10 mL PBS και αφού αφαιρέθηκε το αιώρημα

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των διαφόρων καρκινικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν.

Κυτταρική καρκινική σειρά	Βαθμός διαφοροποίησης	Φύλο του φιλοξενούντος πειραματοζώου (Α: Άρρεν, Θ: Θήλυ)	Χρόνος διπλασιασμού (ημέρες)
MAC15 (συμπαγής σειρά)	Καλά διαφοροποιημένη, σωληνώδες	A	3,0
MAC15A ip κύτταρα (εμφυτευμένα τμήματα MAC15 ενδοπεριτοναϊκά)	Μέτρια διαφοροποιημένη	A	1,2
MAC15A TC κύτταρα (MAC15A ip κύτταρα σε ιστική καλλιέργεια)	Μέτρια διαφοροποιημένη	-	0,9
MAC15A S/C (MAC15A ip κύτταρα εμφυτευμένα υποδόρια)	Μέτρια διαφοροποιημένη	A	1,3
MAC29 (συμπαγής σειρά)	Καλά διαφοροποιημένη, σωληνώδης	Θ	3,3
MAC30T (συμπαγής σειρά)	Καλά διαφοροποιημένη, βλενοεκκριτική	Θ	5,3
MAC31 (συμπαγής σειρά)	Καλά διαφοροποιημένη, νεκρωτική	Θ	8,0

φυγοκεντρήθηκε για 5 min στους 20 °C. Το νέο ίζημα επαναδιαλύθηκε στον ίδιο όγκο, όπως προηγουμένως, χρησιμοποιώντας ομογενοποιητικό διάλυμα. Ως μέσο ομογενοποίησης χρησιμοποιήθηκαν 10 mM HEPES με pH 7,4 που περιείχε 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT και 500 KIU/L απροτινίνης. Το ομογενοποιημένο αυτό μείγμα καταψύχθηκε στους -80 °C για 10–15 min και μετά έτηξε στους 37 °C.

Η μέθοδος αυτή έκανε δυνατή την παρασκευή κατάλληλου κυτταρικού παρασκευάσματος για τον υπολογισμό των κυτταρικών κλασμάτων.

Οι ιστοί θα πρέπει να φυλάσσονται στους -70 °C (ξηρά αποθήκευση) ή στους -20 °C σε διάλυμα 50% v/v buffer σουκρόζης/γλυκερόλης. Οι ιστοί έτηξαν σε διάλυμα σουκρόζης (0,1 HEPES, το οποίο περιλαμβάνει 15 mM MgCl₂, με pH 7,4) μέσα σε πάγο για 15 min. Όλο το λίπος αφαιρέθηκε και ο ιστός διαιρέθηκε σε κομμάτια μεγέθους περίπου 1 mm, χρησιμοποιώντας χειρουργική λεπίδα, ενώ 5 mL μέσου ομογενοποίησης (pH 7,4) για κάθε g υγρού ιστού προστέθηκαν σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα ιδανικό για ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση.

Ακολούθησε ομογενοποίηση με τη χρήση ιδανικού ομογενοποιητή με συνθλίψεις διάρκειας 10 sec, αφήνοντας το διάλυμα να κρύνει μεταξύ των συνθλίψεων. Περαιτέρω ομογενοποίηση έλαβε χώρα με τη χρήση γυαλιού (ομογενοποιητής γυαλιού) μέχρι τη δημιουργία εναιωρήματος.

Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 2.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C για 5 min. Το ίζημα αποτελεί το πυρηνικό κλάσμα μετά από πλύση μέσω ομογενοποίησης και επανάληψη της φυγοκέντρησης, όπως προηγουμένως. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε περαιτέρω σε 40.000 g στους 4 °C για 30 min. Το δεύτερο εναιώρημα είναι ένα κυτταρικό διαλυτό κλάσμα. Το ίζημα περιέχει τις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες αναρροφούνται προσεκτικά και διαλύονται και πάλι σε 1 mL buffer EGF-r, αφού το εναιώρημα έχει απομακρυνθεί. Το buffer EGF-r ήταν 10 mM HEPES pH 7,4, που περιλαμβάνει 50 mM NaCl και 1 mg/mL BSA. Οι κυτταρικές μεμβράνες μπορούν στη συνέχεια να αποθηκευτούν

στους -70 °C για χρονική διάρκεια μέχρι και 6 μήνες.

Η ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε άγνωστο δείγμα καθορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Χρησιμοποιήθηκαν 10 μL κάθε δείγματος κυτταρικών μεμβρανών και σε αυτό προστέθηκαν 90 μL αποσταγμένου νερού. Η απορροφητικότητα κάθε δείγματος σε 595 nm αποδόθηκε με μια ομαλή καμπύλη. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν (σε mg/mL) μετατράπηκαν σε mg/mL.

Τα τελικά ιζήματα μεμβρανών μπορούσαν να παραμένουν αποθηκευμένα στους -70 °C. Τέσσερις δοκιμαστικοί σωλήνες τύπου Eppendoff χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μη ειδικής σύνδεσης και της ολικής σύνδεσης (σε διπλές) για κάθε δείγμα.

Όλα τα βήματα της διαδικασίας "EGFr assay" εκτελέστηκαν σε διπλές.

- Δοκιμαστικοί σωλήνες τύπου Eppendoff 1 και 2 (μη ειδική σύνδεση)
100 μL μεμβρανικών κλασμάτων
10 μL ¹²⁵I mEGF 15 nM 10 μL mEGF ανταγωνιστού 1,5 μM (100×περίσσεια)
30 μL buffer
Συνολικός όγκος 150 μL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες τύπου Eppendoff 3 και 4 (ολική σύνδεση)
100 μL μεμβρανικών κλασμάτων
10 μL ¹²⁵I mEGF 15 nM
40 μL of buffer
Συνολικός όγκος 150 μL
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min
- 500 μL buffer EGF-r προστέθηκαν στον καθέναν
- Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν σε ταχύτητα 11.000 rpm για 30 min στους 4 °C. Αυτή η τεχνική διαχωρίζει το δεσμευμένο από τον ελεύθερο δείκτη
- Τα εναιωρήματα που προέκυψαν αφαιρέθηκαν με προσεκτική αναρρόφηση. Δόθηκε εξαιρετική προσοχή στη διαφύλαξη

του ιζήματος και απορρίφθηκαν ως ραδιενεργό υλικό (μη συνδεδεμένο κλάσμα)

- Το ίζημα με την προσθήκη buffer (100 μ L) μεταγγίστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες LP3 και μετρήθηκε η ραδιενέργεια με τη χρήση KLB γάμμα μετρητή για 60 sec.

Η μέση μη ειδική σύνδεση αφαιρέθηκε από την ολική σύνδεση, ενώ η εναπομείνουσα ειδική σύνδεση διαιρέθηκε με την ειδική δραστηριότητα του 125 I mEGF που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα σε fmoles/mL μετατράπηκαν σε fmoles/mg μεμβρανικής πρωτεΐνης, αφού η συγκέντρωση της μεμβρανικής πρωτεΐνης υπολογίστηκε πρώτα με τη μέθοδο Bradford.

Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση EGF στους συμπαγείς όγκους MAC15A S/C και MAC31

Οι οσμωτικές αντλίες AZLET είναι μικροσκοπικές αντλίες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να εγχέουν ουσίες σε πειραματόζωα. Όταν εμφυτεύονται ενδοπεριτοναϊκά, οι αντλίες αυτές αποτελούν μια συνεχή πηγή μακροχρόνιας έγχυσης. Οι οσμωτικές αντλίες καλύπτουν ευρύ φάσμα ρυθμού και διάρκειας έγχυσης. Ενώ ο ρυθμός έγχυσης είναι σταθερός, η ποσότητα της ουσίας που διανέμεται μπορεί να τροποποιηθεί όταν αυξηθεί η συγκέντρωση της ουσίας μέσα στην αντλία. Κάθε οσμωτική αντλία τύπου AZLET που χρησιμοποιήθηκε για την έγχυση EGF στη συγκεκριμένη εργασία είχε χωρητικότητα 100 μ L, διάρκεια έγχυσης 7 ημέρες και ρυθμό έγχυσης 0,5 μ L/ώρα. Η κατασκευή της αντλίας είναι τέτοια, ώστε η διαφορά της οσμωτικής πίεσης μεταξύ των διαφόρων διαμερισμάτων της να ωθεί την περιεχόμενη ουσία στο περιβάλλον. Ο έλεγχος της λειτουργικότητας των οσμωτικών αντλιών AZLET μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μέτρησης της δραστηρικής ουσίας που παραμένει στο εσωτερικό της αντλίας όταν αυτές αφαιρέθηκαν από τα πειραματόζωα στο τέλος του πειράματος. Δεδομένου ότι οι αντλίες AZLET που χρησιμοποιήθηκαν για την έγχυση του EGF είχαν χωρητικότητα 100 μ L, διάρκεια έγχυσης 7 ημέρες και το μέσο βάρος των πειραματόζωων ήταν 28 g, οι συγκεντρώσεις του EGF που εγχύθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ήταν 0,3, 1,5 και 3,0 μ g/αντλία ανά εβδομάδα, αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

EGF-r-μέθοδος πρόσδεσης σε μονήρες σημείο (single point binding assay) των καρκινικών σειρών MAC

Τα αποτελέσματα της μεθόδου αποτυπώνονται στον πίνακα 2 (μέση τιμή). Τουλάχιστον τέσσερα παρασκευάσματα κάθε σειράς έχουν πραγματοποιηθεί, ενώ η σταθερή απόκλιση καθώς και ο συντελεστής απόκλισης της κάθε σειράς, όπως έχουν υπολογιστεί με βάση τη στατιστική ανάλυση κατά Fisher's LSD multiple comparison's test με χρήση NCSS, καταγράφονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 2. EGF-r-μέθοδος πρόσδεσης σε μονήρες σημείο (single point binding assay) του φυσιολογικού εντερικού βλεννογόνου και των σειρών MAC.

Ιστός	Βάρος (g)	Μέση τιμή (fmoles/mg κυτταρική μεμβράνη)
Αρσενικός εντερικός βλεννογόνος	1,0012	23,80
	0,9854	
	1,1256	
	0,8732	
Θηλυκός εντερικός βλεννογόνος	1,3610	21,29
	1,0602	
	0,8451	
	1,3456	
MAC15	0,8562	45,02
	0,6148	
	0,8645	
	1,4432	
MAC15A S/C (S/C: Υποδόρια ανάπτυξη)	1,4165	50,33
	1,7021	
	1,6438	
	1,0218	
MAC29	1,8454	27,91
	2,1170	
	2,0568	
	1,6538	
MAC30T	1,6109	21,69
	1,4037	
	1,8245	
	1,5284	
MAC 31	1,4331	11,78
	1,6548	
	2,5288	
	1,9303	
	1,9767	
Πληθυσμός		
MAC15A ip κύτταρα (ip: Ενδοπεριτοναϊκή καλλιέργεια)	54,80 $\times 10^6$	4,23
	41,25 $\times 10^6$	
	194,02 $\times 10^6$	
	161,60 $\times 10^6$	
MAC15A TC κύτταρα (TC: Ιστική καλλιέργεια)	44,30 $\times 10^6$	14,47
	31,44 $\times 10^6$	
	28,96 $\times 10^6$	
	26,14 $\times 10^6$	

Πίνακας 3. Η σταθερή απόκλιση και ο συντελεστής απόκλισης του εντερικού βλεννογόνου και των διαφόρων καρκινικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν.

Σειρά	Σταθερή απόκλιση	Συντελεστής απόκλισης
Αρσενικός εντερικός βλεννογόνος	1,52	3,19%
Θηλυκός εντερικός βλεννογόνος	1,25	2,91%
MAC15	7,38	8,19%
MAC15A ip κύτταρα (ip: Ενδοπεριτοναϊκή καλλιέργεια)	2,69	31,67%
MAC15A TC κύτταρα (TC: Ιστική καλλιέργεια)	7,43	25,63%
MAC15A S/C (S/C: Υποδόρια ανάπτυξη)	8,27	8,20%
MAC29	1,60	2,86%
MAC30T	3,91	8,99%
MAC31	6,04	22,92%

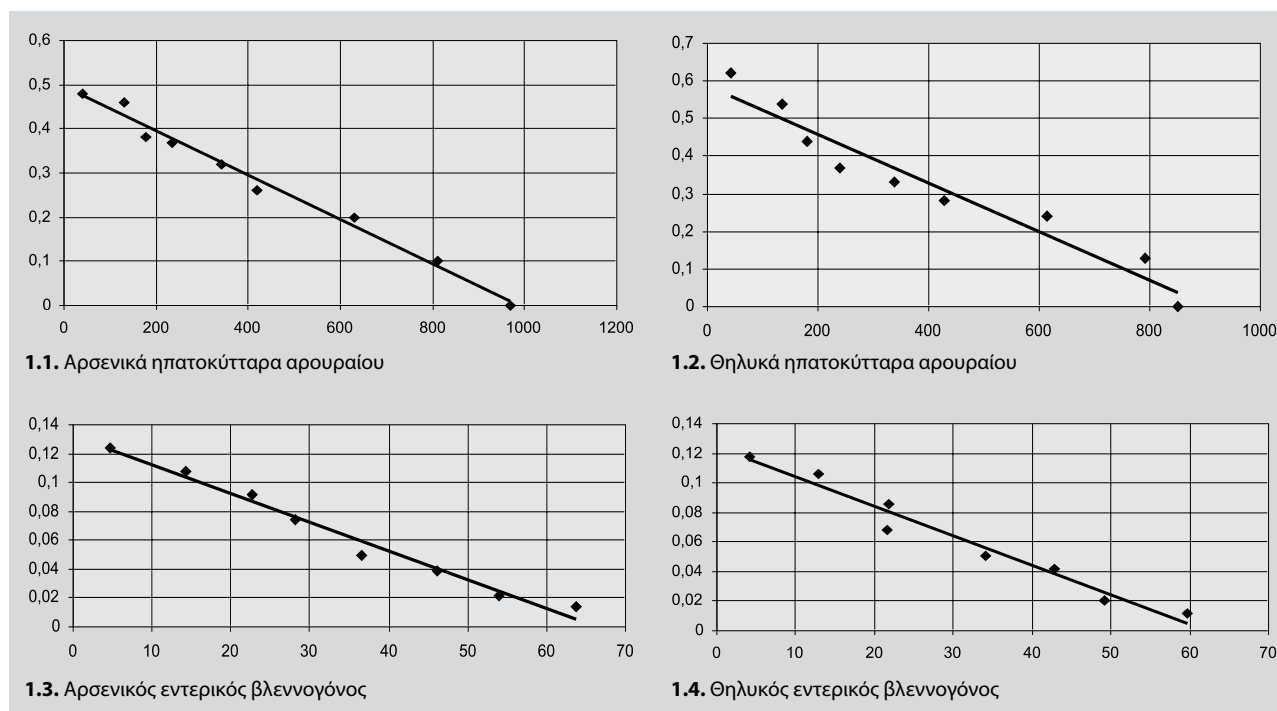
Ανάλυση κατά Scatchard του πληθυσμού των EGF-r κάθε καρκινικής σειράς

Η ανάλυση αυτή έχει καταγραφεί στις καμπύλες της εικόνας 2. Είναι προφανές από την ανάλυση των αποτελεσμάτων ότι υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ του πληθυσμού των EGF-r στις κυτταρικές μεμβράνες των καρκινικών σειρών και του χρόνου διπλασιασμού τους. Αυτό αποτυπώνεται στην εικόνα 3 και αναλύεται παρακάτω

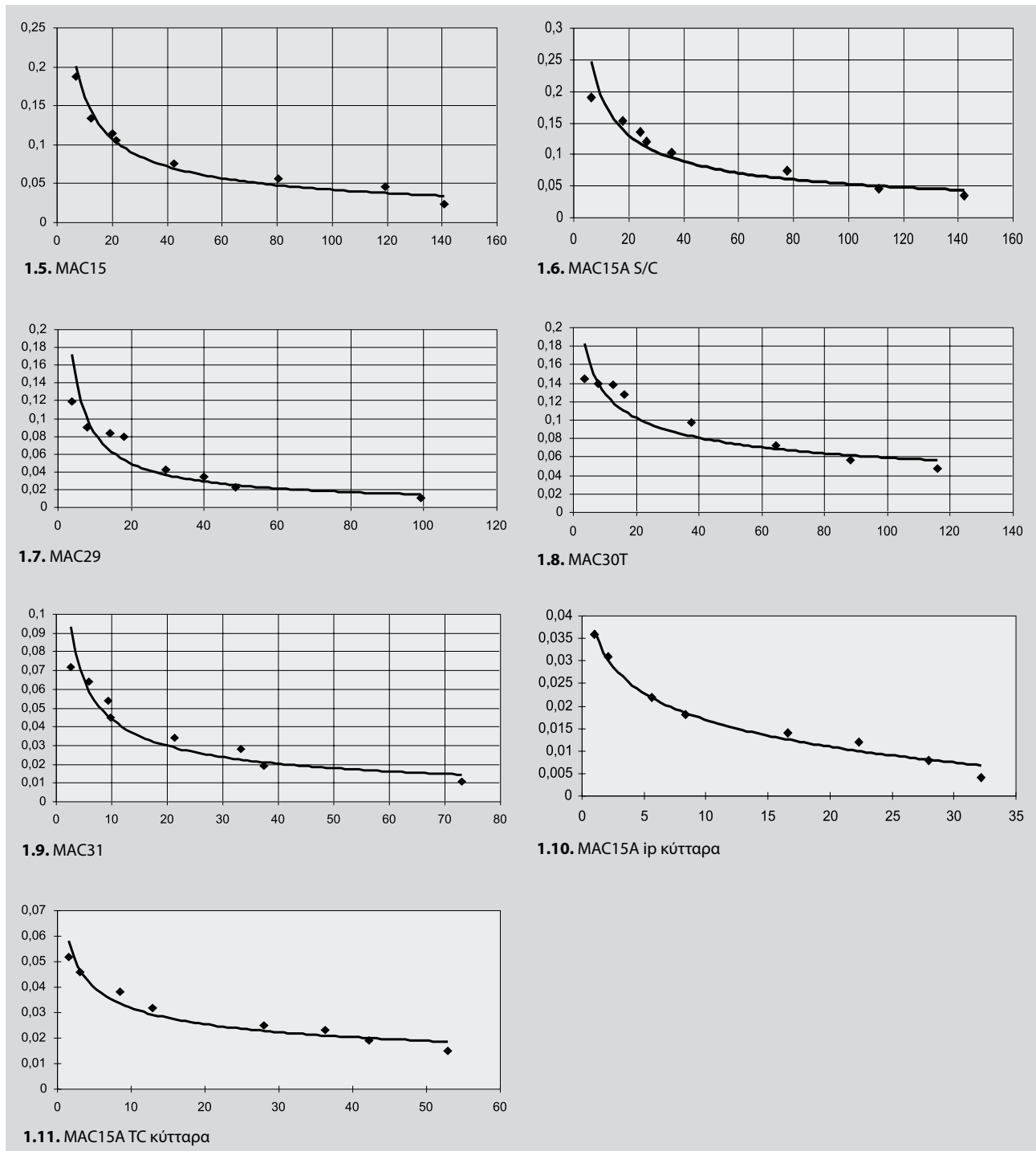
στο κεφάλαιο «Συζήτηση». Αν κάποιος, επίσης, αναλύσει προσεκτικά τα αποτελέσματα του πληθυσμού των EGF-r ανάμεσα στις σειρές MAC15A ip και MAC15A T/C, θα παρατηρήσει ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά όσον αφορά στον πληθυσμό των EGF-r τόσο μεταξύ τους όσο και με τη συμπαγή σειρά MAC15 A S/C, κι αυτό παρά το γεγονός ότι όλες προέρχονται από την ίδια αρχική σειρά MAC15 και μάλιστα, στην πραγματικότητα, η σειρά MAC15A T/C είναι στην ουσία η σειρά MAC15A ip σε ιστοκαλλιέργεια. Η πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου αναλύεται στο κεφάλαιο «Συζήτηση» (εικ. 4).

Αποτελέσματα της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης EGF στο ρυθμό ανάπτυξης των συμπαγών καρκινικών όγκων

Μετά από ανασκόπηση των αποτελεσμάτων των πληθυσμών των EGF-r στις κυτταρικές μεμβράνες των καρκινικών σειρών είναι προφανές ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σειρών MAC15A S/C και MAC31. Εξωγενής ενδοπεριτοναϊκή έγχυση EGF πραγματοποιήθηκε σε αυτές τις δύο σειρές για να εξακριβωθεί η επίδραση στην ανάπτυξή τους. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι έχει επιχειρηθεί θεραπεία συμπαγών όγκων με μονοκλωνικά αντισώματα κατά EGF-r από διάφορους ερευνητές ανά τον κόσμο, αλλά είναι η πρώτη φορά που εξωγενής χορήγηση EGF πραγματοποιείται σε συμπαγείς όγκους αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. Ο



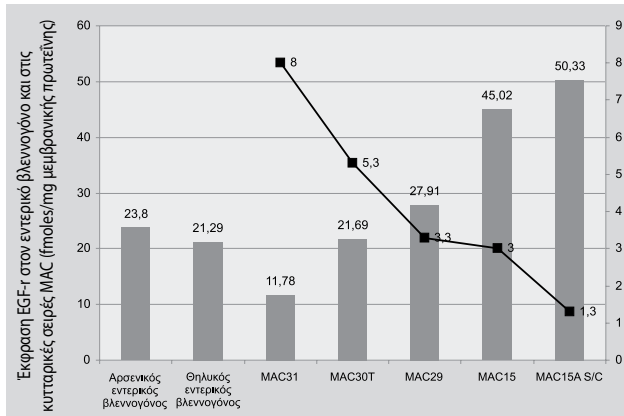
Εικόνα 2. Ανάλυση κατά Scatchard του πληθυσμού των EGF-r κάθε καρκινικής σειράς.



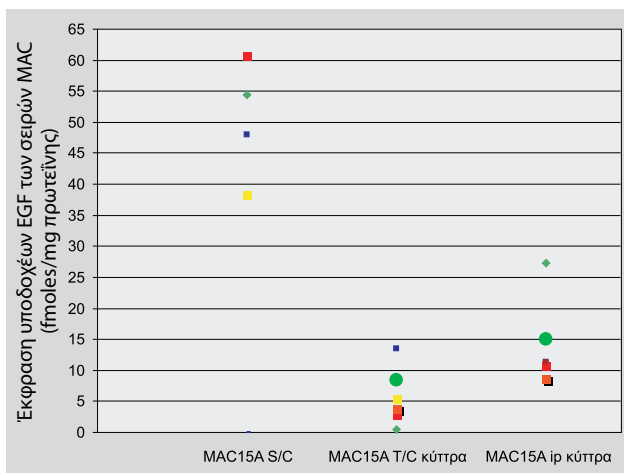
Εικόνα 2. (συνέχεια) Ανάλυση κατά Scatchard του πληθυσμού των EGF-r κάθε καρκινικής σειράς.

χορηγηθείς EGF και η επίδρασή του στη νεοπλασματική ανάπτυξη βασίζεται στις αρχές της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-υποδοχέα και στην παραδοχή της εκλεκτικότητας και του κορεσμού που χαρακτηρίζει τις αντιδράσεις των ορμονών με εκλεκτικούς κυτταρικούς υποδοχείς σε όργανα-στόχους. Έτσι, αποφασίστηκε η έγχυση 10, 50 και 100

μg/kg σωματικού βάρους EGF στα πειραματόζωα που φιλοξενούσαν τις δύο καρκινικές σειρές MAC15A S/C και MAC31, ενώ παρατηρήθηκε και καταγράφηκε η επίδρασή του στο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν την 4η και 7η ημέρα του πειράματος ήταν το δισδιάστατο μέγεθος, ο όγκος και ο σχετικός νεοπλασματι-



Εικόνα 3. Εκφραση EGF-r στον εντερικό βλεννογόνο και στις κυτταρικές σειρές MAC σε συνδυασμό με το χρόνο διπλασιασμού του καρκίνου.

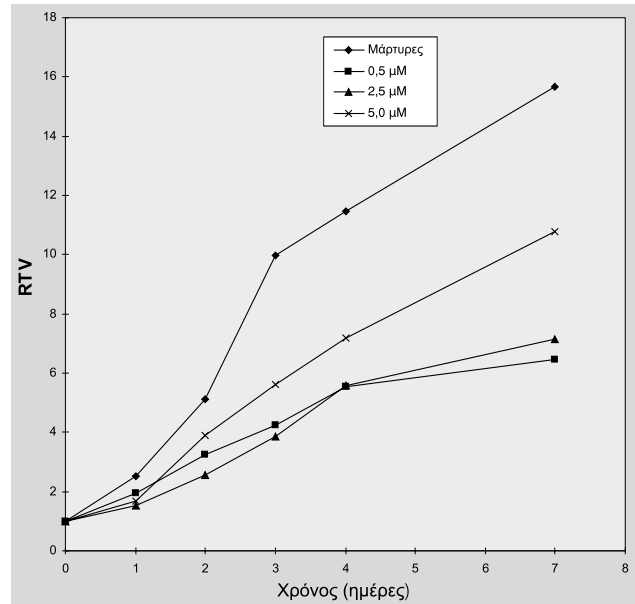


Εικόνα 4. Εκφραση υποδοχέων EGF των σειρών MAC 15A σε διαφορετικό μικροκυτταρικό περιβάλλον.

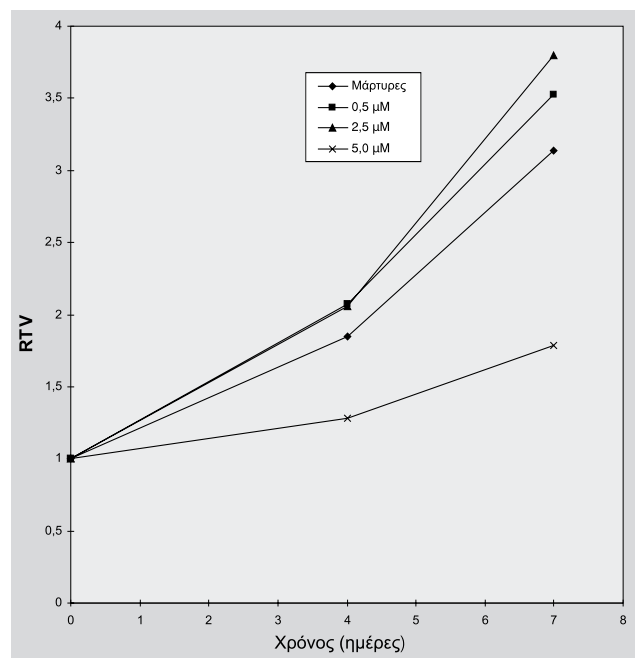
κόσ όγκος των οζιδίων. Οι συγκεντρώσεις των ποσοτήτων EGF που χορηγήθηκαν μέσω των αντλίων με βάση το μέσο σωματικό βάρος των πειραματόζων ήταν τελικά 0,5, 2,5 και 5,0 μM /αντλία ανά εβδομάδα. Οι εικόνες 5 και 6 αποτυπώνουν τις καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών MAC15A S/C και MAC31 (σχετικός νεοπλασματικός όγκος, relative tumor volume, RTV, σε σχέση με το χρόνο σε ημέρες, ανάλογα με τη συγκέντρωση σε μM του EGF που εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σχετικά αυτόνομη ιδιότητα των κακοήθων κυττάρων σε καλλιέργεια έχει αναλυθεί εδώ και πολλά χρόνια· απαιτούν λιγότερους εξωγενείς αναπτυξιακούς παράγοντες για την ανάπτυξη τους απ’ότι τα φυσιολογικά κύτταρα. Μια



Εικόνα 5. Καμπύλες ανάπτυξης της καρκινικής σειράς MAC15A S/C [RTV-σχετικός νεοπλασματικός όγκος σε σχέση με το χρόνο (ημέρες), ανάλογα με τη συγκέντρωση σε μM του EGF που εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά].



Εικόνα 6. Απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης της καρκινικής σειράς MAC31 [RTV-σχετικός νεοπλασματικός όγκος σε σχέση με το χρόνο (ημέρες), ανάλογα με τη συγκέντρωση σε μM του EGF που εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά].

εξήγηση ήταν ότι τα κακοήθη κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν δικούς τους παράγοντες ανάπτυξης και, παράλληλα, διαθέτουν λειτουργικούς υποδοχείς γι’αυτούς, μηχανισμός ο οποίος ονομάστηκε αυτοκρινής έκκριση.¹⁶

Αυτός ο μηχανισμός σαφώς μπορούσε να παράσχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα, με την έννοια ότι τα καρκινικά κύτταρα θα έχουν πιθανώς λιγότερη ανάγκη από εξωγενείς παράγοντες για την ανάπτυξή τους απ' ό,τι οι φυσιολογικοί ιστοί. Η αυτοέκκριση περιγράφηκε αρχικά από τους De Larco και Todaro το 1978¹ σε κύτταρα αρουραίων που είχαν μεταλλαχθεί από τον ιό του σαρκώματος. Το μείγμα των πολυπεπτιδίων που εξέκριναν τα κύτταρα αυτά περιείχε παράγοντες δομικά συγγενείς με τον παράγοντα EGF και ονομάζεται transforming growth factor-alpha (TGF-α). Ο μηχανισμός εκκίνησης που ενεργοποιείται από έναν αυτοεκκριτικό αναπτυξιακό παράγοντα μπορεί επίσης να προκαλέσει αρνητική αναπτυξιακή ανταπόκριση ή, με άλλα λόγια, να δράσει ως «το πόδι στο φρένο» παρά το «πόδι στο γκάζι». Το καλύτερο γνωστό παράδειγμα αρνητικού αναπτυξιακού παράγοντα είναι ο transforming growth factor-beta (TGF-β). Στην πραγματικότητα, ο TGF-β είναι ένας πολυλειτουργικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιεί την αύξηση σε μερικά κύτταρα, ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη σε άλλα. Έτσι, όλοι οι αναπτυξιακοί παράγοντες έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, πολύ πιο ευρύ απ' ό,τι υπονοεί το ίδιο το όνομά τους.

Πληθυσμός των EGF-r στον ορθοκολικό καρκίνο πειραματοζώων που ελέγχθηκαν με "single point screening assay"

Υπερέκφραση του EGF-r στις νεοπλασίες στον άνθρωπο.

Ο πρόδρομος των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων είναι ο υποδοχέας του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (EGF-r). Ο EGF-r δεν είχε κλωνοποιηθεί μέχρι το 1984.⁷ Η διέγερσή του προάγει το διπλασιασμό του DNA, ο οποίος ακολουθείται από κυτταρική διαίρεση. Το σύστημα αυτό φαίνεται ότι εξασκεί τη σημαντικότερη επίδραση στην ανάπτυξη των επιθηλιακών και πιθανόν και άλλων ειδών κυττάρων. Δύο γονίδια έχουν αναγνωρισθεί ως σχετιζόμενα δομικά και λειτουργικά με τον EGF-r, και αφού το γονίδιο του EGF-r μερικές φορές ονομάζεται c-erb-1, τα γονίδια αυτά έχουν ονομαστεί c-erb2 και c-erb-3. Η πρώτη επίδειξη της υπερέκφρασης των EGF-r πραγματοποιήθηκε από τους Hendler και Ozanne το 1984,¹⁷ κάνοντας χρήση ενός ραδιοσημασμένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του EGF-r καθώς και αυτοραδιογραφίας ιστών καρκίνου του πνεύμονα. Από τότε, αυξημένη έκφραση των EGF-r έχει πιστοποιηθεί σε πολλούς καρκίνους στον άνθρωπο, όπως στο 40% των περιπτώσεων γλοιοβλαστώματος και σε μικρότερο ποσοστό σε περιπτώσεις σβανωμάτων, επενδυμμάτων, μυελοβλαστωμάτων και υποφυσιακών αδενωμάτων,^{18,19} καρκίνων από πλακώδες επιθήλιο και αδενοκαρκινωμάτων πνεύμονα,^{20,21} διηθητικών καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης,²² αδενοκαρκινωμάτων του στομάχου,²³ καρκίνων

του μαστού,²⁴ όγκων κεφαλής και τραχήλου,²⁵ καρκίνων του οισοφάγου²⁶ και γυναικολογικών καρκίνων.²⁷

Επίπονη έρευνα, εξάλλου, έχει πραγματοποιηθεί από διάφορους ερευνητές για να βρεθεί εάν υπάρχει σχέση μεταξύ υπερέκφρασης των EGF-r και ενίσχυσης του πρωτο-ογκογονιδίου c-erb2 στο γαστρικό καρκίνο.²⁸ Υπερέκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου c-erb2 ανιχνεύτηκε στο 26% όλων των περιπτώσεων καρκίνου, συχνότερα στις εντερικού τύπου (53%) απ' ό,τι στις διάχυτες (8%). Επίσης, διαπιστώθηκε σχέση με το στάδιο του όγκου ή τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, όχι όμως με το μέγεθος του όγκου ή με τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του (εξωφυτικός ή διηθητικός). Υπερέκφραση των EGF-r ανιχνεύτηκε στο 18% των γαστρικών καρκίνων και όπως και με το c-erb2 ήταν συχνότερος στους καρκίνους εντερικού τύπου (27%) έναντι των διάχυτων (12%). Επίσης, δεν υπήρχε συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου. Ο βαθμός διαφοροποίησης δεν συσχετιζόταν και στις δύο περιπτώσεις, ωστόσο άλλοι ερευνητές έχουν ανιχνεύσει υπερέκφραση των EGF και EGF-r σε γαστρικούς καρκίνους στον άνθρωπο που παρουσιάζουν μεγάλη διηθητικότητα μακρο- και μικροσκοπικά, χαμηλή διαφοροποίηση και διήθηση.²⁹ Πάντως, ποτέ δεν βρέθηκαν EGF-r σε πρώιμους γαστρικούς καρκίνους.³⁰ Αυτό μάλλον εξηγείται από το γεγονός ότι η υπερέκφραση των c-erb2 και EGF-r συμβαίνει αργότερα κατά την ανάπτυξη του όγκου. Εδώ, είναι σημαντικό να λεχθεί ότι η υπερέκφραση και των δύο πρωτο-ογκογονιδίων του γαστρικού καρκίνου σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση απ' ό,τι εάν υπερεκφράζεται³¹ μόνο ένα από τα δύο.

Έκφραση των EGF-r στον ορθοκολικό καρκίνο πειραματοζώων και ρυθμός ανάπτυξης του όγκου. Μέτριες έως καλά διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος στον άνθρωπο παρουσιάζουν υπερέκφραση των EGF-r, ενώ αδιαφοροποίητες σειρές, όπως αποδεικνύεται μετά από Western transfer ή EGF-r binding assays.³² Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για τον πληθυσμό των EGF-r σε σχέση με το ρυθμό ανάπτυξης του ορθοκολικού καρκίνου. Τα περισσότερα αποτελέσματα όσον αφορά στη σχέση μεταξύ του πληθυσμού των EGF-r και των χαρακτηριστικών του όγκου (ιστολογικός τύπος, βαθμός διαφοροποίησης, μακροσκοπική εμφάνιση) έχουν παραχθεί από τη μελέτη κυτταρικών σειρών με τη χρήση binding assays και ανθρώπινων χειρουργικών παρασκευασμάτων με τη χρήση ανοσοχημικών μεθόδων. Η σειρά του ορθοκολικού καρκίνου κατά MAC, σύμφωνα με το πρότυπο κατά Bradford, αποτελεί ένα άριστο πειραματικό μοντέλο που είναι εύκολα αναπαραγωγίσιμο και παράγει κυτταρικές και συμπαγείς καρκινικές σειρές οι οποίες διατηρούν τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά διαμέσου γενεών μετά από μεταμόσχευσή τους. Αποφασίστηκε ότι στην παρούσα

ερευνητική εργασία θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα όγκων που να παρέχουν επίσης ευρύ φάσμα αναπτυξιακών ρυθμών (χρόνων διπλασιασμού). Οι ταχέως αναπτυσσόμενοι όγκοι MAC15 και MAC15A S/C έχουν χρόνο διπλασιασμού 3 και 1,3 ημέρες, αντίστοιχα, ο όγκος MAC29 έχει χρόνο διπλασιασμού 3,3 ημέρες και οι βραδέως αναπτυσσόμενοι όγκοι MAC30T και MAC31 έχουν χρόνο διπλασιασμού της μάζας τους 5,3 και 8 ημέρες, αντίστοιχα. Όλοι οι συμπαγείς όγκοι είναι καλώς διαφοροποιημένοι, εκτός από το MAC15A S/C, που αν και προέρχεται από τη σειρά MAC15 είναι αδιαφοροποίητος. Οι σειρές MAC15A ip και MAC15A T/C είναι κυτταρικές, προερχόμενες επίσης από το MAC15, η μεν πρώτη μετά από ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό, η δε δεύτερη σε ιστοκαλλιέργεια. Ο χρόνος διπλασιασμού αυτών των δύο κυτταρικών σειρών είναι 1,2 και 0,9 ημέρες, αντίστοιχα. Ο αριθμός των EGF-r είναι μεγαλύτερος στη σειρά MAC15A S/C (κατά μέσον όρο 50,33 fmoles/mg μεμβρανικής πρωτεΐνης) και μικρότερος στη σειρά MAC31 (κατά μέσον όρο 11,78 fmoles/mg μεμβρανικής πρωτεΐνης). Στο μέσο της κλίμακας των συμπαγών όγκων βρίσκονται οι σειρές MAC15, MAC29 και MAC30T (με πληθυσμό των EGF-r 45,02, 27,91 και 21,69 fmoles/mg μεμβρανικής πρωτεΐνης, αντίστοιχα).

Οι σταθερές αποκλίσεις υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε μετά από υπολογισμό του σταθερού σφάλματος (standard error, SE) και upper and lower 95% confidence limits (CL) της κάθε σειράς, δηλαδή:

$$95\% \text{ confidence limits} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \times 1,96 \text{ ή } SE \times 1,96$$

όπου SD παριστάνει τη σταθερή απόκλιση, SE το σταθερό σφάλμα και n τον αριθμό των δειγμάτων κάθε σειράς που χρησιμοποιήθηκαν. Η σημαντικότητα εκφράστηκε στο επίπεδο του 5% και 1%, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο one way analysis of variance ακολουθούμενη από το Fisher's LSD multiple comparison test με τη χρήση NCSS (number cruncher statistical system, Hintze JL, Utah, USA). Ανασκοπώντας τα αποτελέσματα, είναι σαφές ότι υφίσταται μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ της έκφρασης των EGF-r στις κυτταρικές μεμβράνες των συμπαγών όγκων και του χρόνου διπλασιασμού της μάζας τους, δηλαδή όταν ο χρόνος διπλασιασμού των όγκων αυξάνει ο πληθυσμός των EGF-r μειώνεται. Η εικόνα 4 συμπυκνώνει αυτό το συμπέρασμα.

Η επίδραση του περικυτταρικού περιβάλλοντος στην έκφραση των EGF-r. Η έρευνα αυτή παρέχει ενδείξεις ότι το περιβάλλον ενός ιστού ξενιστή ενδέχεται να επηρεάσει την ανάπτυξη της σειράς MAC15A ip, που βρίσκεται μεταμ-φυτευμένη στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στο περιβάλλον

αυτό, ο όγκος αναπτύσσεται με τη μορφή πολλαπλών συμπαγών όζων. Έτσι, παράγοντες που επηρεάζουν την αρχική εγκαθίδρυση των μικροσπηλών της σειράς MAC15 μπορεί να είναι παρόμοιοι με εκείνους που επηρεάζουν την ικανότητα ενός μεταστατικού καρκίνου να αναπτύσσεται όταν έχει απομακρυνθεί από την κυκλοφορία και έχει εγκατασταθεί σε απομακρυσμένο σημείο του σώματος. Σε προγενέστερες μελέτες έχει δειχθεί ότι καρκινικά κύτταρα μετά από αιματογενή διασπορά παρουσιάζουν εκλεκτική ανάπτυξη στο όργανο όπου εγκαθίστανται. Ο EGF μπορεί να έχει προκαλέσει ενεργοποίηση της ανάπτυξης του μεταστατικού όγκου και επομένως αυξημένο καταβολισμό των EGF-r στη σειρά MAC15A ip διαμέσου διαφόρων μηχανισμών. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο EGF των καρκινικών κυττάρων που εκκρίνεται στο μεταστατικό περιβάλλον επιδρά άμεσα στην ανάπτυξη της σειράς MAC15A ip *in vivo* και αυτό ακριβώς παρέχει ένα σαφές πλεονέκτημα στην κυτταρική ανάπτυξη. Επειδή, όπως έχει καταδειχθεί από άλλους ερευνητές,³² η ανάπτυξη ενδοπεριτοναϊκών όγκων υποβοηθείται σε μεγάλο βαθμό σε περιτόναιο πλούσιο σε λευκοκύτταρα, ο εμπλεκόμενος EGF μπορεί να προέρχεται από αυτή την πηγή. Εξάλλου, άλλες πηγές, όπως τα αιμοπετάλια ή τα μακροφάγα, μπορεί να αποτελούν εναλλακτικές πηγές EGF. Γεγονός είναι ότι δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση του περικυτταρικού περιβάλλοντος στην έκφραση των EGF-r. Οι υπάρχουσες πληροφορίες αναφέρονται στην έκφραση των EGF-r σε καρκινικά κύτταρα γαστρικού τοιχώματος σε σχέση με την έκφρασή τους στους επιχώριους λεμφαδένες. Η εξήγηση γι' αυτό είναι ότι πιθανόν ένας κυτταρικός κλώνος με αυξημένη έκφραση EGF-r έχει μεταναστεύσει στις μεταστατικές εστίες.³³ Ωστόσο, είναι εξίσου πιθανό ότι τοπικοί παράγοντες στον επιχώριο λεμφαδένα «ρυθμίζουν» την έκφραση των EGF-r. Έτσι, στην παρούσα έρευνα, όπου τα ίδια κύτταρα που αναπτύσσονται ενδοπεριτοναϊκά, υποδορίως ή σε ιστοκαλλιέργεια εκφράζουν πολύ διαφορετικό πληθυσμό EGF-r, είναι πιθανόν ότι αντιδρούν διαφορετικά σε «περιβαλλοντικά» άγνωστα σήματα που επηρεάζουν το mRNA των EGF-r σε επίπεδο κυτταρικού πυρήνα. Αυτή η υπόθεση απομένει να διερευνηθεί και σε άλλες έρευνες, πάντως στη συγκεκριμένη έρευνα τα αποτελέσματα της καρκινικής σειράς MAC15A σε διαφορετικά «περιβάλλοντα» έδειξαν διαφορετικό πληθυσμό EGF-r, όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Σημειωτέον ότι οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές και στα δύο επίπεδα (P=0,05 και P=0,01).

Επίδραση της ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης EGF στο ρυθμό ανάπτυξης των σειρών MAC15A S/C και MAC31

Η κυτταρική μεμβράνη παίζει έναν πολύ σημαντικό

ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ εξωκυττάριου και ενδοκυττάριου περιβάλλοντος και αντίστροφα. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολύ εξειδικευμένα συστατικά στην κυτταρική μεμβράνη, τα οποία έχουν ως λειτουργία τη διαδικασία της μεταφοράς. Από τη μια πλευρά, μεταβολίτες και ιόντα μπορούν να διέλθουν άμεσα μέσα από κανάλια ή να μεταφερθούν συνδεδεμένα με πρωτεΐνες. Από την άλλη, ειδικές εξωκυτταρικές ουσίες είναι δυνατόν να δώσουν γένεση σε ενδοκυτταρικές λειτουργίες χωρίς να χρειάζεται να περάσουν την κυτταρική μεμβράνη. Αυτοί οι παράγοντες, όπως νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και παράγοντες ανάπτυξης, αναγνωρίζονται ειδικά και εκλεκτικά στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Στην περίπτωση του EGF-r, η πρόκληση από αυτόν των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του σήματος που παράγεται από την στην κυτταρική μεμβράνη ευρισκόμενη EGF-r-τυροσινική-κινάση. Η οδός που προκαλεί μια κυτταρική αντίδραση είναι προφανές ότι υπόκειται και σε ανάδρομη ρύθμιση (feedback). Έτσι, η κυτταρική αντίδραση που προκαλείται από έναν υποδοχέα μπορεί να ρυθμιστεί από το feedback και να οδηγηθεί σε διακοπή της. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση ενός β-αδρενεργικού υποδοχέα όταν αυτός καταλαμβάνεται από κατεχολαμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του κυττάρου σε αδρενεργικά ερεθίσματα.

EGF εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε πειραματόζωα που είχαν MAC15A S/C και MAC31, ως αντιπρόσωπους του μεγαλύτερου και του μικρότερου πληθυσμού EGF-r, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις του EGF ήταν 0,5, 2,5 και 5 μM . Οι καμπύλες ανάπτυξης της σειράς MAC15A S/C έδειξαν σαφώς αναστολή της ανάπτυξης αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του EGF. Έτσι, η αναστολή της ανάπτυξης που παρατηρήθηκε μετά από την έγχυση 0,5 μM EGF ήταν η μεγαλύτερη, ενώ η μικρότερη παρατηρήθηκε μετά από την έγχυση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης (5 μM) EGF (εικ. 5). Αναστολή ανάπτυξης παρατηρήθηκε επίσης μετά από έγχυση 5 μM EGF στη σειρά MAC31, ενώ επιτάχυνση της ανάπτυξης παρατηρήθηκε όταν εγχύθηκαν 0,5 και 2,5 μM (εικ. 6). Είναι ήδη γνωστό ότι ο EGF σε συγκεντρώσεις από 3–100 μM εξασκεί μιτωτική δράση στην A431 επιδερμοειδή καρκινική κυτταρική σειρά, ενώ σε συγκεντρώσεις 3 nM προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης της ίδιας σειράς.³⁴ Αυτή η φαινομενικά παράδοξη επίδραση εξηγείται από το γεγονός ότι οι EGF-r αυτής της σειράς μπορεί να είναι ετερογενείς, με ένα μέρος από το σύνολο να έχει εκλεκτική συγγένεια στην πρόοδο της ανάπτυξης. Ταχεία ενδοκυττάρια μεταφορά του συμπλέγματος EGF-EGF-r ακολουθεί μετά από την προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης EGF, αλλά το ίδιο δεν παρατηρείται μετά από την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων EGF.³⁵ Ταχεία ενδοκυττάρια μεταφορά του

συμπλέγματος EGF-EGF-r έχει συνδεθεί με την κατάληψη του 20–30% των υποδοχέων και συνακόλουθα την έναρξη της φωσφορυλίωσής τους.³⁶ Φαίνεται ότι στην περίπτωση μας η επιτάχυνση της ενδοκυττάριας μεταφοράς των υψηλής συγγένειας EGF-r στη σειρά MAC15A S/C μετά από εξωγενή έγχυση EGF είχε ως αποτέλεσμα τα νεοπλασματικά κύτταρα να ανταποκρίνονται λιγότερο στον EGF που παράγεται από αυτά μέσω του μηχανισμού της αυτοέκκρισης. Είναι όμως αδιευκρίνιστο γιατί η αναστολή ανάπτυξης της σειράς MAC15A S/C μετά από έγχυση 5 μM EGF είναι μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε μετά από έγχυση 0,5 μM EGF. Είναι πολύ πιθανόν τα διαφορετικά αποτελέσματα των οδών της ενδοκυττάριας ενεργοποίησης του συμπλέγματος EGF-EGF-r να έχουν παίξει κάποιο ρόλο στη συνακόλουθη έκλυση διαφορετικών αντιδράσεων της κυτταρικής ανάπτυξης. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ενδοπεριτοναϊκή οδός που επιλέχθηκε για την έγχυση του εξωγενούς EGF μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα μικρότερες από τις απαιτούμενες ποσότητες να έφθασαν τελικά στους όγκους. Κι αυτό, γιατί λογικά ο εξωγενής EGF θα πρέπει να δεσμεύτηκε πρώτα από τους τοπικούς υποδοχείς του περιτοναίου και κατόπιν από το ήπαρ μετά από την είσοδό του στην πυλαία κυκλοφορία. Το αποτέλεσμα θα ήταν μάλλον εντονότερο εάν ο εξωγενής EGF είχε ενεθθεί άμεσα στα νεοπλασματικά οζίδια.

Συμπερασματικά, ο ορθοκολικός καρκίνος είναι η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου παγκοσμίως από καρκίνο.³⁷ Καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμα αποτελεσματική συστηματική θεραπεία, οι παρούσες διαγνωστικές δυνατότητες ανιχνεύουν λιγότερους από τους μισούς καρκίνους που είναι χειρουργικά ιάσιμοι. Η υπερέκφραση των EGF-r, η οποία ενδεχομένως παίζει κάποιο ρόλο στην καρκινογένεση, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μια πιθανή θεραπευτική μέθοδος μέσω ορμονο- ή ανοσοθεραπείας.

Οι πιθανές θεραπευτικές παρεμβάσεις που έχουν άμεση σχέση με την υπερέκφραση των EGF-r στον ορθοκολικό καρκίνο θα μπορούσαν να συνοψιστούν στα εξής: στοχοποίηση των υποδοχέων με τοξίνες, χρήση εκλεκτικών EGF-r αντισωμάτων, χρήση αναστολέων της τυροσινικής κινάσης. Με τη μεγάλη πρόοδο της μοριακής γενετικής και την περιγραφή αρκετών ογκογονιδίων είναι πλέον δυνατή η ανίχνευση ασθενών υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου. Η υπερέκφραση των EGF-r στα καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Η συσχέτιση των EGF-r με τη διηθητικότητα ή την εξάπλωση του καρκίνου μπορεί να δικαιολογήσει την εφαρμογή θεραπειών που στοχεύουν στη διαμόρφωση της δράσης αυτών των υποδοχέων. Πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας αναφορικά με τη σχέση των EGF-r

και του χρόνου διπλασιασμού τους, την επίδραση του περικυτταρικού περιβάλλοντος στην υπερέκφραση των EGF-r και την αναστολή της νεοπλασματικής ανάπτυξης μετά από εξωγενή χορήγηση EGF, είναι αρκετά σημαντικά

σε αυτές τις πειραματικές σειρές ορθοκολικών καρκίνων σε ποντίκια. Ωστόσο, ένα κρίσιμο ερώτημα παραμένει και πρέπει κάποτε να απαντηθεί: Είναι όλα αυτά τα ευρήματα συμβατά και με τον ορθοκολικό καρκίνο στον άνθρωπο;

ABSTRACT

Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-r) and the effects of exogenous intraperitoneal infusion of EGF on growth rates in murine adenocarcinoma of the colon

P. BOULOUGOURIS, G. KONSTADOUDAKIS, S. CHRISTODOULOU, G. GIANNOPOULOS, K. PETROPOULOU, D. SABANIS, M. SAFIOLEAS

4th Department of Surgery, University of Athens, Medical School, "Attikon" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(5):634–646

OBJECTIVE To investigate the correlation between epidermal growth factor receptor (EGF-r) expression and growth rates in colon cancer, and the effects of exogenous intraperitoneal infusion of EGF on growth rates in murine adenocarcinoma of the colon. **METHOD** Seven well characterised sterile tumor solid and cell lines were used. These tumors were induced by injecting NMRI mice with 1,2-dimethylhydrazine, a known carcinogen producing colon cancer. Fragments of the primary tumors were then transplanted into hosting NMRI mice intraperitoneally and subcutaneously, and grown in tissue culture to produce a panel of tumors of different histology and growth characteristics (MAC15, MAC15A ip, MAC15A T/C, MAC15A S/C, MAC29, MAC30T, MAC31). The volume doubling times varied between 0.9 days (MAC15A T/C cells) and 8.0 days (MAC31 solid line). These tumors were originally produced in the Bradford Oncology Unit, Bradford University, UK, and transferred to the Medico-Biology Research Center of the Academy of Athens, Greece. EGF-r single point screening assay and Scatchard analysis of the binding data were made on the MAC lines. **RESULTS** The results clearly showed an inverse relationship between EGF-r expression and doubling times of the solid lines. MAC15A lines also showed different EGF-r expression, a finding that raises the possibility that EGF-r expression is strongly influenced by environmental changes. Exogenous intraperitoneal infusion of 5 μ M EGF induced inhibition of growth of the rapid growing MAC15A S/C and the same dose also resulted in inhibition of growth of the slow growing MAC31. **CONCLUSIONS** Colorectal cancer is the second leading cause of death from cancer world wide. There is no effective systemic therapy and current diagnostic techniques find fewer than half of the cases early enough to be cured by surgery. Since over-expression of EGF-r may play a role in carcinogenesis, it could be used as a possible therapeutic method through immuno- or hormonal therapy.

Key words: EGF receptors, Mouse adenocarcinoma of the colon-MAC, Pericellular environment

Βιβλιογραφία

1. TODARO GJ, De LARCO JE. Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75:4147–4154
2. SPORN MB, TODARO GJ. Identifying tumour suppressor genes in human colorectal cancer. *Science* 1980, 247:12–13
3. SHOYAB M, PLOWMAN GD, McDONALD VL, BRADLEY JG, TODARO GJ. Structure and function of human amphiregulin – a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989, 243:1074–1076
4. CARPENTER G, COHEN S. Epidermal growth factor (mini review). *J Biol Chem* 1979, 56:7709–7712
5. CARPENTER G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptides. *Annu Rev Biochem* 1987, 56:881–914
6. LIN CR, CHEN WS, KRUIJER W, STOLARSKY LS, WEBER W, EVANS RM ET AL. Expression cloning of human EGF receptor complementary DNA: Gene amplification and three related mRNA products in A431 cells. *Science* 1984, 24:843–848
7. ULLRICH A, COUSSENS L, HAYFLICK JS, DULL TJ, GRAY A, TAM AW ET AL. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984, 309:418–425
8. XU YH, ISHI HS, CLARK AJL, SULLIVAN M, WILSON RK, MA DP ET AL. Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNA's overproduced in A431 carcinoma cells. *Nature* 1984, 309:806–810
9. HUNTER T, COOPER JA. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tu-

- mour cells. *Cell* 1981, 24:741–752
10. MAYES EL, WATERFIELD MD. Biosynthesis of the epidermal growth factor receptor in A431 cells. *EMBO J* 1984, 3:531–537
 11. GREENFIELD C, HILES I, WATERFIELD MD. Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the extracellular domain of its receptor. *EMBO J* 1989, 8:114–123
 12. YARDEN Y, SCHLESSINGER J. Self-phosphorylation as epidermal growth factor receptor: Evidence for a model of intracellular allosteric activation. *Biochemistry* 1987, 26:1434–1442
 13. MARGOLIS B, RHEE SG, FELDER S. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II; a potential mechanism for EGF receptor signalling. *Cell* 1989, 57:1101–1110
 14. HAASE P, COWEN DM, KNOWLES JC, COOPER EH. Evaluation of dimethylhydrazine induced tumors in mice as a model system for colorectal cancer. *Cancer* 1973, 28:530–543
 15. DOUBLE JA, BIBBY M. Chemotherapy of transplantable adenocarcinomas of the colon in mice. Development and characterization of an ascetic line. *Cancer Treatment Reports* 1978, 62:85–90
 16. SPORN MB, ROBERTS AB. Autocrine growth factors are multifactorial. *Nature* 1988, 332:217–219
 17. HENDLER FJ, OZANNE BW. Squamous cell cancers express increased EGF receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 48:673–679
 18. LIBERMAN T, NUSBAUM H, RAZON N. Nerve growth factor I: a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature* 1985, 317:632–643
 19. WONG AJ, BIGNER SH, BIGNER DD, KINZLER KW, HAMILTON SR, VOGELSTEIN B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:6899–6903
 20. SOBOL RE, ASTARITA RW, HOFEDITZ C, MASUI H, FAIRSHTER R, ROYSTON I ET AL. Epidermal growth factor receptor expression in human lung carcinomas defined by a monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1987, 79:403–407
 21. CASSEL D, ROTHENBEG P, ZHUANG Y, DEUEL T, GLASER L. Platelet-derived growth factor stimulates Na⁺/H⁺ exchange and induces cytoplasmic alkalinization in NR6 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:6224–6228
 22. BERGER MS, GREENFIELD C, GULLICK WJ, HALEY J, DOWNWARD J, NEAL DE ET AL. Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. *Br J Cancer* 1987, 56:533–537
 23. YASUI W, SUMIYOSHI H, HATA J, KAMEDA T, OCHIAI A, ITO H ET AL. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988, 48:137–141
 24. SAINSBURY JR, FARNDON JR, SHERBET GV, HARRIS AL. Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 1985, 16:364–366
 25. HENDLER FJ, SHUM-SIU A, OESCHI M. Increased EGFR binding predicts a poor survival in squamous tumours. *Cancer Res* 1989, 7:347–351
 26. OZAWA S, UEDA M, ANDO N, ABE O, HIRAI M, SHIMIZU N. High incidence of EGF receptor hyperproduction in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Oral Surg* 1987, 39:333–337
 27. BAUKNECHT T, KOHLER M, JANZ I, PFLEIDERER A. The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterisation of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical and breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989, 115:193–199
 28. LEMOINE NR, JAIN S, SILVESTRE F. Amplification and over-expression of EGF receptor and c-erb2 in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990, 78:856–861
 29. SUGIYAMA K, YUTAKAY, MIYAZAKI I. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. *Cancer* 1989, 63:1557–1561
 30. YONEMURA Y, NIKOMIYA I, OHYAMA S, KIMURA H, YAMAGUCHI A. Immunoreactivity for c-erb-2 protein is an independent indicator of poor short term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1990, 67:2914–2918
 31. HARRIS AL, NICHOLSON S, SAINSBURY JRC, FARNDON J, WRIGHT C. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: Association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with new. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1989, 34:123–131
 32. DAVIES DE, FARMER S, WHITE J, SENIOR PV, WARNES SL, ALEXANDER P. Contribution of host derived growth factors to *in vivo* growth of a transplantable murine mammary carcinoma. *Br J Cancer* 1994, 70:263–269
 33. YASUI W, SUMIYOSHI H, HATA J, KAMEDA T, OCHIAI A, ITO H ET AL. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988, 48:137–141
 34. KING AC, CUATRECASAS P. Resolution of high and low affinity epidermal growth factor receptors. Inhibition of high affinity component by low temperature, cycloheximide, and phorbol esters. *J Biol Chem* 1982, 257:3053–3060
 35. DAS M, FOX CF. Molecular mechanism of mitogen action: Processing of receptor induced by epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75:2644–2648
 36. KAWAMOTO T, SATO D, SATO G, MENDELSOHN J. Growth stimulation of A431 cells by EGF: Identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:1337–1341
 37. STEELE DG, DAVIS S, YOW H, WONG JM, RIVERS EN, SUMMERHAYES IC ET AL. Alterations of gene expression in human colorectal cancer. *Arch Surg* 1990, 125:493–497
- Corresponding author:*
P. Boulougouris, 1 Rimini street, GR-124 62 Chaidari, Greece
e-mail: panboul@hotmail.com