



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της αγγειακής
μίμησης σε μελανοκυτταρικούς όγκους του οφθαλμού και της
περιοφθαλμικής περιοχής**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ
Οφθαλμίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της αγγειακής
μίμησης σε μελανοκυτταρικούς όγκους του οφθαλμού και της
περιοφθαλμικής περιοχής**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ
Οφθαλμίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σπηλιόπουλου Κωνσταντίνου: 14-3-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 764^α/17-6-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κίτσος Γεώργιος, Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Πέσχος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κυτταρική Φυσιολογία

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-7-2014

«Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της αγγειακής μίμησης σε μελανοκυτταρικούς όγκους του οφθαλμού και της περιοφθαλμικής περιοχής»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 818^α/7-7-2017

1. Κίτσος Γεώργιος, Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Καλογερόπουλος Χρήστος, Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Στεφανιώτου Μαρία, Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Πέσχος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Ράγκος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-9-2017

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ



Στη σύζυγό μου, Ζωή, και στα

δίδυμα αγγελούδια μου Θεόδωρο και Αικατερίνη

Πρόλογος

Η ικανότητα ενός νεοπλάσματος να αναπτύσσεται, εξαρτάται από την παροχή επαρκούς ποσότητας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών μέσω των νεοαγγείων. Η μικροαγγειακή πυκνότητα θεωρείται το gold standard για την εκτίμηση της νεοαγγείωσης των συμπαγών όγκων. Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης αναφέρεται στη δημιουργία αγγείων που επενδύονται από τροποποιημένα κύτταρα του όγκου και τα οποία συμβάλλουν στην αγγείωση των όγκων. Αν και υπάρχουν μελέτες που συγκρίνουν το βαθμό της αγγειογένεσης ανάμεσα σε δερματικά μελανώματα και σπίλους, η αναζήτησή μας στο PubMed δεν βρήκε κάποια μελέτη που να εστιάζει στην οφθαλμική περιοχή και πιο συγκεκριμένα να συγκρίνει την αγγειογένεση των ραγοειδικών μελανωμάτων με αυτή των σπίλων του οφθαλμού. Επιπλέον, αν και το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης έχει βρεθεί σε μια ποικιλία κακοήθων νεοπλασμάτων συμπεριλαμβανομένων των δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων, δεν έχει μελετηθεί σε καλοήθεις όγκους. Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της αγγειογένεσης και της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλοήθεις και κακοήθεις μελανοκυτταρικούς όγκους της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής.

Σε αυτόν τον πρόλογο, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Οφθαλμολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Γεώργιο Κίτσο, ο οποίος με παρότρυνε να πραγματοποιήσω και να ολοκληρώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή, η οποία εκπονήθηκε κάτω από τη δική του εποπτεία. Επίσης, με την ευκαιρία αυτή, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τον ιδιαίτερο ζήλο που επέδειξε ως Διευθυντής της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων στην εκπαίδευση των ειδικευομένων και κυρίως στη χειρουργική κατάρτισή τους.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ επίσης να εκφράσω:

Στην κ. Άννα Μπατιστάτου, Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για το αμέριστο ενδιαφέρον της και τις πολύτιμες συμβουλές της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Στον κ. Δημήτριο Πέσχο, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη μεγάλη βοήθεια και ώθηση που μου έδωσε για να καταφέρω να ολοκληρώσω αυτήν τη διατριβή.

Στον κ. Ιωάννη Ντούντα, Οφθαλμίατρο, Επιστημονικό Συνεργάτη του Πρώτου Τμήματος της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γ. Γεννηματάς», για τη βοήθειά του στην εύρεση ιστολογικών δειγμάτων από το Νοσοκομείο «Υγεία».

Στην κ. Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Παθολογοανατόμο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη βοήθειά της στην επιλογή των κατάλληλων ιστολογικών δειγμάτων από το αρχείο του Τμήματος Παθολογοανατομίας και για τις απαντήσεις της σε πολλές από τις απορίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Στον κ. Ιωάννη Σίμο, Κλινικό Διαιτολόγο και Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1-2
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΡΑΓΟΕΙΔΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	7-12
Επιδημιολογία-Αιτιολογία	7
Κλινικά χαρακτηριστικά-Διάγνωση	7-8
Ιστολογική ταξινόμηση	8-9
Προγνωστικοί παράγοντες-Σταδιοποίηση	9-10
Θεραπεία	10
Πρόγνωση	10-12
2. ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	13-18
Επιδημιολογία-Αιτιολογία	13
Κλινικά χαρακτηριστικά	13-14
Ιστολογικοί τύποι	14-15
Μιτωτικός ρυθμός	15-16
Προγνωστικοί παράγοντες-Σταδιοποίηση	17-18
Θεραπεία-Πρόγνωση	18
3. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ	19-20
4. ΣΠΙΛΟΙ ΕΠΙΠΕΦΥΚΟΤΑ	21-22
5. ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ	23-24
6. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	25-32
Γενικά-Ορισμοί	25-27
Μικροαγγειακή πυκνότητα	28-32
7. ΜΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	
(ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΜΙΜΗΣΗ)	33-56
Γενικά-Ορισμοί	33-36
Λειτουργική σημασία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	37-38

Ερευνητικά μοντέλα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	38-39
Χαρακτηριστικά των κυττάρων που επενδύουν τα κανάλια της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	39-41
Μόρια και κυτταρικά μονοπάτια της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	42-54
Κλινική σημασία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	55-56
ΣΚΟΠΟΣ	57-58
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	61-74
Ιστικά δείγματα	61-62
Ανοσοϊστοχημεία	62
Εκτίμηση μικροαγγειακής πυκνότητας	63-67
Καθορισμός ιστολογικού τύπου	68
Μέτρηση μιτώσεων	68-69
Προσδιορισμός της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης	69
Στατιστική ανάλυση	70-74
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75-84
Μικροαγγειακή πυκνότητα	75-79
Μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης	80-84
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	85-92
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93-94
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	95-96
6. ABSTRACT	97-98
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99-124

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΡΑΓΟΕΙΔΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Το 3% των κακοήθων μελανωμάτων εξορμούνται από τον οφθαλμό. Από τα μελανώματα του οφθαλμού, το 85% είναι ραγοειδικά.¹ Το ραγοειδικό μελάνωμα αποτελεί τον πιο συχνό πρωτοπαθή κακοήγη ενδοφθάλμιο όγκο στους ενήλικες. Το 80% των περιπτώσεων είναι μελανώματα του χοριοειδούς, με τα υπόλοιπα να αφορούν μελανώματα του ακτινωτού σώματος και λιγότερο συχνά της ίριδας. Η συχνότητα του ραγοειδικού μελανώματος στο δυτικό ημισφαίριο είναι 5-7.5 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού και ανά έτος, ενώ η μέση ηλικία της διάγνωσης είναι τα 60 έτη.² Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ραγοειδικού μελανώματος είναι η λευκή φυλή, το ανοιχτό χρώμα της ίριδας, οι πολλαπλοί δερματικοί σπίλοι, το σύνδρομο του δυσπλαστικού σπίλου (σύνδρομο οικογενούς μελανώματος), η συγγενής οφθαλμική μελανοκύττωση, και το χοριοειδικό μελανοκύττωμα.^{2,3} Τα περισσότερα ραγοειδικά μελανώματα εμφανίζουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια GNAQ και GNA11, τα οποία κωδικοποιούν την άλφα υπομονάδα της πρωτεΐνης Gq της συνδεόμενης με το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (guanine nucleotide-binding protein Gq subunit alpha).^{4,5,6} Οι πρωτεΐνες οι συνδεόμενες με το νουκλεοτίδιο της γουανίνης είναι μια οικογένεια ετεροτριμερών πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, οι οποίες συνδέουν υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με ενδοκυττάρια μονοπάτια που επιτελούν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ-ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το ραγοειδικό μελάνωμα μπορεί να ανακαλυφτεί κατά την οφθαλμολογική εξέταση ρουτίνας ή μπορεί να είναι συμπτωματικό. Το μελάνωμα του χοριοειδούς παρουσιάζεται συνήθως με θάμβος όρασης ή μυοψίες. Το μελάνωμα του ακτινωτού

σώματος μπορεί να παρουσιαστεί σαν οφθαλμική υπερτονία. Τα μελανώματα του χοριοειδούς έχουν συγκεκριμένα βυθοσκοπικά χαρακτηριστικά τα οποία βοηθούν στη διαφοροδιάγνωσή τους από τους σπίλους του χοριοειδούς καθώς και από άλλες νοσολογικές οντότητες. Η λεπτομερής περιγραφή αυτών των χαρακτηριστικών είναι πέρα από τους σκοπούς αυτής της εργασίας. Η κλινική διάγνωση του μελανώματος του χοριοειδούς (βυθοσκόπηση, φλουραγγειογραφία, αγγειογραφία με ινδοκυανίνη, υπερηχογραφία, μαγνητική τομογραφία) έχει ακρίβεια μεγαλύτερη από 99%.⁷ Συνεπώς η βιοψία και/ή εξαίρεση του όγκου για ιστοπαθολογική εξέταση δεν απαιτούνται για τη διάγνωσή του. Ο ραγοειδής δεν έχει λεμφαγγεία και έτσι οι μεταστάσεις γίνονται με αιματογενή διασπορά.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα μελανώματα του χοριοειδούς και του ακτινωτού σώματος έχουν 3 βασικούς κυτταρικούς τύπους: Τα ατρακτοειδή κύτταρα Α, τα ατρακτοειδή κύτταρα Β και τα επιθηλιοειδή κύτταρα. Τα ατρακτοειδή κύτταρα Α έχουν χαμηλό πηλίκο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα και μια κεντρική ράβδωση κατά μήκος του επιμήκους άξονα του πυρήνα. Τα ατρακτοειδή κύτταρα Β έχουν ένα μεγαλύτερο πηλίκο πυρήνα προς κυτταρόπλασμα και έναν επιμηκισμένο πυρήνα με ευδιάκριτο πυρηνίσκο. Οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες των ατρακτοειδών κυττάρων δεν διακρίνονται. Τα επιθηλιοειδή κύτταρα έχουν άφθονο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και ένα μεγάλο πυρήνα με εμφανή πυρηνίσκο. Οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες των επιθηλιοειδών κυττάρων διακρίνονται και ο εξωκυττάριος χώρος συχνά παρεμβάλλεται ανάμεσα στα κύτταρα. Οι όγκοι κατηγοριοποιούνται με τη χρήση μιας τροποποίησης της αρχικής ταξινόμησης κατά Callender και χωρίζονται σε σπίλο ατρακτοειδών κυττάρων (αποτελείται αποκλειστικά από ατρακτοειδή κύτταρα Α),

μελάνωμα ατρακτοειδών κυττάρων (τα ατρακτοειδή κύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι ατρακτοειδή κύτταρα Α, ατρακτοειδή κύτταρα Β ή μείγμα ατρακτοειδών κυττάρων Α και Β, αποτελούν >90% του συνόλου των κυττάρων του μελανώματος, ενώ τα επιθηλιοειδή κύτταρα αποτελούν <10% του συνόλου των κυττάρων), μελάνωμα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού (αποτελείται από >10% επιθηλιοειδή κύτταρα και <90% ατρακτοειδή κύτταρα) και μελάνωμα επιθηλιοειδών κυττάρων (αποτελείται από >90% επιθηλιοειδή κύτταρα και <10% ατρακτοειδή κύτταρα). Το μελάνωμα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού είναι το πιο συχνό είδος μελανώματος χοριοειδούς ή ακτινωτού σώματος, αποτελώντας το 45% των περιπτώσεων. Το μελάνωμα επιθηλιοειδών κυττάρων είναι ο πιο σπάνιος τύπος μελανώματος χοριοειδούς ή ακτινωτού σώματος αποτελώντας μόλις το 3% των περιπτώσεων. Σχεδόν όλα τα μελανώματα της ίριδας είναι μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων.^{2,8,9}

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ- ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Συγκεκριμένα ιστολογικά χαρακτηριστικά όπως ο μεγάλος αριθμός επιθηλιοειδών κυττάρων, ο μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων στην περιοχή του όγκου, ο μεγάλος αριθμός μιτώσεων ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγένθυσης και η παρουσία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες για το μελάνωμα του χοριοειδούς. Άλλοι αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ιδιαίτερα η μονοσωμία του χρωμοσώματος 3, οι γονιδιακές μεταλλάξεις των γονιδίων GNAQ και GNA11, η κατηγορία 2 του συνολικού γονιδιακού προφίλ του όγκου όπως αυτό απεικονίζεται μέσω της ανάλυσης μικροαλληλουχιών του γενετικού υλικού, το μεγάλο μέγεθος του όγκου, η επέκταση του όγκου πέρα από το σκληρό χιτώνα, οι πρόσθια επεκτεινόμενοι όγκοι οι

οποίοι διηθούν το ακτινωτό σώμα, η μεγάλη ηλικία κατά τη διάγνωση του όγκου, το άρρεν φύλο και η υποτροπή του όγκου.^{2,3,4,7}

Η σταδιοποίηση των ραγοειδικών μελανωμάτων δεν είναι ικανοποιητική. Η ακριβής χρήση του συστήματος σταδιοποίησης TNM απαιτεί παθολογοανατομική διάγνωση, η οποία συνήθως δεν εφαρμόζεται σε αυτούς τους όγκους.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η βραχυθεραπεία (ακτινοθεραπεία με επισκληρικές πλάκες) με Ρουθένιο-106 ή Ιόδιο-125 αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για τα μελάνωμα του χοριοειδούς. Σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιείται η εξωτερική ακτινοθεραπεία με φορτισμένα σωματίδια όπως το πρωτόνιο, η στερεοτακτική ακτινοθεραπεία και λιγότερο συχνά η διακορική θερμοθεραπεία, η διασκληρική χοροϊδεκτομή, η διααμφιβληστροειδική χοροϊδεκτομή, και η εκπυρήνωση (αφαίρεση του βολβού). Η συστηματική χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία και οι στοχευμένες θεραπείες δεν έχουν βρει μέχρι σήμερα κάποια θέση στην αντιμετώπιση του μελάνωματος του χοριοειδούς.^{2,7,10}

Αρκετά από τα μελάνωμα του ακτινωτού σώματος αντιμετωπίζονται με ιριδοκυκλεκτομή, ενώ πολλά από τα μελάνωμα της ίριδας αντιμετωπίζονται με ιριδεκτομή ή ιριδοκυκλεκτομή.²

ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα χοριοειδούς ή ακτινωτού σώματος δεν έχει αλλάξει τις τελευταίες 3 δεκαετίες (81.6%) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το προσδόκιμο επιβίωσης μάλλον δεν επηρεάζεται από την αποτελεσματικότητα της τοπικής θεραπείας. Το 34% των ασθενών με μελάνωμα χοριοειδούς ή ακτινωτού σώματος αναπτύσσει μεταστάσεις στα 10 χρόνια, ενώ η πιο συνηθισμένη εντόπιση

των μεταστάσεων είναι το ήπαρ (95%).⁷ Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο το 1-2% των ασθενών έχουν ανιχνεύσιμη μετάσταση κατά τη διάγνωση του μελανώματος του χοριοειδούς. Η πρόγνωση του μελανώματος της ίριδας είναι πολύ καλή με μόνο το 5% των ασθενών να αναπτύσσει μεταστάσεις στα 10 χρόνια.²

ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Το δερματικό μελάνωμα είναι ο 15^{ος} πιο συχνός κακοήθης όγκος παγκοσμίως, προσβάλλει κυρίως άτομα της λευκής φυλής, ενώ η συχνότητά του έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες με πρόσφατη σταθεροποίηση του αυξητικού αυτού ρυθμού. Η συχνότητα της νόσου αυξάνει την 6^η δεκαετία της ζωής.¹¹ Προσβάλλει συχνότερα το πρόσωπο, την κεφαλή και τον τράχηλο. Ο πιο σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που προδιαθέτει στην ανάπτυξη μελανώματος είναι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ ο ενδογενής παράγοντας όπως ο μεγάλος αριθμός σπίλων, η λευκή φυλή, το ανοιχτό χρώμα μαλλιών και ίριδας, η αδυναμία μαυρίσματος μετά από έκθεση στον ήλιο, η ύπαρξη εφελίδων και το οικογενειακό ιστορικό μελανώματος, παίζει ρόλο σε αρκετές περιπτώσεις.¹¹⁻¹³ Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που απαντώνται στο μελάνωμα είναι των ογκογονιδίων BRAF (περίπου 50% των ασθενών) και του NRAS (10-25%).¹⁴ Έχει υπολογιστεί ότι 5 με 12% των μελανωμάτων είναι κληρονομικά και περίπου 40% των κληρονομούμενων μελανωμάτων οφείλονται σε μεταλλάξεις το γονιδίου CDKN2A.¹⁵ Το μελάνωμα του δέρματος εμφανίζεται συνήθως de novo. Ένα στα τέσσερα μελανώματα προέρχεται από προϋπάρχοντες σπίλους, αν και οι σπίλοι συμπεριλαμβανομένων των δυσπλαστικών σπίλων έχουν μικρή πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής.¹⁶⁻¹⁹

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ασυμμετρία, το ανώμαλο περίγραμμα, η ασύμμετρη κατανομή του χρώματος και το μέγεθος (>6mm) είναι η κλασσική προσέγγιση για την κλινική διάγνωση του μελανώματος (asymmetry, irregular border, uneven color, diameter, κανόνας ABCD). Τα περισσότερα (πρακτικά όλα) de novo μελανώματα ξεκινούν σαν κεχρωσμένη

κηλίδα αντιπροσωπεύοντας τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων στην επιδερμίδα (μελάνωμα *in situ*). Με την πάροδο του χρόνου (στις περισσότερες περιπτώσεις πιθανόν σε διάστημα πολλών ετών), ο όγκος εξαπλώνεται οριζόντια αποκτώντας πιο ανώμαλα όρια και διηθώντας το επιφανειακό τμήμα του χορίου (θηλώδες χόριο). Σε μεταγενέστερα στάδια ο όγκος εμφανίζει κάθετη ανάπτυξη διηθώντας το εν τω βάθει μέρος του χορίου και κατευθυνόμενος προς το υποδόριο λίπος, αποκτώντας τη μορφή κηλίδας ή οζιδίου.¹¹

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ

Ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος του δερματικού μελανώματος είναι ο επιφανειακά εξαπλούμενος τύπος (*superficial spreading melanoma*), ο οποίος αποτελεί τα 2/3 του συνόλου των μελανωμάτων. Ο τύπος αυτός εμφανίζει αρχικά οριζόντια ανάπτυξη και αργότερα κάθετη ανάπτυξη. Ο δεύτερος πιο συχνός ιστολογικός τύπος είναι το οζώδες μελάνωμα (*nodular melanoma*) που αποτελεί το 10-15% των όγκων και εξ' ορισμού αυτός ο τύπος βρίσκεται σε κάθετη φάση ανάπτυξης. Τα δερματικά μελανώματα, σε αντίθεση με τα ραγοειδικά μελανώματα, δεν ταξινομούνται ιστολογικά βάσει του κυτταρικού τύπου (ατρακτοειδή ή επιθηλιομορφα κύτταρα). Τόσο ο επιφανειακά εξαπλούμενος τύπος, όσο και το οζώδες μελάνωμα έχουν μεγάλο αριθμό επιθηλιοειδών κυττάρων.¹¹

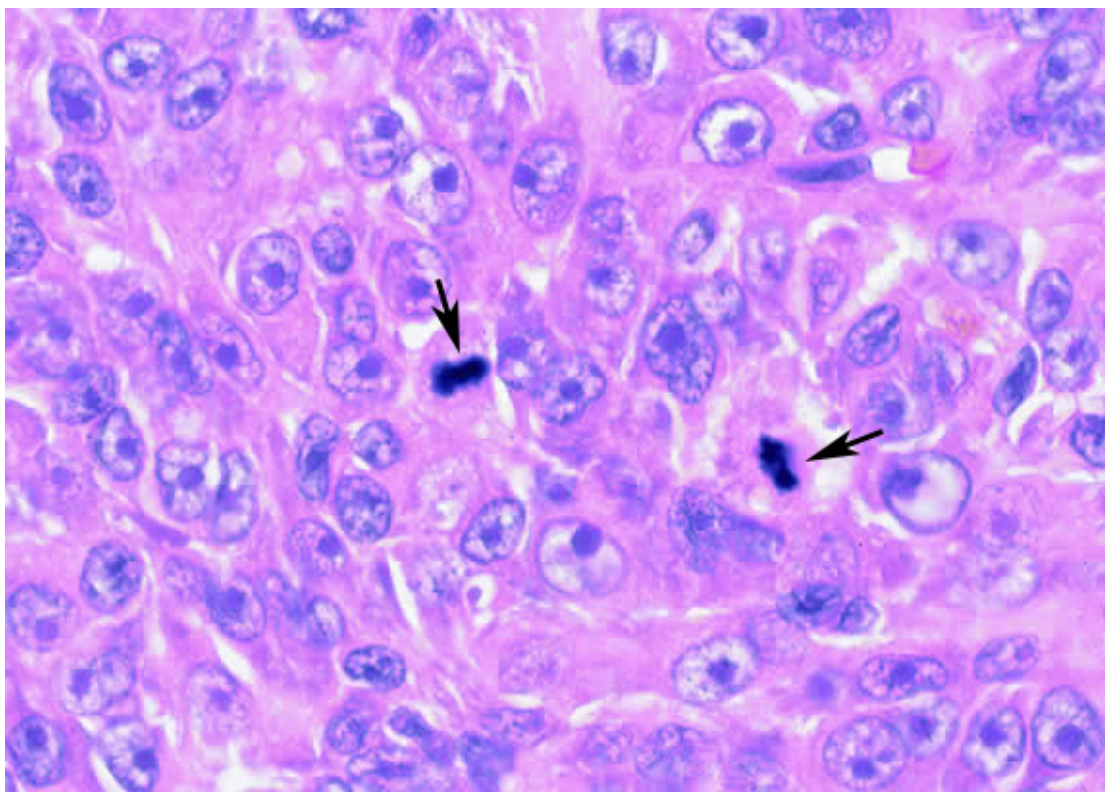
Η ιστολογική ανάλυση επιτρέπει ακριβή ταξινόμηση των περισσότερων μελανοκυτταρικών βλαβών σε καλοήθεις και κακοήθεις. Μόνο σε μια μειοψηφία βλαβών είναι απαραίτητη η χρήση άλλων τεχνικών σαν διαγνωστικό βοήθημα. Μεταξύ αυτών οι περισσότεροι συγγραφείς συνιστούν την ανοσοϊστοχημεία. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντισώματα στην παθολογοανατομία του δέρματος είναι το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης S100, το HMB-45 (έναντι της γλυκοπρωτεΐνης

gp100), το Melan-A (έναντι του αντιγόνου ένα του μελανώματος του αναγνωριζόμενου από κύτταρα T, melanoma antigen recognized by T cells-1, MART1) και το MIB-1 (έναντι της πυρηνικής πρωτεΐνης Ki-67, η οποία αποτελεί δείκτη πολλαπλασιασμού).²⁰

ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΡΥΘΜΟΣ

Ο μιτωτικός ρυθμός εκφράζεται είτε ως μιτωτικός δείκτης, δηλαδή ως αριθμός μιτώσεων ανά τετραγωνικό χιλιοστό, είτε ως δείκτης μιτωτικής ενεργότητας, δηλαδή ως αριθμός μιτώσεων ανά δέκα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (400X) σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Εικόνα 1). Τρία με δέκα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης ισοδυναμούν με ένα τετραγωνικό χιλιοστό, ανάλογα με το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται. Ο Clark είχε διαιρέσει το μιτωτικό δείκτη των δερματικών μελανωμάτων σε τρεις κατηγορίες (0, 1-6, και >6 μιτώσεις ανά τετραγωνικό χιλιοστό). Έκτοτε έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες ταξινομήσεις του μιτωτικού δείκτη, ο οποίος πολλές φορές χωρίζεται σε δύο κατηγορίες (0 και ≥ 1 μιτώσεις ανά τετραγωνικό χιλιοστό).²¹⁻²³ Μερικές φορές υπάρχει δυσκολία προσδιορισμού του μιτωτικού ρυθμού όπως για παράδειγμα συμβαίνει σε περιοχές με έντονη χρώση, υψηλή κυτταροβρίθεια ή νέκρωση, καθώς και σε περιοχές με πολλά πυκνωτικά σωμάτια. Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες έχουν διερευνηθεί σαν υποκατάστατα του μιτωτικού ρυθμού, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το MIB-1, ένα αντίσωμα έναντι το πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 το οποίο εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός από την G0 και τα αρχικά στάδια της G1. Τα αντισώματα έναντι της μονοκλωνικής μιτωτικής πρωτεΐνης 2 (anti-monoclonal mitotic protein-2, MPM-2) και της φωσφοϊστόνης H3 (anti-phosphohistone H3, PHH3) είναι δύο καινούργια υπό διερεύνηση αντισώματα, τα

οποία διαφέρουν από τους παλαιότερους ανασοϊστοχημικούς δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υποκατάστατα του μιτωτικού ρυθμού στο γεγονός ότι οι αντίστοιχοι επίτοποι-στόχοι των αντισωμάτων εκφράζονται αποκλειστικά στη φάση Μ του κυτταρικού κύκλου.²⁴ Οι δύο τελευταίοι δείκτες διερευνώνται σε διάφορα νεοπλάσματα, μεταξύ των οποίων τα δερματικά και ραγοειδικά μελανώματα.^{24,25} Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δερματικά μελανώματα πιθανόν να έχουν υψηλότερο μιτωτικό ρυθμό από ότι τα ραγοειδικά μελανώματα.^{22,26}



Εικόνα 1. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ενός μελανώματος του χοριοειδούς (400X). Αναγνωρίζονται δύο μιτώσεις (βέλη), τα οποία αποτελούνται από συμπυκνωμένη χρωματίνη στον κυτταρικό πυρήνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ-ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Το πάχος του μελανώματος, η ανατομική του θέση, ο ιστολογικός του τύπος, το φύλο και η ηλικία του ασθενούς, καθώς και η ύπαρξη εξέλκωσης έχουν προγνωστική σημασία. Τα επιφανειακά εξαπλούμενα μελανώματα έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους υπότυπους εν μέρει γιατί συνήθως έχουν μικρό πάχος κατά Breslow. Τα μελανώματα του κορμού, της άκρας χειρός και του άκρου ποδός έχουν χειρότερη πρόγνωση. Η μεγάλη ηλικία και το αρρεν φύλο αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες. Ο μιτωτικός δείκτης, η διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα, η ύπαρξη μικροσκοπικών δορυφόρων, καθώς και η λεμφαγγειακή διήθηση έχουν επίσης προγνωστική αξία.^{11,21} Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που ασχολούνται με την εύρεση προγνωστικών (κυρίως ιστολογικών) δεικτών, όπως η μεταλλοπρωτεϊνάση του διάμεσου ιστού τύπου 2, μερικοί από τους οποίους μπορεί να μουν στην καθημερινή κλινική πράξη όπως ήδη έχει γίνει με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 και την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέως (lactate dehydrogenase, LDH).^{27,28} Επίσης η ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο BRAF έχει προγνωστική αξία.

Η πιο ευρέως αποδεκτή σταδιοποίηση του δερματικού μελανώματος είναι αυτή της Αμερικανικής Επιτροπής για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) κατά την οποία η TNM ταξινόμηση λαμβάνει υπόψη της εκτός από την ανατομία του όγκου και παθολογοανατομικά δεδομένα όπως τον αριθμό των μιτώσεων και την ύπαρξη εξέλκωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κλασσική σταδιοποίηση του πάχους του όγκου κατά Breslow, όπως και αυτή κατά Clark, αν και ακόμα χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη, δεν χρησιμοποιούνται πλέον από την AJCC για τον προσδιορισμό του σταδίου του όγκου (με εξαίρεση το

γεγονός ότι τα επίπεδα IV και V κατά Clark έχουν δευτερεύουσα σημασία στην ταξινόμηση του όγκου σαν σταδίου pT1b).²³

ΘΕΡΑΠΕΙΑ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η θεραπεία του μελανώματος είναι η χειρουργική εξαίρεση του όγκου και η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάγνωση του όγκου σε πρώιμο στάδιο. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς με όγκο σταδίου 1a (σύμφωνα με το σύστημα TNM) έχουν 5ετή επιβίωση 97%, ενώ οι ασθενείς με όγκο σταδίου 4 έχουν 5ετή επιβίωση μόλις 15-20%. Η κλασική χημειοθεραπεία (πχ Ντακαρμπαζίνη, Dacarbazin) δεν έχει αποτέλεσμα στην επιβίωση των ασθενών. Καινούργιες θεραπείες έχουν μπει στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση του προχωρημένου μελανώματος, με μέτρια αποτελέσματα, όπως η ανοσοθεραπεία με αναστολείς του ανοσολογικού σημείου ελέγχου (immune checkpoint inhibitors), και η στοχευμένη θεραπεία (targeted therapy) όπως αυτή που στοχεύει στην αναστολή της μεταγωγής του ενδοκυττάριου σήματος (signal transduction inhibitors).^{29,30} Το μεταστατικό μελάνωμα εξακολουθεί να αποτελεί μια δύσκολα αντιμετωπίσιμη νόσο με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης.

ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ

Η έκθεση στον ήλιο κατά την παιδική ηλικία, η λευκή φυλή, η φωτοθεραπεία στη νεογνική ηλικία, καθώς και ο γενετικός παράγοντας προδιαθέτουν στη δημιουργία μελανοκυτταρικών σπύλων.³¹⁻³⁵ Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Τα κύτταρα των σπύλων είναι ένας μορφολογικός υπότυπος μελανοκυττάρων, ο οποίος έχει περισσότερο επιθηλιοειδή χαρακτηριστικά παρά δένδριτικά. Τα κύτταρα αυτά, στην περίπτωση των σπύλων, δημιουργούν ‘φωλιές’ κυττάρων, δηλαδή περιοχές με μελανοκύτταρα που βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο. Οι καλοήθεις μελανοκυτταρικοί σπίλοι είναι σαφώς περιγεγραμμένοι στρογγυλοί ή ωοειδείς σχηματισμοί. Η μεγάλη πλειοψηφία των σπύλων είναι επίκτητοι. Οι επίκτητοι καλοήθεις μελανοκυτταρικοί σπίλοι χωρίζονται σε 3 κατηγορίες με βάση την ιστολογική τους εμφάνιση:

Συνδεσμικούς σπίλους, οι οποίοι παρατηρούνται κυρίως σε νέους ανθρώπους και οι οποίοι έχουν τη μορφή κηλίδας ή πλάκας. Τα κύτταρα του σπύλου βρίσκονται στα σύνορα της επιδερμίδας με το χόριο.

Σύνθετους σπίλους, οι οποίοι παρατηρούνται κυρίως στη μέση ηλικία και οι οποίοι έχουν τη μορφή βλατίδας. Τα κύτταρα του σπύλου βρίσκονται στην επιδερμίδα και το χόριο.

Χοριακούς σπίλους, οι οποίοι είναι οι πιο συχνοί και απαντώνται κυρίως σε ηλικιωμένους. Έχουν τη μορφή βλατίδας. Τα μελανοκύτταρα περιορίζονται στο χόριο.²

Υπάρχει η θεωρία ότι οι σπίλοι προέρχονται από πολλαπλασιασμό ενδοεπιδερμικών μελανοκυττάρων τα οποία αρχικά σχηματίζουν φωλιές μελανοκυττάρων στο χοριοεπιδερμικό όριο, τους συνδεσμικούς σπίλους. Σε μεταγενέστερο στάδιο, περαιτέρω πολλαπλασιασμός και ‘ωρίμανση’ των

μελανοκυττάρων οδηγεί στη μετανάστευση και την οργάνωσή τους σε φωλιές μελανοκυττάρων στο θηλώδες χόριο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σύνθετων σπύλων. Σταδιακά ο πολλαπλασιασμός των ενδοεπιδερμικών μελανοκυττάρων σταματά με αποτέλεσμα ο σύνθετος σπύλος να μετατρέπεται σε χοριακό σπύλο.³²

Τα μελανοκύτταρα του χορίου έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και μεταβολισμού. Με τη μείωση του πολλαπλασιασμού των μελανοκυττάρων ο κυτταρικός πληθυσμός των χοριακών σπύλων αντικαθίσταται προοδευτικά από μεσοκυττάρια ουσία και λιπώδη κύτταρα. Οι περισσότεροι χοριακοί σπύλοι σταδιακά υποστρέφουν.

Αν και η μετάλλαξη BRAF είναι συχνή στα μελάνωμα, βρίσκεται και σε πολλούς καλοήθεις σπύλους δημιουργώντας ερωτηματικά για τον ρόλο της στην ανάπτυξη του μελάνωματος.

Οι καλοήθεις μελανοκυτταρικοί σπύλοι αφαιρούνται συνήθως για κοσμητικούς λόγους. Η gold standard τεχνική της αφαίρεσης των σπύλων είναι η ολική χειρουργική αφαίρεση η οποία πρέπει να εκτείνεται 2mm περιμετρικά της βλάβης καθώς και στο κατάλληλο βάθος.³² Υπάρχουν και χειρουργικές τεχνικές κατά τις οποίες αφαιρείται τμήμα της βλάβης για βιοψία, με το μειονέκτημα ότι μόνο ένα μέρος του όγκου μπορεί να εξεταστεί παθολογοανατομικά. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται η θεραπεία με laser (κυρίως Er:YAG και CO₂), η οποία έχει το μειονέκτημα ότι δεν παρέχει τη δυνατότητα ιστολογικής εξέτασης του δείγματος.

ΣΠΙΛΟΙ ΕΠΙΠΕΦΥΚΟΤΑ

Ο σπίλος του επιπεφυκότα είναι ο πιο συχνός μελανοκυτταρικός όγκος του επιπεφυκότα, με την πρωτογενή επίκτητη μελάνωση, τη δευτερογενή επίκτητη μελάνωση και το μελάνωμα του επιπεφυκότα να εμφανίζονται σπανιότερα. Οι σπίλοι του επιπεφυκότα εμφανίζονται συνήθως κατά τις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής και ανατομικά βρίσκονται πιο συχνά κοντά στο σκληροκερατοειδές όριο. Ιστολογικά οι σπίλοι του επιπεφυκότα ταξινομούνται κατά ανάλογο τρόπο με τους δερματικούς σπίλους με τη διαφορά ότι επειδή δεν υπάρχει χόριο στον επιπεφυκότα ο όρος υποεπιθηλιακός σπίλος αντικαθιστά το χοριακό σπίλο. Συνεπώς έχουμε συνδεσμικούς, σύνθετους και υποεπιθηλιακούς σπίλους του επιπεφυκότα. Η εκτομή τους γίνεται συνήθως για αισθητικούς λόγους. Τα περισσότερα μελάνωματα του επιπεφυκότα προέρχονται από πρωτοπαθή επίκτητη μελάνωση με ατυπία, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό (5-25%) προέρχεται από προϋπάρχοντες σπίλους του επιπεφυκότα. Παρόλα αυτά η πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής ενός σπίλου του επιπεφυκότα είναι μικρή, κάτω από 1%.²

ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ

Όπως προαναφέρθηκε, ένα σημαντικό ποσοστό των δερματικών μελανωμάτων, περίπου ένα στα τέσσερα, προέρχεται από προϋπάρχοντες σπίλους,³⁶ αν και οι σπίλοι, συμπεριλαμβανομένων των δυσπλαστικών σπίλων, έχουν μικρή πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής.¹⁶⁻¹⁹ Οι δυσπλαστικοί ή άτυποι σπίλοι (dysplastic nevi or atypical moles) είναι επίκτητες μελανοκυτταρικές αλλοιώσεις του δέρματος των οποίων ο κλινικός και ιστοπαθολογικός ορισμός δεν είναι αποσαφηνισμένος. Υπάρχει, δηλαδή, διαφωνία μεταξύ των ειδικών σχετικά με τον ορισμό του δυσπλαστικού σπίλου. Οι όροι δυσπλαστικός σπίλος και άτυπος σπίλος χρησιμοποιούνται από πολλούς σαν συνώνυμες έννοιες. Άλλοι ταξινομούν έναν σπίλο σαν δυσπλαστικό με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του, ενώ όταν η ταξινόμηση γίνεται με βάση κλινικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιούν τον όρο άτυπος σπίλος. Ο Clark όρισε πέντε ιστολογικά χαρακτηριστικά για τον χαρακτηρισμό ενός σπίλου σαν άτυπου: πυρηνική ατυπία των μελανοκυττάρων, φακοειδής μελανοκυτταρική υπερπλασία, στοιβαδωτή ινοπλασία, συγκεντρική ηωσινοφιλική ινοπλασία και λεμφοκυτταρικές διηθήσεις κατά τόπους.³⁷ Το ίδιο έτος (1984) ο Reed πρώτος εισήγαγε την ιδέα της ταξινόμησης των δυσπλασιών σε ήπιες, μέτριες και σοβαρές.³⁸ Αργότερα ο Rhodes περιέγραψε τα κριτήρια για τους 3 βαθμούς της δυσπλασίας και συγκεκριμένα χρησιμοποίησε το μέγεθος του πυρήνα, τις αλλαγές της χρωματίνης και τα κυτταροπλασματικά χαρακτηριστικά για αυτόν το σκοπό.³⁹ Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύρια ιστολογικά κριτήρια για το χαρακτηρισμό ενός σπίλου σαν άτυπου συμπεριλαμβάνουν τόσο αρχιτεκτονικά (π.χ. μέγεθος σπίλου $\geq 4\text{mm}$, συνδεσμικό τμήμα σπίλου ευρισκόμενο δίπλα σε σύνθετο τμήμα σπίλου, μεμονωμένα μελανοκύτταρα και 'φωλιές' μελανοκυττάρων κυρίως κοντά στις κορυφές και τις πλευρές επιμηκυσμένων καταδύσεων της επιδερμίδας στο χόριο)

όσο και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά.¹¹ Οι άτυποι σπίλοι διαφέρουν από τους κοινούς επίκτητους μελανοκυτταρικούς σπίλους σε αρκετά κλινικά χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένων της αυξημένης διαμέτρου και της έλλειψης ομοιόμορφης χρωματικής κατανομής. Μερικοί άτυποι σπίλοι δεν είναι δυνατόν να διαφοροποιηθούν κλινικά από το μελάνωμα. Έχει γίνει προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η γενετική ταυτότητα των δυσπλαστικών σπίλων, χωρίς ιδιαίτερη επιτυχία.¹² Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γενετικά χαρακτηριστικά των δυσπλαστικών σπίλων είναι ενδιάμεσα μεταξύ των καλοήθων σπίλων και των κακοήθων μελανωμάτων.¹⁶

Έχει περιγραφεί σε οικογένειες ένα σύνδρομο όπου τα μέλη τους εμφανίζουν πολλούς σπίλους, συνήθως πάνω από 50, μεταξύ των οποίων κάποιοι είναι δυσπλαστικοί, ενώ υπάρχει οικογενειακό ιστορικό μελανώματος (συγγενείς πρώτου και δευτέρου βαθμού). Το σύνδρομο αυτό ονομάζεται οικογενές σύνδρομο πολλαπλών άτυπων σπίλων και μελανώματος (familial atypical multiple mole melanoma syndrome, FAMMM) και σχετίζεται στενά με μεταλλάξεις στο γονίδιο CDKN2A. Είναι επίσης γνωστό και ως σύνδρομο άτυπου σπίλου ή σύνδρομο δυσπλαστικού σπίλου ή σύνδρομο B-K σπίλου. Η πιθανότητα ανάπτυξης μελανώματος στα άτομα που πληρούν τα κριτήρια για ένταξη στο σύνδρομο FAMMM είναι πάνω από 50%, ενώ μερικοί από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν παγκρεατικό καρκίνο. Το σύνδρομο FAMMM είναι υπεύθυνο για ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των δερματικών μελανωμάτων.⁴⁰

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

ΓΕΝΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΙ

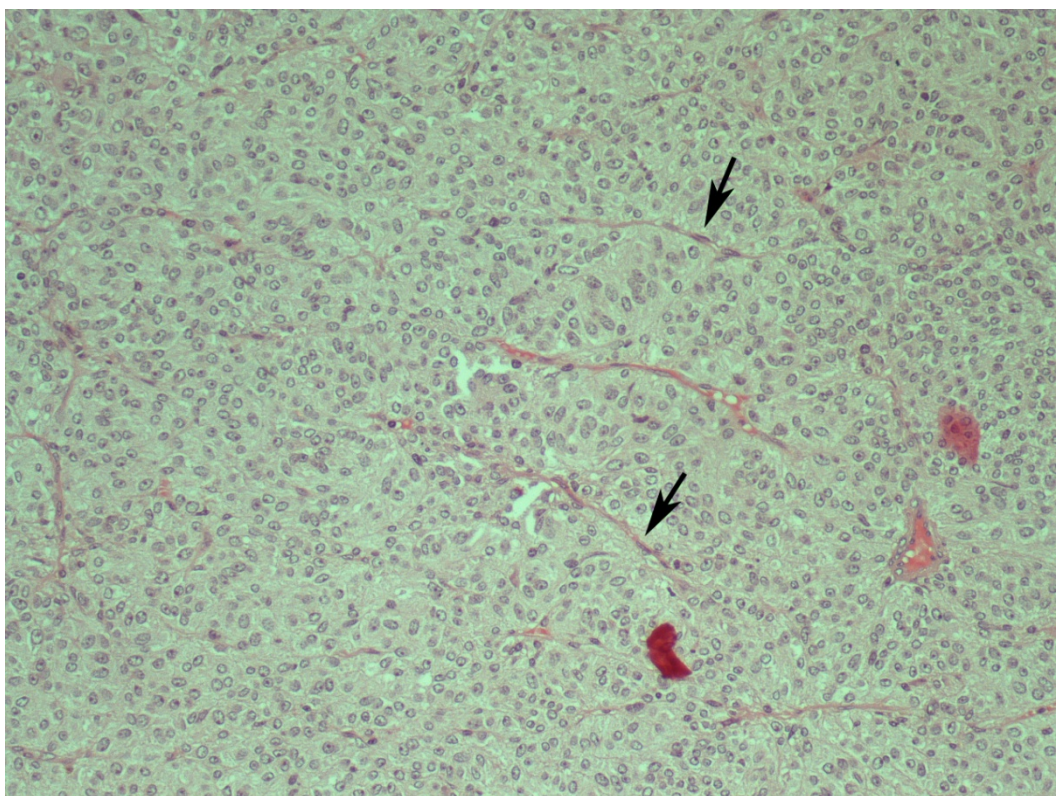
Αγγειογένεση (angiogenesis) είναι η φυσιολογική διαδικασία της δημιουργίας καινούργιων αγγείων από προυπάρχοντα αγγεία. Αγγειακή διαφοροποίηση (vasculogenesis) είναι η διαδικασία της δημιουργίας καινούργιων αγγείων από την de novo παραγωγή ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά ονομάζονται αιμαγγειοβλάστες και αποτελούν κοινό πρόγονο των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του αίματος. Τα πρώτα αγγεία στο αναπτυσσόμενο έμβρυο σχηματίζονται μέσω της διαδικασίας της αγγειακής διαφοροποίησης, ενώ αργότερα κατά την εμβρυική ζωή όπως και μετά τη γέννηση ο πιο σημαντικός μηχανισμός δημιουργίας νέων αγγείων είναι η αγγειογένεση η οποία γίνεται κυρίως μέσω του μηχανισμού της ενδοθηλιακής εκβλάστησης.⁴¹ Κατά την ενήλικη ζωή το αγγειακό σύστημα παραμένει σε κατάσταση ηρεμίας με κάποιες εξαιρέσεις όπως στην περίπτωση της επούλωσης τραύματος και στο γυναικείο καταμήνιο κύκλο.

Έχουν βρεθεί πάνω 30 ενδογενείς παράγοντες που οδηγούν στην αγγειογένεση και αρκετοί παράγοντες που την εμποδίζουν.^{42,43} Ο πιο σημαντικός αγγειογενετικός παράγοντας είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), ενώ άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα αγγειογενετικών παραγόντων αποτελούν η αγγειογενίνη (angiogenin), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF), οι μετατρεπτικοί αυξητικοί παράγοντες άλφα και βήτα (transforming growth factor alpha and beta, TGFα/TGFβ), ο προερχόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor, PDGF) και η ιντερλευκίνη 8. Παράγοντες που αναστέλλουν την αγγειογένεση αποτελούν μεταξύ άλλων η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη.⁴³ Η

αύξηση της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων σε συνδιασμό με τη μείωση της έκφρασης των ανασταλτικών παραγόντων οδηγεί στην αγγειογένεση των όγκων.

Για πολλά χρόνια υπήρχε η αντίληψη πως η αγγειογένεση των συμπαγών όγκων συμβαίνει με ένα και μοναδικό μηχανισμό, την ενδοθηλιακή εκβλάστηση. Τελικά οι επιστήμονες αναγνώρισαν 5 είδη αγγειογένεσης των όγκων: την ενδοθηλιακή εκβλάστηση, τον εγκολεασμό, την ενσωμάτωση προϋπάρχουσας αγγείωσης, τη μεταγεννητική αγγειακή διαφοροποίηση από πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης.⁴⁴⁻⁴⁹ Συχνά ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλους τους προαναφερθέντες μηχανισμούς αν και είναι γνωστό σήμερα ότι τουλάχιστον σε δύο από τους πέντε μηχανισμούς η πραγματική διαδικασία είναι ή μοιάζει με την αγγειακή διαφοροποίηση. Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει αρκετές μελέτες οι οποίες μας έχουν βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα τους μηχανισμούς της αγγειογένεσης και ιδιαίτερα την ενδοθηλιακή εκβλάστηση.^{50,51}

Τα νεοαγγεία (Εικόνα 2) διαφέρουν από τα φυσιολογικά αγγεία στο γεγονός ότι είναι ανατομικά και λειτουργικά ανώμαλα. Τα αγγεία του όγκου έχουν μικρότερη διάμετρο και μεγαλύτερη διαπερατότητα από τα φυσιολογικά αγγεία και επίσης δεν έχουν περικύτταρα και βασική μεμβράνη (ή οι δομές αυτές βρίσκονται σε απόσταση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα).⁴³



Εικόνα 2. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ενός μελανώματος της ίριδας ατρακτοειδών κυττάρων (200X). Κάποια από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς μερικά νεοαγγεία (τα οποία δεν έχουν σχηματιστεί μέσω του φαινομένου της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης) έχουν επισημανθεί με βέλη.

ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Η αγγειογένεση είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των συμπαγών όγκων σε μέγεθος μεγαλύτερου των 2mm και για τη δημιουργία και ανάπτυξη των μεταστάσεων. Το gold standard για τον προσδιορισμό του μεγέθους της νεοαγγειογένεσης ενός συμπαγούς όγκου είναι ο υπολογισμός της μικροαγγειακής πυκνότητας (microvascular density, MVD).⁵² Η μικροαγγειακή πυκνότητα αντιστοιχεί στον αριθμό των μικροαγγείων ανά μονάδα επιφάνειας του όγκου. Διάφοροι πανενδοθηλιακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας μέσω ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, με τους δείκτες CD31 και CD34 να αποτελούν τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους.⁵³ Ο Weidner και οι συνεργάτες του είναι αυτοί που καθιέρωσαν τον προσδιορισμό της μικροαγγειακής πυκνότητας ως μέτρο εκτίμησης της νεοαγγείωσης των όγκων.⁵⁴⁻⁵⁷ Οι ερευνητές αυτοί πρώτοι έδειξαν ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα έχει προγνωστική σημασία σε καρκινώματα του μαστού και του προστάτη. Έκτοτε έχει αποδειχτεί ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα έχει προγνωστική σημασία και σε άλλα είδη όγκων μεταξύ των οποίων το ραγοειδικό και το δερματικό μελάνωμα.^{52,58-61} Η μέθοδος του Weidner συνίσταται αρχικά στην αναγνώριση μέσω οπτικού μικροσκοπίου, στις ιστολογικές τομές, των περιοχών του όγκου με τη μεγαλύτερη νεοαγγείωση (θερμές περιοχές, hot spots). Αυτό γίνεται σε μικρή μεγέθυνση (10-100X). Συνήθως επιλέγονται 3 με 5 θερμές περιοχές. Σε κάθε μία από αυτές τις περιοχές γίνεται η καταμέτρηση των αγγείων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (200 ή 400X) και τέλος υπολογίζεται ο μέσος όρος. Να σημειωθεί ότι κάθε χρωματισμένο ενδοθηλιακό κύτταρο ή συνάθροισμα ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται ξεχωριστά από γειτονικά αγγεία μετρώνται σαν μικροαγγεία, ακόμα και αν δεν διακρίνεται ο αυλός των αγγείων ή ενδοαυλικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η μέθοδος του Chalkley χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά από τη μέθοδο του Weidner για τον προσδιορισμό της μικροαγγειακής πυκνότητας. Η μέθοδος αυτή είναι ουσιαστικά ίδια με τη μέθοδο του Weidner, με κύρια διαφορά τη χρησιμοποίηση ειδικού βαθμονομημένου δικτυωτού πλέγματος στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου. Αυτό που καταμετράται είναι ο αριθμός των σημείων του πλέγματος που διασταυρώνονται με ανοσοϊστοχημικά σημασμένα αγγεία.^{52,62}

Πολλοί ερευνητές καταμετρούν ένα προς ένα τα μικροαγγεία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει χαμηλή αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, δηλαδή διαφορετικό αποτέλεσμα μεταξύ διαφορετικών ερευνητών που κάνουν καταμέτρηση σε μια συγκεκριμένη ιστολογική τομή, όπως και μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων από τον ίδιο ερευνητή.⁶³ Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μέτρησης της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων ή της επιφάνειας των αγγείων (η επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων συν την επιφάνεια του αυλού των αγγείων) με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή με σκοπό τη μείωση του σφάλματος σε σχέση με τις μετρήσεις που γίνονται από τον άνθρωπο.⁶⁴⁻⁶⁷ Αυτές οι μετρήσεις ίσως να είναι περισσότερο αξιόπιστες (αναπαραγώγιμες).^{68,69}

Το σύμπλεγμα διαφοροποίησης 31 (cluster of differentiation 31, CD31), γνωστό και ως αιμοπεταλιακό-ενδοθηλιακό μόριο κυτταρικής προσκόλλησης 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1) είναι μία πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και μέλος των επιφανειακών υποδοχέων του κυττάρου που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια και τους περισσότερους υποπλυθισμούς λευκοκυττάρων, καθώς επίσης και από έναν πληθυσμό προδρομικών κυττάρων των μακροφάγων/δενδριτικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Αποτελεί βασικό δομικό μόριο πολλών διακυτταρικών συνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων και

πιθανότατα συμμετέχει στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων, στην αγγειογένεση και στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών.⁵³ Αν και το αντίσωμα έναντι του δείκτη CD31 εμφανίζει καλή ευαισθησία, έχει το μειονέκτημα ότι έχει μικρή ειδικότητα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν η τομή που εξετάζεται έχει έντονη φλεγμονώδη διήθηση δεδομένου ότι αρκετά είδη λευκών αιμοσφαιρίων βάφονται με αυτό το αντίσωμα.

Το σύμπλεγμα διαφοροποίησης 34 (cluster of differentiation 34, CD34), γνωστό και ως CD34 αντιγόνο των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic progenitor cell antigen CD34), είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων αλλά όχι των λεμφαγγείων (με εξαίρεση τα υπεζωκοτικά λεμφαγγεία), τα αιμοποιητικά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα, τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Μπορεί να παίζει ρόλο στην προσκόλληση των αρχέγονων κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία του μυελού των οστών ή στα κύτταρα του στρώματος.⁵³ Όπως εύκολα μπορεί να αντιληφτεί κανείς το κύριο μειονέκτημα της χρήσης αντισωμάτων έναντι του δείκτη CD34 με σκοπό τον προσδιορισμό της μικροαγγειακής πυκνότητας είναι ότι εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα βάφονται και κύτταρα του στρώματος μειώνοντας έτσι την ειδικότητα της μεθόδου.

Εκτός από τα αντισώματα έναντι των πανενδοθηλιακών δεικτών CD31 ή CD34, για τη μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα έναντι του παράγοντα VIII (von Willebrand factor), ο οποίος αποτελεί έναν εναλλακτικό πανενδοθηλιακό δείκτη (πιο ειδικός αλλά λιγότερο ευαίσθητος δείκτης σε σχέση με τους CD31 ή CD34). Υπάρχουν και αντισώματα ειδικά για ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα και συγκεκριμένα τα αντισώματα έναντι του

CD105 (ενδογλίνη) καθώς και τα αντισώματα E9 και LM-609. Τα αντισώματα αυτά έχουν το πλεονέκτημα ότι βάφουν κυρίως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεοαγγείων σε αντίθεση με τα αντισώματα έναντι των προαναφερθέντων πανενδοθηλιακών δεικτών που βάφουν και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των φυσιολογικών αγγείων.^{52,70,71}

ΜΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

(ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΜΙΜΗΣΗ)

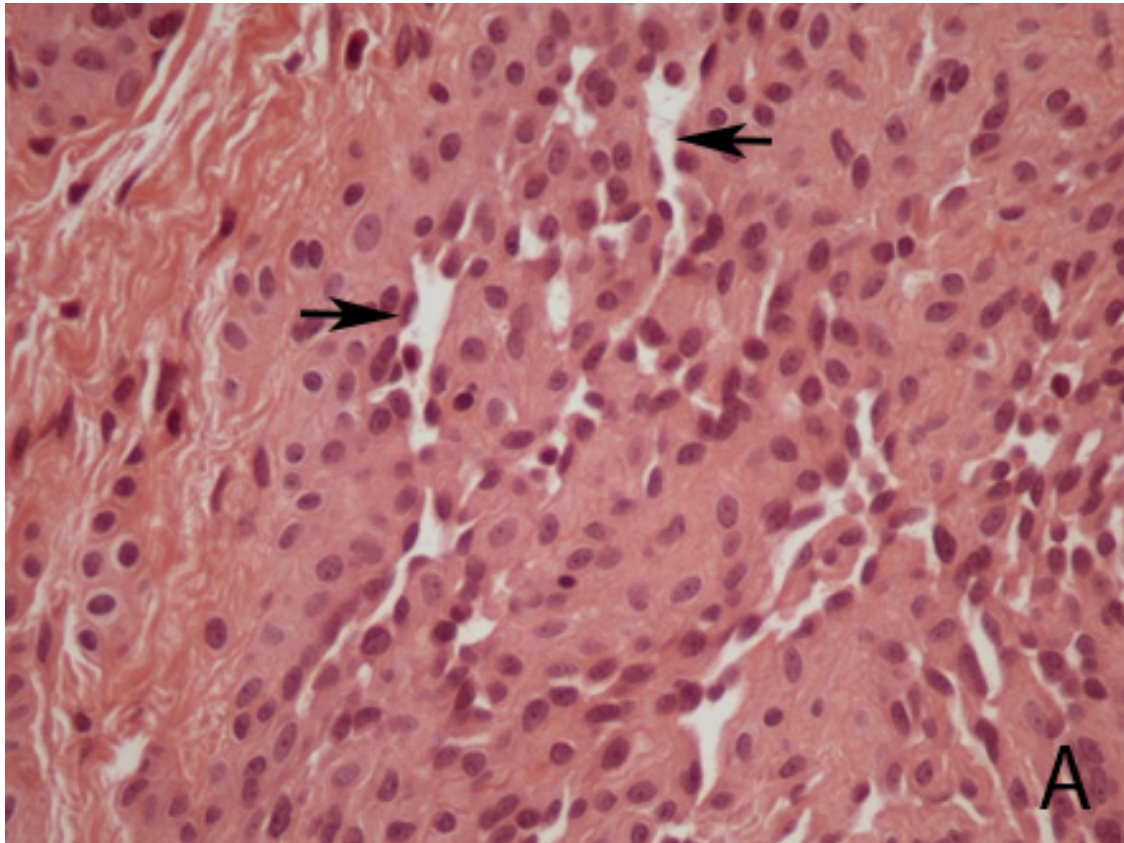
ΓΕΝΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΙ

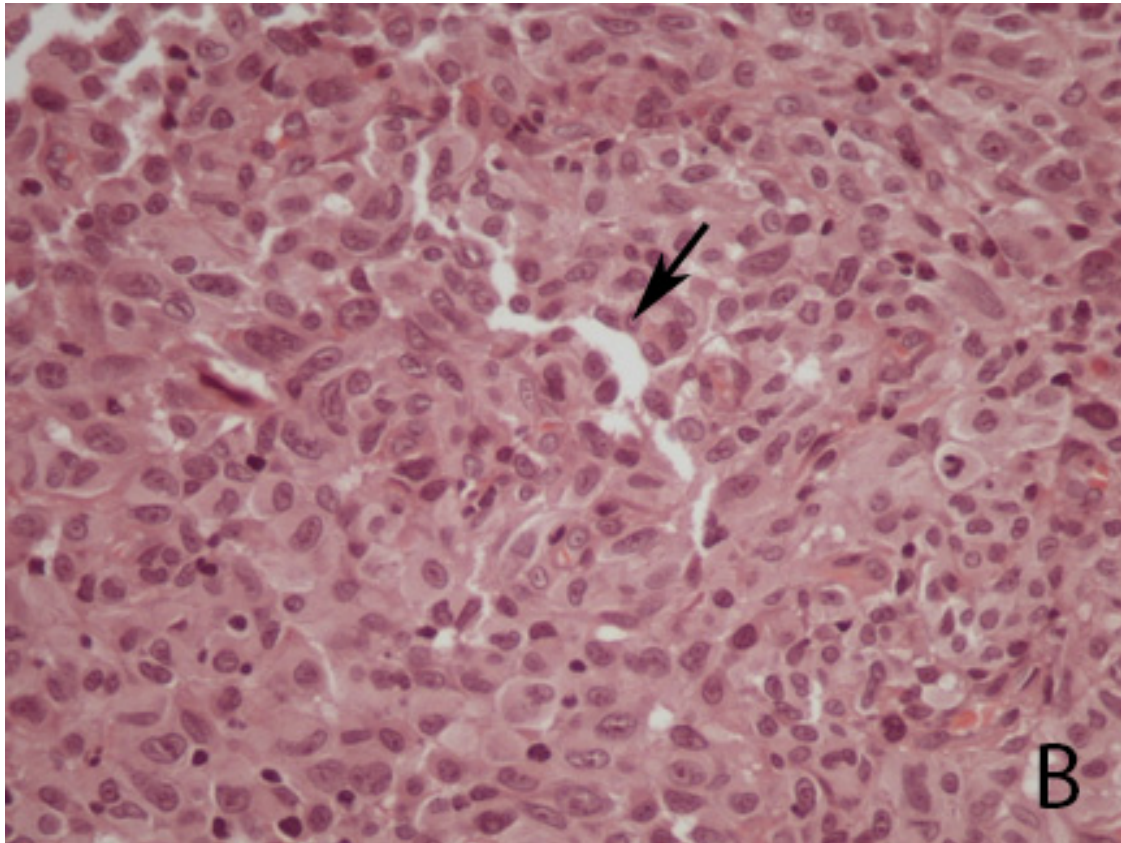
Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenic mimicry, VM) είναι η de novo παραγωγή αγγειακών καναλιών, συνήθως από επιθετικά ή μεταστατικά κακοήγη κύτταρα. Δε θεωρείται αμιγές είδος αγγειακής διαφοροποίησης γιατί η αυθεντική αγγειακή διαφοροποίηση οδηγεί στην de novo δημιουργία αγγείων τα οποία επενδύονται από ενδοθηλιακά κύτταρα.⁷² Ο Maniotis, ο Hendrix και οι συνεργάτες τους ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν και περιέγραψαν αυτό το φαινόμενο το 1999 και εισήγαγαν τον όρο μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης για να δώσουν έμφαση στην de novo δημιουργία αγγειακών δομών αλλά ταυτόχρονα να τη διαφοροποιήσουν από την πραγματική αγγειακή διαφοροποίηση.⁷³ Έκτοτε έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα πάνω στη μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης. Ο Maniotis και οι συνεργάτες του παρατήρησαν επαναλαμβανόμενα (πανομοιότυπα) συμπαγή και κοίλα μικροκυκλοφορικά (μικροαγγειακά) δίκτυα αποτελούμενα από συνδεδεμένες αγκύλες εξωκυττάριας ουσίας, τα οποία ήταν θετικά στη χρώση PAS (periodic acid-Schiff), σε ιστολογικές τομές πρωτογενών και μεταστατικών περιοχών ανθρώπινων ραγοειδικών μελανωμάτων.⁷³ Αξίζει να σημειωθεί ότι το 45% των πρωτογενών ραγοειδικών μελανωμάτων είχαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Χρησιμοποιώντας οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς και δείκτες μελανοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων (ανοσοϊστοχημεία), ανακάλυψαν ότι τα μικροκυκλοφορικά δίκτυα ή οι δομές που έμοιαζαν με τριχοειδή αγγεία αποτελούνται από εξωκυττάρια ουσία και επενδύονται εξωτερικά από κύτταρα μελανώματος, ενώ δεν υπάρχουν ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι αυλοί των καναλιών περιείχαν συχνά ερυθρά αιμοσφαίρια. Η εσωτερική στοιβάδα των

επενδυόμενων με μελανοκύτταρα μικροαγγειακών δομών αποτελείται από πρωτεΐνες εξωκυττάριας ουσίας όπως η λαμινίνη, το κολλαγόνο τύπου IV και VI, και πρωτεογλυκάνες πλούσιες στη γλυκοζαμινογλυκάνη θειϊκή ηπαράνη. Επιθετικά ραγοειδικά και δερματικά κύτταρα μελανώματος ήταν ικανά να δημιουργούν επαναλαμβανόμενα συμπαγή και κοίλα κανάλια εξωκυττάριας ουσίας *in vitro* χωρίς την παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών ή διαλυτών αυξητικών παραγόντων σε τρισδιάστατες καλλιέργειες που περιείχαν Matrigel ή αραιωμένο κολλαγόνο τύπου 1.⁷³⁻⁷⁶ Η χρώση PAS καθώς και τα αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών κυτταρικών δεικτών CD31 και CD34 έχουν αποτελέσει τα εργαλεία εκλογής για το χαρακτηρισμό και τη μελέτη της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μόριο CD31 είναι ένα μόριο αιμοπεταλιακής ενδοθηλιακής κυτταρικής πρόσδεσης (platelet endothelial adhesion molecule, PECAM1). Τα κανάλια μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης είναι PAS θετικά, CD31 (ή CD34) αρνητικά κανάλια. Να σημειωθεί ότι δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν *in situ* στο 34% των πρωτογενών περιοχών των όγκων σε ασθενείς με δερματικά μελανώματα.⁷⁷

Τα 4 κύρια χαρακτηριστικά των δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης είναι η ύπαρξη αγγείωσης επενδυόμενης από κύτταρα του όγκου (Εικόνα 3), η έκφραση ενός αρχέγονου φαινοτύπου από τα κύτταρα του όγκου με επικράτηση δεικτών αρχέγονων και ενδοθηλιακών κυττάρων, η λειτουργική σύνδεση των δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης με αγγεία επενδυόμενα με ενδοθηλιακά κύτταρα και η ύπαρξη αντιθρομβωτικών παραγόντων που διευκολύνουν την αιματική ροή μέσω αυτών των δικτύων καθιστώντας τα λειτουργικά και σημαντικά για την προμήθεια του όγκου με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο.⁶⁸

Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης έχει βρεθεί και μελετηθεί σε μια ποικιλία νεοπλασμάτων, ενώ το κακόηθες μελάνωμα, τόσο το ραγοειδικό όσο και το δερματικό, αποτελεί τον προτιμώμενο όγκο πολλών μελετητών.^{69,78}





Εικόνα 3. Μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλοήγη σπύλο του δέρματος (αιματοξυλίνη-ηωσίνη 400X) (Α). Παρατηρείστε τους κενούς χώρους οι οποίοι περιβάλλονται από κύτταρα του σπύλου και όχι από κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά ενδοθηλιακών κυττάρων. Μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης σε κακόηθες δερματικό μελάνωμα (αιματοξυλίνη-ηωσίνη 400X) (Β). Το τοίχωμα του αγγειακού χώρου στο κέντρο της εικόνας (βέλος) επενδύεται από κύτταρα του μελανώματος.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Υπάρχει μια διαφωνία ανάμεσα στους επιστήμονες για το εάν τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης είναι λειτουργικά ή είναι απλώς ένα artifact προερχόμενο από κύτταρα του όγκου τοποθετημένα κοντά σε αγγεία ή αποτελούν το αποτέλεσμα της αντικατάστασης των ενδοθηλιακών κυττάρων από κύτταρα του όγκου όταν τα τελευταία διηθούν τα αγγεία. Ο Chang και οι συνεργάτες του παρατήρησαν μωσαϊκά αγγεία στα οποία τόσο τα ενδοθηλιακά όσο και τα κύτταρα του όγκου επένδυναν τον αυλό σε ξενομοσχεύματα καρκινώματος του παχέως εντέρου και υπέθεσαν ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εκτείνονται στην εσωτερική επιφάνεια του αυλού μετά από την απομάκρυνση των προϋπαρχόντων ενδοθηλιακών κυττάρων ή μερικά ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να χάνουν τον ανοσοφαινότυπο CD31.^{79,80} Η ιδέα των μωσαϊκών αγγείων δεν αποκλείει κατ' ανάγκη την ύπαρξη του φαινομένου της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, ενώ αγγεία επενδύόμενα αποκλειστικά από ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και αγγεία επενδύόμενα αποκλειστικά από κύτταρα του όγκου μπορεί να αποτελούν τα δύο άκρα ενός φάσματος μεταξύ των οποίων διαφορετικά ποσοστά κυττάρων του όγκου και ενδοθηλιακών κυττάρων επενδύουν το τοίχωμα των αγγείων. Μερικοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης κυριαρχεί στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των όγκων και τα επενδύόμενα από ενδοθηλιακά κύτταρα αγγεία αποτελούν το κυρίαρχο στοιχείο του μικροκυκλοφορικού συστήματος όταν το μέγεθος του όγκου έχει αυξηθεί σημαντικά, ενώ τα μωσαϊκά αγγεία κυριαρχούν στα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης των όγκων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολύ πρώιμο στάδιο, όταν το μέγεθος του όγκου είναι κάτω από 2mm, δεν υπάρχει ανάγκη

για νεοαγγείωση και ο όγκος μπορεί να προμηθευτεί θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο από τους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς μέσω της διάχυσης.⁸¹

Έχει αποδειχτεί με τη χρήση ιχνηλατών ότι τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης μπορούν να μεταφέρουν υγρά *in vitro*, σε κυτταρικές καλλιέργειες ραγοειδικών μελανωμάτων υψηλής κακοήθειας,^{73,82} καθώς και σε ξενομοσχεύματα ανθρωπίνων δερματικών μελανωμάτων σε μυ.^{75,83} Τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης όχι μόνο μεταφέρουν,⁸⁴ αλλά επίσης κυκλοφορούν το πράσινο της ινδοκυανίνης *in vivo*, σε ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα,⁷⁶ αναδεικνύοντας την πιθανότητα ότι αυτά τα δίκτυα είναι λειτουργικά και αποτελούν μια εναλλακτική οδό προμήθειας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, μελέτη *in vivo* με υπερήχους Doppler και ειδικά με τη χρήση μικροφυσσαλίδων σε μυϊκό ξενομόσχευμα ανθρωπίνων δερματικών μελανωμάτων αποκάλυψε ότι υπάρχει λειτουργική σύνδεση και ροή του αίματος μεταξύ των επενδύμενων με ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων μυών και περιοχών μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε ανθρώπινα μελάνωματα.⁸⁵

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο Hendrix και οι συνεργάτες του όχι μόνο ανακάλυψαν το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, αλλά συνέβαλαν αποφασιστικά στην έρευνα για την ανακάλυψη των μοριακών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία αυτού του φαινομένου. Ένα σημαντικό μέρος αυτής της έρευνας έχει γίνει με τη χρήση συστημάτων *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, η τρισδιάστατη γέλη κολλαγόνου τύπου I χρησιμοποιείται συχνά σαν υπόστρωμα για τη δημιουργία και ανάπτυξη δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης από κύτταρα μελανωμάτων. Οι ερευνητές

παράγουν τη γέλη με τον τρόπο που περιγράφηκε από τον Hess και τους συνεργάτες του.⁸⁶ Η τρισδιάστατη γέλη Matrigel χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά για τον ίδιο σκοπό.⁷³ Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές δερματικών μελανωμάτων C8161 (υψηλής κακοήθειας) και C81-61 (χαμηλής κακοήθειας) και οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ραγοειδικών μελανωμάτων MUM-2B (υψηλής κακοήθειας), C918 (υψηλής κακοήθειας) και MUM-2C (χαμηλής κακοήθειας) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές στην έρευνα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Αλλομοσχεύματα και ξενομοσχεύματα μυός έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην έρευνα, με τους ανοσοανεπαρκείς NOD/SCID μύες, τους ανοσοεπαρκείς C57BL/6 μύες και τους λευκοπαθείς (αλμπίνους) BALB/c μύες να αποτελούν μερικά από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα ζώων. Τα κύτταρα μελανώματος μυός B16F10 χρησιμοποιούνται συχνά για την παραγωγή μυϊκών αλλομοσχευμάτων.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΕΠΕΝΔΥΟΥΝ ΤΑ ΚΑΝΑΛΙΑ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Υπάρχουν δύο επικρατούσες θεωρίες σχετικά με την οντογένεση των κυττάρων που σχηματίζουν τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η πρώτη υποστηρίζει ότι αυτά τα κύτταρα είναι κύτταρα του όγκου που έχουν υποστεί μια διαδικασία αποδιαφοροποίησης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αρχέγονου κυτταρικού τύπου ο οποίος συμπεριλαμβάνει χαρακτηριστικά κυττάρων του όγκου, αρχέγονων κυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και άλλων κυττάρων. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι τα κύτταρα που σχηματίζουν τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης προέρχονται από καρκινικά αρχέγονα κύτταρα.⁸⁷⁻⁸⁹

Τα κύτταρα του μελανώματος, τα οποία σχηματίζουν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, μοιάζουν με μη διαφοροποιημένα, προδρομικά, εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα με βάση την έκφραση των γονιδίων τους και το μοριακό τους αποτύπωμα.⁸⁷ Πιο συγκεκριμένα αυτά τα κύτταρα εκφράζουν γονίδια που απαντώνται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών, επιθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων, όπως επίσης και των νευρώνων και μυϊκών κυττάρων.⁹⁰ Επιπλέον αυτά τα κύτταρα εκφράζουν πολλά γονίδια που σχετίζονται με εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα όπως το NODAL.^{91,92} Κύτταρα μελανώματος που εκφράζουν το μέλος ABCB5 της συνδεδεμένης με το ATP κασέτας (ATP-binding cassette) θεωρούνται ‘αρχέγονα κύτταρα μελανώματος’ ή ‘κύτταρα που δημιουργούν το κακόηθες μελάνωμα’ και έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.^{93,94} Η υπερικογενεία ABC αποτελείται από ενεργούς μεμβρανικούς μεταφορείς οι οποίοι εκφράζονται σε αρχέγονα/προδρομικά κύτταρα και είναι υπεύθυνοι για την αντίσταση των κυττάρων σε πολλά διαφορετικά φάρμακα. Το CD133 (ανθρώπινη προμινίνη 1), μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη άγνωστης λειτουργίας που βρίσκεται σε αρχέγονα και προδρομικά κύτταρα, συνυπάρχει (βρίσκεται στην ίδια περιοχή του κυττάρου) με το αντιγόνο ABCB5, ενώ στο knockdown στο CD133 μειώθηκε η έκφραση του ABCB5 και της αγγειακής ενδοθηλιακής καντχερίνης [vascular endothelial (VE)-cadherin, γνωστή και σαν καντχερίνη 5 ή CD 144] και εμποδίστηκε η δημιουργία περιοχών μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε μυϊκά ξενομοσχεύματα ανθρωπίνων μελανωμάτων.⁹⁵ Ραγοειδικά κύτταρα μελανώματος που είναι ικανά να σχηματίζουν κανάλια μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης εκφράζουν το δείκτη αρχέγονων κακοήθων κυττάρων CD271 (γνωστό και ως υποδοχέα του νευρικού αυξητικού παράγοντα, nerve growth factor receptor, NGFR ή p75NTR) ο οποίος παίζει ρόλο

στην κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο. Κύτταρα μελανώματος που δεν ήταν ικανά να σχηματίσουν κανάλια μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης δεν εξέφρασαν αυτόν τον δείκτη.⁹⁶

Μετά από ανάλυση μικροσυστοιχιών σε περισσότερες από 30 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές δερματικών μελανωμάτων βρέθηκε ότι πολλά γονίδια που σχετίζονται με την αγγειογένεση και την αγγειακή διαφοροποίηση όπως αυτά που κωδικοποιούν την ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη, την τυροσινική κινάση 1 με περιοχές που μοιάζουν με τις ανοσοσφαιρίνες και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (tyrosine kinase with Ig-like and epidermal growth factor like domains 1, TIE1), την ινονεκτίνη-1 (fibronectin-1), και πολλά γονίδια σχετιζόμενα με επιθηλιακά κύτταρα όπως αυτά που κωδικοποιούν τον υποδοχέα 2 της εφρίνης τύπου Α (ephrin type-A receptor 2, EphA2) υπερεκφράζονται σε κύτταρα μελανώματος υψηλής κακοήθειας σε σύγκριση με κύτταρα μελανώματος χαμηλής κακοήθειας.⁹⁰ Επιπλέον γονίδια που σχετίζονται με την αγγειογένεση όπως αυτά που κωδικοποιούν διαφορετικούς προσδέτες των εφρινών και γονίδια που κωδικοποιούν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF) βρέθηκε να εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε περιοχές δικτύων που μοιάζουν με αγγειακές δομές σε σχέση με περιοχές τυχαία διατεταγμένων κυττάρων (φωλίες) σε κυτταρικές καλλιέργειες ραγοειδικών και δερματικών μελανωμάτων υψηλής κακοήθειας.⁹⁷

ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

EphA2/VE-καντχερίνη/Κινάση της τοπικής προσκόλλησης(focal adhesion kinase, FAK). Τα κυτταρικά μονοπάτια που απαντώνται στα αγγεία έχουν προεξάρχοντα ρόλο στη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης και μερικά μόρια που συμμετέχουν σε αυτές τις οδούς όπως ο EphA2 και η VE-καντχερίνη αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η οικογένεια των υποδοχέων της εφρίνης είναι η μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων των κινασών της τυροσίνης, αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, και παίζει ρόλο στην εμβρυονική αγγειακή διαφοροποίηση και την αγγειογένεση των ενηλίκων. Ανάλυση μικροαλληλουχιών αποκάλυψε ότι τα κύτταρα μελανώματος υψηλής κακοήθειας εκφράζουν πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς και προσδέτες της εφρίνης, συμπεριλαμβανομένου του EphA2 και του προσδέτη του εφρίνη-A1 (Ephrin-A1).^{90,97,98} Ο EphA2 εκφράζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και έχει ένα σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση των ενηλίκων και τη νεοαγγειογένεση των όγκων.⁹⁹ Βρέθηκε να έχει υψηλή έκφραση και να είναι φωσφορυλιωμένος σε επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς (υψηλής κακοήθειας) κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος τα οποία σχημάτιζαν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης *in vitro*, αλλά δεν εκφραζόταν σε κύτταρα μελανώματος χαμηλής κακοήθειας.⁸⁶ Επίσης η μείωση της έκφρασης του EphA2 σε επιθετικά κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος καθώς και σε επιθετικά κύτταρα δερματικού μελανώματος τα οποία είχαν την ικανότητα δημιουργίας δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης *in vitro*, εμπόδιζε το σχηματισμό αυτών των δικτύων.^{86,100}

Η VE-καντχερίνη, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, είναι ένα μόριο πρόσδεσης ειδικό των ενδοθηλιακών κυττάρων που είναι σημαντικό για την εμβρυονική

αγγειακή διαφοροποίηση. Βρέθηκε να εκφράζεται ισχυρά σε επιθητικά κύτταρα ραγοειδικού και δερματικού μελανώματος αλλά όχι σε καλλιέργειες κυττάρων μελανώματος χαμηλής κακοήθειας, ενώ το knockout του γονιδίου της εμπόδισε τη δημιουργία περιοχών μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.¹⁰¹ Η γενεστεΐνη (genistein), που είναι ισοφλαβόνη και φυτοοιστρογόνο, αναστέλλει το σχηματισμό δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες κυττάρων ραγοειδικού μελανώματος και σε μύες που είχαν προσλάβει ξενομοσχεύματα ανθρωπίνων κυττάρων ραγοειδικού μελανώματος, μέσω της μείωσης της έκφρασης της VE-καντχερίνης.¹⁰² Παρομοίως η υδροχλωρική λυκορόνη (licorine hydrochloride), το κύριο δραστικό συστατικό του παραδοσιακού κινέζικου βοτάνου *Lycoris radiata*, επίσης αναστέλλει το σχηματισμό δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες κυττάρων δερματικού μελανώματος και σε μύες που είχαν προσλάβει ξενομοσχεύματα ανθρωπίνων κυττάρων δερματικού μελανώματος, μέσω της μείωσης της έκφρασης της VE-καντχερίνης.¹⁰³

Ο EphA2 και η VE-καντχερίνη συνυπάρχουν σε κοντινή απόσταση στις συνδέσεις πρόσδεσης (adhesion junctions) των κυττάρων σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ραγοειδικού και δερματικού μελανώματος καθώς επίσης και σε τομές ιστού ραγοειδικού μελανώματος. Το knockout στο γονίδιο της VE-καντχερίνης είχε σαν αποτέλεσμα την ανακατανομή του EphA2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, τη μείωση της φωσφορυλίωσής του, την εξαφάνιση του EphA2 από τις συνδέσεις πρόσδεσης μεταξύ των κυττάρων και την εμφάνισή του στο κυτταρόπλασμα.¹⁰⁴ Το knockout στο γονίδιο του EphA2 δεν άλλαξε την κυτταρική εντόπιση της VE-καντχερίνης.

Στο κυτταρικό μονοπάτι που ξεκινάει από τον EphA2 και τη VE-καντχερίνη υπάρχουν μερικές κυτταρικές κινήσεις όπως η κίνηση τοπικής προσκόλλησης (focal

adhesion kinase, FAK) και η κινάση της φωσφατιδιλοϊνοσιτόλης 3 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) οι οποίες φωσφορυλιώνονται κατά τη μεταγωγή του σήματος. Η FAK φωσφορυλιώνεται σε συγκεκριμένες θέσεις τυροσίνης σε καλλιέργειες κυττάρων δερματικού και ραγοειδικού μελανώματος, αλλά όχι σε λιγότερο επιθετικά κύτταρα δερματικού και ραγοειδικού μελανώματος και ούτε σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα. Η FAK βρέθηκε επίσης φωσφορυλιωμένη σε επιθετικά δερματικά και ραγοειδικά μελανώματα *in situ*. Η συνδεόμενη με την FAK μη κινάση (FAK-related non-kinase, FRNK), η οποία διακόπτει τη λειτουργία της FAK, ανέστειλε το σχηματισμό μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες επιθετικών κυττάρων μελανωμάτων, μειώνοντας την έκφραση των ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια σήματα κινασών 1 και 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, ERK 1/2) και κατά συνέπεια μειώνοντας τη δραστικότητα της ουροκινάσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η FRNK δεν είχε οποιαδήποτε επίπτωση στις δραστικότητες της μεμβρανικής τύπου 1 μεταλλοπρωτεϊνάσης της εξωκυττάριας ουσίας (membrane type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP) και της μεταλλοπρωτεϊνάσης της εξωκυττάριας ουσίας 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2). Απευθείας αναστολή των ERK 1/2 οδήγησε σε μειωμένες δραστικότητες της ουροκινάσης και των MT1-MMP και MMP2, δείχνοντας ότι μπορεί να υπάρχει ένα εναλλακτικό μονοπάτι μεταγωγής σήματος ανεξάρτητο της FAK το οποίο είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση των ERK 1/2, όπως συμβαίνει στο μονοπάτι της ενεργοποιούμενης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης/κινάσης ρυθμιζόμενης από εξωκυττάριο σήμα (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase, MAPK/ERK).^{105,106} Το τελευταίο μονοπάτι είναι μερικώς υπεύθυνο για την ανασταλτική δράση της φορσκολίνης (forskolin) στη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε επιθετικά κύτταρα δερματικού και ραγοειδικού

μελανώματος in vitro.¹⁰⁷ Αυτό το οργανικό συστατικό που παράγεται από το φυτό ινδικό κολεό (Indian Coleus) δρα αυξάνοντας τα επίπεδα του κυτταρικού κυκλικού AMP (cAMP) και επίσης αναστέλλει τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης μέσω αναστολής της PI3K καθώς επίσης και μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ανταλλαγής η οποία ενεργοποιείται απευθείας από το cAMP και την πρωτεΐνη 1 τη σχετιζόμενη με το Ras (exchange protein directly activated by cAMP/Ras-related protein 1, EphA2/Rap1).¹⁰⁷ Η κουρκουμίνη (curcumin), μία φυσική φαινόλη, ανέστειλε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε ένα μοντέλο μελανώματος του χοριοειδούς σε αλλομόσχευμα μυός μέσω μείωσης της έκφρασης των EphA2, PI3K και MMP2.¹⁰⁸

Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και μεταλλοπρωτεΐνάσες εξωκυττάριας ουσίας. Ο κυτταρικός καταρράκτης που ξεκίνησε με την αύξηση της έκφρασης του EphA2 και της VE-καντχερίνης και συνεχίστηκε με τη φωσφορύλωση συγκεκριμένων κυτταροπλασματικών κινασών, οδηγεί στην αύξηση της έκφρασης μερικών μεταλλοπρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας (MMPs) με αποτέλεσμα τη διάσπαση μιας συγκεκριμένης λαμινίνης με συνακόλουθη αναδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας η οποία αποτελεί το μικροπεριβάλλον των κυττάρων του όγκου.

Η εξωκυττάρια ουσία δεν είναι ένα παθητικό και αδρανές συστατικό των ιστών, όπως θεωρούνταν στο παρελθόν, αλλά στην πραγματικότητα αλληλεπιδρά με τα κύτταρα. Επιτελεί τη δράση της στα κύτταρα κυρίως μέσω των λαμινινών οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες των βασικών μεμβρανών και συνεπώς συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας και οι οποίες ενώνονται με τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω υποδοχέων ιντεγκρίνης συμμετέχοντας και τροποποιώντας πολλές σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων όπως η κυτταρική προσκόλληση και η διαφοροποίηση. Αντίστροφα, τα κύτταρα είναι ικανά να επιδρούν πάνω στην εξωκυττάρια ουσία και

να τη τροποποιούν. Για παράδειγμα κύτταρα δερματικού μελανώματος χαμηλής κακοήθειας τα οποία εμβολιάστηκαν σε γέλη κολλαγόνου τύπου 1 που είχε δημιουργηθεί από επιθετικά κύτταρα μελανώματος σχημάτισαν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης κατά μήκος των περιοχών που ήταν πλούσιες σε $\gamma 2$ αλυσίδες της λαμινίνης 5 (laminin 5 $\gamma 2$ chain) οι οποίες είχαν δημιουργηθεί από τα επιθετικά κύτταρα μελανώματος. Επίσης αυτά τα κύτταρα χαμηλής κακοήθειας εξέφρασαν μία γονιδιακή ταυτότητα χαρακτηριστική επιθετικών κυττάρων.^{109,110} Οι MMPs είναι ενδοπεπτιδάσες εξαρτώμενες από τον ψευδάργυρο, ικανές να αποδομίσουν όλα τα είδη των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως επίσης και έναν αριθμό βιοενεργών μορίων, και συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση.

Έχει αποδειχτεί ότι τα επίπεδα του MT1-MMP (γνωστό και σαν MMP14) και της $\gamma 2$ αλυσίδας της λαμινίνης 5 είναι αυξημένα σε κύτταρα επιθετικών δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων *in vitro* και αυτές οι πρωτεΐνες υπάρχουν σε περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, ενώ η έκφρασή τους είναι μειωμένη σε κύτταρα δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων χαμηλής κακοήθειας. Αντισώματα κατά των μεταλλοπρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας MT1-MMP ή MMP2, ή αναστολή της $\gamma 2$ αλυσίδας της λαμινίνης 5 εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.¹⁰⁹ Αναστολή της κινάσης PI3K οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας των MT1-MMP και MMP2 και εμπόδισε τη διαίρεση της $\gamma 2$ αλυσίδας της λαμινίνης 5 με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα των $\gamma 2$ και $\gamma 2'$ προμεταναστευτικών κλασμάτων σε καλλιέργειες επιθετικών δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων. Επίσης εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης από αυτά τα κύτταρα.¹¹¹ Η θαλιδομίδη ανέστειλε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης *in vivo* σε ένα μοντέλο αλλομοσχεύματος

μελανώματος μυός μέσω αναστολής της έκφρασης των MMP2 και VEGF.¹¹² Η δοξυκυκλίνη επίσης μείωσε την έκφραση της MMP2 και εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε ένα μοντέλο αλλομοσχεύματος μελανώματος μυός.¹¹³ Η χημικά τροποποιημένη τετρακυκλίνη 3 (chemically modified tetracycline-3, CMT-3, γνωστή και σαν COL-3) ανέστειλε την έκφραση των MMP2 και VE-καντχερίνης in vitro τόσο σε κύτταρα επιθετικών δερματικών μελανωμάτων όσο και ραγοειδικών, ενώ ανέστειλε την έκφραση των MT1-MMP και TIE1 σε κύτταρα επιθετικών δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων, αντίστοιχα, και εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης και στα δύο είδη κυττάρων. Επίσης εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε κύτταρα μελανώματος χαμηλής κακοήθειας τα οποία είχαν ενοφθαλμιστεί σε διάμεση ουσία που είχε επωαστεί με επιθετικά κύτταρα μελανώματος, μέσω της μείωσης της παραγωγής προμεταναστευτικών κλασμάτων από την γ2 αλυσίδα της λαμίνης 5.¹¹⁴ Η βαντιμεζάνη (vadimezan ή DMXAA ή AS10404), ένα μικρό μόριο που διασπά την ακεραιότητα των αγγείων, ανέστειλε την έκφραση της MMP2 και εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες κυττάρων επιθετικών μελανωμάτων, ενώ η παράλληλη χρησιμοποίηση του SB203580, ενός εκλεκτικού αναστολέα του p378 MAPK αποκατέστησε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης χωρίς να επηρεάζεται η έκφραση της MMP2.¹¹⁵

Μόρια εμβρυονικών αρχέγονων κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κύτταρα όγκων που σχηματίζουν δομές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης υπερεκφράζουν διάφορα μόρια εμβρυονικών αρχέγονων κυττάρων. Δύο σημαντικά τέτοια μόρια είναι το Nodal και το Notch. Το Nodal είναι ένα μορφογόνο και ρυθμιστής της διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων το οποίο εκφράζεται κατά

τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και ανήκει στην υπεροικογένεια του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor beta, TGF β). Η οικογένεια των υποδοχέων Notch είναι επίσης σημαντική για τον καθορισμό της διαφοροποίησης των εμβρυονικών αρχέγονων κυττάρων και αποτελείται από 4 διαμεμβρανικούς υποδοχείς συμπεριλαμβανομένου του Notch4, και 5 προσδέτες οι οποίοι συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το Notch4 εκφράζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα και συμμετέχει στη δημιουργία και την αναδόμηση των αγγείων, καθώς και στην αγγειογένεση των όγκων. Το Notch4 εκφράστηκε αποκλειστικά από επιθετικές κυτταρικές σειρές μελανωμάτων *in vitro* σε αντίθεση με άλλα μέλη της οικογένειας του Notch. Ο περιορισμός της έκφρασης του Notch4 μείωσε την έκφραση του Nodal σε επιθετικές κυτταρικές σειρές μελανωμάτων. Η αναστολή της δραστηριότητας του Notch4 εμπόδισε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε κύτταρα μελανώματος επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς, ενώ η προσθήκη εξωγενούς πρωτεϊνικού προϊόντος Nodal σε αυτά τα κύτταρα αποκατέστησε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η έκφραση του Nodal και της VE-καντχερίνης επίσης αποκαταστάθηκε σε αυτά τα κύτταρα με τη χρήση εξωγενώς παραγόμενου Notch4. Τα προηγούμενα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το Notch4 ευνοεί τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης αυξάνοντας την έκφραση του Nodal.¹¹⁶ Σε μυϊκά ξενομοσχεύματα μελανώματος το mRNA του Nodal βρέθηκε αποκλειστικά σε περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.⁹¹ Ανθρώπινα επιθετικά κύτταρα δερματικού μελανώματος τα οποία επώαστηκαν με αντισώματα εναντίον του Nodal που εμπόδιζαν τη λειτουργία του, είχαν μειωμένη δυνατότητα παραγωγής μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.¹¹⁷

Υποξία, παράγοντας επαγόμενος από την υποξία 1α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF1 α), αντιδραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), και

VEGF. Η υποξία των ιστών παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου και τη δημιουργία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Παράγοντες που επάγονται από την υποξία είναι μεταγραφικοί παράγοντες που απαντούν σε αλλαγές της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Η υποξία σταθεροποιεί τον HIFα ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί πολλά γονίδια όπως το *VEGF* για να υποστηρίξει την επιβίωση κάτω από συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Η υποξία οδήγησε στην έκφραση των HIF1α, MMP2 και *VEGF* και προώθησε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης *in vivo* όπως αποδείχτηκε με τη μεταφορά μυϊκών κυττάρων μελανώματος σε ισχαιμικά άκρα μυών και σε μη ισχαιμικά άκρα (ομάδα αναφοράς), οδηγώντας σταδιακά σε μελανώματα ίδιου μεγέθους στα ισχαιμικά και στα μη ισχαιμικά άκρα παρά τον αρχικό μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης του μεγέθους του όγκου στα ισχαιμικά άκρα.¹¹⁸

Το ογκογονίδιο του λεμφώματος-2 βήτα κυτταρικού τύπου (B-cell lymphoma-2, BCL2), μπορεί επίσης να συμβάλλει στην επαγωγή της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης από την υποξία σε κυτταρικές καλλιέργειες μελανώματος.¹¹⁹ Η επώαση επιθετικών κυττάρων μελανώματος σε υποξικές συνθήκες αύξησε τα επίπεδα των ROS και HIF1α και ενίσχυσε την ικανότητα δημιουργίας δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στις κυτταρικές καλλιέργειες, ενώ η αναστολή του HIF1α οδήγησε στην κατάργηση της δημιουργίας δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε αλλομοσχεύματα μυός. Επιπλέον η αναστολή των ROS οδήγησε στην κατάργηση της δημιουργίας δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε αλλομοσχεύματα μυός.¹²⁰ Αυτά τα ευρήματα μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν τη βραχύχρονη αποτελεσματικότητα, την αποτυχία, ή ακόμα και την προμεταστατική δράση των αντιαγγειογενετικών θεραπειών οι οποίες δρουν περιορίζοντας τη νεοαγγείωση των όγκων και επάγοντας

υποξία.¹²¹⁻¹²³ Τα αντιοξειδωτικά μείωσαν τους ROS, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 και κατάργησαν τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε κύτταρα δερματικού μελανώματος in vitro και σε αλλομοσχεύματα μυός.¹²⁴

Οι αναστολείς της αγγειογένεσης άγκινεξ (anginex), TNP-470 και ενδοστατίνη δεν εμπόδισαν την ικανότητα σχηματισμού δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες επιθετικών κυττάρων δερματικού και ραγοειδικού μελανώματος.¹²⁵

Ο VEGFR1 έχει ιδιότητες τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης και είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας του VEGF-A, με σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην αγγειογένεση. Ο VEGFR1 εκφράζεται έντονα στους υποπληθυσμούς μελανοκυττάρων που είναι θετικοί στο δείκτη ABCB5 και οι οποίοι επάγουν τη δημιουργία μελανώματος και σχετίζονται με τη μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης. Το knockdown στον VEGFR1 ανέστειλε τη δημιουργία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε μυϊκά ξενομοσχεύματα ανθρωπίνου μελανώματος.⁹³ Ο VEGFR3 έχει ιδιότητες τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης και είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας των VEGF-C και D, με σημαντικό ρόλο στη λεμφοαγγειογένεση. Ο VEGFR3 επίσης φαίνεται να έχει ρόλο στη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης in vitro σε κύτταρα δερματικού μελανώματος.¹²⁶ Το μονοπάτι της ενδοθηλίνης 1-υποδοχέα B της ενδοθηλίνης συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις στρώματος-μελανοκυττάρων επάγοντας την ανάπτυξη το όγκου, τη νεοαγγειογένεση, τη λεμφοαγγειογένεση και τις μεταστάσεις. Υπάρχει μεταφορά σημάτων (cross talk) μεταξύ του υποδοχέα B της ενδοθηλίνης και του VEGFR3.¹²⁶ Η ενδοθηλίνη 1 σε συνδυασμό με τον VEGFR3 αύξησε περαιτέρω τη φωσφορυλίωση του VEGFR3 και τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε σύγκριση με τη μεμονωμένη χρήση της ενδοθηλίνης 1 ή του

VEGFC.¹²⁶ Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ανθρώπινα ραγοειδικά μελανώματα μεθίστανται αποκλειστικά μέσω των αιμοφόρων αγγείων, ενώ στα δερματικά μελανώματα το λεμφικό σύστημα παίζει επίσης σπουδαίο ρόλο.

Άλλα μόρια και οδοί μεταγωγής σήματος. Για να είναι λειτουργικά τα δίκτυα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, η αιματική ροή μέσω αυτών πρέπει να διευκολύνεται και φαίνεται ότι αυτό τουλάχιστον μερικώς επιτυγχάνεται μέσω της αναστολής της πήξης του αίματος. Ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF) και οι αναστολείς 1 και 2 του μονοπατιού του ιστικού παράγοντα (TF pathway inhibitor 1 ή TFPI1, και TFPI2) εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από κύτταρα επιθετικών δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων σε σύγκριση με κύτταρα δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων χαμηλής κακοήθειας. Ο TF είναι υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας που αποτελεί το πρώτο μόριο του καταρράκτη της πήξης (εξωγενές μονοπάτι) και χρησιμεύει σαν συμπαράγοντας για τον VIIa. Η προθρομβωτική δράση του TF στα επιθετικά κύτταρα μελανώματος ρυθμίζεται από τον TFPI1, έναν αντιστρεπτό αναστολέα του παράγοντα Xa, αλλά όχι από τον TFPI2. Αυτή η ιδιότητα του TFPI1 μπορεί να διευκολύνει την ικανότητα που έχουν τα δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης να μεταφέρουν υγρά. Ο TFPI2 είναι σημαντικός για το σχηματισμό δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης μέσω ενός εναλλακτικού, ανεξάρτητου της πήξης, μηχανισμού. Η χρήση αντισώματος έναντι του TFPI2 μείωσε τη δραστηριότητα της MMP2 και επίσης ανέστειλε εντελώς τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλλιέργειες επιθετικών κυττάρων δερματικών και ραγοειδικών μελανωμάτων.⁸⁵

Άλλα μόρια όπως εξωκυτταρικά εκκρινόμενες πρωτεΐνες π.χ. ο προερχόμενος από το μελάγχρουν επιθήλιο παράγοντας (pigment epithelium-derived factor), η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 4 (bone morphogenic protein 4, BMP4) ή

ενδοκυττάρια μόρια όπως η πρωτεΐνη 2 του αναστολέα της σύνδεσης/διαφοροποίησης του DNA (inhibitor of DNA binding/differentiation protein 2), και η κασπάση-3 έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.

Ο προερχόμενος από το μελάγχρουν επιθήλιο παράγοντας είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια των αναστολέων της πρωτεάσης της σερίνης. Ο παράγοντας αυτός δεν έχει ιδιότητες αναστολέα της πρωτεάσης της σερίνης και πιθανόν συνδέεται με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας για να ενεργοποιήσει διάφορους καταρράκτες σήματος. Έχει αντιαγγειογενετική και άμεση αντινεοπλασματική δράση. Το knockdown του προερχόμενου από το μελάγχρουν επιθήλιο παράγοντα σε κυτταρικές σειρές μελανωμάτων χαμηλής κακοήθειας αύξησε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης in vitro.¹²⁷

Μια άλλη εξωκυττάρια πρωτεΐνη, η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 4, ευνοεί τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Οι BMPs είναι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες που ανήκουν στην υπερικογένεια του TGFβ και οι οποίοι ελέγχουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η χημειοταξία, η κινητικότητα και ο κυτταρικός θάνατος διαφόρων κυτταρικών τύπων όπως τα επιθηλιακά και τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Είναι επίσης εμβρυονικά μορφογόνα και σχετίζονται με τη δημιουργία και την ανάπτυξη των όγκων. Η αναστολή της BMP4 οδήγησε στη μείωση της έκφρασης του EphA2 και της VE-καντχερίνης και ανέστειλε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε επιθετικά κύτταρα δερματικού μελανώματος in vitro.¹²⁸

Οι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες στη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η πρωτεΐνη 2 του

αναστολέα της σύνδεσης/διαφοροποίησης του DNA αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα. Οι πρωτεΐνες του αναστολέα της σύνδεσης/διαφοροποίησης του DNA (inhibitors of DNA binding/differentiation proteins, Id proteins) ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες ετεροδιμερίζονται με βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν δομή έλικας-αγκύλης-έλικας με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την πρόσδεση των τελευταίων στο DNA. Οι πρωτεΐνες Id περιέχουν μία δομή έλικας-αγκύλης-έλικας (περιοχή ετεροδιμερισμού), αλλά δεν έχουν την περιοχή που ενώνεται με το DNA και έτσι ρυθμίζουν αρνητικά τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν δομή έλικας-αγκύλης-έλικας όταν ετεροδιμερίζονται με αυτούς. Μεταξύ άλλων λειτουργιών οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των αρχέγονων και των νεοπλασματικών κυττάρων. Το knockdown του Id2 σε επιθητικά κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος *in vitro* οδήγησε σε μειωμένη έκφραση της VE-καντχερίνης και ανέστειλε τη δημιουργία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.¹²⁹

Η κασπάση-3, μία άλλη ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, σχετίζεται με τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Οι κασπάσες (ή πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού ή εξαρτώμενες από κυστεΐνη και κατευθυνόμενες από ασπαρτικό πρωτεάσες) αποτελούν μία οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης που συμμετέχουν στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και σε αρκετές μη αποπτωτικές κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση. Υψηλότερα επίπεδα ενεργού κασπάσης-3 ανιχνεύθηκαν σε μη αποπτωτικά κύτταρα δερματικού μελανώματος *in situ* τα οποία είχαν σχηματίσει δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν σχημάτισαν αυτά τα δίκτυα. Με τη χρήση μικρών δόσεων αναστολέα της κασπάσης-3 οι οποίες μείωσαν τη δραστηριότητα της κασπάσης-3 χωρίς να επηρεάσουν την κυτταρική απόπτωση σε καλλιέργειες κυττάρων δερματικού μελανώματος *in vitro*,

μειώθηκε η δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, αποδεικνύοντας ότι η κασπάση-3 έχει ένα σημαντικό ρόλο στη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, πιθανώς διασπώντας το pro-MMP2 με παραγωγή του MMP2.¹³⁰ Φαίνεται ότι η ενεργός κασπάση-3 προάγει τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης και μέσω της αποπτωτικής της δράσης. Η ενεργός κασπάση-3 ήταν αρχικά μη ανιχνεύσιμη, αλλά εμφανίστηκε μέσα σε λίγες ώρες και προοδευτικά συσσωρεύτηκε σε καλλιέργειες κυττάρων μελανώματος τα οποία σχημάτιζαν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Ο αποπτωτικός δείκτης ήταν υψηλότερος σε επιθητικά κύτταρα δερματικού μελανώματος τα οποία σχημάτιζαν δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης *in vitro* σε σχέση με κύτταρα χαμηλής κακοήθειας τα οποία δεν σχημάτιζαν αυτά τα δίκτυα.¹²⁴ Η αναστολή της δράσης της κασπάσης-3 με τη χρησιμοποίηση ενός ευρέως φάσματος αναστολέα των κασπασών ή ενός εκλεκτικού αναστολέα της κασπάσης-3 παρεμπόδισε τη δημιουργία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.¹³¹

Η γκαλεκτίνη-3, ένα μέλος της οικογένειας των λεκτινών, είναι μία πρωτεΐνη που συνδέεται με την β-γαλακτοσίδη και εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου και των μεταστάσεων. Εκφράζεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα, την κυτταρική επιφάνεια και τον εξωκυττάριο χώρο. Το knockout στη γκαλεκτίνη-3 εμφάνισε μείωση της έκφρασης της VE-καντχερίνης και της ινονεκτίνης-1 καθώς και κατάργηση της δημιουργίας δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε επιθητικά κύτταρα δερματικού μελανώματος *in vitro*. Επίσης το knockout μείωσε την έκφραση της VE-καντχερίνης και της MMP2 σε ένα ξενομόσχευμα μυός.¹³²

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η παρουσία δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε ασθενείς με κακοήθεις όγκους έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί έναν ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα σε πολλές περιπτώσεις. Ασθενείς με μελανώματα, τόσο δερματικά όσο και ραγοειδικά, που είχαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης είχαν χειρότερη πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση σε σχέση με αντίστοιχους ασθενείς με μελανώματα που δεν είχαν τέτοιες περιοχές. Το ίδιο βρέθηκε και σε άλλες κακοήθειες, αλλά όχι σε όλους τους κακοήθεις όγκους που μελετήθηκαν.^{74,77,78,133-135}

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγγειογένεσης, καθώς και της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, σε καλοήγη και κακοήγη μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών.

Αναλυτικότερα μελετήθηκαν:

- Η ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα σε μελανώματα της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής, η πλειοψηφία των οποίων ήταν μελανώματα του χοριοειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Η μικροαγγειακή πυκνότητα μελετήθηκε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των πανενδοθηλιακών δεικτών CD31 και CD34. Τα μελανώματα χωρίστηκαν σε ραγοειδικά και δερματικά ανάλογα με την ανατομική τους θέση, σε μελανώματα επιθηλιοειδών κυττάρων, μεικτού κυτταρικού πληθυσμού και μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων ανάλογα με τον ιστολογικό τους τύπο, και σε μελανώματα υψηλού και χαμηλού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας ανάλογα με το μέγεθος του μιτωτικού ρυθμού.
- Η ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα σε σπίλους της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής, η πλειοψηφία των οποίων ήταν σπίλοι επιπεφυκότα.
- Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε μελανώματα της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής. Η μελέτη έγινε σε τομές των όγκων που είχαν βαφτεί με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, με αντιπαράβολή αυτών των τομών με διαδοχικές τομές που είχαν βαφτεί ανοσοϊστοχημικά με αντισώματα έναντι του CD31 ή του CD34.
- Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε σπίλους της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή είναι μια αναδρομική μελέτη η οποία χρησιμοποίησε υλικό από το αρχείο του Τμήματος Παθολογοανατομίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων, καθώς και παθολογοανατομικό υλικό από το Νοσοκομείο 'Υγεία'. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε μελανοκυτταρικούς όγκους του οφθαλμού και της περιοφθαλμικής περιοχής συμπεριλαμβανομένης της προωτιαίας περιοχής. Η διάγνωση των όγκων είχε γίνει από το 2011 έως το 2015. Στη μελέτη μας δεν συμπεριλάβαμε παιδιατρικούς ασθενείς (<18 ετών). Εξετάσαμε ιστολογικές τομές από 154 ασθενείς. Ο προσδιορισμός της μικροαγγειακής πυκνότητας κατέστη δυνατός σε 118 ασθενείς. Ογδόντα οκτώ από τους ασθενείς είχαν καλοήθεις σπίλους, εκ των οποίων οι περισσότεροι ήταν σπίλοι επιπεφυκότα, ενώ οι υπόλοιποι 30 ασθενείς είχαν κακοήγη μελανώματα, η πλειοψηφία των οποίων εντοπιζόταν στον χοριοειδή χιτώνα του οφθαλμού (Πίνακας 1). Στη μελέτη μας δεν υπήρξε ούτε ένας δυσπλαστικός σπίλος, πιθανόν λόγω του γεγονότος ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η αφαίρεση των οφθαλμικών και περιοφθαλμικών σπίλων έγινε για κοσμητικούς λόγους και όχι λόγω υποψίας για κακοήθεια βάσει των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Επίσης δεν υπήρξε καμία περίπτωση πρωτοπαθούς επίκτητης μελάνωσης ή κακοήθους μελανώματος του επιπεφυκότα λόγω της σπανιότητας των νοσολογικών αυτών οντοτήτων. Διαδοχικές ιστολογικές τομές χρωματίστηκαν με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και ανοσοϊστοχημικά. Η αγγειογένεση εκτιμήθηκε με τη μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών δεικτών CD31 και CD34. Αυλοί που έμοιαζαν με αγγειακές δομές μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και οι οποίοι δεν επενδύονταν από

ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς ήταν αρνητικοί για το CD31 ή το CD34, αντιπροσώπευαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα καθορίστηκε με τη χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης που πραγματοποιήθηκε σε ένα ημιαυτοματοποιημένο μηχάνημα (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) με τη χρήση ενός συστήματος αντίχνευσης που βασιζόταν σε τεχνολογία πολυμερών και όχι στη βιοτίνη. Για κάθε αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο και στανταρισμένο πρωτόκολλο που αποτελείται από 100 περίπου αυτόματα βήματα, με μοναδικό χειροκίνητο βήμα την προσθήκη του αντισώματος. Ιστολογικές τομές πάχους 5μm δημιουργήθηκαν από ένα αντιπροσωπευτικό για κάθε ασθενή δείγμα το οποίο είχε υποστεί μονιμοποίηση σε φορμόλη και είχε εμβυθιστεί σε παραφίνη. Περιληπτικά η αυτοματοποιημένη διαδικασία ξεκινά με αποπαραφίνωση των τομών η οποία ακολουθείται από επανυδάτωση (με εμβύθιση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα), ανάκτηση των αντιγόνων με θέρμανση, και ανοσοϊστοχημεία με μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι του CD31 (κλώνος JC70, αραιώση 1:50, χρόνος επώασης 32 min, Cell Marque, Roclin, CA, USA) ή με μονοκλωνικό αντίσωμα μύος έναντι του CD34 (κλώνος QBEnd/10, αραιώση 1:70, χρόνος επώασης 32 min, Leica, Nussloch, Germany). Το σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου έγινε ορατό με τη χρήση του χρωμογόνου της τετραϋδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης, ενώ η αιματοξυλίνη Harris χρησιμοποιήθηκε σαν αντίθετη χρώση.¹³⁶

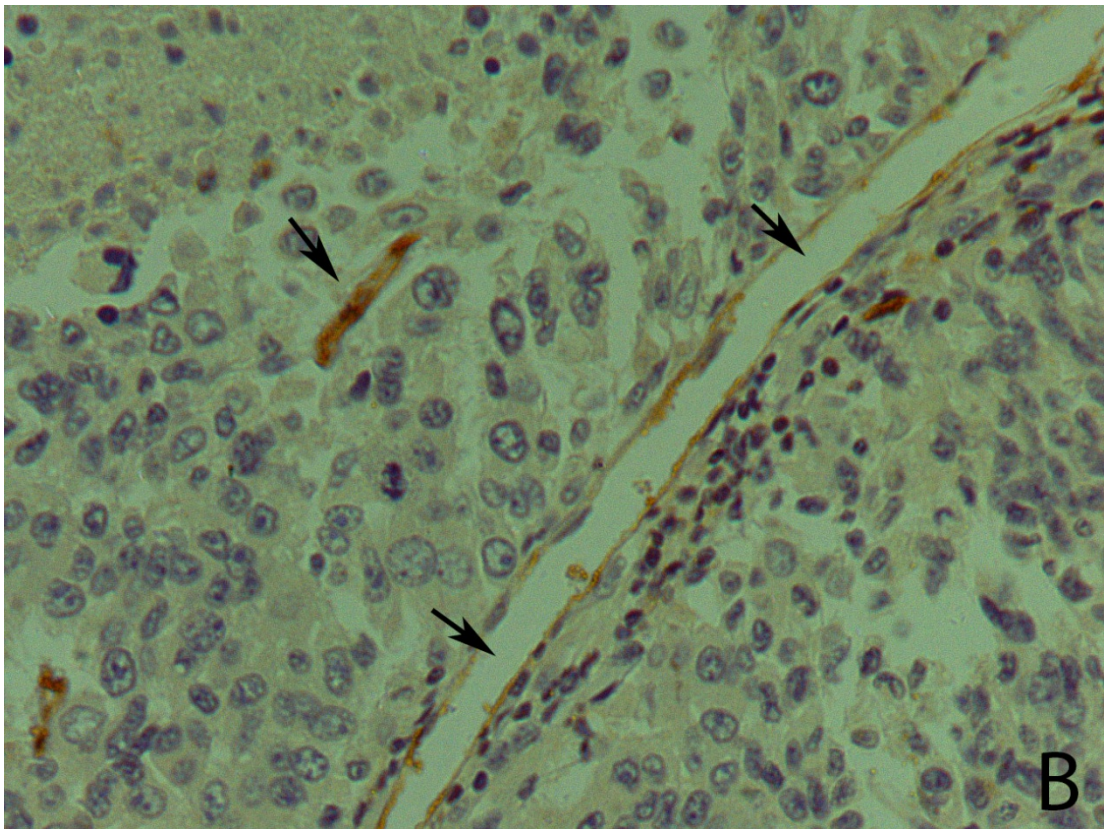
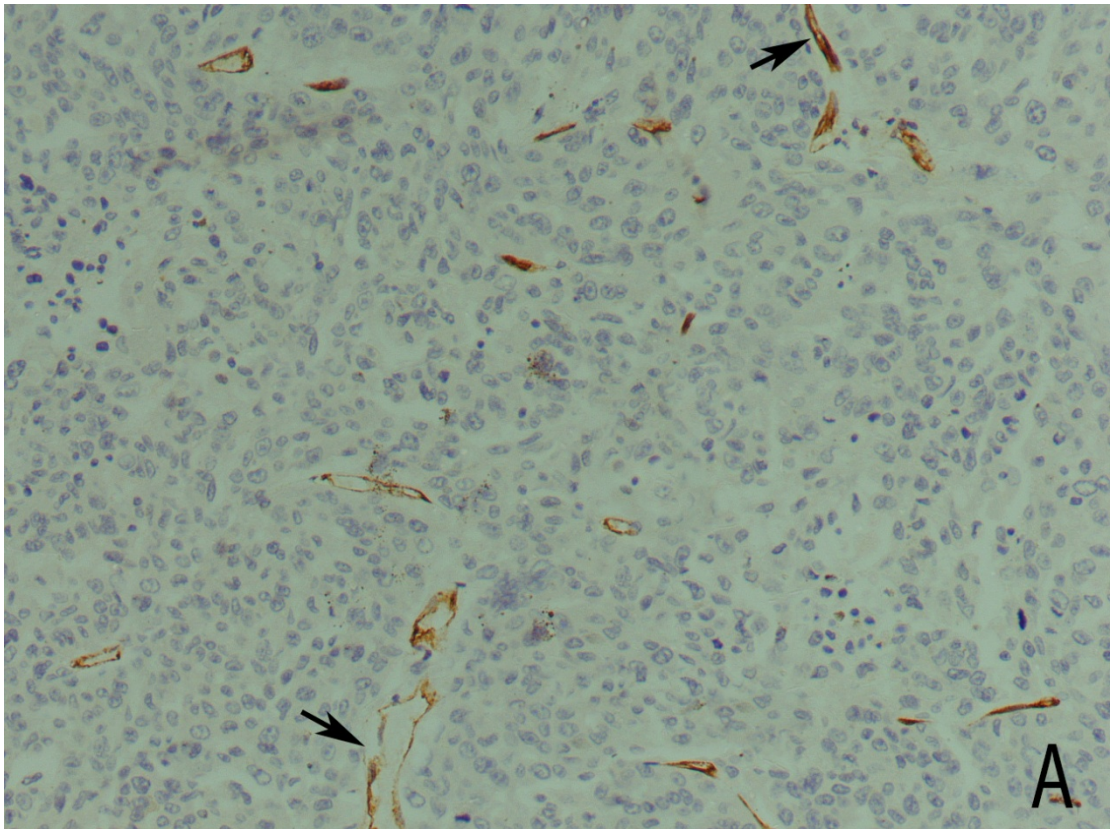
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

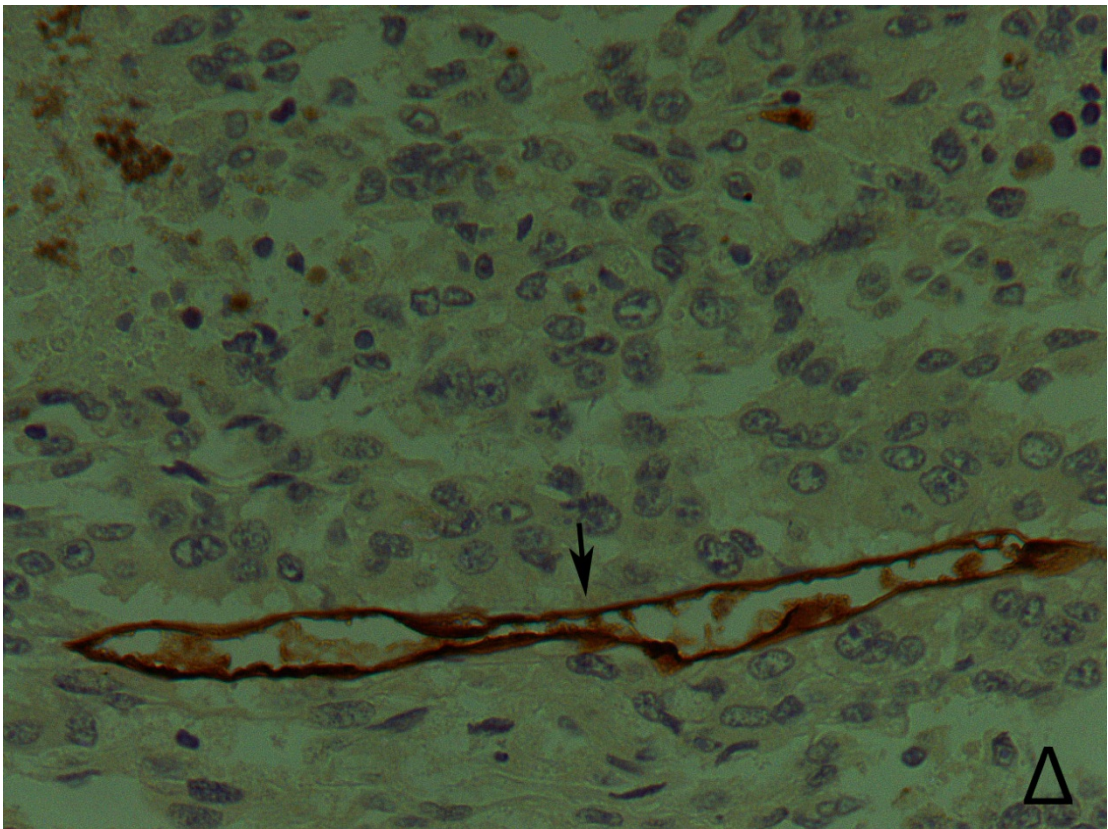
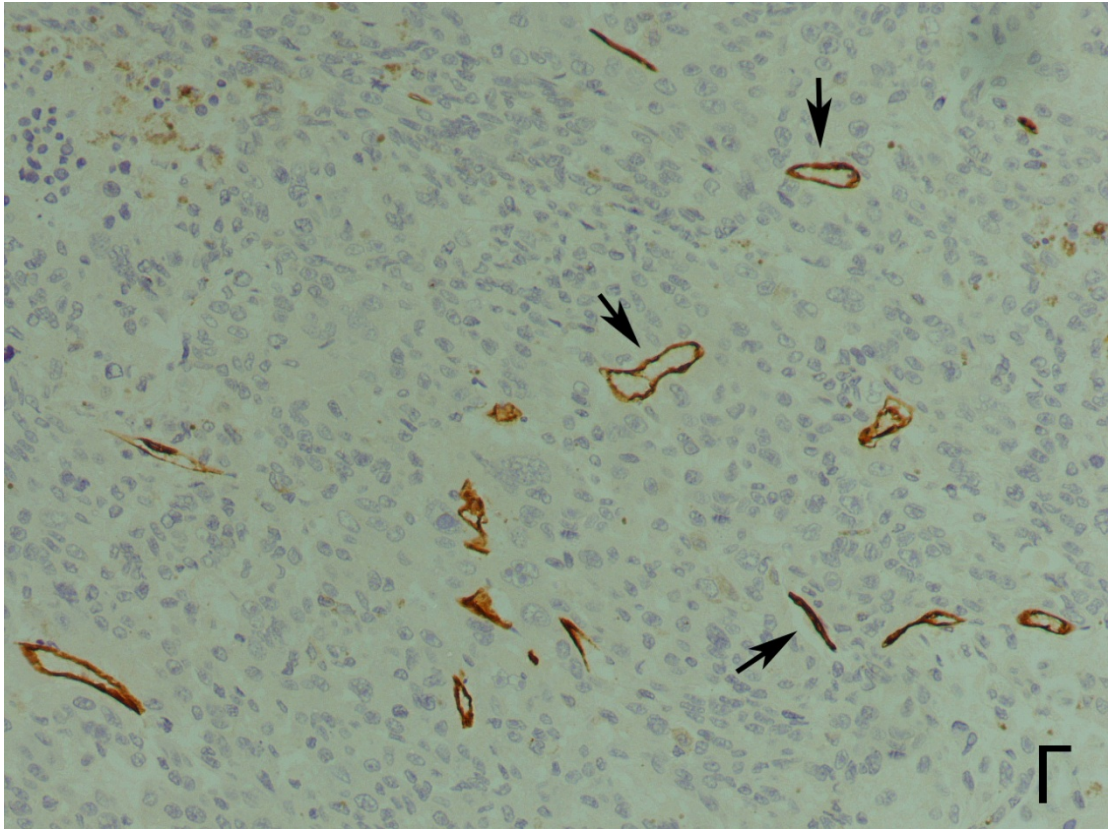
Η μικροαγγειακή πυκνότητα εκτιμήθηκε με μια τροποποίηση της μεθόδου του Weidner.⁵⁷ Περιληπτικά, οι χρωματισμένες τομές εξετάστηκαν αρχικά σε χαμηλή μεγέθυνση (100X) για να αναγνωριστούν οι περιοχές του όγκου με την υψηλότερη νεοαγγείωση (hot spots). Σε κάθε τομή επιλέχτηκαν οι 3 πιο αγγειοβριθείς περιοχές. Ο βαθμός της χρώσης με το αντίσωμα έναντι του CD31 ή του CD34 και συνεπώς ο αριθμός των μικροαγγείων και το μέγεθος της μικροαγγειακής πυκνότητας όπως αυτή εκφράζεται ως αριθμός μικροαγγείων/mm² εκτιμήθηκε στη μεγέθυνση 200X του οπτικού μικροσκοπίου (Nikon Labophot)(Εικόνα 4). Υπολογίστηκε ο μέσος όρος στις 3 επιλεγμένες περιοχές (το εμβαδόν της κάθε περιοχής ήταν 0.6mm²) κάθε όγκου. Κάθε ενδοθηλιακό κύτταρο ή συνονθύλευμα ενδοθηλιακών κυττάρων ξεχωριστό από γειτονικά μικροαγγεία θεωρήθηκε ένα μικροαγγείο. Τα νούμερα της μικροαγγειακής πυκνότητας υπολογίστηκαν με καταμέτρηση ενός προς ενός των μικροαγγείων.

Καλοήθειες Σπίλοι	88			
Επιπεφυκότα	58	(66%)	Χοριακοί/Υποεπιθηλιακοί	48 (54.5%)
Βλεφάρων	24	(27%)	Σύνθετοι	36 (41%)
Άλλοι	6	(7%)	Συνδεσμικοί	4 (4.5%)
Συνολικά Μελανώματα	30			
Ραγοειδικά Μελανώματα	23	(77%)	Επιθηλιοειδών Κυττάρων	3 (13%)
Χοριοειδικά	19	(63.5%)	Ατρακτοειδών Κυττάρων	10 (43.5%)
Ίριδας	3	(10%)	Μικτού Πληθυσμού	10 (43.5%)
Ακτινωτού Σώματος	1	(3.5%)		
Δερματικά Μελανώματα	7	(23%)		

* ΔΜΕ, Δείκτης Μιτωτικής Ενεργότητας

Πίνακας Ι. Κατανομή των καλοήθων σπύλων ανάλογα με τη τοποθεσία τους και τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά (ανώτερο μέρος του πίνακα) και κατανομή των κακοήθων μελανωμάτων ανάλογα με το γενικό τους τύπο, την τοποθεσία, τον κυτταρολογικό τύπο και το δείκτη μιτωτικής ενεργότητας (ΔΜΕ) (κατώτερο μέρος του πίνακα).





Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημεία μελανώματος του χοριοειδούς επιθηλιοειδών κυττάρων με χρώση έναντι του CD31 (διαμινοβενζιδίνη X200 και X400) (Α και Β, αντίστοιχα), και του CD34 (διαμινοβενζιδίνη X200 και X400) (Γ και Δ, αντίστοιχα). Μερικά από τα νεοαγγεία έχουν επισημανθεί με βέλη. Στο μελάνωμα αυτό δεν εντοπίσαμε περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης.

ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ

Μια τροποποίηση της ταξινόμησης κατά Calender χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την κατηγοριοποίηση των μελανωμάτων σε 3 ιστολογικούς τύπους.⁹ Στην περίπτωση των μελανωμάτων ατρακτοειδών κυττάρων, τα ατρακτοειδή κύτταρα αποτελούσαν πάνω από το 90% του συνόλου των μελανοκυττάρων. Ως μελανώματα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού χαρακτηρίστηκαν αυτά με >10% επιθηλιοειδή κύτταρα και <90% ατρακτοειδή κύτταρα. Τα μελανώματα επιθηλιοειδών κυττάρων αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από επιθηλιοειδή κύτταρα (>90% επιθηλιοειδή κύτταρα). Η συντριπτική πλειοψηφία των δερματικών μελανωμάτων στη μελέτη μας ήταν μελανώματα επιθηλιοειδών κυττάρων και αυτός ήταν ένας λόγος που δεν συμπεριλάβαμε τα δερματικά μελανώματα στη στατιστική ανάλυση σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο. Επιπλέον τα δερματικά μελανώματα κατηγοριοποιούνται ιστολογικά σε διάφορα είδη όχι με βάση το ποσοστό των ατρακτοειδών ή επιθηλιοειδών κυττάρων αλλά βάσει άλλων ιστολογικών χαρακτηριστικών, με τα επιφανειακώς εξαπλούμενα και τα οζώδη μελανώματα να αποτελούν δύο από τους πιο συχνούς τύπους (και τα δύο αυτά είδη έχουν μεγάλο αριθμό επιθηλιοειδών κυττάρων).^{11,23}

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΤΩΣΕΩΝ

Ο δείκτης μιτωτικής ενεργότητας (ΔΜΕ) χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο εκτίμησης της μιτωτικής δραστηριότητας. Ο δείκτης μιτωτικής ενεργότητας ορίζεται ως ο αριθμός των μιτώσεων ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγένθυσης (high power field, HPF). Ο ΔΜΕ εκτιμήθηκε σε ιστολογικές τομές βαμμένες με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Τα μελανώματα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση το ΔΜΕ. Τα μελανώματα χαμηλού ΔΜΕ είχαν λιγότερες από δύο μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης

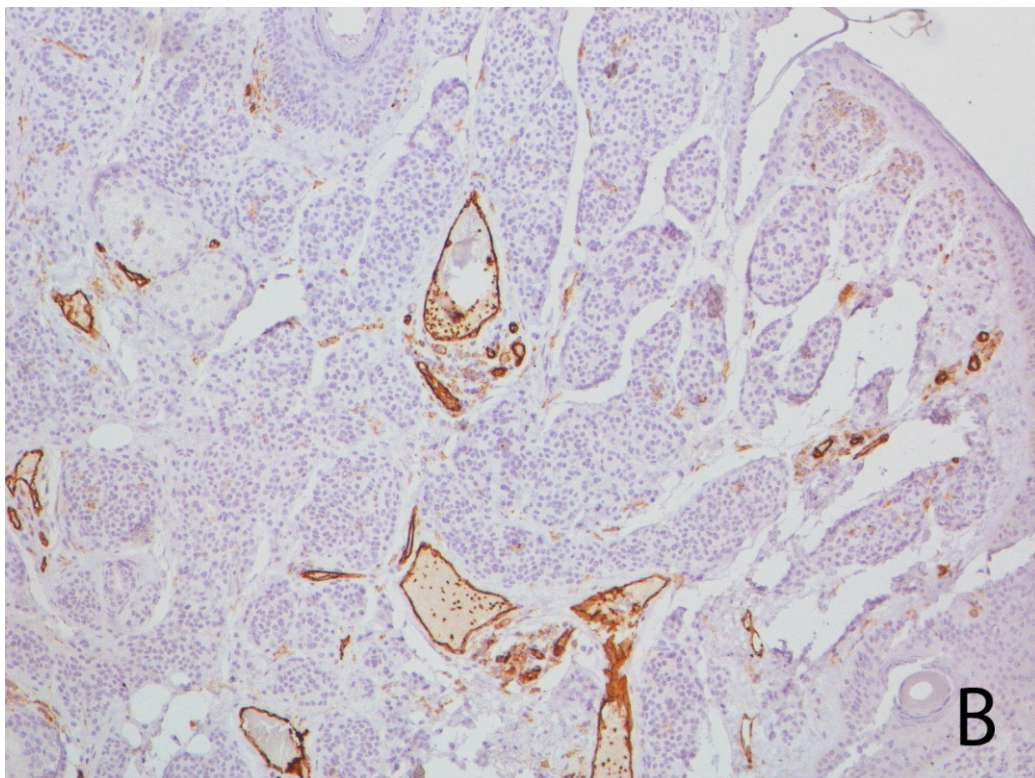
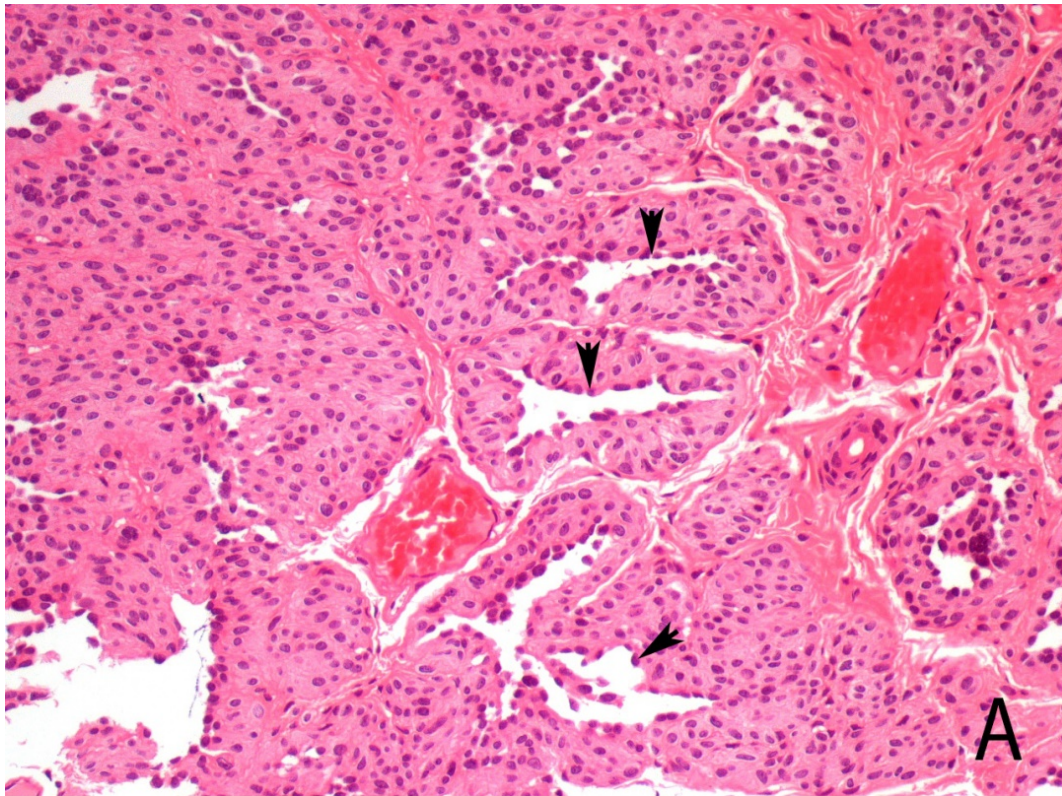
μεγένθυσης, ενώ οι όγκοι υψηλού ΔΜΕ είχαν δύο ή περισσότερες από δύο μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγένθυσης. Οι μιτώσεις μετρήθηκαν σε περιοχές με πλούσια κυτταροβρίθεια οι οποίες δεν εμφάνιζαν νέκρωση ή φλεγμονή. Έγινε επιλογή των περιοχών με μεγάλο αριθμό μιτώσεων συγκριτικά με άλλες περιοχές του εκάστοτε όγκου. Η καταμέτρηση έγινε σε 10 διαδοχικές περιοχές, κάθε μία από τις οποίες είχε εμβαδό 0.152mm^2 , με αποτέλεσμα η συνολική επιφάνεια να ανέρχεται σε 1.52mm^2 (μεγέθυνση 400X). Ο προσδιορισμός των μιτώσεων έγινε με μεγάλη προσοχή για να αποφευχθεί η προσμέτρηση των αποπτωτικών σωματίων και των νεκρωτικών κυττάρων.

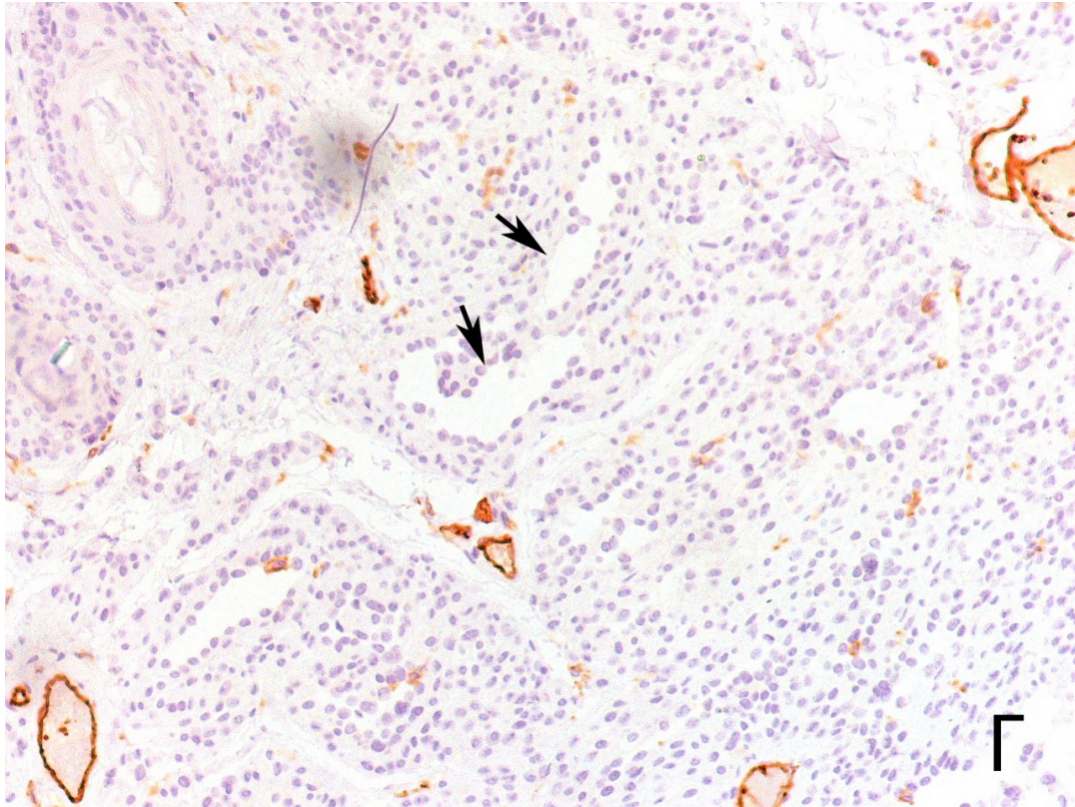
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για κάθε ασθενή, ιστολογικές τομές πάχους $5\mu\text{m}$ κόπηκαν από ιστό, ο οποίος είχε μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και εμβυθιστεί σε παραφίνη, και χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης εκτιμήθηκε σε αυτές τις τομές (Εικόνες 5,6). Κανάλια που έμοιαζαν με αγγειακές δομές ανάμεσα σε νεοπλασματικά κύτταρα και τα οποία δεν επενδύονταν από κύτταρα με μορφολογικά χαρακτηριστικά ενδοθηλιακών κυττάρων αντιπροσώπευαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Αυτές οι περιοχές δεν βάφονταν σε αντίστοιχες τομές που είχαν χρησιμοποιηθεί για ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι του CD31 ή του CD34. Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης εκτιμήθηκε ποιοτικά και οι όγκοι χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες βάσει της έκτασης των περιοχών που εμφάνιζαν αυτό το φαινόμενο. Όγκοι χωρίς περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης βαθμολογήθηκαν με 0, ενώ όγκοι με λίγες/μικρές και πολλές/μεγάλες περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης βαθμολογήθηκαν με + ή ++, αντίστοιχα.

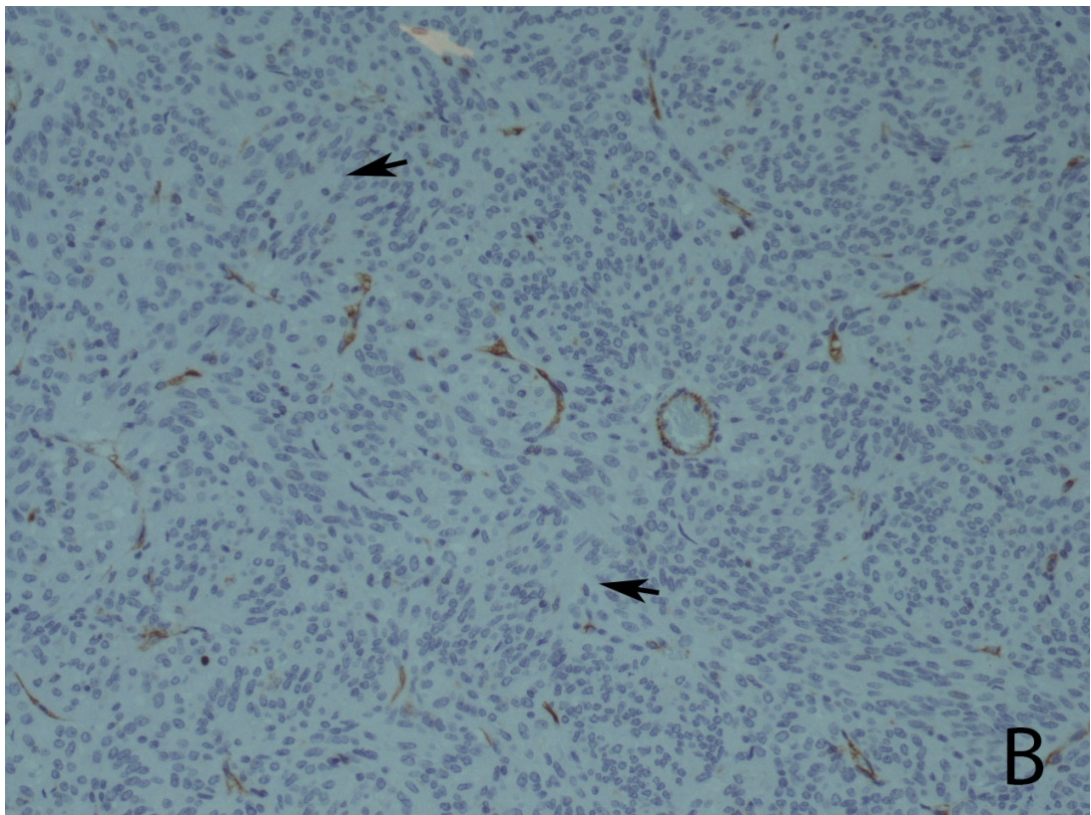
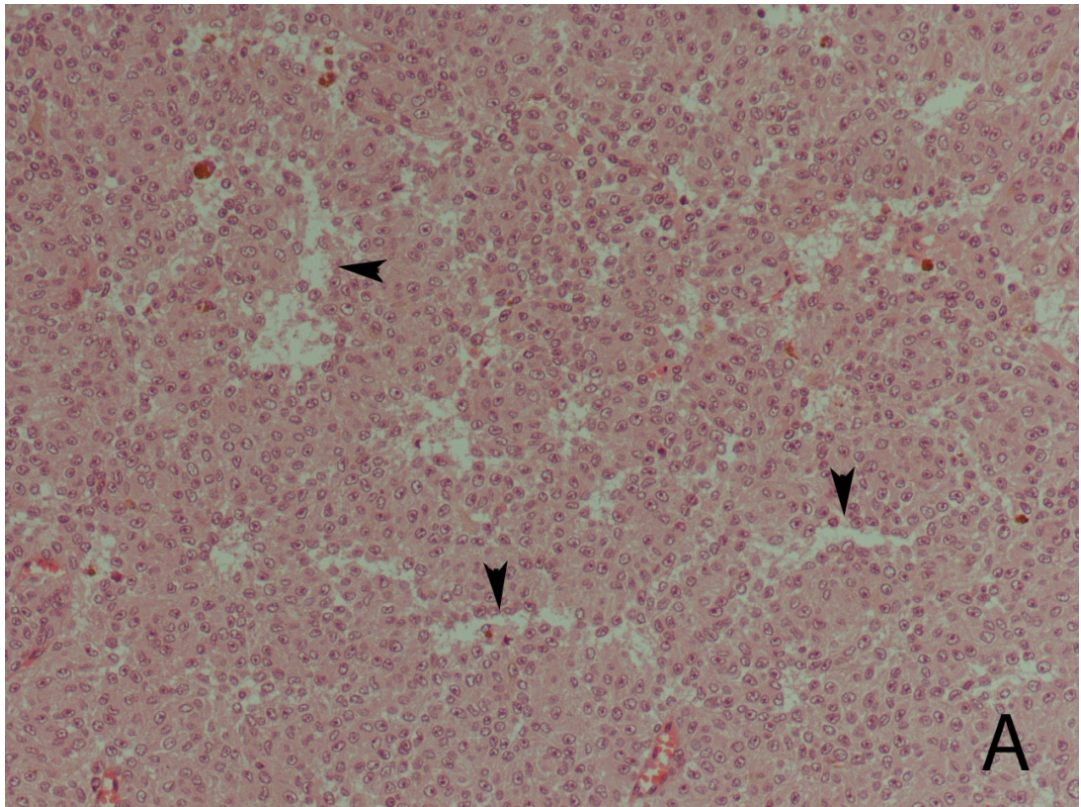
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

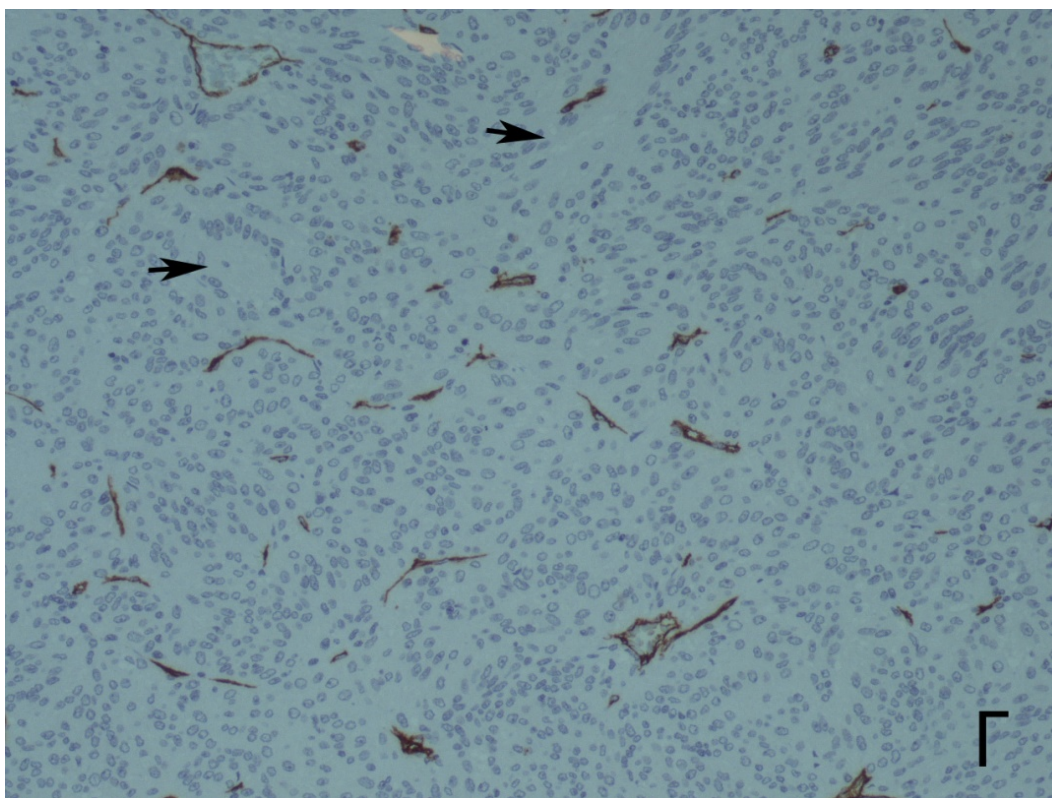
Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for the Social Sciences software, έκδοση 17.0, Chicago, USA). Η στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στους μέσους όρους της μικροαγγειακής πυκνότητας εκτιμήθηκε με το Student's t-test και την μονόδρομη ανάλυση των διαφορών (one-way analysis of variance, ANOVA), ακολουθούμενα από αναλύσεις post-hoc (post-hoc analyses, Tukey's test) για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων (σύγκριση κατά ζεύγη ομάδων). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος (mean) $\pm$ τυπική απόκλιση (standard deviation, SD).





Εικόνα 5. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ενός καλοήθους σύνθετου σπίλου τις περιοφθαλμικής δερματικής περιοχής (200X) (Α), και ανοσοϊστοχημεία με χρώση έναντι του CD31 (διαμινοβενζιδίνη X100) (Β), και του CD34 (διαμινοβενζιδίνη X200) (Γ) του ίδιου σπίλου. Οι χώροι της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης εικονίζονται πολύ καλά στην τομή με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (κεφαλές βελών). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που περιβάλλουν αυτούς τους χώρους θυμίζουν κύτταρα του όγκου παρά ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτοί οι χώροι είναι επίσης εμφανείς (αλλά δεν χρωματίζονται) στην τομή με το αντίσωμα έναντι του CD34 (βέλη).





Εικόνα 6. Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ενός μελανώματος του χοριοειδούς μεικτού κυτταρικού πληθυσμού (200X) (Α), και ανοσοϊστοχημεία με χρώση έναντι του CD31 (διαμινοβενζιδίνη X200) (Β), και του CD34 (διαμινοβενζιδίνη X200) (Γ) του ίδιου μελανώματος. Οι περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης αναγνωρίζονται εύκολα στην τομή με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (κεφαλές βελών), όπως επίσης και στις τομές με χρώση του CD31 και CD34 (βέλη).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 43.4 ± 11.3 έτη για την ομάδα των καλοήθων σπίλων και 59.2 ± 16.6 έτη για την ομάδα των κακοήθων μελανωμάτων. Το 52.3% των ασθενών της ομάδας των καλοήθων σπίλων ήταν άνδρες, ενώ στην ομάδα των μελανωμάτων το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 43.5%. Η ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα των μελανωμάτων με τη χρήση αντισώματος έναντι του CD31 κυμάνθηκε μεταξύ 6 και 84 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 37.5 ± 18.8 αγγεία/ mm^2 , ενώ στους καλοήθεις σπίλους η μικροαγγειακή πυκνότητα ήταν σαφώς μικρότερη κυμαινόμενη από 6 μέχρι 18 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 11.4 ± 3.3 αγγεία/ mm^2 ($p < 0.001$). Τα μικροαγγεία βάφτηκαν πιο έντονα με το αντίσωμα έναντι του CD34 σε σχέση με το αντίσωμα έναντι του CD31. Πιο συγκεκριμένα η ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα των μελανωμάτων με τη χρήση αντισώματος έναντι του CD34 κυμάνθηκε μεταξύ 20 και 96 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 42.1 ± 19.6 αγγεία/ mm^2 , ενώ στους καλοήθεις σπίλους η μικροαγγειακή πυκνότητα κυμάνθηκε από 6 μέχρι 24 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 14.4 ± 4.4 αγγεία/ mm^2 ($p < 0.001$) (Πίνακας II, Εικόνα 7Α).

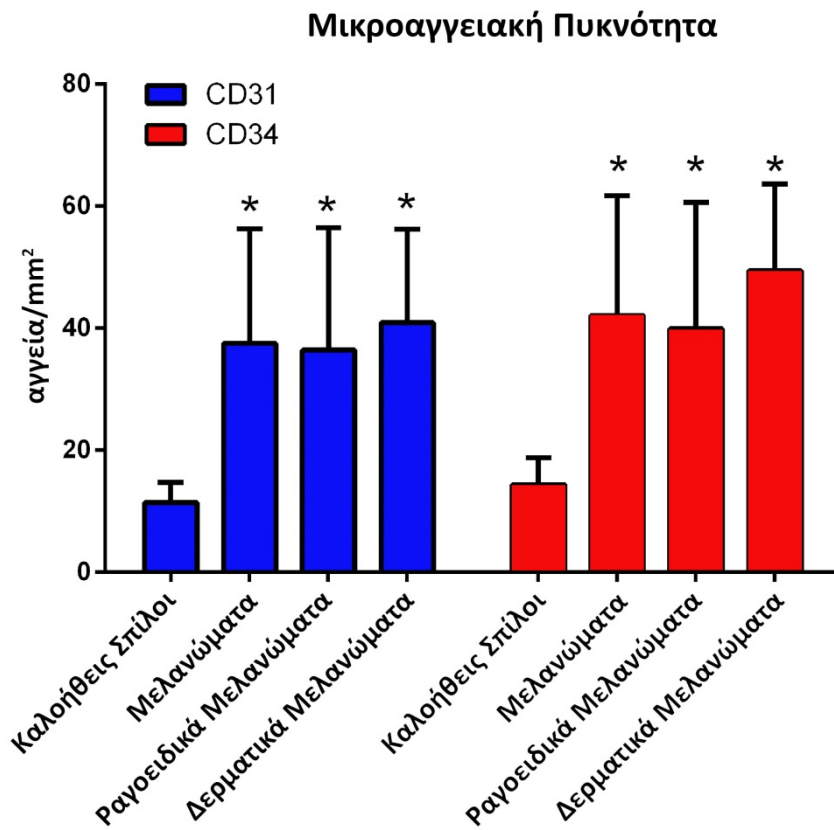
Η μικροαγγειακή πυκνότητα ήταν υψηλότερη στα μελανώματα των οποίων ο αριθμός των επιθηλιοειδών κυττάρων ήταν $>10\%$ του συνολικού αριθμού των μελανοκυττάρων, δηλαδή στα μελανώματα επιθηλιοειδών κυττάρων καθώς και στα μελανώματα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού, σε σύγκριση με τα μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα, κυμαινόμενη από 22 μέχρι 84 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 46 ± 19.7 αγγεία/ mm^2 στην πρώτη ομάδα και από 6 μέχρι 34 αγγεία/ mm^2 με μέσο όρο 21.6 ± 7.7 αγγεία/ mm^2 στη δεύτερη ομάδα, στην περίπτωση του αντισώματος έναντι του CD31 ($p < 0.001$) (Εικόνα 7Β). Παρακαλώ, για τα αποτελέσματα με τη χρήση του αντισώματος έναντι

του CD34, δείτε τον Πίνακα II και την Εικόνα 7B. Τα μελανώματα με υψηλό δείκτη μιτωτικής ενεργότητας είχαν αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα σε σχέση με τα μελανώματα χαμηλού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας, ένα αποτέλεσμα το οποίο ήταν στατιστικά σημαντικό (Πίνακας II, Εικόνα 7Γ). Το μέγεθος του όγκου δεν ήταν ανάμεσα στις παραμέτρους που εξετάστηκαν για εύρεση διαφορών στη μικροαγγειακή πυκνότητα επειδή η μεγάλη πλειοψηφία των ραγοειδικών μελανωμάτων ήταν είτε μεσαίου είτε μεγάλου μεγέθους και μόνο λίγα μελανώματα είχαν μικρό μέγεθος (το μέγεθος του όγκου ορίστηκε σύμφωνα με ένα ευρέως αποδεκτό πρωτόκολλο).⁹

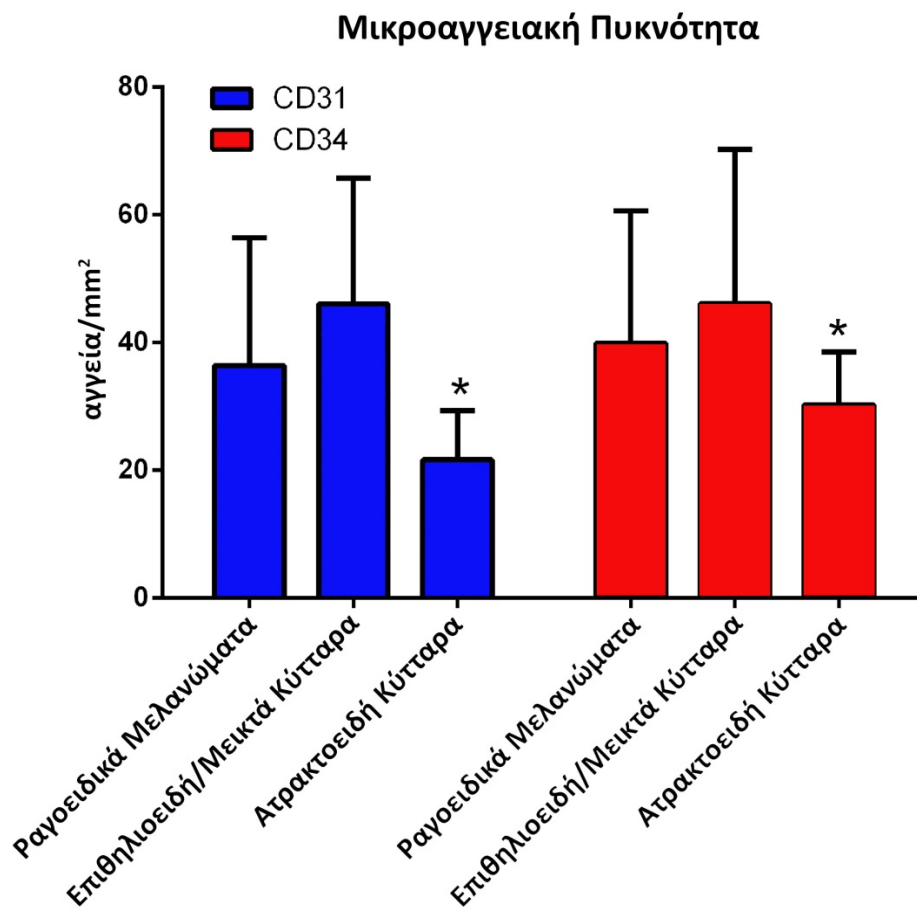
Πίνακας II. Ελάχιστες, μέγιστες και μέσες τιμές μικροαγγειακής πυκνότητας (microvascular density, MVD) με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του δείκτη CD31 ή CD34 στους καλοήθεις σπίλους, τα κακοήγη μελανώματα και σε κατηγορίες μελανωμάτων όπως ορίζονται με βάση το γενικό τους τύπο, τον κυτταρολογικό τους τύπο και το δείκτη μιτωτικής ενεργότητας (ΔΜΕ).

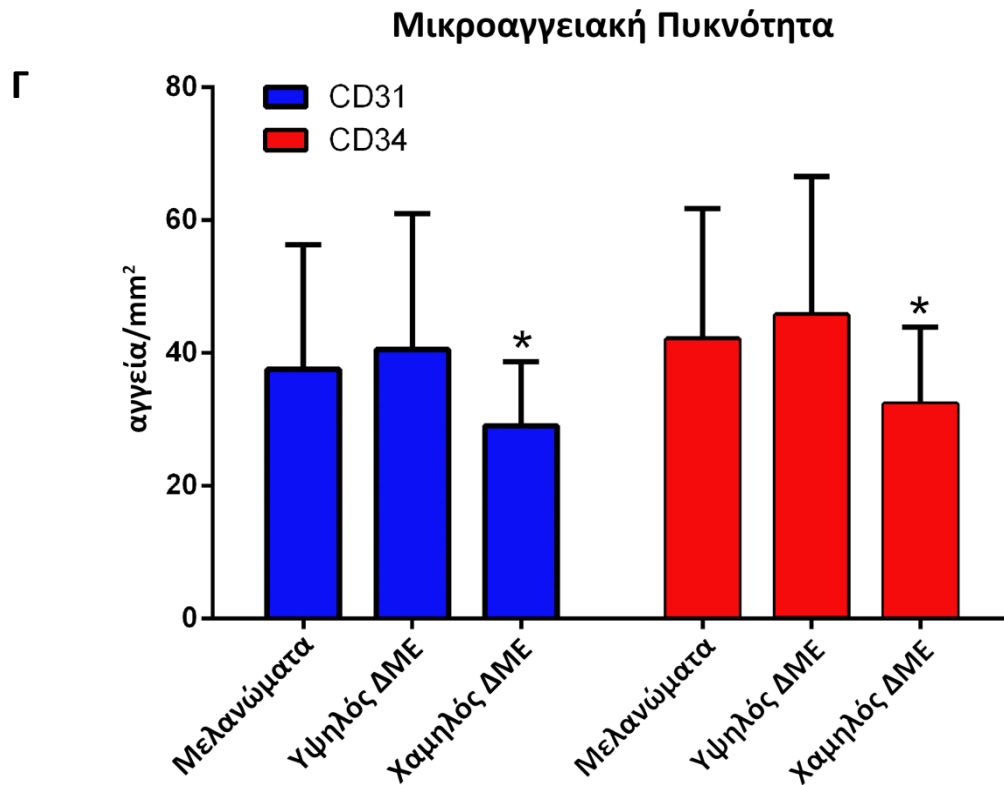
	CD31		CD34		Μέσες τιμές MVD (αγγεία/mm ²)				
	Ελάχιστες		Μέγιστες		Ελάχιστες		Μέγιστες		
	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	τιμές MVD (αγγεία/mm ²)	CD31	CD34	p-Value
Καλοήθεις Σπίλοι	6.0	18.0	6.0	24.0	11.4±3.3	14.4±4.4			
Μελανώματα (Ραγοειδικά/Δερματικά)	6.0	84.0	20.0	96.0	37.5±18.8	42.1±19.6	0.000		0.000
Ραγοειδικά Μελανώματα	6.0	84.0	20.0	96.0	36.4±20.0	39.9±20.7	0.000		0.000
Δερματικά Μελανώματα	22.0	64.0	32.0	70.0	40.9±15.3	49.4±14.2	0.000		0.000
Μελανώματα Ατρακτοειδών Κυττάρων	6.0	34.0	20.0	58.0	21.6±7.7	30.2±8.3			
Επιθηλιοειδών/Μεικτού Πληθυσμού	22.0	84.0	24.0	96.0	46.0±19.7	46.1±24.1	0.001		0.012
Μελανώματα Χαμηλού ΔΜΕ	18.0	50.0	22.0	58.0	29.0±9.7	32.3±11.6			
Μελανώματα Υψηλού ΔΜΕ	6.0	84.0	20.0	96.0	40.5±20.5	45.7±20.9	0.043		0.027

A



B





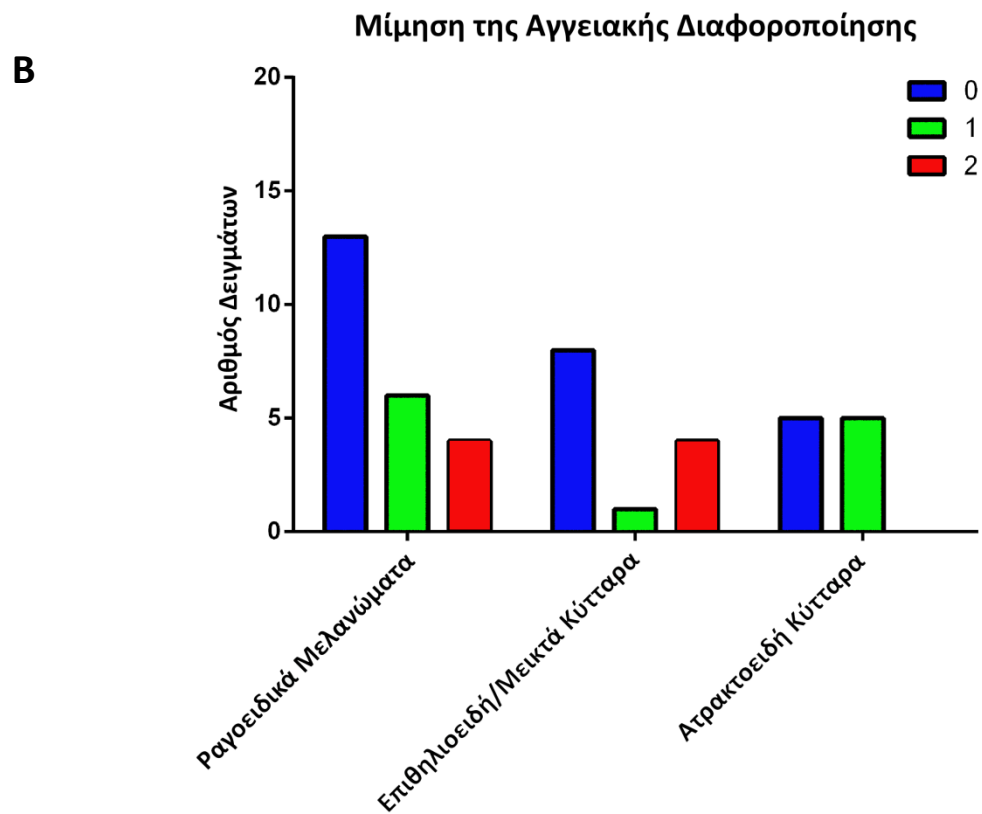
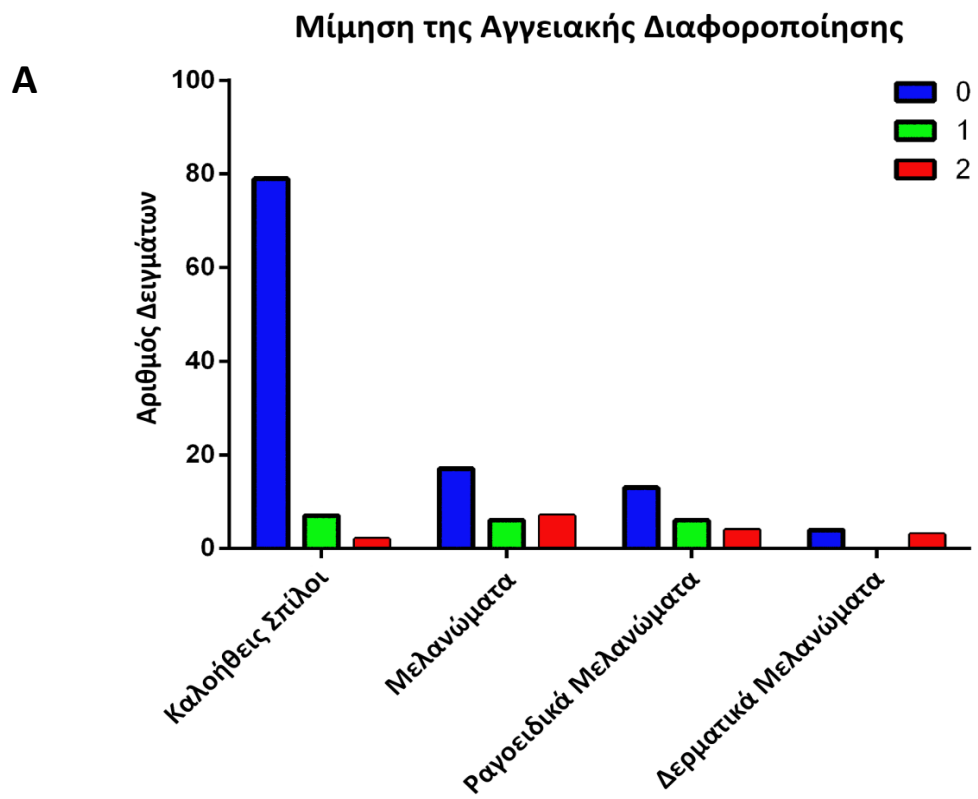
Εικόνα 7. Ραβδογράμματα τα οποία αντιπροσωπεύουν τις τιμές της μικροαγγειακής πυκνότητας σε διαφορετικές κατηγορίες. Σύγκριση ανά ζεύγη των τιμών της μικροαγγειακής πυκνότητας μεταξύ των συνολικών μελανωμάτων και των καλοήθων σπίλων, των ραγοειδικών μελανωμάτων και των καλοήθων σπίλων, και των δερματικών μελανωμάτων και των καλοήθων σπίλων κατέληξε σε τιμές $p < 0.001$ (Α). Σύγκριση των τιμών της μικροαγγειακής πυκνότητας μεταξύ διαφορετικών κυτταρολογικών τύπων ραγοειδικών μελανωμάτων έδειξε ότι τα μελανώματα επιθηλιοειδών κυττάρων/μεικτού κυτταρικού πληθυσμού είχαν υψηλότερες τιμές από ότι τα μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων ($p < 0.001$ και $p < 0.05$ με χρήση αντισώματος έναντι του CD31 και έναντι του CD34, αντίστοιχα) (Β). Σύγκριση των τιμών της μικροαγγειακής πυκνότητας μεταξύ μελανωμάτων διαφορετικού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας έδειξε ότι τα μελανώματα με υψηλό δείκτη μιτωτικής ενεργότητας είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα μελανώματα χαμηλού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας ($p < 0.05$) (Γ).

ΜΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

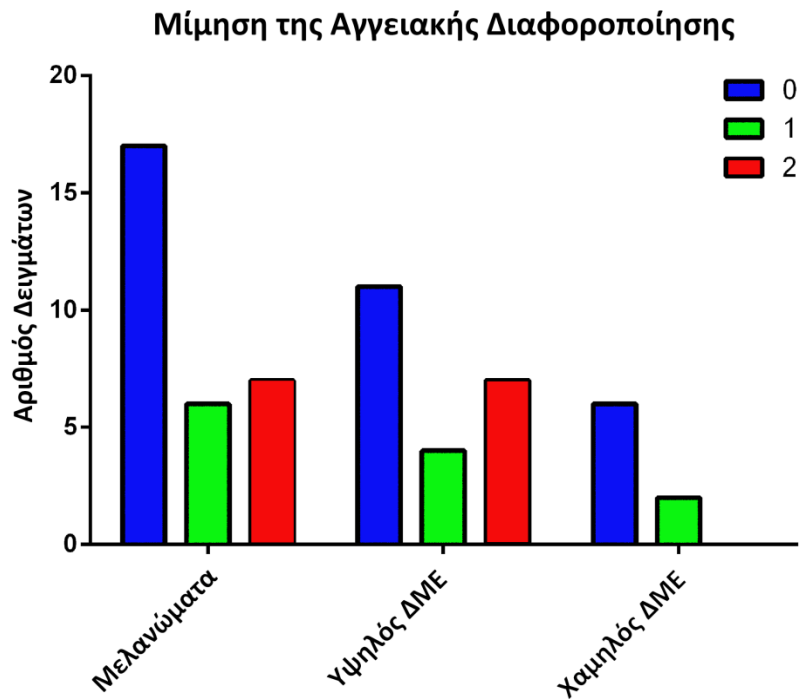
Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε σε 13 από τα 30 μελανώματα (43%), ενώ ήταν σαφώς λιγότερο συχνό τους καλοήθεις σπίλους, ευρισκόμενο μόνο σε 9 από τους 88 σπίλους (10%), μια διαφορά που ήταν στατιστικά σημαντική (Chi-square test, $\chi^2(1)=16.17$, $p<0.001$) (Πίνακας III, Εικόνα 8Α). Αν και η συχνότητα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης ήταν παρόμοια στα μελανώματα ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τύπο, παρατηρήσαμε ότι υπήρχαν διαφορές στην έκταση του φαινομένου με τα επιθηλιοειδή και τα μελανώματα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού να έχουν πιο εκτεταμένες περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων. (Πίνακας III, Εικόνα 8Β). Επιπλέον, τα μελανώματα υψηλού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας είχαν αυξημένη συχνότητα και έκταση μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα μελανώματα χαμηλού δείκτη μιτωτικής ενεργότητας (Πίνακας III, Εικόνα 8Γ). Αυτές οι παρατηρήσεις δεν επιβεβαιώθηκαν με στατιστική ανάλυση λόγω του μικρού αριθμού του δείγματός μας.

Πίνακας III. Έκταση της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης (ΜΑΔ) στους καλοήθεις σπίλους, τα κακοήθη μελανώματα και σε κατηγορίες κακοήθων μελανωμάτων ανάλογα το γενικό τους τύπο, τον κυτταρολογικό τύπο και το δείκτη μιτωτικής ενεργότητας (ΔΜΕ).

	ΜΑΔ 0	ΜΑΔ+	ΜΑΔ++	Σύνολο
Καλοήθεις Σπίλοι	79	7	2	88
	90%	8%	2%	
Μελανώματα (Ραγοειδικά/Δερματικά)	17	6	7	30
	57%	20%	23%	
Ραγοειδικά Μελανώματα	13	6	4	23
	57%	26%	17%	
Δερματικά Μελανώματα	4	0	3	7
	57%	0%	43%	
Επιθηλιοειδή/Μεικτού Πληθυσμού	8	1	4	13
	61%	8%	31%	
Μελανώματα Ατρακτοειδών Κυττάρων	5	5	0	10
	50%	50%	0	
Μελανώματα Υψηλού ΔΜΕ	11	4	7	22
	50%	18%	32%	
Μελανώματα Χαμηλού ΔΜΕ	6	2	0	8
	75%	25%	0	



Γ



Εικόνα 8. Ραβδογράμματα τα οποία αντιπροσωπεύουν την έκταση της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε διαφορετικές κατηγορίες. Κατανομή της έκτασης της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στους καλοήθεις σπίλους, τα συνολικά μελανώματα, τα ραγοειδικά μελανώματα και τα δερματικά μελανώματα (Α). Κατανομή της έκτασης της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στα ραγοειδικά μελανώματα και τα μελανώματα διαφόρων κυτταρολογικών τύπων (Β). Κατανομή της έκτασης της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στα συνολικά μελανώματα και τα μελανώματα διαφορετικών δεικτών μιτωτικής ενεργότητας (ΔΜΕ) (Γ).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογένεση είναι μία κρίσιμη διαδικασία κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, αλλά επίσης μια σημαντική παθολογική διαδικασία τόσο στους καλοήθεις όσο και στους κακοήθεις όγκους. Η δημιουργία επαρκούς αγγείωσης των όγκων σε ανταπόκριση στην αυξημένη ζήτηση οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών είναι τεράστιας σημασίας για την ανάπτυξη του όγκου σε μέγεθος μεγαλύτερο των 2mm.¹³⁷

Από τότε που ο Weidner και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν πρώτοι τη προγνωστική αξία της εκτίμησης της μικροαγγειακής πυκνότητας ως μέτρο του βαθμού αγγειογένεσης του καρκίνου του μαστού, έχουν γίνει εκατοντάδες μελέτες της μικροαγγειακής πυκνότητας διαφόρων συμπαγών όγκων. Σε πολλές από αυτές τις μελέτες έχει βρεθεί ότι η υψηλή ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, κυρίως σε σχέση με το ποσοστό υποτροπής των όγκων. Αυτό αφορά συχνούς καρκίνους, όπως του πνεύμονα, του μαστού και του παχέως εντέρου, αλλά και κακοήθειες με μικρότερη συχνότητα όπως ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου, του παγκρέατος, του ήπατος, του οισοφάγου, του στομάχου, της ουροδόχου κύστεως, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του λάρυγγος, το νευροβλάστωμα, το ραγοειδικό και το δερματικό μελάνωμα.^{52,138-151} Αντίθετα υπάρχουν μερικές μελέτες που δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ της μικροαγγειακής πυκνότητας και της πρόγνωσης των όγκων.¹⁵²⁻¹⁵⁷

Προηγούμενες μελέτες των διαφορών της μικροαγγειακής πυκνότητας σε μελανοκυτταρικούς όγκους επικεντρώθηκαν κυρίως σε δερματικά κακοήγη μελανώματα και σπίλους και βρήκαν ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα ήταν υψηλότερη στα δερματικά μελανώματα σε σχέση με τους καλοήθεις ή δυσπλαστικούς σπίλους.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Βρήκαμε ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα είναι επίσης μεγαλύτερη στα ραγοειδικά μελανώματα συγκριτικά με τους καλοήθεις σπίλους του

οφθαλμού και της περιοφθαλμικής περιοχής. Η μέση μικροαγγειακή πυκνότητα των 42.1 αγγείων/mm² στα ραγοειδικά μελανώματα της μελέτης μας (αντίσωμα έναντι του CD34) είναι μικρότερη από τη μέση μικροαγγειακή πυκνότητα των 40 αγγείων/0.313 mm² που είχε βρεθεί σε μια προηγούμενη μελέτη όπου είχαν εξεταστεί 167 δείγματα εξόρυξης οφθαλμού ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα (αντίσωμα έναντι του CD34).⁶⁰ Η διαφορά ανάμεσα στις δύο μελέτες μπορεί μερικώς να αποδοθεί σε διαφορές στη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία. Υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της υψηλής μικροαγγειακής πυκνότητας και της κυριαρχίας των επιθηλιοειδών κυττάρων στα ραγοειδικά μελανώματα.⁶⁰ Κατ' αντιστοιχία, τα επιθηλιοειδή μελανώματα και τα μελανώματα μεικτού κυτταρικού πληθυσμού είχαν υψηλότερη μικροαγγειακή πυκνότητα σε σχέση με τα μελανώματα ατρακτοειδών κυττάρων στη μελέτη μας, ένα λογικό αποτέλεσμα δεδομένου ότι οι πρώτοι τύποι μελανωμάτων έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με το δεύτερο τύπο, και η υψηλή μικροαγγειακή πυκνότητα αποτελεί ένα δυσμενή προγνωστικό δείκτη των ραγοειδικών μελανωμάτων. Επιπλέον, η θετική συσχέτιση που βρήκαμε μεταξύ του δείκτη μιτωτικής ενεργότητας και της μικροαγγειακής πυκνότητας είναι επίσης αναμενόμενο αποτέλεσμα δεδομένης της αυξημένης επιθετικότητας των όγκων με υψηλό μιτωτικό δείκτη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ασθενείς με όγκους που έχουν μεγάλη μικροαγγειακή πυκνότητα δεν ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες σε σχέση με ασθενείς με λιγότερο αγγειοβριθείς όγκους. Συνεπώς το μέγεθος της αγγείωσης ενός όγκου ίσως να μην πρέπει να επηρεάζει την απόφαση για τη χρήση αντιαγγειογενετικών παραγόντων στους ασθενείς.⁵² Η αντιαγγειογενετική θεραπεία δυστυχώς είχε πτωχά αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες, στη μεγάλη

πλειονηφία των όγκων που εξετάστηκαν, παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα που είχε στα πειραματόζωα (προκλινικές μελέτες).¹⁶²

Παρόλα αυτά, σε μερικά είδη όγκων, η αντιαγγειογενετική θεραπεία, συνήθως σε συνδυασμό με τη κλασσική χημειοθεραπεία, βελτίωσε την πορεία της νόσου οδηγώντας στην έγκρισή της από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (U.S. food and drug administration, FDA), συχνά σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε είδη όγκων όπως ο μεταστατικός καρκίνος του παχέως εντέρου, το προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, ο προχωρημένος καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, ο προχωρημένος ωοθηκικός καρκίνος, το υπερνέφρωμα και το γλοίωμα του εγκεφάλου.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Η αντι-αγγειογενετική θεραπεία δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική στο κακόηθες μελάνωμα, αν και τα τελικά αποτελέσματα μιας μεγάλης κλινικής μελέτης φάσης III εκκρεμούν,¹⁶⁷ ενώ και στο ραγοειδικό μελάνωμα δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα.¹⁶⁸

Από το 1999, όταν ο Maniotis και οι συνεργάτες του περιέγραψαν πρώτοι το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε ραγοειδικά μελανώματα, το φαινόμενο αυτό έχει βρεθεί σε μια ποικιλία κακοήθων όγκων όπως το γλοιοβλάστωμα, το σάρκωμα, ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, της ωοθήκης του ήπατος, του παγκρέατος, της χοληδόχου κύστης, του οισοφάγου και του στομάχου.¹⁶⁹⁻¹⁸⁰

Πολύ μεγάλη έρευνα έχει διεξαχθεί για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στη δημιουργία των δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, τα οποία επενδύονται από κύτταρα του όγκου. Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης έχει μελετηθεί σε κακοήθη νεοπλάσματα, κυρίως μελανώματα, με το 45% των πρωτογενών ραγοειδικών μελανωμάτων να

έχουν τέτοιες περιοχές σύμφωνα με τη μελέτη ορόσημο του Maniotis.⁷³ Αυτά τα δίκτυα ανιχνεύθηκαν επίσης *in situ* στο 34% των πρωτογενών θέσεων περιπτώσεων ανθρωπίνων δερματικών μελανωμάτων,⁷⁷ δείχνοντας ότι ο επιπολασμός της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης είναι πιθανότατα παρόμοιος στα ανθρώπινα δερματικά και ραγοειδικά μελανώματα.⁷² Τα ευρήματά μας είναι σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες. Σαράντα-τρία τοις εκατό των ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα είχαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στην πρωτογενή θέση του όγκου.

Η παρουσία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης στα μελανώματα, τόσο στα ραγοειδικά όσο και στα δερματικά, αποτελεί ένα δυσμενή προγνωστικό δείκτη οδηγώντας σε μικρότερη επιβίωση.^{74,76,132-135} Το ίδιο ισχύει και για τους περισσότερους από τους άλλους κακοήθεις όγκους που μελετήθηκαν.^{78,181-184} Συνεπώς, η παρατήρησή μας ότι μελανώματα με πιο επιθετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά έχουν πιο εκτεταμένες περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης δεν αποτελεί έκπληξη. Η αναγνώριση δικτύων μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά στην καθημερινή κλινική πράξη σε συνδυασμό με κλινικά και άλλα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως επίσης και με τη βοήθεια του ταχέως αναπτυσσόμενου τομέα της μοριακής και γενετικής διαγνωστικής για μια πιο ακριβή πρόγνωση τόσο των ραγοειδικών όσο και των δερματικών μελανωμάτων, καθώς και άλλων ειδών κακοήθων όγκων.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷

Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης έχει ενοχοποιηθεί για τα πτωχά αποτελέσματα της αντιαγγειογενετικής θεραπείας σε κλινικές μελέτες κακοήθων όγκων.¹⁶² Χωρίς αμφιβολία, χρειάζεται περισσότερη έρευνα πάνω στη μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης για την περαιτέρω διαλεύκανση των μοριακών της

μηχανισμών και της αλληλουχίας των σημάτων που εμπλέκονται σε αυτό το φαινόμενο. Αυτό θα οδηγήσει στην ανακάλυψη καινούργιων ουσιών που διακόπτουν τις κυτταρικές οδούς που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η στόχευση του μέρους της αιμάτωσης των κακοήθων όγκων που προέρχεται από τα δίκτυα μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, με διάφορα φάρμακα που έχει αποδειχτεί ότι είναι αποτελεσματικά *in vitro* ή σε πειραματόζωα και τα οποία αναφέρθηκαν στην εισαγωγή αυτής της διατριβής, σε συνδυασμό με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες που καταστέλλουν τα νεοαγγεία που επενδύονται από ενδοθηλιακά κύτταρα ή με άλλες θεραπείες κατά του καρκίνου που διαθέτουμε στο οπλοστάσιό μας, ίσως να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των παρόντων αντικαρκινικών σχημάτων.

Πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι το 10% των καλοήθων σπίλων στη μελέτη μας εμφάνισαν περιοχές μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης. Η παρουσία μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε μερικούς σπίλους αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον εύρημα, δεδομένου της έλλειψης σχετικών εργασιών στη διεθνή βιβλιογραφία. Κατά την έρευνα μας στο Pubmed βρήκαμε μόνο ένα case report και δύο μικρά case series. ‘Ψευδοαγγειακοί χώροι επενδυόμενοι από μελανοκύτταρα’ παρατηρήθηκαν σε τρεις καλοήθεις έγχρωμους σπίλους,¹⁸⁸ σε τρεις καλοήθεις μελανοκυτταρικούς σπίλους,¹⁸⁹ καθώς και σε έναν καλοήθη σπίλο.¹⁹⁰

Οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν μεθόδους για να αναγνωρίσουν ποιοι σπίλοι μπορεί να εξαλλαγούν σε μελάνωμα. Με τις σύγχρονες μοριακές τεχνικές, οι γενετικοί δείκτες, οι κυτοκίνες, και οι δείκτες πολλαπλασιασμού βρίσκονται υπό έρευνα.^{16,191-194} Επί του παρόντος δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες γενετικές εξετάσεις που να μπορούν να προβλέψουν την εξέλιξη των δυσπλαστικών σπίλων σε μελάνωμα.¹¹ Ο κίνδυνος ανάπτυξης μελάνωματος σε κάποιο άτομο αυξάνεται ήπια

με τον αυξανόμενο αριθμό των δυσπλαστικών σπίλων.^{11,195-198} Άτομα με δυσπλαστικό σπίλο με υψηλό βαθμό ατυπίας ίσως να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν μελλοντικά μελάνωμα (όχι κατ' ανάγκη στην περιοχή του εξαιρεθέντος σπίλου) σε σχέση με άτομα με δυσπλαστικό σπίλο με μέτριο βαθμό ατυπίας, και αυτά με τη σειρά τους έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν μελάνωμα σε σχέση με άτομα με δυσπλαστικό σπίλο μικρού βαθμού ατυπίας.¹⁹⁹ Στα περιστατικά μας η παρουσία της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης δεν συσχετίστηκε με άτυπα χαρακτηριστικά των σπίλων, δείχνοντας ότι πιθανόν δεν συνδέεται με ανάπτυξη κακοήθειας.

Οι περισσότεροι σπίλοι στη μελέτη μας ήταν σπίλοι επιπεφυκότα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πιο πολλά μελάνωματα του επιπεφυκότα προέρχονται από πρωτοπαθή επίκτητη μελάνωση με ατυπία, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό (5-25%) προέρχεται από προϋπάρχοντες σπίλους.^{2,200} Παρόλα αυτά ο κίνδυνος κακοήθους εξαλλαγής ενός σπίλου επιπεφυκότα είναι μικρός και δεν ξεπερνά το 1%.¹¹ Ομοίως, ένα σημαντικό ποσοστό των δερματικών μελανωμάτων, περίπου ένα στα τέσσερα, προέρχονται από προϋπάρχοντες σπίλους,³⁶ αν και οι σπίλοι συμπεριλαμβανομένων των δυσπλαστικών σπίλων έχουν μικρή πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής.¹⁶⁻¹⁹

Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν επίσης οι σπίλοι του χοριοειδούς, εάν υπήρχε αυτή η δυνατότητα. Οι τυπικοί σπίλοι του χοριοειδούς δεν απαιτούν παρακολούθηση (follow-up) επειδή ο κίνδυνος κακοήθους εξαλλαγής τους είναι υπερβολικά χαμηλός.² Αντίθετα οι ύποπτοι σπίλοι του χοριοειδούς (βάσει των βυθοσκοπικών τους χαρακτηριστικών) απαιτούν παρακολούθηση.² Παρόλα αυτά σε καμία περίπτωση δε χρειάζεται εξόρυξη του οφθαλμού και γι' αυτόν το λόγο δεν υπήρχε διαθέσιμο παθολογοανατομικό υλικό για να συμπεριλάβουμε τους σπίλους του χοριοειδούς στη μελέτη μας. Ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση το ενδιαφέρον

θα ήταν κυρίως ακαδημαϊκό επειδή εάν βρίσκαμε ότι κάποιοι από τους σπίλους του χοριοειδούς εμφανίζουν μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης, η γνώση αυτή δεν θα μπορούσε μελλοντικά να αξιοποιηθεί στην καθημερινή κλινική πράξη δεδομένου ότι αυτοί οι σπίλοι δεν εξαιρούνται, ενώ η βιοψία ενός ύποπτου σπίλου του χοριοειδούς για τον αποκλεισμό της περίπτωσης κακοήθους μελανώματος γίνεται σπάνια. Ακαδημαϊκό ενδιαφέρον θα είχε επίσης η σύγκριση της μικροαγγειακής πυκνότητας των ραγοειδικών μελανωμάτων με αυτή των σπύλων του χοριοειδούς.

Μεγαλύτερη έρευνα στους καλοήθεις και κυρίως στους δυσπλαστικούς σπίλους απαιτείται για να αποσαφηνιστεί η συχνότητα της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε αυτές της βλάβες και να βρεθεί εάν αυτό το εύρημα έχει οποιαδήποτε προγνωστική σημασία, αυξάνοντας τον κίνδυνο κακοήθους εξαλλαγής σε μελάνωμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η παρούσα ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα του οφθαλμού και της περιοφθαλμικής περιοχής κατέληξε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η αγγειογένεση είναι μεγαλύτερη στα μελανώματα σε σχέση με τους καλοήθεις σπίλους.
- Η αγγειογένεση είναι μεγαλύτερη στα μελανώματα με επιθετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με μελανώματα με λιγότερο επιθετικά χαρακτηριστικά.
- Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης παρατηρείται σε πολλά μελανώματα και είναι πιο έντονο σε μελανώματα με επιθετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με μελανώματα με λιγότερο επιθετικά χαρακτηριστικά.
- Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης απαντάται και σε καλοήθεις όγκους.
- Η εύρεση της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης σε καλοήθεις όγκους μπορεί να έχει προγνωστική σημασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός. Η μελέτη της αγγειογένεσης, καθώς και της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης, σε καλοήγη και κακοήγη μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα της οφθαλμικής και περιοφθαλμικής περιοχής.

Υλικά και μέθοδοι. Εκτιμήθηκαν ιστολογικές τομές από 118 ασθενείς, εκ των οποίων οι 88 είχαν σπίλους κυρίως του επιπεφυκότα, ενώ οι υπόλοιποι 30 είχαν μελανώματα οφθαλμού, η πλειοψηφία των οποίων ήταν χοριοειδικά. Η εκτίμηση της αγγειογένεσης έγινε με ανοσοϊστοχημική χρώση για τους δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων CD31 και CD34, με βάση την οποία προσδιορίστηκε η μικροαγγειακή πυκνότητα. Η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης, δηλαδή η παρουσία αυλών οι οποίοι δεν επενδύονται από ενδοθηλιακά αλλά από νεοπλασματικά κύτταρα και συνεπώς είναι αρνητικοί στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τους δείκτες CD31 και CD34, εκτιμήθηκε στις τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

Αποτελέσματα. Η αγγειογένεση ήταν αυξημένη στα μελανώματα συγκριτικά με τους σπίλους. Μελανώματα με αυξημένο αριθμό μιτώσεων και/ή αποτελούμενα κυρίως από επιθηλιοειδή κακοήγη μελανοκύτταρα είχαν περισσότερα νεοαγγεία, συγκρινόμενα με λιγότερο επιθητικά μελανώματα βάσει ιστολογικών χαρακτηριστικών, και συγκεκριμένα με μελανώματα αποτελούμενα από ατρακτοειδή κύτταρα και/ή μελανώματα με σπάνιες μιτώσεις. Το φαινόμενο της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης παρατηρήθηκε στο ήμισυ περίπου των μελανωμάτων και ήταν πιο έντονο σε εκείνα με επιθητικά χαρακτηριστικά. Επίσης, αν και παρατηρήθηκε και σε σπίλους, ήταν σαφώς σε μικρότερο βαθμό από τα μελανώματα.

Συμπεράσματα. Τόσο η αγγειογένεση όσο και η μίμηση της αγγειακής διαφοροποίησης εμφανίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα μελανώματα συγκριτικά με

τους σπίλους της περιοχής του οφθαλμού. Η διαπίστωση του φαινομένου της μίμησης της αγγειακής διαφοροποίησης και σε σπίλους αποτελεί μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παρατήρηση δεδομένου ότι μπορεί να αυξάνει την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής τους.

ABSTRACT

Immunohistochemical study of angiogenesis and vasculogenic mimicry in melanocytic tumors of the eye and the periocular area

Konstantinos Spiliopoulos

Aim. The aim of the present study is to study angiogenesis and vascular mimicry in benign and malignant melanocytic tumors of the eye and the periocular region.

Materials and methods. Histological sections from 118 patients were examined. Eighty-eight of the patients had nevi, most of which were conjunctival, while the remaining 30 had malignant melanomas, mostly choroidal. Histological sections were stained either with haematoxylin-eosin or immunohistochemically. Angiogenesis was assessed by studying microvascular density, using antibodies against the endothelial cell markers, CD31 and CD34. Vascular-like channels between neoplastic cells, that were not lined by endothelial cells, and thus were negative for CD31 and CD34, represented areas of vasculogenic mimicry.

Results. Angiogenesis was more pronounced in melanomas compared to melanocytic nevi. Angiogenesis was increased in melanomas with high mitotic index and/or epithelioid cell preponderance, compared to melanomas with low mitotic index and/or spindle cell predominance. Vasculogenic mimicry areas were evident in many melanomas and in several nevi. Melanomas with more aggressive histologic features had more extensive areas of vasculogenic mimicry compared to less aggressive tumors.

Conclusions. Both angiogenesis and vasculogenic mimicry are more evident in melanomas compared to nevi of the eye and the periocular region. The presence of

vasculogenic mimicry in some nevi is a very interesting finding that might have prognostic implications.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Esmaeli B: Ophthalmic Oncology (MD Anderson Solid Tumor Oncology Series). New York, Springer, pp 201-222, 2011.
2. Kanski JJ and Bowling B: Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach. (8th ed.). Edinburgh, Elsevier, pp 474, 2015.
3. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE: Molecular pathology of uveal melanoma. Eye 27:230-242, 2013.
4. Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, Marr BP, Carvajal RD: Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. Clin Ophthalmol 11:279-289, 2017.
5. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC: Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue nevi. Nature 457(7229):599-602, 2009.
6. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Carrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Knanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC: Mutations in GNA11 in uveal melanoma. N Engl J Med 363(23):2191-2199, 2010.
7. Pereira PR, Odashiro AN, Lim LA, Miyamoto C, Blanco PL, Odashiro M, Maloney S, De Souza DF, Burnier MN Jr.: Current and emerging treatment options for uveal melanoma. Clinical Ophthalmol 7:1669-1682, 2013.
8. Lin AY: Diagnosis and Staging of Uveal Melanoma. AAOOP Companion Society Meeting, USCAP 2013.

9. Grossniklaus HE, Finger PT, Harbour JW and Kivela T: Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Uveal Melanoma. College of American Pathologists. Protocol web posting date: January 2016.
10. Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, Marr B, Francis JH, Nathan PD: Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *Br J Ophthalmol* 101(1):38-44, 2017.
11. LeBoit PE, Burg G, Weedon D and Sarasin A: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Skin Tumours. Lyon, IARC Press, pp 49-69 and 105-109, 2006.
12. Goldstein AM, Tucker MA: Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(4):528-532, 2013.
13. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22:3042-3052, 2003.
14. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R: Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44(9):1006-1014, 2012.
15. Echerie MD, Bishop M, Resse E, Sluzevich J: Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome. *Cancer Syndromes* (Internet). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
16. Hussein MR: Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas: emerging clues. *J Clin Pathol* 58(5):453-456, 2005.

17. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T: The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population based-estimate. *Arch Dermatol* 139(3):282-288, 2003.
18. Cyr PR: Atypical Moles. *Am Fam Physician* 78(6):735-740, 2008.
19. Perkins A, Duffy RL: Atypical Moles: Diagnosis and management. *Am Fam Physician* 91(11):762-767, 2015.
20. Prieto VG, Shea CR: Immunohistochemistry of Melanocytic Proliferations. *Arch Pathol Lab Med* 135:853-859, 2011.
21. Crowson AN, Magro CM, Mihm Jr MC: Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Modern Pathol* 19:S71-S87, 2006.
22. Thompson JF, Soong S-J, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Sondak VK: Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. *J Clin Oncol* 29(16):2199-2205, 2011.
23. Smoller BR, Balch C, Balzer BL, Crowson AN, Didolkar M, Lazar A, McNiff JM, Perry RR, Prieto VG, Rao P, Smith MT, Wick MR and Frishberg DP: Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Melanoma of the Skin. College of American Pathologists. Protocol web posting date: January 2016.
24. Hale CS, Qian M, Ma MW, Scanlon P, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Shao Y, Polsky D, Osman I, Darvishian F: Mitotic rate in melanoma: prognostic value of immunostaining and computer-assisted image analysis. *Am J Surg Pathol* 37(6):882-889, 2013.

25. Angi M, Damato B, Kalirai H, Dodson A, Taktak A, Coupland SE: Immunohistochemical assessment of mitotic count in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 89(2):e155-e160, 2011.
26. Lee WR: *Ophthalmic Histopathology*. London, Springer-Verlag, pp. 106, 1993.
27. Bonnie E, Rothberg G, Bracken MB, Rimm DL: Tissue Biomarkers for Prognosis in Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 101(7):452-474, 2009.
28. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN: Circulating Serologic and Molecular Biomarkers in Malignant Melanoma. *Mayo Clin Proc* 86(10):981-990, 2011.
29. Force J, Salama AKS: First-line treatment of metastatic melanoma: role of nivolumab. *Immunotargets Ther* 6:1-10, 2017.
30. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Melanoma Treatment (PDQ): Patient Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda: National Cancer Institute (US).
31. MacLennan R, Kelly JW, River JK, Harrison SL: The Eastern Australian Childhood Nevus Study: site differences in density and size of melanocytic nevi in relation to latitude and phenotype. *J Am Acad Dermatol* 48:367-375, 2003.
32. Sardana K, Chakravarty P, Goel K: Optimal management of common acquired melanocytic nevi (moles): current perspectives. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 7:89-103, 2014.
33. Wachsmuth RC, Gaut RM, Barrett JH, Saunders CL, Randerson-Moor JA, Eldridge A, Martin NG, Bishop T, JA Newton Bishop: Heritability and Gene-Environment Interactions for Melanocytic Nevus Density Examined in a U.K. Adolescent Twin Study. *J Invest Dermatol* 117:348-352, 2001.

34. Brogelli L, De Giorgi V, Bini F, Giannotti B: Melanocytic naevi: clinical features and correlation with the phenotype in healthy young males in Italy. *Br J Dermatol* 125:349-352, 1991.
35. Matichard E, Le Henanff A, Sanders A, Leguyadec J, Crickx B, Descamps V: Effect of Neonatal Phototherapy on Melanocytic Nevus Count in Children. *Arch Dermatol* 142(12):1599-1604, 2006.
36. Sam AH and Theo JTH: *Rapid Medicine*. (1st ed.). Malden, Massachusetts, Wiley-Blackwell, pp 192, 2003.
37. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M: A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15(12):1147-1165, 1984.
38. Reed RJ: A classification of melanocytic dysplasias and malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 6 Suppl:195-206, 1984.
39. Rhodes AR, Mihm MC Jr, Weinstock MA: Dysplastic melanocytic nevi: a reproducible histologic definition emphasizing cellular morphology. *Mol Pathol* 2(4):306-319, 1989.
40. Mize DE, Bishop M, Resse E, Sluzevich J: Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome. In: Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Hefferon T, Roberts M, editors. *Cancer Syndromes* (Internet). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
41. Flamme I, Frolich T, Risau W: Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173(2):206-210, 1997.
42. Roskoski R Jr: Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 62(3):179-213, 2007.

43. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M: Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2(3):213-219, 2006.
44. Jain RK, Carmeliet P: SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* 149(6):1408-1408, 2012.
45. Hilen F, Griffioen AW: Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4):489-502, 2007.
46. Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV, Hendrix MJ: Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol* 181(4):1115-1125, 2012.
47. Kirchmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ: Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 18(10):2726-2732, 2012.
48. Quiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y: Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med* 19(2):315-326, 2015.
49. Chung HJ, Mahalingam M: Angiogenesis, vasculogenic mimicry and vascular invasion in cutaneous malignant melanoma - implications for therapeutic strategies and targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 14(5):621-639, 2014.
50. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P: Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 146:873-887, 2011.
51. Ziyad S, Iruela-Arispe, ML: Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer* 2(12):1085-1096, 2011.
52. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D: Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23:601-607, 2008.

53. Spiliopoulos K, Peschos D, Batistatou A, Ntountas I, Papoudou-Bai A, Zioga A, Agnantis N, Kitsos G: Immunohistochemical Study of Vasculogenic Mimicry and Angiogenesis in Melanocytic Tumors of the Eye and the Periocular Area. *Anticancer Res* 37(3):1113-1120, 2017.
54. Weidner N, Sample JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8, 1991
55. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Belilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84:1875-1887, 1992
56. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumour angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143:401-409, 1993.
57. Weidner N: Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 36(2):169-180, 1995.
58. Al-Jamal RT, Makitie T, Kivela T: Nucleolar diameter and microvascular factors as independent predictors of mortality from malignant melanoma of the choroid and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6):2381-2389, 2003.
59. Foss AJ, Alexander RA, Jefferies LW, Hungerford JL, Harris AL, Lightman S: Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res* 56:2900-2903, 1996.
60. Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T: Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2471-2480, 1999.

61. Depasquale I, Thompson WD: Microvessel density for melanoma prognosis. *Histopathol* 47(2):186-194, 2005.
62. Chalkley HW: Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 4:47-53, 1943.
63. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, Mc Culloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY: Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A:2474-2484, 1996.
64. Simpson JF, Ahn C, Battifora H, Esteban JM: Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer* 77:2077-2085, 1996.
65. Schoell WM, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, Winter R: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer* 80:2257-2262, 1997
66. Wakui S, Furusato M, Itoh T, Saraki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S: Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastases: a morphometric study. *J Pathol* 168:257-262, 1992.
67. Barbareschi M, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Dalla Palma P: Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res Treat* 36: 181-192, 1995.
68. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL: Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: Comparison of microvessel density, Chalkley count and computer image analysis. *J Pathol* 177:275-283, 1995.

69. Barbareschi M, Weidner N, Gasparini G, Morelli L, Forti S, Eccher C, Fina P, Mauri F, Bevilacqua P, Dalla Palma P: Microvessel density quantification in breast carcinomas. Assessment by light microscopy versus computer aided image analysis system. *Appl Immunohistochem* 3:75-84, 1995.
70. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd R: Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression, and Therapy. *Anticancer Res* 31(6):2283-2290, 2011.
71. Hayat MA: *Methods of Cancer Diagnosis, Therapy, and Prognosis. Volume 7: General Overviews, Head and Neck Cancer and Thyroid Cancer.* Union, NJ, Springer, pp 46-46, 2010.
72. Spiliopoulos K, Peschos D, Batistatou A, Ntountas I, Agnantis N, Kitsos G: Vasculogenic Mimicry: Lessons from Melanocytic Tumors. *In vivo* 29(3):309-317, 2015.
73. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ: Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155(3):739-752, 1999.
74. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156(2):361-381, 2000.
75. Clarijs R, van Dijk M, Ruiter DJ, de Waal RM: Functional and morphologic analysis of the fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(9):3013-3020, 2005.
76. Frenkel S, Barzel I, Levy J, Lin AY, Bartsch DU, Majumdar D, Folberg R, Pe'er J: Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye (Lond)* 22(7):948-952, 2008.

77. van Beurden A, Schmitz RF, van Dijk CM, Baeten CI: Periodic acid Schiff loops and blood lakes associated with metastasis in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 22(6):424-429, 2012.
78. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q: Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 49(18):3914-3923, 2013.
79. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL: Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26):14608-14613, 2000.
80. di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, McDonald DM, Jones R, Munn LL: Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 65(13):5740-5749, 2005.
81. Chen L, Zhang S, Li X, Sun B, Zhao X, Zhang D, Zhao S: A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in intraocular melanoma model. *Oncol Rep* 21(4):989-999, 2009.
82. Maniotis AJ, Chen X, Garcia C, DeChristopher PJ, Wu D, Pe'er J, Folberg R: Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix. *Lab Invest* 82(8):1031-1043, 2002.
83. Clarijs R, Otte-Höller I, Ruiter DJ, de Waal RM: Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(4):912-918, 2002.
84. Mueller AJ, Bartsch DU, Folberg R, Mehaffey MG, Boldt HC, Meyer M, Gardner LM, Goldbaum MH, Pe'er J, Freeman WR: Imaging the microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy. *Arch Ophthalmol* 116(1):31-39, 1998.

85. Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM, Margaryan NV, Seftor RE, Miyagi Y, Hendrix MJ: Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 63(17):5381-5389, 2003.
86. Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ: Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 61(8):3250-3255, 2001.
87. Murphy GF: Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 91(5):647-664, 2011.
88. Sajithlal GB, McGuire TF, Lu J, Beer-Stolz D, Prochownik EV: Endothelial-like cells derived directly from human tumor xenografts. *Int J Cancer* 127(10):2268-2278, 2010.
89. Dunleavy JM, Dudley AC: Vascular Mimicry: Concepts and Implications for Anti-Angiogenic Therapy. *Curr Angiogenes* 1(2):133-138, 2012.
90. Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA, Seftor RE, Hendrix MJ: Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 44(1):17-27, 2002.
91. McAllister JC, Zhan Q, Weishaupt C, Hsu MY, Murphy GF: The embryonic morphogen, Nodal, is associated with channel-like structures in human malignant melanoma xenografts. *J Cutan Pathol* 37 Suppl 1:19-25, 2010.
92. Khalkhali-Ellis Z, Kirschmann DA, Seftor EA, Gilgur A, Bodenshtein TM, Hinck AP, Hendrix MJ: Divergence(s) in Nodal signaling between aggressive melanoma and embryonic stem cells. *Int J Cancer* 136(5): E242-251, 2015.

93. Frank NY, Schatton T, Kim S, Zhan Q, Wilson BJ, Ma J, Saab KR, Osherov V, Widlund HR, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Kupper TS, Murphy GF, Frank MH: VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res* 71(4):1474-1485, 2011.
94. Murphy GF, Wilson BJ, Girouard SD, Frank NY, Frank MH: Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Aspects Med* 39:33-49, 2014.
95. Lai CY, Schwartz BE, Hsu MY: CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 72(19):5111-5118, 2012.
96. Valyi-Nagy K, Kormos B, Ali M, Shukla D, Valyi-Nagy T: Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures. *Mol Vis* 18:588-592, 2012.
97. Demou ZN, Hendrix MJ: Microgenomics profile the endogenous angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma. *J Cell Biochem* 105(2):562-73, 2008.
98. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V: Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406(6795):5365-40, 2000.
99. Hess AR, Margaryan NV, Seftor EA, Hendrix MJ: Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* 236(12):3283-3296, 2007.

100. Margaryan NV, Strizzi L, Abbott DE, Seftor EA, Rao MS, Hendrix MJ, Hess AR: EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol Ther* 8(3):279-288, 2009.
101. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE: Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):8018-8023, 2001.
102. Cong R, Sun Q, Yang L, Gu H, Zeng Y, Wang B: Effect of Genistein on vasculogenic mimicry formation by human uveal melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 28:124, 2009
103. Liu R, Cao Z, Tu J, Pan Y, Shang B, Zhang G, Bao M, Zhang S, Yang P, Zhou Q: Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:630-638, 2012
104. Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor RE, Hendrix MJ: VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 5(2):228-233, 2006.
105. Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, Nickoloff BJ, Hendrix MJ: Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 65(21):9851-9860, 2005.
106. Hess AR, Hendrix MJ: Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle* 5(5):478-480, 2006.
107. Lissitzky JC, Parriaux D, Ristorcelli E, Vérine A, Lombardo D, Verrando P: Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 69(3):802-809, 2009.

108. Chen LX, He YJ, Zhao SZ, Wu JG, Wang JT, Zhu LM, Lin TT, Sun BC, Li XR:
Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through
down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal
melanoma model. *Cancer Biol Ther* 11(2):229-235, 2011.
109. Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M,
Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ: Cooperative interactions of
laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-
matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis
by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61(17):6322-6327, 2001.
110. Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Margaryan NV, Seftor RE, Hendrix MJ:
The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a
metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med* 10(1):174-196, 2006.
111. Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ: Phosphoinositide 3-kinase regulates
membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during
melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 63(16):4757-4762, 2003.
112. Zhang S, Li M, Gu Y, Liu Z, Xu S, Cui Y, Sun B: Thalidomide influences
growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin*
Cancer Res 27:60, 2008.
113. Zhang S, Zhang D, Sun B: Vasculogenic mimicry: Current status and future
prospects. *Cancer Let* 254:157-164, 2007.
114. Seftor REB, Seftor EA, Kirschman DA, Hendrix MJC: Targeting the Tumor
Microenviroment with Chemically Modified Tetracyclines: Inhibition of Laminin
5 γ 2 Chain Promigratory Fragments and Vasculogenic Mimicry. *Mol Cancer*
Ther 1:1173-1179, 2002.

115. Zhao L, Marshall ES, Kelland LR, Baguley BC: Evidence for the involvement of p38 MAP kinase in the action of the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Invest New Drugs* 25:271-276, 2007.
116. Hardy KM, Kirschmann DA, Seftor EA, Margaryan NV, Postovit L-M, Strizzi L, Hendrix MJC: Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 70(24): 10340–10350, 2010.
117. Strizzi L, Postovit L-M, Margaryan NV, Lipavsky A, Gadiot J, Blank C, Seftor REB, Seftor EA, Hendrix MJC: Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol* 4(1):67–78, 2009.
118. Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, Zhao X: Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Let* 249:188-197, 2007.
119. Zhao N, Sun BC, Sun T, Ma YM, Zhao XL, Liu ZY, Dong XY, Che N, Mo J, Gu Q: Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol* 29(5):3599-3607, 2012.
120. Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, Migliore C, Giordano S, Chiarugi P: HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 51(4):893-904, 2011.
121. Wu S, Singh RK: Resistance to chemotherapy and molecularly targeted therapies: rationale for combination therapy in malignant melanoma. *Curr Mol Med* 11(7):553-563, 2011.

122. Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, Figg WD, Sarli G, de Oliveira JT, Gärtner F: Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *ScientificWorldJournal* 2014:919570, 2014.
123. Schnegg CI, Yang MH, Ghosh SK, Hsu MY: Induction of vasculogenic mimicry overrides VEGFA silencing and enriches stem-like cancer cells in melanoma. *Cancer Res* 75(8):1682-1690, 2015.
124. Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, Baryshnikov AY, Lichinitser MR: Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level. *Melanoma Res* 17(6):370-379, 2007.
125. van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, Yokoyama Y, Griffioen AW, Hendrix MJ: Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 96(19):1473-1477, 2004.
126. Spinella F, Caprara V, Di Castro V, Rosanò L, Cianfrocca R, Natali PG, Bagnato A: Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *J Mol Med (Berl)* 91(3):395-405, 2013.
127. Orgaz JL, Ladhani O, Hoek KS, Fernández-Barral A, Mihic D, Aguilera O, Seftor EA, Bernad A, Rodríguez-Peralto JL, Hendrix MJ, Volpert OV, Jiménez B: Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma. *Oncogene* 28(47):4147-4161, 2009.
128. Rothhammer T, Bataille F, Spruss T, Eissner G, Bosserhoff AK: Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* 26(28):4158-4170, 2007.

129. Su F, Li B, Wang J, Xu X, Ren R, Li L, Gao F, Liu X: Molecular regulation of vasculogenic mimicry in human uveal melanoma cells: role of helix-loop-helix Id2 (inhibitor of DNA binding 2). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247(3):411-419, 2009.
130. Liu YR, Sun B, Zhao XL, Gu Q, Liu ZY, Dong XY, Che N, Mo J: Basal caspase-3 activity promotes migration, invasion, and vasculogenic mimicry formation of melanoma cells. *Melanoma Res* 23(4):243-253, 2013.
131. Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, Baryshnikov AY: The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry. *Melanoma Res* 17(1):1-8, 2007.
132. Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M: Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 173(6):1839-1852, 2008.
133. Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T: Microvascular Loops and Networks as Prognostic Indicators in Choroidal and Ciliary Body Melanomas. *J Natl Cancer Inst* 91(4):359-367, 1999.
134. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, Hwang T, Woolson RF, Pe'er J, Gruman LM: The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 100(9):1389-1398, 1993.
135. Warso MA, Maniotis AJ, Chen X, Majumdar D, Patel MK, Shilkaitis A, Gupta TK, Folberg R: Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 7(3):473-477, 2001.
136. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, Walk E, Penault-Llorca F, Kurosumi M, Dietel M, Wang L, Loftus M, Pettay J, Tubbs RR, Grogan TM: Development of automated brightfield double In Situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17

- centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence In Situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol* 3:41, 2008.
137. Muthukkaruppan VR, Kubai L, Auerbach R: Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J Natl Cancer Inst* 69:699-708, 1982.
 138. Shimizu T, Hino K, Tauchi K, Ansai Y, Tsukada K: Prediction of axillary node metastasis by intravenous digital subtraction angiography in breast cancer, its correlation with microvascular density. *Breast Cancer Res Treat* 61:261-269, 2000.
 139. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B: Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14:461-466, 1996.
 140. Chandrachud KM, Pendleton N, Chisholm DM, Horan MA, Schor AM: Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 76:1367-1375, 1997.
 141. Cantou De Leon D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J: Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer* 13:856-862, 2003.
 142. Chen B, Fang WK, Wu ZY, Xu XE, Wu JY, Fu JH, Yao XD, Huang JH, Chen JX, Shen JH, Zheng CP, Wang SH, Li EM, Xu LY: The prognostic implications of microvascular density and lymphatic vessel density in esophageal squamous cell carcinoma: Comparative analysis between the traditional whole sections and the tissue microarray. *Act Histochem* 116(4):646-653, 2014.
 143. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Sansonno D, Dammacco F: Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* 32:437-444, 2006.

144. Yao X, Qian CN, Zhang ZF, Tan MH, Kort EJ, Yang XJ, Resau JH, The BT: Two distinct types of blood vessels in clear cell renal cell carcinoma have contrasting prognostic implications. *Clin Cancer Res* 13:161-169, 2007.
145. Lackner C, Jukic Z, Tsybrovsky O, Jatzko G, Wette V, Hoeffter G, Klimpfinger M, Denk H, Zatloukal K: Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. *Virchows Arch* 445:160-167, 2004.
146. Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J: Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 11:3227-3233, 2005.
147. Fernandez-Aguilar S, Jondet M, Simonart T, Noel JC: Microvessel and lymphatic density in tubular carcinoma of the breast: comparative study with invasive low-grade ductal carcinoma. *Breast* 15, 782-785, 2006.
148. Sun S, Pan X, Zhao L, Zhou J, Wang H, Sun Y: The expression and relationship of CD68-Tumor-Associated Macrophages and Microvascular Density With the Prognosis of Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 9(3):270-277, 2016.
149. Cernea CR, Ferraz AR, de Castro IV, Sotto MN, Logullo AF, Bacchi CE, Potenza AS: Angiogenesis and skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Head Neck* 26:396-400, 2004.
150. Kusamura S, Derchain S, Alvarenga M, Gomes CP, Syrjanen KJ, Andrade LA: Expression of p53, c-erbB-2, Ki-67, and CD34 in granulosa cell tumor of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 13:450-457, 2003.
151. Ribatti D, Ponzoni M: Antiangiogenic strategies in neuroblastoma. *Cancer Treat Rev* 31:27-34, 2005.

152. Busam KJ, Berwich M, Blession K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T, Fine J, Cochran AJ, White WL, Rivers J: Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 147:1049-1056, 2005.
153. Couvelard A, O'Toole D, Turley H, Leek R, Sauvanet A, Degott C, Ruzniewski P, Belghiti J, Harris AL, Gatter K, Pezzella F: Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumor progression. *Br J Cancer* 92:94-101, 2005.
154. Song H, Jing G, Wang L, Guo W, Ren G: Periodic acid-Schiff-positive loops and networks as a prognostic factor in oral mucosal melanoma. *Melanoma Res* 26(2):145-152, 2016.
155. Hillen F, van de Winkel A, Creyten D, Vermeulen AH, Griffioen AW: Proliferating endothelial cells, but not microvessel density, are a prognostic parameter in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16:453-457, 2006.
156. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S: Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 55:5049-5053, 1995.
157. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Jett J, Caporaso NE, Liotta LA, Harris CC: Nitric Oxide synthase cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6:4739-4744, 2000.
158. Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, Alberts DS: Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer* 110(11):2519-2527, 2007.

159. Zidlik V, Brychtova S, Uvirova M, Ziak D and Dvorackova J: The Changes of Angiogenesis and Immune Cell Infiltration in the Intra- and Peri-Tumoral Melanoma Microenvironment. *Int J Mol Sci* 16(4): 7876-7889, 2015.
160. Tu YT, Tao J, Liu YQ, Li Y, Huang CZ, Zhang XB, Lin Y: Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in human malignant melanoma and their relation to angiogenesis. *Clin Exp Dermatol* 31(3):413-418, 2006.
161. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Lospalluti M, Serio G, Carrel S and Dammacco F: Melanocyte Tumor Progression Associated with Changes in Angiogenesis and Expression of the 67-Kilodalton Laminin Receptor. *Cancer* 72(2): 455-461, 1993.
162. Cao Y: Future options of anti-angiogenic cancer therapy. *Chinese J Cancer* 35:21, 2016.
163. Nerini IF, Cesca M, Bizzaro F, Giavazzi R: Combination therapy in cancer: effects of angiogenesis inhibitors on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Chinese J Cancer* 35:61, 2016.
164. Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, DeRemer DL, Somanath PR: Anti-Angiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacother* 32(12):1095-1111, 2012.
165. NIH/National Cancer Institute: www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-bevacizumab
166. NIH/National Cancer Institute: www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet#q4
167. Corrie PG, Marshall A, Dunn JA, Middleton MR, Nathan PD, Gore M, Davidson N, Nicholson S, Kelly CG, Marples M, Danson SJ, Marshall E, Houston SJ, Board RE, Waterston AM, Nobes JP, Harries M, Kumar S, Young G, Lorigan P: Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of

- recurrence (AVAST-M): preplanned interim results from a multicenter, open-label, randomized controlled phase III study. *Lancet Oncol* 15(6):620-630, 2014.
168. Piperno-Neumann S, Diallo A, Etienne-Grimaldi M-C, Bidard F-C, Rodrigues M, Plancher C, Mariani P, Cassoux N, Decaudin D, Asselain B, Servois V: Phase II Trial of Bevacizumab in Combination With Temozolomide as First-Line Treatment in Patients With Metastatic Uveal Melanoma. *Oncologist* 21(3):281-282, 2016.
 169. Zhang JT, Sun W, Zhang WZ, Ge CY, Liu ZY, Zhao ZM, Lu XS, Fan YZ: Norcantharidin inhibits tumor growth and vasculogenic mimicry of human gallbladder carcinomas by suppression of the PI3-K/MMPs/Ln-5 γ 2 signaling pathway. *BMC Cancer* 14:193, 2014.
 170. Wu S, Yu L, Wang D, Zhou L, Cheng Z, Chai D, Ma L, Tao Y: Aberrant expression of CD133 in non-small cell lung cancer and its relationship to vasculogenic mimicry. *BMC Cancer* 12:535, 2012.
 171. Xu X, Yang L, Zheng L, Pan Y, Cao Z, Zhang Z, Zhou Q, Yang B, Cao C: Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses vasculogenic mimicry and proliferation of highly aggressive pancreatic cancer PaTu8988 cells. *BMC Cancer* 14:373, 2014.
 172. Francescone R, Scully S, Bentley B, Yan W, Taylor SL, Oh D, Moral L, Shao R: Glioblastoma-derived Tumor Cells Induce Vasculogenic Mimicry through Flk-1 Protein Activation. *J Biol Chem* 287(29):24821-24831, 2012.
 173. Yao X, Ping Y, Liu Y, Chen K, Yoshimura T, Liu M, Gong W, Chen C, Niu Q, Guo D, Zhang X, Wang JM, Bian X: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) plays a Key Role in Vasculogenic Mimicry Formation, Neovascularization and Tumor Initiation by Glioma Stem-like Cells. *PLoS One* 8(3):e57188, 2013.

174. Mao JM, Liu J, Guo G, Mao XG, Li CX: Glioblastoma vasculogenic mimicry: signaling pathways progression and potential anti-angiogenesis targets. *Biomarker Res* 3:8, 2015
175. Wang L, Lin L, Chen X, Sun L, Liao Y, Huang N, Liao W: Metastasis-associated in colon cancer-1 promotes vasculogenic mimicry in gastric cancer by upregulating Twist1/2. *Oncotarget* 6:11492-11506, 2015.
176. Zhao N, Sun BC, Zhao XL, Wang Y, Meng J, Che N, Dong XY, Gu Q: Role of Bcl-2 and its associated miRNAs in vasculogenic mimicry of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8:15759-15768, 2015.
177. Tang NN, Zhu H, Zhang HJ, Zhang WF, Jin HL, Wang L, Wang P, Hu GJ, Hao B, Shi RH: HIF-1 α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 20:17894-17904, 2014.
178. Wang W, Lin P, Han C, Cai W, Zhao X, Sun B: Vasculogenic mimicry contributes to lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 29:60, 2010.
179. Cai XS, Jia YW, Mei J, Tang RY: Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chin Med J (Engl)* 117(1):94-98, 2004.
180. Sook AK, Fletcher MS, Zahn CM, Gruman LM, Coffin JE, Seftor EA, Hendrix MJ: The clinical significance of tumor cell-lined vasculature in ovarian carcinoma: implications for anti-vasculogenic therapy. *Cancer Biol Ther* 1(6):661-664, 2002.
181. Shen Y, Quan J, Wang M, Li S, Yang J, Lv M, Chen Z, Zhang L, Zhao X, Yang J: Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer. *Oncotarget* 2017 Apr 7. doi: 10.18632/oncotarget.16919. [Epub ahead of print].

182. Liu XM, Zhang QP, Mu YG, Zhang XH, Sai K, Pang JC, Ng HK, Chen ZP: Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J Neurooncol* 105(2):173-179, 2011.
183. Yang JP, Liao YD, Mai DM, Xie P, Qiang YY, Zheng LS, Wang MY, Mei Y, Meng DF, Xu L, Cao L, Yang Q, Yang XX, Wang WB, Peng LX, Huang BJ, Qian CN: Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis. *Angiogenesis* 19(2):191-200, 2016.
184. Guo Q, Yuan Y, Jin Z, Xu T, Gao Y, Wei H, Li C, Hou W, Hua B: Association between Tumor Vasculogenic Mimicry and the Poor Prognosis of Gastric Cancer in China: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2016:2408645, 2016.
185. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE: Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)* 27(2):230-242, 2013.
186. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW: Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res* 18(3):191-200, 2008.
187. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL: Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 101(7):452-474, 2009.
188. Modlin RL, Gottlieb B, Taylor C, Rea TH: Identification of cells lining pseudovascular spaces of benign pigmented nevi. *Am J Dermatopathol* 6 Suppl:25-29, 1984.
189. Lee KH, Han YW, Park CJ: Three Cases of Melanocytic Nevi with Pseudovascular Spaces. *Korean J Dermatol* 45(1):90-93, 2007.

190. Demitsu T, Kakurai M, Yamada T, Kiyosawa T, Yaoita H: The vascular space-like structure in melanocytic nevus is not an injection artifact: report of a case and an experimental study. *J Dermatol* 25(3):143-149, 1998.
191. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Delvenne P: Simulants of malignant melanoma. *Onc Rev* 9(1):278, 2015.
192. Lebe B, Pabuccuoglu U, Ozer E: The significance of Ki-67 proliferative index and cyclin D1 expression of dysplastic nevi in the biologic spectrum of melanocytic lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15(2):160-164, 2007.
193. Clarke LE: Dysplastic nevi. *Clin Lab Med* 31(2):255-265, 2011.
194. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H: Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res* 28(6):661-672, 2015.
195. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr.: Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 46:1787-1794, 1980.
196. Elder DE, Murphy GF: Melanocytic tumors of the skin. *Atlas of tumor pathology*. 3rd series. Fascicle 2. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology. 1991.
197. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu S-H: Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 17:459-468, 1987.
198. Piepkorn MW, Barnhill RL, Cannon-Albright LA, Elder DE, Goldgar DE, Lewis CM, Maize JC, Meyer LJ, Rabkin MS, Sagebiel RW: A multiobserver, population-based analysis of histologic dysplasia in melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 30:707-714, 1994.

199. Arumi-Uria M, McNutt NS, Finnerty B: Grading of atypia in nevi: correlation with melanoma risk. *Mol Pathol* 16(8): 764-77, 2003.
200. Zembowicz A, Mandal RV, Choopong P: Melanocytic Lesions of the Conjunctiva. *Arch Pathol Lab Med* 134:1785-1792, 2010.

