

Νεοαγγειογένεση στο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης

Χ. Καλέκου, Δ. Μηλιαράς, Α. Καμάς

Neoangiogenesis in gallbladder carcinoma

Kalekou Chariklia, Miliaras Dimosthenis, Kamas Athanasios
Dept of Pathology, St Paul General Hospital of Thessaloniki

The aim of this study is the investigation of the association between the microvessel density (MVD) in the stroma of gallbladder carcinomas with the depth of invasion, the degree of differentiation and the expression of p53 protein and c-erbB2 oncogene protein expression by the tumor cells. Immunohistochemical staining with antibodies against Factor VIII RAg, p53 protein and c-erbB2 were performed on sections from 33 cases of gallbladder carcinoma. Significant increase of MVD was found with increasing depth of invasion ($p < 0.02$). No association of MVD with degree of differentiation and p53 and c-erbB2 protein expression was shown. The expression of p53 protein was significantly higher in advanced stage tumors ($p = 0.028$) and in moderately and well differentiated tumors ($p < 0.05$). It is concluded that MVD in carcinomas of the gallbladder increases progressively with increasing tumor invasiveness. This process appears to be unrelated with the expression of the c-erbB2 and p53 gene product. Both MVD increase and p53 protein expression seem to play a significant role in gallbladder carcinoma progression and to be associated with increased tumor aggressiveness.

Key words: neoangiogenesis, gallbladder carcinoma, p53 protein, FVIII RAg, c-erbB2

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να διερευνήσει τη σχέση της πυκνότητας των μικροαγγείων (ΠΜ) στο υπόστρωμα του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης (καΧΚ) με το βάθος διήθησης, το βαθμό διαφοροποίησης, την έκφραση της πρωτεΐνης p53 και την έκφραση του ογκογονιδίου c-erbB2. Χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές από 33 περιπτώσεις καΧΚ μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με αντι-FVIII RAg. Διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της ΠΜ ανάλογα με την αύξηση του βάθους διήθησης ($p < 0,02$). Δεν βρέθηκε σχέση της ΠΜ με το βαθμό διαφοροποίησης, την έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου p53 και του c-erbB2. Η έκφραση της p53

πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε όγκους προχωρημένου σταδίου ($p=0.028$) και σε όγκους με μέσου και χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση ($p<0.05$).

Συμπεραίνεται ότι η ΠΜ στο καΧΚ αυξάνεται προοδευτικά με την αύξηση της διηθητικότητας του όγκου. Η διεργασία αυτή δεν φαίνεται να σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου *p53* και του *c-erbB2*. Τόσο η αύξηση της ΠΜ όσο και η έκφραση της *p53* πρωτεΐνης πιθανότατα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καΧΚ σχετιζόμενες με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου.

Λέξεις-κλειδιά: νεοαγγειογένεση, καρκίνωμα χοληδόχου κύστης, πρωτεΐνη *p53*, FVIII_RAg, *c-erbB2*

Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί το συχνότερο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης σε ποσοστό άνω του 90% και συνήθως διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο.¹ Μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* και του γονιδίου *K-ras* πιθανότατα εμπλέκονται στην καρκινογένεση στη χοληδόχο κύστη και φαίνεται ότι σχετίζονται με αύξηση του βαθμού κυτταρικής ατυπίας, αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη διηθητικότητα.²⁻⁵ Η σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης του γονιδίου *c-erbB-2* σε καρκινώματα της χοληδόχου κύστης παραμένει ασαφής· μολονότι έχει προταθεί ότι πιθανότατα δρα συνεργικά με την έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου *p53* κατά τη νεοπλασματική εξαλλαγή.⁶

Πολυάριθμες μελέτες σχετικές με την αγγειογένεση στο υπόστρωμα διαφόρων όγκων έχουν δείξει ότι αποτελεί ουσιαστικό παράγοντα για την αύξηση και τη μεταστατική τους επέκταση. Επιπλέον για πολλούς όγκους έχει προταθεί ότι η πυκνότητα των μικροαγγείων στο υπόστρωμα του όγκου, ως έμμεσος δείκτης της αγγειογένεσης, σχετίζεται με το κλινικό αποτέλεσμα και αποτελεί προγνωστικό δείκτη ανεξάρτητης προγνωστικής σημασίας.⁷⁻¹⁰ Εξάλλου φαίνεται να υπάρχει επίσης σχέση της αγγειογενετικής δραστηριότητας, η οποία επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση και την ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων με μεταλλάξεις των γονιδίων *p53* και *K-ras*.¹¹⁻¹³ Ωστόσο για τη σημασία της αγγειογένεσης στο υπόστρωμα του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης υπάρχουν ελάχιστες και αντιφατικές πληροφορίες προερχόμενες από μελέτες Ιαπώνων ερευνητών.¹⁴⁻¹⁷ Σκοπός της μελέτης μας είναι να διερευνήσει τη σχέση της πυκνότητας των μικροαγγείων στο υπόστρωμα του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης με το βάθος διήθησης, το βαθμό διαφοροποίησης, την έκφραση της πρωτεΐνης του

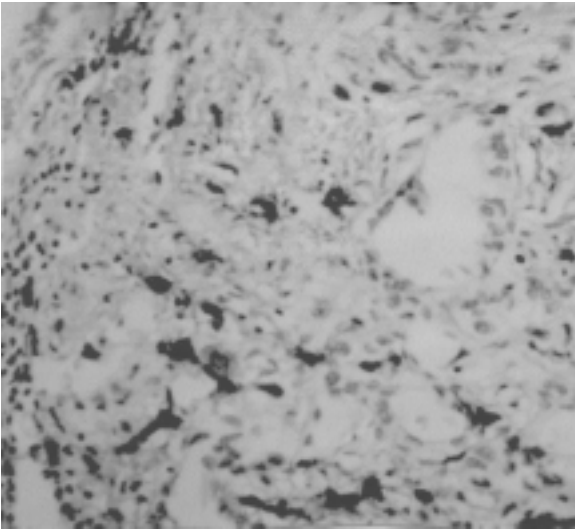
γονιδίου *p53* και την έκφραση της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου *c-erbB-2*, καθώς και την σχέση των δυο τελευταίων παραμέτρων με τη διαφοροποίηση και την διηθητικότητα του όγκου.

Υλικό και μέθοδοι

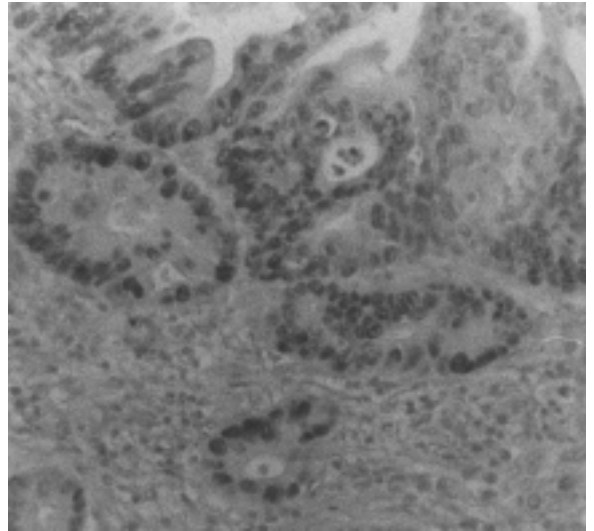
Μελετήθηκαν αναδρομικά ιστολογικές τομές παραφίνης από 33 περιπτώσεις καρκινώματος της χοληδόχου κύστης οι οποίες κατατάχθηκαν σε ομάδες ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης (καλή διαφοροποίηση: $n=14$ και μέτρια/χαμηλή διαφοροποίηση: $n=19$) και ανάλογα με το βάθος διήθησης (in situ/αρχόμενη διήθηση: $n=5$, διήθηση περιορισμένη μέσα στο τοίχωμα: $n=20$, και διήθηση επεκτεινόμενη και έξω από το τοίχωμα: $n=8$).

Η ανίχνευση της δετικότητας σε *p53* πρωτεΐνη και *c-erbB-2* έγινε ανοσοϊστοχημικά με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ως ακολούθως: anti-*p53* κλώνος DO-7, αραιώση 1:70 (YLEM, Ιταλία) και anti-*c-erbB-2* αραιώση 1:80 (Novocastra, Ηνωμένο Βασίλειο) με μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (Novostain kit, Novocastra). Αξιολογήθηκαν ως *p53* δετικές μόνο οι περιπτώσεις που παρουσίαζαν πυρηνική δετικότητα σε >5% των νεοπλασματικών κυττάρων. Όσον αφορά την έκφραση του ογκογονιδίου *c-erbB-2* αξιολογήθηκε τόσο η μεμβρανική, όσο και η κυτταροπλασματική δετικότητα.

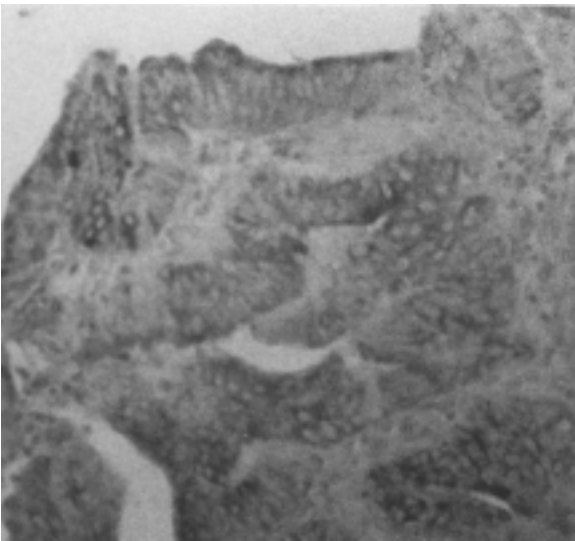
Η ανάδειξη των μικροαγγείων στο υπόστρωμα των όγκων έγινε μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου που σχετίζεται με τον παράγοντα VIII (FVIII_R-Ag, αραιώση 1:25, DAKO, Δανία). Η μέτρηση των μικροαγγείων έγινε ταυτόχρονα από δυο παρατηρητές σε μικροσκόπιο διπλής παρατήρησης. Μετά από επιλογή της περιοχής του όγκου με τη μεγαλύτερη πυκνότητα μικροαγγείων (microvessel hotspot) σε μικρή



Εικόνα 1. Καρκίνωμα χοληδόχου κύστης. Ανοσοϊστοχημική χρώση ενδοθηλίων με αντι-FVI-IRAg. X200



Εικόνα 2. Καρκίνωμα χοληδόχου κύστης. Ανοσοϊστοχημική πυρηνική χρώση με αντι-p53. X200



Εικόνα 3. Καρκίνωμα χοληδόχου κύστης. Ασθενής έως μέτρια μεμβρανική και κυτταροπλασματική χρώση με αντι-c-erbB2 X200

σφαίρια, β) αγγεία χωρίς μυϊκό τοίχωμα και γ) ομάδες κυττάρων δετικών σε FVIIIIRAg χωρίς εμφανή αυλό.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση του αριθμού των μικροαγγείων σε σχέση με τις διάφορες παραμέτρους (διαφοροποίηση, βάθος διήθησης, δετικότητα στο p53 και το c-erbB-2) χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Η στατιστική ανάλυση της αντίδρασης των καρκινωμάτων της χοληδόχου σε αντισώματα έναντι του p53 και του c-erbB-2, σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης και το βάθος διήθησης, έγινε με τη μέθοδο χ^2 .

Αποτελέσματα

Όλα τα in situ/αρχόμενα καρκινώματα (n=5) ήσαν αρνητικά σε p53 πρωτεΐνη, ενώ 50% των καρκινωμάτων με εκτεταμένη διήθηση του τοιχώματος ή/και των γύρω ιστών (n=28) ήσαν δετικά. Η μεταξύ των δυο αυτών ομάδων διαφορά ήταν σημαντική (p=0,028). Σημαντική ήταν και η διαφορά μεταξύ των καλής διαφοροποίησης καρκινωμάτων (n=14) τα οποία παρουσίαζαν p53 δετικότητα μόνο σε 20% των περιπτώσεων και των καρκινωμάτων με μέτρια/χαμηλή διαφοροποίηση (n=19) τα οποία παρουσίαζαν p53 δετικότητα σε 55% των περιπτώσεων

μεγέθυνση με κοινή συμφωνία των παρατηρητών, ο αριθμός των μικροαγγείων μετρήθηκε σε οπτικό πεδίο μεγέθυνσης 200X ανεξάρτητα από κάθε παρατηρητή. Σε όλες τις περιπτώσεις η απόκλιση στις μετρήσεις των δυο παρατηρητών ήταν ασήμαντη. Η περαιτέρω αξιολόγηση βασίσθηκε στη μεγαλύτερη μέτρηση κάθε περίπτωσης. Στη μέτρηση συμπεριλήφθηκαν: α) αγγεία με διάμετρο αυλού <10 ερυθρά αιμο-

($p < 0.05$).

Θετικότητα σε *c-erbB-2* παρατηρήθηκε σε 25% των καρκινωμάτων με καλή διαφοροποίηση και σε 29,4% των καρκινωμάτων με μέτρια/χαμηλή διαφοροποίηση. Θετικά σε *c-erbB-2* ήταν το 28,6% των *in situ*/αρχόμενων καρκινωμάτων και το 25% των καρκινωμάτων με διήθηση του μυϊκού τοιχώματος ή του τοιχώματος και των γύρω ιστών. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς την *c-erbB-2* θετικότητα δεν ήταν σημαντικές.

Ο αριθμός των μικροαγγείων στις διάφορες ομάδες φαίνεται στον πίνακα 1. Διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην πυκνότητα των μικροαγγείων μεταξύ των ομάδων με διαφορετικό βάθος διήθησης. Έτσι, τα *in situ*/αρχόμενα καρκινώματα είχαν μέσο όρο μικροαγγείων 11,8 ($\pm 5,9$), τα καρκινώματα με διήθηση περιορισμένη στο τοίχωμα 32,5 ($\pm 20,3$) και τα καρκινώματα με διηθητική επέκταση εκτός του τοιχώματος 53,2 ($\pm 14,2$). Αντίθετα, δεν βρέθηκε σχέση της πυκνότητας των μικροαγγείων με το βαθμό διαφοροποίησης, την έκφραση της πρωτεΐνης *p53* και την έκφραση του ογκογονιδίου *c-erbB-2*.

Πίνακας 1. Πυκνότητα μικροαγγείων στις διάφορες ομάδες και στατιστική αξιολόγηση των μεταξύ των διαφορών.

	<i>n</i>	AM0+/- SD	<i>p</i>
ΒΑΘΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ			
<i>In situ</i> /αρχόμενη	5	11,8+/-5,9	<0,05
Ενδοτοιχωματική	20	32,5+/-20,3	
Εξωτοιχωματική	8	53,2+/-14,2	
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ			
Καλή	14	32,7+/-25,7	Μ.Σ.
Μέτρια/χαμηλή	19	35,4+/-18,4	
<i>p53</i>			
Αρνητικό	19	30,6+/-20,9	Μ.Σ.
Θετικό	14	39,2+/-21,9	
<i>c-erbB-2</i>			
Αρνητικό	16	29,5+/-21,6	Μ.Σ.
Θετικό	7	24,4+/-12,5	

Συζήτηση

Ένα από τα χαρακτηριστικά των προνεοπλασματικών αλλοιώσεων σε σύγκριση με τις νεοπλασίες που προκύπτουν από αυτές είναι η απουσία νεοαγγειογένεσης.¹⁸ Η είσοδος της

εξεργασίας σε αγγειογενετική φάση ακολουθείται από αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου και από μεταστατική συμπεριφορά των κακοήδων όγκων.¹⁹ Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο φαίνεται ότι συμμετέχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή παραγόντων που σχετίζονται με την ευόδωση ή την αναστολή της αγγειογένεσης.^{19,20} Ειδικότερα έχει προσδιορισθεί ότι η υπερέκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF, ο οποίος προάγει την αγγειογένεση, σχετίζεται με μετάλλαξη των γονιδίων *K-ras* και *p53*.¹¹⁻¹³

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι τα *in situ* και πρώιμα καρκινώματα της χοληδόχου κύστης παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη αγγειογενετική δραστηριότητα από όγκους με αυξημένη διηθητικότητα και ότι οι όγκοι με ενδο- και εξωτοιχωματική επέκταση παρουσίαζαν σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητα μικροαγγείων από τους όγκους με ενδοτοιχωματική μόνο διήθηση, στοιχείο ενδεικτικό αυξημένης διηθητικότητας των όγκων σε σχέση με αυξημένη νεοαγγειογένεση. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με πρόσφατη μελέτη στην οποία η πυκνότητα των μικροαγγείων βρέθηκε να σχετίζεται με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, ενώ δεν είχε σχέση με τους ιστολογικούς χαρακτήρες του όγκου ή το κλινικό στάδιο.¹⁵ Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε σχέση της πυκνότητας των μικροαγγείων με την επιβίωση σε μονοπαραγοντική ανάλυση, χωρίς όμως η πυκνότητα των μικροαγγείων να επιβεβαιώνεται από πολυπαραγοντική ανάλυση ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας.¹⁵ Οι συγγραφείς οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η συμβολή της νεοαγγείωσης στην επέκταση του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης είναι ελάχιστη.

Οι Okita και συν¹⁶ και Yamamoto και συν¹⁴ επεχείρησαν προσέγγιση του δέματος της νεοαγγειογένεσης στο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης μέσω της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης του VEGF, ο οποίος θεωρείται ότι διεγείρει τη μιτωτική δραστηριότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κατατάσσεται ως ένας από τους σπουδαιότερους αγγειογενετικούς παράγοντες. Παρατήρησαν θετικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων σε VEGF σε 38% και 91% των περιπτώσεων αντίστοιχα. Στη μελέτη των Yamamoto και συν η έκφραση του VEGF βρέθηκε να σχε-

τίζεται ευθέως με την πυκνότητα των μικροαγγείων στο υπόστρωμα του όγκου, όχι όμως με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους όπως ο τύπος του όγκου, το στάδιο και η επιβίωση.¹⁴ Αντίθετα, οι Okita και συν διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές μεταξύ δετικών και αρνητικών σε VEGF ως προς το μέγεθος του όγκου, τη λεμφαγγειακή διήθηση και το στάδιο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του VEGF σχετίζεται με την προοδευτική εξέλιξη του όγκου.¹⁶ Το εύρημα αυτό συμφωνεί έμμεσα με το δικό μας εύρημα της αυξημένης διηθητικότητας των όγκων με την αύξηση της πυκνότητας των μικροαγγείων, η οποία πιθανότατα σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα του VEGF. Από τη μελέτη ενός άλλου αγγειογενετικού παράγοντα, του PD-ECGF/Θυμιδινοφωσφορυλάσης σε καρκινώματα της χοληδόχου κύστης προέκυψε απουσία συσχέτισης με την αγγειογένεση και σημαντική σχέση με το βάθος διήθησης, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και το στάδιο.¹⁷ Τα αντιφατικά αυτά ευρήματα πιθανότατα αντικατοπτρίζουν τη συμμετοχή και αλληλεπίδραση και άλλων αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων στη διεργασία της αγγειογένεσης στο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης. Μεταλλάξεις των γονιδίων *K-ras* και *p53* θεωρείται ότι συμμετέχουν στην αγγειογένεση, δρώντας ευοδωτικά στην αύξηση της έκφρασης του VEGF. Σε ορθοκολικούς όγκους για παράδειγμα, έχει βρεθεί σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητα μικροαγγείων σε *p53* και VEGF δετικούς όγκους.¹³ Μελέτη συσχέτισμού της έκφρασης της πρωτεΐνης του γονιδίου *p53* με την αγγειογένεση σε καρκινώματα της χοληδόχου κύστης δεν βρήκαμε στην προσιτή σε μας βιβλιογραφία. Στο δικό μας υλικό δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ *p53* δετικών και *p53* αρνητικών όγκων. Είναι πιθανό ότι η έκφραση της πρωτεΐνης *p53* στο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης δρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών στην εξέλιξη του όγκου και όχι διαμέσου της ευόδωσης της αγγειογενετικής δραστηριότητας.

Έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου *p53* στα καρκινώματα της χοληδόχου κύστης έχει βρεθεί σε ποσοστά που κυμαίνονται από 35% έως 65%.^{4,6,21,22} Η παρατηρούμενη προοδευτική αύξηση της έκφρασης της *p53* πρωτεΐνης από τις προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις στα διηθητικά καρκινώματα, φαίνεται πως σχετίζεται με τη συνήθη οδό ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος της χοληδόχου κύστης.²³ Από ορι-

σμένους συγγραφείς έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό δετικότητας σε *in situ* καρκινώματα και σε καρκινώματα σταδίου I, στοιχείο που θεωρήθηκε ενδεικτικό ότι μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* συμβάλλουν στην πρώιμη φάση της καρκινογένεσης στο βλεννογόνο της χοληδόχου κύστης.^{4,24} Ωστόσο, τόσο τα δικά μας ευρήματα όσο και άλλων ερευνητών⁶ υποδεικνύουν σημαντικά μεγαλύτερη δετικότητα σε προχωρημένους όγκους, καθώς και σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης. Σε μεγάλη μελέτη του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης στη Χιλή, όπου το καρκίνωμα αυτό αποτελεί ένα από τους συχνότερους όγκους, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης *p53* σε όγκους προχωρημένου σταδίου, καθώς και σε όγκους μέσου/χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης.²¹ Η συχνότερη έκφραση της πρωτεΐνης *p53* σε μέσου/χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης καρκινώματα δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την πρόγνωση.²²

Υπέρεκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου *c-erbB-2*, ενδεικτική της συμμετοχής του στην καρκινογένεση στη χοληδόχο κύστη, έχει παρατηρηθεί σε σημαντικό ποσοστό^{25,26}, ωστόσο δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης και το βάθος διήθησης, όπως διαπιστώσαμε και στη δική μας μελέτη. Επιπλέον δεν προέκυψε σχέση μεταξύ της υπέρεκφρασης του *c-erbB-2* και της αγγειογενετικής δραστηριότητας στο υπόστρωμα του όγκου.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η αύξηση της πυκνότητας των μικροαγγείων στο καρκίνωμα της χοληδόχου κύστης σχετίζεται με την αύξηση της διηθητικότητας του όγκου και ότι η διεργασία αυτή δεν σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης των γονιδίων *p53* και *c-erbB-2*. Φαίνεται όμως ότι τόσο η αύξηση της πυκνότητας των μικροαγγείων, όσο και η έκφραση της πρωτεΐνης *p53* παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκινώματος της χοληδόχου κύστης και σχετίζονται με αυξημένη επιδετικότητα του όγκου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Levin B. Gallbladder carcinoma Ann Oncol Suppl 4:129-130, 1999
2. Watanabe H, Date K, Itoi T, Matsubayashi H, Yokoyama N, Yamano M, Ajioka Y, Nishikura K. Histological and genetic changes in malignant transformation of gallbladder adenoma Ann Oncol Suppl 4:136-9, 1999

3. Matsubara T, Sakrai Y, Sasayama Y, Hori H, Ochiai M, Funabiki T, Matsumoto K, Hirono I. K-ras point mutations in cancerous and non-cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 77(8 Suppl):1752-7, 1996
4. Hanada K, Itoh M, Fujii K, Tsuchida A, Ooishi H, Kajiyama G. K-ras and p53 mutations in stage I gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Cancer* 77:452-8, 1996
5. Ohashi K, Tsumi M, Nakajima Y, Nakano H, Konishi Y. K-ras point mutations and proliferation activity in biliary tract carcinomas *Br J Cancer* 74:930-5, 1996
6. Kamel D, Paakko P, Nuorva K, Vahakangas K, Soini Y. p53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gallbladder. *J Pathol* 170:67-72, 1993
7. Weidner N, Semple PJ, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma *N Engl J Med* 324:1-8
8. Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996 78:226-231, 1991
9. Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Huget P et al: Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 79:316-322, 1999
10. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count : an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma *Mod Pathol* 9 :636-641, 1996
11. Rak J, Mitsushashi Y, Bayoko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55:4575-80, 1995
12. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of VEGF. *Oncogene* 9:963-9, 1994
13. Kang SM, Maeda K, Onoda N, Chung YS, Nakata B, Nishiguchi Y, Sowa M. Combined analysis of p53 and VEGF expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *Int J Cancer* 74:502-7, 1997
14. Yamamoto S, Fujii K, Kitadai Y, Yamamoto S, Tsuchida A, Kajiyama G. Expression of vascular endothelial growth factor in human gallbladder lesions. *Oncol Rep* 5:1065-9, 1998
15. Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, Noie T, Inoue K, Kubota K, Takayama T. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma. *Hepatogastroenterology* 46:1682-6, 1999
16. Okita S, Kondoh S, Shiraishi K, Kaino S, Hatanano S, Okita K. Expression of VEGF correlates with tumor progression in gallbladder cancer. *Int J Oncol* 12:1013-8, 1998
17. Yamamoto S, Kitadai Y, Tsuchida A, Sasaki T, Matsubara K, Kajiyama G. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/ thymidine phosphorylase in human gallbladder lesions. *Eur J Cancer* 36:257-63, 2000
18. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia *Nature* 339:58-61, 1989
19. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth . *Semin Cancer Biol* 3:65-71, 1992
20. Koura AN, van Golen K, Tsan R, Radinsky R, Price JE, Ellis LM. Regulation of genes associated with angiogenesis, growth and metastasis by specific point mutations in a murine melanoma cell line. *Oncol Rep* 4:475-9, 1997
21. Roa I, Villaseca M, Araya J, Roa J, de Aretxabal X, Melo A, Ibacache G p53 tumour suppressor gene protein expression in early and advanced gallbladder carcinoma. *Histopathology* 31:226-30, 1997
22. Washington K, Gottfried MR. Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* 16:99-104, 1996
23. Wistuba I, Gazdar AF, Roa I, Albores-Saavedra J. p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 27:360-5, 1996
24. Wee A, Tech M, Raju GC. Clinical importance of p53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *J Clin Pathol* 47:453-6, 1994
25. Chow NH, Huang SM, Chan SH, Mo LR, Hwang MH, Su WC. Significance of c-erbB-2 expression in normal and neoplastic epithelium of biliary tract. *Anticancer Res* 15:1055-9, 1995
26. Suzuki T, Takano Y, Kakita A, Okudaira M. An immunohistochemical and molecular biological study of c-erbB-2 amplification and prognostic relevance in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract* 189:283-92, 1993

Corresponding author:

Kalekou Chariklia,
PO Box 21013,
55510 Pylea, Thessaloniki

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Καλέκου Χαρίκλεια,
ΤΘ 21013,
55510 Πυλαία, Θεσσαλονίκη