



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης
στο βασικοκυτταρικό και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του
δέρματος των βλεφάρων καθώς και σε προκαρκινωματώδεις δερματικές
αλλοιώσεις. Συσχέτιση και με κλινικές παραμέτρους**

ΤΖΟΥΤΖΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2

Ημερομηνία αίτησης του κ. Τζούτζου Κωνσταντίνου: 25-5-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 560^α/21-6-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Κίτσος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Μπατιστάτου Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 28-6-2005

«Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στο βασικοκυτταρικό και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος των βλεφάρων καθώς και σε προκαρκινωμάτoidεις δερματικές αλλοιώσεις. Συσχέτιση και με κλινικές παραμέτρους».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 740^α/3-7-2012

1. Βουγιουκλάκης Θεόδωρος, Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Στεφάνου Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Καλογερόπουλος Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Κίτσος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μπατιστάτου Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Στεφανιώτου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 1-7-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τζαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΚΑΛΗΤΟΠΟΥΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

Στη σύζυγό μου,
Αγγελική και στη νεογέννητη κόρη μου

Πρόλογος

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα συνιστά το συχνότερο δερματικό κακοήθη όγκο στον άνθρωπο. Είναι ο συχνότερα απαντώμενος κακοήθης όγκος στα βλέφαρα και αποτελεί το 90% των κακοηθειών που εντοπίζονται σε αυτά. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα μαζί με το βασικοκυτταρικό αποτελούν την ομάδα των μη μελανωτικών δερματικών κακοήθων όγκων και είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενοι δερματικοί καρκίνοι στον άνθρωπο. Η αντιμετώπισή τους περιλαμβάνει μια σειρά από θεραπευτικές επιλογές και η πρόγνωση συνήθως είναι άριστη, ενώ σπάνια εμφανίζονται επιπλοκές όπως υποτροπή ή μετάσταση.

Η αγγειογένεση στις συμπαγείς νεοπλασίες είναι μια πολυσταδιακή διεργασία ευρέως μελετημένη σε διάφορα καρκινώματα, ιδιαίτερα τα τελευταία 20 έτη. Ελέγχεται από τα καρκινικά κύτταρα και συντελεί στη δημιουργία ικανού αγγειακού δικτύου για την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Ο παράγοντας VEGF είναι ένας από τους πολλούς παράγοντες που εμπλέκονται στην διαδικασία της αγγειογένεσης και αποτέλεσε το επίκεντρο των ερευνών. Η λεμφαγγειογένεση είναι διαδικασία αντίστοιχη της αγγειογένεσης στο λεμφαγγειακό δίκτυο και αποτελεί ένα γεγονός που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στις δερματικές κακοήθειες.

Η μελέτη του αγγειογενετικού δυναμικού διαφόρων νεοπλασιών μέσω της αξιολόγησης του VEGF και της CD-105 μετρούμενης μικροαγγειακής πυκνότητας διενεργήθηκε από πολλές πρόσφατες μελέτες. Όσον αφορά τις δερματικές κακοήθειες, τις περισσότερες μελέτες έχει να επιδείξει το κακοήθες μελάνωμα και λιγότερες το βασικοκυτταρικό και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Η διερεύνηση των καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων των βλεφάρων δεν έχει να επιδείξει, από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στα βασικοκυτταρικά και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων καθώς και στις προκαρκινικές αλλοιώσεις αυτών, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των κύριων παραγόντων ελέγχου των παραπάνω διεργασιών και στη συσχέτιση της τυχόν προγνωστικής αξίας των αποτελεσμάτων με την κλινική έκβαση των ασθενών.

Πριν το τέλος αυτού του προλόγου, επιθυμώ να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Δημήτριο Στεφάνου, ο οποίος προσέφερε ακούραστα τη συμπαράστασή του και τις επιστημονικές του υποδείξεις στην παρούσα διατριβή, η οποία εκπονήθηκε κάτω από τη δική του εποπτεία.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ επίσης να εκφράσω:

Στον κ. Γεώργιο Κίτσο, αναπληρωτή Καθηγητή Οφθαλμολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για το αμέριστο ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Στην κ. Άννα Μπατιστάτου, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την συνεχή συμπαράστασή της, την προσφορά τεχνογνωσίας και το εν γένει ενδιαφέρον της στην προσπάθειά μου.

Στις κ. Ευδοκία Αρκουμάνη και Βασιλική Σιωζοπούλου, Ιατρούς Παθολογοανατόμους, για την βοήθειά τους στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πρόθυμη συνεργασία τους για την πραγματοποίηση του τεχνικού μέρους αυτής της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, η ηθική συμπαράσταση των οποίων υπήρξε σημαντική για την ολοκλήρωση της παρούσας προσπάθειας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	9
Επιδημιολογία-αιτιολογία	9
Εντόπιση-κλινική εικόνα-βιολογική συμπεριφορά	11
Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία	14
Αντιμετώπιση βασικοκυτταρικού καρκινώματος	16
Πρόγνωση	20
2. ΒΑΣΙΚΟΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	23
3. ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	25
Επιδημιολογία-αιτιολογία	25
Εντόπιση-κλινική εικόνα-βιολογική συμπεριφορά	28
Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία	31
Αντιμετώπιση-πρόγνωση	34
4. ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	37
Ακτινική κεράτωση	37
Νόσος Bowen	39
5. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	43
Γενικά –ορισμοί	43
Γονίδιο-πρωτεϊνική δομή	49
Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της παραγωγής VEGF	49
Υποδοχείς VEGF-A	51
VEGFR1	52
VEGFR2	53
Neuropilins	55
Βιολογικές δράσεις	56
Ρόλος στην νεοπλασματική αγγειογένεση	57
Μικροαγγειακή πυκνότητα	59
6. ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	63
Γενικά-ορισμοί	63

Παράγοντες λεμφαγγειογένεσης	66
ΣΚΟΠΟΣ	71
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	75
Επιλογή δείγματος	75
Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας	76
Αξιολόγηση της έκφρασης των CD-105, VEGF, Flt-1, Flk-1, Flt-4	77
Στατιστική επεξεργασία	79
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
Γενικές παρατηρήσεις και περιγραφικά στατιστικά	83
BCC-Έκφραση αντισωμάτων και συσχέτιση αυτών με κλινικές παραμέτρους	85
Λοιπά καρκινώματα-στατιστική σύγκριση με τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα	107
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
Περίληψη	127
Abstract	131
Βιβλιογραφία	135

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (ΒΚΚ) αποτελεί έναν τοπικά αναπτυσσόμενο όγκο του οποίου τα κύτταρα ομοιάζουν προς τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας¹. Συνιστά το συχνότερο δερματικό κακοήγη όγκο στον άνθρωπο². Στο 90% των περιπτώσεων^{3,4} εμφανίζεται στην κεφαλή και τον τράχηλο και από το ποσοστό αυτό περίπου το 10% εμφανίζεται στην περιοχή των βλεφάρων⁵. Το ΒΚΚ είναι ο πλέον συχνά απαντώμενος κακοήθης όγκος των βλεφάρων και αποτελεί το 90% των κακοηθών όγκων που εμφανίζονται σε αυτά⁶.

Η μακροχρόνια έκθεση στον ήλιο και η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας που δρα αθροιστικά, φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνισή του, όχι όμως με τρόπο ξεκάθαρο, όπως στην περίπτωση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος⁷. Για το λόγο αυτό παρατηρείται η εμφάνισή του κυρίως σε μέρη του σώματος ακάλυπτα στον ήλιο⁸, χωρίς όμως να αποκλείονται και περιπτώσεις όπου το ΒΚΚ έχει διαπιστωθεί σε σημεία του σώματος προστατευμένα από την ηλιακή ακτινοβολία^{4,7,9}. Προβληματισμό επίσης προκαλεί η εμφάνιση του ΒΚΚ στη συντριπτική του πλειοψηφία στην κεφαλή και στον τράχηλο, ενώ άλλα σημεία που δέχονται εξίσου την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας (π.χ. ραχιαία επιφάνεια του πήχη) δεν εκδηλώνουν παρόμοιες βλάβες¹⁰. Το φαινόμενο αυτό είναι ακόμα υπό έρευνα, εικάζεται όμως ότι τα κύτταρα του δέρματος των περιοχών αυτών έχουν διαφορετική ικανότητα¹⁰ στην επιδιόρθωση των γενετικών βλαβών που συμβαίνουν με την επίδραση του ηλίου⁹⁻¹¹, ενώ πιθανώς και η διαφορά στην ικανότητα σύνθεσης μελανίνης να παίζει κάποιο ρόλο¹²⁻¹⁴. Επιπλέον φαίνεται ότι για την ανάπτυξη του το ΒΚΚ δεν απαιτεί την ύπαρξη προηγούμενης προκαρκινικής βλάβης, όπως το

ΑΚΚ¹⁵, δεν αποκλείεται όμως η συσχέτισή του με ηλιακά εγκαύματα που συμβαίνουν στην παιδική και εφηβική ηλικία¹⁶⁻¹⁸, ενοχοποιείται δε η ευκαιριακή έκθεση στον ήλιο και όχι τόσο η συνεχής έκθεση για επαγγελματικούς λόγους (π.χ. αγρότες)⁸. Η κατανομή του ΒΚΚ ακολουθεί στενά την κατανομή των τριχοσηγηματογόνων μονάδων και για το λόγο αυτό ουδέποτε συμβαίνει στον ημιβλεννογόνο των χειλέων, στις παλάμες και τα πέλματα². Άλλωστε δεν αναπτύσσεται σε βλεννογονικές επιφάνειες.

Το ΒΚΚ εμφανίζεται συχνότερα στη λευκή φυλή από ότι στη μαύρη με ελαφρά υπεροχή των ανδρών έναντι των γυναικών, ενώ γενικά είναι πιο συχνό σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα⁸. Στα άτομα αυτά είναι και ο παράγοντας της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας που δρα αθροιστικά¹ και αυξάνει την επίπτωση της νόσου. Σε αυτή την αθροιστική δράση οφείλεται το γεγονός ότι το ΒΚΚ συναντάται συχνότερα σε ηλικιωμένους ασθενείς^{9,19} ηλικίας άνω των 60 ετών⁵, ενώ είναι ασύνηθες κάτω από την ηλικία των 40 και σπάνιο κάτω από τα 30 έτη. Εξαιρέση αποτελούν ασθενείς που παρουσιάζουν κάποιες σπάνιες νοσολογικές οντότητες που μπορούν να αναπτύξουν ΒΚΚ κατά τη διάρκεια της πρώτης η δεύτερης δεκαετίας της ζωής τους και είναι:

Η **μελαγχρωματική ξηροδερμία**⁶ είναι μια υπολειπόμενη αυτοσωματική νόσος που χαρακτηρίζεται από δερματικές βλάβες μετά από έκθεση στο ηλιακό φως με επακόλουθο προοδευτικές ανωμαλίες της χρωστικής του δέρματος. Οι προσβεβλημένοι ασθενείς εμφανίζουν πτηνόμορφα χαρακτηριστικά προσώπου και προδιάθεση στη μετέπειτα δημιουργία ΒΚΚ, μελανώματος, επιδερμοειδικού καρκινώματος που μπορεί να έχει πολλαπλή εμφάνιση, όπως και κακοήθεις βλάβες στον επιπεφυκότα.

Το σύνδρομο **βασικοκυτταρικού καρκινώματος δίκην σπίλου**⁶ (Gorlin-Golz) είναι μια επικρατούσα αυτοσωματική διαταραχή στην οποία παρατηρούνται συγγενείς διαμαρτίες των οστών, του ΚΝΣ, του προσώπου και των οφθαλμών. Πολλοί από τους ασθενείς με

αυτή τη διαταραχή εμφανίζουν πολλαπλά μικρά ΒΚΚ κατά τη διάρκεια της δεύτερης δεκαετίας της ζωής τους.

ΕΝΤΟΠΙΣΗ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Τα βλέφαρα είναι μυώδεις, ευκίνητες δερματικές πτυχές σχήματος μηνοειδούς²⁰. Αρχίζουν αντίστοιχα από το άνω χείλος του κόγχου (άνω βλέφαρο) και το κάτω χείλος του κόγχου (κάτω βλέφαρο) και εκτείνονται μέχρι το ελεύθερο βλεφαρικό χείλος σχηματίζοντας τον έσω κανθό (ρινικά) και τον έξω κανθό (κροταφικά). Το ελεύθερο βλεφαρικό χείλος έχει μήκος 35 mm και πάχος 2 mm. Το άνω και κάτω βλέφαρο χωρίζονται μεταξύ τους από τη βλεφαρική σχισμή και ενώνονται στα άκρα τους με τον έσω και τον έξω βλεφαρικό σύνδεσμο. Κάθε βλέφαρο φέρει δύο επιφάνειες, μια πρόσθια και μια οπίσθια αποτελούμενες από τα έξω προς τα έσω από τα εξής ανατομικά στοιχεία: Το δέρμα, τον υποδόριο ιστό, το μυϊκό στρώμα, το υπομυϊκό στρώμα, τον ινώδη σκελετό και τον επιπεφυκότα²⁰.

Το ΒΚΚ εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κάτω βλέφαρο (50%) και ακολουθούν με σειρά μειούμενης συχνότητας η εντόπιση στον έσω κανθό (30%), στο άνω βλέφαρο (15%) και στον έξω κανθό (5%)⁶. Κλινικά το ΒΚΚ των βλεφάρων εμφανίζεται κυρίως με τους τρεις ακόλουθους τύπους:

Οζώδες ΒΚΚ (nodular): είναι ένα στιλπνό, σκληρό, μαργαριταροειδές οζίδιο με μικρά διασταλμένα αιμοφόρα αγγεία στην επιφάνειά του. Είναι το πιο συχνό και απαντάται είτε σε κυστική μορφή (cystic-adenoid), είτε σε συμπαγή μορφή (solid)^{2,8}. Αρχικά ο όγκος αναπτύσσεται βραδέως και ενδεχομένως να χρειαστούν 1-2 χρόνια για να λάβει το μέγεθος του 1 εκ. Στο σημείο αυτό και αν δεν αντιμετωπισθεί εγκαίρως είναι δυνατό η εξέλιξή του

να είναι ταχύτερη με το ογκίδιο να αποκτά μια κεντρική εξέλκωση και να μεταπέσει σε οζώδο-ελκώδες BKK⁶.

Ελκώδες BKK (ulcerative): είναι μια βλάβη που χαρακτηρίζεται από κεντρική εξέλκωση με υπερυψωμένα και αναδιπλωμένα χείλη και διευρυμένα αιμοφόρα αγγεία που διατρέχουν τα πλάγια τοιχώματα της αλλοίωσης. Είναι δυνατό μια τέτοια βλάβη να επεκταθεί και να προσβάλλει μεγάλο μέρος του βλεφάρου η και ολόκληρο το βλέφαρο⁶ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ελκώδες BKK στο κάτω βλέφαρο

Σκληρωτικό BKK (morphea-like): είναι το λιγότερο συχνό από τα άλλα δύο. Διηθεί ακτινοειδώς την επιδερμίδα ως μια επίπεδη σκληρυμένη πλάκα και για το λόγο αυτό πολλές φορές είναι δύσκολο να διαγνωσθεί. Τα όρια του όγκου μπορεί να είναι αδύνατο να εντοπισθούν κλινικά ενώ με την ψηλάφηση ο όγκος δίδει την εντύπωση ευρύτερης αλλοίωσης από ότι φαίνεται με την επισκόπηση. Στοιχείο που προστίθεται στη δυσκολία της διάγνωσης αποτελεί το γεγονός ότι το σκληρωτικό BKK μπορεί να μιμείται εντοπισμένη περιοχή ετερόπλευρης «χρόνιας βλεφαρίτιδος»⁶.

Άλλοι υπότυποι του BKK που μπορεί να αναπτυχθούν στα βλέφαρα είναι το μελαγχρωματικό BKK (pigmented)^{2,8} που εμφανίζεται ως μελανωτική βλάβη και πρέπει

να διαφοροδιαγνωσθεί από το κακόηθες μελάνωμα και το επιφανειακώς εξαπλούμενο ΒΚΚ (superficial)^{1,2,8}, το οποίο είναι λιγότερο επιθετικό και μπορεί να εμφανισθεί ως έκζεμα που επιμένει παρά τη θεραπεία.

Το ΒΚΚ είναι ένας όγκος που αναπτύσσεται βραδέως και εξαπλούται κατά συνέχεια ιστού τοπικά τόσο σε έκταση όσο και σε βάθος⁶. Δύναται, αν δεν αντιμετωπισθεί, να προσβάλλει χόνδρους, οστά ακόμη και μήνιγγες (rodent ulcer)². Οι όγκοι που εντοπίζονται στον έσω κανθό έχουν μεγαλύτερη τάση να διεισδύουν στον κόγχο και τους παραρρινίους κόλπους και είναι περισσότερο δύσκολοι στην αντιμετώπισή τους. Αυτό παρατηρείται και σε όγκους που έχουν θεραπευθεί ατελώς, καθώς όταν υποτροπιάζουν γίνονται πιο επιθετικοί⁶. Συγκεκριμένα οι υπότυποι του ΒΚΚ που έχουν επιθετική συμπεριφορά δύναται να προσβάλλουν τα οστικά τοιχώματα του οφθαλμικού κόγχου (άνω γνάθος, μετωπιαίο, ηθμοειδές, σφηνοειδές και ζυγωματικό οστό), τους οφθαλμικούς μύες, τον δακρυϊκό ασκό, τον ρινοδακρυϊκό πόρο και τη σκληρή μήνιγγα²¹. Οι μεταστάσεις από ΒΚΚ είναι εξαιρετικά σπάνιες (<0.50%)⁵ και αφορούν κυρίως ασθενείς με AIDS, άτομα που έχουν υποστεί μεταμόσχευση και ανοσοκατασταλμένα γενικά άτομα. Συχνότερες είναι οι μεταστάσεις δια της λεμφικής οδού²² στους επιχώριους λεμφαδένες (αφορούν το 60% των μεταστάσεων), ενώ οι πνεύμονες τα οστά και το ήπαρ αποτελούν τα όργανα στόχους της αιματογενούς διασποράς²³⁻²⁶ και η μέση επιβίωση όταν προσβληθούν τα όργανα αυτά φθάνει κατά μέσο όρο τους 10 μήνες²⁷. Επιπρόσθετα η περινευρική διήθηση είναι σπανιότατη (<0.2%) και παρατηρείται στους επιθετικούς υπότυπους, σε υποτροπές και σε μεταστατικά ΒΚΚ²⁸⁻³⁰.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ- ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Το ΒΚΚ θεωρείται ότι προέρχεται από αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας και για το λόγο αυτό τα καρκινικά κύτταρα του ΒΚΚ εμφανίζουν ομοιότητες με αυτά της βασικής στοιβάδας του δέρματος⁸. Η ιστοπαθολογία του ΒΚΚ ποικίλλει ανάλογα με τον κάθε υπότυπο, υπάρχουν όμως κάποια κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά³¹. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεγάλους βαθυχρωματικούς πυρήνες σχήματος οβάλ ή επιμήκους και ομοιάζουν με τους πυρήνες των βασικών κυττάρων της επιδερμίδας (βασικοκυτταροειδείς χαρακτήρες), διαθέτουν λίγο κυτταρόπλασμα και δεν παρουσιάζουν ενδοκυττάρια γέφυρες². Σπάνια παρατηρούνται μτώσεις ακόμα και σε ΒΚΚ που μεθίστανται, ενώ επίσης σπάνια είναι η εμφάνιση έντονης κυτταρικής ατυπίας¹.

Όσον αφορά την μικροσκοπική εικόνα, τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται σε ομάδες/δοκίδες ή σε κυστικούς σχηματισμούς. Οι νεοπλασματικές ομάδες παρατηρούνται σχεδόν αποκλειστικά σε επαφή με την επιδερμίδα, σε μία θέση ή και πολυεστιακά και επεκτείνονται προς το χόριο.

Συχνά τα καρκινικά κύτταρα διατάσσονται πασαλοειδώς στην περιφέρεια της αλλοίωσης (peripheral palisading), ενώ σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί συρρίκνωση του στρώματος με δημιουργία σχισμών-βοθρίων, χαρακτηριστικά τα οποία είναι βοηθητικά για την ιστοπαθολογική διάγνωση. Επιπλέον μπορεί να παρατηρηθεί εναπόθεση βλέννης. Εξαιρετικά σπάνια παρατηρούνται γιγάντιες κυτταρικές μορφές, ατυπία του στρώματος, πάχυνση της βασικής μεμβράνης, οστικού τύπου μετάπλαση, εκκρινής διαφοροποίηση και περινευρική διήθηση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Κλασικό ΒΚΚ οζώδους τύπου με την χαρακτηριστική πασαλοειδή διάταξη των καρκινικών κυττάρων στην περιφέρεια

Ορισμένα ειδικά χαρακτηριστικά μπορεί να παρατηρηθούν στους διάφορους υπότυπους :

Στο **οζώδες ΒΚΚ** υπάρχουν μεγάλα βασεόφιλα κύτταρα με σχηματισμό βοθρίων³¹.

Στο **μελαγχρωματικό ΒΚΚ** η εικόνα είναι παρόμοια με του οζώδους, εδώ όμως υπάρχουν και μελανοκύτταρα ανάμεσα από τα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν πολυάριθμα κοκκία μελανίνης στο κυτταρόπλασμά τους καθώς και έντονη παρουσία μελανοφάγων³¹.

Στο **επιφανειακώς εξαπλούμενο ΒΚΚ** παρατηρούνται ομάδες από καρκινικά κύτταρα που εισβάλλουν στο χόριο από τη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας. Εδώ υπάρχει πασαλοειδής διάταξη των περιφερικών κυτταρικών στρωμάτων και επιδερμική ατροφία³¹.

Στο **σκληρωτικό ΒΚΚ** καρκινικά κύτταρα βρίσκονται καθηλωμένα σε πυκνό ινώδες στρώμα με εισβολή στο χόριο³¹.

Από ιστολογικής απόψεως τα ΒΚΚ μπορούν να διαιρεθούν σε καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης¹. Τα πρώτα έχουν την τάση να διαφοροποιούνται προς δερματικά

εξαρτήματα τριχών, σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες. Δεν μπορεί όμως να γίνει απόλυτη διάκριση μεταξύ αυτών των ομάδων γιατί σε αδιαφοροποίητα ΒΚΚ παρουσιάζονται περιοχές διαφοροποίησης και το αντίθετο. Από κλινικής απόψεως ίσως είναι πιο χρήσιμη η ταξινόμηση των ΒΚΚ σε αυτά που παρουσιάζουν τάση για υποτροπή ή όχι¹. Έτσι συχνή τάση για υποτροπή παρουσιάζουν το επιπολής εξαπλούμενο ΒΚΚ, το σκληρωτικό, το διηθητικό, το μικροοζώδες και το μετατυπικό ΒΚΚ (basosquamous).

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Πρώτο μέλημα του χειρουργού οφθαλμιάτρου είναι η ιστολογική επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης και ακολούθως να επιλεγεί ο ορθός τρόπος αντιμετώπισης της βλάβης⁶. Πρέπει να γίνει σαφές ότι η θεραπεία υποδεικνύεται από ορισμένα κριτήρια που τοποθετούν την κάθε περίπτωση σε συγκεκριμένες ομάδες που η κάθε μία απαιτεί διαφορετική αντιμετώπιση. Αυτά είναι³²:

- α. Το μέγεθος του όγκου
- β. Οι προηγηθείσες η όχι υποτροπές
- γ. Η κλινική εικόνα
- δ. Ο ιστολογικός υπότυπος
- ε. Η τοποθεσία του όγκου
- στ. Οι προηγηθείσες θεραπευτικές οδοί
- ζ. Η ιστολογική ταξινόμηση
- η. Η ύπαρξη περινευρικής διήθησης
- θ. Η σε βάθος και έκταση εξάπλωση
- ι. Η τάση για διαφοροποίηση

Ως θεραπεία εκλογής για το ΒΚΚ επιλέγεται η **χειρουργική αφαίρεση** του όγκου⁶ που σκοπό έχει την αφαίρεση του εξ' ολοκλήρου, αλλά και την ταυτόχρονη διατήρηση όσο το δυνατόν περισσότερου υγιούς ιστού για την εξασφάλιση ενός αποδεκτού λειτουργικού και αισθητικού αποτελέσματος³³, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί με δυο μεθόδους :

Η απλή αφαίρεση (standard excision) ακολουθούμενη από ταχεία βιοψία περιλαμβάνει εκτομή του όγκου, αλλά και του παρακείμενου υγιούς ιστού και κατόπιν ιστολογική εξέταση των ορίων του αφαιρεθέντος παρασκευάσματος κατά τη διάρκεια του χειρουργείου ώστε να επιβεβαιωθεί ότι τα όρια δεν παρουσιάζουν διηθήσεις. Τότε το βλέφαρο αποκαθίσταται ανατομικά, αν όμως η εξαίρεση δεν έχει γίνει επί υγιών ορίων, πραγματοποιείται περαιτέρω αφαίρεση ιστού μέχρις ότου αποδειχθεί ότι τα όρια είναι ελεύθερα διηθήσεων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για μικρά ΒΚΚ που αφαιρούνται μαζί με έναν δακτύλιο υγιούς ιστού 3 mm⁶. Οι Wolf και Zitelli προτείνουν έναν δακτύλιο 4 mm ως ασφαλές όριο³⁴⁻³⁶ σε μη σκληρωτικό ΒΚΚ μικρότερο των 2 cm.

Η μικρογραφική χειρουργική κατά Moh's (Moh's micrographic surgery-MMS) αφορά την αφαίρεση του όγκου σε οριζόντιες ιστολογικές τομές που μονιμοποιούνται με ψύξη από το εν τω βάθει τμήμα του όγκου. Στη συνέχεια οι τομές κωδικοποιούνται με χρώματα ή χαρτογραφούνται με σκοπό την αναγνώριση τυχόν υπολειμματικής βλάβης^{6,37,38}. Η μέθοδος είναι χρονοβόρα, μεγιστοποιεί όμως τις πιθανότητες για πλήρη αφαίρεση του όγκου με την ελάχιστη δυνατή απώλεια υγιούς ιστού. Είναι μέθοδος εκλογής για όγκους με διάχυτη εξάπλωση και ασαφή όρια, όπως το σκληρωτικό και το επιφανειακώς εξαπλούμενο ΒΚΚ, για υποτροπιάζοντα ΒΚΚ καθώς και για αυτά που καταλαμβάνουν τον έσω και έξω κανθό³⁹⁻⁴⁰. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ιδιαίτερα εκτεταμένα ΒΚΚ που διηθούν παρακείμενους ιστούς του κόγχου μπορεί να απαιτηθεί η εξεντέρωσή του (exenteration)⁴¹.

Εναλλακτική μέθοδος θεραπείας για το ΒΚΚ είναι η **ραδιοθεραπεία (radiotherapy-XRT)**⁶. Δεν αποτελεί θεραπεία εκλογής. Χρησιμοποιείται σε μικρά οζωδο-ελκώδη ΒΚΚ σε περιοχές εκτός του έσω κανθού και κυρίως σε ασθενείς που δεν αποδέχονται τη χειρουργική θεραπεία η όταν αυτή δεν ενδείκνυται. Δεν χρησιμοποιείται σε αυτά που εντοπίζονται στον έσω κανθό η για μεγάλα, υποτροπιάζοντα, σκληρωτικού τύπου διηθητικά ΒΚΚ. Επίσης δεν έχει ένδειξη για όγκους που εντοπίζονται στο άνω βλέφαρο λόγω της επακόλουθης κερατινοποίησης και του χρόνιου ερεθισμού του οφθαλμού. Σε μια μελέτη⁴² συστήνεται η χρήση της ραδιοθεραπείας επικουρικά μετά από χειρουργική αφαίρεση με MMS σε ΒΚΚ σκληρωτικού τύπου όταν εντοπίζονται στον έσω κανθό και είναι σε μεγάλη έκταση εξαπλούμενα τόσο σε βάθος όσο και περιφερικά. Η ραδιοθεραπεία εμφανίζει και αρκετές επιπλοκές⁶ όπως :

- α. δερματικές βλάβες και μαδάρωση του βλεφάρου
- β. στένωση ρινοδακρυικού πόρου
- γ. ξηροφθαλμία, κερατοπάθεια και καταρράκτης
- δ. αμφιβληστροειδοπάθεια και οπτική νευροπάθεια

Πολλές από τις επιπλοκές αυτές είναι δυνατό να αποφευχθούν αν ο βολβός προστατευθεί με ειδική καλύπτρα κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όμως τα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου έναντι της χειρουργικής αφαίρεσης, όπως η αδυναμία ιστολογικής επιβεβαίωσης της πλήρους εξάλειψης της νόσου, το μεγαλύτερο ποσοστό υποτροπών και η εξαιρετικά δύσκολη μετέπειτα χειρουργική αντιμετώπιση των ακτινοβοληθέντων περιοχών εξακολουθούν να παραμένουν⁶.

Η κρυοθεραπεία (cryotherapy) είναι μια ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιείται για σχετικά μικρά και επιφανειακά ΒΚΚ⁴³ και για αυτά που εντοπίζονται κοντά στο δακρυϊκό

σωληνάριο, που είναι σχετικά ανθεκτικό στην ψύξη^{44,45}. Συνίσταται στην καταστροφή καρκινικού ιστού μαζί με υγιή ιστό σε αρκετή έκταση ώστε να εξαλειφθεί κάθε υποψία υποκλινικής εξάπλωσης της νόσου⁶. Οι αντενδείξεις της είναι παρόμοιες με αυτές της ραδιοθεραπείας και χρησιμοποιείται και αυτή κυρίως ως υποβοηθητική θεραπεία. Μειονεκτήματά της έναντι της χειρουργικής εξαίρεσης ισχύουν όπως και για τη ραδιοθεραπεία, ενώ πιθανές επιπλοκές της είναι ο δερματικός αποχρωματισμός, η μαδάρωση του βλεφάρου και η υπερτροφία του επιπεφυκότα⁶.

Η απόξεση και καυτηρίαση (curettage and desiccation-C&D) συνίσταται σε απόξεση της βλάβης με ειδικό ξέστρο και ακολούθως καυτηρίαση της γύρω περιοχής. Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για μικρά BKK μη διηθητικά μη επιθετικά^{46,47}, όπως και η **φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy-PDT)**⁴⁸ που η χρήση της περιορίζεται σε BKK εξαιρετικά χαμηλού κινδύνου και αφορά την καταστροφή του όγκου μέσω της ενεργοποίησης, από το ορατό φως, ορισμένων φωτοευαίσθητων ουσιών που τοποθετούνται στην περιοχή της βλάβης⁴⁹.

Η χημειοθεραπεία (chemotherapy) χρησιμοποιείται τόσο τοπικά όσο και συστηματικά⁵⁰. Ουσίες όπως η 5-FU και το Imiquimod έχουν δοκιμασθεί κυρίως για την αντιμετώπιση της ακτινικής κεράτωσης και ελάχιστων μορφών BKK (in situ BCC και επιφανειακώς εξαπλούμενο)⁵¹, όμως οι τοπικές παρενέργειες όπως οίδημα, ερύθημα, άλγος και εξέλκωση καθώς και το αυξημένο ποσοστό υποτροπών (20%)⁵² σύμφωνα με μια πενταετή έρευνα του Epstein περιορίζουν την τοπική χημειοθεραπεία σε συγκεκριμένες περιπτώσεις BKK. Αντίθετα η συστηματική χορήγηση έχει βρει την εφαρμογή της στην αντιμετώπιση ιδιαίτερα επιθετικών όγκων που έχουν δώσει μεταστάσεις⁵⁰. Στις περιπτώσεις αυτές γίνεται έλεγχος μέσω βιοψίας των επιχώριων λεμφαδένων και ακτινολογικός έλεγχος για απομακρυσμένες μεταστάσεις σε άλλα όργανα. Επιπλέον γίνεται χρήση ορισμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων (cisplatin, doxorubicin)^{53,54} με σκοπό τη μείωση του

αρχικού μεγέθους του όγκου και την μετέπειτα ευκολότερη αντιμετώπισή του με χειρουργική αφαίρεση ή ραδιοθεραπεία. Ωστόσο δεν λείπουν τόσο οι τοπικές επιπλοκές (οπτική νευρίτις, οίδημα ίριδος και κερατοειδούς)⁵⁴⁻⁵⁷, όσο και οι συστηματικές (αλωπεκία, νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, μυελοκαταστολή και γαστρεντερικές διαταραχές)⁵⁸⁻⁶⁰.

Πρόσφατα η ουσία **Vismodegib**⁶¹ πήρε την έγκριση του FDA, Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, για την χρήση της σε ΒΚΚ επιθετικά, υποτροπιάζοντα και σε όσα δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με τις υπάρχουσες θεραπείες. Αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog που βρέθηκε να είναι παρών στο 90% των εν λόγω καρκινωμάτων. Η διεύρυνση της χρήσης της και σε άλλες μορφές καρκίνου είναι υπό έρευνα.

Η παραπάνω περιγραφή των τρόπων αντιμετώπισης καθιστά εμφανή την υπεροχή της MMS έναντι των άλλων τεχνικών⁶²⁻⁶⁶. Οι Rowe et al.³⁴ αναφέρουν μόλις 1% πιθανότητα υποτροπής για ΒΚΚ που αντιμετωπίστηκε με MMS, έως 10% για την απλή χειρουργική αφαίρεση, 7% για την απόξεση και καυτηρίαση, 8.7% για ραδιοθεραπεία και 7.5% για κρυοθεραπεία. Οι ίδιες τεχνικές όταν χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση υποτροπιαζόντων ΒΚΚ δίνουν ποσοστά υποτροπών 5.6%, 17.6%, 40% και 9.8% αντίστοιχα χωρίς να περιλαμβάνεται στην έρευνα η κρυοθεραπεία ως μέθοδος αντιμετώπισης των υποτροπών. Με τα παραπάνω ποσοστά συμφωνούν και άλλες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας⁶⁴⁻⁶⁸.

ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Το ΒΚΚ όταν διαγνωσθεί έγκαιρα και αντιμετωπισθεί με την κατάλληλη θεραπευτική μέθοδο έχει άριστη πρόγνωση. Με τη χρήση της MMS η επιτυχής εξαίρεση του όγκου

φθάνει το 99%³⁴. Παρά την αρχική επιτυχή αντιμετώπιση οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται περιοδικά ανά εξάμηνο⁶⁹ για την επόμενη πενταετία για την ενδεχόμενη εμφάνιση υποτροπών, νέων πρωτοπαθών ΒΚΚ, ακόμα και μελανώματος. Είναι γνωστό ότι η ύπαρξη ενός ΒΚΚ αυξάνει την πιθανότητα από 36-50%⁷⁰⁻⁷² για την ανάπτυξη νέου ΒΚΚ καθώς και μελανώματος, άρα πρέπει να συνιστάται η αποφυγή της έκθεσης στον ήλιο, ενώ περίπου το 40% των ασθενών με ΒΚΚ θα εμφανίσει μέσα στα επόμενα 10 έτη ένα ή περισσότερα ΒΚΚ⁷³.

Το υποτροπιάζων ΒΚΚ έχει και αυτό καλή πρόγνωση αν και τείνει να υποτροπιάζει επανειλημμένα και να συμπεριφέρεται πιο επιθετικά². Σε αυτή την ομάδα των ασθενών ο έλεγχος πρέπει να είναι διεξοδικότερος και πιο συχνός για να εντοπισθούν έγκαιρα νέες υποτροπές ή πρωτοπαθή ΒΚΚ. Σε έρευνα των Pieh, Kuchar, Novak et al.⁴² φαίνεται ότι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση υποτροπών είναι ο σκληρωτικός τύπος ΒΚΚ, το μεγάλο του μέγεθος και η σε βάθος επέκτασή του, η εμφάνισή του κυρίως στον έσω κανθό καθώς και οι ενδεχόμενες προηγούμενες υποτροπές.

Τέλος για τις εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις που έχει συμβεί μετάσταση από ΒΚΚ⁷⁴⁻⁷⁶, η πρόγνωση είναι φτωχή με τη μέση επιβίωση να είναι 8-10 μήνες από τη στιγμή της διάγνωσης^{8,27}, ενώ θάνατοι μπορεί να προκύψουν και από ΒΚΚ ιδιαίτερα επιθετικά με άμεση εξάπλωση σε όλο τον οφθαλμικό κόγχο και ενδοκρανιακά⁷⁷.

ΤΟ ΒΑΣΙΚΟΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (BASOSQUAMOUS CARCINOMA)

Στο σημείο αυτό της μελέτης μας κρίνουμε σκόπιμο να γίνει μια ιδιαίτερη μνεία σε έναν αμφιλεγόμενο τύπο ΒΚΚ, το μετατυπικό καρκίνωμα. Πρωτοαναφέρθηκε το 1910 από τον MacCormac⁷⁸, σε μια μελέτη φαγεσωρικών ελκών και περιγράφηκε ως μια συνύπαρξη ΒΚΚ και ΑΚΚ, χωρίς την ύπαρξη ζώνης μετάβασης μεταξύ τους. Από τότε έχουν διατυπωθεί διαφωνίες σχετικά με το αν αυτός ο όγκος είναι συνδυασμένη μορφή δυο δερματικών όγκων ή ένα κερατινοποιημένο ΒΚΚ⁷⁸⁻⁸⁶. Τελευταίες έρευνες με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων αναφέρουν την ύπαρξη περιοχών ΑΚΚ και ΒΚΚ με μια μεταβατική ζώνη ανάμεσά τους, προτείνοντας ως μοντέλο δημιουργίας του βασικοπλακώδους καρκινώματος την διαφοροποίηση του ενός καρκινώματος στο άλλο^{87,88}. Σήμερα πιστεύεται πως τα κύτταρα του ΒΚΚ, όντας πολυδύναμα, διαφοροποιούνται σε πιο επιθετικά ακανθοκύτταρα⁸⁶.

Η παραπάνω νοσολογική οντότητα είναι σχετικά σπάνια (<2% από όλα τα δερματικά καρκινώματα)^{83,84,87}, έχει όμως την τάση να είναι πιο επιθετικό και να υποτροπιάζει ή να μεθίσταται συχνότερα^{25,89,90}. Κατά τα άλλα ακολουθεί το ίδιο μοντέλο όσον αφορά τα αίτια εμφάνισής του, την επιδημιολογία του, την αντιμετώπιση αλλά και την πρόγνωσή του. Παρατηρείται επίσης μια δυσκολία στην ορθή διάγνωση⁹¹, καθώς απαιτείται αρκετό βιοψτικό υλικό, ώστε να συμπεριληφθούν οι περιοχές ΒΚΚ και ΑΚΚ. Στη διεθνή βιβλιογραφία δυο κυρίως έρευνες ασχολούνται με την αντιμετώπιση του όγκου με MMS Leibovitch et al.⁹¹ και Bowman et al.⁹⁰, με την πρώτη να αναφέρει ποσοστά υποτροπής 4.1% στην πενταετία και να προτείνει ως θεραπεία εκλογής την χειρουργική αφαίρεση.

ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΒΛΕΦΑΡΩΝ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (ΑΚΚ), η μαλπιγκιακό, η πλακώδες, η επιδερμοειδές (όταν εμφανίζεται σε βλεννογόνους)¹⁵, είναι ένας κακοήθης δερματικός όγκος που μαζί με το ΒΚΚ αποτελούν την ομάδα των μη μελανωτικών δερματικών κακοηθών όγκων και συνιστούν τους συχνότερους εμφανιζόμενους δερματικούς καρκίνους στον άνθρωπο. Προέρχεται από τα πλακώδη κύτταρα της επιδερμίδας που παράγουν κερατίνη (suprabasal epithelial keratinocytes) και εμφανίζεται στο δέρμα και σε βλεννογόνους⁸. Είναι από 40 έως 11 φορές λιγότερο συχνό από το ΒΚΚ⁹²⁻⁹⁵ και αναπτύσσεται όπως και το ΒΚΚ σε περιοχές εκτεθειμένες στην ηλιακή ακτινοβολία¹⁶. Η διαφορά του με το ΒΚΚ είναι ότι έχει παρατηρηθεί στο κranίο, στο μέτωπο, στις έλικες των ωτών ακόμα και στη ραχιαία επιφάνεια του πήχη και της άκρας χειρός, θέσεις ασυνήθιστες για το ΒΚΚ⁹⁶ (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. ΑΚΚ εντοπιζόμενο στο άνω βλέφαρο

Το ΑΚΚ όταν εμφανίζεται στα βλέφαρα κατέχει το 5-10% των κακοηθών όγκων που εμφανίζονται σε αυτά⁶ και ανήκει στην ευρύτερη ομάδα του ΑΚΚ κεφαλής και τραχήλου

(head and neck scc-HNSCC)⁹⁷, που βρίσκεται στην 8^η θέση σε σειρά συχνότητας και αποτελεί το 3-5% περίπου του συνόλου των κακοηθών νεοπλασμάτων που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Η σπάνια εμφάνισή του στον οφθαλμό δεν μειώνει την επικινδυνότητά του, καθώς το νεόπλασμα αυτό είναι ικανό για μετάσταση⁵, ενώ η τάση του συχνά να ομοιάζει με άλλες λιγότερο κακοήθεις η καλοήθεις βλάβες του οφθαλμού, με αποτέλεσμα να μένει αθεράπευτο, μπορεί να οδηγήσει σε ικανό αριθμό θανάτων ετησίως⁹⁸.

Το ΑΚΚ είναι γνωστό ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε πλήθος περιοχών. Η αλήθεια όμως είναι ότι κατά κύριο λόγο αναπτύσσεται στα ακάλυπτα από τον ήλιο μέρη του σώματος και αυτό γιατί η εμφάνισή του έχει αποδεδειγμένα ξεκάθαρη σχέση με την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet radiation- UVR) και ιδιαίτερα με το φάσμα UVB (280-320nm)¹⁶. Φαίνεται ότι η ακτινοβολία επάγει μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 με αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας των κυττάρων Langerhans της επιδερμίδας για ανοσοεπιτήρηση. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως για κάθε 8-10 μίρες γεωγραφικού πλάτους προς τον ισημερινό διπλασιάζονται τα περιστατικά του ΑΚΚ, ενώ τα περισσότερα τα συναντούμε σε πληθυσμούς που ζουν σε περιοχές αυξημένης ηλιοφάνειας⁹⁹. Μελέτες αναφέρουν σημαντική αύξηση περιστατικών ΑΚΚ σε Γιαπωνέζους αποίκους στη Χαβάη σε σχέση με τον ιθαγενή πληθυσμό της Ιαπωνίας¹⁰⁰. Πειράματα που έγιναν σε ποντίκια και αφορούσαν την πρόκληση δερματικού καρκίνου μέσω έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία, αναφέρουν ότι η πλειονότητα των καρκίνων ήταν ΑΚΚ¹⁰¹.

Η αιτιολογία του ΑΚΚ καθορίζει και την επιδημιολογία του. Έτσι εμφανίζεται χαρακτηριστικά στη λευκή φυλή και συγκεκριμένα σε άτομα με λευκό δέρμα, γαλάζιο χρώμα ματιών, κόκκινα μαλλιά, εφηλίδες⁸. Όταν εμφανίζεται στη μαύρη φυλή δεν παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερη σωματική κατανομή². Είναι για τον ίδιο λόγο πιο συχνό σε αγροτικούς πληθυσμούς, ναυτικούς και εργάτες, καθώς η ενασχόληση με εργασία στο

εξωτερικό περιβάλλον αυξάνει την έκθεση στον ηλιακό βλαπτικό παράγοντα^{2,8,15}. Πιθανώς η συχνότερη ενασχόληση του ανδρικού πληθυσμού με τα παραπάνω επαγγέλματα να ευθύνεται για το προβάδισμα του έναντι του γυναικείου (2:1)⁸. Τέλος, επειδή η βλαπτική επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας έχει αθροιστική δράση, το ΑΚΚ συναντάται κυρίως μετά την ηλικία των 40 ετών με μέσο όρο εμφάνισης τα 60+/-5 έτη¹⁰².

Το ΑΚΚ είναι μια βλάβη που μπορεί να εμφανισθεί χωρίς προϋπάρχον υπόστρωμα (de novo), αλλά κυρίως αναπτύσσεται σε περιοχές διαφόρων αλλοιώσεων¹. Έτσι είναι σύνηθες να αναπτύσσεται σε περιοχές του δέρματος που εμφανίζουν αλλοιώσεις ακτινικής κεράτωσης και νόσου Bowen. Ιδιαίτερα για την εμφάνιση του ΑΚΚ στον οφθαλμό πέρα από τον αποδεδειγμένο ρόλο της ηλιακής ακτινοβολίας, ενοχοποιητική είναι η εμφάνιση τέτοιου τύπου αλλοιώσεων τόσο στο δέρμα των βλεφάρων, όσο και στον επιπεφυκότα, καθώς σπανίως αναπτύσσεται στις περιοχές αυτές ΑΚΚ de novo⁶.

Άλλες σπανιότερες περιπτώσεις εμφάνισης ΑΚΚ είναι σε ασθενείς με ψωρίαση που βρισκόταν σε θεραπευτικό σχήμα με ακτινοβολία (PUVA)⁵. Αυτοί οι ασθενείς έχουν 30 φορές αυξημένη την πιθανότητα να αναπτύξουν δερματικό μη μελανωτικό καρκίνο σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό, που στην πλειονότητά τους είναι ΑΚΚ¹⁰³. Επίσης ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς¹⁰⁴ που έχουν υποστεί μεταμόσχευση ή που πάσχουν από HIV, ορισμένους τύπους HPV, λευχαιμία και λέμφωμα¹⁰⁵ ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση ΑΚΚ. Άλλοι ενοχοποιητικοί παράγοντες είναι ορισμένα χημικά καρκινογόνα όπως το αρσένιο, η πίσσα, οι υδρογονάνθρακες, λιπαντικά, ορυκτέλαια και η αιθάλη^{98,106} ενώ σε ορισμένα κληρονομικά νοσήματα, όπως η μελαγχρωματική ξηροδερμία και ο οφθαλμοδερματικός αλφισμός, η εμφάνιση του ΑΚΚ είναι πιο συχνή και μάλιστα σε αρκετά μικρότερες ηλικίες (2^η και 3^η δεκαετία ζωής)⁹⁸. Σπανιότερες θέσεις εντόπισης ΑΚΚ είναι κάποιες ουλωτικές βλάβες (ουλές εγκαυμάτων ή εμβολίων, άτονα

έλκη, συρίγγια, βλάβες λευκοπλακίας, χρόνιες ακτινοδερματίτιδες, ουλές από φυματώδη η ερυθρηματώδη λύκο, σε σκληρό και ατροφικό λειχήνα κ.λπ.)². Επίσης έχει παρατηρηθεί σε μεταμόσχευση δέρματος, σε επιδερμοειδείς κύστεις, ακόμα και σε σημεία της γλώσσας έπειτα από χρόνια ερεθισμό οφειλόμενο σε κακή σύγκλιση οδοντοστοιχίας⁹⁷.

ΕΝΤΟΠΙΣΗ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΑΚΚ

Το ΑΚΚ συναντάται στον οφθαλμό κυρίως στο δέρμα των βλεφάρων και στον επιπεφυκότα. Στα βλέφαρα η συχνότερη θέση εμφάνισης είναι το κάτω βλέφαρο και ο έσω κανθός, ενώ αρκετά σπανιότερα προσβάλλεται το άνω βλέφαρο και ο έξω κανθός⁶. Ουσιαστικά φαίνεται πως η εντόπισή του είναι όμοια με του ΒΚΚ, όμως υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές, καθώς το ΑΚΚ έχει την τάση όταν εμφανίζεται στα βλέφαρα να προσβάλλει συνήθως το ελεύθερο βλεφαρικό χείλος, ενώ έχει διαπιστωθεί πως η εμφάνισή του στο άνω βλέφαρο και στον έξω κανθό είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του ΒΚΚ^{94,95}.

Το ΑΚΚ του δέρματος των βλεφάρων δύναται να εμφανισθεί *de novo* η σε προϋπάρχουσα αλλοίωση ακτινικής κεράτωσης¹⁰⁷, *in situ* καρκινώματος (νόσος Bowen) και σε περιοχές παλαιών ουλών και εγκαυμάτων⁶. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η έκθεση σε χημικές ουσίες, η ανοσοκαταστολή, η πυώδης ιδραδενίτιδα και η μελαγχρωματική ξηροδερμία. Η βλάβη μπορεί να εμφανισθεί αρχικά σαν μια πάχυνση του δέρματος, σαν μυρμηκιώδης βλάβη η ερυθρό οζίδιο, η σαν μια περιοχή λευκοπλακίας. Αργότερα μπορεί να εξελιχθεί σε κυστική βλάβη, αλλά κυρίως εμφανίζεται με οζώδη-εξωφυτική μορφή και ελκωτική-ενδοφυτική μορφή². Η βάση της βλάβης τείνει να είναι εύθρυπτη και αιμορραγεί με τον παραμικρό τραυματισμό¹⁰⁸. Το ΑΚΚ όταν εμφανίζεται *de novo* συνήθως είναι ένα ερυθρό οζίδιο το οποίο μεγθύνεται γρήγορα. Η σύστασή του είναι συμπαγής και έχει την

τάση να εξελκώνεται. Οι γειτονικοί ιστοί ενδεχομένως να παρουσιάζουν έντονη φλεγμονώδη αντίδραση. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι ΑΚΚ⁶:

α. **ο όμοιος με πλάκα**, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια τραχεία, εξέρυθρη, υπερκερατωσική, καλυμμένη με λεπτά λέπια περιοχή που μπορεί να εξορμάται επί εδάφους προϋπάρχουσας ακτινικής κεράτωσης.

β. **ο οζώδης**, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός υπερκερατωσικού οζιδίου το οποίο μπορεί να δημιουργήσει εσχαροποιημένες διαβρώσεις και σχισμές.

γ. **ο ελκωτικός**, ο οποίος εμφανίζει μια εξέρυθρη βάση και όρια σαφώς αφοριζόμενα, υπεργεμμένα και σκληρυμένα .

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του επιπεφυκότα, μαζί με τις ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του επιπεφυκότα και του κερατοειδή χιτώνα, ανήκουν σε μια ευρύτερη ομάδα που περιγράφεται ως ocular surface squamous neoplasia (OSSN)¹⁰⁹. Είναι ένας σπάνιος όγκος¹¹⁰ που εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα στους πάσχοντες από μελαγχρωματική ξηροδερμία^{5,6}. Παρατηρείται σε ηλικιωμένους ασθενείς και μπορεί να εξορμά de novo η από προϋπάρχουσα ενδοεπιθηλιακή υπερπλασία⁶. Κλινικά εμφανίζεται ως ζελατινώδης η θηλωματώδης μάζα η οποία συχνά σχετίζεται με τροφοφόρα αγγεία και εντοπίζεται στο σκληροκερατοειδές όριο με πιθανή την επέκτασή του στον παρακείμενο κερατοειδή. Είναι ένας όγκος που αναπτύσσεται βραδέως και σπανίως δίδει μεταστάσεις⁶.

Το ΑΚΚ μπορεί είτε να επεκταθεί τοπικά στους υποκείμενους και τους παρακείμενους ιστούς, είτε να δώσει μεταστάσεις. Η διήθηση και επέκταση στους γειτονικούς ιστούς δεν είναι τόσο συχνή όσο στο ΒΚΚ. Αφορά κυρίως την επέκταση στον υποδόριο ιστό και σε υποκείμενους ιστούς, όπως μύες, οστά και χόνδρους¹⁶. Μπορεί να επεκταθεί εν τω βάθει σε ιστούς του οφθαλμικού κόγχου¹¹¹ και τότε ίσως απαιτηθεί η εξεντέρωση του κόγχου για

την αντιμετώπισή του^{5,112}. Άλλες φορές ο όγκος αυτός υποτροπιάζει μετά την αρχική του αφαίρεση^{40,113}.

Το ΑΚΚ από την άλλη μεριά έχει την τάση να μεθίσταται και μάλιστα πιο συχνά από ότι το ΒΚΚ (0.5%-6%)⁴⁹. Αυτό συμβαίνει κατά κανόνα με τη λεμφική οδό. Συγκεκριμένα τα ΑΚΚ που εντοπίζονται στο ήμισυ ρινικό τμήμα του βλεφάρου παροχετεύουν τη λέμφο τους στους υπογνάθιους λεμφαδένες με αντίστοιχη εντόπιση των λεμφικών μεταστάσεων στην περιοχή αυτή, ενώ η λέμφος από το ήμισυ κροταφικό τμήμα παροχετεύεται στα προωτιαία λεμφαγγεία²⁰. Όταν συμβεί μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες αυτοί διογκώνονται, γίνονται σκληροί, συμφύονται με τους γύρω ιστούς και κατά την ψηλάφηση τους είναι ανώδυνοι, στοιχείο που τους διακρίνει από άλλες καλοήθειες καταστάσεις. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μεταστατική ικανότητα είναι :

α. Το μέγεθος του όγκου και η σε βάθος επέκτασή του, συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί ότι όσο μεγαλύτερος ο όγκος τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος για μετάσταση, ενώ όγκοι που ταξινομούνται σε στάδιο 4 η 5 κατά Clark μεθίστανται στου επιχώριους λεμφαδένες σε ποσοστό 20%¹⁰⁸.

β. Η εντόπιση του όγκου, ώστε ΑΚΚ που βρίσκονται στο ελεύθερο βλεφαρικό χείλος και στον έσω κανθό δίδουν συχνότερα μεταστάσεις¹¹³.

γ. Αδιαφοροποίητοι όγκοι, με περινευρική διήθηση η υποτροπιάζοντα ΑΚΚ μεθίστανται συχνότερα, ενώ το ίδιο συμβαίνει και σε ασθενείς σε ανοσοκαταστολή^{52,113}.

δ. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι καρκίνοι που αναπτύχθηκαν de novo εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο μετάστασης από 2-3%¹¹⁴, όπως και αυτοί που αναπτύσσονται σε έδαφος παλαιών ουλών και χρόνιων φλεγμονωδών και εκφυλιστικών διαδικασιών (έως 20% κίνδυνος μετάστασης)¹¹⁵, σε αντίθεση με αυτούς που συμβαίνουν επί προηγούμενης βλάβης ακτινικής κεράτωσης με μεταστατικό κίνδυνο μόλις 0.5%^{116,117}.

Σπανίως το ΑΚΚ εμφανίζει περινευρική διήθηση η δίνει μεταστάσεις αιματογενώς¹⁰⁸

και τα όργανα που κυρίως προσβάλλονται είναι οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, το δέρμα και τα οστά¹⁶.

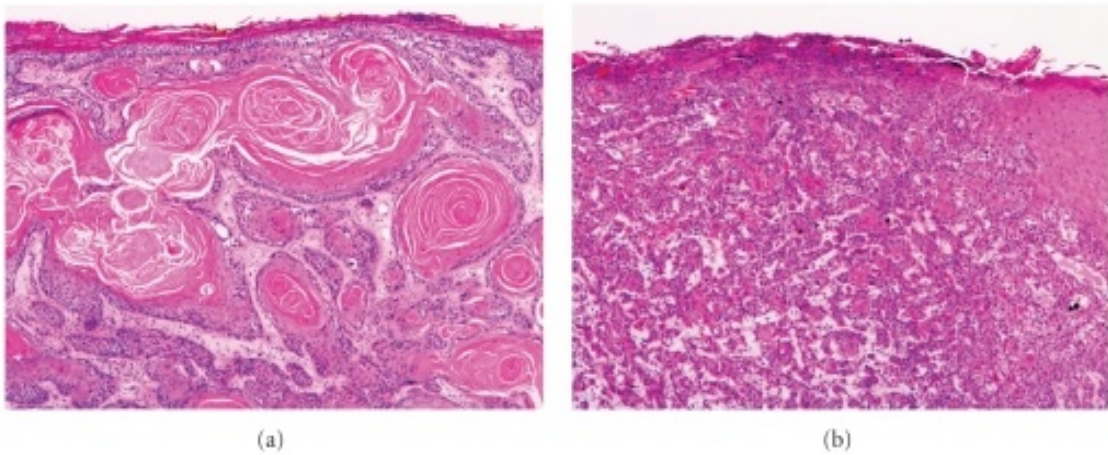
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Το ΑΚΚ προέρχεται από τα κύτταρα της ακανθωτής στοιβάδας της επιδερμίδας, η οποία φυσιολογικά αποτελείται από ακανθωτά κύτταρα που έχουν πολυεδρικό σχήμα, κεντρικό στρογγυλό πυρήνα και ροδόχρωο κυτταρόπλασμα. Συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάρειες γέφυρες (άκανθες) που καταλήγουν σε συνάψεις δεσμοσωμάτων¹¹⁸.

Τα γενικά ιστολογικά χαρακτηριστικά του ΑΚΚ μπορούν να συνοψισθούν σε διαταραχές στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους. Συγκεκριμένα παρατηρούνται μεγάλοι βαθυχρωματικοί ή φυσαλιδώδεις πυρήνες με άτυπη εμφάνιση, μεγάλα πυρήνια και ανώμαλη κατανομή χρωματίνης. Υπάρχει λιγιστό κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την διαταραχή της φυσιολογικής αναλογίας-σχέσης πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Οι κυτταρικές συνδέσεις μπορεί να απουσιάζουν και τα κύτταρα να χάσουν την συνοχή και τον αξονικό τους προσανατολισμό. Επιπλέον παρατηρούνται πολλές και άτυπες μιτώσεις, κυτταρικός πλειομορφισμός και ανώμαλη παραγωγή κερατίνης¹¹⁹.

Η παρατήρηση του ΑΚΚ στο απλό μικροσκόπιο θα αναδείξει τα καρκινικά ακανθωτά κύτταρα που αθροίζονται υπό μορφή δοκίδων, νησιδίων η μικρότερων κυτταρικών ομάδων. Οι καρκινικοί βλάστες μπορεί να διηθούν το χόριο και να διασπούν την δερμοεπιδερμική συμβολή (dermal-epidermal junction), ακόμη και να διηθούν τους υποκείμενους ιστούς (υποβλεννογόنيος, μύες, χόνδρους και οστά). Στα καλής διαφοροποίησης καρκινώματα διατηρούνται συνάψεις δεσμοσωμάτων και εμφανίζονται σφαιρικές αθροίσεις κερατινοποιημένων η παρακερατινοποιημένων ακανθωτών κυττάρων,

οι λεγόμενες πέρλες κερατίνης (horn perls) με αυξημένη κερατινοποίηση προς το κέντρο τους. Αδιαφοροποίητοι όγκοι εμφανίζουν μεγάλο αριθμό αναπλαστικών, άτυπων ακανθωτών κυττάρων με μείωση ή παντελή έλλειψη των μεσοκυττάρων συνδέσεων και των δεσμοσωμάτων, παρουσία πολλαπλών η και ανώμαλων μιτώσεων και μεμονωμένη κερατινοποίηση των κυττάρων (Εικόνα 4)^{1,2}.



Εικόνα 4. ΑΚΚ υψηλής διαφοροποίησης (αριστερά) με τις χαρακτηριστικές πέρλες κερατίνης και ΑΚΚ καρκίνωμα μέσης διαφοροποίησης (δεξιά)

Η WHO προτείνει την παθολογοανατομική ταξινόμηση των ΑΚΚ¹²⁰ σε χαμηλής, μέσης και υψηλής διαφοροποίησης σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που περιγράφησαν παραπάνω. Το γεγονός όμως αυτό ενέχει σε ικανό βαθμό την υποκειμενικότητα από πλευράς του παθολογοανατόμου για την εκτίμηση της διαφοροποίησης. Για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί το σύστημα ταξινόμησης του Broder⁸, το οποίο ο ίδιος εισήγαγε το 1932, που ταξινομεί τους όγκους σε μια κλίμακα από το 1 έως το 4 με το 1 να αντιστοιχεί σε καλά διαφοροποιημένο νεόπλασμα και το 4 σε πλήρως αδιαφοροποίητο (Εικ.5).

Histologic grading of malignancy of tumor cell population				
Morphologic parameter	Points			
	1	2	3	4
Degrees of keratinization	Highly keratinized (>50% of the cells)	Moderately keratinized (20-50% of cells)	Minimal keratinization (5-20% of cells)	No keratinization (0-5% of cells)
Nuclear polymorphism	Little nuclear polymorphism (>75% mature cells)	Moderately abundant nuclear polymorphism (50-75% mature cells)	Abundant nuclear polymorphism (25-50% mature cells)	Extreme nuclear polymorphism (0-25% mature cells)
Number of mitoses/HPF*	0-1	2-3	4-5	> 5

Histologic grading of malignancy of tumor-host relationship				
Morphologic parameter	Points			
	1	2	3	4
Pattern of invasion	Pushing, well-delineated infiltrating borders	Infiltrating, solid cords, bands and/or strands	Small groups or cords of infiltrating cells (n > 15)	Marked and wide-spread cellular dissemination in small groups of cells (n < 15) and/or in single cells
Stage of invasion (depth)	Carcinoma in situ and/or questionable invasion	Distinct invasion, but involving lamina propria only	Invasion below lamina propria adjacent to muscles, salivary gland tissues, and periosteum	Extensive and deep invasion replacing most of the stromal tissue and infiltrating jaw bone
Lympho-plasmocytic infiltration	Marked	Moderate	Slight	None

* HPF: high power field

Εικόνα 5. Η κατά Broder ταξινόμηση

Ορισμένα ειδικά χαρακτηριστικά μπορεί να περιγραφούν για τον κάθε υπότυπο¹⁰⁸ του AKK:

Στον γενικό τύπο (**generic type**) παρατηρούνται οι ανωτέρω περιγραφόμενες αλλοιώσεις καθώς και αλλοιώσεις ακτινικής κεράτωσης.

Στον ακανθολυτικό τύπο (**acantholytic, adenoid or pseudoglandular scc**) υπάρχουν αλλοιώσεις που μιμούνται αδενικούς σχηματισμούς σαν σωληνώδεις και πορώδεις κοιλότητες που είναι αποτέλεσμα δυσκεράτωσης και υποκείμενης ακανθόλυσης. Οι σχηματιζόμενες αυτές κοιλότητες βρίσκονται δίπλα από ένα ή πολλά στρώματα επιθηλίου και είναι γεμάτα από αποπτωτικά ακανθολυτικά κύτταρα, πλήρως ή μερικώς διαφοροποιημένα.

Στον **μυρμηκιώδη τύπο (verrucous scc)** εμφανίζονται λόβια ώριμου πλακώδους επιθηλίου με ελάχιστη ατυπία, υπερκεράτωση, παρακεράτωση και ακάνθωση. Είναι ένα καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα.

Στο **ατρακτόμορφο AKK (spindle cell scc)** η διαφοροποίηση είναι χαμηλή. Πρόκειται για αναπλαστικό όγκο με ελάχιστη η καθόλου κερατινοποίηση και συνήθως ταξινομείται ως βαθμός 4 στην κλίμακα του Broder. Τα καρκινικά ατρακτόμορφα κύτταρα αναμιγνύονται με κολλαγόνο και πιθανώς διατάσσονται σπειροειδώς, ενώ μπορεί να παρατηρηθούν και γιγάντια πλειομορφικά κύτταρα.

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ AKK

Το σημαντικότερο βήμα στην αντιμετώπιση του AKK είναι να γίνει ιστολογική επιβεβαίωση της ύποπτης βλάβης⁵ ότι πρόκειται περί αυτού και έπειτα να αποφασισθεί η κατάλληλη θεραπεία με γνώμονα ορισμένα κριτήρια, όπως η κλινική εικόνα της βλάβης, η ιστοπαθολογική ταξινόμηση και η διαφοροποίηση του όγκου. Το AKK διαφέρει από το BKK επειδή είναι πιο επιθετικό και έχει την τάση να μεθίσταται συχνότερα, ιδιαίτερα αυτό που εξορμάται από ουλωτικές περιοχές ή περιοχές χρόνια φλεγμαίνουσες⁵.

Για το λόγο αυτό στη θεραπεία του AKK έχουν θέση κυρίως οι χειρουργικές μέθοδοι, όπως έχουν περιγραφεί για το BKK^{5,6} και συγκεκριμένα η απλή χειρουργική αφαίρεση με τέλεση ταχείας βιοψίας¹²¹ και η μικροχειρουργική αφαίρεση^{113,122} κατά Moh's (MMS). Οι υπόλοιπες εφαρμοζόμενες τεχνικές είναι όμοιες με αυτές που περιγράφησαν για τη θεραπεία του BKK και περιορίζονται για πρωτοπαθείς μικρούς όγκους, χωρίς περινευρική διήθηση ή διηθημένους λεμφαδένες. Συγκεκριμένα εφαρμόζονται η ακτινοθεραπεία¹²³ σαν εναλλακτική της χειρουργικής, αλλά κυρίως ως επικουρική αυτής¹²², η καυτηρίαση και απόξεση, η κρυοθεραπεία με υγρό άζωτο, η τοπική χημειοθεραπεία κυρίως με 5 F-U, η

συστηματική χημειοθεραπεία όταν υπάρχουν μεταστάσεις⁵⁰, η φωτοδυναμική θεραπεία¹²⁴ και η αφαίρεση με τη χρήση laser CO₂. Όλες οι μη χειρουργικές μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα της αδυναμίας ιστολογικού ελέγχου των ορίων της βλάβης και η χρήση τους θα πρέπει να περιορίζεται σε όγκους χαμηλής επικινδυνότητας⁸.

Η απλή χειρουργική αφαίρεση ενδείκνυται για την αντιμετώπιση όγκων <2mm σε βάθος επέκταση με τα χειρουργικά όρια ασφαλείας να είναι 4 mm. Η επέκταση βάθους >6mm και διαμέτρου >1cm, απαιτεί όρια 6 mm, η τη χρήση MMS. Γενικά η MMS προτείνεται για όγκους διηθητικούς, υποτροπιάζοντες, με περινευρική διήθηση¹²⁵ (perineural infiltration - PNI), μεγάλο μέγεθος και ακανόνιστα όρια. Επίσης σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς και σε περιοχές με αυξημένη τάση για υποτροπή, όπως περιοχές ουλών, χρόνιων φλεγμονών η ακτινοβοληθέντων στο παρελθόν. Είναι θεραπεία εκλογής για τον οφθαλμό, που έχει ιδιαίτερη σημασία η διατήρηση όσο το δυνατόν περισσότερου υγιούς ιστού¹²⁶.

Όπως αναφέρεται από τους Rowe et al.¹²⁷ τα ποσοστά υποτροπής για πρωτοπαθή ΑΚΚ είναι για την MMS 3.1%, για την χειρουργική αφαίρεση 8.1%, για την ακτινοθεραπεία 10% και για την ηλεκτροκαυτηρίαση 3.7%. Τα ποσοστά υποτροπών για τη χειρουργική θεραπεία συνολικά μπορεί να φαίνονται αυξημένα, αλλά οφείλονται στη προτίμηση αυτών των μεθόδων για αντιμετώπιση υψηλού κινδύνου ΑΚΚ. Εξάλλου στην ίδια μελέτη τα ποσοστά υποτροπών σε χαμηλού κινδύνου ΑΚΚ είναι 1.9% μετά από θεραπεία με MMS και 16.5% για όλες τις υπόλοιπες μεθόδους, ενώ τα ποσοστά ίασης για υποτροπιάζοντες όγκους είναι 76.7% μετά από απλή χειρουργική αφαίρεση και 90% μετά από MMS¹²⁷. Σχετικά πρόσφατη μελέτη¹²⁸ δίνει ποσοστό ίασης 92% για τα ΑΚΚ που αντιμετωπιστήκαν με MMS, ενώ άλλη μελέτη φτάνει αυτό το ποσοστό σε 98.1%⁴⁰.

Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την πρόγνωση είναι :

α . Η αδυναμία ακόμα και από έμπειρους εξεταστές να εντοπίσουν την βλάβη^{129,130}.

Πράγματι πρόσφατη μελέτη δίνει ποσοστό 51% σωστής διάγνωσης για το ΑΚΚ¹¹⁶, ενώ το

αντίστοιχο για το ΒΚΚ είναι 92.8%¹²⁹. Αυτό θεωρητικά είναι αναμενόμενο γιατί σύμφωνα με μελέτες το ΑΚΚ είναι από 10 έως 40 φορές σπανιότερο του ΒΚΚ άρα και δυσκολότερο να επιτευχθεί κλινική εμπειρία.

β . Ο κίνδυνος να εμφανισθεί υποτροπή ιδιαίτερα σε όγκους που υπάρχει περινευρική διήθηση (περίπου 50% σε πρόσφατη μελέτη)⁹⁸ και ο κίνδυνος ανάπτυξης νέων μη μελανωτικών καρκινωμάτων¹³¹ (σύμφωνα με μελέτη, ασθενείς με ΑΚΚ έχουν τρεις φορές αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν νέο ΑΚΚ σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό¹³².

γ . Η περινευρική διήθηση, η οποία εμφανίζεται σε ένα 14% των περιπτώσεων στα ΑΚΚ που αναπτύσσονται στο πρόσωπο, ενώ μελέτη ειδικά για τα ΑΚΚ του βλεφάρου δίνει ένα ποσοστό της τάξεως του 7.8%⁹⁸.

δ . Η διήθηση του οφθαλμικού κόγχου που παρατηρείται σε ποσοστό 2.5%¹¹¹ και συνήθως απαιτεί την εξεντέρωση του οφθαλμικού κόγχου.

ε . Οι μεταστάσεις που συμβαίνουν σε ποσοστό 0.3-3.7%⁹⁶ κυρίως με τη λεμφική οδό και αντιμετωπίζονται με λεμφαδενικό καθαρισμό της περιοχής¹³³. Η πενταετής επιβίωση μετά από μετάσταση ενός ΑΚΚ είναι 26.8%¹²⁷.

Γενικά το ΑΚΚ είναι ένας όγκος που έχει άριστη πρόγνωση όταν αντιμετωπισθεί με τις ενδεδειγμένες κατά περίπτωση μεθόδους^{98,134}. Τυχόν επιπλοκές μπορεί να αντιμετωπισθούν σε περιπτώσεις υποτροπής ή μετάστασης. Θάνατοι έχουν σημειωθεί και οφείλονται στους παραπάνω λόγους, αλλά και σε παραμελημένα ΑΚΚ που διηθούν τους ιστούς του οφθαλμικού κόγχου. Είναι σημαντικό κάθε βλάβη που παρουσιάζεται στο βλέφαρο και στον επιπεφυκότα να εξετάζεται για την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής με βιοψία⁹⁸, να τηρείται πρόγραμμα παρακολούθησης των ασθενών κάθε 3-12 μήνες⁸ για την πρώτη πενταετία και ετησίως εφ' όρου ζωής, αλλά και να τονισθεί η ανάγκη για πρόληψη με την αποφυγή των ηλιακών εγκαυμάτων στην παιδική και εφηβική ηλικία⁹⁸.

ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ

Στο σημείο αυτό είναι σκόπιμο να παρουσιαστούν και δυο προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις που θα συναντήσουμε στην ερευνά μας, η ακτινική κεράτωση (ΑΚ) και το Ca in situ η Bowen's disease.

Η ακτινική κεράτωση (ΑΚ) είναι η πιο συχνή προκαρκινική αλλοίωση⁶ του δέρματος και εμφανίζεται στα ακάλυπτα μέρη του σώματος⁵. Οφείλεται στην αθροιστική δράση της υπεριάδους ακτινοβολίας^{135,136}, κυρίως του φάσματος UVB (280-320 nm) και στην μειωμένη ικανότητα παραγωγής μελανίνης σε ορισμένα άτομα². Έτσι, όπως και στις προηγούμενες βλάβες, συναντάται σχεδόν αποκλειστικά σε άτομα με ανοιχτό χρώμα δέρματος, γαλάζιες ίριδες και ξανθά η κόκκινα μαλλιά¹³⁷ και εντοπίζεται σε περιοχές που δέχονται αυξημένη ακτινοβολία, όπως το πρόσωπο, ο τράχηλος και η ραχιαία επιφάνεια του χεριού. Σπανίως εμφανίζεται και στο δέρμα των βλεφάρων⁵. Έχει βρεθεί ότι το 80% των ΑΚ οφείλονται στην ηλιακή ακτινοβολία¹³⁸. Η βλάβη είναι συχνή σε ηλικιωμένα άτομα κυρίως από 60-69 έτη (ποσοστό 80%) και σπάνια σε νέους ηλικίας 20-29 ετών (<10%). Επίσης το ανδρικό φύλο προσβάλλεται συχνότερα καθώς και οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς¹³⁸. Τέλος ορισμένα γενετικά σύνδρομα, όπως ο αλφισμός και η μελαγρωματική ξηροδερμία ευνοούν την ανάπτυξη ΑΚ σε μικρότερες ηλικίες.

Αρχικά η βλάβη στο βλέφαρο παρουσιάζεται σαν μια κηλίδα του δέρματος με τραχεία επιφάνεια⁵. Το χρώμα της μπορεί να είναι φυσιολογικό όπως του δέρματος η κιτρινωπό, καφεοειδές και ερυθρό. Αργότερα η βλάβη καλύπτεται με λέπια τα οποία προσφύονται στερεά, όταν όμως αποκολληθούν προκαλείται αιμορραγία ενώ μπορεί και να επανεμφανισθούν². Η βλάβη δύναται να είναι επίπεδη κερατωσική και σπάνια οζώδης, θηλωματώδης η ομοιάζουσα με δερματικό κέρασ⁶. Το μέγεθός της κυμαίνεται από 3-6 mm¹⁶ και γενικά στο βλέφαρο δεν ξεπερνά το 1 cm¹⁰⁸. Η πάχυνση της βλάβης, η αύξηση

της ερυθρότητας και η έντονη φλεγμονή είναι σημεία ύποπτα για κακοήθη εξαλλαγή¹⁶.

Πέντε είναι οι ιστολογικοί υπότυποι της ΑΚ¹ : η υπερτροφική, η ατροφική, η ακανθολυτική, η μελαγχρωματική και η ομοιάζουσα με νόσο Bowen. Πέρα από τα ξεχωριστά χαρακτηριστικά κάθε τύπου υπάρχουν ορισμένες ιστολογικές ομοιότητες. Συγκεκριμένα οι βλάβες εμφανίζουν υπερκεράτωση, παρακεράτωση και δυσκεράτωση^{5,8}. Τα ακανθωτά κύτταρα είναι άτυπα με μεγάλο βαθυχρωματικό πυρήνα και ελάχιστο κυτταρόπλασμα⁸. Η επιδερμίδα μπορεί να είναι ατροφική ή πεπαχυσμένη με καταδύσεις προς το χόριο, όμως η βασική στοιβάδα παραμένει ανέπαφη⁵. Το χόριο συνήθως εμφανίζει χρόνια ακτινική εκφύλιση και φλεγμονώδη διήθηση^{1,2}.

Η θεραπεία της ΑΚ¹³⁹ καθορίζεται από το μέγεθος της βλάβης, την εντόπισή της και τον αριθμό των βλαβών, καθώς και από τις ιδιαιτερότητες κάθε περίπτωσης όπως η ηλικία, η γενικότερη κλινική κατάσταση, η ύπαρξη ανοσοκαταστολής⁸. Προτιμώνται λιγότερο επεμβατικές μέθοδοι, όπως η κρυοθεραπεία με υγρό άζωτο με ποσοστό ίασης 98,8%⁸ και η καυτηρίαση. Μάλιστα στις Η.Π.Α. οι δυο αυτές μέθοδοι αντιστοιχούν στο 80% των χρησιμοποιούμενων τεχνικών¹⁴⁰. Η τοπική χημειοθεραπεία με 5-FU εμφανίζει αυξημένα ποσοστά υποτροπών από 25-75%⁸ σύμφωνα με μια έρευνα και δεν ενδείκνυται στη θεραπεία της ΑΚ, ενώ η φωτοδυναμική θεραπεία και η αφαίρεση της βλάβης με τη χρήση laser CO₂¹⁴¹ είναι νέες μέθοδοι που κερδίζουν έδαφος στην αντιμετώπιση προκαρκινικών βλαβών, όπως η ΑΚ. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόζονται μόνο σε περιπτώσεις ιστολογικά και κλινικά επιβεβαιωμένης ΑΚ. Σε οποιαδήποτε υποψία (low grade SCC η BCC), θεραπεία εκλογής παραμένει η χειρουργική αφαίρεση με 100% ποσοστό επιτυχούς αντιμετώπισης.

Η βλάβη της ΑΚ είναι δυνατόν να συμπεριφερθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους¹⁴² : να υποστρέψει, να επιμείνει με τοπικές υποτροπές και να εξελιχθεί σε ΑΚΚ. Το να προβλέψει κανείς τη συμπεριφορά αυτής της προκαρκινικής αλλοίωσης είναι αδύνατο⁸.

Χαρακτηριστικό είναι ότι στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ποσοστά από 1-20%¹⁴³⁻¹⁴⁴ ως πιθανότητα εξαλλαγής σε ΑΚΚ, γεγονός που δείχνει την πολυπλοκότητα των παραγόντων που συμμετέχουν στην διαδικασία αυτή. Είναι όμως γνωστό ότι το 60% των εμφανιζομένων ΑΚΚ προέρχεται από ΑΚ¹⁴³, οπότε η άμεση σχέση των δυο κλινικών οντοτήτων είναι αδιαμφισβήτητη¹⁴⁰. Η ανάπτυξη ΑΚ είναι ένας μάρτυρας πως το δέρμα του ασθενούς έχει δεχθεί αυξημένα ποσοστά ηλιακής ακτινοβολίας και πως ελλοχεύει ο κίνδυνος ανάπτυξης μη μελανωτικού καρκίνου του δέρματος (non melanoma skin cancer- NMSC) de novo^{145,146} υποτροπών ΑΚ, εξαλλαγής της βλάβης σε ΑΚΚ και σπανίως μελανώματος⁸. Για το λόγο αυτό τα άτομα αυτά πρέπει να παρακολουθούνται περιοδικά και μακροχρόνια για την πρόληψη και την έγκαιρη θεραπεία νέων ενδεχόμενων αλλοιώσεων. Η πρόγνωση της ΑΚ είναι άριστη όταν γίνει έγκαιρη διάγνωση και εφαρμοσθεί η ενδεδειγμένη θεραπεία, αλλά και στις ελάχιστες περιπτώσεις που εμφανισθεί κακοήθης εξαλλαγή η ΝΜSC, η επιτυχής αντιμετώπιση μπορεί να επιτευχθεί, όπως προαναφέρθηκε στα αντίστοιχα κεφάλαια.

BOWEN'S DISEASE

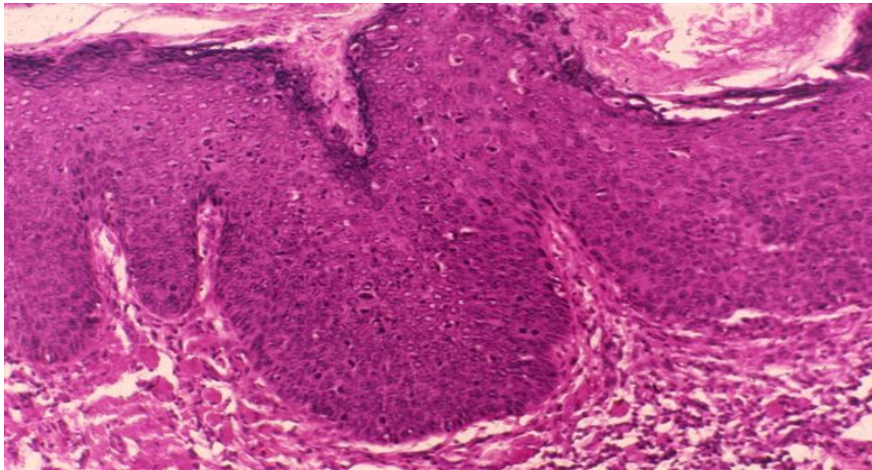
Η νόσος του Bowen είναι συνώνυμο με το καρκίνωμα in situ στο δέρμα και στους βλεννογόνους. Στον οφθαλμό απαντάται σπάνια είτε με τη μορφή του βλεφαρικού καρκινώματος, είτε με τη μορφή της ενδοεπιθηλιακής υπερπλασίας του επιπεφυκότα. Θεωρείται ως η in situ μορφή του ΑΚΚ¹⁰⁸.

Λίγα επιδημιολογικά δεδομένα είναι γνωστά, ενώ όσον αφορά τα αίτια της εμφάνισής του πιθανολογείται ότι σχετίζονται με αυτά του ΑΚΚ. Έτσι αναπτύσσεται σε άτομα μέσης και τρίτης ηλικίας, χωρίς να δείχνει προτίμηση σε περιοχές που εκτίθενται η όχι στην ηλιακή ακτινοβολία και προσβάλλει εξίσου άνδρες και γυναίκες⁸. Η έκθεση σε αρσενικό και η

ηλιακή ακτινοβολία έχουν ενοχοποιηθεί ως βλαπτικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου, όπως και ορισμένοι τύποι HPV^{5,16}, η ανοσοκαταστολή και η θεραπεία με PUVA σε ασθενείς με ψωρίαση¹³⁴.

Η νόσος που αναπτύσσεται στο δέρμα των βλεφάρων εμφανίζεται ως καλά περιγεγραμμένη ερυθριματώδης λεπτή πλάκα με ακανόνιστα όρια, έχουσα στην επιφάνειά της εφελκίδες⁸. Είναι συνήθως μια μονήρης, βραδέως αναπτυσσόμενη βλάβη που σπάνια εξαλλάσσεται σε AKK¹⁴⁷. Η εμφάνιση της νόσου στον επιπεφυκότα αφορά μια πάθηση μονήρη και ετερόπλευρη¹⁴⁸ που εξορμάται συνήθως από το σκληροκερατοειδικό όριο, περιοριζόμενη στο επιθήλιο του επιπεφυκότα αντίστοιχα προς τη μεσοβλεφάρια σχισμή, με τάση επέκτασης στα κολπώματα του επιπεφυκότα και στον κερατοειδή χιτώνα^{6,148}. Σπάνια διηθεί εσωτερικούς ιστούς του οφθαλμού η εξαλλάσσεται σε AKK και δίνει μεταστάσεις. Τυπικά εμφανίζεται ως μια ελαφρώς υπεργερμένη, σαρκώδης η ανθοκραμβοειδής μάζα με θυσάνους νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων. Ενίοτε μπορεί να λάβει τη μορφή μιας ζελατινώδους ανάγγειας αλλοίωσης. Επειδή η βλάβη αφορά το επιθήλιο μπορεί να μετακινείται ελεύθερα επάνω στην επιφάνεια του βολβού^{6,20}.

Ιστολογικά εμφανίζεται παρακεράτωση, υπερκεράτωση και ακάνθωση, με διαταραχή της αρχιτεκτονικής δομής της επιδερμίδας¹. Στο απλό μικροσκόπιο μπορεί κανείς να παρατηρήσει πολλά πλειομορφικά, άτυπα υπερχρωματικά κερατινοκύτταρα⁸ που μοιάζουν με αυτά της νόσου Paget¹⁴⁹. Επίσης μπορεί να εμφανισθούν μεγάλα κύτταρα με τεράστιο βαθυχρωματικό πυρήνα¹⁵⁰. Η βασική στοιβάδα παραμένει άθικτη και το χόριο εμφανίζει στοιχεία χρόνιας φλεγμονώδους διήθησης^{1,150} (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Νόσος Bowen: η βλάβη περιορίζεται στην επιδερμίδα

Η νόσος Bowen όταν εμφανίζεται στον οφθαλμό έχει άριστη πρόγνωση. Τα κύτταρα της βλάβης μπορεί να παραμείνουν στην προκαρκινική κατάσταση ή σπανίως να μετατραπούν σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων που προκαλεί μεταστάσεις²⁰. Οι υποτροπές επίσης της νόσου δεν είναι σπάνιες^{3,38} και μπορεί να συμβούν σε έδαφος ανεπαρκούς θεραπείας της αλλοίωσης. Θεραπεία εκλογής για αυτό το *in situ* Ca είναι η χειρουργική αφαίρεσή του με τους τρόπους που αναφέρθηκαν στα αντίστοιχα κεφάλαια για την αντιμετώπιση του ΑΚΚ και του ΒΚΚ. Επικουρικά στην χειρουργική θεραπεία μπορεί να προστεθεί η κρυοθεραπεία και η χρήση μιτομυκίνης C για βλάβες που εντοπίζονται στον επιπεφυκότα⁶ και η ραδιοθεραπεία για αυτές που εντοπίζονται στα βλέφαρα. Επειδή πρόκειται για την προκαρκινική μορφή του ΑΚΚ οι αλλοιώσεις αυτές είναι αναγκαίο να αντιμετωπίζονται με προσοχή από τον χειρουργό οφθαλμίατρο¹⁵⁰ και οι ασθενείς μετά την επιτυχή αντιμετώπιση της βλάβης να συμμετέχουν σε πρωτόκολλα παρακολούθησης για να εντοπισθούν έγκαιρα ενδεχόμενες υποτροπές ή κακοήθης εξέλιξη της νόσου.

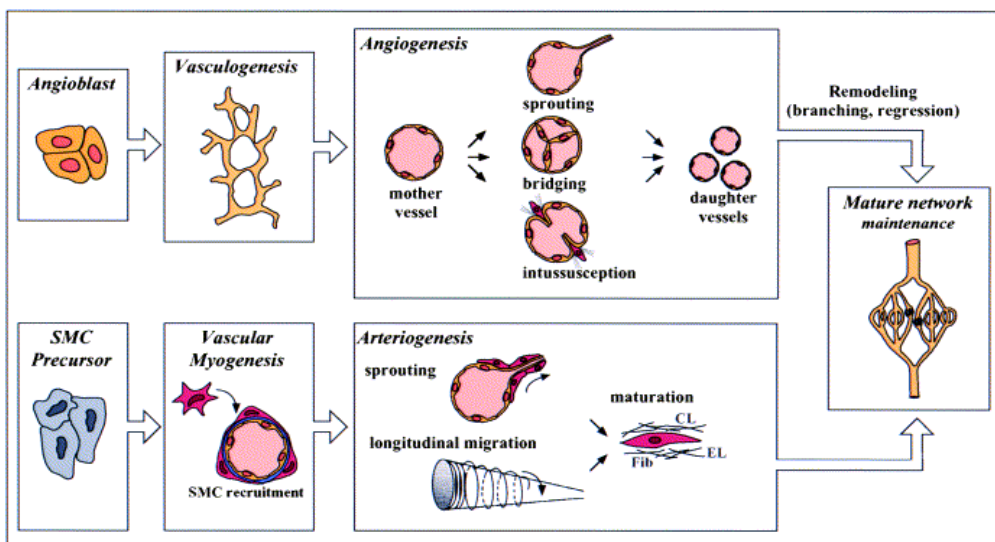
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Γενικά-Ορισμοί

Το κυκλοφορικό σύστημα είναι απαραίτητο για την επιβίωση κάθε πολυκύτταρου οργανισμού καθώς εξυπηρετεί την μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και σηματοδοτικών μορίων στα κύτταρα και στους ιστούς, απομακρύνοντας παράλληλα το διοξείδιο του άνθρακα και τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Είναι άλλωστε το πρώτο οργανικό σύστημα που αναπτύσσεται και φτάνει σε λειτουργικό επίπεδο κατά την εμβρυική ζωή έτσι ώστε να συμβάλλει με τη σειρά του στην οργανογένεση και στην ανάπτυξη/διαφοροποίηση των υπόλοιπων συστημάτων^{151,152}.

Στο έμβρυο, τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται μέσω δύο διαφορετικών διαδικασιών: της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis) και της αγγειογένεσης (angiogenesis)¹⁵³⁻¹⁵⁴. Η αγγειακή διαφοροποίηση περιλαμβάνει την de novo διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων από αρχέγονα κύτταρα του μεσοδέρματος. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται αιμαγγειοβλάστες, αποτελούν κοινό πρόγονο των ενδοθηλιακών και των αιμοποιητικών κυττάρων και βρίσκονται στις λεγόμενες αιματικές νησίδες του λεκιθικού ασκού. Από τους αιμαγγειοβλάστες προέρχονται οι αγγειοβλάστες, τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια οργανώνονται σε ένα αρχικό άωρο αγγειακό πλέγμα¹⁵⁵. Αυτό το εμβρυικό πλέγμα περιλαμβάνει κάποια από τα βασικότερα αγγεία του ανθρώπινου οργανισμού, όπως για παράδειγμα την αορτή. Στο στάδιο αυτό οι αγγειοβλάστες έχουν ήδη αποκτήσει αρτηριακή και φλεβική διαφοροποίηση¹⁵⁶. Το αρχικό αγγειακό δίκτυο, που προήλθε από την διαδικασία της αγγειακής διαφοροποίησης, επεκτείνεται, αναδιαμορφώνεται και τελικά βελτιώνεται σε ένα πιο λειτουργικό δίκτυο, μέσω του μηχανισμού της αγγειογένεσης¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Αγγειογένεση καλείται η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα με διαδικασίες όπως η εκβλάστηση, η γεφυροποίηση και ο εγκολεασμός. Παράλληλα με την αγγειογενετική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος επιτελείται η σταθεροποίηση του αγγειακού τοιχώματος μέσω της προσέλκυσης μεσεγχυματικών κυττάρων που αναπτύσσονται περιενδοθηλιακά και διαφοροποιούνται αφενός σε περικύτταρα στο επίπεδο των τριχοειδών αγγείων και αφετέρου σε λεία μυϊκά κύτταρα στο επίπεδο των αρτηριδίων, φλεβιδίων και μεγαλύτερων αγγείων¹⁶⁰⁻¹⁶¹.



Εικόνα 7. Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (αγγειοβλάστες) οργανώνονται σε ένα αρχικό δίκτυο (αγγειακή διαφοροποίηση) που στην συνέχεια επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται (αγγειογένεση). Λεία μυϊκά κύτταρα σταθεροποιούν τα νέα αγγεία για την δημιουργία του ώριμου αγγειακού δικτύου (Carmeliet, 2003).

Κατά την ενήλικη ζωή το αγγειακό σύστημα παραμένει σε κατάσταση ηρεμίας με εξαίρεση καταστάσεις όπως η επούλωση των τραυμάτων και ο γυναικείος καταμήνιος κύκλος όπου και η αγγειογένεση ενεργοποιείται¹⁵². Πέρα από τις φυσιολογικές αυτές λειτουργίες, η αγγειογένεση εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών και ποικίλων νοσημάτων

όπως οι παραγωγικές αμφιβληστροειδοπάθειες, η γεροντική εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση κ.α. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αγγειογένεση στα κακοήθη νεοπλάσματα, αποτελώντας αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας με πολυάριθμες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η **νεοπλασματική αγγειογένεση** είναι μία σύνθετη και πολυσταδιακή διαδικασία που εξυπηρετεί τον σχηματισμό του αγγειακού δικτύου του νεοπλάσματος, εξασφαλίζοντας έτσι την διηθητική του ανάπτυξη και την δυνατότητα μετάστασης στους ιστούς^{163,164}. Η φυσιολογική αγγείωση δεν επαρκεί για την ανάπτυξη του όγκου πέρα από διάμετρο 2 χιλιοστών. Το νεόπλασμα επομένως εξασφαλίζει την βασική αγγειακή του παροχή από επέκταση και αναδιαμόρφωση του υπάρχοντος αγγειακού δικτύου του ιστού εντός του οποίου αναπτύσσεται¹⁶⁵.

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μία σειρά βημάτων, μερικά από τα οποία είναι: η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και η έκκριση πρωτεϊνών με επακόλουθη αποικοδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που περιβάλλει το αγγειακό δίκτυο, στη συνέχεια η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και τέλος η οργάνωσή τους σε νεοσχηματισμένους αγγειακούς αυλούς¹⁶⁶. Σε αρκετά κακοήθη νεοπλάσματα η αγγειογένεση συμβαίνει ταυτόχρονα με την επανεργοποίηση της εμβρυικής αγγειακής διαφοροποίησης, ο ρόλος της οποίας στην καρκινογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως¹⁶⁷.

Τα νεοσχηματισμένα αγγεία του όγκου σε αντίθεση με τα φυσιολογικά παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία. Οι Algire και Chalkley μελετώντας όγκους που αναπτύχθηκαν in vivo σε ποντικούς έδειξαν ότι τα τριχοειδή που σχηματίζονται εντός του αναπτυσσόμενου όγκου έχουν πενταπλάσια διάμετρο σε σχέση με αυτά του φυσιολογικού ιστού¹⁶⁸. Επίσης τα τριχοειδή αυτά σπάνια διαφοροποιούνται σε αρτηρίδια και φλεβίδια. Επιπλέον η χρήση τρισδιάστατης μικροσκοπίας ανέδειξε την άναρχη και ακανόνιστη ανάπτυξη των

νεοαγγειών του όγκου, τα οποία εμφάνιζαν ανώμαλους αυλούς και ατελή ενδοθηλιακή κάλυψη με αποτέλεσμα η ροή του αίματος στα κακοήθη νεοπλάσματα να είναι χαοτική^{164,169}.

Η αγγειογένεση υπόκειται σε αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η συνεχής αναστολή της στον ενήλικα με εξαίρεση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, την ιστική επανόρθωση και τις κυκλικές μεταβολές του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Συγκεκριμένα, η ρύθμιση της αγγειογενετικής διαδικασίας επιτελείται μέσω μιας σειράς ενδογενών διεγερτών (προ-αγγειογενετικοί παράγοντες) και αναστολέων (αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες). Η ακριβής ισορροπία μεταξύ τους είναι απαραίτητη για την διατήρηση του εφησυχάζοντος αγγειακού δικτύου. Η απώλεια των μηχανισμών ρύθμισης στα κακοήθη νεοπλάσματα έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της ισορροπίας διεγερτών-αναστολέων και την ενεργοποίηση του αγγειογενετικού διακόπτη με αποτέλεσμα την επικράτηση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων και την αύξηση συνεπώς του νεοπλάσματος¹⁷⁰.

Έχουν περιγραφεί περίπου τριάντα παράγοντες που ενεργοποιούν την αγγειογένεση και άλλοι τόσοι που την αναστέλλουν (πίνακας 1)¹⁷¹. Κυρίαρχο ρόλο στην προαγωγή τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής αγγειογένεσης κατέχει ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), ο οποίος πρωταγωνιστεί στην έρευνα της αγγειογένεσης τουλάχιστον για την τελευταία εικοσαετία.

Η ανακάλυψη και ταυτοποίηση του VEGF έγινε από δύο ομάδες ερευνητών που εργαζόταν ταυτόχρονα αλλά ανεξάρτητα στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Το 1983 ο Senger και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την μερική απομόνωση μιας πρωτεΐνης με την ιδιότητα να αυξάνει την διαπερατότητα του δέρματος. Ονόμασαν τη νέα πρωτεΐνη «αγγειακό παράγοντα διαπερατότητας» (vascular permeability factor, VPF), χωρίς ωστόσο να πετύχουν την πλήρη απομόνωσή της και την καταγραφή της αμινοξικής της

ακολουθίας¹⁷². Το 1989 οι Ferrara και Henzel ανακοίνωσαν την πλήρη απομόνωση και ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης που εμφανίζει ισχυρή μιτογόνο δράση ειδική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η οποία ήταν εντελώς διαφορετική από τους μέχρι τότε γνωστούς παράγοντες διέγερσης του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁷³. Ονόμασαν την καινούργια πρωτεΐνη αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF). Ακολούθησε η πλήρης απομόνωση και ταυτοποίηση του VPF από τις ομάδες των Conolly και του Senger καθώς και η κλωνοποίηση του cDNA του VPF και του VEGF, επίσης το 1989, αποδεικνύοντας ότι επρόκειτο για την ίδια πρωτεΐνη^{174,175}. Ο κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης είχε αναγνωριστεί και μια περίοδος εντατικής έρευνας ξεκινούσε στις αρχές της δεκαετίας του 1990.

Διεγέρτες της αγγειογένεσης Προ-αγγειογενετικοί παράγοντες	Αναστολείς της αγγειογένεσης Αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες
Αγγειογενίνη	Αγγειοστατίνη
Αγγειοποιητίνες (1 και 2)	Αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών ιστικού τύπου (TIMP)
Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)	Αντιθρομβίνη III
Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)	Αρρεστίνη
Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β)	Ενδοστατίνη
Διεγερτικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (GCSF)	Ιντερφερόνες (α,β,γ)
Διεγερτικός παράγοντας των μακροφάγων (GM-CSF)	Ιντερλευκίνες 4,12,18
Εφρίνες (A1, B1, B2)	Οστεοποντίνη
Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)	Προλακτίνη
Ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF)	

Ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (IGF)	Προθρομβίνη 2
Ιντερλευκίνες 1,6,8	Πλασμινογόνο
Ιντεγκρίνες	Παράγοντας αιμοπεταλίων- 4
Λεπτίνη	Χοντρομοντουλίνη-1
Πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PIGF)	Σεμαφορίνη-3
Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-a)	2-μεθοξυλεστραδιόλη
	Διαλυτή ισομορφή VEGFR1

Πίνακας 1. Επιλεκτική αναφορά ενδογενών παραγόντων που προάγουν/αναστέλλουν την αγγειογένεση.

Ο VEGF (ο οποίος αναφέρεται και ως VEGF-A) είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τους VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F και PIGF (placental growth factor)¹⁵². Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν ομολογία ως προς τη δομή τους, έχουν ωστόσο διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Ειδικότερα ο VEGF-B, έχει και αυτός αγγειογενετική δράση, η οποία όμως είναι ασθενέστερη από του VEGF-A. Οι VEGF-C και VEGF-D είναι οι κύριοι ρυθμιστές της λεμφαγγειογένεσης και η δράση τους θα αναπτυχθεί εκτενέστερα παρακάτω. Ο PIGF ανακαλύφθηκε στον πλακούντα και συμμετέχει τόσο στην φυσιολογική όσο και στην παθολογική αγγειογένεση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος¹⁷⁶. Τέλος υπάρχει και ο VEGF-E, μη ανθρώπινος παράγοντας, ο οποίος εντοπίστηκε στο γονιδίωμα ενός παρβομυξιοϊού, του orf virus, εμφανίζει ομολογία ως προς τον VEGF και παρόμοια αγγειογενετική δράση¹⁷⁷.

Γονίδιο-Πρωτεϊνική δομή

Το γονίδιο του VEGF-A στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3¹⁷⁸ και είναι οργανωμένο σε οκτώ εξόνια τα οποία διαχωρίζονται από επτά ιντρόνια¹⁷⁹. Υπάρχουν τέσσερις βασικές ισομορφές του VEGF-A (VEGF121, VEGF165, VEGF189 και VEGF206) οι οποίες είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και αποτελούνται από 121, 165, 189 και 206 αμινοξέα αντίστοιχα¹⁸⁰. Η κύρια ισομορφή με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά, όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα και τις βιολογικές δυνατότητες είναι ο VEGF165, μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη με MW 45 KDa που συνδέεται στην ηπαρίνη. Αυτή είναι και η ισομορφή που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα κατά την νεοπλασματική αγγειογένεση^{152,181}.

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της παραγωγής του VEGF-A

Τάση οξυγόνου

Η μερική τάση οξυγόνου στους ιστούς παίζει κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων¹⁸². Η έκφραση του mRNA του VEGF επάγεται από την έκθεση σε συνθήκες υποξίας σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου^{183,184}. Ο κύριος μεσολαβητής σε αυτόν τον μηχανισμό είναι ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (Hypoxia inducible factor 1, HIF-1), ένας μεταγραφικός παράγοντας με ετεροδιμερή μορφή έλικας-αγκύλης-έλικας, ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες, τον HIF-1a και τον HIF-1b¹⁸⁵. Κάτω από νορμοξικές συνθήκες ο HIF-1a καταβολίζεται από το πρωτεολυτικό σύστημα της ουβικουτίνης, σε υποξικές όμως συνθήκες ο καταβολισμός του αναστέλλεται και η παραγωγή του αυξάνεται ραγδαία¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Ο HIF-1a συνδέεται σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία 28 βάσεων στην 5' περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου του VEGF επάγοντας έτσι την μεταγραφή του σε περιβάλλον υποξίας^{185,188}. Σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ρυθμιστικής δράσης του HIF-1a παίζει το

ογκοκατασταλτικό γονίδιο VHL (Von Hippel Lindau) το οποίο αναστέλλει την έκφραση του HIF-1a. Όταν το γονίδιο αυτό είναι ανενεργό, η δράση του HIF-1a και κατά συνέπεια και του VEGF απελευθερώνεται και η διαδικασία της αγγειογένεσης γίνεται ανεξέλεγκτη. Αυτός είναι και ο λόγος που ασθενείς με τη νόσο Von Hippel Lindau εμφανίζουν πολυάριθμα αιμαγγειοβλαστώματα στον αμφιβληστροειδή και στην παρεγκεφαλίδα. Μετάλλαξη του VHL γονιδίου παρατηρείται και στα περισσότερα νεφροκυτταρικά καρκινώματα, διαυγοκυτταρικού τύπου¹⁸⁹. Επιπλέον η υποξία επάγει την σταθεροποίηση της ασταθούς 3' περιοχής του mRNA του VEGF, αυξάνει τον ρυθμό μετάφρασης του VEGF mRNA και ενισχύει την έκφραση των υποδοχέων του VEGF. Βέβαια το γονίδιο του VEGF δεν είναι ο μοναδικός στόχος της υποξίας και του HIF-1a. Τα μοριακά μονοπάτια ενεργοποίησης του HIF-1a και του VEGF είναι πολύ στενά συνδεδεμένα και διαπλεκόμενα με τα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ενεργοποίησης ογκογονιδίων και της εξάλειψης ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και της ενεργοποίησης αυξητικών παραγόντων και κυττοκινών^{187,189}.

Αυξητικοί παράγοντες-κυττοκίνες-ορμόνες-ογκογονίδια

Ικανός αριθμός αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται τόσο από τα φυσιολογικά όσο και από τα καρκινικά κύτταρα επάγουν την παραγωγή του VEGF. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο EGF, οι TGF α και β, ο KGF (keratinocyte growth factor), ο IGF-1, ο FGF και ο PDGF. Οι παράγοντες αυτοί δρουν τόσο με αυτοκρινείς όσο και με παρακρινείς μηχανισμούς, είτε σε συνδυασμό με τον μηχανισμό της υποξίας είτε εντελώς ανεξάρτητα, προάγοντας τη νεοπλασματική αγγειογένεση ακόμα και σε νορμοξικό περιβάλλον¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Διάφορες κυττοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες IL-1 και η IL-6 επάγουν την έκφραση του VEGF σε διάφορους τύπους κυττάρων προάγοντας την αγγειογένεση σε καταστάσεις φλεγμονής¹⁹². Επίσης διάφορες ορμόνες είναι σημαντικές για την ρύθμιση

της έκφρασης του VEGF. Η TSH για παράδειγμα αυξάνει την παραγωγή VEGF σε κύτταρα καρκίνου του θυρεοειδούς¹⁹³. Η ACTH αυξάνει την έκφραση VEGF στα επινεφρίδια και οι γοναδοτροπίνες στις ωθήκες^{194,195}. Επιπρόσθετα η χοριακή γοναδοτροπίνη και τα στεροειδή του φύλου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του VEGF σε ορμονοευαίσθητους ιστούς¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 συμβαίνουν σε πολλές κακοήθειες και έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της δράσης του VEGF. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως το K-ras και το H-ras σε ποικίλες νεοπλασίες επάγει την παραγωγή του VEGF και την νεοπλασματική αγγειογένεση¹⁹⁹.

Τέλος σημαντικό ρόλο στην παραγωγή VEGF φαίνεται να διαδραματίζει και το μοριακό μονοπάτι των προσταγλαδινών. Σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων παρατηρείται υπερέκφραση της κυκλοοξυγενάσης COX-2 και υπερπαραγωγή της προσταγλαδίνης PGE-2 με επακόλουθη ενεργοποίηση του καταρράκτη της MAP κινάσης¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Έτσι ενεργοποιούνται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο NF-kB και επάγεται η έκφραση γονιδίων όπως αυτό του VEGF²⁰⁰⁻²⁰¹.

Υποδοχείς VEGF-A

Ο VEGF-A εκδηλώνει την πλειοψηφία των δράσεών του συνδεδεμένος με δύο υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης. Πρόκειται για τον VEGRR-1 (γνωστό και ως flt-1, fms like tyrosine kinase, όπου fms=feline McDonough sarcoma virus) και τον VEGFR-2 (γνωστό και ως Flk-1/KDR, Fetal liver kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor). Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ υπάρχουν και σε κύτταρα άλλων ιστών, χωρίς να έχει διευκρινιστεί πλήρως η σημασία αυτής της έκφρασης. Εκφράζονται επίσης και από τα νεοπλασματικά κύτταρα διαφόρων κακοήθων όγκων. Επιπλέον ο

VEGF-A αλληλεπιδρά με μία οικογένεια μορίων που δρουν ως συνυποδοχείς, τις νευροπιλίνες (Neuropilins, NP)¹⁵².

VEGFR-1

Ο VEGFR-1 είναι ο πρώτος υποδοχέας του VEGF που ταυτοποιήθηκε ωστόσο η ακριβής λειτουργία του παραμένει ακόμα αντικείμενο μελέτης. Αποτελείται από 1338 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 210KDa και συνδέεται με τον VEGF-A καθώς και με τον PlGF και τον VEGF-B²⁰². Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των ενηλίκων εκφράζεται και σε προγονικά εμβρυικά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν αργότερα σε ενδοθηλιακά, όπως τα μεσεγχυματογενή κύτταρα του λεκιθικού ασκού^{203,204}. Ο ρόλος του στην εμβρυική αγγειογένεση είναι αδιαμφισβήτητος καθώς πειραματόζωα στα οποία τα αλληλία που κωδικοποιούν τον υποδοχέα έχουν αδρανοποιηθεί (Flt1-/- ποντίκια) πεθαίνουν ενδομητρίως²⁰⁵. Εκφράζεται επιπλέον σε μονοκύτταρα/μακροφάγα, οστεοβλάστες, κύτταρα της πλακουντιακής τροφοβλάστης, σε νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα καθώς και σε κάποια αρχέγονα προγονικά κύτταρα (stem cells) του αιμοποιητικού συστήματος²⁰⁶⁻²⁰⁸.

Στα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα η σύνδεση του VEGF με τον VEGFR-1 δεν οδηγεί άμεσα σε ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά απαιτείται και η παρουσία του VEGFR-2^{209,210}. Φαίνεται πως ο VEGFR-1 παίζει αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στην δράση του VEGF, ενεργώντας ως υποδοχέας-κράχτης (decoy receptor), ο οποίος λόγω της υψηλής συγγένειάς του με τον VEGF, ουσιαστικά τον παγιδεύει εμποδίζοντας την σύνδεσή του με τον VEGFR-2, για τον οποίο ο VEGF έχει χαμηλότερη συγγένεια και ισχύ σύνδεσης και τελικά αναστέλλει έτσι την δράση του^{210,211}. Επιπλέον υπάρχει και η διαλυτή ισομορφή του VEGFR-1, που είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος και η οποία δεσμεύει τον κυκλοφορούντα VEGF και ελαττώνει έτσι τα επίπεδα δραστηριότητάς του

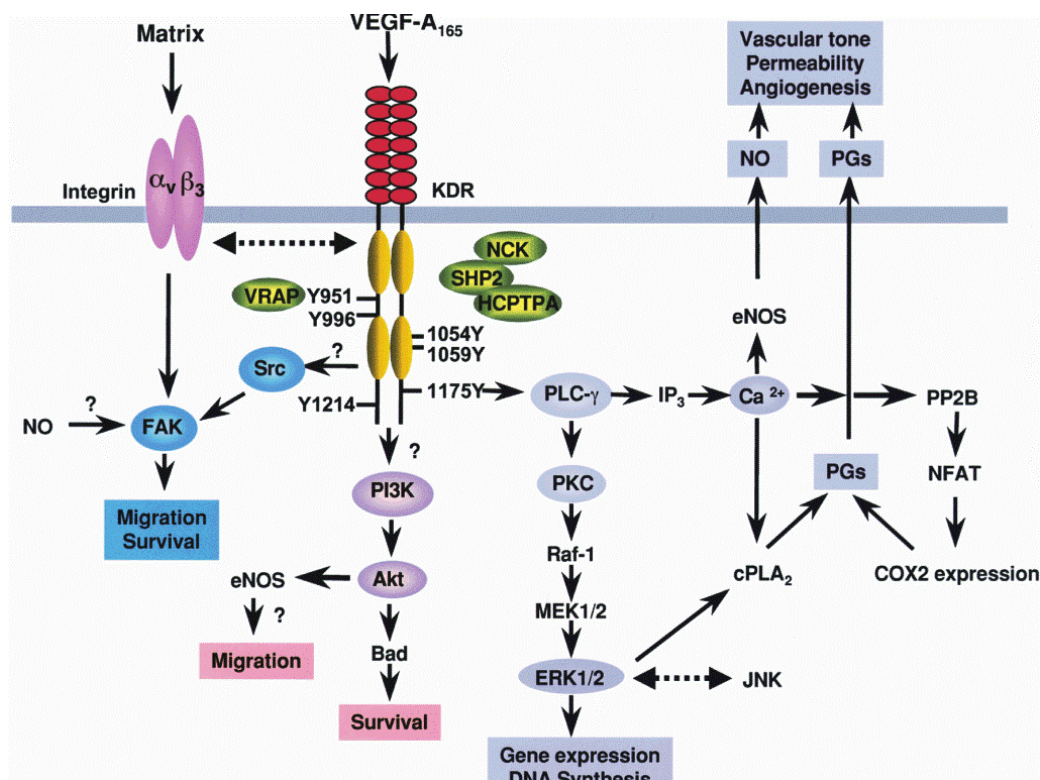
στους ιστούς^{212,213}. Από την άλλη όμως, η πρόσδεση του VEGF στον VEGFR-1 φαίνεται να επάγει έναν χημειοτακτικό μηχανισμό, προσελκύνοντας μονοκύτταρα στην περιοχή, τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν VEGF²¹⁴. Ακόμη η ενεργοποίηση του VEGFR-1 εμπλέκεται στην αύξηση της έκφρασης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μόριο με γνωστό ρόλο στην αγγειογένεση καθώς προάγει την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων²¹⁴⁻²¹⁵. Επομένως είναι φανερό ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να αποσαφηνιστούν οι ακριβείς δράσεις αυτού του υποδοχέα.

VEGFR-2

Πρόκειται για τον υποδοχέα με την καλύτερα μελετημένη δράση. Αποτελείται από μια ακολουθία 1356 αμινοξέων, έχει μοριακό βάρος 210 KDa και συνδέεται εκτός από τον VEGF-A, με τους VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E^{216,217}. Εκφράζεται κυρίως στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό σε αιμοποιητικά κύτταρα²¹⁸. Όπως και με τον VEGFR-1, έτσι και τα VEGFR-2 -/- πειραματόζωα πεθαίνουν έως την 9^η ημέρα κύησης, καθώς είναι αδύνατη η περαιτέρω ανάπτυξη του αιμοποιητικού και αγγειακού συστήματος²¹⁹. Επιπλέον έχει αναφερθεί η έκφρασή του σε νευρικά κύτταρα, οστεοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα παγκρεατικών πόρων, προγονικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και μεγακαρυοκύτταρα, με ασαφή προς το παρόν ρόλο^{214,220}. Όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος των όγκων, ενώ εκφράζουν αυξημένα επίπεδα VEGF-A παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης VEGFR-2. Αντίθετα παρατηρείται υψηλή έκφραση VEGFR-2 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου, γεγονός που υποδεικνύει τον παρακρινή τρόπο δράσης του VEGF-A στην νεοπλασματική αγγειογένεση. Τέλος εκφράζεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του

λεμφαγγειακού συστήματος όπου μέσω της σύνδεσής του με τον VEGFC φαίνεται να συμβάλλει μερικώς και στην λεμφαγγειογένεση^{152,214,221}.

Η συγγένεια σύνδεσης του VEGF για αυτόν τον υποδοχέα είναι μικρότερη από ότι για τον VEGFR1, ωστόσο η σύνδεσή του στον VEGFR-2 έχει σαν αποτέλεσμα τον διμερισμό και την έντονη αντίδραση αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα και επακόλουθη ενεργοποίηση αρκετών πρωτεϊνών με δράση τυροσινικής κινάσης εντός του ενδοθηλιακού κυττάρου²²²⁻²²⁶. Ανάμεσα σε αυτές είναι η φωσφολιπάση-C, η PI3 κινάση, η Ras-GTPάση, η οικογένεια των src πρωτεϊνών και το μονοπάτι των Raf-Mek-Erk κινασών²²⁷. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, ο πολλαπλασιασμός, η ενεργοποίηση, η μετανάστευση και η αύξηση της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και η χημειοταξία των κυττάρων του στρώματος²²⁸⁻²³⁰. Ο VEGFR-2 επίσης αλληλεπιδρά με την VE-cadherin και με τις ιντεγκρίνες όπως η ιντεγκρίνη ανβ3²³¹. Υπάρχει γενική ομοφωνία πως ο VEGFR-2 αποτελεί τον κύριο εκφραστή της μιτογόνου και της εν γένει αγγειογενετικής δράσης του VEGF.



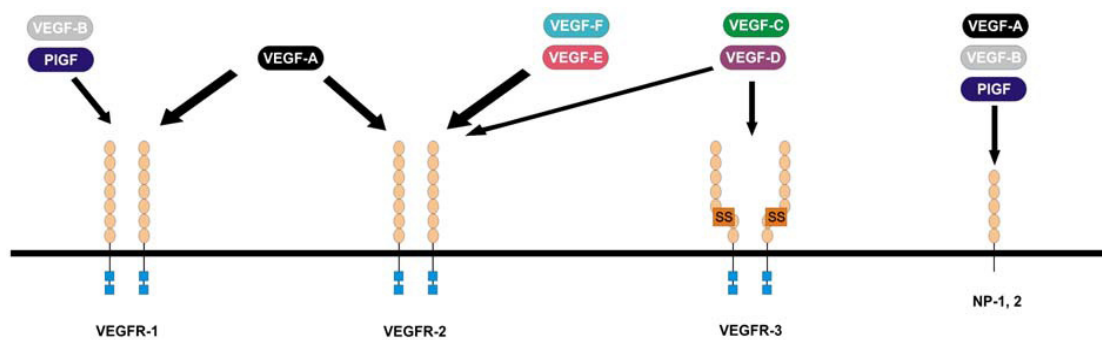
Εικόνα 8. Η μεταγωγή του σήματος μετά την πρόσδεση του VEGF-A στον υποδοχέα VEGFR-2 και ενεργοποιούμενα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια με σκοπό την επίτευξη των βιολογικών του δράσεων.

Neuropilins (NP1 και NP2)

Πρόκειται για γλυκοπρωτείνες με μοριακό βάρος 120-140 kDa, με διαμεμβρανική εντόπιση και ρόλο συνυποδοχέα για δύο μεγάλες οικογένειες πρωτεϊνών: τις σεμαφορίνες (πρωτείνες με ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος) και την οικογένεια του VEGF²³². Αρχικά αναγνωρίστηκαν στα κύτταρα του νευρικού συστήματος και χαρακτηρίστηκαν ως μόρια νευρικής αναγνώρισης και κυτταρικής προσκόλλησης^{233,234}. Σήμερα πλέον έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία τους σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων καθώς και στα καρκινικά κύτταρα πολλών νεοπλασιών^{235,236}. Φαίνεται να διαμεσολαβούν στην ανάπτυξη των νεοπλασμάτων μέσω της προαγωγής της αγγειογένεσης ή ακόμα και δρώντας απευθείας στα καρκινικά κύτταρα²³⁶⁻²³⁷.

Οι υποδοχείς αυτοί φαίνεται να έχουν έναν επικουρικό ρόλο στην μεταγωγή του σήματος

του VEGF. Δρουν ως συνυποδοχείς για τους VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3, συμβάλλοντας στην μεταγωγή του σήματος μέσω του καταρράκτη των πρωτεϊνών τυροσινικής κινάσης²³⁸. Πιο συγκεκριμένα η σύνδεση του VEGF με την NP1 οδηγεί στην παρουσίαση του VEGF στον VEGFR-2 σε μορφή που αυξάνει τη συγγένεια σύνδεσης και ενεργοποιεί την μεταγωγή του σήματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση των δράσεων του VEGF μέσω του VEGFR-2²³⁹⁻²⁴¹. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η έκφραση και των δύο υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη του ενδοθηλιακού κυττάρου.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των μορίων-μελών της VEGF οικογένειας με τους υποδοχείς VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 και τις neuropilins.

Βιολογικές δράσεις

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ένωση του VEGF με τους υποδοχείς του οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινάσων και σε επακόλουθη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁴². Ο VEGF επάγει επίσης τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και τη μετανάστευση των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα το σχηματισμό τριχοειδών^{242,243}. Η δράση του επεκτείνεται και στην επαγωγή της απελευθέρωσης ενζύμων που δρουν στη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία όπως είναι ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, ο υποδοχέας της ουροκινάσης, κολλαγενάσες και μεταλοπρωτεϊνάσες²⁴³. Ο VEGF αυξάνει και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κυρίως μέσω της

αναστολής του μηχανισμού της απόπτωσης. Αυτό επιτυγχάνεται με ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3/Akt και την επαγωγή της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως της Bcl-2, της A1, της XIAP και της survivin²⁴³⁻²⁴⁴.

Οι δράσεις του VEGF σε κυτταρικό επίπεδο επεκτείνονται στο αιμοποιητικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ειδικότερα ο VEGF επάγει την παράγωγή μακροφάγων, κοκκιοκυττάρων και β-λεμφοκυττάρων καθώς και την χημειοταξία των μονοκυττάρων, ενώ αναστέλλει την διαφοροποίηση των δενδριτικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων²⁴⁵. Αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια αποτελούν οι απευθείας δράσεις του VEGF στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα με παρακρινείς ή/και αυτοκρινείς μηχανισμούς.

Πέρα από τις δράσεις του VEGF σε κυτταρικό επίπεδο, ο παράγοντας αυτός επηρεάζει και τη συνολική λειτουργία του αγγειακού δικτύου κυρίως μέσω της αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο μέσω της αύξησης της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της διαφυγής διαφόρων μορίων μέσα από το αγγειακό δίκτυο, τόσο σε καταστάσεις φλεγμονής όσο και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον επάγει το σχηματισμό θυρίδων και κενοτοποειδών οργανιδίων στα αγγεία, μέσω των οποίων τελικά μεταφέρονται μόρια προς τη θεμέλια ουσία. Η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας είναι πρωταρχικής σημασίας για την διαδικασία της αγγειογένεσης καθώς επιτρέπει την έξοδο ινώδους από τα κύτταρα, το οποίο και χρησιμεύει ως αρχικό ικρίωμα για την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων¹⁶¹⁻¹⁶⁶.

Ρόλος στην νεοπλασματική αγγειογένεση

Η συντριπτική πλειοψηφία των έως τώρα μελετημένων ανθρώπινων κακοήθων νεοπλασμάτων χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες με *in situ* υβριδισμό έδειξαν ότι το mRNA του VEGF εκφράζεται στον καρκίνο

του πνεύμονα, του μαστού, της γαστρεντερικής οδού, του νεφρού, της ουροδόχου κύστεως, των ωοθηκών, του ενδομητρίου, του θυρεοειδή αδένου, σε ενδοκρινικούς όγκους, καθώς και σε όγκους όπως το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και το κακόηθες μελάνωμα²⁴⁶⁻²⁶⁹. Το mRNA του VEGF εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του όγκου και σε πολύ μικρότερο βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων που σχετίζονται με τους όγκους, τα οποία ωστόσο υπερεκφράζουν το mRNA των υποδοχέων του VEGFR1 και VEGFR2 και τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν για τον παρακρινή τρόπο δράσης του VEGF, ο οποίος εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα και επιδρά στα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα-στόχους, στα οποία και αθροίζεται, όπως άλλωστε φαίνεται και από ανοσοϊστοχημικές μελέτες που αναδεικνύουν παρουσία VEGF τόσο στα καρκινικά όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα^{165,270-272}. Η αναστολή της λειτουργίας του VEGF σε πειραματόζωα οδηγεί σε αναστολή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης και σε επακόλουθη διακοπή της ανάπτυξης των όγκων *in vivo*²⁷³⁻²⁷⁵.

Έχει αποδειχθεί ότι ο VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και διηθητική ανάπτυξη του SCC στο δέρμα. Απλά και μόνο η πειραματική επιλεκτική υπερέκφραση του VEGF-A σε έναν μη επιθετικό κλώνο SCC (*in situ* καρκίνωμα για την ακρίβεια) είναι αρκετή για να πυροδοτήσει διηθητικά πρότυπα ανάπτυξης και περαιτέρω αύξηση του μεγέθους του όγκου *in vivo*²⁷⁶. Επιπλέον η αναστολή της δράσης του VEGF με τη χρήση αδρανοποιητικών αντισωμάτων εναντίον των υποδοχέων VEGFR1/VEGFR2 συνεπάγεται αναστολή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης και της διηθητικής ανάπτυξης του καρκινώματος²⁷⁷. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του VEGFR2 αυξάνεται παροδικά στην ακτινική κεράτωση και υπερεκφράζεται σταθερά στις κακοήθεις αλλοιώσεις^{277,278}, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο εν λόγω υποδοχέας παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του SCC.

Όσον αφορά το BCC, δερματικό όγκο με αργή ανάπτυξη και λιγότερο επιθετική πορεία σε

σχέση με το SCC, γενικά οι μέχρι τώρα μελέτες αναφέρουν συνολικά χαμηλότερη έκφραση του VEGF. Ο Weniger και οι συνεργάτες του μελετώντας την έκφραση του VEGF με *in situ* υβριδισμό και ανοσοϊστοχημεία σε επιθηλιακούς όγκους του δέρματος διαπίστωσαν έκφραση VEGF μόνο σε 5 από τις 14 συνολικά περιπτώσεις BCC, σε αντίθεση με τα SCC που εξέφραζαν VEGF στο σύνολό τους²⁷⁹⁻²⁸⁰. Στο ίδιο πνεύμα η Loggini και συνεργάτες βρήκαν χαμηλή έκφραση mRNA VEGF σε 20 από τα 26 BCC, με παράλληλη χαμηλή VEGF ανοσοϊστοχημική έκφραση (περίπου 10%), ενώ υπήρχαν και δύο αρνητικές περιπτώσεις²⁸¹. Βέβαια τα BCC με επιθετικό φαινότυπο και υψηλό μεταστατικό δυναμικό παρουσιάζουν αυξημένο αγγειογενετικό δείκτη σε σχέση με λιγότερο επιθετικούς κλώνους²⁸². Άλλωστε ο VEGF σε αυτές τις περιπτώσεις εκφράζεται αποκλειστικά από τα καρκινικά κύτταρα της διηθητικής περιοχής του όγκου.

Μικροαγγειακή πυκνότητα

Η σημασία της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στην εξέλιξη και έκβαση των κακοήθων νεοπλασμάτων δημιούργησε την ανάγκη ποσοτικοποίησης της εν λόγω διαδικασίας. Καθοριστική υπήρξε η συμβολή της ανοσοϊστοχημείας με την ανακάλυψη και χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ανάδειξη των αγγείων σε ιστολογικές τομές των νεοπλασμάτων. Ο Weidner και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας σε τομές παραφίνης από νεοπλάσματα μαστού και προστάτη είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση των ασθενών²⁸³⁻²⁸⁶. Ο όρος μικροαγγειακή πυκνότητα αντιστοιχεί στον αριθμό των αγγείων ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης. Ουσιαστικά πρόκειται για τον μέσο όρο πολλών μετρήσεων που αφορούν περιοχές της ιστολογικής τομής με την υψηλότερη συγκέντρωση αγγείων (θερμές περιοχές, hot spots).

Η πλειοψηφία των μελετών που ακολούθησαν τις πρωτοποριακές μελέτες του Weidner κατέληξε σε θετική συσχέτιση της υψηλής μικροαγγειακής πυκνότητας με αυξημένα ποσοστά υποτροπής και μικρότερα ποσοστά επιβίωσης²⁸⁶⁻³⁰⁶, αν και υπάρχουν μελέτες που έδειξαν αντίστροφη συσχέτιση ή καμία απολύτως συσχέτιση³⁰⁷⁻³¹². Η ασυμφωνία οφείλεται τόσο στην μεθοδολογία της τεχνικής όσο και στην φιλοσοφία της. Τα κύρια μεθοδολογικά διλήμματα αφορούν στην επιλογή του αντισώματος και στην μέθοδο καταμέτρησης των αγγείων. Επιπλέον στην μεθοδολογία εμπλέκονται παράμετροι όπως η επιλογή των αντιπροσωπευτικότερων τομών από το αρχείο, οι συνθήκες μονιμοποίησης και διατήρησης των δειγμάτων, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλλά και η εμπειρία του παθολογοανατόμου που επιτελεί την καταμέτρηση. Όσον αφορά τη φιλοσοφία της τεχνικής πρέπει να γίνει σαφές ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα είναι ένας έμμεσος δείκτης του αγγειογενετικού δυναμικού του όγκου, καθώς η μελέτη μιας ιστολογικής τομής αποτελεί ουσιαστικά ένα «φωτογραφικό στιγμιότυπο» της αγγειογένεσης τη δεδομένη χρονική στιγμή, ενώ η διαδικασία στο σύνολό της εξελίσσεται σε βάθος χρόνου^{313,314}.

Για την μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας χρησιμοποιούνται δύο κατηγορίες αντισωμάτων ειδικών για τα ενδοθηλιακά κύτταρα: οι πανενδοθηλιακοί κυτταρικοί δείκτες καθώς και αντισώματα ειδικά για τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα³¹³. Οι πανενδοθηλιακοί δείκτες, όπως είναι τα αντισώματα για τα αντιγόνα CD31, CD34 και τον παράγοντα VIII (von Willebrand factor, vWF) χαρακτηρίζονται από ίσης έντασης χρώση για όλα τα αγγεία, βάφοντας εξίσου τα νεόπλαστα με τα προϋπάρχοντα φυσιολογικά αγγεία^{315,316}. Πέρα από τη χαμηλή τους ευαισθησία προβλήματα προκύπτουν και από την χαμηλή ειδικότητα των παραπάνω δεικτών. Το CD31 εκφράζεται και από φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα πλασματοκύτταρα, ενώ το CD34 από μεσεγχυματογενή κύτταρα του στρώματος και από τα περιαγγειακά στρωματικά κύτταρα καθώς και από τα λεμφαγγειακά

ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος ο vWF εκφράζεται από τα κύτταρα του στρώματος και από τα λεμφαγγεία^{313,316}.

Οι ειδικοί για τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα δείκτες αναδεικνύουν με μεγαλύτερη ένταση χρώσης τα μετασχηματισμένα αγγεία επιτρέποντας τον ποσοτικό διαχωρισμό τους από τα προϋπάρχοντα και συνεπώς διευκολύνουν την ακριβέστερη καταμέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας του νεοπλάσματος³¹⁶. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το αντίσωμα για την ενδογλίνη ή CD105, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα ιστών που υπόκεινται σε ενεργό αγγειογένεση, όπως οι νεοπλασματικοί ιστοί³¹⁷. Η ανωτερότητα του anti-CD105 αντισώματος συγκριτικά με τους πανενδοθηλιακούς δείκτες στον υπολογισμό της MVD έχει επιβεβαιωθεί σε μία σειρά μελετών στις οποίες φαίνεται ότι η CD105-MVD παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την πρόγνωση των ασθενών με διάφορες νεοπλασίες, ενώ η χρήση του anti-CD34 αντισώματος για την μέτρηση της MVD απέτυχε να δώσει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα^{316,318,319}.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η τεχνική καταμέτρησης των αγγείων από τον Weidner αρχίζει με την επιλογή των θερμών περιοχών με τη χρήση μικρής μεγέθυνσης στο οπτικό μικροσκόπιο (10-100X). Για τη μείωση του σφάλματος δειγματοληψίας συνιστάται να αποφεύγονται οι περιοχές της τομής με έντονη φλεγμονή. Επίσης, επειδή η καταμέτρηση σε πολλές θερμές περιοχές μειώνει τελικά το μέγεθος της MVD, προτείνεται η επιλογή 3-5 θερμών περιοχών. Σε κάθε περιοχή και υπό μεγάλη μεγέθυνση (200-400X) γίνεται η καταμέτρηση των αγγείων και η MVD εκφράζεται ως αριθμός αγγείων ανά οπτικό πεδίο. Το εμβαδό των οπτικών πεδίων που συνήθως χρησιμοποιούνται κυμαίνεται από 0,12-1,00 mm² και είναι απαραίτητο να αναφέρεται κάθε φορά ώστε να είναι τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών συγκρίσιμα. Κατά την καταμέτρηση προσμετρείται και ο αριθμός των

μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν το αντίσωμα, χωρίς να είναι απαραίτητη η αναγνώριση αυλού ή ενδοαυλικών ερυθρών αιμοσφαιρίων^{283,313}.

Εκτός από την παραπάνω καθιερωμένη μέθοδο καταμέτρησης της MVD, υπάρχει και η μέθοδος που προτάθηκε από τον Chalkley³²⁰. Η μέθοδος αυτή είναι πανομοιότυπη με αυτή του Weidner, με μοναδική διαφορά τη χρήση ειδικού βαθμονομημένου δικτυωτού πλέγματος στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου. Αυτό που καταμετρείται είναι ο αριθμός των σημείων του πλέγματος που διασταυρώνονται με ανοσοϊστοχημικά σεσημασμένα αγγεία. Με αυτήν την τεχνική δίνεται απάντηση στο δίλημμα που δημιουργείται από την κατά Weidner μέθοδο, για το αν δύο παρακείμενες και εφαπτόμενες δομές που βάζονται από το αντίσωμα θα καταμετρηθούν ως ένα ή δύο αγγεία^{313,320}. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι και οι δύο τεχνικές έχουν σημαντική διακύμανση αποτελεσμάτων μεταξύ των παρατηρητών ως προς την επιλογή των θερμών περιοχών, γεγονός που αυξάνει το συστηματικό τους σφάλμα^{314,321}.

Έχουν προταθεί και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης των αγγείων, όπως η σάρωση όλης της ιστολογικής τομής και η καταμέτρηση των αγγείων με την βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή (Computerised Image Analysis Systems, CIAS)^{322,323}. Οι μελέτες συγκριτικής αξιολόγησης των υπαρχόντων τεχνικών καταμέτρησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (Weidner, Chalkley, CIAS) είναι μέχρι τώρα ελάχιστες^{320,321}. Είναι σαφές πως περαιτέρω προοπτικές μελέτες απαιτούνται για τον καθορισμό και την πλήρη τυποποίηση μιας μεθόδου εκλογής, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφόρων ερευνητικών κέντρων καθώς και η οργάνωση πολυκεντρικών μελετών πάνω στην προγνωστική και προβλεπτική αξία της MVD στους συμπαγείς ανθρώπινους όγκους.

ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Γενικά-Ορισμοί

Το κυκλοφορικό σύστημα του ανθρώπου εκτός από το αγγειακό σύστημα για το οποίο έγινε λόγος προηγουμένως περιλαμβάνει και το λεμφικό σύστημα. Αποτελείται από λεμφικά τριχοειδή, μικρά τυφλά αγγεία, τα οποία παροχετεύουν την λέμφο από τον μεσοκυττάριο χώρο και την μεταφέρουν στα αθροιστικά λεμφαγγεία, από εκεί στους λεμφαδένες και μετά σε μεγαλύτερα λεμφικά στελέχη. Αυτά στη συνέχεια καταλήγουν στον μείζονα και στον ελάσσονα θωρακικό πόρο, οι οποίοι στη συνέχεια εκβάλλουν στην φλεβική κυκλοφορία³²⁴.

Το λεμφικό σύστημα συμβάλλει στην ομοιοστασία των υγρών του οργανισμού καθώς επιστρέφει τελικά στην κυκλοφορία το 10% του όγκου του διάμεσου υγρού που εξαγγειώνεται από τα αγγειακά τριχοειδή στους ιστούς. Επιπλέον διατηρεί σταθερή ωσμωτική πίεση στο διάμεσο χώρο μέσω της απομάκρυνσης βιολογικών μακρομορίων από την μεσοκυττάρια ουσία³²⁵. Μία ακόμη σημαντική λειτουργία είναι η απορρόφηση των λιπιδίων τα οποία και μεταφέρει μαζί με λιποδιαλυτές πρωτεΐνες από το έντερο στην κυκλοφορία. Τέλος έχει και ανοσολογικό ρόλο καθώς μεταφέρει αντιγόνα και ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στους επιχώριους λεμφαδένες. Πέρα από τις παραπάνω φυσιολογικές λειτουργίες τα λεμφαγγεία παίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως οι φλεγμονές, η ιστική επανόρθωση, το λεμφοίδημα και οι νεοπλασματικές μεταστάσεις^{326,327}.

Για τα περισσότερα κακοήθη νεοπλάσματα το λεμφικό σύστημα αποτελεί τη σημαντικότερη οδό για τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Άλλωστε οι λεμφαδενικές μεταστάσεις αποτελούν δείκτη επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων

και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση του ασθενούς^{324,328}. Η παραδοσιακή άποψη θέλει τα λεμφαγγεία να διαδραματίζουν έναν παθητικό ρόλο στην διαδικασία της καρκινικής διασποράς, καθώς υποστηρίζει ότι τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε αυτά όπως ακριβώς και η λέμφος³²⁹⁻³³². Η έρευνα στον τομέα αυτό περιοριζόταν από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν σαφείς και απόλυτοι μορφολογικοί χαρακτήρες που να διαχωρίζουν τα λεμφικά τριχοειδή και μικρά λεμφαγγεία από τα αντίστοιχα αρτηριακά και φλεβικά τριχοειδή και αγγεία στο απλό οπτικό μικροσκόπιο. Ακόμα και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ο διαχωρισμός τους απαιτεί μεγάλη εμπειρία³³³. Μεγάλη ώθηση στην μελέτη και κατανόηση της λειτουργίας του λεμφικού συστήματος έδωσε η ανακάλυψη πρωτεϊνών που εκφράζονται ειδικά στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας. Κάποιοι από αυτούς τους λεμφαγγειακούς δείκτες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της λεμφαγγειογένεσης, η οποία εκτός από τον φυσιολογικό της ρόλο φαίνεται να εμπλέκεται και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις με κυρίαρχη την λεμφαδενική μεταστατική διασπορά των νεοπλασμάτων^{334,335}.

Ο πρώτος δείκτης που ανακαλύφθηκε είναι ο VEGFR-3 (γνωστός και ως Flt-4) ένας fms-like υποδοχέας τυροσινικής κινάσης ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των VEGF υποδοχέων^{152,174}. Κύριοι προσδέτες του είναι ο VEGF-C και ο VEGF-D, οι οποίοι αποτελούν και τους βασικούς ρυθμιστές της λεμφαγγειογένεσης³³⁶. Ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και ωρίμανση του λεμφικού συστήματος καθώς εκφράζεται σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα του εμβρύου. Η αδρανοποίηση του άλλωστε αναστέλλει τον σχηματισμό του λεμφικού συστήματος στο έμβρυο. Στον ενήλικα εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων³³⁷⁻³³⁸. Η παρουσία του ωστόσο και σε φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως μακροφάγα, καθιστούν σαφές ότι η ειδικότητά του ως προς την ανίχνευση των λεμφαγγείων δεν είναι ιδανική³³⁹⁻³⁴⁰.

Ένας ακόμη λεμφαγγειακός δείκτης είναι ο LYVE-1. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί τον υποδοχέα της υαλουρονάνης (μιας γλυκοζαμινογλυκάνης του εξωκυττάρου χώρου), υπεύθυνος για την διακίνηση αυτού του μορίου μεταξύ της κυκλοφορίας και εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας³⁴¹. Ο υποδοχέας αυτός εμφανίζει 41% ομολογία με το CD44 και οι μελέτες έδειξαν ότι εκφράζεται από μία μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως φλεγμονώδη αλλά και αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, απέχει επομένως από το να χαρακτηριστεί ως ο τέλειος λεμφαγγειακός δείκτης³⁴²⁻³⁴⁴.

Ο Prox-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και διακλάδωση του εμβρυικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση. Η παρουσία του σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα απενεργοποιεί μεγάλο αριθμό γονιδίων που οδηγούν σε φαινότυπο αγγειακού ενδοθηλιακού κυττάρου, ενώ αντίθετα ενεργοποιεί γονίδια που ορίζουν φαινοτυπικά τα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Αν και θεωρείται παράγοντας που προάγει την λεμφαγγειακή διαφοροποίηση, δεν είναι γνωστό αν η έκφρασή του είναι συνεχής ή περιορίζεται σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των λεμφικών ενδοθηλιακών κυττάρων³⁴⁵⁻³⁴⁷.

Η ποδοπλανίνη είναι μια διαμεμβρανική βλεννώδης γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε μία ποικιλία κυττάρων όπως είναι τα ποδοκύτταρα του νεφρικού σπειράματος, τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας και τα πνευμονοκύτταρα τύπου I. Το αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης αυτής βάφει έντονα μικρά λεμφαγγεία που συνεκφράζουν VEGF-3 χωρίς να αντιδρά καθόλου με τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ευαισθησία και η ειδικότητά του για την ανίχνευση των λεμφαγγείων φαίνεται να είναι μεγάλη, όπως προκύπτει και από το γεγονός ότι στοχευμένη απαλοιφή της ποδοπλανίνης οδηγεί σε ελαττωματική ανάπτυξη των λεμφαγγείων κατά την εμβρυική ζωή χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξη των αγγείων³⁴⁸⁻³⁵⁰.

Τέλος υπάρχει και το D2-40, ένα IgG-2a μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αντιδρά με τα

λεμφαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα με μεγάλη ειδικότητα. Η πρωτεΐνη εναντίον της οποίας στρέφεται έχει μεγάλη ομοιότητα με την ποδοπλανίνη. Από τις λίγες έως τώρα μελέτες για την ευαισθησία του και την ειδικότητά του ως προς την ανίχνευση των λεμφαγγείων στους ενήλικες προκύπτουν αισιόδοξα αποτελέσματα³⁵¹.

Σε πολλές μελέτες γίνεται συνδυασμένη χρήση των ανωτέρω αναφερόμενων δεικτών, είτε μεταξύ τους είτε μαζί με έναν αγγειακό δείκτη (πχ CD34) ώστε να αυξηθεί η ακρίβειά τους^{352,353}. Εντούτοις η αναζήτηση του ιδανικότερου λεμφαγγειακού δείκτη ακόμα συνεχίζεται.

Παράγοντες λεμφαγγειογένεσης

Ο κύριος ρυθμιστής της λεμφαγγειογένεσης είναι ο VEGF-C και σε μικρότερο βαθμό ο VEGF-D. Πρόκειται για μέλη της VEGF οικογένειας πρωτεϊνών, τα οποία εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω της σύνδεσής τους με τον VEGFR-3 υποδοχέα. Η σημασία του VEGF-C για την ανάπτυξη και ωρίμανση του λεμφικού συστήματος είναι αδιαμφισβήτητη. Σε πειραματόζωα στα οποία λείπουν και τα δύο VEGF-C αλληλία (VEGF-C -/- ποντίκια) παρατηρείται τελικά ενδομήτριος θάνατος, ενώ όταν λείπει το ένα αλληλίο (VEGF-C +/- ποντίκια) το λεμφικό σύστημα είναι υποπλαστικό με εμφάνιση λεμφοιδήματος²³⁸.

Πολλές μελέτες στην διεθνή βιβλιογραφία επιβεβαιώνουν την παραγωγή του VEGF-C από τα καρκινικά κύτταρα σε μία ποικιλία νεοπλασμάτων όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του θυρεοειδούς, του προστάτη, του παγκρέατος, της κεφαλής και τραχήλου, του ΚΝΣ καθώς και σε αιματολογικές κακοήθειες, σαρκώματα και στο κακόηθες μελάνωμα³⁵⁴⁻³⁵⁸. Πέρα από τα καρκινικά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι παράγεται επιπλέον από τα περιαγγειακά στρωματικά κύτταρα και από τα μακροφάγα και αιμοπετάλια τα οποία προσελκύονται από το νεόπλασμα³⁵⁹.

Οι περισσότερες μελέτες συσχετίζουν την ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση του VEGF-C με την επαγωγή της λεμφαγγειογένεσης και την παρουσία μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες^{334,335}. Αντίστροφα, το μπλοκάρισμα του μονοπατιού VEGF-C/ VEGFR-3 με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του VEGFR-3 αναστέλλει την λεμφαγγειογένεση και την εμφάνιση των λεμφαδενικών μεταστάσεων³⁵⁹⁻³⁶⁰. Γενικά από την μέχρι σήμερα έρευνα επιβεβαιώνεται η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στα επίπεδα του VEGF-C εντός του όγκου ή/και στην περιφέρεια αυτού και στην κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων^{334,335,360}.

Η υποξία και το μοριακά μονοπάτια των p53 και ras δεν επάγουν την έκφραση του VEGF-C όπως συμβαίνει με τον VEGF-A. Αντίθετα η παραγωγή του επάγεται από αυξητικούς παράγοντες όπως ο EGF και ο PDGF και από προφλεγμονώδεις κυττοκίνες^{361,362}.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο VEGF-C συνδέεται και ενεργοποιεί ασθενώς τον VEGFR-2 (με μικρότερη ένταση συγκριτικά με τον VEGF-A) συμβάλλοντας από ότι φαίνεται και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειογένεσης³⁶³. Συνδέεται επίσης και ενεργοποιεί την α9β1 ιντεγκρίνη, η οποία εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των λεμφαγγείων και σχετίζεται με την ανάπτυξη και την λειτουργικότητα του λεμφαγγειακού δικτύου²³¹. Τέλος συνδέεται και με την neuropilin NP2 με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος του VEGF-C/ VEGFR-3 μονοπατιού^{241,364}.

Ο δεύτερος πιο γνωστός παράγοντας λεμφαγγειογένεσης είναι ο VEGF-D^{365,366}. Ο ρόλος του είναι παρόμοιος με αυτόν του VEGF-C. Παράγεται από τους ίδιους τύπους κυττάρων με τον VEGF-C και συνδέεται με τον VEGFR-3 υποδοχέα και σε μικρότερο βαθμό με την NP2^{364,366}. Σε αντίθεση με τα VEGF-C-/- πειραματόζωα, τα VEGF-D-/- έμβρυα είναι βιώσιμα και η ανάπτυξη του λεμφαγγειακού συστήματος επιτελείται κανονικά, παρέχοντας ένα φυσιολογικό λεμφικό σύστημα στα ενήλικα ζώα. Τα ευρήματα δείχνουν ότι μόνο ο VEGF-C είναι αναντικατάστατος για την φυσιολογική λεμφαγγειογένεση³⁶⁷. Η

παραγωγή του VEGF-D από τα καρκινικά κύτταρα αυξάνει σε μία ποικιλία κακοήθων νεοπλασμάτων^{368,369}, ενώ επιπλέον έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του στον ορθοκολικό καρκίνο^{370,371} καθώς και στον καρκίνο του πνεύμονα³⁷² και των ωοθηκών³⁷³ συνδέεται με την ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί πως η έρευνα της λεμφαγγειογένεσης στα νεοπλάσματα βρίσκεται ακόμη σε αρχικά στάδια, με τα αποτελέσματα των μελετών να είναι σε πολλές περιπτώσεις αντικρουόμενα. Βασικό ερώτημα της επιστημονικής κοινότητας είναι αν όντως η λεμφαγγειογένεση στα νεοπλάσματα είναι μια υπαρκτή και ενεργός διαδικασία που οδηγεί στην λεμφαδενική μετάσταση ή αν αυτή είναι απόρροια μιας παθητικής μεταφοράς νεοπλασματικών κυττάρων μέσω των ήδη υπαρχόντων λεμφαγγείων³⁷⁴. Αντικείμενο μελέτης αποτελεί κυρίως η λεμφαγγειακή πυκνότητα (lymph vessel density, LVD, η οποία μετράται όπως ακριβώς και η MVD) στο κέντρο του όγκου (ενδο-ογκικά λεμφαγγεία) και στην περιφέρεια (περι-ογκικά λεμφαγγεία) και η συσχέτισή τους με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων αλλά και την πρόγνωση της νόσου^{374,375}.

Συγκεκριμένα υποστηρίχθηκε από αρκετούς ερευνητές ότι τα λεμφαγγεία που είναι υπεύθυνα για την μεταστατική διασπορά είναι τα προϋπάρχοντα και εντοπίζονται στην περιφέρεια του όγκου, ενώ τα ενδο-ογκικά λεμφαγγεία είναι ή ανύπαρκτα ή μη λειτουργικά. Βέβαια, στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκε ως μοναδικός λεμφαγγειακός δείκτης ο LYVE-1³⁷⁵. Ακολούθησαν μελέτες με την χρήση δύο ανοσοϊστοχημικών δεικτών, οι οποίες διαπίστωσαν την παρουσία λεμφαγγείων σε φάση πολλαπλασιασμού εντός του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνου, ενώ υπάρχουν και έρευνες που κάνουν λόγο για αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα μόνο στην περιφέρεια του όγκου³⁷⁶⁻³⁸⁰.

Όσον αφορά τη συσχέτιση της λεμφαγγειακής πυκνότητας με την πρόγνωση της νόσου και

την επιβίωση των ασθενών πάλι παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των διαφόρων νεοπλασμάτων που εξετάστηκαν. Στο κακόηθες μελάνωμα για παράδειγμα, ενώ έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενεργού λεμφαγγειογένεσης τόσο ενδο-ογκικά όσο και περι-ογκικά, επικρατεί διχογνωμία για το ποια λεμφαγγειακή πυκνότητα από τις δύο είναι ο ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης³⁸¹⁻³⁸⁷. Καμία συσχέτιση ανάμεσα στην λεμφαγγειακή πυκνότητα εντός του όγκου και στην επιβίωση των ασθενών δεν παρατηρήθηκε στον καρκίνο του παγκρέατος και στο πορογενές καρκίνωμα του μαστού^{343,388,389}.

Οι λόγοι για τις παρατηρούμενες ασυμφωνίες είναι πολλοί. Πρώτον, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως δεν υπάρχει ο τέλειος λεμφαγγειακός δείκτης και η ακρίβεια των κάθε φορά χρησιμοποιούμενων δεικτών διαφέρει. Επιπλέον είναι πιθανόν, η αναγκαιότητα ή μη της λεμφαγγειογένεσης για την μεταστατική διασπορά του όγκου να εξαρτάται από την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας. Μπορεί δηλαδή σε κάποιες περιπτώσεις όγκων η λεμφαγγειογένεση να μην απαιτείται για την ανάπτυξη του νεοπλάσματος, ενώ αντίθετα σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι αναγκαία συνθήκη αλλά όχι επαρκής για την επίτευξη της μετάστασης³⁹⁰. Ρόλο ίσως να παίζει και ο μικρότερος αριθμός των λεμφαγγείων σε σχέση με αυτόν τον αγγείων, οπότε οι πιθανότητες να πετύχει κανείς την λεμφαγγειογένεση σε ενεργό φάση μειώνονται³⁹¹. Αν αναλογιστούμε ότι πρόκειται για μία δυναμική διαδικασία σε βάθος χρόνου, όπως και η αγγειογένεση, δεν είναι απαραίτητο η εξέταση ενός τμήματος του όγκου σε μία δεδομένη χρονική στιγμή να αποκαλύψει ενεργό διαδικασία¹⁶³⁻¹⁶⁴. Τέλος είναι πιθανόν να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες ρύθμισης της διαδικασίας πέραν του μοριακού μονοπατιού του VEGF-C, VEGF-D/VEGFR3.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στα βασικοκυτταρικά και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων καθώς και στις προκαρκινικές αλλοιώσεις αυτών, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των κύριων παραγόντων ελέγχου των παραπάνω διεργασιών και στη συσχέτιση της τυχόν προγνωστικής αξίας των αποτελεσμάτων με την κλινική έκβαση των ασθενών.

Αναλυτικότερα μελετήθηκαν:

1. Η έκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα των παραπάνω νεοπλασμάτων και η προγνωστική αξία της παραπάνω καταγραφής κυρίως σε σχέση με την κλινική πορεία της νόσου (επιθετικότητα νεοπλάσματος, υποτροπή, μεταστάσεις). Επιπλέον έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις κατηγορίες των υπό μελέτη αλλοιώσεων καθώς και σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά της σχετικής διεθνούς βιβλιογραφίας.
2. Η έκφραση των υποδοχέων VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3 στα καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την έκφραση του VEGF, με την μικροαγγειακή πυκνότητα, τα χαρακτηριστικά (μέση διάμετρος, εξέλκωση κτλ) των νεοπλασμάτων καθώς και με την κλινική έκβαση των ασθενών.
3. Η μικροαγγειακή πυκνότητα με την χρήση του αντισώματος CD105. Αξιολογήθηκε η σχέση της μικροαγγειακής πυκνότητας με την έκφραση του VEGF και των υπό μελέτη υποδοχέων του. Διερευνήθηκε επίσης η προγνωστική αξία του CD105 ως προς την κλινική

έκβαση των ασθενών και συσχετίστηκε με την αντίστοιχη προγνωστική αξία της αγγειογένεσης.

4. Η ενδο-ογκική (intratumoral) και η περι-ογκική (peritumoral) μικροαγγειακή πυκνότητα σε κάθε τύπο νεοπλάσματος, η σύγκριση των αποτελεσμάτων και ο ρόλος τους στο αγγειογενετικό προφίλ του κάθε νεοπλάσματος.

5. Η ύπαρξη ή όχι ενεργού λεμφαγγειογένεσης στα βασικοκυτταρικά και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων με τη βοήθεια του λεμφαγγειακού δείκτη VEGFR-3 (Flt-4). Μελετήθηκε επίσης η εντόπισή της (εντός/πéριξ του όγκου) καθώς και αν τα νεόπλαστα λεμφαγγεία αποτελούν στόχους νεοπλασματικής προσβολής. Επιπλέον διερευνήθηκε η συσχέτιση της λεμφαγγειακής πυκνότητας με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και ο ρόλος της ως προγνωστικός δείκτης για την έκβαση των ασθενών.

6. Μελετήθηκε και καταγράφηκε η σύγκριση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων μεταξύ καρκινικών όγκων και προκαρκινικών αλλοιώσεων, καθώς και μεταξύ της υποομάδας των ΒΚΚ με μια υποομάδα ΒΚΚ με πολλαπλή εμφάνιση των αλλοιώσεων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν αναδρομικός και αφορούσε την περίοδο 2000-2006. Στην παρούσα μελέτη αναζητήθηκαν μονιμοποιημένα δείγματα BCC, SCC και προκαρκινικών αλλοιώσεων από το αρχείο δειγμάτων του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Π.Γ.Ν.Ι. Η εξαίρεση των αλλοιώσεων πραγματοποιήθηκε με απλή χειρουργική αφαίρεση του όγκου και ενός δακτυλίου υγιούς ιστού 3-4 mm. Τα εν λόγω δείγματα είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Μετά από προσεκτική μελέτη των δειγμάτων σε τομές αιματοξυλίνης- ηωσίνης, επιλέχθηκε ο ένας και καταλληλότερος κύβος παραφίνης από τους διαθέσιμους. Κριτήρια επιλογής αποτέλεσαν η ύπαρξη αντιπροσωπευτικού τμήματος του όγκου και του πέριξ υγιούς ιστού και η όσο το δυνατόν απουσία περιοχών με έντονη φλεγμονή και νέκρωση. Επιπλέον αξιολογήθηκε η ιστολογική διαφοροποίηση των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων. Από τον κάθε κύβο παραφίνης κόπηκαν σε μικροτόμο συνεχείς τομές πάχους 2 μm και τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια (superfrost) για τη διενέργεια της ανοσοϊστοχημείας.

Η σειρά των τομών καταγράφηκε ώστε να είναι συνεχείς. Στη μελέτη καταγράφηκε το φύλο και η ηλικία των ασθενών, η διάγνωση και εντόπιση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα οι εν λόγω αλλοιώσεις βρέθηκαν να προσβάλλουν τον έσω και έξω κανθό, το άνω και κάτω βλέφαρο. Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ορισμένα περιγραφικά χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων αυτών όπως η μέση διάμετρος, η ύπαρξη η όχι εξέλκωσης, φλεγμονής και λεμφοκυτταρικής διήθησης. Τέλος αξιολογήθηκαν οι χρώσεις για την μικροαγγειακή πυκνότητα και οι αντίστοιχες για τους παράγοντες VEGF, FLT-1, FLK-1, FLT-4. Οι πληροφορίες καταχωρήθηκαν σε αρχείο επεξεργασίας δεδομένων με αποκλειστικά

αριθμητική κωδικοποίηση, ώστε να μην είναι δυνατή η αποκάλυψη της ταυτότητας των ασθενών.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα της BenchMark XT IHC/ISH Staining Module (Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA) ακολουθώντας την διαδικασία διαδοχικών και αυτοματοποιημένων βημάτων XT iVIEW DAB V.1. Για κάθε αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο και στανταρισμένο πρωτόκολλο που αποτελείται από 100 περίπου αυτόματα βήματα, με μοναδικό χειροκίνητο βήμα την προσθήκη του αντισώματος. Τα αντισώματα και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2. Εκεί αναγράφεται επίσης η προέλευση του καθενός από τα αντισώματα, η αραίωση στην οποία χρησιμοποιήθηκε και ο χρόνος επώασης.

Περίληπτικά η αυτοματοποιημένη διαδικασία ξεκινά με την αποπαραφίνωση των τομών και την εμβύθισή τους σε διαδοχικά ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικούς κύκλους επώασης κάθε φορά. Ακολουθεί η τιτλοποίηση και η προσθήκη του πρωτοταγούς αντισώματος στην κατάλληλη αραίωση καθώς και η επώασή του για τον απαιτούμενο χρόνο. Ακολουθεί μια σειρά από πλύσεις και η ενίσχυση του αντισώματος. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την αντίθετη χρώση με αιματοξυλίνη 10% για 4 λεπτά, εφαρμογή του μπλε χρωμογόνου αντιδραστηρίου για άλλα 4 λεπτά και τέλος την κάλυψη της τομής με καλυπτρίδα³⁹².

Αντίσωμα	Προέλευση	Πρωτόκολλο XT iVIEWDABV.1	Αραίωση	Επώαση
VEGF	Neomarkers, Fremont, California,USA	#171	1:50	32min
Flt1(VEGFR1)	DBS, California,USA	#182	1:30	32min
Flk1(VEGFR2)	DBS, California,USA	#181	1:30	32min
Flt4(VEGFR3)	DBS, California,USA	#183	1:30	32min
CD105	DAKO, Denmark	#31	1:20	32min

Πίνακας 2: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ VEGF, VEGFR1(Flt-1), VEGFR2(Flk-1), VEGFR3(Flt-4) και CD105

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του VEGF, των υποδοχέων του και του CD105 έγινε από δύο ανεξάρτητους και έμπειρους παρατηρητές οι οποίοι δεν γνώριζαν εκ των προτέρων τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών. Η παρατήρηση των τομών έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο συμπαρατήρησης τύπου Olympus BX-52.

Η πρώτη αξιολόγηση αφορούσε στην έκφραση του VEGF και των τριών υποδοχέων του (Flt-1, Flk-1, Flt-4). Συγκεκριμένα σε κάθε τομή αξιολογήθηκε η θετική κυτταροπλασματική χρώση σε 1000 καταμετρημένα νεοπλασματικά κύτταρα και ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση ενός δείκτη χρώσης (staining index), όπως έχει ήδη

περιγραφεί στη βιβλιογραφία^{393,394}. Ο δείκτης αυτός προκύπτει από το γινόμενο της έντασης χρώσης (0= απουσία χρώσης, 1= ήπια χρώση, 2= μέτρια χρώση, 3= έντονη χρώση) και ενός αριθμού που καθορίζεται σύμφωνα με το ποσοστό των θετικών για τη χρώση νεοπλασματικών κυττάρων ($\leq 10\%=1$, $10-50\%=2$, $>50\%=3$). Όπως φαίνεται, ο δείκτης χρώσης κυμαίνεται από το 0 έως το 9, με τα δείγματα με δείκτη ≥ 4 να χαρακτηρίζονται ως υψηλής έκφρασης και <4 χαμηλής. Φλεγμονώδη κύτταρα με θετική χρώση εξαιρέθηκαν από την καταμέτρηση ενώ από την αξιολόγηση εξαιρέθηκαν και οι περιοχές νέκρωσης.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός δείκτης CD105 χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας σε συνεχόμενες ιστολογικές τομές. Χρησιμοποιήθηκε η κατά Weidner μέθοδος. Συγκεκριμένα σε κάθε τομή αναγνωρίστηκαν με τη χρήση μικρής μεγέθυνσης (X40) οι τρεις περιοχές με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αγγείων («hot spots»). Όπου αυτό δεν κατέστη δυνατό μελετήθηκαν δυο περιοχές hot spot. Ακολούθησε η καταμέτρηση των αγγείων ανά περιοχή με μεγάλη μεγέθυνση (X200) και ο αριθμός τους διαιρέθηκε διά του 3 η του 2 αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα που προέκυψε αντιστοιχούσε στην μικροαγγειακή πυκνότητα ανά οπτικό πεδίο (με το εμβαδόν του οπτικού πεδίου να ισούται με 0.7386 mm^2). Για την καταμέτρηση των αγγείων αρκούσε μόνο η ανοσοϊστοχημική έκφραση του ενδοθηλιακού δείκτη, χωρίς να είναι απαραίτητη η αναγνώριση αγγειακού αυλού. Η μέση τιμή (mean) της μικροαγγειακής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε ως κατώφλι (cut-off) για τον διαχωρισμό των όγκων με υψηλή ($\geq \text{mean}$) και χαμηλή ($< \text{mean}$) μικροαγγειακή πυκνότητα όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην βιβλιογραφία^{316-318,376}.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης οργανώθηκαν σ' ένα σύνολο από μεταβλητές που αφορούσαν τον ασθενή, την κλινική εικόνα της νόσου, καθώς και τους μοριακούς παράγοντες που σχετίζονται με την νεοπλασματική αγγειογένεση. Τα ονόματα των μεταβλητών ενίοτε αποδίδονταν στην ελληνική, τις περισσότερες φορές όμως προτιμήθηκαν οι συντμήσεις που παραπέμπουν στην αγγλική ορολογία (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική επεξεργασία.

Πλήρης περιγραφή της μεταβλητής	Αγγλική απόδοση	Χαρακτηρίρας	Κατηγοριοποίηση ή μονάδα μέτρησης	Όνομα ή σύντμηση που χρησιμοποιήθηκε στο κείμενο
Φύλο του ασθενή	Sex of patient	Ποιοτική	1 – άνδρας, 2 - γυναίκα	Φύλο
Ηλικία του ασθενή	Age of patient	Ποσοτική	έτη	Ηλικία
Τύπος καρκίνου	Cancer type	Ποιοτική	1 – BCC, 2 – BSC, 3 – SCC, 4 – PL*	Τύπος καρκίνου
Εντόπιση του καρκινώματος	Tumor localization	Ποιοτική	1 – κάτω βλέφαρο, 2 – έσω κανθός, 3 – άνω βλέφαρο, 4 – έξω κανθός	Εντόπιση
Μέγιστη διάμετρος όγκου	Maximum diameter of tumor	Ποσοτική	χιλιοστά	MD
Μέση ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα	Mean intratumoral microvascular density	Ποσοτική	Μέσος αριθμός των CD105-θετικών κυττάρων εντός του όγκου ανά οπτικό πεδίο μικροσκοπίου	ITMVD
Μέση περιογκική μικροαγγειακή πυκνότητα	Mean peritumoral microvascular density	Ποσοτική	Μέσος αριθμός των CD105-θετικών κυττάρων στην περιφέρεια του όγκου ανά οπτικό πεδίο μικροσκοπίου	PTMVD
Εξέλκωση	Ulceration	Ποιοτική	0 – απουσία, 1 – παρουσία	Εξέλκωση
Φλεγμονή	Inflammation	Ποιοτική	0 – απουσία, 1 – παρουσία	Φλεγμονή
Έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα	Expression of vascular endothelial growth factor	Διατεταγμένη	0 – απουσία, 1 – ασθενής έκφραση, 2 – ισχυρή έκφραση	VEGF
Έκφραση του υποδοχέα VEGFR-1	VEGFR-1 expression	Διατεταγμένη	0 – απουσία, 1 – ασθενής έκφραση, 2 – ισχυρή έκφραση	FLT-1
Έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2	VEGFR-2 expression	Διατεταγμένη	0 – απουσία, 1 – ασθενής έκφραση, 2 – ισχυρή έκφραση	FLK-1

Έκφραση του υποδοχέα VEGFR-3	VEGFR-3 expression	Διατεταγ- μένη	0 – απουσία, 1 – ασθενής έκφραση, 2 – ισχυρή έκφραση	FLT-4
------------------------------	--------------------	-------------------	--	-------

* BCC – basal cell carcinoma (βασικοκυτταρικό καρκίνωμα), BSC – basosquamous carcinoma (βασικοπλακώδες καρκίνωμα), SCC – squamous cell carcinoma (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα), PL – precancerous lesions (προκαρκινικές αλλοιώσεις).

Πριν αναλυθούν οι επί μέρους σχέσεις των μεταβλητών, κρίθηκε σκόπιμο να προηγηθεί μια γενική εξερευνητική (explorative) ανάλυση προκειμένου να αναδειχθεί η συνολική δομή των σχέσεων των δεδομένων. Η συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό είναι η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (principal component analysis), αυτή όμως είναι εφαρμόσιμη μόνο στην περίπτωση ποσοτικών μεταβλητών που κατανέμονται ομαλά. Καθώς η παρούσα μελέτη περιλάμβανε μεταβλητές διαφορετικού χαρακτήρα, επελέγη η μέθοδος των κατηγοριακών κύριων συνιστωσών (categorical principal component analysis), η οποία προβαίνει με τον τρόπο παρόμοιο με αυτόν των κλασικών κύριων συνιστωσών, αλλά μπορεί να συμπεριλαμβάνει και ποιοτικές και διατεταγμένες μεταβλητές και επιπλέον, είναι ελεύθερη προϋποθέσεων περί κατανομής³⁹⁵. Προτιμήθηκε η λύση (συμπύκνωση των αρχικών μεταβλητών) σε δύο διαστάσεις (κατηγοριακές κύριες συνιστώσες).

Στις επί μέρους αναλύσεις, για έναν απλό έλεγχο συνάφειας δύο ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ-τετράγωνο (Pearson chi-square test) ή ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher exact test) σε περίπτωση πινάκων συνάφειας 2x2. Για έναν απλό έλεγχο αναλογιών (π.χ. αναλογία φύλου σε έναν τύπο καρκίνου) χρησιμοποιήθηκε ο διωνυμικός έλεγχος. Για μη παραμετρική ποσοτική σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων (π.χ. σύγκριση ηλικίας ανάμεσα στους άνδρες και γυναίκες) εφαρμόστηκε ο έλεγχος Mann-Whitney.

Σε περίπτωση που εξετάζοταν η σχέση εξαρτημένων ποσοτικών μεταβλητών με ένα σύνολο από ποιοτικές και ποσοτικές μεταβλητές, εφαρμόστηκε η ανάλυση της

συνδιακύμανσης (ANCOVA). Αν χρειαζόταν απλά να αναδειχθούν οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών, υπολογιζόταν ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης (Spearman Rho).

Οι σχέσεις των ποσοτικών μεταβλητών, όπως MD, ITMVD και PTMVD με τα επίπεδα έκφρασης του VEGF και των υποδοχέων του αναλύθηκαν με τη μη παραμετρική μέθοδο Kruskal-Wallis, λαμβάνοντας τα τελευταία ως επίπεδα του ανεξάρτητου παράγοντα. Η μέθοδος αυτή προτιμήθηκε από την παραμετρική ανάλυση της διακύμανσης δεδομένου ότι οι εξαρτημένες μεταβλητές συχνά δεν παρουσίαζαν κανονική κατανομή.

Στις περισσότερες περιπτώσεις που υποβάλλονταν σε έλεγχο οι σχέσεις μιας ποιοτικής ή διατεταγμένης μεταβλητής με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές (ποιοτικές, διατεταγμένες ή ποσοτικές), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος λογιστικής παλινδρόμησης (logistic regression), διωνυμικής αν η εξαρτημένη μεταβλητή είχε μόνο δύο κατηγορίες και πολυωνυμικής στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Η λογιστική παλινδρόμηση εξετάζει την πιθανότητα εμφάνισης μιας κατηγορίας της εξαρτημένης μεταβλητής ως συγκεκριμένη μαθηματική συνάρτηση ενός συνόλου ανεξάρτητων παραγόντων (ποιοτικών ή ποσοτικών)³⁹⁶. Καθώς μόνον οι ανεξάρτητες μεταβλητές με σημαντική επίδραση έπρεπε να συμπεριληφθούν στο τελικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι με κατά βήμα πρόσθεση ή αφαίρεση των μεταβλητών (stepwise forward inclusion or backward elimination methods).

Ως αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάστηκαν η ολική στατιστική σημαντικότητα του μοντέλου (overall significance or p value), ο έλεγχος της προσαρμογής (goodness of fit test), το μέτρο της προσαρμογής (Nagelkerke R^2) και ο εκθέτης b (exponent b), ο οποίος αναπαριστά τη μεταβολή του λόγου στοιχημάτων (odds ratio) με τη μεταβολή της ανεξάρτητης μεταβλητής ανά μία μονάδα μέτρησης. Στη συνέχεια, για παραστατικούς σκοπούς, η σχέση της καθεμιάς ανεξάρτητης μεταβλητής με την εξαρτημένη παρουσιάστηκε με τη μορφή του πίνακα συνάφειας ο οποίος περιείχε, μαζί με

τις παρατηρούμενες συχνότητες, τα προσαρμοσμένα τυποποιημένα υπόλοιπα (ένα τυποποιημένο μέτρο απόκλισης από την αναμενόμενη υπό όρους της μηδενικής υπόθεσης συχνότητα).

Όλες οι αναλύσεις έγιναν με την χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 19.0 (Chicago Inc. IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στο σύνολό τους 137 ασθενείς με ιστολογικά παρασκευάσματα που ανήκαν σε τέσσερις τύπους δερματικών νεοπλασμάτων (Πίνακας 4): βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (basal cell carcinoma, BCC), μετατυπικό καρκίνωμα (ή βασικοπλακώδες καρκίνωμα, basosquamous carcinoma, BSC), ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma, SCC), καθώς και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις (precancerous lesions (PL): ακτινική κεράτωση, solar keratosis και η νόσος του Bowen, Bowen's disease).

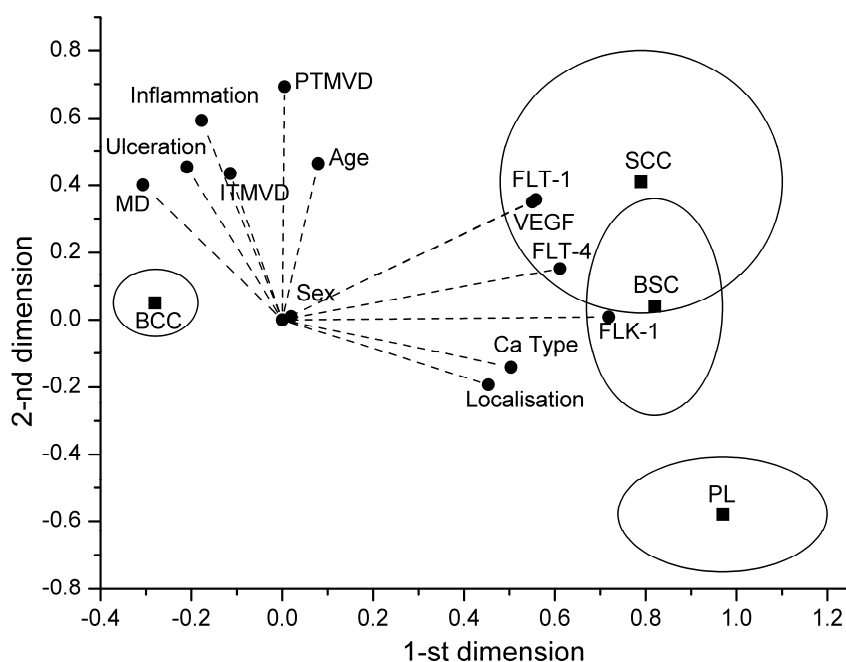
Πίνακας 4. Συχνότητα προσβολής των δύο φύλων από διαφόρους τύπους δερματικών νεοπλασμάτων.

		Τύπος πάθησης				Σύνολο
		BCC	BSC	SCC	PL	
Φύλο	Άνδρες	43	0	8	7	58
	Γυναίκες	60	6	10	3	79
Σύνολο		103	6	18	10	137

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 42 μέχρι 88 έτη (μέσος όρος 70.0, τυπική απόκλιση 9.2) παρουσιάζοντας μια σημαντική αριστερόπλευρη ασυμμετρία (έλεγχος Kolmogorov-Smirnov $p < 0.001$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των καρκινωμάτων στα δύο φύλα, με εξαίρεση το BSC, το οποίο στη μελέτη μας συναντήθηκε αποκλειστικά σε γυναίκες ασθενείς ($p = 0.031$; διωνυμικός έλεγχος). Επιπλέον, η αναλογία φύλου στο σύνολο των ασθενών δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική εξάρτηση από την ηλικία (διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση, $p = 0.34$).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των κατηγοριακών κύριων συνιστωσών έδειξαν ότι, στο σύνολο, υπήρχε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων της μελέτης (συντελεστής εσωτερικής συνέπειας, Cronbach's Alpha 0.818), παρόλο που η συνδιακύμανση των μεταβλητών αφορούσε σε ένα μικρό μέρος μόνον της συνολικής διακύμανσης (~3%).

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 10, όπου παρουσιάζονται οι βαρύτητες (συντελεστές) των μεταβλητών στο σχηματισμό των κύριων συνιστωσών, καθώς και το μέσο σκορ για τους διάφορους τύπους καρκίνου, η πρώτη διάσταση (κύρια συνιστώσα) διαχωρίζει κυρίως το BCC από τις υπόλοιπες παθήσεις και συσχετίζεται με την έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του, καθώς και με την εντόπιση του καρκινώματος. Η δεύτερη διάσταση (κύρια συνιστώσα) συσχετίζεται περισσότερο με την παρουσία μικροαγγείων στον όγκο και στην περιφέρειά του (ITMVD και PTMVD), με την μέγιστη διάμετρο του όγκου, με την παρουσία εξέλκωσης και φλεγμονής, καθώς και με την ηλικία των ασθενών. Η συνιστώσα αυτή έχει μια ορισμένη ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ των νεοπλασμάτων εκτός του BCC, κυρίως των προκαρκινικών αλλοιώσεων από τις λοιπές μορφές καρκίνου. Τέλος, η μεταβλητή που εμφάνισε τις πλέον ασθενείς συσχετίσεις με τις υπόλοιπες μεταβλητές είναι το φύλο των ασθενών.



Εικόνα 10. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των κατηγοριακών κύριων συνιστωσών.

Στις συντεταγμένες αναφέρονται οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από τις αρχικές μεταβλητές (1-st & 2-nd dimensions).

Οι γραμμές αναπαριστούν τους συντελεστές (loadings) επί των αρχικών μεταβλητών στις εξισώσεις των κύριων συνιστωσών.

Οι κύκλοι αναπαριστούν τα περιγραφικά στατιστικά των υποομάδων με διαφόρους τύπους των δερματικών νεοπλασμάτων. Το κέντρο – μέσος όρος των σκορ των ασθενών, η ακτίνα της έλλειψης – τυπικό σφάλμα του μέσου.

ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (BCC)

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 103 άτομα, εκ των οποίων 43 άνδρες (41.7%) και 60 γυναίκες (58.3%). 9 άτομα (8.7%) είχαν πολλαπλή εμφάνιση του καρκινώματος. Η αναλογία φύλων δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική από την 1:1 (διωνυμικός έλεγχος, $p = 0.12$). Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 42 μέχρι 88 χρονών (μέσος όρος 69.7, διάμεσος 70.0, τυπική απόκλιση 9.5) χωρίς να παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα (Mann-Whitney, $p = 0.15$). Οι όγκοι εντοπίζονταν ως επί το πλείστον στο κάτω

βλέφαρο (71 ή 62.8%), ακολουθούμενο από τον έσω κανθό (23 ή 20.4%), το άνω βλέφαρο (15 ή 13.3%) και τον έξω κανθό (4 ή 3.5%), ποσοστά τα οποία συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία. Τα περιγραφικά στατιστικά για τα MD, ITMVD και PTMVD παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Περιγραφικά στατιστικά για τη μέγιστη διάμετρο όγκου, τη μέση ενδοογκική και τη μέση περιογκική μικροαγγειακή πυκνότητα.

	Μέσος όρος	Διάμεσος	Τυπική απόκλιση	Εύρος	Ομαλότητα κατανομής (Kolmogorov-Smirnov)
MD	0.70	0.60	0.43	0.2 – 2.3	$p < 0.001$
ITMVD	24.46	23.00	13.14	0 – 63	$p = 0.095$
PTMVD	29.37	26.00	14.89	0 – 74	$p = 0.001$

Οι κατανομές των MD και PTMVD απέκλιναν σημαντικά από την κανονική, δείχνοντας μια δεξιόπλευρη ασυμμετρία (έλεγχος Kolmogorov-Smirnov). Σημειωτέον επίσης, ότι και οι τρεις εν λόγω μεταβλητές παρουσίαζαν μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ τους (Πίνακας 6), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί αγγειογένεσης τίθενται σε λειτουργία και ενισχύονται καθώς ο όγκος αυξάνει.

Πίνακας 6. Συντελεστές μη παραμετρικής συσχέτισης μεταξύ της μέγιστης διαμέτρου του όγκου, της μέσης περιογκικής και της μέσης ενδοογκικής πυκνότητας.

	MD	ITMVD	PTMVD
MD	1.000	0.214 $p < 0.05$	0.207 $p < 0.05$
ITMVD	0.214 $p < 0.05$	1.000	0.559 $p < 0.01$
PTMVD	0.207 $p < 0.05$	0.559 $p < 0.01$	1.000

Ιδιαίτερα ισχυρή σχέση (~0.6) έδειξαν οι τιμές των ITMVD και PTMVD, αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι η αγγειογένεση εντός του όγκου και στην περιφέρειά του διέπεται πιθανώς από κοινούς μηχανισμούς. Οι παρατηρούμενες συχνότητες των επιπέδων έκφρασης του

CD105 αναφέρονται στον Πίνακα 7. Από τα 113 ΒΚΚ, τα 57 εμφάνισαν ασθενή έκφραση και τα 54 ισχυρή, στην περιφέρεια του όγκου, ενώ ενδο-ογκικά οι εμφανίσεις ήταν αντίστοιχα 53 και 58. Δυο καρκινώματα εμφάνισαν μηδενική χρώση.

Πίνακας 7. Παρατηρούμενες συχνότητες των επιπέδων έκφρασης CD105 σε ασθενείς με ΒCC*.

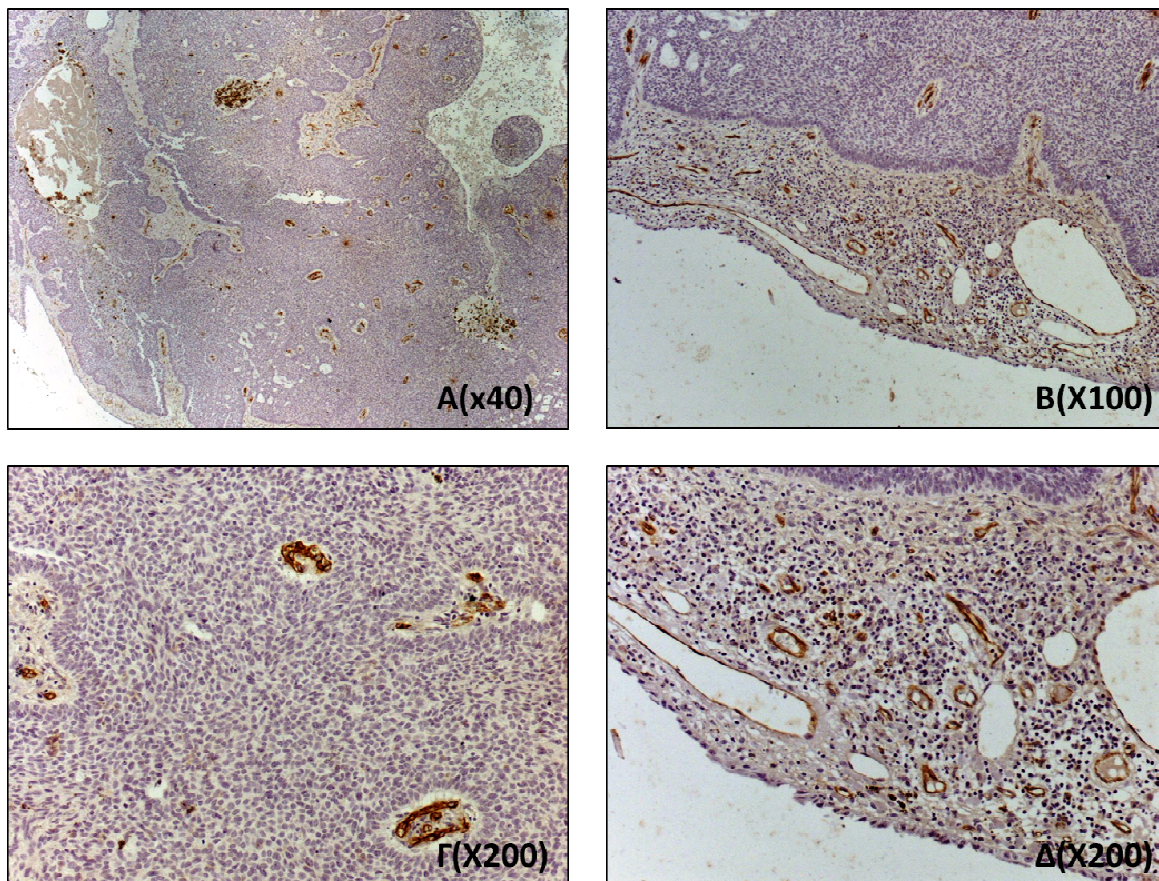
			PTMVD		Σύνολο
			Ασθενής έκφραση	Ισχυρή έκφραση	
ITMVD	Ασθενής έκφραση	Συχνότητα Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	36 3.3	17 - 3.3	53
	Ισχυρή έκφραση	Συχνότητα Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	21 - 3.3	37 3.3	
Σύνολο			57	54	111

* Ακριβής έλεγχος Fisher: $p = 0.001$

Ανάμεσα στους 113 όγκους συνολικά, οι 42 (46.0%) εμφάνισαν μια εικόνα φλεγμονής, ενώ 71 εξ αυτών (62.8%) εξέλκωση (Πίνακας 8). Οι δύο μεταβλητές παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντική συνάφεια (Fisher's exact test, $p < 0.001$).

Πίνακας 8. Παρατηρούμενες συχνότητες εξέλκωσης και φλεγμονής σε βασικοκυτταρικό καρκίνο του βλεφάρου.

			ΦΛΕΓΜΟΝΗ		Σύνολο
			ΑΠΟΥΣΙΑ	ΠΑΡΟΥΣΙΑ	
ΕΞΕΛΚΩΣΗ	ΑΠΟΥΣΙΑ	Συχνότητα Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	30 4.2	12 - 4.2	42
	ΠΑΡΟΥΣΙΑ	Συχνότητα Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	22 - 4.2	49 4.2	
Σύνολο			52	61	113



Εικόνα 11. Ανάδειξη των νεόπλαστων αγγείων εντός και εκτός του όγκου με τη βοήθεια του CD-105, σε βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Α, Β). Με μεγαλύτερη μεγέθυνση διακρίνονται σαφώς τα ενδο-ογκικά (Γ) όσο και τα περι-ογκικά (Δ) νεοαγγεία, η ανάπτυξη των οποίων φτάνει έως το χειρουργικό όριο εκτομής της αλλοίωσης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης των παραγόντων αγγειογένεσης (VEGF και των υποδοχέων του) στους ασθενείς με BCC. Η έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του κατηγοριοποιήθηκε σε τρισκελή κλίμακα (απουσία έκφρασης, ασθενής και υψηλή έκφραση) και οι παρατηρούμενες συχνότητες αναφέρονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Επίπεδα έκφρασης του VEGF και των υποδοχέων του όπως εκτιμήθηκαν από τα αντίστοιχα πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημικής χρώσης.

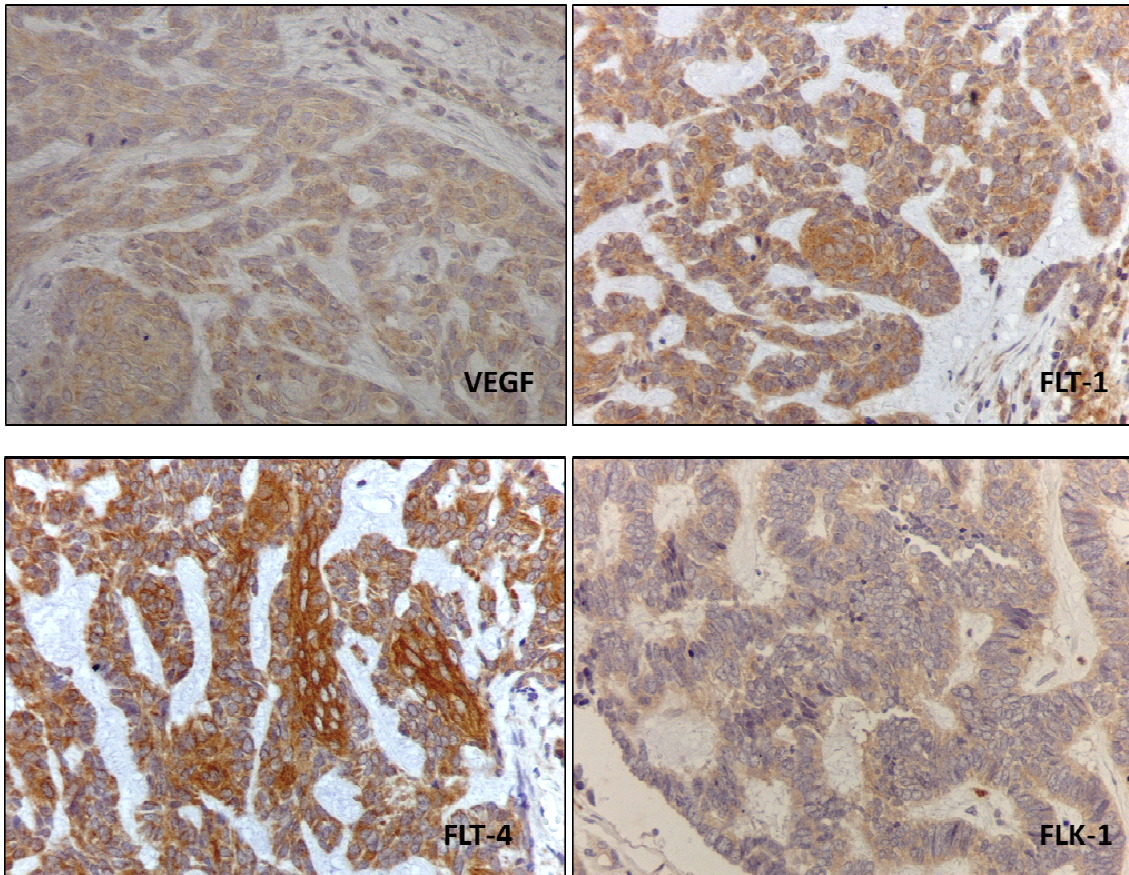
Μοριακός παράγοντας	Επίπεδο έκφρασης		
	Απουσία	Ασθενής	Υψηλή
VEGF	17	33	63
FLT-1	6	43	64
FLK-1	50	47	16
FLT-4	0	40	73

Τα επίπεδα έκφρασης και των τεσσάρων μοριακών παραγόντων είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 10, ο οποίος περιέχει τους μη παραμετρικούς συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των εν λόγω μεταβλητών.

Πίνακας 10. Συντελεστής μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman Rho) μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του VEGF και των υποδοχέων του*.

	FLT-1	FLT-4	FLK-1	VEGF
FLT-1	1.000	0.261	0.269	0.269
FLT-4	0.261	1.000	0.340	0.257
FLK-1	0.269	0.340	1.000	0.268
VEGF	0.269	0.257	0.268	1.000

* Όλες οι συσχετίσεις είναι σημαντικές στο επίπεδο $\alpha = 1\%$



Εικόνα 12. Η έκφραση του VEGF και όλων των υποδοχέων του στο ίδιο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα. Παρατηρείται ασθενής έως έντονη κυτταροπλασματική χρώση στο σύνολο των νεοπλασματικών κυττάρων.

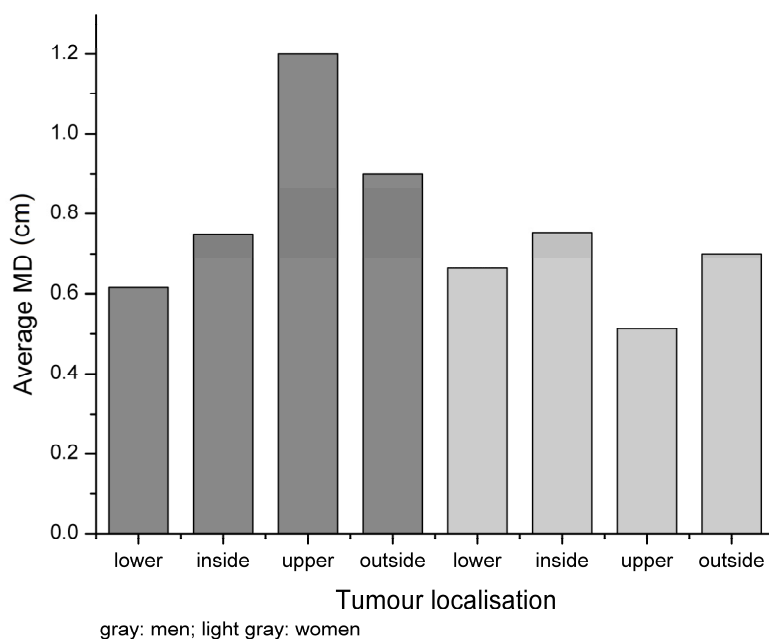
Η εντόπιση του BCC δεν παρουσίασε σημαντική εξάρτηση από το φύλο ($p = 0.45$) και την ηλικία ($p = 0.74$) των ασθενών (πολυωνυμική λογιστική παλινδρόμηση). Η τυχόν εξάρτηση των σχετιζόμενων με τον όγκο ποσοτικών μεταβλητών (MD, PTMVD και ITMVD) από το φύλο, την ηλικία και την εντόπιση του νεοπλασματος μελετήθηκε με την ανάλυση της συνδιακύμανσης (ANCOVA, Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Στατιστική σημαντικότητα (p , τιμές πιθανότητας σφάλματος τύπου 2) των σχέσεων των MD, ITMVD και PTMVD με το φύλο και την ηλικία των ασθενών, καθώς και με την εντόπιση του καρκινώματος (ANCOVA).

		Συνδυασμός παραγόντων					
		Εντόπιση	Φύλο	Ηλικία	Εντόπιση*Φύλο	Εντόπιση*Ηλικία	Φύλο*Ηλικία
Εξαρτημένες μεταβλητές	MD	0.09	0.36	0.23	0.005**	0.08	0.93
	ITMVD	0.82	0.35	0.94	0.55	0.75	0.38
	PTMVD	0.24	0.40	0.85	0.52	0.26	0.46

** Σημαντικό στο επίπεδο $\alpha = 1\%$

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, οι περισσότερες επιδράσεις των παραγόντων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, με τη μόνη εξαίρεση την MD σε σχέση με το συνδυασμό παραγόντων "εντόπιση" και "φύλο". Συγκεκριμένα, το BCC του άνω βλεφάρου εμφάνισε τη μεγαλύτερη μέση τιμή της διαμέτρου στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες τα καρκινώματα με αυτή την εντόπιση είχαν τη μικρότερη διάμετρο (Εικόνα 13). Το παραπάνω αποτέλεσμα δεν φαίνεται να έχει κάποια κλινική βαρύτητα και ίσως να οφείλεται σε τυχαία σύμπτωση (false discovery).



Εικόνα 13. Μέσες τιμές της μέγιστης διαμέτρου του όγκου για διάφορα σημεία εντόπισης για τα δύο φύλα.

Η πιθανότητα εξέλκωσης και ενδοογκικής φλεγμονής ως συνάρτηση φύλου, ηλικίας, της διαμέτρου του όγκου, καθώς και των δεικτών αγγειακής πυκνότητας, μελετήθηκε με τη μέθοδο διωνυμικής παλινδρόμησης (forward inclusion based on likelihood ratio). Η εξέλκωση παρουσίασε μια ασθενή (Nagelkerke $R^2 = 0.051$) αλλά σημαντική ($p < 0.05$) θετική σχέση με την ηλικία των ασθενών ($\text{Exp}(b) = 1.044 \{1.001; 1.090\}$). Η δε εμφάνιση φλεγμονής συσχετιζόταν σημαντικά (Nagelkerke $R^2 = 0.191$) με την ηλικία ($\text{Exp}(b) = 1.079 \{1.028; 1.133\}$; $p < 0.01$) και με την MD ($\text{Exp}(b) = 3.840 \{1.298; 11.363\}$, $p < 0.05$). Αντίθετα, το φύλο, καθώς και οι δείκτες της μικροαγγειακής πυκνότητας (ITMVD και PTMVD) δεν είχαν στατιστικά σημαντική σχέση με την εξέλκωση ή τη φλεγμονή στους όγκους (Πίνακες 12 και 13).

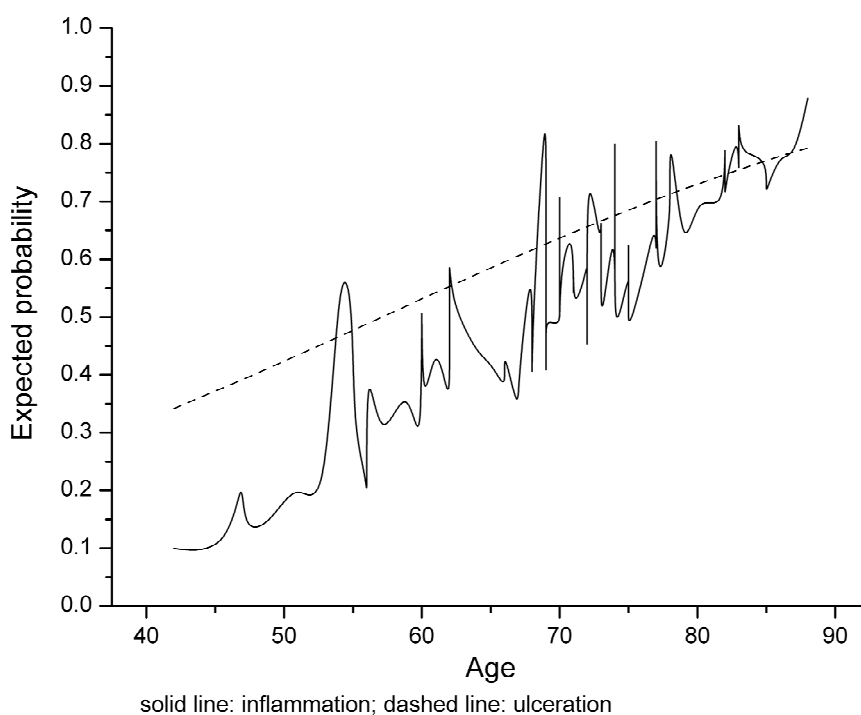
Πίνακας 12. Απουσία σημαντικών σχέσεων της εξέλκωσης με το φύλο, την ITMVD και την PTMVD στους ασθενείς με BCC.

Εξέλκωση		Φύλο		ITMVD		PTMVD	
		Άνδρες	Γυναίκες	Ασθενής έκφραση	Ισχυρή έκφραση	Ασθενής έκφραση	Ισχυρή έκφραση
Απουσία	Συχνότητα	19	22	18	23	24	17
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	0.8	- 0.8	- 0.6	0.6	1.2	- 1.2
Παρουσία	Συχνότητα	27	43	35	35	33	37
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	- 0.8	0.8	0.6	- 0.6	- 1.2	1.2
Έλεγχος Fisher		p = 0.43		p = 0.56		p = 0.33	

Πίνακας 13. Απουσία σημαντικών σχέσεων της φλεγμονής με το φύλο, την ITMVD και την PTMVD στους ασθενείς με BCC.

Φλεγμονή		Φύλο		ITMVD		PTMVD	
		Άνδρες	Γυναίκες	Ασθενής έκφραση	Ισχυρή έκφραση	Ασθενής έκφραση	Ισχυρή έκφραση
Απουσία	Συχνότητα	22	29	27	24	31	20
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	0.3	- 0.3	1.0	- 1.0	1.8	- 1.8
Παρουσία	Συχνότητα	24	36	26	34	26	34
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	- 0.3	0.3	- 1.0	1.0	- 1.8	1.8
Έλεγχος Fisher		p = 0.85		p = 0.35		p = 0.09	

Η πιθανότητα εξέλκωσης και φλεγμονής ως συνάρτηση της ηλικίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 14. Σημειωτέον ότι η γραμμή της συνεπαγόμενης πιθανότητας φλεγμονής, αντίθετα από αυτήν της εξέλκωσης, δεν είναι ομαλή, καθώς η πρόβλεψη της πρώτης βασίζεται, εκτός από την ηλικία, και στις τιμές της MD. Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι με την αύξηση της ηλικίας αναμένεται συχνότερα η παρουσία εξέλκωσης και φλεγμονής, ιδιαίτερα σε όγκους μεγαλύτερης διαμέτρου.



Εικόνα 14. Πιθανότητα της φλεγμονής (συνεχής γραμμή) και της εξέλκωσης (διακεκομμένη γραμμή) ως συνάρτηση της ηλικίας των ασθενών.

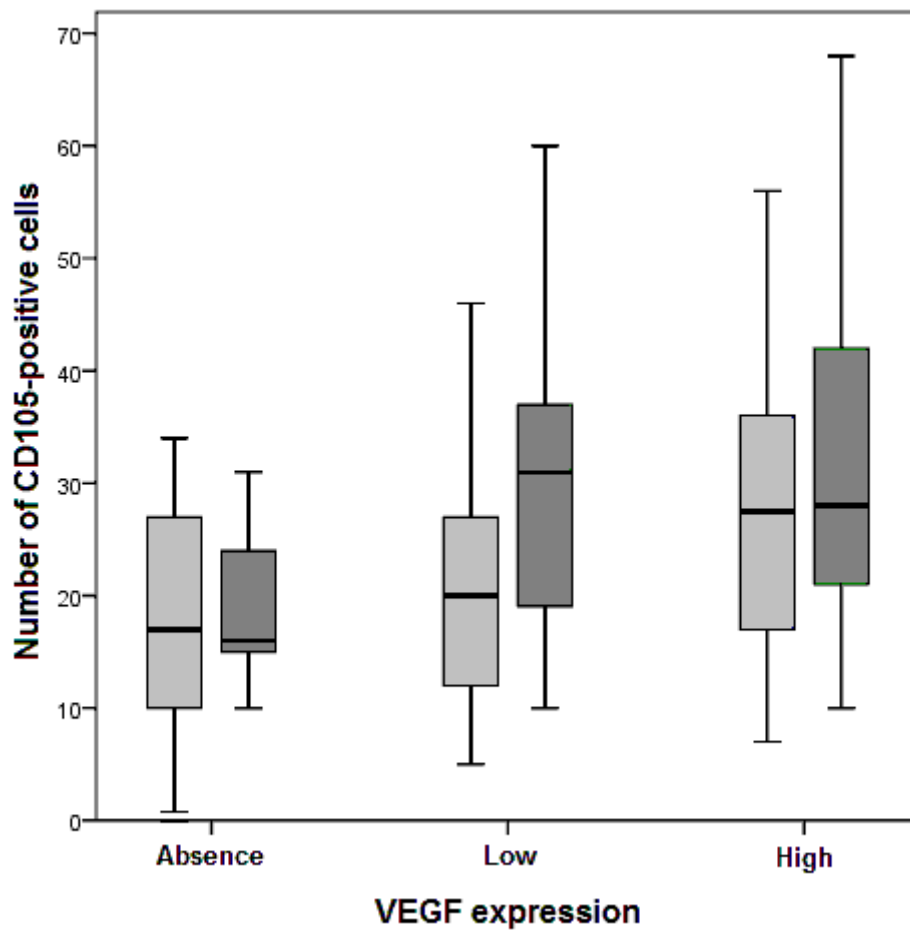
Οι σχέσεις της έκφρασης του VEGF καθώς και των υποδοχέων του με ποιοτικούς παράγοντες (φύλο, εντόπιση όγκου, εξέλκωση και φλεγμονή) μελετήθηκαν με την μέθοδο της πολυωνυμικής παλινδρόμησης και έπειτα οι σημαντικές σχέσεις παρουσιάστηκαν ως πίνακες συνάφειας.

Η έκφραση του VEGF παρουσίασε μια σημαντική σχέση με το φύλο των ασθενών ($p < 0.05$), ενώ οι υπόλοιπες ποιοτικές μεταβλητές (εντόπιση, εξέλκωση και φλεγμονή) δεν είχαν σημαντική επίδραση. Συγκεκριμένα, η απουσία έκφρασης του VEGF είναι πιο πιθανή στις γυναίκες, ενώ οι άνδρες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν την υψηλή έκφραση του αυξητικού παράγοντα, παρά τη μηδενική ($p < 0.05$, Πίνακας 14).

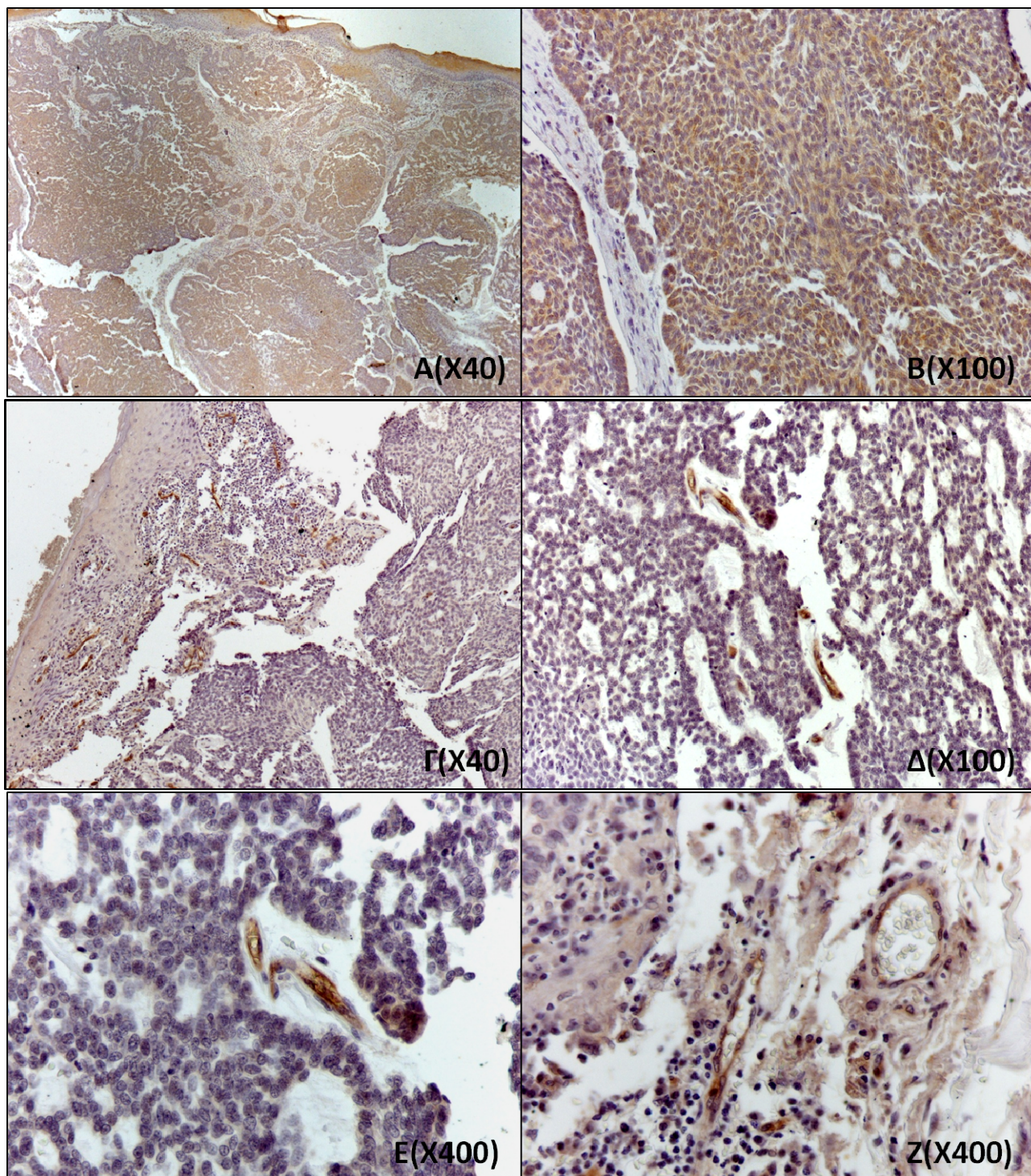
Πίνακας 14. Σχέση της έκφρασης του VEGF με το φύλο των ασθενών.

Φύλο		VEGF			Σύνολο
		Απουσία έκφρασης	Ασθενής έκφραση	Υψηλή έκφραση	
Άνδρες	Συχνότητα	3	14	29	46
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	- 2.1	0.2	1.3	
Γυναίκες	Συχνότητα	14	19	34	67
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	2.1	- 0.2	- 1.3	
Σύνολο		17	33	63	113

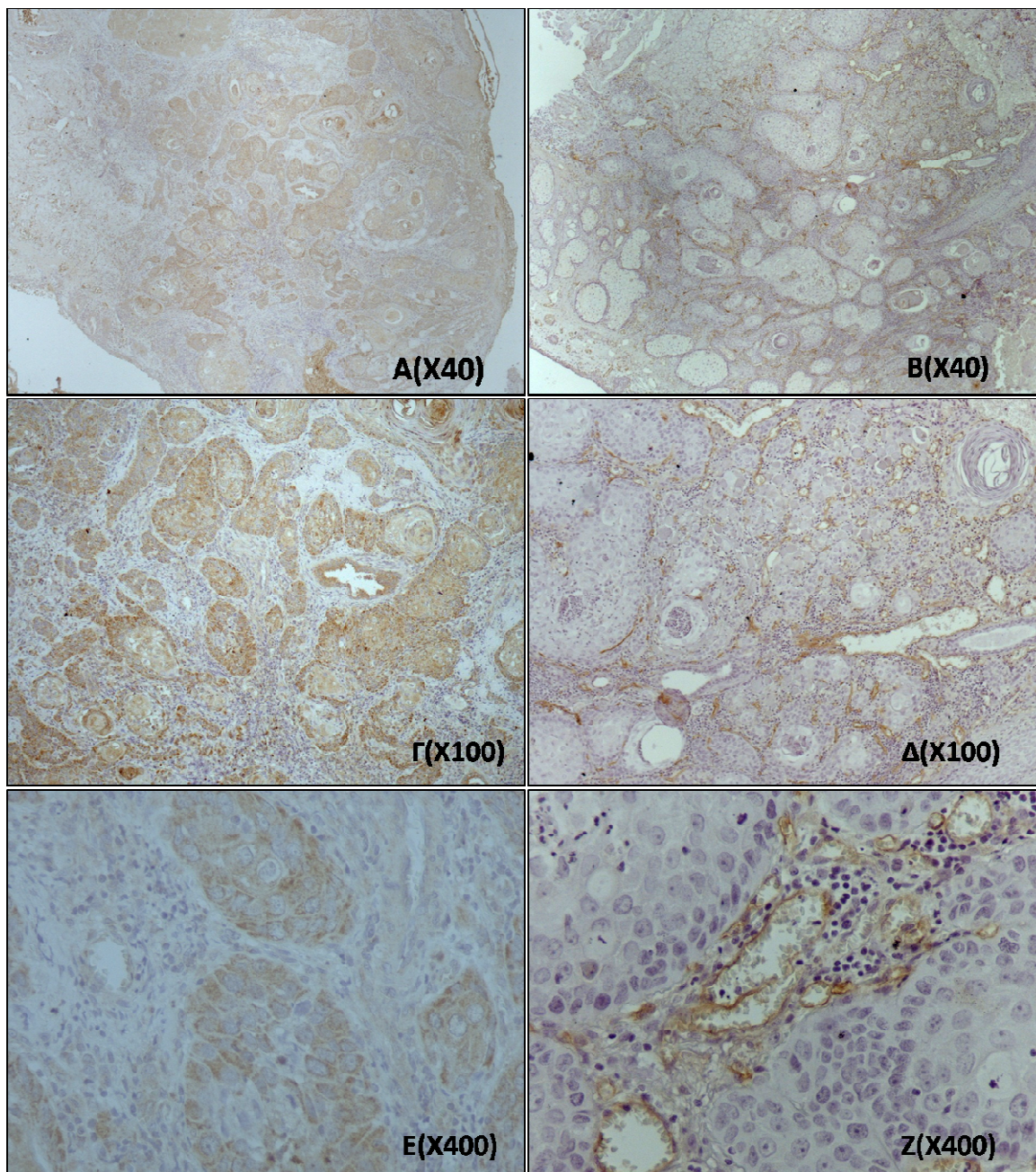
Οι σχέσεις της έκφρασης του VEGF με την ηλικία, MD, ITMVD και PTMVD μελετήθηκαν με τη μέθοδο Kruskal-Wallis. Η έκφραση του VEGF συσχετιζόταν σημαντικά με την ITMVD ($p = 0.020$) και PTMVD ($p = 0.011$), αλλά όχι με την MD ($p = 0.529$) και την ηλικία των ασθενών ($p = 0.378$). Το μικροαγγειακό δίκτυο, τόσο εντός του όγκου, όσο και στην περιφέρειά του, ήταν γενικά πιο ανεπτυγμένο στους ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του VEGF (Εικόνα 14).



Εικόνα 15. Η ενδοαγγειακή (ανοιχτό γκρι) και η περιαγγειακή (σκούρο γκρι) πυκνότητα ως συνάρτηση του επιπέδου έκφρασης του VEGF.

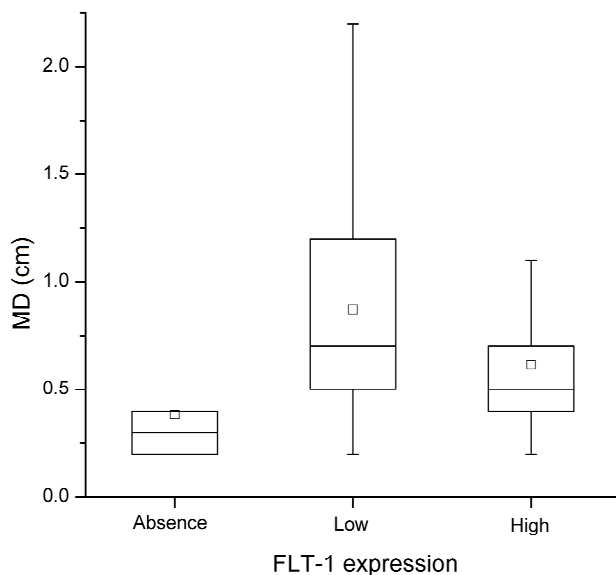


Εικόνα 16. Έκφραση του VEGF και του CD-105 στο ίδιο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα. Παρατηρείται έντονη χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον VEGF (A,B) καθώς και αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα τόσο ενδο-ογκικά, όσο και περιογικά όπως φαίνεται και με την μεγαλύτερη μεγέθυνση (Γ,Δ,Ε,Ζ)



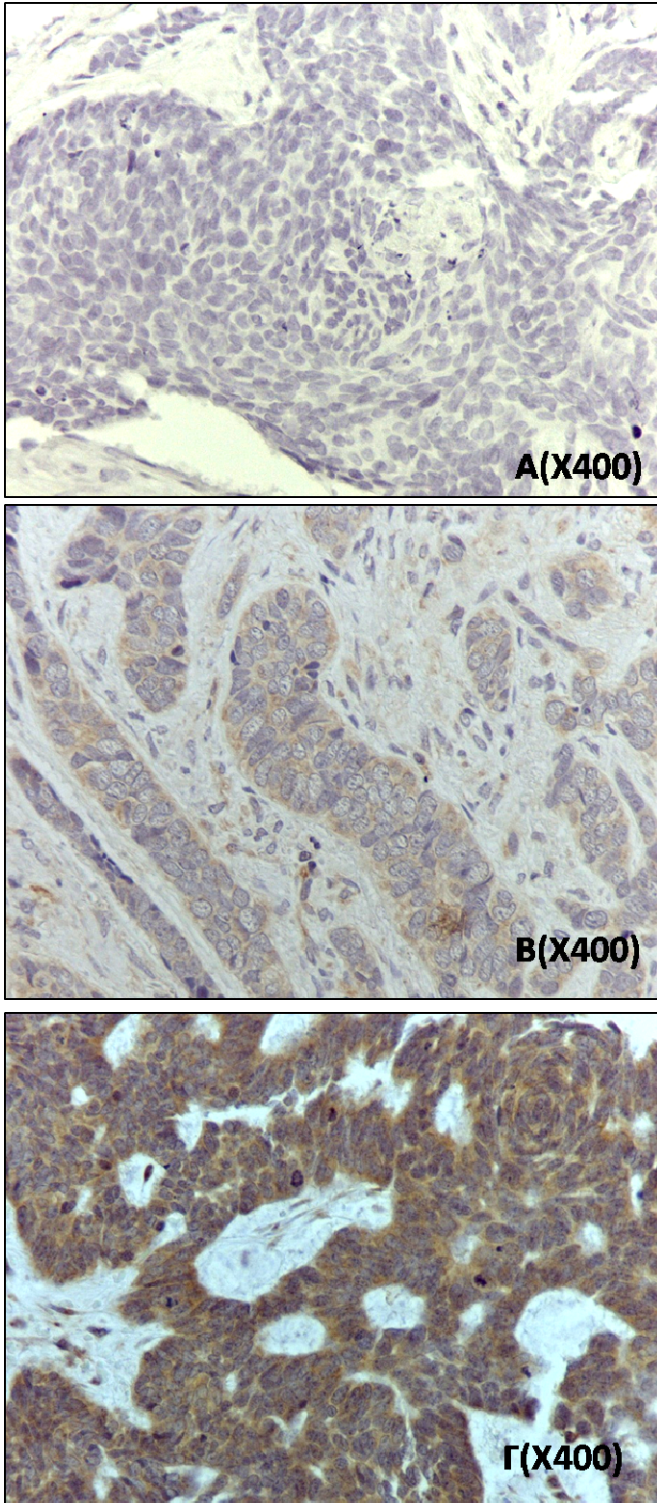
Εικόνα 17. Έκφραση του VEGF και του CD-105 στο ίδιο πλακώδες καρκίνωμα. Στην αριστερή στήλη (Α,Γ,Ε) παρατηρείται η έντονη κυτταροπλασματική χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον VEGF ενώ στην δεξιά στήλη (Β,Δ, Ζ) αναγνωρίζεται η παρουσία νεόπλαστων αγγείων κυρίως στην περιφέρεια των νεοπλασματικών ομάδων.

Η έκφραση του FLT-1 δεν βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά (πολυωνυμική λογιστική παλινδρόμηση) με τους παράγοντες όπως το φύλο ($p = 0.264$), η εντόπιση του όγκου ($p = 0.931$), παρουσία εξέλκωσης ($p = 0.805$) ή φλεγμονής ($p = 0.931$). Από τις ποσοτικές μεταβλητές, τα επίπεδα του FLT-1 επηρεάζονταν σημαντικά από την MD ($p < 0.01$), ενώ οι σχέσεις με την ηλικία, ITMVD και PTMVD δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p = 0.428$, 0.147 και 0.078 αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Όπως φαίνεται από την Εικόνα 18, η έκφραση του FLT-1 διαφοροποιείται ανάλογα με τις τιμές της μέγιστης διαμέτρου του νεοπλάσματος: η απουσία έκφρασης συναντιέται μόνο σε μικρούς όγκους, ενώ η έκφραση του υποδοχέα καταστέλλεται και πάλι ως ένα βαθμό σε πολύ μεγάλους όγκους.

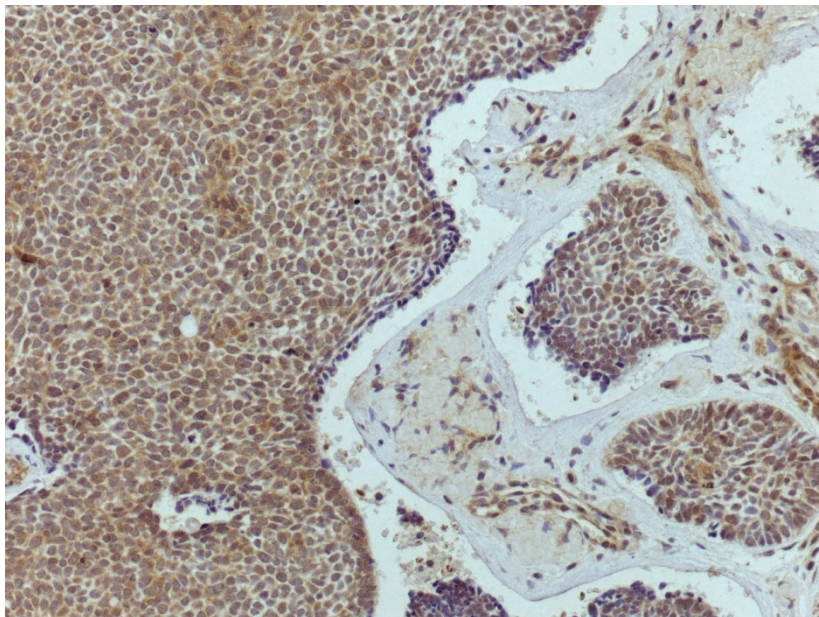


Εικόνα 18. Η μέγιστη διάμετρος όγκου (MD) ως συνάρτηση της έκφρασης του FLT-1.

Πιο αναλυτικά, η ομάδα ασθενών με τη μέτρια (χαμηλή) έκφραση του FLT-1 είχε πιο ψηλές τιμές της MD σε σύγκριση με την ομάδα της μηδενικής έκφρασης ($p = 0.01$), καθώς και με αυτήν της υψηλής έκφρασης ($p = 0.05$).

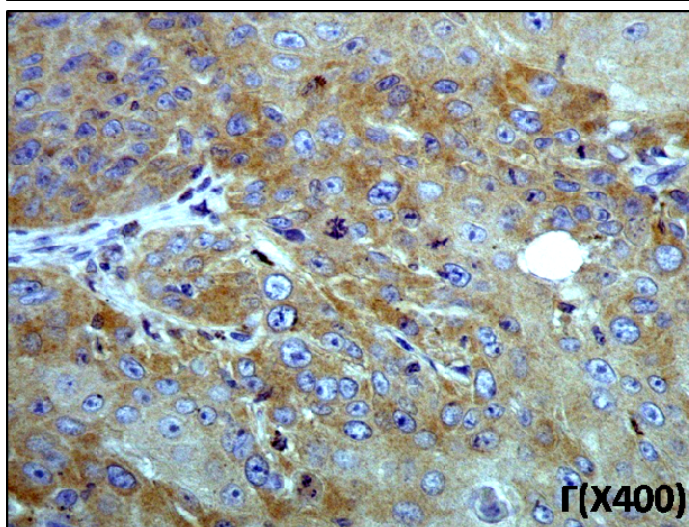
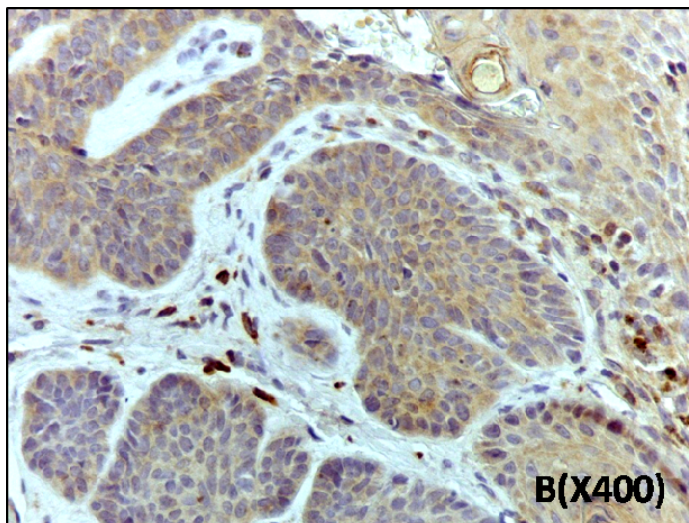
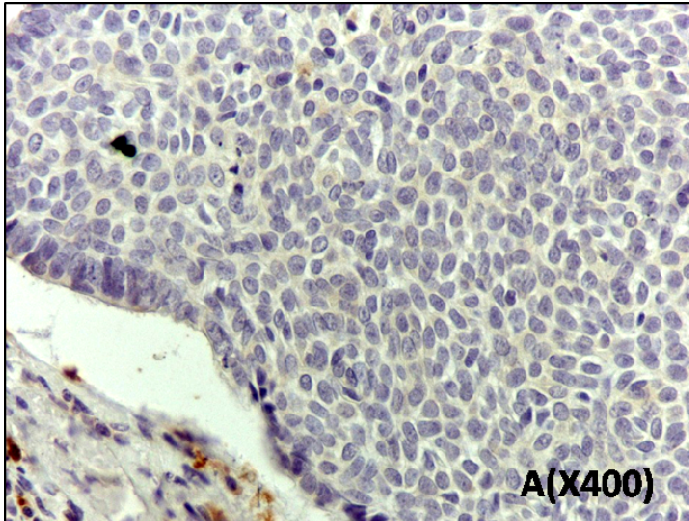


Εικόνα 19. Παραδείγματα έκφρασης του FLT-1 σε βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Παρατηρείται απουσία χρώσης στην πρώτη περίπτωση (Α), ασθενής κυτταροπλασματική χρώση στην δεύτερη περίπτωση (Β), καθώς και έντονη χρώση στην τρίτη περίπτωση (Γ).

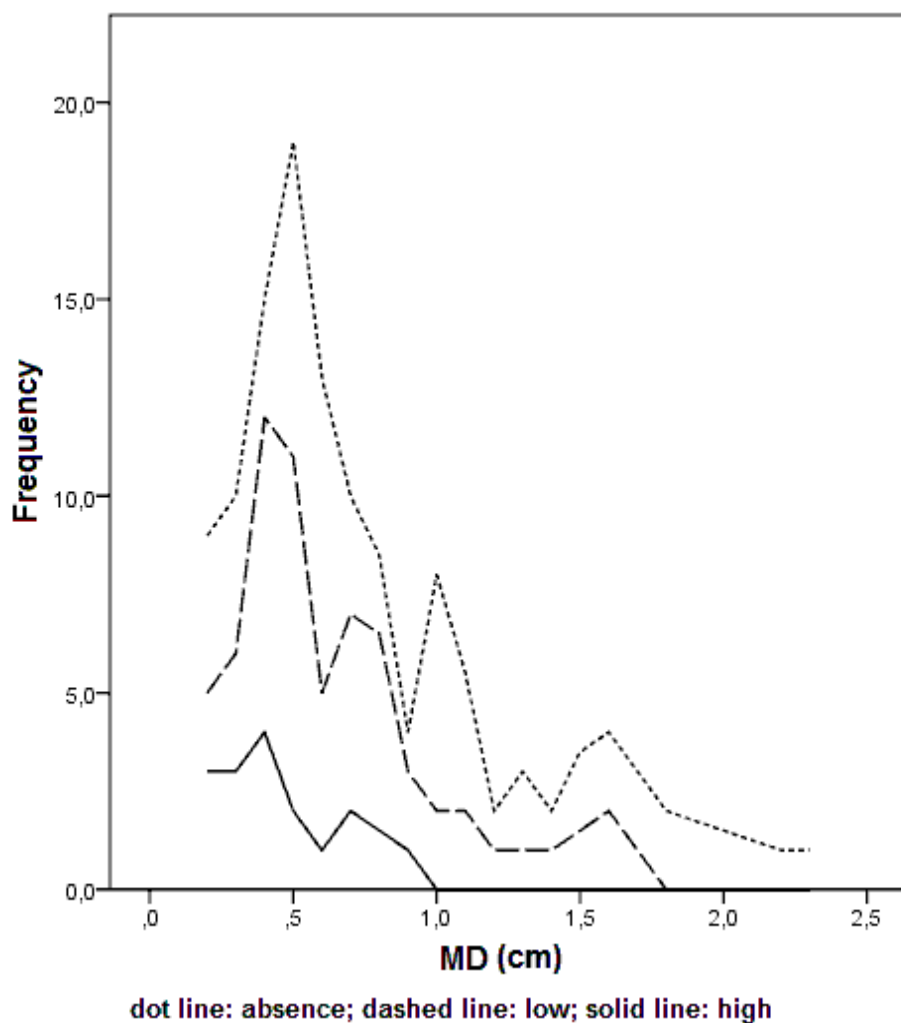


Εικόνα 20. FLT-1 σε BCC. Παρατηρείται έκφραση του υποδοχέα τόσο από τα νεοπλασματικά κύτταρα, όσο και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (αυτοκρινής και παρακρινής δράση)

Η έκφραση του FLK-1 βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά (πολυωνυμική παλινδρόμηση, $p < 0.001$; goodness of fit $p = 0.53$; Nagelkerke pseudo $R^2 = 0.26$) με την MD ($p = 0.001$), με την PTMVD ($p < 0.01$) και με το φύλο ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του FLK-1 δεν απαντώνταν σε μεγάλους όγκους (Εικόνα 22), ενώ η ασθενής έκφραση του υποδοχέα ήταν πιο χαρακτηριστική (σε σχέση με τη μηδενική) για όγκους με την υψηλή PTMVD (Πίνακας 15) και για τις γυναίκες ασθενείς (Πίνακας 16). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι επιδράσεις των MD και PTMVD επί του επιπέδου έκφρασης του FLK-1 μπορεί να μην είναι ανεξάρτητες, δεδομένου ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών αυτών των δύο παραγόντων (Spearman Rho 0.231, $p < 0.05$). Έτσι, είναι πιθανό, στους μεγάλους όγκους με ήδη καλά ανεπτυγμένο μικροαγγειακό δίκτυο, η έκφραση του FLK-1 να καταστέλλεται με κάποιο μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης.



Εικόνα 21. Παραδείγματα έκφρασης του FLK-1 σε διάφορα νεοπλάσματα. Παρατηρείται απουσία χρώσης σε βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Α), έντονη χρώση σε βασικοκυτταρικό επίσης καρκίνωμα (Β), καθώς και έντονη χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων σε ένα ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Γ).



Εικόνα 22. Κατανομή της MD σε σχέση με την έκφραση του FLK-1.

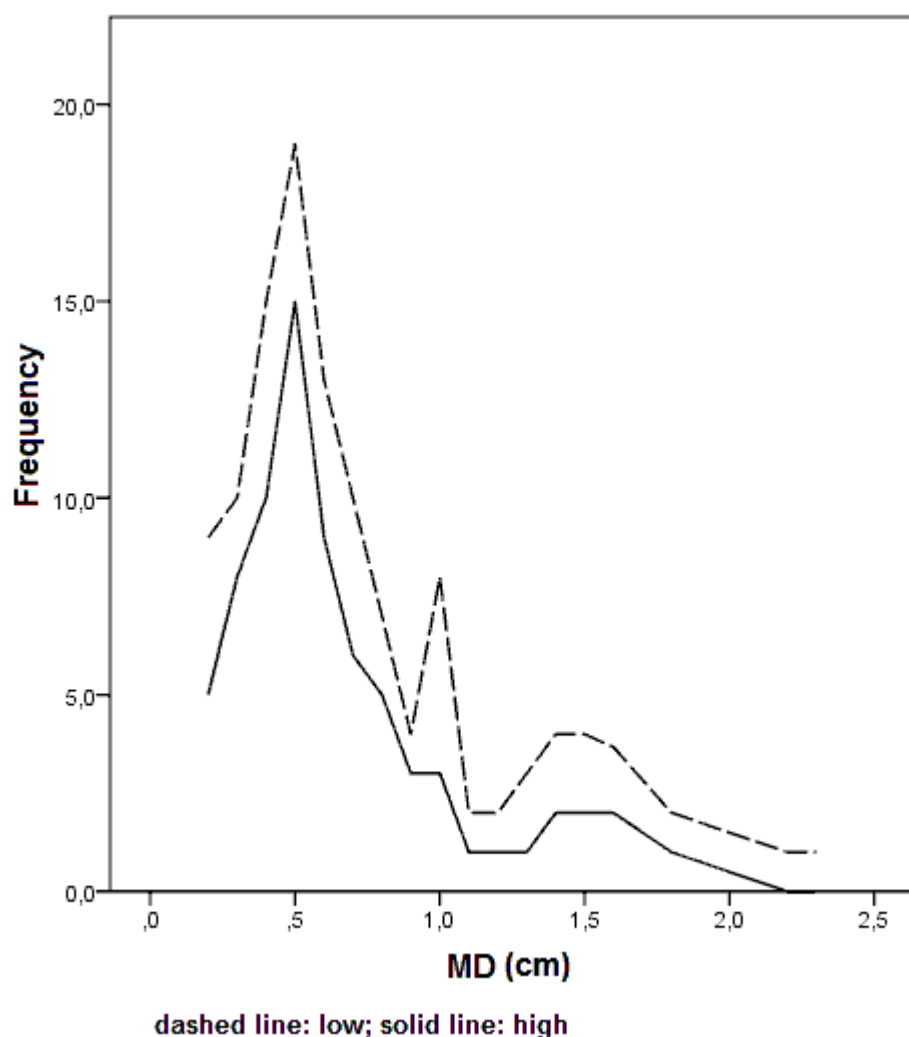
Πίνακας 15. Η έκφραση του FLK-1 σε ασθενείς με διαφορετική περιογκική μικροαγγειακή πυκνότητα.

PTMVD		FLK-1			Σύνολο
		Απουσία έκφρασης	Ασθενής έκφραση	Υψηλή έκφραση	
Ασθενής έκφραση	Συχνότητα	30	18	10	58
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	1.8	-2.4	0.9	
Υψηλή έκφραση	Συχνότητα	19	29	6	54
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	-1.8	2.4	-0.9	
Σύνολο		49	47	16	112

Πίνακας 16. Η έκφραση του FLK-1 σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς.

Φύλο		FLK-1			Σύνολο
		Απουσία έκφρασης	Ασθενής έκφραση	Υψηλή έκφραση	
Άνδρες	Συχνότητα	25	13	8	46
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	1.9	- 2.5	0.8	
Γυναίκες	Συχνότητα	24	34	8	66
	Προσαρμ. τυπ. υπόλοιπα	- 1.9	2.5	- 0.8	
Σύνολο		49	47	16	112

Η έκφραση του FLT-4 παρουσίασε οριακά σημαντική συσχέτιση μόνο με τη μέγιστη διάμετρο όγκου (διωνυμική παλινδρόμηση, $p = 0.05$), καθώς η πιθανότητα του υψηλού επιπέδου έκφρασης του υποδοχέα ελαττωνόταν ελαφρώς με την αύξηση της MD ($\text{Exp}(b) = 0.384 \{0.151; 0.973\}$, Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Κατανομή της MD για τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του FLT-4.

Από 103 άτομα με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, 9 παρουσίασαν πολλαπλή εμφάνισή του στα βλέφαρα. Οι τρεις ομάδες καρκινωμάτων που προέκυψαν (μοναδικοί όγκοι, πρωτογενείς όγκοι στους ασθενείς με πολλαπλή εμφάνιση και δευτερογενείς όγκοι) δεν διέφεραν στατιστικά όσον αφορά όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους (πολυωνυμική παλινδρόμηση, $p = 0.924$). Αυτό μπορεί να οφείλεται τόσο σε αντικειμενική απουσία σημαντικών διαφορών, όσο και στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης (μικρός αριθμός ατόμων με πολλαπλή εμφάνιση).

ΛΟΙΠΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ

ΒΑΣΙΚΟΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (BSC)

Μόνον 6 ασθενείς από το σύνολο που συμμετείχε στην μελέτη εμφάνισαν το BSC. Όλοι αυτοί ήταν γυναίκες με ηλικία από 49 έως 78 χρονών (μέσος όρος 70.7). Η MD κυμαινόταν από 0.2 μέχρι 1.2 εκατοστά (μέσος όρος 0.7). Δύο ασθενείς δεν εμφάνισαν ούτε εξέλκωση, ούτε φλεγμονή, ενώ οι υπόλοιποι τέσσερεις εμφάνισαν και τις δύο. Οι τιμές των ITMVD και PTMVD κυμαινόταν στα διαστήματα {25 – 63} και {11 – 58} με μέσους όρους 43.7 και 33.7 αντίστοιχα. Από τους 6 ασθενείς, τρεις εμφάνισαν χαμηλό επίπεδο έκφρασης του VEGF και οι άλλες τρεις υψηλό. Ένας μόνον ασθενής χαρακτηριζόταν από χαμηλή έκφραση του FLT-1, ενώ οι υπόλοιποι 5 είχαν ψηλό επίπεδο. Όσον αφορά το FLK-1, και τα τρία επίπεδα έκφρασης ήταν παρόντα, ενώ η έκφραση του FLT-4 ήταν υψηλή και στους 6 ασθενείς. Μια μελέτη με περισσότερα άτομα είναι σαφώς αναγκαία για να χαρακτηριστεί αυτή η μορφή καρκίνου με κάποια στατιστική επάρκεια.

ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (SCC)

Αυτή τη μορφή καρκίνου εμφάνισαν 10 άτομα, εκ των οποίων 7 άνδρες και 3 γυναίκες. Τρεις ασθενείς είχαν grade 1, τέσσερεις – grade 2 και τρεις – grade 3. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 69 έως 87 χρονών με το μέσον όρο 75.1. Η MD είχε φάσμα τιμών από 0.2 μέχρι 2.0 εκατοστά (μέσος όρος 0.9). Οκτώ ασθενείς στους 10 παρουσίασαν εξέλκωση και επτά φλεγμονή, ενώ δεν υπήρχε όγκος που να μην χαρακτηριζόταν με τουλάχιστον ένα από τα δύο. Η ITMVD είχε εύρος {27 – 83} με το μέσον όρο 50.9, ενώ τα αντίστοιχα στατιστικά για την PTMVD ήταν {10 – 56} και 26.4. Όλοι οι ασθενείς

εξέφραζαν κάποια ποσότητα του VEGF, οκτώ από αυτούς είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης. Όλοι οι ασθενείς με υψηλό επίπεδο VEGF εμφάνισαν επίσης υψηλά επίπεδα του FLT-4, ενώ επτά από αυτούς είχαν και υψηλά επίπεδα έκφρασης του FLT-1. Όπως και στην περίπτωση του BSC, περισσότερα άτομα χρειάζεται να συμπεριληφθούν στη μελέτη προκειμένου να εξαχθούν πιο αξιόπιστα στατιστικά συμπεράσματα.

ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ (PL)

Εκ του συνόλου των 18 ατόμων, 8 ήταν άνδρες και 10 γυναίκες, ενώ 12 ασθενείς εμφάνισαν ακτινική κεράτωση και οι υπόλοιποι 6 τη νόσο του Bowen. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 53 έως 82 χρονών (μέσος όρος 68.6), η MD μεταβαλλόταν στα πλαίσια 0.2 – 2.6 εκατοστά με το μέσο όρο 0.57. Εννέα άτομα από τα 18 εμφάνισαν εξέλκωση και επίσης εννέα φλεγμονή. Σε οκτώ άτομα τα νεοπλάσματα χαρακτηρίζονταν από την παρουσία και των δύο, ενώ άλλα οκτώ άτομα δεν εμφάνισαν ούτε εξέλκωση, ούτε φλεγμονή. Η συνάφεια των δύο αυτών μεταβλητών ήταν στατιστικά σημαντική (ακριβής έλεγχος Fisher, $p < 0.01$). Ο μέσος αριθμός των CD105-θετικών κυττάρων στην περιφέρεια του νεοπλάσματος ανά μικροσκοπικό πεδίο κυμαινόταν από 7 μέχρι 43 με το μέσον όρο 17.4. Ένας μόνον ασθενής χαρακτηριζόταν από απουσία έκφρασης του VEGF, ενώ δέκα είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης. Οκτώ ασθενείς είχαν χαμηλή έκφραση του FLT-1 και 10 υψηλή. Τέσσερις μόνον ασθενείς είχαν χαμηλή έκφραση του FLT-4, ενώ οι υπόλοιποι 14 υψηλή. Τέλος, πέντε ασθενείς δεν εξέφραζαν καθόλου τον FLK-1 στους όγκους, εννέα είχαν χαμηλή και τέσσερα άτομα υψηλή έκφραση.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ BSC, SCC ΚΑΙ PL ΜΕ ΤΟ BCC

Οι σπανιότερα απαντώμενες στη μελέτη μορφές καρκίνου των βλεφάρων (βασικοπλακώδες, ακανθοκυτταρικό, προκαρκινικές αλλοιώσεις) συγκρίθηκαν στατιστικά

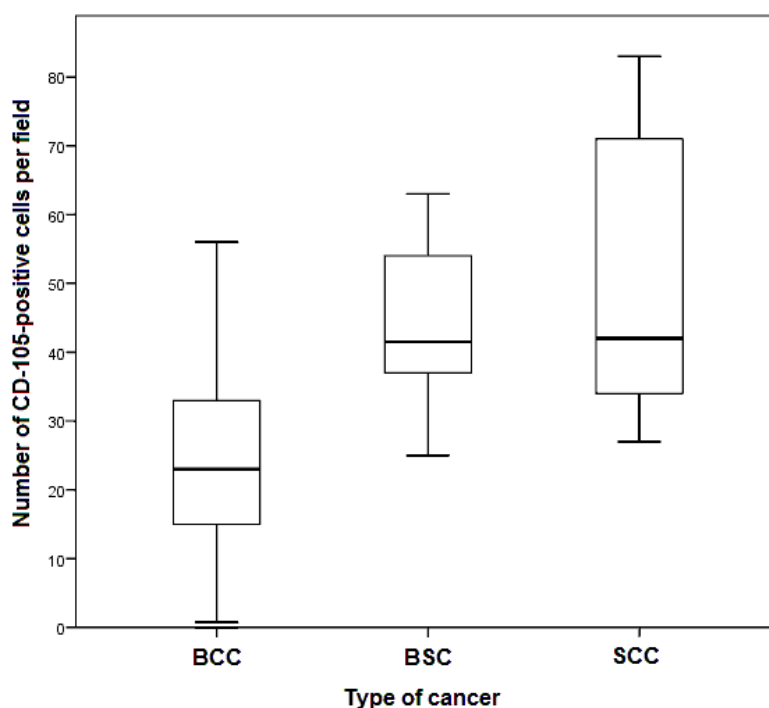
με το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα ως κατηγορία αναφοράς, δεδομένου ότι μόνον αυτή η τελευταία είχε αρκετό αριθμό ατόμων. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολυωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης με διαδοχική εξάλειψη των μη σημαντικών μεταβλητών (polynomial logistic regression with backward elimination). Οι παράγοντες με την στατιστικά σημαντική προβλεπτική ισχύ επί των μελετούμενων μορφών καρκίνου που απάρτισαν το τελικό μοντέλο παρουσιάζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Παράγοντες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς διαφορετικές μορφές κακοήθων νεοπλασιών του βλεφάρου*.

	Παράγοντας	Στατιστική σημαντικότητα του παράγοντα
Συνολικό μοντέλο	Φύλο ITMVD PTMVD	$p < 0.05$ $p < 0.001$ $p < 0.01$
BSC	Φύλο ITMVD	0.015 0.004
SCC	ITMVD	0.000
PL	PTMVD	0.003

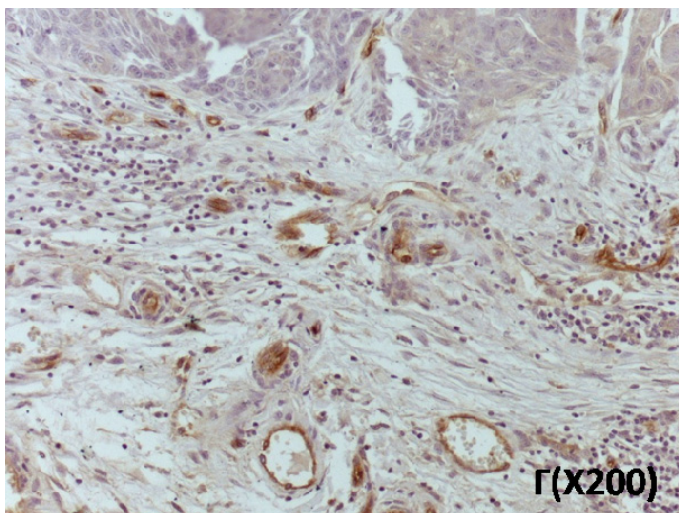
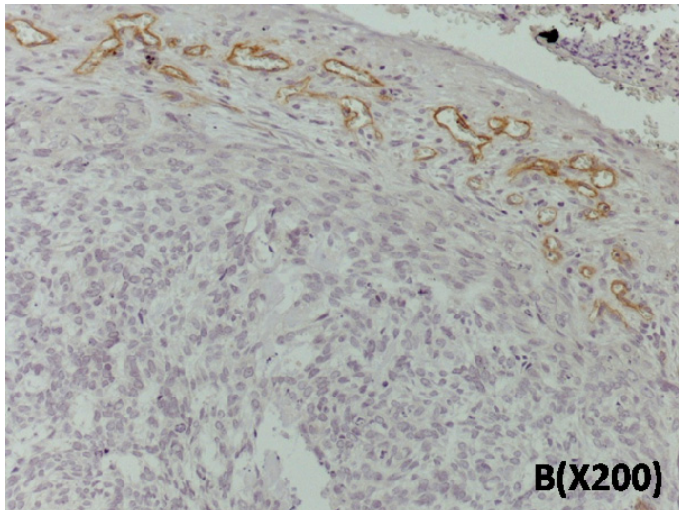
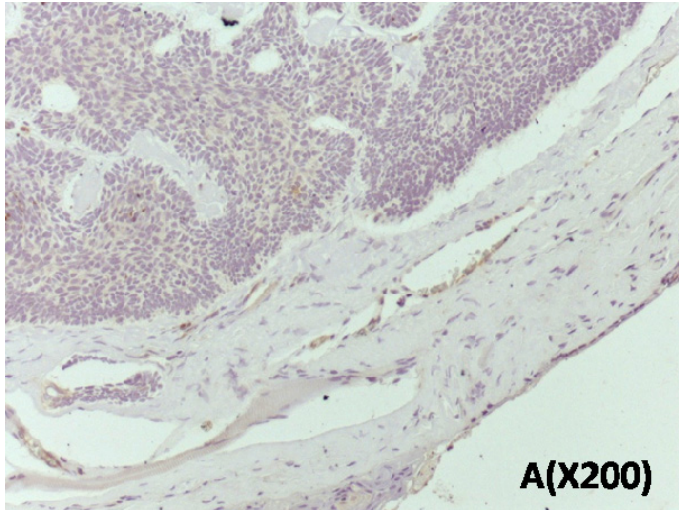
* Πολυωνυμική λογιστική παλινδρόμηση, Nagelkerke $R^2 = 0.474$

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, το συνολικό μοντέλο περιλαμβάνει τρεις μεταβλητές, οι οποίες στο σύνολό τους είχαν μια στατιστικά σημαντική ικανότητα να διαχωρίζουν τα πιο σπάνια καρκινώματα από το BCC, ενσωματώνοντας περίπου 30% της συνολικής διακύμανσης. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, το BSC διέφερε σημαντικά από το BCC όσον αφορά το φύλο των ασθενών και την ITMVD. Η ITMVD ήταν επίσης σημαντικά διαφορετική στους ασθενείς με SCC. Γενικά, τόσο το βασικοπλακώδες, όσο και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα χαρακτηρίζονταν από υψηλότερες τιμές της ITMVD σε σύγκριση με το BCC ($p < 0.05$ και $p < 0.001$ αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test, Εικόνα 24).

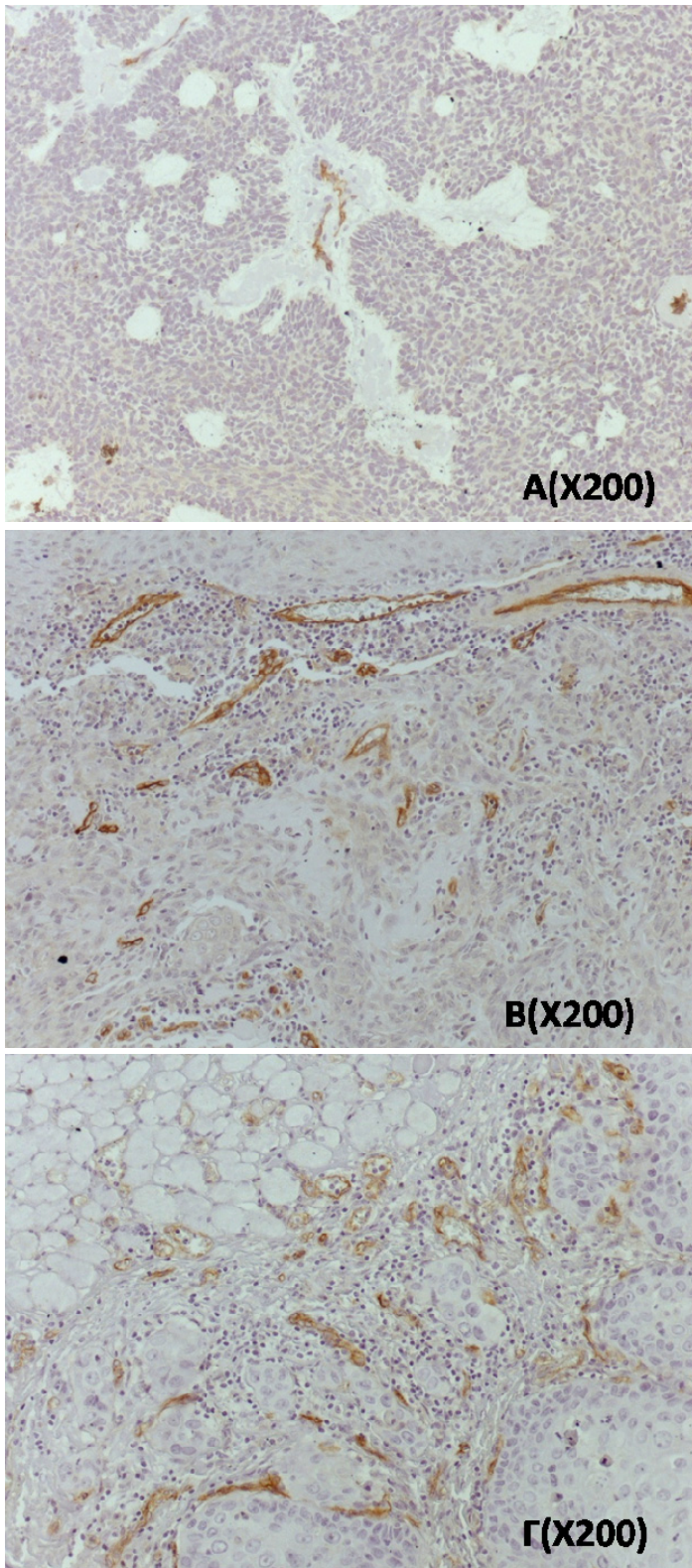


Εικόνα 24. Κατανομή των τιμών της ITMVD σε σχέση με τον τύπο καρκίνου.

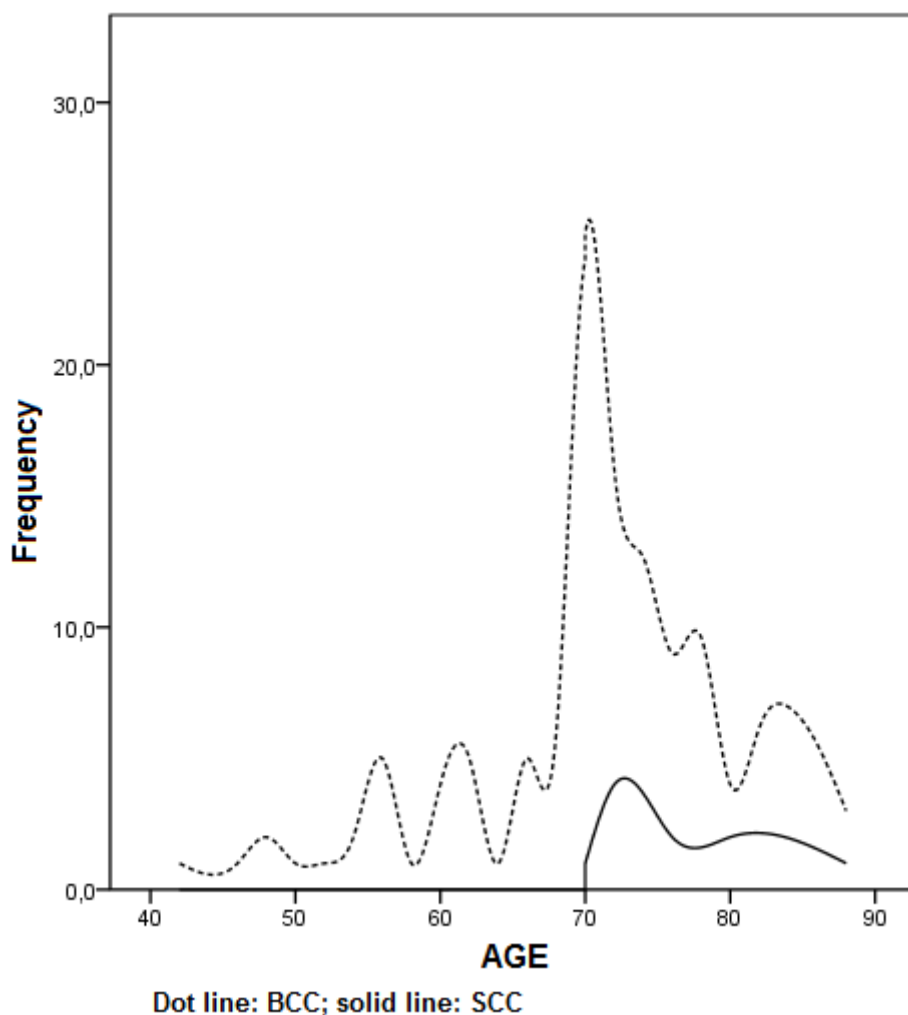
Οι ασθενείς με SCC έτειναν επίσης να είναι μεγαλύτερης ηλικίας σε σύγκριση με αυτούς που έπασχαν από το BCC (Εικόνα 26), παρόλο που η τάση αυτή δεν ξεπέρασε το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ ($p = 0.066$, Mann-Whitney test), πιθανόν λόγω του μικρού αριθμού ατόμων στην ομάδα SCC. Αυτό το φαινόμενο, σε περίπτωση αν τελικά ισχύει, ίσως να σχετίζεται με τη συσσώρευση ηλιακής ακτινοβολίας, η οποία αποτελεί αιτιώδη παράγοντα εμφάνισης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος.



Εικόνα 25. Σύγκριση της PTMVD ανάμεσα σε BCC (Α), BSC (Β), και SCC (Γ). Παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των CD-105 θετικών αγγείων που αναπτύσσονται στην περιφέρεια του όγκου όσο προχωράμε προς τον επιθετικότερο φαινότυπο.

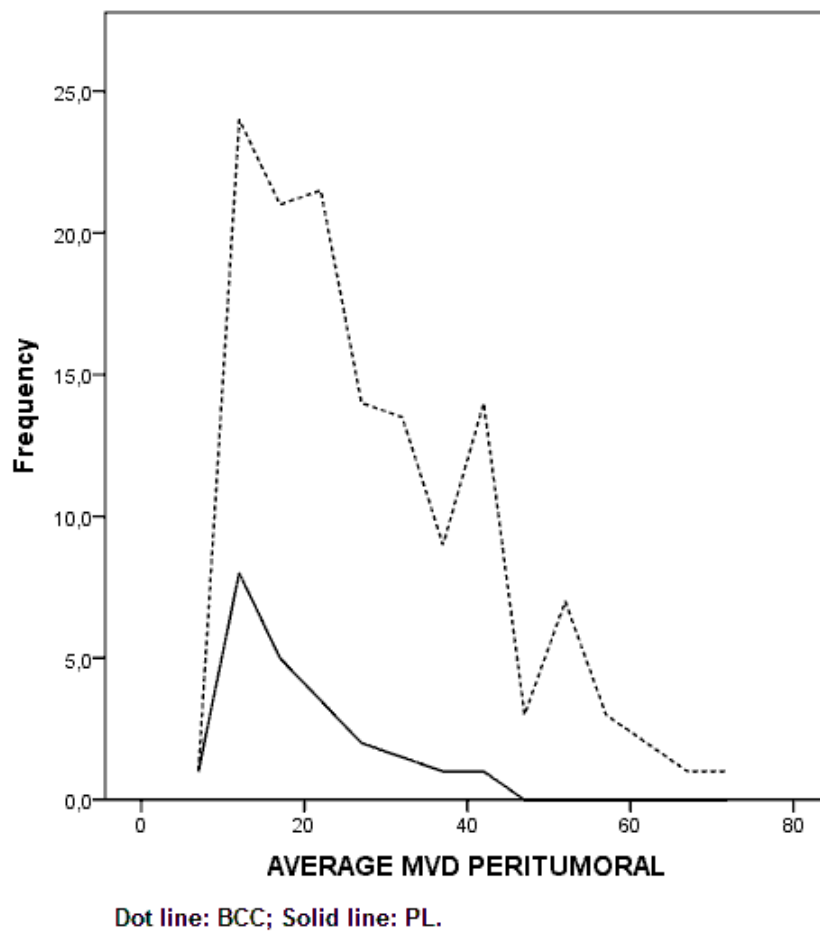


Εικόνα 26. Σύγκριση της ITMVD ανάμεσα σε BCC (Α), BSC (Β), και SCC (Γ). Παρατηρείται σημαντική αύξηση του αριθμού των CD-105 θετικών αγγείων που αναπτύσσονται εντός του όγκου όσο προχωράμε προς τον επιθετικότερο φαινότυπο.



Εικόνα 26. Ιστογράμματα της ηλικίας των ασθενών με ΒΚΚ (διακεκομμένη γραμμή) και ΑΚΚ (συνεχόμενη γραμμή).

Τέλος, οι ασθενείς με προκαρκινικές αλλοιώσεις διακρίνονταν από την ομάδα των ασθενών με ΒΚΚ ως προς τη μικροαγγειακή πυκνότητα στην περιφέρεια του όγκου (PTMVD): οι ασθενείς της τελευταίας κατηγορίας είχαν γενικότερα υψηλότερο αριθμό CD105-θετικών κυττάρων, αποτέλεσμα που προκύπτει τόσο από τη λογιστική παλινδρόμηση (βλ. πιο πάνω), όσο και από τον ανεξάρτητο έλεγχο Mann-Whitney ($p < 0.001$, Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Κατανομή του αριθμού CD105-θετικών κυττάρων για ασθενείς με BCC (διακεκομμένη γραμμή) και αυτούς με PL (συνεχόμενη γραμμή).

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα (εκτιμώμενη ως αριθμός CD105-θετικών κυττάρων ανά μικροσκοπικό πεδίο) αποτελεί σημαντικό κριτήριο στον διαχωρισμό των νεοπλασιών του βλεφάρου: οι προκαρκινικές αλλοιώσεις διακρίνονται από χαμηλότερες τιμές PTMVD σε σχέση με το BCC, ενώ οι πιο σπάνιες και επιθετικές μορφές καρκίνου (BSC και SCC) έχουν, σε σύγκριση με το BCC, υψηλότερες τιμές της ITMVD. Εντός της ομάδας BCC, η μικροαγγειακή πυκνότητα (αμφότερες οι ITMVD και PTMVD) συσχετιζόταν θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του VEGF, ενώ η PTMVD είχε επιπλέον μια σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα του FLK-1.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογένεση αποτελεί θεμελιώδη διαδικασία στην ανάπτυξη και την μεταστατική διασπορά των συμπαγών νεοπλασμάτων. Τα νεόπλαστα αγγεία είναι υπεύθυνα για την μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών καθώς και για την απομάκρυνση των άχρηστων μεταβολικών προϊόντων¹⁵². Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι αδύνατη η αύξηση του μεγέθους του όγκου πέραν των 2 mm χωρίς την παρουσία νέων αγγείων. Το νεόπλασμα εξασφαλίζει την βασική αγγειακή του παροχή από επέκταση και αναδιαμόρφωση του υπάρχοντος αγγειακού δικτύου του ιστού εντός του οποίου αναπτύσσεται. Η διακοπή της αγγειογενετικής διαδικασίας σημαίνει την ενεργοποίηση των μηχανισμών κυτταρικής νέκρωσης και απόπτωσης^{163,166,184}.

Τα νεοπλασματικά μικροαγγεία διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ιστών καθώς παρουσιάζουν ανώμαλη μορφολογία, αυξημένη ευθραυστότητα και διαπερατότητα αλλά και υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού από αυτόν που παρατηρείται στα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα χαρακτηριστικά τους διευκολύνουν την διασπορά καρκινικών κυττάρων στο αγγειακό δίκτυο, αυξάνοντας έτσι το μεταστατικό δυναμικό ενός κακοήθους όγκου¹⁷⁰⁻¹⁷¹.

Η παρατήρηση ότι η ανάπτυξη του όγκου εξαρτάται από την αγγειογένεση, οδήγησε τον Weidner και τους συνεργάτες του να υποθέσουν ότι ο αριθμός των αγγείων ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης, όπως αυτός προσμετρείται κατά την παρατήρηση της ιστολογικής τομής στο οπτικό μικροσκόπιο, αντανακλά το αγγειογενετικό δυναμικό ενός όγκου. Η ενδο-ογκική (intratumoral, IT) μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density, MVD) μπορεί λοιπόν να αποτελεί παράγοντα πρόγνωσης για την ανάπτυξη του όγκου. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε σε μία μελέτη ορόσημο, ότι η ITMVD στα επιθετικά καρκινώματα του μαστού με μεταστάσεις και κακή πρόγνωση είναι διπλάσια σε σχέση με

αυτήν που παρατηρείται στα μη μεταστατικά καρκινώματα του μαστού με την καλύτερη πρόγνωση²⁸³⁻²⁸⁵. Η αναγνώριση της ITMVD ως ισχυρού και ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη, συνδεδεμένου με την επιβίωση των ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού ενισχύθηκε από τις μελέτες του Horak, που δημοσιεύτηκαν ταυτόχρονα με αυτές του Weidner²⁸⁶. Την επόμενη δεκαετία δημοσιεύτηκαν πάνω από 100 αναδρομικές μελέτες σχετικά με την προγνωστική αξία της ITMVD στους συμπαγείς όγκους. Μόνο για τον καρκίνο του μαστού πραγματοποιήθηκαν 40 περίπου μελέτες που περιελάμβαναν συνολικά 7000 ασθενείς. Τα 2/3 των παραπάνω μελετών κατέληξαν σε θετική συσχέτιση της ITMVD με την κλινική έκβαση των ασθενών, ενώ περίπου το 1/3 των ερευνητών δεν μπόρεσαν να αναγνωρίσουν θετική συσχέτιση ανάμεσα στις μετρήσεις της ITMVD και στην πρόγνωση της νόσου³⁰⁷⁻³¹⁶.

Έκτοτε, η προγνωστική αξία της ITMVD μελετήθηκε σε μία πληθώρα όγκων όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του ουροποιητικού συστήματος, ο ορθοκολικός καρκίνος, ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου, οι γυναικολογικές κακοήθειες, το κακόηθες μελάνωμα κ.α. Μια απλή αναζήτηση του όρου ITMVD στο Medline εμφανίζει περισσότερες από 2000 εργασίες οι οποίες έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία 20 χρόνια και εστιάζουν στη νεοπλασματική αγγειογένεση³¹⁶. Συμπερασματικά, παρά τις αντιφατικές αναφορές που υπάρχουν, το σύνολο των διαθέσιμων αποτελεσμάτων είναι αρκετό για να καθιερώσει την ITMVD ως το μέτρο της αγγειογενετικής δραστηριότητας στους συμπαγείς όγκους και τις μετρήσεις της μια σημαντική μορφολογική αξιολόγηση της νεοπλασματικής αγγείωσης.

Ιδιαίτερη σημασία για τον ακριβή υπολογισμό της MVD έχει η επιλογή του κατάλληλου ανοσοϊστοχημικού δείκτη. Η χρήση του CD105 ως αγγειακού ενδοθηλιακού δείκτη για την καταγραφή της MVD φαίνεται να υπερέχει έναντι των συμβατικών πανενδοθηλιακών δεικτών. Το CD105 είναι ένα αντίσωμα που στρέφεται εναντίον της πρωτεΐνης ενδογλίνης,

μιας γλυκοπρωτεΐνης που ρυθμίζει την μεταγωγή σήματος του TGF-β, ενός αναστολέα της αγγειογένεσης. Η ενδογλίνη αναστέλλει την δράση του TGF-β, επάγοντας κατά αυτόν τον τρόπο την αγγειογένεση και εκφράζεται έντονα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε φάση πολλαπλασιασμού. Επομένως το CD105 παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα για τα πολλαπλασιαζόμενα νεοαγγεία, ενώ είναι κατά κανόνα αρνητικό στο φυσιολογικό αγγειακό δίκτυο. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα εργαστήρια με την χρήση ποικίλων αντισωμάτων εναντίον του CD105 έδειξαν αυξημένη έκφραση σε μεγάλο εύρος καρκινικών ενδοθηλίων, συμπεριλαμβανομένων καρκινωμάτων στο παχύ έντερο, μαστό, ήπαρ, προστάτη και πνεύμονα, συνδέοντας τελικά την CD105- MVD με την πρόγνωση των ασθενών³¹⁷⁻³²⁰.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους και πλέον ειδικούς αγγειογενετικούς παράγοντες στην νεοπλασματική αγγειογένεση. Δρα ως ειδικός μιτογόνος παράγοντας του ενδοθηλίου προάγοντας την αγγειογένεση στις περιοχές των ενεργά αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Η δράση του επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων του, από τους οποίους οι Flt-1 (VEGFR1), Flk-1 (VEGFR2) και Flt-4 (VEGFR3) είναι αντικείμενο έρευνας στη παρούσα μελέτη^{152,171,176}.

Η συντριπτική πλειοψηφία των έως τώρα μελετημένων κακοηθών νεοπλασμάτων χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα. Μια σειρά μελετών έχουν δείξει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα και στην μικροαγγειακή πυκνότητα συμπαγών όγκων, όπως ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας, του εγκεφάλου καθώς και οι δερματικές νεοπλασίες²⁴⁶⁻²⁷⁰.

Γενικά οι περισσότερες μελέτες γύρω από την δερματική νεοπλασματική αγγειογένεση αφορούν το κακόηθες μελάνωμα και συσχετίζουν την αυξημένη VEGF έκφραση με την

μικροαγγειακή πυκνότητα, η οποία με τη σειρά της φαίνεται να παίζει σημαντικό προγνωστικό ρόλο στην κάθετη φάση ανάπτυξης του όγκου. Η αυξημένη MVD σχετίζεται επίσης με μεγαλύτερη μέση διάμετρο του όγκου, με την παρουσία εξέλκωσης και τελικά με μικρότερη επιβίωση των ασθενών^{268,269,393}.

Η έρευνα της αγγειογένεσης στους επιθηλιακούς δερματικούς όγκους (βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, βασικοπλακώδες καρκίνωμα, ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα και οι προκαρκινικές τους αλλοιώσεις) έχει να επιδείξει ελάχιστες μελέτες, τα αποτελέσματα των οποίων είναι συχνά αντιφατικά μεταξύ τους³⁹⁷. Από όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη μελέτη αγγειογένεσης που αφορά τους επιθηλιακούς δερματικούς όγκους σε μία τόσο ειδική ανατομική θέση όπως είναι τα βλέφαρα.

Τα επιθηλιακά καρκινώματα του δέρματος είναι συχνοί όγκοι με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό, αν και τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (squamous cell carcinoma, SCC) συχνά χαρακτηρίζονται από επιθετικότερο φαινότυπο όσον αφορά την μετάσταση και τη τοπική υποτροπή. Τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα (basal cell carcinoma, BCC) διαφέρουν από τα ακανθοκυτταρικά τόσο ως προς τα ιστολογικά χαρακτηριστικά όσο και ως προς την βιολογική τους συμπεριφορά¹.

Η παρούσα μελέτη παρουσίασε μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στη έκφραση του VEGF από τα νεοπλασματικά κύτταρα των BCC και στις τιμές που βρέθηκαν για την MVD τόσο εντός του όγκου (ITMVD) όσο και στην περιφέρειά του (peritumoral MVD, PTMVD). Επιπλέον οι δύο αυτές μετρήσεις της MVD διαφέρουν ανάμεσα στους τύπους των νεοπλασμάτων. Οι προκαρκινικές αλλοιώσεις παρουσιάζουν κάποια νεοαγγείωση σε σχέση με το φυσιολογικό δέρμα, αλλά αυτή είναι μικρότερη σε σχέση με την νεοαγγείωση που παρατηρείται στο BCC στην περιφέρεια του όγκου. Οι επιθετικότεροι τύποι καρκίνου (BSC και SCC) παρουσιάζουν αυξημένη ITMVD κυρίως, σε σχέση με τα BCC. Επιπλέον

στη μελέτη μας επιβεβαιώθηκε η θετική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της ενδο-ογκικής και περι-ογκικής μικροαγγειακής πυκνότητας, καταδεικνύοντας τους κοινούς μηχανισμούς ανάπτυξης της νεοπλασματικής αγγείωσης. Τα αποτελέσματα αυτά δεν διαφοροποιούνται σημαντικά από τα αντίστοιχα που παρουσιάζονται μέχρι σήμερα στην διεθνή βιβλιογραφία.

Ο Staibano και οι συνεργάτες του χώρισαν τα BCC σε δύο κατηγορίες, στα BCC κλασικού τύπου (BCC1) με σχετικά καλοήγη πορεία και στα επιθετικά BCC (BCC2), τα οποία παρουσίαζαν εκτεταμένη διηθητική και μεταστατική ανάπτυξη. Παρατήρησαν ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα ήταν σημαντικά αυξημένη στη δεύτερη «επιθετική» κατηγορία με την χειρότερη πρόγνωση²⁸². Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξε και ο Maiolino μελετώντας SCC σε σκύλους. Βρήκε ότι η MVD αυξάνει όσο χαμηλότερη είναι η διαφοροποίηση του νεοπλάσματος, δηλαδή είναι αυξημένη στα SCC χαμηλής διαφοροποίησης σε σχέση με τα καλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Το ίδιο συνέβαινε και με την έκφραση του VEGF³⁹⁸.

Με την χρήση *in situ* υβριδισμού και ανοσοϊστοχημείας ο Weniger έδειξε ότι ο VEGF εκφράζεται σε διαφορετικό ποσοστό στα SCC και στα BCC. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση VEGF στο σύνολο των 10 SCC της μελέτης και απουσία έκφρασης σε 9 από τα 14 BCC, ενώ στο σύνολο 19 αλλοιώσεων η MVD βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη στα SCC σε σχέση με τα BCC^{279,280}.

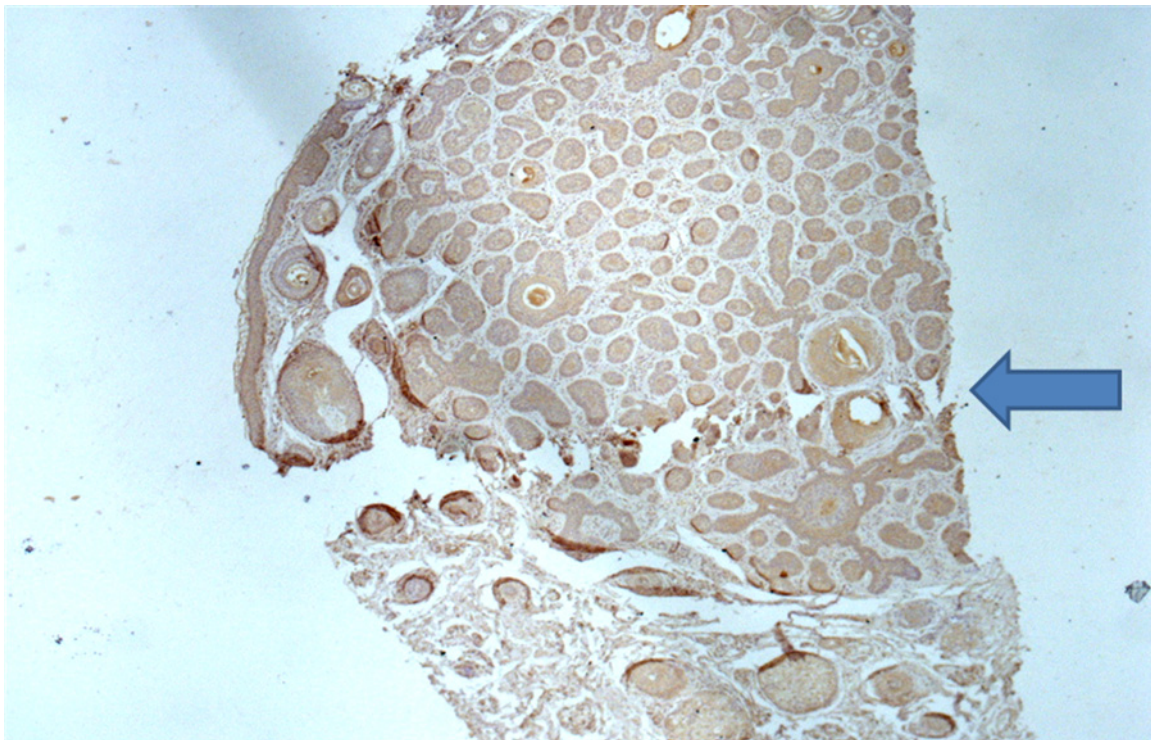
Συγκρίνοντας την έκφραση του VEGF ανάμεσα στα βασικοκυτταρικά και στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου, ο Bowden και η ομάδα του διαπίστωσαν έκφραση VEGF και στις δύο κατηγορίες. Η ένταση της έκφρασης ωστόσο ήταν σημαντικά υψηλότερη στα SCC, όπου μάλιστα σχετιζονταν άμεσα με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου³⁹⁹. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην

έκφραση του VEGF και στην μικροαγγειακή πυκνότητα παρατήρησε η Loggini μελετώντας 26 BCC και 11 SCC, με τα ακανθοκυτταρικά να παρουσιάζουν αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα σε σχέση με τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα²⁸¹.

Τέλος σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη (2010) οι ερευνητές σύγκριναν την ITMVD και την PTMVD ανάμεσα σε βασικοκυτταρικά καρκινώματα και σε καλοήθεις εξαρτηματικούς όγκους που ιστολογικά μοιάζουν με BCC. Όλοι οι τύποι των νεοπλασμάτων παρουσίασαν χαμηλή ITMVD με μόνη διαφορά στην μέτρηση της PTMVD, η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη στα BCC σε σχέση με τα αμιγώς καλοήθη νεοπλάσματα, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με την διαφορετική βιολογική συμπεριφορά των BCC ως προς την ικανότητα διηθητικής ανάπτυξης τοπικά. Η συγκεκριμένη ομάδα πρότεινε την ανοσοϊστοχημική ανάδειξη της υψηλής PTMVD ως χρήσιμη πληροφορία στην διαφορική διάγνωση των BCC από τους καλοήθεις ιστολογικούς μιμητές τους⁴⁰⁰.

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από το σύνολο των μελετών είναι ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα και η έκφραση του VEGF στους επιθηλιακούς δερματικούς όγκους μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τον διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδες με διαφορετική πρόγνωση και συνεπώς διαφορετική θεραπευτική στρατηγική και πρωτόκολλο παρακολούθησης. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτεί κανείς την ανατομική ιδιαιτερότητα που παρουσιάζει η περιοχή των βλεφάρων σε σχέση με την δυνατότητα χειρουργικής εκτομής του όγκου επί υγιών ορίων καθώς και την εξασφάλιση ενός αισθητικά και λειτουργικά αποδεκτού αποτελέσματος. Η μελέτη του αγγεογενετικού δυναμικού της βλάβης μπορεί να προσφέρει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα τοπικής υποτροπής, επιβάλλοντας στενότερη μετεγχειρητική παρακολούθηση και συμπληρωματική ενδεχομένως θεραπεία με τη χρήση τοπικών αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Μια τέτοια προσέγγιση θα είχε πλεονεκτήματα τη διατήρηση του βλεφαρικού ιστού και την ευκολία της τοπικής ενέσιμης εφαρμογής. Σε ένα αρκετά

μεγάλο ποσοστό των καρκινωμάτων που μελετήσαμε, η υψηλή έκφραση των αγγειογενετικών δεικτών αφήνει περιθώριο για μια πιθανή αντιαγγειογενετική θεραπεία στο μέλλον. Το μπλοκάρισμα των αγγειογενετικών μονοπατιών στα αρχικά στάδια ίσως μπορεί να εμποδίσει ή να σταθεροποιήσει την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Η παρουσία αυξημένης PTMVD, δηλαδή αυξημένης νεοπλασματικής αγγειογένεσης, στο όριο εκτομής, όπως αυτό ελέγχεται ιστολογικά, αποτελεί συχνό εύρημα στην παρούσα μελέτη. Δεν είναι απίθανο να υποδηλώνει μικροσκοπική νεοπλασματική διασπορά στα εναπομείναντα νεόπλαστα μικροαγγεία και να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής ιδίως στα περισσότερο επιθετικά ακανθοκυτταρικά καρκινώματα. Η υπόθεση αυτή βέβαια απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση με μεγαλύτερες σειρές ασθενών υπό στενή και μακροχρόνια μετεγχειρητική παρακολούθηση.



Εικόνα 28. VEGF χρώση σε BCC το οποίο εκτείνεται μέχρι και το χειρουργικό όριο εκτομής (βέλος)

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μόνο ένα περιστατικό υποτροπής BCC, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα που αυτή έλαβε χώρα, το οποίο όπως προέκυπτε από την ιστοπαθολογική έκθεση αφορούσε όγκο ατελώς εξαιρούμενο, που διηθούσε το χειρουργικό όριο εκτομής. Αυτό συμφωνεί και με τα γενικώς χαμηλά ποσοστά υποτροπής του BCC όταν αυτό αφαιρεθεί σωστά. Το δείγμα αυτό εξαιρέθηκε από την μελέτη για λόγους αξιοπιστίας των στατιστικών αποτελεσμάτων. Επίσης παρατηρήθηκαν και 9 ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν περισσότερο από μια φορά BCC στα βλέφαρα. Η ομάδα αυτή δεν φάνηκε να διαφέρει με τα υπόλοιπα BCC ως προς τους παράγοντες αγγειογένεσης που μελετήσαμε, όμως το δείγμα είναι αρκετά μικρό για ασφαλή εξαγωγή στατιστικών συμπερασμάτων και χρειάζεται μια μεγαλύτερη σειρά για να απαντήσει στο ερώτημα εάν ασθενείς με προδιάθεση να εμφανίσουν πολλαπλά BCC στα βλέφαρα και αλλού, εμφανίζουν όγκους με διαφορά στο αγγειογενετικό τους προφίλ. Στην μελέτη των Ho και συνεργατών του, προτείνεται η μόνο για ένα εξάμηνο παρακολούθηση ασθενών με οζώδες πρωτοπαθές BCC πλήρως εξαιρεθέν, καθώς στην ομάδα αυτή δεν εμφανίσθηκε υποτροπή καρκινώματος. Προτείνουν επίσης, περίοδο παρακολούθησης 5 ετών για ασθενείς με σκληρωτικό BCC η υποτροπιάζον, καθώς το ποσοστό υποτροπής του όγκου αυτού βρέθηκε να είναι 3.8% και 3.6% αντίστοιχα, μέσα στην πενταετία από την αφαίρεσή του⁴⁰¹. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η περίοδος παρακολούθησης δεν χρειάζεται να είναι η ίδια για όλους τους ασθενείς καθώς μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα χρήσιμη αλλά και να αυξάνει το υγειονομικό κόστος. Αντίθετα απαιτείται μια πιο εξατομικευμένη παρακολούθηση που αφορά πέρα από τον ιστολογικό τύπο του όγκου, την εντόπισή του, την ηλικία του ασθενούς και πιθανώς το αγγειογενετικό προφίλ του, ειδικά αυτό που καθορίζεται από την μικροαγγειακή πυκνότητα εντός του όγκου, στην περιφέρεια του και στο χειρουργικό όριο εκτομής, όπως προηγουμένως αναφέρθηκε.

Αξιολογήθηκε επιπλέον η έκφραση τριών υποδοχέων του VEGF (Flt-1, Flk-1, Flt-4) στα

νεοπλασματικά κύτταρα των υπό μελέτη επιθηλιακών δερματικών όγκων. Η έκφραση και η λειτουργία των υποδοχέων του VEGF στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι σε γενικές γραμμές γνωστή, η σημασία της έκφρασής τους όμως από τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί³⁶³. Υποδοχείς του VEGF έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα μελανώματος³⁵⁸, καρκινώματος του μαστού²⁴⁸⁻²⁵⁰, σαρκώματος Καρσί³⁵⁹, καρκινώματος πνεύμονα³⁷², πεπτικού καρκινώματος^{370,371}, αδενοκαρκινώματος του προστάτη³⁵⁷ καθώς και σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου³⁷⁶. Για κάποια από τα παραπάνω νεοπλάσματα έχει τεκμηριωθεί αυτοκρινής δράση του VEGF, ο οποίος διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων που τον εκκρίνουν και φέρουν ταυτόχρονα και τους υποδοχείς του. Αυτή την υπόθεση μελετήσαμε στα δείγματά μας.

Πράγματι, βρέθηκε ότι η έκφραση του VEGF συμβαδίζει με τη έκφραση των υποδοχέων του κυρίως στα βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Συγκεκριμένα αναμένεται υψηλή έκφραση των υποδοχέων του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα σε όγκους με υψηλή έκφραση VEGF και το αντίστροφο. Επιπλέον η έκφραση των υποδοχέων του σχετίζεται με την μέση διάμετρο του όγκου, με τον Flk-1 να παρουσιάζει την ισχυρότερη αρνητική συσχέτιση. Στη μελέτη μας, καρκινώματα τα οποία αποκτούν ένα ορισμένο μέγεθος φαίνεται ότι εμφανίζουν σχετικά χαμηλή έκφραση των υποδοχέων του VEGF, κυρίως του Flk-1, ενώ παράλληλα η ασθενής έκφραση του σχετίστηκε με υψηλή έκφραση CD-105. Πιθανόν τα καρκινικά κύτταρα παράγουν VEGF όχι μόνο για να διεγείρουν την νεοπλασματική αγγειογένεση αλλά και για να τον χρησιμοποιήσουν τα ίδια μέσω των υποδοχέων του, ως αυξητικό παράγοντα με αυτοκρινή δράση για την ανάπτυξη του νεοπλάσματος μέχρι να επιτευχθεί ικανοποιητικό μικροαγγειακό δίκτυο το οποίο θα αναλάβει την περαιτέρω εξάπλωση της νόσου.

Οι παρατηρήσεις μας σχετικά με την έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του στους

επιθηλιακούς δερματικούς όγκους θα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες σειρές νεοπλασμάτων με περισσότερα δείγματα από τις κατηγορίες των προκαρκινικών αλλοιώσεων, των βασικοπλακωδών και των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με τον ρόλο τους στην δερματική αγγειογένεση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη των καρκινικών και προκαρκινικών δερματικών αλλοιώσεων των βλεφάρων μας οδήγησε στα ακόλουθα συμπεράσματα, αλλά και σε υποθέσεις που πρέπει να επιβεβαιωθούν μελλοντικά.

1. Τα BCC κυρίως αλλά και οι υπόλοιποι καρκίνοι υπερέκφρασαν σε μεγάλο ποσοστό τόσο τον CD-105, όσο και τον VEGF.
2. Η μικροαγγειακή πυκνότητα σχετίστηκε έντονα θετικά τόσο περι-ογκικά όσο και ενδο-ογκικά με την έκφραση VEGF.
3. Αντίθετα οι υποδοχείς του VEGF και κυρίως ο Flk-1 σχετίστηκαν αρνητικά με το αυξημένο μέγεθος του όγκου, ιδιαίτερα όταν η αλλοίωση έχει αποκτήσει ένα ικανό μικροαγγειακό δίκτυο.
4. Όλοι οι υποδοχείς VEGF σχετίστηκαν έντονα θετικά με τον VEGF.
5. Οι προκαρκινικές αλλοιώσεις φάνηκε να εμφανίζουν ασθενέστερο αγγειογενετικό προφίλ σε σχέση με τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα, ενώ τα τελευταία έδειξαν να υστερούν αγγειογενετικά σε σχέση με τα επιθετικότερα βασικοπλακώδη και ακανθοκυτταρικά.
6. Ουδεμία διαφοροποίηση προέκυψε στην ομάδα των BCC με μοναδική εμφάνιση και σε αυτών με πολλαπλή. Πιθανώς να χρειάζεται μια μελέτη με ικανό αριθμό ασθενών με πολλαπλή εμφάνιση BCC.
7. Η αξιολόγηση της μικροαγγειακής εισβολής στο χειρουργικό όριο της εκτομής του όγκου, ενδεχόμενα μπορεί να αποβεί ωφέλιμη στην πρόβλεψη της έκβασης της θεραπείας.
8. Το ενισχυμένο αγγειογενετικό προφίλ των συγκεκριμένων νεοπλασιών και ιδιαίτερα των BCC, που μελετήθηκαν εκτενέστερα, ενισχύει την ανάγκη για μελέτες πάνω στην αντιαγγειογενετική θεραπεία αυτών των αλλοιώσεων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογένεση στους συμπαγείς όγκους είναι μια διαδικασία αποτελούμενη από πολλά στάδια και ρυθμιζόμενη από διάφορους παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια με τελικό σκοπό την δημιουργία ενός αγγειακού δικτύου ικανού για την ανάπτυξη του όγκου. Η νεοπλασματική νεοαγγείωση είναι απαραίτητη συνθήκη για να εκδηλώσει ο όγκος το αυξητικό και μεταστατικό του δυναμικό. Κατά τη διεργασία αυτή, η ισορροπία μεταξύ αναστολέων της αγγειογένεσης και διεγερτών της, διαταράσσεται. Κυρίαρχο ρόλο στη διαταραχή αυτή αποδείχτηκε ότι διαδραματίζει ο παράγοντας VEGF, ο οποίος αποτέλεσε αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών τα τελευταία 20 χρόνια. Παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα φυσιολογικά στρωματικά και ασκεί τη δράση του μέσω της διασύνδεσής του με τους υποδοχείς VEGF-R1 (Flt-1) και VEGF-R2 (Flk-1). Η ανάδειξη της νεοπλασματικής αγγείωσης ως σημαντικού παράγοντα στην καρκινογένεση, έθεσε την ανάγκη για την ποσοτική της καταμέτρηση. Αυτό κατέστη δυνατό με την ανοσοϊστοχημεία και τα αντισώματα έναντι ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως το CD-105. Αυτά απεδείχθησαν πιο ειδικά από τους πανενδοθηλιακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν και καθιέρωσαν την μικροαγγειακή πυκνότητα σημαντικό δείκτη βιολογικής συμπεριφοράς και κλινικής έκβασης σε μια σειρά νεοπλασιών.

Η λεμφαγγειογένεση στα νεοπλάσματα αποτελεί πεδίο αντιπαράθεσης για το αν είναι μια διαδικασία παθητική ή αν συμβάλλει στην ενεργό λεμφαγγειακή προσβολή και στη διασπορά των καρκινωμάτων. Έρευνες την συνδέουν με την μεταστατική ικανότητα ορισμένων όγκων, ενώ άλλες μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν τη λεμφαγγειογένεση ως δείκτη εκτίμησης της επιθετικότητας κάποιων νεοπλασιών. Οι παραπάνω προβληματισμοί ενισχύονται περαιτέρω καθώς δεν υπάρχει τέτοιος λεμφαγγειακός δείκτης που θα αναδείξει με ευαισθησία και ειδικότητα την ενεργό καρκινική λεμφαγγειογένεση.

Οι εξεργασίες στο δέρμα των βλεφάρων είναι μια συχνά απαντώμενη πάθηση στην κλινική πράξη του οφθαλμίατρου. Η διάκριση αυτών των βλαβών είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς ακολουθούν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Οι πλέον συνήθεις αφορούν το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και σπανιότερα το μετατυπικό, το ακανθοκυτταρικό και τις προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις. Η συσχέτιση της αγγειογένεσης και της λεμφοαγγειογένεσης έχει να αναδείξει πλήθος εργασιών που αφορούν κυρίως το κακόηθες μελάνωμα και λιγότερο τους επιθηλιακούς δερματικούς όγκους. Δε βρέθηκε να γίνεται διάκριση για τα καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων, για τα οποία κυρίως η αντιμετώπισή τους εμφανίζει ιδιαιτερότητες, όπως η όσο το δυνατόν διατήρηση λειτουργικού ιστού και η επίτευξη ικανοποιητικού αισθητικού αποτελέσματος, σε συνδυασμό με την πλήρη αφαίρεση του όγκου.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφοαγγειογένεσης στα βασικοκυτταρικά και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος των βλεφάρων καθώς και στις προκαρκινικές αλλοιώσεις αυτών, με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των κύριων παραγόντων ελέγχου των παραπάνω διεργασιών και στη συσχέτιση της τυχόν προγνωστικής αξίας των αποτελεσμάτων με την κλινική έκβαση των ασθενών.

Μελετήθηκαν συνολικά 137 ασθενείς με ιστολογικά παρασκευάσματα που ανήκαν σε 4 τύπους νεοπλασιών. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 113 βασικοκυτταρικά, 6 βασικοπλακώδη, 10 ακανθοκυτταρικά και 18 προκαρκινικές αλλοιώσεις. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση για τους παράγοντες VEGF, Flt-1, Flk-1, Flt-4 και CD-105. Αξιολογήθηκε η έκφρασή τους, μετρήθηκε η μικροαγγειακή πυκνότητα και έγινε έλεγχος της συσχέτισης των παραγόντων αυτών μεταξύ τους αλλά και με κλινικές

παραμέτρους όπως η εξέλκωση, η φλεγμονή, το φύλο, η ηλικία, το μέγεθος και η εντόπιση των όγκων.

Από τη μελέτη προέκυψε ένα υψηλό ποσοστό υπερέκφρασης των αγγειογενετικών δεικτών γενικότερα, ακολουθούμενο από έναν ικανό αριθμό περιστατικών τα οποία εμφάνισαν χαμηλή έκφραση αυτών. Η μηδενική έκφραση αποτέλεσε ένα σπάνιο γεγονός. Συγκεκριμένα ο VEGF εμφάνισε ισχυρή έκφραση και συσχετίστηκε έντονα με τους υποδοχείς του Flt-1, Flk-1, Flt-4 και με την μικροαγγειακή πυκνότητα, εκφραζόμενη από τον παράγοντα CD-105. Βρέθηκε θετική συσχέτιση τόσο με την ενδο-ογκική όσο και με την περι-ογκική νεοπλασματική αγγείωση. Επιπλέον ισχυρά σχετίστηκαν μεταξύ τους η εντός και περίξ του όγκου νεοαγγείωση, δείχνοντας τους κοινούς μηχανισμούς που διέπουν την αύξηση του αγγειακού δυναμικού του όγκου και την επιρροή του από τον παράγοντα VEGF. Οι υποδοχείς VEGF και κυρίως ο Flk-1, σχετίστηκαν αρνητικά με το μεγάλο μέγεθος των όγκων. Τα προς μελέτη καρκινώματα βρέθηκε να εμφανίζουν μειωμένη έκφραση υποδοχέων VEGF, όταν φτάσουν ένα κρίσιμο μέγεθος και όταν το αγγειογενετικό τους δυναμικό γίνει επαρκές. Ο παράγοντας VEGF έδειξε να μην επηρεάζεται από το μέγεθος του όγκου, ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, η έκφραση του παράγοντα CD-105 συσχετίστηκε θετικά με τη διάμετρο των καρκινωμάτων, φανερώνοντας την ανάγκη επίτευξης ικανού νεοαγγειακού δικτύου προκειμένου ο όγκος να αναπτύξει το αυξητικό του δυναμικό.

Η σύγκριση των ομάδων των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων με τα μετατυπικά, τα πλακώδη και τις προκαρκινικές αλλοιώσεις ανέδειξε την μικροαγγειακή πυκνότητα ως ικανό δείκτη διάκρισης μεταξύ τους. Μια σειρά με περισσότερα περιστατικά από τις σπανιότερες νεοπλασίες, πιθανώς να ενισχύσει τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Η έκφραση του CD-105 βρέθηκε χαμηλότερη στη νόσο Bowen και την ακτινική κεράτωση και με αυξητική τάση όσο προχωρούμε προς τα ΒΚΚ και τις επιθετικότερες μορφές των

δερματικών κακοηθειών. Ουδεμία διαφοροποίηση προέκυψε κατά τη σύγκριση των ΒΚΚ με μια υποομάδα ΒΚΚ με πολλαπλή εμφάνιση του όγκου όσον αφορά το αγγειογενετικό τους δυναμικό. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αντικειμενική απουσία διαφοροποίησης, είτε σε στατιστική αδυναμία δεδομένου του μικρού αριθμού των περιστατικών στην ομάδα των ΒΚΚ πολλαπλής εμφάνισης. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε αρκετά συχνά τα CD-105 θετικά νεοαγγεία να φτάνουν ως το χειρουργικό όριο εκτομής των ΒΚΚ. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα δείκτη διαφοροποίησης των καρκινωμάτων σε επιθετικά η μη και να δώσει πληροφορίες σχετικά με την τάση τους για υποτροπή. Τέλος, η ισχυρή έκφραση των αγγειογενετικών δεικτών από τις δερματικές κακοήθειες των βλεφάρων, καθιστά δυνατή την πιθανότητα η αντιαγγειογενετική θεραπεία να εφαρμοσθεί στο μέλλον ως μια υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική.

ABSTRACT

The angiogenesis in solid tumors is a process consisting of several stages and regulated by various factors and signaling pathways in order to ultimately create a vascular network necessary for tumor growth. Tumor neovascularization is a prerequisite for the indicated volume growth and metastatic potential. In this process, the balance between inhibitors of angiogenesis, stimulators and inducers is being disturbed. It is proven that the dominant role in this disorder plays the VEGF factor, which has been the subject of extensive research over the last 20 years. Produced by tumor cells and normal stromal, exerts its effects through its interaction with its receptors, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (Flk-1). The emergence of tumor vasculature as an important factor in carcinogenesis, raised the need for its quantitative measurement. This was made possible by immunohistochemistry and antibodies against activated endothelial cells, such as the CD-105. These proved to be more specific than their panendothelial indicators used in the past and have established the microvascular density as an important indicator for biological behavior and clinical outcome in a number of neoplasms.

The lymphangiogenesis in tumors is a controversial matter, whether it is a passive process or if it contributes to active lymphatic infestation and spread of tumors. Research associate with the metastatic ability of some tumors, while other studies failed to show lymphangiogenesis as an indicator assessment of aggressiveness of some cancers. These concerns are further enhanced as there is no such lymphatic marker capable of presenting sensitivity and specificity of the active tumor lymphangiogenesis.

The lesions on the skin of the eyelids is a commonly encountered medical condition in clinical practice of the ophthalmologist. The distinction of these lesions is of particular importance, as they follow different biological behavior. The most commonly found is the

basal cell carcinoma, while basosquamous and squamous cell carcinoma and precancerous lesions are rare. The correlation of angiogenesis and lymphangiogenesis has brought up many works related mainly to malignant melanoma and less to epithelial skin tumors. No research was found to discriminate cutaneous tumors of the eyelids, for which mainly concern is the excision of as lesser tissue as possible and also maintaining tissue function and satisfactory aesthetic result, combined with the complete removal of the tumor.

The aim of this research was to study angiogenesis and lymphangiogenesis in basal and squamous cell carcinomas of the eyelid skin and in precancerous lesions, using immunohistochemical techniques. Specifically, particular emphasis was placed on quantitative assessment of expression of the main factors controlling these processes and the relationship of any predictive value of the results with the clinical outcome of patients.

We studied 137 patients with histological preparations belonging to four types of growths. We studied 113 BCC, 6 BSC, 10 SCC and 18 precancerous lesions. In these samples, immunohistochemical staining was performed for the factors VEGF, Flt-1, Flk-1, Flt-4 and CD-105. After their expression was evaluated, we measured microvessel density and an inspection was made of the association of these factors with each other and with clinical parameters such as ulceration, inflammation, sex, age, size and location of the tumors.

The study has shown a high rate of overexpression of angiogenic markers in general, followed by a sufficient number of specimens which showed low expression of them. The null expression was a rare event. Specifically VEGF showed strong expression and correlated strongly with the receptors Flt-1, Flk-1, Flt-4 and the microvascular density, expressed by the agent CD-105. We found a positive correlation with both intratumoral and peritumoral vascularization. Intensely strong was the association of neovascularization in and around the tumor, suggesting common mechanisms governing the growth potential of vascular volume and the influence of the factor VEGF. VEGF receptors and particularly

the Flk-1, was negatively correlated with the large sized tumors. The study of those carcinomas was found to exhibit decreased receptor expression of VEGF, when they reach a critical size and the angiogenic potential became adequate. The factor VEGF has been shown to be unaffected by the size of the tumor, while as expected, the expression of factor CD-105 correlated with the diameter of tumor, demonstrating the need to achieve sufficient neovasculature in order to develop the volume of the growth potential .

The comparison of groups of BCC with the more rare BSC, SCC and precancerous lesions revealed microvascular density as a marker capable of distinguishing between them. A larger series of cases of rare tumors, will presumably reinforce the findings of this study. The expression of CD-105 was lower in Bowen's disease and solar keratosis and eventually rising as we move to BCC and more aggressive forms of skin malignancies. No differentiation on the angiogenic potential emerged, when comparing BCC and a subgroup of BCC with multiple tumor appearance. This may be due to either lack of objective differentiation, either in a statistical impossibility, given the small number of cases in the group of BCC with multiple appearance. In this study, it was found quite often that CD-105 positive neovascular cells reach as far as the surgical excision boundary of many BCC specimens. This could be a dissimilarity index of carcinomas in aggressive and non-aggressive and give information about their recurrence tendency. Finally, the strong expression of angiogenic markers of cutaneous malignancies of the eyelids remains a fact in our study, allowing the possibility that the antiangiogenic therapy could be applied in the future as a promising therapeutic strategy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Elder E.D, Elentitsas R. Levers Histopathology of the skin, L.W&W, 9th ed. Ch.29-30 (2004).
2. Ιωάννης Χατζής, Βασική Δερματολογία – Αφροδισιολογία Τόμος Β (1994)
3. Marks R. An overview of skin cancers: incidence and causation. *Cancer*;75:607-612 (1995).
4. Gun Lindgren, Brian L Diffey, Olle Larko. Basal cell carcinoma of the eyelids and solar ultraviolet radiation exposure. *Br J Ophthalmol*;82:1412-1415 (1998).
5. Myron Yanoff and Jay S Duker Ophthalmology 3nd Edition (2009).
6. Jack J Kanski, Brad Bowling. Clinical Ophthalmology a systemic approach 7th Ed. (2011)
7. Neale RE, Davis M, Pandeya N, Whiteman DC, Green AC. Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure. *J Am Acad Dermatol.* 2;56(3):380-6. (2007)Epub 2006 Oct 13.
8. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th ed. (2012)
9. Marc Heckman, MD; Frank Zolgermeier, MD; Birger Konz, MD. Frequency of facial basal cell carcinoma does not correlate with site specific uv exposure. *Arch Dermatol*;138:1494-1497 (2002).
10. Bean DJ, Rees RS, O'Leary JP, Lynch JB. Carcinoma of the hand: a 20 year experience. *South Med J*.;77:998-1000 (1984).
11. Mae R. Gailani, David J. Leffel, AnneMarie Ziegler, Earl G. Gross, Douglas E. Brash, Allen E. Bale. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*;88:349-353(1996).
12. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and

- risk of nonmelanocytic skin cancer. I: basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*;131:157-163(1995).
13. Halder RM, Bridgeman Shah- S. Skin cancer in African Americans. *Cancer*;75:667-773(1995).
14. Abreo F, Sanusi ID. Basal cell carcinoma in north American blacks: clinical and histopathologic study of 26 patients. *J Am Acad Dermatol*.;117:245-251(1991).
15. Αγκάντη Ν.Ι και συνεργάτες, Ειδική Παθολογική Ανατομική, μέρος Β;177-178 (2000).
16. Tomas P. Habif MD, Clinical Dermatology. A color guide to diagnosis and therapy 5th edition, (2009).
17. Gaughan LJ, Bergeron JR, Mullins JF. Giant basal cell epithelioma developing in acute burn site. *Arch Dermatol*;99:594(1969).
18. Margolis MH. Superficial multicentric basal cell epithelioma arising in thermal burn scar. *Arch Dermatol*;102:474(1970).
19. Betti R, Inselvini E, Carducci M, Crosti C. Age and site prevalence of histologic subtypes of basal cell carcinomas. *Int J Dermatol*. 1995;34:174-176 (1995).
20. Ψύλλας Γ.Κ. Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία και στην Νευροοφθαλμολογία, (1996).
21. Leibovitch I, McNab A, Sullivan T, Davis G, Selva D. Orbital invasion by periocular basal cell carcinoma. *Ophthalmology*.;112(4):717-23 (2005).
22. Von Domarus H, Stevens PJ. Metastatic basal cell carcinoma: report of five cases and review of 170 cases in the literature. *J Am Acad Dermatol*;10:1043 (1984).
23. Wermuth BM, Fajardo LF. Metastatic basal cell carcinoma. *Arch Pathol*;90:458(1970).
24. Soffer D, Kaplan H, Weshler Z. Meningeal carcinomatosis due to basal cell carcinoma. *Hum Pathol*;16:530(1985)
25. Farmer ER, Helwig EB. Metastatic basal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 17 cases. *Cancer*;46: 748(1986).

26. Mikhail GR, Nims LP, Kelly AP Jr, et al. Metastatic basal cell carcinoma. (review) *Arch Dermatol*;113:1261(1977).
27. Safai B, Godd RA. Basal cell carcinoma with metastasis. *Arch Pathol* ;101: 327(1977).
28. Niazi ZB, Lamberty BG: Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg* 46: 156, (1993).
29. Ratner D et al: Perineural infiltration in basal cell carcinomas treated with Mohs micrographic surgery. *Cancer* 88:1605 (2000).
30. Carlson KC, Roenigk RK: Know your anatomy: Perineural involvement of basal and squamous cell carcinoma on the face. *J Dermatol Surg Oncol* 16:827 (1990).
31. Rippey JJ: Why classify basal cell carcinomas? *Histopathology* 32: 393 (1998).
32. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. basal cell carcinoma treated with Moh's surgery in Australia I. *J Am Acad Dermatol.*;53(3):445-51 (2005).
33. Chakrabarty A, Geisse JK, Medical Therapies for Non-Melanoma Skin Cancer. *Clinics in Dermatology*;22: 183-8 9(2004).
34. Rowe DE et al: Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: Implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol* 15: 315 (1989).
35. Rowe DE et al: Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 15: 424 (1989).
36. Wolf DJ, Zitelli JA: Surgical margins for basal cell carcinoma: *Arch Dermatol* 123:340 (1987).
37. Roenigk RK. Mohs' micrographic surgery. *Mayo Clin Proc*;63:175 -83 (1987).
38. Swanson NA. Mohs surgery: technique, indications, applications and the future. *Arch Dermatol*;119:761-73 (1983).
39. Waltz K, Margo CE. Mohs micrographic surgery. *Ophthalmol Clin North Am*;4: 153-63(1991).

40. Mohs FE. Micrographic surgery for microscopically controlled excision of eyelid tumors. *Arch Ophthalmol.*;104: 901-9 (1986).
41. Simon GB, Schwarcz RM, et al. Orbital Exenteration: One Size Does Not Fit All. *Am J Ophthalmology*;139: 11-8 (2005)
42. Pieh S, Kuchar A, Novak P, Kunstfeld R, Gunda N, Steinkogler FJ. Long term results after surgical basal cell carcinoma excision in the eyelid region. *Br J Ophthalmol* ;83:85-88 (1999).
43. Torre D. Cryosurgery of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 15: 917-929, (1986).
44. Tuppurainen K. Cryotherapy for eyelid and periocular basal cell carcinomas : outcome in 166 cases over an 8-year period. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*;233(4):205-8 (1995).
45. Torre D. Cryosurgery of eyelid tumors. In: *Jakobiec FA, ed. Ocular and adnexal tumors*. Birmingham, AL: Aesculapius:517–24 (1978).
46. Kopf AW et al: Curettage-electrodesiccation treatment of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*;113:439 (1977).
47. Spiller W, Spiller RF: Treatment of basal cell epithelioma by curettage and electrodesiccation. *J Am Acad Dermatol* ;11: 808 (1984).
48. Wilson BD, Mang TS, Stoll H. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*;128:1597–601 (1992).
49. Fritsch C et al: Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol*; 134: 207 (1998).
50. Malcolm N. Luxemburg, MD and (by invitation), Troy H. Guthrie, Jr, MD. Chemotherapy of eyelid and periorbital tumors. *Tr. Am. Ophth. Soc. Vol. LXXXIII* (1985).

51. Labanter HP, Ryan RF: 5-fluorouracil in management of Gorlin's syndrome. *N Engl J Med* 298: 913 (1978).
52. Epstein E: Fluorouracil paste treatment of thin basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 121: 207 (1985).
53. Vizek M, Oster MW: Ocular side effects of cancer chemotherapy. *Cancer*;49:1999-2002 (1982).
54. Becher R, Shtitt P, Osieka R, et al. Peripheral neuropathy and ophthalmologic toxicity after treatment with cis-dichlorodiaminoplatinum II. *J Cancer Res Clin Oncol* ;96:219-221 (1980).
55. Ostrow S, Hahn D, Wierni PH, et al: Ophthalmologic toxicity after cis-dichlorodiammineplatinum (II) therapy. *Cancer Treat Rep*;62:1591-1593 (1978).
56. Feun LG, Wallace S, Stewart DJ, et al: Intracarotid infusion of cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of recurrent malignant brain tumors. *Cancer*;54:794-799 (1984).
57. Walsh TJ, Clark AW, Parhad IM, et al: Neurotoxic effects of cisplatin therapy. *Arch Neurol*;39:719-720 (1982).
58. Griffin JD, Garnick MB: Eye toxicity of cancer chemotherapy: A review of the literature. *Cancer*;48:1539-1549 (1981).
59. Pippitt CH, Muss HB, Homesley HD, et al: Case report. Cisplatin associated cortical blindness. *Gynecol Oncol*;12:253-255 (1981).
60. Diamond SB, Rudolph SH, Lubicz SS, et al: Cerebral blindness in association with cis-Platinum chemotherapy for advanced carcinoma of the fallopian tube. *Obstet Gynecol*;59:84S-86S (1989).
61. Geeraert P, Williams JS, Brownell I. Targeting the hedgehog pathway to treat Basal cell carcinoma. *J Drugs Dermatol.*;12(5):519-23 (2013).

62. Vuyk H, Lohuis PJ: Mohs micrographic surgery for facial skin cancer. *Clin Otolaryngol* 26: 265 (2001).
63. Gibbs P, Gonzalez R, Lee LA, Walsh P, Medical Management of Cutaneous Malignancies. *Clinics in Dermatology*;19:298-304 (2001).
64. Seegenschmiedt MH, Oberste-Beulmann S, Lang E, Lang B, Guntrum F, Olschewski T. Radiotherapy for Basal Cell Carcinoma:Local Control and Cosmetic Outcome. *Strahlenther Onkol.*;177:240-6 (2001).
65. Malhotra R, Huigol SC, Huynh NT, Selva D. The Australian Mohs Database, Part I. Periocular Basal Cell Carcinoma Experience over 7 Years. *Ophthalmology*;111:624-30 (2004).
66. Malhotra R, Huigol SC, Huynh NT, Selva D. The Australian Mohs Database, Part II. Periocular Basal Cell Carcinoma Outcome at 5-Year Follow-up. *Ophthalmology*;111:631-6 (2004).
- 67 Kwan W, Wilson D, Moravan V. Radiotherapy for Locally Advanced Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas of the Skin. *Int J Radiation Oncology*;60:406-11 (2004).
68. Buker JL, Amonette RA: Micrographic surgery, *Clin Dermatol*;10:309-315 (1992).
69. Tijn JW, Koorne VL. The optimal follow-up time for basal cell carcinoma of the eyelid. *Doc Ophthalmol.*;75:275-9 (1990).
70. Czarnecki D: The prognosis of patients with basal and squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Dermatol*;37: 656 (1998).
71. Marghoob A, Kopf AW, et al: Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*;28: 22-28 (1993).
72. Karagas MR, Stukel TA, et al: Risk of subsequent basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. Skin Cancer Prevention Study Group, *JAMA*;267: 3305-3310 (1992).

73. Schubert H, Wolfram G, Guldner G. Basaliomrezidive nach behandlung, *Dernatol Monatsschr*;165:89 (1979).
74. Miller SJ: Biology of basal cell carcinoma (Part 1). *J Am Acad Dermatol* 24: 1 (1991).
75. Domarus H, Stevens PJ: Metastatic basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*;10: 1043 (1984).
76. Lo JS et al: Metastatic basal cell carcinoma: Report of 12 cases with a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*;24: 715 (1991).
77. Moro F, de Caro R, de Caro G, Ninfo V. Eyelid basal cell carcinoma with intracranial extension. *Ophthal Plast Reconstr Surg.*;14(1):50-6 (1998).
78. MacCormac H. The relation of rodent ulcer to squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Middlesex Hosp.*; 19: 172–183 (1910).
79. Montgomery H. Basal squamous cell epithelioma. *Arch Dermatol Syphil.*; 18: 50–73 (1928).
80. Lennox B, Wells A. Differentiation in the rodent ulcer group of tumors. *Br J Cancer.*; 5: 195–212 (1951).
81. Burston H, Clay RD. The problems of histological diagnosis in baso-squamous cell carcinoma of the skin. *J Clin Pathol.*; 12: 73–79 (1959).
82. Lever W. Tumors of the epidermal appendages. In: *Lever W, editor. Histopathology of the skin. 4th edition.* London: Pitman: 589–590 (1967).
83. Borel DM. Cutaneous basosquamous carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.*; 95: 293–297 (1973).
84. Schuller DE, Berg JW, Sherman G, Krause CJ. Cutaneous basosquamous carcinoma of the head and neck: a comparative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.*; 87: 420–427 (1979).

85. Lopes de Faria J. Basal cell carcinoma of the skin with areas of squamous cell carcinoma: a basosquamous cell carcinoma? *J Clin Pathol.*; 38: 1273–1277 (1985).
86. Lopes de Faria J, Nunes PH. Basosquamous cell carcinoma of the skin with metastases. *Histopathology*; 12: 85–94 (1988).
87. Maloney ML. What is basosquamous carcinoma? *Dermatol Surg.*; 26: 505–506 (2000).
88. Jones MS, Helm KF, Maloney ME. The immunohistochemical characteristics of the basosquamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.*; 23: 181–184 (1997).
89. Martin RC 2nd, Edwards MJ, Cawte TG, Sewell CL, McMasters KM. Basosquamous carcinoma: analysis of prognostic factors influencing recurrence. *Cancer*; 88: 1365–1369 (2000).
90. Bowman PH, Ratz JL, Knoepp TG, Barnes CJ, Finley EM. Basosquamous carcinoma. *Dermatol Surg.*; 29: 830–832 (2003).
91. Igal Leibovitch, MD; Shyamala C. Huilgol, M.B.B.S.; Dinesh Selva, M.B.B.S.; Shawn Richards, M.B.B.S.; Robert Paver, M.B.B.S. Basosquamous Carcinoma Treatment with Mohs Micrographic Surgery. *Cancer*; 104:170-5(2003).
92. Kwitko ML, Boniuk M, Zimmerman LE. Eyelid tumours with reference to lesions confused with squamous cell carcinoma. I. Incidence and errors in diagnosis. *Arch Ophthalmol* ;69:693–7 (1963).
93. Aurora A, Blodi F. Lesions of the eyelids. A clinicopathologic study. *Surv Ophthalmol*;15:94–104 (1970).
94. Kwitko ML, Boniuk M, Zimmerman LE. Eyelid tumors with reference to lesions confused with squamous cell carcinoma. 1. Incidence and errors in diagnosis. *Arch Ophthalmol*. 69: 693-7 (1963).
95. Lederman M. Discussion of carcinomas of conjunctiva and eyelid. In *Boniuk M, ed. Ocular and adnexal tumors*. St Louis: CV Mosby; 104-9 (1964).

96. Kwa RE, Campana K, Moy RL: Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 26: 1-26 (1992).
97. Κύζας Π. Μελέτη της αγγειογένεσης και της λεμφαγγειογένεσης στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2006).
98. M J Donaldson, T J Sullivan, K J Whitehead, R M Williamson. Squamous cell carcinoma of the eyelids. *Br J Ophthalmol*;86:1161-1165 (2002).
99. Johnson TM et al: Squamous cell carcinoma of the skin. *J Am Acad Dermatol* 26: 467 (1992).
100. Chuang TY et al: Nonmelanoma skin cancer in Japanese ethnic Hawaiians in Kauaii, Hawaii: An incidence report. *J Am Acad Dermatol* 33: 422 (1993).
101. Winkleman RK et al: Squamous cell carcinoma produced by ultraviolet light in hairless mice. *J Invest Dermatol* 40: 217 (1963).
102. Miller DL, Weinstock MA: Nonmelanoma skin cancer in the United States: Incidence. *J Am Acad Dermatol* 30: 774 (1994).
103. Stern RS, Lange R: Nonmelanoma skin cancer occurring in patients treated with PUVA five to ten years after first treatment. *J Am Invest Dermatol* 91: 120 (1998).
104. Maclean H, Dhillon B, Ironside J. Squamous cell carcinoma of the eyelid and the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol*;121:219-21 (1996).
105. Weimar VM et al: Aggressive biologic behavior of basal and squamous cell cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia or chronic lymphatic lymphoma. *J Dermatol Surg Oncol* 5: 609 (1979).
106. Haas AF, Tucker SM. Squamous cell carcinoma. In *Mannis MJ, Macsai MS, Huntley AC, eds. Eye and skin disease*. Philadelphia: Lippincott Raven: 405-11 (1996).

107. Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet*;1:795–6 (1988).
108. Byron J. Baily Head and Neck Surgery-Otolaryngology 4th Edition, Vol. 2 (2001).
109. Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv Ophthalmol*;39:429–50 (1995).
110. Yang J, Foster CS. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Int Ophthalmol Clin*;37:73–85 (1997).
111. Howard GR, Nerad JA, Carter KD, et al. Clinical characteristics associated with orbital invasion of cutaneous basal cell and squamous cell tumours of the eyelid. *Am J Ophthalmol*;113:123–33 (1992).
112. Rathbun JE, Beard C, Quickert MH. Evaluation of 48 cases of orbital exenteration. *Am J Ophthalmol*:72:191–1 (1971).
113. Malhotra R, Huilgol SC, Huynh NT, Selva D. The Australian Mohs Database: periocular squamous cell carcinoma. *Ophthalmology*;111(4):617-23 (2004).
114. Arons MS, Lynch JB, Lewis SR, et al. Scar tissue carcinoma. I. A clinical study with special reference to burn scar carcinoma. *Ann Surg*;161:170 (1965).
115. Martin H, Strong E, Spiro RH. Radiation - induced skin cancer of the head and neck. *Cancer*;25:61 (1970).
116. Nixon RL, Dorevitch AP, Marks R. Squamous cell carcinoma of the skin: accuracy of clinical diagnosis and outcome of follow-up in Australia. *Med J Aust*;144:235–6 (1986).
117. Bernstein SC, Lim KK, Brodland DG, et al. The many faces of squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg*;22:243–54 (1996).
118. Lowe ASJ, Ιστολογία του Ανθρώπου, μετάφραση Κίττας Χ., 2^η έκδοση, 355-375 (1998)
119. Font RL. Eyelids and lacrimal drainage system. In: *Spencer WH, ed. Ophthalmic*

pathology: an atlas and textbook, 4th ed, Vol 4. Philadelphia: WB Saunders: 2218-443 (1996)

120. WHO Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumors of the Head and Neck, WHO Ed; (2004)

121. Nemet AY, Deckel Y, Martin PA, Kourt G, Chilov M, Sharma V, Bengier R. Management of periocular basal and squamous cell carcinoma: a series of 485 cases. *Am J Ophthalmol.*;142(2):293-7 (2006).

122. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Hill D, Richards S, Paver R. Cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery in Australia II. Perineural invasion, *J Am Acad Dermatol.*;53(2):261-6 (2005).

123. Petsuksiri J, Frank SJ, Garden AS, Ang KK, Morrison WH, Chao KS, Rosenthal DI, Schwartz DL, Ahamad A, Esmaeli B. Outcomes after radiotherapy for squamous cell carcinoma of the eyelid. *Cancer.*1;112(1):111-8 (2008).

124. Rossi R, Puccioni M, Mavilia L, Campolmi P, Mori M, Cappuccini A, Reali EF, Cappugi P. Squamous cell carcinoma of the eyelid treated with photodynamic therapy. *J Chemother.*;16(3):306-9 (2004).

125. Brodland DG, Zitelli JA: Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 27: 241 (1992).

126. Drake LA et al: Guidelines of care for Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol.*;33: 271 (1995).

127. Rowe DE et al: Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 26: 976 (1992).

128. Turner RJ et al: A retrospective study of outcome of mohs micrographic surgery for

- cutaneous squamous cell carcinoma using formalin fixed sections. *Br J Dermatol* 142: 752 (2000).
129. Kersten RC, Ewing Chow D, Kulwin DR, et al. Accuracy of clinical diagnosis of cutaneous eyelid lesions. *Ophthalmology*; 104:479–84 (1997).
130. Green A, Leslie D, Weedon D. Diagnosis of skin cancer in the general population: clinical accuracy in the Nambour survey. *Med J Aust.*;148: 447–50 (1998).
131. Bernstein SC, Lim KK, Brodland DG, et al. The many faces of squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg*;22: 243–54 (1996).
132. Karagas MR. Occurrence of cutaneous basal cell and squamous cell malignancies among those with a prior history of skin cancer. *J Invest Derm*;102 (Suppl):10S–13S (1994).
133. Weisberg NK et al: Combined sentinel lymphadenectomy and Mohs micrographic surgery for high risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 43: 483 (2000).
134. Salasche SJ, Cheney ML: Recognition and management of the high risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Curr Probl Dermatol*;5: 141 (1993).
135. Brownstein MH, Rabinowitz AD. The precursors of cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol*;18:1 (1979).
136. Epstein JH. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol*;9:487 (1983).
137. Salasche SJ: Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 42: S4 (2000).
138. Frost CA, Green AC: Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 131: 455 (1994).
139. Drake LA et al: Guidelines for the care of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 32: 95 (1995).

140. Lober BA et al: Actinic keratosis is squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 43:881 (2000).
141. Trimas SJ et al: The carbon dioxide laser: An alternative for the treatment of actinically damaged skin. *Dermatol Surg*;23: 885 (1997).
142. Thompson SC et al: Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *N Engl J Med* 329: 1147 (1993).
143. Marks R et al: Malignant transformation of solar keratosis to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1: 795 (1988).
144. Scott KR, Kronish JW. Premalignant lesions and squamous cell carcinoma. In: *Albert DM, Jakobiec FA, eds. Principles and practice of ophthalmology: clinical practice, vol 3.* Philadelphia:WB Saunders; 1733-44 (1994).
145. Marks R et al: The relationship of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratosis. *Arch Dermatol* 1224: 1039 (1998).
146. Green A, Battistuta D: Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk Australian population. *Int J Cancer* 46: 356 (1990).
147. Kao GF. Editorial: carcinoma arising in Bowen's disease. *Arch Dermatol*;122:1124 (1986).
148. The Wills Eye Manual: Office and Emergency Room Diagnosis and Treatment of Eye Disease (2012).
149. Reed W, Oppedal BR, et al: Immunohistology is valuable in distinguishing between Paget's disease, Bowen's disease and superficial spreading malignant melanoma, *Histopathology* 16: 583-585 (1990).
150. P.D. Trevor-Roper, Department of Pathology, Institute of Ophthalmology, University of London. Intraepithelial epithelioma, Bowen's disease. *Br J Ophthalmol* ;41:167-173 (1957).

151. Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. Human embryology. *Baltimore: Williams & Wilkins* (1962).
152. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581–611 (2004).
153. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91 (1995).
154. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674 (1997).
155. Zammaretti P, Zisch AH. Adult ‘endothelial progenitor cells’. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol*;37:493–503 (2005)
156. Karamysheva A.F. Mechanisms of angiogenesis. *Biokhimiya* ;73:7;935-948 (2008)
157. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM 1997 Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964–967 (1997)
158. Aghi M, Chiocca EA. Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors. *Mol Ther*;12:994–1005 (2005).
159. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*;13:61–67 (2002).
160. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*;91:3527–61 (1998).
161. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*;438:937–45 (2005).
162. Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* ;9:789–795 (2003).
163. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*;9:653–660 (2003).

164. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*;9:685–693 (2003).
165. Dvorak HF. Angiogenesis: update. *J Thromb Haemost*;3:1835–42 (2005).
166. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;17:605–19 (1997).
167. Auguste P, Lemièrè S, Larrièu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*;54:53–61 (2005).
168. Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 6:73–85 (1945).
169. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*;34:185–94 (2000).
170. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*;86:353–64 (1996).
171. Roskoski J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*;62: 179-213 (2007).
172. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*;219:983–5 (1983).
173. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*;161:851–8 (1989).
174. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*;84:1470–8 (1989).
175. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and

- NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*;50:1774–8 (1990).
176. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*;56:549–80 (2004).
177. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*;18:363–74 (1998).
178. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93:1493–1495 (1996)
179. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*;5:1806–1814 (1991).
180. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*;266:11947–11954 (1991).
181. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*;267:26031–26037(1992)
182. Safran M, Kaelin Jr WJ. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest*.111:779–783 (2003).
183. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol*;280:C1367–C1374 (2001)

184. Semenza G. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*;54:17–28 (2003).
185. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*;270:13333–13340 (1995).
186. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*;77:638–643 (1995).
187. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin Jr WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10595–105 (1996).
188. Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol* ;13:29–37 (2002).
189. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677–684 (2003).
190. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*;270:12607–12613 (1995).
191. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*;269:6271–6274 (1994).
192. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*;271:736–741 (1996).
193. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY.

Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*;120:944–947 (1996).

194. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*;83:1342–1347 (1998).

195. Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*;4:336–340 (1998).

196. Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*;82:2135–2142 (1997).

197. Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ, Mukhopadhyay AK. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl*;25:128–139 (2004).

198. Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res*;62:506–511 (2002).

199. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*;105:1589–1594 (2000).

200. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(716) knockout mice. *Nat Med*;7:1048–1051 (2001).

201. Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M. Host

prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med*;197:221–232 (2003).

202. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*;255:989–91 (1992).

203. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*;90:8915–9 (1993).

204. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* ;5:519–24 (1990).

205. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*;126:3015–3025 (1999).

206. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*;87:3336–43 (1996).

207. Clark DE, Smith SK, He Y, et al. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod*;59:1540–8 (1998).

208. Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY, Armstrong DM, Wang W. Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*;195:255–9 (2006).

209. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor.

- Potential of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*;269:25646–54 (1994).
210. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;95:11709–14 (1998).
211. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* ;90:8915–9 (1993).
212. Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem*;273:23410–8 (1998).
213. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*;90:10705–9 (1998).
214. Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J Biol Chem*;276:3222–30 (2001).
215. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A—dependent activation of PLC and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*;20:2768–78 (2001).
216. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*;6:1677–83 (1991).
217. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* ;187:1579–86 (1992).
218. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liverkinase 1 is a

receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*;90:7533–7 (1993).

219. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*;376:62–66 (1995).

220. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*;124:2039–2048 (1997).

221. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem*;274:31047–54 (1999).

222. Millauer B, Witzigmann Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*;72:835–846 (1996).

223. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*;273:11197–11204 (1998).

224. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*;112 RE 21:1–17 (2001).

225. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A dependent activation of PLC and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*;20:2768–2778 (2001)

226. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain

SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*;270:6729–6733 (1995).

227. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*;18:2221–2230 (1999)

228. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, Wang D, Warren RS, Donner DB. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*;275:5096–5103 (2000).

229. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. Snake venom VEGFs exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem* ;278:51985–51988 (2003).

230. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, Sessa WC. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase *Akt*. *Circ Res*;86:892–896 (2000).

231. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*;6:851–860 (2000).

232. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovas Med*;12:13–19 (2002).

233. Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, et al. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol*;170:207–22 (1995).

234. Chen H, Bagri A, Zupicich JA, et al. Neuropilin-2 regulates the development of

selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron*;25:43–56 (2000).

235. Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Herzog Y, Neufeld G. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett*;231:1–11 (2006).

236. Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res*;312:584–93 (2006).

237. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*;5:1099–107 (2006).

238. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol*;515:81–90 (2002).

239. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*;92:735–45 (1998)

240. Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, et al. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem*;274:21217–22 (1999).

241. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem*;275:18040–5 (Erratum: *J Biol Chem*;275:29922). (2000)

242. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*;114:521–32 (1992).

243. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol3_-kinase/Akt signal

transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* ;273:30336–43 (1998).

244. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*;62:2749–2752 (2002).

245. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*;172:1535–45 (1990).

246. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res*;17:99–103 (1997).

247. Volm M, Koomagi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer*;74:64–68 (1997).

248. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*;26:86–91(1995).

249. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res*;56:2013–2016 (1996).

250. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res*;53:4727–4735 (1993).

251. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H,

Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*;56:3004–3009 (1996).

252. Ellis LM, Takahashi Y, Fenoglio CJ, Cleary KR, Bucana CD, Evans DB. Vessel counts and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*;34:337–340 (1998).

253. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Tanaka H, Shibagaki I, Miyahara T, Ishigami S, Imamura M. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer*;77:1704–1709 (1998)

254. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol*;143: 1255–1262 (1993).

255. Nicol D, Hii SI, Walsh M, Teh B, Thompson L, Kennett C, Gotley D. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol*;157:1482–1486 (1997).

256. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*;35:133–137 (1999).

257. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res*;54:276–280 (1994).

258. Sowter HM, Corps AN, Evans AL, Clark DE, Charnock-Jones DS, Smith SK. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab Invest*;77:607–614 (1997).

259. Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H, Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer*;76:1221–1227 (1997).
260. Guidi AJ, Abu Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer*;78:454–460 (1996).
261. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*;359:845–848 (1992).
262. Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH. Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*;82:3741–3747 (1997)
263. Plenat F, Leclere J, Duprez A, Weryha G. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*;86:656–658 (2001).
264. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev*;24:600–632 (2004).
265. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*;362:841–844 (1993).
266. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*;95:1789–1797 (1995).

267. Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res*;56:921–924 (1996).
268. Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF et al. Expression of vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res*;56: 172–81 (1996).
269. Salven P, Heikkila P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br J Cancer*; 76: 930–4 (1997).
270. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell*;3:211–20 (1992).
271. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*;18:4–25 (1997).
272. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med*;174:1275–8 (1991).
273. Klement G, Baruchel S, Rak J, ManS, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*;105:R15–R24 (2000).
274. Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res*;60:5565–5570 (2000).
275. Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD. Vascular endothelial

- growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res*;61:39–44 (2001).
276. Detmar M, Velasco P, Richard L et al. Expression of vascular endothelial growth factor induces an invasive phenotype in human squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*;156:159–67 (2000).
277. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N et al. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med*; 3: 1222–7 (1997).
278. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L et al. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. *Br J Cancer*; 82: 591–600 (2000).
279. Weninger W, Uthman A, Pammer J et al. Vascular endothelial growth factor production in normal epidermis and in benign and malignant epithelial skin tumors. *Lab Invest*;75: 647–57 (1996).
280. Weninger W, Rendl M, Pammer J et al. Differences in tumor microvessel density between squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas may relate to their different biologic behavior. *J Cutan Pathol*; 24: 364–9 (1997).
281. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K, Cervadoro G, Pingitore R, Barachini P, Leocata P, Fontanini G. CD34 Microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*;199:705–712 (2003).
282. Staibano S, Boscaino A, Salvatore G, Orabona P, Palombini I, De Rosa G. The prognostic significance of tumour angiogenesis in nonaggressive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol*;27: 695-700 (1996)
283. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumour angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*;324: 1– 8 (1991).
284. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S,

Gasparini G. Tumour angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*;84: 1875 – 1887 (1992).

285. 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).

286. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*;340: 1120 – 1124 (1992).

287. Gasparini G, Fox SB, Verderio P, Bonoldi E, Bevilacqua P, Boracchi P, Dante S, Marubini E, Harris AL. Determination of angiogenesis adds information to oestrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients. *Clin Cancer Res*;2:1191 – 1198 (1996)

288. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, Vermeulen PB, Bonoldi E, Dirix LY, Ranieri G, Miceli R, Cheresch DA. Vascular integrin avb3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res*;4: 2625 – 2634 (1998).

289. Gasparini G, Harris AL. Prognostic significance of tumour vascularity. In *Antiangiogenic agents in cancer therapy*, Teicher BA (ed) pp 317 – 339. Totowa, NJ: Humana Press (1999).

290. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast carcinoma. *Crit Rev Oncol Haematol*;37: 97 – 114 (2001)

291. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*;32A:2451 – 2460 (1996).

292. Ellis LM, Walker RA, Gasparini G. Is determination of angiogenic activity in human tumours clinically useful?. *Eur J Cancer*;34: 609 – 618 (1998).

293. Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T, Tominaga T. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*;77: 1101 – 1106 (1996).
294. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P, El-Naggar AK, Swanson DA, Fidler IJ, Dinney CP. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol*;158: 735 – 743 (2001)
295. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumour prognosis. *J Natl Cancer Inst*;87: 1603 – 1612 (1995).
296. Borre M, Offersen BV, Nerstrom B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer*;78: 940 – 944 (1998)
297. Bancher-Todesca D, Rosen A, Graf A, Wasicky R, Hohlagschwandtner M, Rebhandl W, Heinze G, Breitenneck G, Gitsch G, Obermair A. Prognostic significance of tumour angiogenesis in primary fallopian tube cancer. *Cancer Lett*;141: 179 – 186 (1999).
298. Cooper RA, West CM, Wilks DP, Logue JP, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD. Tumour vascularity is a significant prognostic factor for cervix carcinoma treated with radiotherapy: independence from tumour radiosensitivity. *Br J Cancer*;81: 354 – 358 (1999).
299. Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, Thorpe PE, Anastasiadis P, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. The angiogenic ‘vascular endothelial growth factor/flk-1/KDR receptor’ pathway in patients with endometrial carcinoma: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer*;92: 2569 – 2577 (2001).
300. Obermair A, Wasicky R, Kaider A, Preyer O, Losch A, Leodolter S, Kolbe H.

Prognostic significance of tumour angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*;138: 175 – 182 (1999)

301. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer*;77: 858 – 863 (1996).

302. Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, Erdogan A, Dertsiz L, Denircan A, Keles N. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol*;54: 940 – 944 (2001).

303. Fujioka S, Yoshida K, Yanagisawa S, Kawakami M, Aoki T, Yamazaki Y. Angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Cancer*;92: 1788 – 1797 (2001).

304. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumour angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*;37: 921 – 926 (1994).

305. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, Mussi A, Ciardiello F, De Laurentiis M, De Placido S, Basolo F, Angeletti CA, Bevilacqua P. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst*;89: 881 – 886 (1997).

306. Edwards JG, Cox G, Andi A, Jones JL, Walker RA, Waller DA, O'Byrne KJ. Angiogenesis is an independent prognostic factor in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*;85: 863 – 868 (2001).

307. Hall NR, Fish DE, Hunt N, Goldin RD, Guillou PJ, Monson RT. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real?. *Surg Oncol*;1: 223 – 229 (1992).

308. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative breast cancer. *Eur J Cancer*;29A:: 1141 – 1145 (1993).

309. Axelsson K, Ljung BM, Moore 2nd DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH. Tumour angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*;87: 997 – 1008 (1995).
310. Costello P, McCann A, Carney DN, Dervan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast cancer. *Hum Pathol*;26:181 – 184 (1995).
311. Goulding Hm, Abdul Rahid NF, Robertson JF, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. Assessment of angiogenesis in breast carcinomas: an important factor in prognosis? *Hum Pathol*;26: 1196 – 1200 (1995).
312. Morphopoulos G, Pearson M, Ryder WD, Howell A, Harris M. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *J Pathol*;180: 44 – 49 (1996).
313. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Wiedner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*;32A: 2474 – 2484 (1996).
314. Vermeulen PB, Libura M, Libura J, O'Neill PJ, Van Dam P, van Marck E, van Oosterom AT, Dirix LY. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*;42: 165 – 172 (1997).
315. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*;5: 278 – 289 (2001).
316. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumours. *BJ of Cancer*;86: 1566-1577 (2002).

317. Seon BK: Expression of endoglin (CD105) in tumor blood vessels. *Int J Cancer*;99:310-311 (2002).
318. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast cancer: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumour prognosis. *Cancer Res*;59: 856 – 861 (1999).
319. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*;7: 3410 – 3415 (2001).
320. 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).
321. 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 a computer aided image analysis system. *Appl Immunohistochem*;3: 75 – 84 (1995).
322. Wakui S, Furusato M, Itoh T, Saraki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastases: a morphometric study. *J Pathol* ;168: 257 – 262 (1992).
323. Visscher DW, Smilanz S, Drozdowicz S, Wykes SM. Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Analyte Quant Cytol Histol*;15: 88 – 92 (1993).
324. Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Micr Res and Tech*;55:92-99 (2001).

325. Aukland K, Reed RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*;73:1-78 (1993).
326. Pullinger BD, Florey HW. Some observations on the structure and functions of lymphatics: their behaviour in local edema. *Br J Exp Pathol* 16:49 (1935).
327. Guyton A., Hall J. Textbook of Medical Physiology, 9th ed. *W.B. Saunders Company, Philadelphia* (1996).
328. Sleeman J.P. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res*;157, 55–81 (2000).
329. Lee FC, Tilghmanm RC. Lymph vessels in rabbit carcinoma, with a note on the normal lymph vessel structure of the testis. *Arch Surg*;26:602-616, (1933).
330. Gilchrist RK. Surgical management of advanced cancer of the breast. *Arch Surg*;61:913-929,(1950).
331. Tanigawa N, Kanazawa T, Satomura K, Hikasa Y, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. Experimental study on lymphatic vascular changes in the development of cancer. *Lymphology*;14:149-154 (1981).
332. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*;60:4324-4327 (2000).
333. Leak LV. Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue – lymph interface. *Microvasc Res*;2:361-391 (1970).
334. Thiele W, Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: A target for cancer therapy? *Journal of Biotechnology*;124:224–241 (2006).
335. Νόννη Α., Πατσούρης Ε. Λεμφικό σύστημα: Λεμφαγγειογένεση και λεμφογενής διασπορά του καρκίνου. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*; 19(1-3): 4-12 (2005).

336. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*;60:203-212 (2000).
337. Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping bindingsites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circ Res*;85:992-999 (1999).
338. Karkkainen M.J., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., Jeltsch M., Jackson D.G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.*;5 (1), 74–80 (2004).
339. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J*;2087-2096 (2000).
340. Sleeman J.P., Krishnan J., Kirkin V., Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc. Res. Tech.*;55 (2), 61–69 (2001).
341. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*;144:789-801 (1999).
342. Bono P., Wasenius V., Heikkilä P., Lundin J., Jackson D.G., Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*;10 (21), 7144–7149 (2004).
343. Vleugel M.M., Bos R., van der Groep P., Greijer A.E., Shvarts A., Stel H.V., van der Wall E., van Diest P.J. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.*;57 (7), 746–751 (2004).
344. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain

- RK. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res*;61:8079-8084 (2001).
345. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*;2:573-583, (2002).
346. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*;98:769-778 (1999).
347. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* ;21:1505-1513, (2002).
348. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*;151:1141-1152 (1997).
349. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kreihuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*;154:385-394 (1999).
350. Weninger W, Partanen TA, Breiteneder-Geleff S, Mayer C, Kowalski H, Mildner M, Pammer J, Struzl M, Kerjaschki D, Alitalo K, Tschachler E. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest*;79:243-251 (1999).
351. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* ;82:1255-1257 (2002).

352. Zeng Y., Opeskin K., Horvath L.G., Sutherland R.L., Williams E.D. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate*;65 (3), 222–230 (2005).
353. Trojan L., Michel M.S., Rensch F., Jackson D.G., Alken P., Grobholz R. Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: lack of lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1). *J. Urol.*;172 (1),103–107 (2004).
354. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest*;111:1723–32 (2003).
355. Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell*;9:209–23 (2006).
356. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol*;11:38-43 (2006).
357. Tsurusaki T., Kanda S., Sakai H., Kanetake H., Saito Y., Alitalo K., Koji T. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br. J. Cancer*;80 (1–2), 309–313 (1999).
358. Schietroma C., Cianfarani F., Lacal P.M., Odorisio T., Orecchia A., Kanitakis J., D’Atri S., Failla C.M., Zambruno G. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer*;98 (4), 789–797 (2003).
359. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K. Lymphatic endothelium and Kaposi’s sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res*;58:1599-1604 (1998).
360. He Y., Kozaki K., Karpanen T., Koshikawa K., Yla-Herttuala S., Takahashi T.,

- Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl. Cancer Inst.*;94, 819–825 (2002).
361. He Y., Rajantie I., Pajusola K., Jeltsch M., Holopainen T., Yla-Herttuala S., Harding, T., Jooss K., Takahashi T., Alitalo K. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.*;65 (11), 4739–4746 (2005).
362. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J*;16:3898–911 (1997).
363. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*;114:853–65 (2001).
364. Karpanen T, Heckman CA, Keskkitalo S, et al. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J*;20:1462–72 (2006).
365. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*;42:483–8 (1997).
366. Al-Rawi MAA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *EJSO*;31:117-121 (2005).
367. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol*;25:2441–9 (2005).
368. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*;65:550–63 (2005).
369. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long term follow-up. *Clin Cancer Res*;9:716–21 (2003).
370. White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al. Vascular endothelial growth factor-D

expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res*;62:1669–75 (2002).

371. Funaki H, Nishimura G, Harada S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. *Oncology*;64:416–22 (2003).

372. Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*;6:2431–9 (2000).

373. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*;88:237–44 (2003).

374. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. Myth or reality? *Clin Cancer Res*;7:462-468, (2001).

375. Padera T.P., Kadambi A., Di Tomaso E., Carreira C.M., Brown E.B., Boucher Y., Choi N.C., Mathisen D., Wain J., Mark E.J., Munn L.L., Jain R.K. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*;296 (5574),1883–1886 (2002).

376. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*;206:170-177 (2005).

377. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int J Cancer*;95:29-33 (2001).

378. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: Its impact on prognosis. *Anticancer Res*;20:2981-2985, (2000).

379. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer*;101:973-978 (2004).
380. Beasley NJP, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson D. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 62:1315-1320 (2002).
381. Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, Orlando A, Bates DO. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer*;90:693-700, 2004.
382. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, Jahnke K, Hauschild A, Hirakawa S, Mihm MC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*;18:1232-1242 (2005).
383. Sahni D, Robson A, Orchard G, Szydlo R, Evans AV, Russell-Jones R. The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma of known sentinel node status. *J Clin Pathol*;58(7):715-721 (2005).
384. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*;9:250-256 (2003).
385. Giorgadze TA, Zhang PJ, Pasha T, Coogan PS, Acs G, Elder DE, Xu X. Lymphatic vessel density is significantly increased in melanoma. *J Cutan Pathol*; 31(10):672-677 (2004).
386. Wong S. Y., Haack H., Crowley D., Barry M., Bronson R. T., Hynes R. O. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res.* 65, 9789–9798 (2005).

387. Tobler N, Detmar M, Tumor and lymph node lymphangiogenesis—impact on cancer metastasis, *J. Leukoc. Biol.*;80: 691–696 (2006).
388. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehrotra S, Badve S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 29(11):1449-1455 (2005).
389. Sipos B, Kojima M, Tiemann K, Klapper W, Kruse M-L, Kalthoff H, Schniewind B, Tepel J, Weich H, Kerjaschki D, Klöppel G. Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. *J Pathol*;207:301-312 (2005).
390. Schoppmann S.F., Birner P., Stockl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D., 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.*;161 (3), 947–956 (2002).
391. Matsui K, Nagy-Bojarsky K, Laakkonen P, et al. Lymphatic microvessels in the rat remnant kidney model of renal fibrosis: aminopeptidase p and podoplanin are discriminatory markers for endothelial cells of blood and lymphatic vessels. *J Am Soc Nephrol*;14:1981-1989 (2003).
392. Nitta H. et al. 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) *Diagnostic Pathology*;3:41 (2008).
393. Straume O, Akslen LA. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 Related to Microvessel Density and Patient Outcome in Vertical Growth Phase Melanomas. *Am J Pathol.*:159:223-235 (2001).
394. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC et al. Vascular Endothelial Growth Factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*;5:775-782 (1999).

395. Linting M., Meulman J., Groenen P. & van der Kooij A. Nonlinear principal component analysis: introduction and application. *Psychological Methods* 12(3): 336-358 (2007).
396. Hosmer D.W. & Lemeshow S. Applied logistic regression. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons (2000).
397. Velasco P, Lange-Asschenfelut. Dermatological aspects of angiogenesis. *Br J of Dermatology* 147: 841-852 (2002).
398. Maiolino P, Paparella S, Restucci B, De Visco G. Angiogenesis in squamous cell carcinoma of canine skin: an immunohistochemical and quantitative analysis. *J Comp Pathol*;125:117-121 (2001).
399. Bowden J, Brennan PA, Tijjani U, Cronin A. Expression of VEGF in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol*;29:585-589 (2002)
400. Winter J, Kneitz H, Brocker EB. Blood Vessel Density in Basal Cell Carcinomas and Benign Trichogenic Tumors as a Marker for Differential Diagnosis in Dermatopathology. *J of Skin Cancer*; Article ID 241382, 5 pages (2011).
401. Ho SF, Brown L, Bamford M, SampathR and Burns J. 5 Years review of periocular basal cell carcinoma and proposed follow-up protocol. *Eye*; 27,78–83 (2013)

