



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

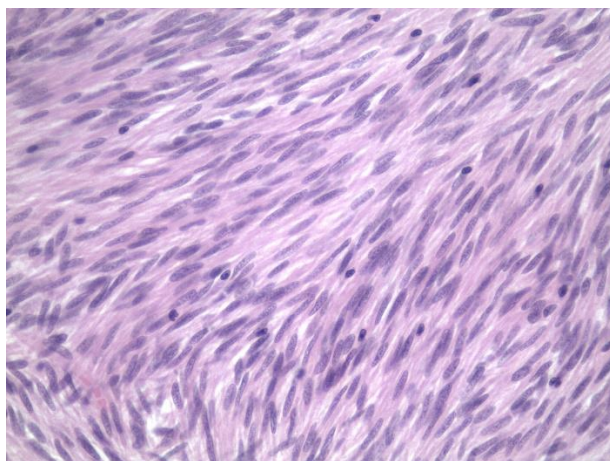
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:

ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

Μηχανισμοί αγγειογένεσης στους στρωματικούς όγκους του
γαστρεντερικού συστήματος (GIST): Εφαρμογές του συστήματος των
εφρινών (EPH/ephrin)



Σταύρος Π. Παπαδάκος - ΑΜ 20200665

Μεταπτυχιακός Φοιτητής - Ειδικεύομενος Γαστρεντερολογίας «ΓΝΑ
ΛΑΪΚΟ»

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

- 1. Σταμάτιος Θεοχάρης**, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό

Παν/μιο Αθηνών

- 2. Μιχαήλ Καραμούζης**, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό

Παν/μιο Αθηνών

- 3. Χαρίκλεια Γακιοπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό & Καποδιστριακό

Παν/μιο Αθηνών

Περιεχόμενα	
Ευχαριστίες.....	4
Abstract - Περίληψη.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.Εισαγωγή.....	7
• 1.1 Γενικά στοιχεία για τους GIST.....	8
• 1.2 Διάγνωση των GIST.....	12
2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης.....	15
• 2.1 Τύποι σχηματισμού αγγείων και οι μοριακοί μηχανισμοί τους.....	15
• 2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση.....	23
1. Σηματοδότηση VEGF.....	23
2. Σηματοδότηση PDGF.....	25
3. Σηματοδότηση FGF.....	26
4. Σηματοδότηση ANG και TIE.....	26
5. Σηματοδότηση NOTCH και WNT.....	28
6. Σηματοδότηση EPH/ephrin.....	29
3. EPHs και εφρίνες: Δομή και σηματοδοτικά μονοπάτια.....	30
• 3.1 Ειδική πρόσδεση.....	30
• 3.2 Μοναδική ενεργοποίηση και σηματοδότηση.....	30
• 3.3 Εμπρόσθια σηματοδότηση.....	31
• 3.4 Ανάστροφη σηματοδότηση.....	31
• 3.5 Συμπεράσματα.....	32
4.Μηχανισμοι αγγειογένεσης στα GIST.....	34
• 4.1 Οι μοριακοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης στα GIST-προκλινικά δεδομένα.....	34
• 4.2 Η συσχέτιση μεταξύ των απεικονιστικών δεδομένων και της αγγειογένεσης στα GISTs.....	36
• 4.3 Διαμεσολαβητές της αγγειογένεσης ως βιοδείκτες σε κλινικά δεδομένα GIST.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	42
5.Υλικά και μέθοδοι.....	43
6. Αποτελέσματα.....	44
7. Συζήτηση.....	52
8. Συμπεράσματα.....	55
Βιβλιογραφικές αναφορές.....	56

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2020-2023, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, «Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)» της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε υπό την άοκνη επίβλεψη του κ. Σταμάτιου Θεοχάρη, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ. Αντικείμενο της αποτελεί η μελέτη του συστήματος των εφρινών (EPH/ephrin) στους αγγειογενετικούς μηχανισμούς των στρωματικών όγκων του πεπτικού (GISTs). Συγκεκριμένα εξετάστηκε η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των EPHA1, EPHA2, EPHA4, EPHA6, EPHB4 και CD34 με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους όπως ο μιτωτικός δείκτης, η σταδιοποίηση T του TNM, η παρουσία νέκρωσης και η προγνωστική κατηγοριοποίηση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Καθηγητή κ. Σταμάτιο Θεοχάρη ο οποίος κατά την πολύμηνη συνεργασία μας έχει αποτελέσει ταυτόχρονα πρότυπο έμπνευσης, καθοδήγησης και διδασκαλίας μέσω της συνεχούς, αδιάκοπης και χωρίς φειδώ αρωγής του καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής μας συνεργασίας. Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρότι τελεολογικώς αποτέλεσε τον θεμελιώδη σκοπό της συνεργασίας μας, στάθηκε το μέσο για τη βαθύτερη μύηση μου στους θεμελιώδεις μηχανισμούς που διέπουν την ογκογένεση χωρίς οίηση. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανεκτίμητη του συνεισφορά και ανυπομονώ να συνεχίσουμε την επιτυχημένη συνεργασία μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια κ. Χαρίκλεια Γακιοπούλου και τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Καραμούζη οι οποίοι με τη μεταδοτικότητα και τις γνώσεις που μου παρείχαν, καθώς και με τη διαρκή καθοδήγησή τους, μου επέτρεψαν να προχωρήσω στη διενέργεια μιας υψηλού επιπέδου μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την κατανόηση και την αμέριστη συμπαράσταση που έδειξαν κατά την περίοδο εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Περίληψη

Οι στρωματικοί όγκοι του γαστρεντερικού συστήματος (GIST) είναι σπάνιοι όγκοι που αναπτύσσονται στο γαστρεντερικό σύστημα, συνήθως στο στομάχι (περίπου το 60% των περιπτώσεων) ή το λεπτό εντερικό, αλλά μπορούν να εμφανιστούν σε άλλα μέρη του γαστρεντερικού συστήματος. Προέρχονται από κύτταρα που αποκαλούνται "interstitial cells of Cajal," που είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της κινητικότητας του γαστρεντερικού συστήματος. Οι όγκοι GIST συχνά συνδέονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο c-kit και στο γονίδιο PDGFRA. Η αγωγή των όγκων GIST συνήθως περιλαμβάνει χειρουργική αφαίρεση του όγκου ενώ σε προχωρημένο στάδιο της νόσου χρειάζονται επιπλέον φαρμακευτική θεραπεία με αναστολείς της τυροσίνης κινάσης (TKI), όπως το imatinib. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη κυτταροπλασματική έκφραση της ERHA1 συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την σταδιοποίηση T, τον αριθμό μιτώσεων και την παρουσία νέκρωσης. Επίσης, η ERHA2 είχε σημαντική σχέση με την εξέλιξη του όγκου, καθώς η υψηλή πυρηνική έκφραση της ERHA2 συσχετίστηκε με χαμηλότερο T στάδιο και προγνωστικό στάδιο, καθώς και με τον μιτωτικό δείκτη. Τέλος, η έκφραση του CD34 στα νεοπλασματικά κύτταρα συσχετίστηκε με την παρουσία θετικής έκφρασης της ERHB4. Αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν σημαντική πληροφορία για την κατανόηση της εξέλιξης των GIST και την αξιολόγηση της πρόγνωσής τους.

Abstract

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are rare tumors that develop in the gastrointestinal system, typically in the stomach (approximately 60% of cases) or the small intestine, but can appear in other parts of the gastrointestinal system. They originate from cells known as "interstitial cells of Cajal," which are responsible for controlling the motility of the gastrointestinal system. GIST tumors are often associated with mutations in the c-kit gene and the PDGFRA gene. The treatment of GIST tumors typically involves surgical removal of the tumor, and in advanced stages of the disease, additional medical therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) like imatinib is needed. This study observed that higher cytoplasmic expression of EPHA1 was associated with worse prognosis, while no correlation was observed with T staging, the number of mitoses, and the presence of necrosis. Additionally, EPHA2 had a significant relationship with tumor progression, as high nuclear expression of EPHA2 was correlated with lower T stage and prognostic stage, as well as the mitotic index. Finally, the expression of CD34 in neoplastic cells was associated with the presence of positive EPHB4 expression. These results provide important information for understanding the progression of GISTs and evaluating their prognosis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά στοιχεία για τα GIST

Οι στρωματικοί όγκοι του γαστρεντερικού συστήματος (GIST) είναι ένας τύπος μεσεγχυματικής προέλευσης όγκων που μπορούν να εμφανιστούν οπουδήποτε στον γαστρεντερικό σωλήνα [1]. Αρχικά, οι GIST θεωρούνταν όγκοι λείων μυών όπως τα λειομύματα ή τα λειομυοσαρκώματα, με βάση τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τους [2]. Ωστόσο, η ανακάλυψη της έκφρασης του κυταροπλασματικού υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (c-KIT or CD117) στα GIST έδειξε ότι η προέλευσή τους μπορεί να είναι από τα διάμεσα κύτταρα του Cajal (ICCs), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη βηματοδοτική λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν στην περιοχή μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της περιοχής κινάσης τυροσίνης του c-KIT. Η αλληλούχιση αποκάλυψε ότι όλες οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες KIT ενεργοποιούνταν διαρκώς, ακόμη και χωρίς τον συνδέτη του KIT, τον παράγοντα βλαστικών κυττάρων (SCF) [3]. Τα GISTs παρουσιάζουν συγκρίσιμα μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά (CD117+/CD34+/Vimentin+) με τα ICCs, υποδεικνύοντας ότι τα ICCs μπορεί να αποτελούν προγονικά κύτταρα για τα GISTs. Επιπλέον, τα ICCs και τα GISTs μοιράζονται ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά [4].

Οι GIST είναι ασυνήθιστοι και η αναφερόμενη επίπτωσή τους ποικίλλει σημαντικά, κυμαινόμενη από 0,4 έως 2 περιπτώσεις ανά 100.000 ετησίως [5],[6], λόγω διαφόρων παραγόντων. Πρώτον, καθώς τα διαγνωστικά κριτήρια εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου προκύπτουν μεθοδολογικές προκλήσεις οδηγώντας σε διαφοροποιήσεις στη διάγνωση και την καταγραφή. Δεύτερον, η πλειονότητα των μητρώων καρκινοπαθών καταγράφει μόνο περιπτώσεις "κακοήθων" GIST. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, η εκτιμώμενη επίπτωση είναι περίπου οκτώ περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ετησίως [7].

Τα GIST είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα όγκων που περιλαμβάνει διάφορους μοριακούς υποτύπους, οι οποίοι συχνά χαρακτηρίζονται από αμοιβαία αποκλειόμενες ογκογονικές μεταλλάξεις, κυρίως στον υποδοχέα KIT ή στον υποδοχέα άλφα του προερχόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (PDGFRA). Κάθε υπότυπος παρουσιάζει ξεχωριστή φυσική ιστορία και απαιτεί διαφορετικές θεραπείες [8],[9],[10]. Τα GIST της παιδικής ηλικίας αντιπροσωπεύουν

μια κλινικά και μοριακά ξεχωριστή υποομάδα, η οποία χαρακτηρίζεται από γυναικεία υπεροχή, απουσία μεταλλάξεων *KIT/PDGFRA* και συχνές μεταλλάξεις ή αποσιώπηση των τεσσάρων γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του συμπλέγματος του ενζύμου succinate dehydrogenase (SDH), πολυεστιακή γαστρική εντόπιση και πιθανώς λεμφαδενικές μεταστάσεις [11]. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

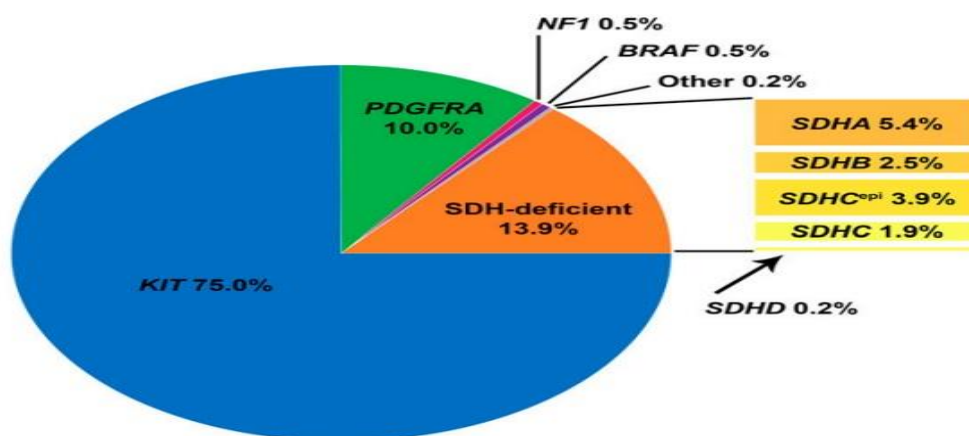


FIGURE 1. Frequency of Gastrointestinal Stromal Tumor Molecular Subtypes
Abbreviation: SDH, succinate dehydrogenase.
Adapted from Schaefer et al.⁶

Εικόνα 1. Η συχνότητα εμφάνισης των κυριότερων οδηγών μεταλλαγών στα GIST. Η εικόνα αναδημοσιεύεται από το: *The GIST of Advances in Treatment of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor*, Inga-Marie Schaefer, Ronald P. DeMatteo, and César Serrano, American Society of Clinical Oncology Educational Book 2022 :42, 885-899

Οι πρωταρχικές εκδηλώσεις του GIST είναι όμοιες με ενός όγκος στο στομάχι ή στο έντερο, που συνήθως συνοδεύονται από συμπτώματα όπως αιμορραγία, πόνος και απόφραξη κατά τη διάγνωση [1]. Οι περισσότεροι GIST εμφανίζονται στο στομάχι (60-65%), ακολουθούμενοι από το λεπτό έντερο (20-25%), ενώ σε άλλες περιοχές όπως το παχύ έντερο, το ορθό και ο οισοφάγος είναι σπάνια η εμφάνισή τους. Τα μικροσκοπικά GIST (<1 cm) ή τα μικρο-GIST (1-2 cm) συνήθως ανακαλύπτονται τυχαία κατά τη διάρκεια της γαστροδωδεκαδακτυλικής ενδοσκόπησης και φέρουν παρόμοιες μεταλλάξεις με τα μεγαλύτερα GIST, αλλά συνήθως δεν αφαιρούνται, εκτός από αυτά που εμφανίζονται στο ορθό. Τα τοπικής έκτασης GIST που είναι μεγαλύτερα από 2 cm θεωρούνται θεραπεύσιμα και συνήθως απαιτούν χειρουργική αφαίρεση

ως πρώτη γραμμής θεραπεία. Η μεταστατική υποτροπή είναι συχνότερη στο ήπαρ και το περιτόναιο [12],[13].

Τα GIST είναι ανθεκτικά στις συνήθεις κυτταροτοξικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται για άλλα σαρκώματα [1]. Η βελτίωση της συνολικής επιβίωσης (OS) είναι δυνατή μετά την εισαγωγή στην κλινική πράξη των αναστολέων της κινάσης τυροσίνης (TKIs) που στοχεύουν τον KIT και/ή τον PDGFRA. Σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, η θεραπεία με TKI έχει βελτιώσει δραματικά τη διάμεση επιβίωση από 18 μήνες σε περισσότερο από 5 χρόνια τα τελευταία 20 χρόνια [13], [12].

Η ιματινίμη αποτελεί τον κύριο πυλώνα της φαρμακευτικής θεραπείας του GIST σαν πρώτη γραμμής θεραπεία στη μεταστατική νόσο [13]. Ως επικουρική θεραπεία, η χορήγηση ιματινίμης επί 3 έτη βελτιώνει τη συνολική επιβίωση (OS) [14]. Από την εισαγωγή των TKIs στην κλινική πρακτική, ασθενείς με μεταστατικό GIST έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν πέραν των δύο δεκαετιών. Η ανάπτυξη θεραπευτικής αντοχής οφείλεται κυρίως στην επιλογή ανθεκτικών κλώνων καρκινικών κυττάρων που προκύπτουν από πρόσθετες μεταλλάξεις στον KIT ή τον PDGFRA [15], με αποτέλεσμα τη διαφορετική ευαισθησία σε θεραπείες μεταγενέστερης γραμμής, όπως η σουνιτινίμη και η ρεγοραφενίμη. Ωστόσο, η τελευταία γενιά TKI, όπως η ριπρετινίμη [16], μπορεί να στοχεύσει αποτελεσματικά αυτές τις μεταλλάξεις αντοχής. Οι ασυνήθιστοι μοριακοί τύποι GIST, όπως εκείνοι με αδρανοποίηση του NF1, απώλεια SDH ή μετατόπιση ενός γονιδίου της οικογένειας NTRK, έχουν συνήθως πρωτογενή αντίσταση στην ιματινίμη, αλλά συγκεκριμένοι TKIs όπως η αβαπριτινίμη σε ασθενείς με PDGFRA D842V, η λαροτρεκτινίμη και η εντρεκτινίμη σε ασθενείς με NTRK διαμεταθέσεις μπορεί να είναι αποτελεσματικοί. Τα παραπάνω παρουσιάζονται αδρά στους αλγόριθμους θεραπευτικής διαχείρισης των GIST της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (ESMO) στις Εικόνες 2,3.

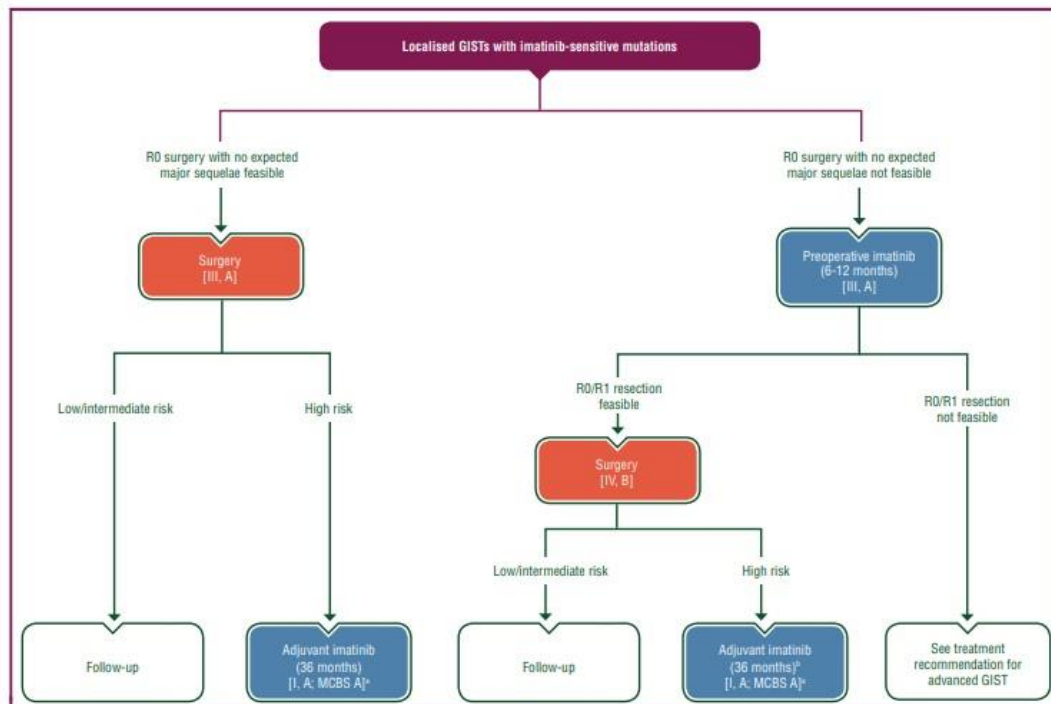


Figure 1. Treatment algorithm for localised GISTs with imatinib-sensitive mutations.

Εικόνα 2. Στην εικόνα παρουσιάζεται η θεραπευτική αντιμετώπιση της ευαίσθητης στην ιματινίμη τοπικής νόσου. Η εικόνα χρησιμοποιείται από την δημοσίευση: *Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2022 Jan;33(1):20-33. doi: 10.1016/j.annonc.2021.09.005. Epub 2021 Sep 21. PMID: 34560242.*

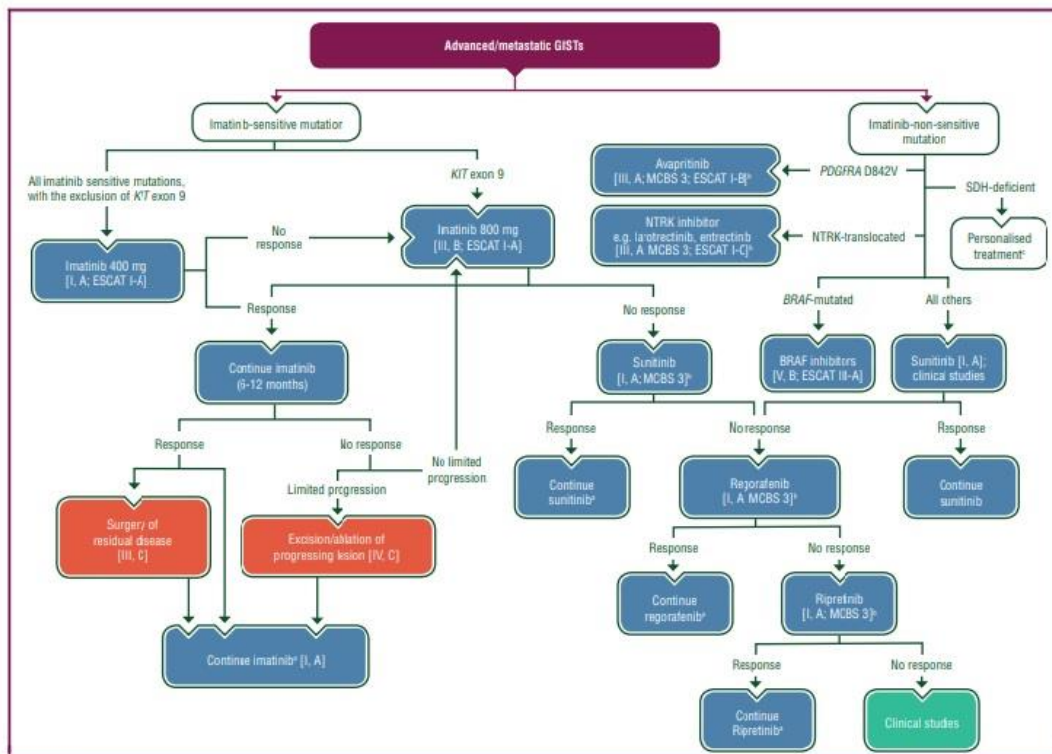


Figure 2. Treatment algorithm for advanced/metastatic GISTs.
 Purple: general categories or stratification; red: surgery; turquoise: combination of treatments or other systemic treatments; white: other aspects of management; blue: systemic anticancer therapy.
 BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; ESCAT, ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets; EMA, European Medicines Agency; FDA, Food

Εικόνα 3. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο θεραπευτικός αλγόριθμος αντιμετώπισης της τοπικά προχωρημένης ή μεταστατικής νόσου. Η εικόνα χρησιμοποιείται από την δημοσίευση: *Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2022 Jan;33(1):20-33. doi: 10.1016/j.annonc.2021.09.005. Epub 2021 Sep 21. PMID: 34560242.*

1.2 Διάγνωση των GIST

Η έκφραση του CD117 εντοπίστηκε στα GIST, οδηγώντας σε μια νέα εποχή μοριακής διάγνωσης [2]. Το CD34 θεωρήθηκε αρχικά ο καλύτερος δείκτης για τα GIST, αλλά η ευαισθησία και η ειδικότητά του ήταν περιορισμένες [17]. Σε πρώιμες μελέτες, η έκφραση του CD117 βρέθηκε στο 76-100% των GISTs [3],[4], και η μεγαλύτερη σειρά ανέφερε ότι το CD117 εκφράστηκε στο 94,7% των 1040 GISTs [18]. Η διακύμανση του θετικού ποσοστού του CD117 στα GIST μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές θέσεις εντόπισης, στα αντισώματα KIT που χρησιμοποιούνται και στα περιορισμένα μεγέθη των δειγμάτων [17]. Το CD117 είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και ειδικό για τα GISTs, ενώ εκφράζεται ελάχιστα σε άλλους όγκους όπως τα λειομυώματα, τα λειομυοσαρκώματα και τα σβαννώματα [17].

Ο DOG1 είναι ένας νέος δείκτης που ανακαλύφθηκε σε GISTs και αποτελεί ευαίσθητο και ειδικό δείκτη για GISTs, ανεξάρτητα από την έκφραση του CD117 και την κατάσταση μετάλλαξης KIT ή PDGFRA [17]. Το DOG1 εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση σε διάφορους καρκίνους [19]. Ο DOG1 ρυθμίζει τον αντι-αγγειογενετικό παράγοντα IGFBP5, οδηγώντας στη διαμόρφωση της σηματοδότησης IGF/IGFR στο μικροπεριβάλλον του όγκου [20]. Το DOG1 είναι εξαιρετικά ειδικό για τα GIST και στη μεγαλύτερη σειρά 1168 GIST, το 94,8% ήταν θετικό για το DOG1. Το DOG1 είχε ελαφρώς καλύτερες επιδόσεις από το CD117 στα γαστρικά ατρακτοειδή GIST, συμπεριλαμβανομένων των GIST με μετάλλαξη PDGFRA, αλλά ήταν ελαφρώς λιγότερο ευαίσθητο από το CD117 στα εντερικά GIST [18]. Παρόλο που το DOG1 ήταν εξαιρετικά ειδικό για τα GISTs, το DOG1 χρωματίστηκε σε άλλους μεσεγχυματικούς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των οπισθοπεριτοναϊκών λειομυωμάτων τύπου μήτρας, της περιτοναϊκής λειομυομάτωσης και των αρθρικών σαρκωμάτων. Ωστόσο, το DOG1 διακρινόταν εύκολα από άλλα καρκινώματα με βάση την ιστολογική μορφολογία [18].

Η διάγνωση των GIST μπορεί να αποτελέσει πρόκληση όταν δεν έχουν έκφραση του CD117/DOG1, κάτι που συμβαίνει σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων (1–2%). Για να υποστηριχθεί η διάγνωση των GIST σε αυτές τις περιπτώσεις, έχουν διερευνηθεί πρόσθετες πρωτεΐνες όπως η πρωτεϊνική κινάση C-θ (PKCθ) [21] και η nestin [22]. Η PKCθ εκφράζεται στα ICCs στο πεπτικό σύστημα και υπερεκφράζεται στα GISTs [21]. Παρόλο που η PKCθ είναι ένας ευαίσθητος δείκτης, είναι λιγότερο ειδικός και μπορεί επίσης να βρεθεί σε άλλους όγκους ατρακτοειδών κυττάρων όπως τα σβαννώματα και οι όγκοι λείων μυών. Ομοίως, η nestin, μια πρωτεΐνη ενδιάμεσου νηματίου, έχει επίσης δείξει ευαισθησία αλλά μικρότερη ειδικότητα από το CD117/DOG1 [23]. Τα CD117 και DOG1 είναι επί του παρόντος οι πιο ευαίσθητοι και ειδικοί δείκτες για τους GIST, καλύπτοντας περίπου το 99% των περιπτώσεων και σπάνια εκφράζονται σε όγκους που δεν είναι GIST [24]. Άλλοι δείκτες όπως οι δείκτες λείων μυών (SMA και desmin) και ο νευρικός δείκτης (S100) μπορούν να είναι χρήσιμοι για τον αποκλεισμό της διάγνωσης των GIST και για τη διάγνωση άλλων γαστρεντερικών μεσεγχυματικών όγκων [24]. Το CD34 χρησιμοποιούνταν παλαιότερα για τη διάγνωση των GISTs, αλλά δεν χρησιμοποιείται πλέον λόγω της χαμηλότερης ευαισθησίας του σε

σύγκριση με το CD117. Συμπερασματικά, ενώ η PKCθ και η nestin μπορούν να παρέχουν υποστηρικτικά στοιχεία για τη διάγνωση των GISTs, η χαμηλότερη ειδικότητά τους περιορίζει τη χρησιμότητά τους στη διάγνωση σε σύγκριση με το CD117/DOG1 [24].

Συνελόντι ειπείν, οι GIST αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της εξατομικευμένης ιατρικής στον τομέα της ογκολογίας. Αποτελούν παράδειγμα για το πώς η εξατομικευμένη ιατρική μεταμορφώνει την αντιμετώπιση του καρκίνου. Με τον εντοπισμό συγκεκριμένων γενετικών μεταλλάξεων, τη στόχευση αυτών των μεταλλάξεων με θεραπείες ακριβείας και την παρακολούθηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης, η εξατομικευμένη ιατρική μεγιστοποιεί την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις παρενέργειες .

2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης

2.1 Τύποι σχηματισμού αγγείων και οι μοριακοί μηχανισμοί τους

Ο σχηματισμός αγγείων, γνωστός και ως αγγειογένεση, είναι η διαδικασία ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την εξέλιξη των ιστών και των οργάνων του σώματος, καθώς και για την επούλωση πληγών και την αναπαραγωγή. Υπάρχουν διάφοροι τύποι σχηματισμού αγγείων. Η αναλυτική παρουσίαση τους γίνεται αλλού [25],[26],[27],[28],[29] και δεν εμπίπτει στους στόχους της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αδρά, οι μηχανισμοί αγγειογένεσης περιγράφονται παρακάτω:

A) Βλαστοειδής (sprouting) αγγειογένεση: Αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος σχηματισμού αγγείων και συμβαίνει κατά την ανάπτυξη και την επούλωση τραυμάτων. Περιλαμβάνει την εκβλάστηση νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα, τα οποία διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες και άλλα σηματοδοτικά μόρια [28]. Η διαδικασία της εκβλαστήσεως της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από διάφορους μοριακούς μηχανισμούς:

- Διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων: Η διαδικασία της εκβλαστήσεως της αγγειογένεσης αρχίζει όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF). Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που πυροδοτεί έναν καταρράκτη ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών.
- Ενεργοποίηση της σηματοδότησης Notch: Η σηματοδότηση Notch είναι ένα κρίσιμο μονοπάτι στη ρύθμιση της εκβλαστήσεως της αγγειογένεσης. Κατά την ενεργοποίησή του, το μονοπάτι Notch προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και την έκφραση αγγειογενετικών γονιδίων. Η σηματοδότηση Notch ενεργοποιείται από Delta-like ligands (DLL) και Jagged ligands, τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των γειτονικών κυττάρων.

- Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων: Μετά την ενεργοποίηση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν προς το σημείο της αγγειογένεσης. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από διάφορους μοριακούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ιντεγκρινών, των πρωτεασών και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (ECM) επιτρέποντας στα κύτταρα να προσκολληθούν και να μεταναστεύσουν κατά μήκος της ECM. Ειδικές πρωτεάσες, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), αποικοδομούν την ECM για να διευκολύνουν τη μετανάστευση των κυττάρων. Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1), προάγουν την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην ECM και στα γειτονικά κύτταρα.
- Σχηματισμός κυττάρων κορυφής και κυττάρων μίσχου: Κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης κατά την εκβλάστηση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εντός της εκβλάστησης διαφοροποιούνται σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους: κύτταρα κορυφής και κύτταρα μίσχου. Τα ακραία κύτταρα βρίσκονται στο εμπρόσθιο άκρο του βλαστού και είναι υπεύθυνα για την καθοδήγηση του βλαστού προς τον στόχο του. Εκφράζουν υψηλά επίπεδα υποδοχέων VEGF και άλλων αγγειογενετικών υποδοχέων, καθώς και γονίδια που προάγουν τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων. Αντίθετα, τα κύτταρα του μίσχου βρίσκονται πίσω από τα κύτταρα της κορυφής και είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό του αυλού του νέου αγγείου. Εκφράζουν υψηλά επίπεδα υποδοχέων Notch και γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.
- Σχηματισμός αυλού: Καθώς ο βλαστός επιμηκώνεται, τα κύτταρα του μίσχου αρχίζουν να σχηματίζουν μια δομή που μοιάζει με σωλήνα, η οποία τελικά γίνεται ο αυλός του νέου αγγείου. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης VEGF, Notch και εφρίνης. Οι εφρίνες είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς σε γειτονικά κύτταρα

ρυθμίζοντας τη μετανάστευση και την προσκόλληση των κυττάρων.

B) Ενδοσυνδετική αγγειογένεση (intussusceptive angiogenesis): Η ενδοσυνδετική αγγειογένεση είναι ένας ξεχωριστός τρόπος αγγειογένεσης που περιλαμβάνει τη διάσπαση προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων σε δύο ή περισσότερα θυγατρικά αγγεία [25]. Σε αντίθεση με την αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης, η ενδοσκληρυντική αγγειογένεση δεν περιλαμβάνει το σχηματισμό νέων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα. Αντ' αυτού, βασίζεται στην αναδιαμόρφωση των υφιστάμενων αιμοφόρων αγγείων με το σχηματισμό διαπυρηνικών ιστικών πυλώνων. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ενδοσκληρυντική αγγειογένεση είναι λιγότερο καλά κατανοητοί από εκείνους της εκβλαστητικής αγγειογένεσης [30],[31] αλλά έχουν εντοπιστεί ορισμένοι βασικοί παράγοντες:

- Η σηματοδότηση της αγγειοποιητίνης-Tie: Η αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1) και η αγγειοποιητίνη-2 (Ang-2) είναι δύο σημαντικοί συνδέτες της οικογένειας των υποδοχέων Tie που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ενδοσκληρυντικής αγγειογένεσης. Ειδικότερα, η Ang-2 έχει αποδειχθεί ότι προάγει τον σχηματισμό ιστικών πυλώνων και τη διάσπαση των αιμοφόρων αγγείων σε απόκριση στην υποξία.
- Σηματοδότηση του VEGF: Ο VEGF είναι βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί επίσης να προάγει την ενδοκυβική αγγειογένεση. Ο VEGF επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειακή αναδιαμόρφωση, συμπεριλαμβανομένων των MMPs που αποικοδομούν την ECM και διευκολύνουν τη διάσπαση των αγγείων.
- Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες: Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-α) και η ιντερλευκίνη-1 βήτα (IL-1β), έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην ενδοκυβική αγγειογένεση. Αυτές οι κυτταροκίνες μπορούν να επάγουν την έκφραση των MMPs και άλλων ενζύμων που αποικοδομούν την ECM και προάγουν τη διάσπαση των αγγείων.

- Διατμητική τάση (shear stress): Η ενδοκυστική αγγειογένεση μπορεί επίσης να ρυθμίζεται από μηχανικές δυνάμεις, όπως η διατμητική τάση. Η διατμητική τάση μπορεί να επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειακή αναδιαμόρφωση, συμπεριλαμβανομένου του VEGF και των MMPs.
- Σηματοδότηση Notch: Η σηματοδότηση Notch έχει επίσης εμπλακεί στη ρύθμιση της ενδοσκληρυντικής αγγειογένεσης. Συγκεκριμένα, η σηματοδότηση Notch έχει αποδειχθεί ότι προάγει τον σχηματισμό ιστικών πυλώνων και τη διάσπαση των αιμοφόρων αγγείων σε απόκριση στην υποξία.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ενδοκυστική αγγειογένεση είναι λιγότερο καλά κατανοητοί από εκείνους της αγγειογένεσης με εκβλάστηση [31], αλλά έχουν εντοπιστεί ορισμένοι βασικοί παράγοντες. Αυτός ο τύπος αγγειογένεσης είναι σημαντικός για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και τη ρύθμιση της ροής του αίματος.

C) Αγγειογένεση (vasculogenesis): Ο τύπος αυτός αγγειογένεσης περιλαμβάνει τον de novo σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από αγγειοβλάστες που είναι πρόδρομα κύτταρα προερχόμενα από το μεσόδερμα [25]. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης περιλαμβάνουν μια σειρά πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών. Ακολουθούν ορισμένοι από τους βασικούς μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αγγειογένεση:

- Διαφοροποίηση των μεσοδερμικών κυττάρων: Η αγγειογένεση ξεκινά με τη διαφοροποίηση των μεσοδερμικών κυττάρων σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Μετανάστευση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων: Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν προς την περιοχή όπου πρόκειται να σχηματιστούν τα αιμοφόρα αγγεία.
- Συναρμολόγηση των ενδοθηλιακών κυττάρων: Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα συναρμολογούνται για να σχηματίσουν έναν αγγειακό λώρο.

- Σχηματισμός αυλού: Ο αγγειακός λώρος υφίσταται σχηματισμό αυλού για τη δημιουργία ενός λειτουργικού αιμοφόρου αγγείου.
- Πρόσληψη τοιχωματικών κυττάρων: Τα τοιχωματικά κύτταρα (περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα) προσλαμβάνονται για να σταθεροποιήσουν τα νεοσχηματισμένα αιμοφόρα αγγεία.
- Αγγειογενετικοί παράγοντες: Διάφοροι αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως ο VEGF, ο FGF και η αγγειοποιητίνη, εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Εξωκυτταρική θεμέλια ουσία: Η ECM διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση παρέχοντας δομική υποστήριξη και σηματοδοτικές ενδείξεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Συνολικά, οι μοριακοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης περιλαμβάνουν μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών που εξασφαλίζουν το σχηματισμό λειτουργικών αιμοφόρων αγγείων.

Δ) Μηχανισμός της σύμπραξης (vessel co-option): Η σύμπραξη είναι ένας τύπος σχηματισμού αγγείων που περιλαμβάνει την ενσωμάτωση προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων στον αναπτυσσόμενο όγκο. Η διαδικασία αυτή είναι συχνή στον καρκίνο όπου οι όγκοι καταλαμβάνουν τα υπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία στον περιβάλλοντα ιστό για να παρέχουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο προωθώντας την ανάπτυξη και τη μετάστασή τους αντί να προκαλούν αγγειογένεση [32]. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αγγειακής συνδιαλλαγής δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά ορισμένοι από τους προτεινόμενους μηχανισμούς περιλαμβάνουν:

- Αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας: Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν ένζυμα όπως οι MMPs που αποικοδομούν την ECM που περιβάλλει τα αιμοφόρα αγγεία επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να διεισδύσουν και να τα συνυποτάξουν.

- Παρακρινής σηματοδότηση: Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες όπως ο VEGF, η Ang-2 και ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF) που διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία.
- Στρατολόγηση περικυττάρων: Τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν περικύτταρα για να σταθεροποιήσουν και να αναδιαμορφώσουν την ECM γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία, γεγονός που προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.
- Προσέλκυση ανοσοποιητικών κυττάρων: Τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν ανοσοποιητικά κύτταρα στην περιοχή των συνυφασμένων αγγείων, γεγονός που μπορεί να διευκολύνει περαιτέρω την ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου.
- Σηματοδότηση του επαγωγίμου παράγοντα υποξίας (HIF): Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν τη σηματοδότηση HIF, η οποία προάγει την έκφραση γονιδίων που ενισχύουν την αγγειακή συνδιαλλαγή αυξάνοντας την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων, MMPs και άλλων παραγόντων.

Συνολικά, οι μοριακοί μηχανισμοί της «αγγειακής σύμπραξης» είναι πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των περικυττάρων, των ανοσοκυττάρων και της ECM [32]. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν αυτή τη διαδικασία.

Ε) Αρτηριογένεση (arteriogenesis): Η αρτηριογένεση είναι η διαδικασία αναδιαμόρφωσης των προϋπαρχουσών παράπλευρων αρτηριών και αρτηριολίων ως απάντηση στην αυξημένη ζήτηση ροής αίματος λόγω απόφραξης ή στένωσης της αρτηρίας. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αρτηριογένεσης περιλαμβάνουν μια σειρά πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών. Ακολουθούν ορισμένοι από τους βασικούς μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αρτηριογένεση:

- Διατμητική τάση: Η αύξηση της ροής του αίματος λόγω απόφραξης ή στένωσης της αρτηρίας δημιουργεί διατμητική τάση, η οποία ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία

μυϊκά κύτταρα στις προϋπάρχουσες παράπλευρες αρτηρίες και αρτηριόλια.

- Οξειδίο του αζώτου (NO): Η αυξημένη διατμητική τάση διεγείρει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία προάγει την αγγειοδιαστολή και τη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της αρτηριακής απόφραξης.
- Φλεγμονώδης αντίδραση: Τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων.
- Αυξητικοί παράγοντες: Αυξητικοί παράγοντες όπως ο VEGF, ο FGF και ο PDGF εμπλέκονται στη διαδικασία της αρτηριογένεσης. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Εξωκυτταρική θεμέλια ουσία: Η ECM διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αρτηριογένεση παρέχοντας δομική υποστήριξη και σηματοδοτικές ενδείξεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα.
- Μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας: Οι MMPs είναι ένζυμα που αποικοδομούν την ECM και εμπλέκονται στη διαδικασία της αρτηριογένεσης προάγοντας την αγγειακή αναδιαμόρφωση.
- Σηματοδότηση Notch: Η σηματοδότηση Notch διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αρτηριογένεση προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων.

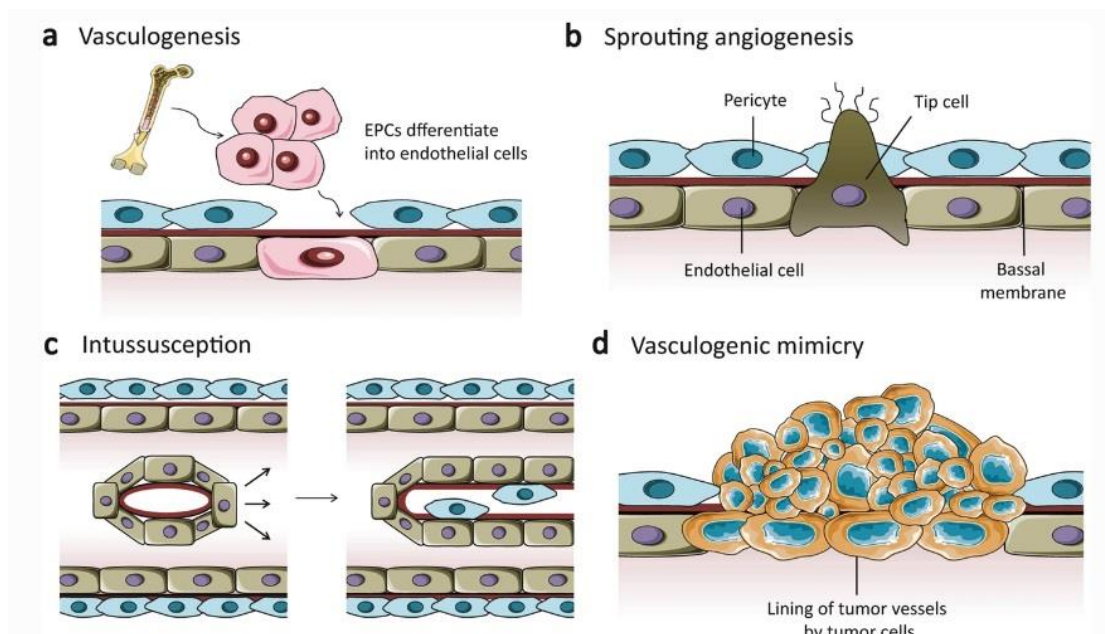
Συνολικά, οι μοριακοί μηχανισμοί της αρτηριογένεσης περιλαμβάνουν μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών που εξασφαλίζουν το σχηματισμό λειτουργικών παράπλευρων αρτηριών και αρτηριολίων σε απόκριση στην αυξημένη ζήτηση αιματικής ροής.

ΣΤ) Αγγειακή μίμηση (vascular mimicry-VM): Η αγγειακή μίμηση είναι ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε πρώτη φορά στο ραγοειδικό μελάνωμα [33], επιτρέπει στα ιδιαίτερα επιθετικά καρκινικά κύτταρα

να κατασκευάσουν το δικό τους δίκτυο καναλιών που οδηγούν το αίμα χωρίς την ανάγκη ενδοθηλιακών κυττάρων(ECs) [31]. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει:

- την υιοθέτηση από τα καρκινικά κύτταρα ενός φαινότυπου που μοιάζει με EC
- τη δημιουργία ενός σωληνοειδούς δικτύου πλούσιου σε πρωτεΐνες της ECM (π.χ. κολλαγόνο IV και VI, λαμινίνη, πρωτεογλυκάνες, θειική ηπαράνη)[34] και
- τη σύνδεση αυτού του δικτύου με την περιβάλλουσα μικροκυκλοφορία με αποτέλεσμα ένα μωσαϊκό ενδοθηλιακού/μη ενδοθηλιακού αγγειακού δικτύου.

Αν και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης VM και του αυξημένου κινδύνου μετάστασης και της κακής κλινικής έκβασης, είναι γνωστό ότι το φαινόμενο περιλαμβάνει αυξημένη πλαστικότητα των κακοήθων καρκινικών κυττάρων που χαρακτηρίζεται από επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή(EMT)[35] και απόκτηση συμπεριφοράς που μοιάζει με καρκινικό βλαστικό κύτταρο(CSC) [36]. Επιπλέον, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ΕΚ [37]. Ενώ αυτό το αγγειογενετικό φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, ο ακριβής κλινικός του αντίκτυπος μένει να προσδιοριστεί [38]. Συγκεντρωτικά οι μηχανισμοί αγγειογένεσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4. Ο σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς: Α) Στους υγιείς ιστούς, τα αγγεία μπορούν να επεκταθούν μέσω της επιστράτευσης ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (EPCs) που προέρχονται από το μυελό των οστών, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Β) Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει την αγγειογένεση με εκβλάστηση. Γ) Μια πρόσθετη οδός είναι η ενδοαγγειακή μικροαγγειακή ανάπτυξη, η οποία χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση των υφιστάμενων αγγείων. Δ) Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν την αγγειογενετική μίμηση, κατά την οποία οργανώνονται ώστε να μοιάζουν με δομές που μοιάζουν με αγγεία. Η εικόνα χρησιμοποιείται από την δημοσίευση: Zuazo-Gaztelu, I., Casanovas, O. (2019). *Mechanisms of Tumor Angiogenesis*. In: Marmé, D. (eds) *Tumor Angiogenesis*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33673-2_1

2.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση

Η αναλυτική παρουσίαση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την αγγειογένεση γίνεται αλλού [39] και ξεφεύγει από τον σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ωστόσο παρακάτω γίνεται μια αδρή παρουσίαση των κύριων ρυθμιστικών μηχανισμών που συμμετέχουν στην αγγειογένεση.

2.2.1 Σηματοδότηση VEGF

Παρά το γεγονός ότι η οικογένεια των VEGF αποτελείται από λίγα μόνο μέλη, είναι αξιοσημείωτο ότι μια πολύπλοκη διαδικασία όπως η αγγειογένεση ρυθμίζεται κυρίως από έναν μόνο αυξητικό παράγοντα, τον VEGF. Η οικογένεια αυτή ξεχωρίζει από άλλες αγγειογενετικές υπεροικογένειες λόγω των διακριτών ρόλων των μελών της, οι οποίοι είναι σε μεγάλο βαθμό μη πλεονάζοντες.

Ο VEGF, επίσης γνωστός ως VEGF-A, είναι ο κύριος παράγοντας που πυροδοτεί την αγγειογένεση τόσο σε υγιείς όσο και σε νοσογόνες καταστάσεις ενεργοποιώντας τον VEGFR-2 (που ονομάζεται επίσης FLK1)[40]. Οι NRP1 και NRP2 είναι νευροπιλίνες που λειτουργούν ως συνυποδοχείς του VEGF, ενισχύοντας τη δραστηριότητα του VEGFR-2, ενώ παράλληλα σηματοδοτούν και αυτόνομα [41]. Η απώλεια του VEGF ή η ανεπάρκεια του VEGFR-2 σταματά την αγγειακή ανάπτυξη [42]. Σε απόκριση σε μια κλίση συγκέντρωσης που δημιουργείται από διαλυτές

και δεσμευμένες ισομορφές του VEGF στην ECM, τα κύτταρα κορυφής αυξάνουν την έκφραση του DLL4, ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι NOTCH στα κύτταρα του μίσχου, το οποίο αναστέλλει την έκφραση του VEGFR-2. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα του μίσχου ανταποκρίνονται λιγότερο στον VEGF, διασφαλίζοντας ότι το κύτταρο της κορυφής αναλαμβάνει την πρωτοκαθεδρία στην αγγειογένεση [43]. Ενώ οι διαλυτές ισομορφές του VEGF διεγείρουν τη διεύρυνση των αγγείων, οι δεσμευμένες στην ECM ισομορφές προάγουν τη διακλάδωση. Ο παρακρινής VEGF που απελευθερώνεται από καρκινικά, μυελοειδή ή στρωματικά κύτταρα ενισχύει τη διακλάδωση των αγγείων και οδηγεί σε ανώμαλα καρκινικά αγγεία [44]. Αντίθετα, ο αυτοκρινής VEGF που απελευθερώνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλει στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης [45].

Ο VEGF-C, ο οποίος αποτελεί συνδέτη για τους υποδοχείς VEGFR-2 και VEGFR-3, πυροδοτεί την ενεργοποίηση των κυττάρων κορυφής [46]. Ο VEGFR-3 είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης και στη συνέχεια διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση της λεμφαγγειογένεσης - της διαδικασίας δημιουργίας νέων λεμφαγγείων από προϋπάρχοντα [47].

Ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (PlGF) αρχικά αναγνωρίστηκε ως μόριο που μοιάζει με τον VEGF και θεωρήθηκε ότι έχει αγγειογενετικές ιδιότητες. Ωστόσο, σε αντίθεση με τον VEGF, ο PlGF δεν είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη και έχει ρόλο μόνο στα πλαίσια νόσου [48],[49]. Ο PlGF έχει πολλαπλές λειτουργίες ως κυτταροκίνη, διεγείροντας την αγγειογένεση μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Ενεργοποιεί επίσης διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως ενδοθηλιακά προγονικά και μυελοειδή κύτταρα, καθώς και στρωματικά κύτταρα, δημιουργώντας ένα περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, ο PlGF προάγει την ενεργοποίηση των καρκινικών κυττάρων και αλλάζει την πόλωση των μακροφάγων που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs) [50]. Ο αποκλεισμός του PlGF με αντισώματα κατά του PlGF μπορεί να μιμηθεί τα αποτελέσματα της γενετικής ανεπάρκειας του *Plgf*, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της αιμάτωσης και της ωρίμανσης των αγγείων και την αύξηση της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [51]. Η αποτελεσματικότητα του αποκλεισμού του PlGF ως θεραπευτικής στρατηγικής για τους καρκινοπαθείς δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί. Σε προκλινικά μοντέλα, η

χορήγηση πρωτεΐνης ή γονιδίου PlGF μπορεί να ενισχύσει την επαναγγείωση ισχαιμικών ιστών.

Η ακριβής λειτουργία του υποδοχέα VEGFR-1, επίσης γνωστού ως FLT-1, στη διαδικασία της αγγειογένεσης δεν είναι πλήρως κατανοητή. Ο VEGFR-1 είναι παρών τόσο σε μια μεμβρανική μορφή που είναι ικανή να σηματοδοτεί, όσο και σε μια διαλυτή μορφή που ονομάζεται sFLT-1 και μπορεί να συλλάβει συνδέτες και δυνητικά να προάγει ή να αναστέλλει τον σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων [52]. Η ασθενής δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης του VEGFR-1 μπορεί επίσης να δρα ως δόλωμα για τον VEGF, το οποίο θα μπορούσε να συμβάλει στη ρύθμιση της ποσότητας του ελεύθερου VEGF που είναι διαθέσιμη για την ενεργοποίηση του VEGFR-2. Η απώλεια του VEGFR-1 έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε υπερανάπτυξη των αγγείων. Ωστόσο, η ενδοκυτταρική σηματοδότηση του VEGFR-1 σε ενδοθηλιακά, στρωματικά και μυελικά κύτταρα μπορεί να διεγείρει την παθολογική αγγειογένεση [53]. Η σηματοδότηση του VEGFR-1 μπορεί επίσης να διεγείρει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων VEGFR-1+ με τρόπο ανεξάρτητο από την αγγειογένεση και να ρυθμίσει την MMP9 στα ενδοθηλιακά κύτταρα στην προμεταστατική περιοχή [54].

2.2.2 Σηματοδότηση PDGF

Η αποτελεσματική λειτουργία των αγγείων απαιτεί να είναι πλήρως ανεπτυγμένα και να καλύπτονται από τοιχωματικά κύτταρα. Οι αυξητικοί παράγοντες PDGFs, οι αγγειοποιητίνες και ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-βήτα (TGF-β) εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία [55]. Τα αγγειογενετικά ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν PDGF-B για να προσελκύσουν τα PDGFR-β+ περικύτταρα, τα οποία σταθεροποιούν τους διαύλους των ενδοθηλιακών κυττάρων. Εάν λείπουν τα περικύτταρα, μπορεί να εμφανιστεί διαρροή των αγγείων, ελικοειδής ροή, σχηματισμός μικροανευρύσματος και αιμορραγία [56]. Ο PDGF-B που εκκρίνεται από τον όγκο μπορεί επίσης να στρατολογήσει έμμεσα τα περικύτταρα μέσω της ρύθμισης του SDF-1α, ενώ τα περικύτταρα μπορούν επίσης να προέρχονται από PDGFR-β+ περιαγγειακά, προγονικά περικύτταρα [56]. Ο VEGF μειώνει την κάλυψη των περικυττάρων αναστέλλοντας τη σηματοδότηση του PDGFR-β στα τοιχωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανώμαλων καρκινικών αγγείων [57]. Η αναστολή του PDGFR μειώνει την ανάπτυξη

του όγκου προκαλώντας αποκόλληση των περικυττάρων, οδηγώντας σε ανώριμα αγγεία που μπορεί να υποτροπιάσουν. Η πρωτεογλυκάνη NG2 είναι επίσης σημαντική για το σχηματισμό αγγείων και η υπερέκφραση του PDGF-B μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου προωθώντας τη στρατολόγηση των περικυττάρων και προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα περικύτταρα προστατεύουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την απόσυρση του VEGF και προσδίδουν αντίσταση στον αποκλεισμό του VEGF παράγοντας VEGF [58]. Ο αποκλεισμός του PDGF-B μπορεί να καταστήσει τα ώριμα αγγεία πιο ευαίσθητα στον αποκλεισμό του VEGF εξαντλώντας τα περικύτταρα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συνδυαστική θεραπεία δεν είναι πιο αποτελεσματική από τη μονοθεραπεία κατά του VEGF [59].

2.2.3 Σηματοδότηση FGF

Η υπεροικογένεια FGF είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος βιολογικών διεργασιών. Μεταξύ αυτών, ο bFGF και ο FGF1 έχει βρεθεί ότι έχουν αγγειογενετικές και αρτηριογενετικές ιδιότητες, ενώ ο FGF9 διεγείρει την αγγειογένεση στην αποκατάσταση των οστών [60]. Οι FGF ενεργοποιούν τους FGFRs στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή προάγουν έμμεσα την αγγειογένεση προκαλώντας την απελευθέρωση αγγειογενετικών παραγόντων από άλλους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα, η σηματοδότηση μέσω FGF στην καρδιά διεγείρει την ανάπτυξη των αγγείων προκαλώντας την απελευθέρωση ANG-2 και VEGF-B [60]. Η διατήρηση χαμηλών επιπέδων FGF είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας, καθώς η αναστολή του FGFR στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να προκαλέσει αποσύνθεση των αγγείων [61]. Η μη φυσιολογική σηματοδότηση του FGF συμβάλλει στην αγγειογένεση του όγκου και διευκολύνει την αποφυγή της αγγείωσης του όγκου από θεραπείες με αναστολείς VEGF ή EGFR. Η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων του FGF ή του FGFR για την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης υπήρξε αργή [62].

2.2.4 Σηματοδότηση ANG και TIE

Η διατήρηση της κατάστασης αδράνειας των αγγείων, ενώ παράλληλα είναι σε θέση να ανταποκρίνονται σε αγγειογενετικά ερεθίσματα, είναι ζωτικής σημασίας για τα υγιή αγγεία. Το σύστημα αγγειοποιητίνης (ANG)-Tie αποτελεί έναν τέτοιο διακόπτη. Η οικογένεια ANG αποτελείται από δύο υποδοχείς, τους TIE-1 και TIE-2, και τρεις συνδέτες, τους ANG-1,

ANG-2 και ANG-4. Η ANG-1 δρα ως αγωνιστής του TIE-2, ενώ η ANG-2 λειτουργεί ως ανταγωνιστικός ανταγωνιστής της ANG-1 με τρόπο εξαρτώμενο από το πλαίσιο, και η λειτουργία της ANG-4 δεν είναι τόσο καλά κατανοητή. Ο TIE-1, ένας ορφανός υποδοχέας χωρίς αναγνωρισμένο ligand, μπορεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του TIE-2, αλλά ο ρόλος του είναι ασαφής [63]. Η ANG-1 εκφράζεται από τοιχωματικά και καρκινικά κύτταρα, ενώ η ANG-2 απελευθερώνεται από τα αγγειογενετικά κύτταρα της κορυφής. Στο συρρέον ενδοθήλιο, η ANG-1 επάγει τη συσσώρευση του TIE-2 στις συνδέσεις κυττάρου-κυττάρου για τη διατήρηση της ηρεμίας των ενδοθηλιακών κυττάρων και την προώθηση της στεγανότητας των αγγείων. Η ANG-1 διεγείρει επίσης την τοιχωματική κάλυψη και την εναπόθεση βασικής μεμβράνης. Παρουσία αγγειογενετικών διεγερτών, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που βλαστάνουν απελευθερώνουν ANG-2, η οποία ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση ANG-1 και TIE-2 για να ενισχύσει την αποκόλληση των τοιχωματικών κυττάρων, την αγγειακή διαπερατότητα και τη βλάστηση των ενδοθηλιακών κυττάρων [64]. Η ανεπάρκεια του Tie2 σε ποντίκια προκαλεί αγγειακές ανωμαλίες και οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του TIE2 στον άνθρωπο οδηγούν σε φλεβικές δυσπλασίες [65].

Οι συνολικές επιδράσεις του συστήματος ANG-TIE στους όγκους εξαρτώνται από το πλαίσιο. Η ANG-1 διεγείρει την ανάπτυξη των όγκων προωθώντας την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την ωρίμανση των αγγείων, αλλά επίσης αναστέλλει την εξωσωματική διαφυγή των καρκινικών κυττάρων και διατηρεί την ακεραιότητα των υγιών αγγείων εκτός των όγκων. Επομένως, απαιτείται προσοχή όταν εξετάζεται η ANG-1 ως αντικαρκινικός στόχος [66]. Αντίθετα, η ANG-2 μπορεί να είναι πιο ελκυστικός θεραπευτικός στόχος, δεδομένου ότι διεγείρει την αγγειογένεση του όγκου και στρατολογεί προ-αγγειογενετικά TEM και η αναστολή της ANG-2 προάγει την οπισθοδρόμηση και την ομαλοποίηση των αγγείων. Ο ταυτόχρονος αποκλεισμός του VEGF και των ANGs είναι ανώτερος στην αναστολή της αγγειογένεσης του όγκου, της μετάστασης και της διαρροής [67]. Διάφοροι παράγοντες που αναστέλλουν είτε τον TIE-2 είτε την ANG-2 βρίσκονται υπό αξιολόγηση σε πρώιμη φάση κλινικών δοκιμών [67].

2.2.5 Σηματοδότηση NOTCH και WNT

Το μοντέλο της διακλάδωσης των αγγείων προτείνει ότι τα κύτταρα της κορυφής μεταναστεύουν, ενώ τα κύτταρα του μίσχου πολλαπλασιάζονται. Πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει τη σηματοδότηση NOTCH ως βασικό συστατικό αυτής της διαδικασίας [43]. Με την ενεργοποίηση του VEGFR-2 από τον VEGF, τα ακραία κύτταρα ρυθμίζουν την έκφραση του DLL4, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί το NOTCH στα γειτονικά κύτταρα του μίσχου. Αυτό ρυθμίζει προς τα κάτω τον VEGFR-2 αλλά ρυθμίζει προς τα πάνω τον VEGFR-1, καθιστώντας τα κύτταρα του μίσχου λιγότερο ευαίσθητα στον VEGF αλλά πιο ευαίσθητα στον PlGF. Αυτό συνολικά περιορίζει τη διακλάδωση αλλά δημιουργεί αιματούμενα αγγεία. Επιπλέον, το DLL4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζει τον PDGFR-β στα NOTCH+ τοιχωματικά κύτταρα, διεγείροντας την ωρίμανση των αγγείων. Το JAGGED1 που εκφράζεται από τα κύτταρα του μίσχου προάγει την επιλογή των ακραίων κυττάρων παρεμβαίνοντας στην αμοιβαία σηματοδότηση DLL4 και NOTCH από το κύτταρο του μίσχου προς το ακραίο κύτταρο [68]. Η σηματοδότηση NOTCH στα στελεχιαία κύτταρα είναι δυναμική με την πάροδο του χρόνου, καθώς ρυθμίζει τον δικό της αναστολέα, NRARP [69].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταγωνίζονται συνεχώς για τη θέση του ακραίου κυττάρου προσαρμόζοντας την έκφραση του VEGFR-2 έναντι του VEGFR-1, καθιστώντας αυτό το κύκλωμα σηματοδότησης συνεχώς επανεκτιμώμενο καθώς τα κύτταρα συναντούν νέους γείτονες [70]. Η αναστολή της σηματοδότησης DLL4 και NOTCH οδηγεί στο σχηματισμό πολυπληθέστερων αλλά υποαγγειακών αγγείων, με αποτέλεσμα την υποξία του όγκου και την αναστολή της ανάπτυξης. Ωστόσο, ο χρόνιος αποκλεισμός της DLL4 σε υγιή ζώα προκαλεί αγγειακές νεοπλασίες και η αδρανοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων του RBP-J, ενός μεταγραφικού παράγοντα κατάντη της NOTCH, οδηγεί επίσης σε ανεξέλεγκτη αγγειογένεση [71]. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη προσοχής κατά της αδιάκριτης χρήσης των αναστολέων DLL4 και NOTCH για τη θεραπεία του καρκίνου.

Τα μέλη της οικογένειας hedgehog συμμετέχουν επίσης στην εμβρυϊκή αγγειογένεση, την αγγειακή μορφογένεση και τον σχηματισμό σωλήνων, καθώς και στον προσδιορισμό των αρτηριών, ρυθμίζοντας την έκφραση της NOTCH [72]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν διάφορους τύπους

συνδέσμων WNT και τους υποδοχείς τους frizzled (FZD), ορισμένοι από τους οποίους διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η NOTCH ενεργοποιεί τη σηματοδότηση WNT στα πολλαπλασιαζόμενα στελεχιαία κύτταρα κατά τη διακλάδωση των αγγείων, εξηγώντας γιατί η NOTCH, η οποία συνήθως καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την ηρεμία, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των στελεχιαίων κυττάρων *in vivo*. Ωστόσο, η WNT ενεργοποιεί επίσης τη NOTCH σε ένα σύστημα αμοιβαίας ανατροφοδότησης, με αποτέλεσμα ελαττώματα διακλάδωσης, απώλεια της φλεβικής ταυτότητας και ανώμαλη αγγειακή αναδιαμόρφωση. Ορισμένα μέλη του WNT αναστέλλουν την αγγειογένεση και θα χρειαστούν ειδικοί αναστολείς αυτών των πρωτεϊνών [73].

2.2.6 Σηματοδότηση EPH/ephrin

Κατά την ανάπτυξη των νευρώνων και των αιμοφόρων αγγείων, τα μόρια καθοδήγησης έχουν τόσο ελκυστικό όσο και απωθητικό ρόλο. Λεπτομερής ανάλυση της δομής και της σηματοδοτικής λειτουργίας του συστήματος των εφρινών γίνεται στο κεφάλαιο 3.

3. EPHs και εφρίνες: Δομή και σηματοδοτικά μονοπάτια

Η οικογένεια EPH περιλαμβάνει δεκατέσσερα διακριτά μέλη που χωρίζονται σε δύο ομάδες: EPHA (EPHA1-8 και EPHA10) και EPHB (EPHB1-4 και EPHB6) [74],[75],[76],[77],[78]. Κατηγοριοποιούνται με βάση τις ομοιότητες της αλληλουχίας τους, τις προτιμήσεις σε συνδέτες και τα δομικά χαρακτηριστικά τους [79]. Τα μέλη της EPHA προτιμούν τις εφρίνεςΑ που συνδέονται με γλυκοσυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη (GPI), ενώ τα μέλη της EPHB προτιμούν τις διαμεμβρανικές εφρίνεςΒ [79]. Στον άνθρωπο υπάρχουν εννέα υποδοχείς EPHA που μπορούν να συνδεθούν με πέντε συνδέτες εφρινών Α και πέντε υποδοχείς EPHB που αλληλεπιδρούν με τρεις συνδέτες εφρινών Β [80]. Αυτοί οι υποδοχείς μοιράζονται μια κοινή δομή, που περιλαμβάνει τομείς όπως μια εξωκυτταρική περιοχή πρόσδεσης συνδέτη, μια περιοχή πλούσια σε Cys με μοτίβα τύπου sushī και επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), περιοχές ινωδονεκτίνης, μια διαμεμβρανική περιοχή, και μια ενδοκυττάρια περιοχή κινάσης τυροσίνης που πλαισιώνεται από ένα sterile alpha motif (SAM) και μια πρωτεΐνη μετα-συναπτικής πυκνότητας (PSD95), έναν *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1) και μια πρωτεϊνική περιοχή zonula occludens-1 (PDZ) [81]. Οι εφρίνες Α διαθέτουν μια σφαιρική περιοχή πρόσδεσης υποδοχέα με σύνδεσμο την GPI, ενώ οι εφρίνες Β διαθέτουν μια σφαιρική περιοχή πρόσδεσης υποδοχέα, διαμεμβρανική περιοχή, ενδοκυτταρικές θέσεις φωσφορυλίωσης και περιοχές PDZ [82].

3.1 Ειδική πρόσδεση

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ EPHs και εφρινών δεν είναι πάντα απλές. Ενώ υπάρχει ένας γενικός κανόνας ότι οι εφρίνες Α συνδέονται με τις EPHAs και οι εφρίνες Β συνδέονται με τις EPHBs, υπάρχουν εξαιρέσεις [83]. Ειδικότερα, οι εφρίνες τύπου Β μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με την EPHA4 και η εφρίνη Α5 μπορεί να συνδεθεί με την EPHB2 [83],[84].

3.2 Μοναδική ενεργοποίηση και σηματοδότηση

Η ενεργοποίηση και η σηματοδότηση των EPH έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Σε αντίθεση με τις τυπικές κινάσες τυροσίνης υποδοχέα (RTKs), οι οποίες απαιτούν διμερισμό για την ενεργοποίηση, οι EPHs εξαρτώνται από τον πολυμερισμό, σχηματίζοντας συστάδες που περιλαμβάνουν μόρια εφρινών και EPH [85]. Το μέγεθος και η σύνθεση

αυτών των συστάδων EPH/εφρίνης καθορίζουν τη φύση και την ισχύ της σηματοδότησης. Μετά τη σύνδεση της εφρίνης, μπορεί να συμβεί αμφίδρομη σηματοδότηση: η σύνδεση της εφρίνης με τις EPHs έχει ως αποτέλεσμα "προς τα εμπρός σηματοδότηση", ενώ οι EPHs μπορούν επίσης να ξεκινήσουν "αντίστροφη σηματοδότηση" [79],[86]. Για την προς τα εμπρός σηματοδότηση, η αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης των EPH κοντά στην κυτταρική μεμβράνη είναι ζωτικής σημασίας. Οι εφρίνες B, οι οποίες στερούνται εγγενούς καταλυτικής δραστηριότητας, μπορούν να πυροδοτήσουν φωσφορυλι-εξαρτώμενη ή ανεξάρτητη αντίστροφη σηματοδότηση, με τη μεσολάβηση των κινάσων Src ή τη συσχέτιση με πρωτεΐνες εταίρους, αντίστοιχα [87],[88]. Είναι ενδιαφέρον ότι οι εφρίνες A μπορούν επίσης να συμμετέχουν στην αντίστροφη σηματοδότηση [86].

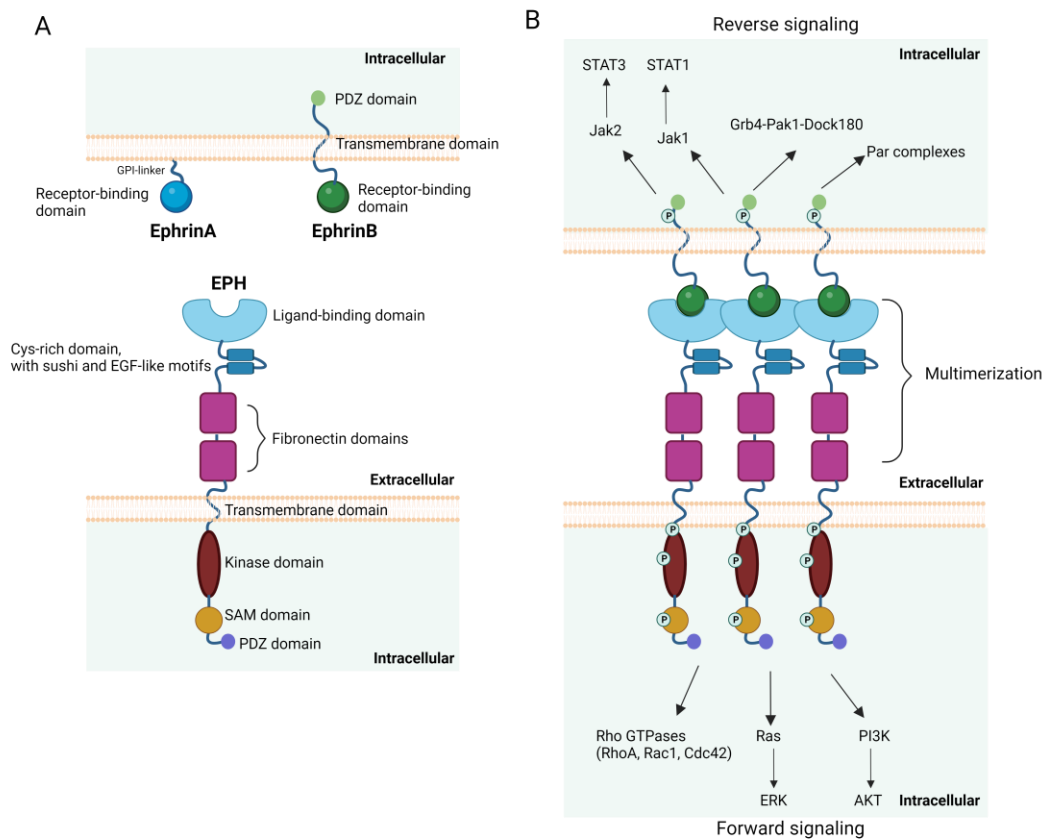
3.3 Εμπρόσθια σηματοδότηση

Η προς τα εμπρός σηματοδότηση στο σύστημα EPH ακολουθεί το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης RTK [89]. Η πρόσδεση συνδέσμου ενεργοποιεί την περιοχή κινάσης του υποδοχέα, ξεκινώντας έναν καταρράκτη γεγονότων που περιλαμβάνει μεταγενέστερες πρωτεΐνες προσαρμογείς και τελεστές. Στους βασικούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι GTPάσες της οικογένειας Rho και Ras, καθώς και η Akt/στόχος του συμπλέγματος ραπαμυκίνης 1 (mTORC1) [90]. Η ρύθμιση των Rho GTPασών με μεσολάβηση των EPH, όπως οι RhoA, Rac1 και Cdc42, επηρεάζει το κυτταρικό σχήμα, την προσκόλληση και την κινητικότητα των κυττάρων επηρεάζοντας τον κυτταροσκελετό ακτίνης [89]. Επιπλέον, η προς τα εμπρός σηματοδότηση της EPH οδηγεί συνήθως στην αναστολή του μονοπατιού Ras/εξωκυτταρικού σήματος ρυθμιζόμενης κινάσης (ERK), επηρεάζοντας διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαίρεσης, της διαφοροποίησης, της κινητικότητας και της έκφρασης γονιδίων[91]. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η προς τα εμπρός σηματοδότηση της EPH μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι Ras/ERK [89].

3.4 Αντίστροφη σηματοδότηση

Η αντίστροφη σηματοδότηση, που επάγεται από τις εφρίνες τύπου B, προσθέτει πολυπλοκότητα στην εικόνα [89]. Μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια που περιλαμβάνουν την κινάση Janus (Jak)2/τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής (STAT)3 και την

Jak1/STAT1/c-Jun N-terminal kinase (JNK)3 [79]. Επιπλέον, η αντίστροφη σηματοδότηση αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα Grb4-Pak1-Dock180 και Par polarity [75]. Όλα τα ανωτέρω απεικονίζονται αδρά στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Οι υποδοχείς EPH ενεργοποιούν μοναδικά μονοπάτια σηματοδότησης. Η προς τα εμπρός σηματοδότηση ενεργοποιεί τα μόρια Rho και Ras. Αντίστροφα, η αντίστροφη σηματοδότηση προκαλεί την ενεργοποίηση μονοπατιών Jak/STAT και άλλων συνδεδεμένων μονοπατιών, επιδρώντας στην κυτταρική κινητικότητα και διαφοροποίηση. Created with Biorender.com. Η εικόνα χρησιμοποιείται από την δημοσίευση: *Stergiou IE, Papadakos SP, Karyda A, Tsitsilonis OE, Dimopoulos MA, Theocharis S. EPH/Ephrin Signaling in Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies: Deciphering Their Intricate Role and Unraveling Possible New Therapeutic Targets. Cancers (Basel). 2023 Aug 4;15(15):3963. doi: 10.3390/cancers15153963. PMID: 37568780; PMCID: PMC10417178.*

3.5 Συμπέρασμα

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των εφρινών και των EPHs αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες γνώσεις σχετικά με τα μονοπάτια σηματοδότησης. Η κατανόηση των ιδιαιτεροτήτων πρόσδεσής τους και της αμφίδρομης φύσης της σηματοδότησής τους προσθέτει βάθος στις γνώσεις μας για την κυτταρική επικοινωνία στη βιολογία των θηλαστικών.

4.Μηχανισμοί αγγειογένεσης στα GIST

Αναλυτική παρουσίαση των μοριακών μηχανισμών αγγειογένεσης έχει δημοσιευτεί από την ερευνητική μας ομάδα [92]. Παρακάτω γίνεται μια πιο σύντομη ανασκόπηση τους.

4.1 Οι μοριακοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης στα GIST-προκλινικά δεδομένα

Μελέτες με ξενομοσχεύματα σε ποντίκια έχουν παράσχει πολύτιμες πληροφορίες για τους αγγειογενετικούς μηχανισμούς στα GIST. Η μελέτη των Giner et al παρείχε μια θεμελιώδη εννοιολογική προσέγγιση της αγγειογενετικής διαδικασίας στα GIST, χρησιμοποιώντας ένα έντονα CD117, DOG1 και CD34 θετικό GIST με συνεχή έκφραση Ki-67 [93]. Τα πειράματα νεοαγγείωσης αποκάλυψαν τη φάση επαγωγής κατά τη διάρκεια των πρώτων 96 ωρών μετά την εμφύτευση, ακολουθούμενη από τη φάση αναδιαμόρφωσης, η οποία καθοδηγείται από την έκφραση των γονιδίων VEGF, VEGFC, PDGFA και PDGFB, σύμφωνα με τους υποδοχείς τους. Τα δεδομένα IHC έδειξαν ότι ο VEGF και οι υποδοχείς VEGFR2, VEGFR3 ήταν θετικοί την ημέρα 4 μετά το ξενομόσχευμα, ενώ οι CXCL9, CXCL10, GRO και οι υποδοχείς τους CXCR3, CXCR2 χρωματίστηκαν στα καρκινικά κύτταρα και το στρώμα σύντομα μετά την εμφύτευση. Οι επιδράσεις αυτές ενορχηστρώνονται ενδεχομένως από τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα (HIF-1α) και το σηματοδοτικό σύστημα CXCL12/CXCR4, τα οποία εκφράζονται συνεχώς [93].

Η αγγειογενετική διαδικασία στα GIST έχει γίνει καλύτερα κατανοητή, με την ταυτοποίηση πολλών ρυθμιστικών μορίων. Η CCL2 είναι μια χημειοκίνη που εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα και προσελκύει ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα που εκφράζουν την CCR2 από την κυκλοφορία του αίματος, όπως παρατηρείται στον καρκίνο του μαστού που καθοδηγείται από HER-2/neu [94]. Αντίθετα, η επαγόμενη από τον VEGF ανύψωση του NF-κΒ χρησιμοποιείται συχνά για την προσέλκυση φλεγμονωδών κυττάρων ώστε να διεγερθεί η αγγειογένεση στον όγκο [95]. Η οικογένεια των βρωμοδομινών και των εξωγενών τομέων ρυθμίζει την ανοσία και τα μονοπάτια σηματοδότησης [96]. Στα GIST, η ρύθμιση του BRD4 ενισχύει τις διαδικασίες μετανάστευσης και εισβολής και ρυθμίζει την αγγειογένεση μέσω της σηματοδοτικής οδού NF-κΒ/CCL2. Τα κύτταρα που εκφράζουν το BRD4 προσελκύουν επίσης τα σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα μέσω της έκφρασης του CCL2, τα

οποία αυξάνουν την πυκνότητα των μικροαγγείων του όγκου και εκκρίνουν διάφορα προ-αγγειογενετικά μόρια, όπως τα VEGFA, LOX και MMP9 [97],[98]. Ομοίως, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PPP2R1A, που ανευρίσκονται σχεδόν στο 20% των περιπτώσεων GIST, συσχετίζονται με έναν πιο επιθετικό φαινότυπο όγκου και επηρεάζουν τη διαδικασία καρκινογένεσης [99],[100]. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης μέσω της ενίσχυσης της φωσφορυλίωσης των c-kit, Akt1/2, ERK1/2 και WNK1, με την τελευταία να μεσολαβεί στη ρύθμιση της αγγειογενετικής διαδικασίας [101],[102]. Η λεπτομερής ανάλυση αυτών των ειδικών μηχανισμών θα ήταν πολύτιμη και θα πρέπει να επιδιωχθεί.

Επιπλέον, αν και ο ρόλος των επιγενετικών μηχανισμών στην εξέλιξη του GIST είναι καλά τεκμηριωμένος, υπάρχει περιθώριο για την περαιτέρω διαλεύκανση της επίδρασής τους στους αγγειογενετικούς μηχανισμούς. Το επιγενετικές αλλαγές θα μπορούσαν να εξηγήσουν διάφορα κενά στην τρέχουσα κατανόησή μας, τα οποία δεν έχουν διαλευκανθεί με την ταξινόμηση της νόσου σύμφωνα με την κατάσταση μετάλλαξης του γονιδίου-οδηγού. Οι μεταβολές στο προφίλ μεθυλίωσης του όγκου σχετίζονται με έναν πιο επιθετικό φαινότυπο και η κατάσταση μεθυλίωσης του CD133 θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στη διαχείριση της νόσου [103], οι οποίες θα συζητηθούν λεπτομερέστερα παρακάτω [104]. Η οικογένεια των αναδιαμορφωτών της χρωματίνης KDM4 (KDM4A-D) έχει εμπλακεί στην παθογένεια ενός ευρέος φάσματος καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του GIST [105]. Στο GIST, η ρύθμιση του KDM4D έχει αποδειχθεί ότι προάγει την αγγειογένεση *in vivo*, όπως αποδεικνύεται από την υπερέκφραση του CD31 στην ανοσοϊστοχημεία. Οι επιδράσεις αυτές διαμεσολαβούνται από το μονοπάτι HIF1β/VEGFA παρουσία απομεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων *H3K9me3* και *H3K36me3* [106]. Η περαιτέρω διερεύνηση αυτών των συγκεκριμένων μηχανισμών θα μπορούσε να προσφέρει πολύτιμες γνώσεις και θα πρέπει να επιδιωχθεί.

Τέλος, αρκετοί αναστολείς τυροσινικών κινασών ασκούν την αντικαρκινική τους δράση αναστέλλοντας την αγγειογένεση. Η καμποζαντινίμη αναστέλλει τις κινάσες τυροσίνης των υποδοχέων MET, VEGFR2, Flt-3, c-Kit και RET [107],[107], ενώ η σοραφενίμη αναστέλλει τη σηματοδότηση των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-β, Flt-3, c-Kit και των κινασών σερίνης/θρεονίνης Raf [108]. Και τα δύο φάρμακα

μειώνουν τη μικροαγγειακή πυκνότητα του όγκου, όπως αποδεικνύεται από την CD31 IHC [109],[110].

4.2 Η συσχέτιση μεταξύ των απεικονιστικών δεδομένων και της αγγειογένεσης στα GISTs

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης για την αξιολόγηση της κακοήθειας των GIST, συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων συναίνεσης των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας (κριτήρια Fletcher), των κριτηρίων του Παθολογικού Ινστιτούτου των Ενόπλων Δυνάμεων (κριτήρια Miettinen) και της ταξινόμησης TNM της Διεθνούς Ένωσης κατά του Καρκίνου. Αυτά τα συστήματα έχουν περιορισμούς, καθώς δεν μπορούν να προσδιορίσουν με ακρίβεια την επιθετικότητα του όγκου χωρίς χειρουργική αφαίρεση και προσεκτική παθολογική ανάλυση ολόκληρου του όγκου για την εκτίμηση του αριθμού των μιτώσεων [111],[112]. Ενώ η αντιμετώπιση της προχωρημένης, ανεγχείρητης νόσου είναι σαφής, υπάρχουν ακόμη περιθώρια βελτίωσης στη διαχείριση της πρωτοπαθούς εντοπισμένης νόσου, ιδίως σε όγκους μικρού μεγέθους. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και οι μικροί GIST μπορούν να παρουσιάσουν κακοήθη συμπεριφορά. Η ενσωμάτωση απεικονιστικών δεδομένων, όπως η ανωμαλία των αγγείων ή η αιμάτωση, σχετικά με την αγγείωση του όγκου μπορεί να προσφέρει πολύτιμες προγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες [113].

Οι Iannicelli και συν[114] προσπάθησαν να καλύψουν αυτό το κενό στη βιβλιογραφία, διεξάγοντας μια μελέτη-ορόσημο σχετικά με τη χρήση της υπολογιστικής τομογραφίας (CT) ως κύριας απεικονιστικής μεθόδου για ασθενείς με κλινικές εκδηλώσεις GIST. Προηγούμενες μελέτες είχαν επίσης ως στόχο τη συσχέτιση ορισμένων απεικονιστικών χαρακτηριστικών με παθολογικές παραμέτρους [115],[116]. Η μελέτη των Iannicelli και συν[114] διαπίστωσε ότι τα ακανόνιστα περιθώρια στους GIST συνδέονταν με υψηλότερο ποσοστό μιτώσεων από ό,τι οι όγκοι με κανονικά περιθώρια. Επιπλέον, ένα ετερογενές μοτίβο σκιαγραφικής ενίσχυσης (CE), αγγειογένεσης και νέκρωσης συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο μέγεθος όγκου και πιο επιθετική κλινική συμπεριφορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η ένταση της CE αποτελεί έναν νέο δείκτη βιολογικής δραστηριότητας, δεν συσχετίστηκε με τον αριθμό των μιτώσεων ή τη διαστρωμάτωση κινδύνου του όγκου [114]. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν μια έμμεση σύνδεση μεταξύ των ορίων του

όγκου και του ρυθμού μιτώσεων, η οποία είναι απαραίτητη για τη διαστρωμάτωση της κλινικής συμπεριφοράς του όγκου πριν από τη χειρουργική επέμβαση και αναδεικνύει τη σημασία της αγγειογένεσης στην εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, η δυναμική ανάλυση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων που διεξήχθη από τους Strauss και συν[43] διαπίστωσε συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού διάχυσης της F-18-φθοροδεοξυγλυκόζης στον όγκο και της έκφρασης του VEGF-A [117]. Ωστόσο, ο κύριος περιορισμός της αξονικής τομογραφίας είναι η χαμηλή ευαισθησία της για την απεικόνιση της αγγείωσης σε μικρούς όγκους [113]. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση της τεχνολογίας ενδοσκοπικών υπερήχων (EUS).

Τις τελευταίες δεκαετίες, το ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS) έχει γίνει ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στη διαχείριση του GIST λόγω της ικανότητάς του να παρακάμπτει το κοιλιακό λίπος και τα γαστρεντερικά αέρια και της δυνατότητάς του για βιοψία με αναρρόφηση με λεπτή βελόνα (FNA), επιτρέποντας μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση. Με την EUS, τα GIST αναγνωρίζονται ως υποηχοειδείς μάζες που αναδύονται από τον μυϊκό προσθιοειδή ή τον μυϊκό βλεννογόνο. Τα ακανόνιστα περιθώρια, οι κυστικές περιοχές ή οι κακοήθεις λεμφαδένες σχετίζονται με κακή πρόγνωση [118]. Η χρήση σκιαγραφικών μέσων στην EUS ενισχύει τη διαγνωστική της ικανότητα και προάγει την αγγείωση του όγκου ως πολύτιμο προγνωστικό βιοδείκτη. Ο ρόλος του EUS με ενισχυμένη σκιαγραφική ουσία (CE-EUS) έχει εξεταστεί εκτενώς αλλού [119], αλλά θα περιγράψουμε τα βασικά εδώ. Οι Sakamoto και συν [113] ταξινόμησαν την αγγείωση του όγκου σε δύο υποομάδες με βάση το πρότυπο αιμάτωσης (ομοιογενές ή ετερογενές) και την εμφάνιση των αγγείων (κανονική ή ακανόνιστη). Η ομοιογενής αιμάτωση με κανονικά αγγεία υποδήλωνε ήπια κλινική συμπεριφορά. Συνέκριναν επίσης τη διαγνωστική ευαισθησία του ενισχυμένου με σκιαγραφικό αρμονικού υπερηχογραφήματος, του EUS με Power-Doppler και της ενισχυμένης με σκιαγραφικό πολυτομικής υπολογιστικής τομογραφίας (CT) για την απεικόνιση των αγγείων του όγκου. Σε GIST μεγαλύτερα από 3 cm, η ευαισθησία τους ήταν 100%, 75% και 42%, αντίστοιχα. Οι διαφορές ήταν πιο έντονες σε όγκους μικρότερους από 3 cm: 100%, 25% και 0%, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το CE-EUS ανίχνευσε κάθε κακοήθη βλάβη μικρότερη από 3 cm στη συνομοταξία πριν από τη χειρουργική επέμβαση [113].

Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το CE-US είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την απεικόνιση της αγγείωσης. Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα, οι Yamashita και συν [120] κατέδειξαν συσχέτιση μεταξύ των απεικονιστικών ευρημάτων στο CE-US και της παθολογικής διαστρωμάτωσης κινδύνου. Συγκεκριμένα, τα μεγάλα αγγεία στερούνταν ελαστικού ιστού, υποδεικνύοντας ότι η νεοαγγείωση είναι ο υποκείμενος παθογενετικός μηχανισμός και εξέφραζαν VEGF [120].

Αυτά τα απεικονιστικά ευρήματα της αγγείωσης μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις για μια υποομάδα ασθενών με μικρούς όγκους (< 3 cm) και επιθετικούς φαινότυπους. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερα ουσιαστικά στοιχεία για την ορθή αντιμετώπιση αυτών των διλημμάτων.

4.3 Διαμεσολαβητές της αγγειογένεσης ως βιοδείκτες σε κλινικά δεδομένα GIST

Η προσαρμογή της ιατρικής περίθαλψης απαιτεί την ανάπτυξη βιοδεικτών. Η υγρή βιοψία είναι μια καινοτόμος, μη επεμβατική μέθοδος που παρέχει προγνωστικές πληροφορίες για τη θεραπευτική αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών [121],[122]. Η εφαρμογή της στη θεραπεία του GIST είναι ακόμη σχετικά νέα [123],[124]. Αρκετές μεταγενέστερες και πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει μόρια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση με παθολογικά χαρακτηριστικά. Παρά τους περιορισμούς της έρευνας, αναδεικνύεται ο κρίσιμος ρόλος της αγγειογένεσης στην κακοήγη εξέλιξη των GIST. Τα κυριότερα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Συγγραφείς	Μέγεθος δείγματος	Μόριο/Μέθοδος	Αποτελέσματα	Αναφορές
Zhao Y και συν	124 ασθενείς	HIF1a/IHC	Συσχέτιση με την DFS	[125]
		VEGF/IHC	Συσχέτιση με την DFS	
		MVD/IHC	Συσχέτιση με την DFS	
Kang BW και συν	213 ασθενείς	634G/C	Καλύτερη συνολική επιβίωση (OS)	[126]

			και επιβίωση χωρίς υποτροφή νόσου (RFS) από την 634G/G	
Μυ J και συν	20 ασθενείς	BRD4/mRNA, IHC	Αυξημένη έκφραση BRD4 σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό	[97]
		BRD4/ IHC	Συνδέεται με φτωχή συνολική επιβίωση (OS) και επιβίωση χωρίς νόσο (DFS)	
Toda-Ishii M και συν	94 ασθενείς	PPP2R1A μεταλλάξεις/ PCR	Χαμηλότερη συνολική επιβίωση (OS)	[127]
			Χαμηλότερη επιβίωση χωρίς νόσο (DFS)	
Liu N και συν	52 ασθενείς	MMP-9, COX-2, VEGF/ IHC	Ενίσχυση της μετάστασης	[128]
			Υψηλότερος αριθμός μιτώσεων	
			Υψηλότερη συχνότητα κεντρικής νέκρωσης	
Takahashi R και συν	53 ασθενείς με GIST	VEGF/IHC	Συσχέτιση με ηπατική μετάσταση	[129]

	εντοπιζόμενο στο στόμαχο	VEGF/IHC	Κακή 10ετής συνολική επιβίωση (OS)	
		MVD/IHC	Συσχέτιση με ηπατική μετάσταση	
Verboom M και συν	227 ασθενείς - 36 SNPs - 18 γονίδια	Πολυμορφισμός rs1570360 στο γονίδιο VEGFA	Συσχέτιση με φτωχότερη PFS (P = 0,015)	[130]
		Πολυμορφισμός rs1870377 στο γονίδιο VEGFR2	Συσχέτιση με χαμηλότερη PFS (P = 0,037)	
Chen WT και συν	62 ασθενείς	HIF-1a/IHC	Συσχέτιση με ασθένεια υψηλού κινδύνου	[131]
			Συσχέτιση με υποτροπή ή μετάσταση του GIST	
Basilio-de-Oliveira RP και συν	54 ασθενείς	VEGF/IHC	Συσχέτιση με την επιβίωση	[132]
		CD105/IHC	Συσχέτιση με την πρόγνωση	
Imamura M και συν	95 ασθενείς	MVD/IHC	Συσχέτιση με το grading του όγκου	[133]
		MVD/IHC	Συσχέτιση με την έκφραση του VEGF	
		MVD/IHC	Συσχέτιση με την επιβίωση χωρίς νόσο (DFS) μετά τη χειρουργική επέμβαση	
		διαλυτός VEGF	Συσχέτιση με μικρότερη ειδική για τη	

Wang TB και συν	68 ασθενείς		νόσο επιβίωση (DSS)	[134]
		VEGF/IHC	Συσχέτιση με μικρότερη ειδική για τη νόσο επιβίωση (DSS)	
		MVD/IHC	Συσχέτιση με μικρότερη ειδική για τη νόσο επιβίωση (DSS)	

Πίνακας 1. Παρουσιάζονται τα βασικότερα κλινικά δεδομένα σχετικά με μόρια-διαμεσολαβητές της αγγειογένεσης στα GIST.

OS: Overall survival; DSS: Disease-specific survival; DFS: Disease-free survival; PFS: Progression-free survival; VEGF: Vascular endothelial growth factor; IHC: Immunohistochemistry; MVD: Microvascular density; HIF: Hypoxia-inducible factor.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.Υλικά και μέθοδοι

Αξιολογήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των υποδοχέων ERHA1, ERHA2, ERHA4, ERHA6 και ERHB4 καθώς και του CD34 σε ιστοτεμαχίδια που είχαν μονιμοποιηθεί με φορμαλδεΰδη και ήταν ενσωματωμένα σε παραφίνη, τα οποία προήλθαν από 43 ασθενείς με GIST (27 άνδρες, 16 γυναίκες, ηλικία 41-90 ετών). Η έκφραση των ERHs και του histoscore (H-score, ένταση χρώσης και ποσοστό θετικών κυττάρων) συσχετίστηκε με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

6. Αποτελέσματα

Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά:

Στη μελέτη ενσωματώθηκαν 43 ασθενείς με GIST, διάμεση ηλικία τα 66 έτη (εύρος ηλικιών 41 έτη). Τα 27 περιστατικά είναι άνδρες και τα υπόλοιπα 16 γυναίκες. Η πλειοψηφία των GIST έχουν εκδηλωθεί στο στομάχι (21 περιστατικά – 51.2%) και το λεπτό έντερο (15 περιστατικά – 36.6%) ενώ ακολουθούν το δωδεκαδάκτυλο (2 περιστατικά – 4.9%), το ήπαρ (1 περιστατικό - 2,4%), ο οισοφάγος (1 περιστατικό - 2,4%) και το παχύ έντερο (1 περιστατικό - 2,4%).

Τα περιστατικά ταξινομήθηκαν περαιτέρω με βάση το ποσοστό μιτώσεων σε δύο κατηγορίες: χαμηλό (25 περιστατικά - 58,1%) και υψηλό (18 περιστατικά - 41,9%), με βάση την ταξινόμηση T της σταδιοποίησης TNM σε T1 (4 ασθενείς - 9.5%), T2 (17 ασθενείς - 40.5%), T3 (12 ασθενείς - 28.6%) και T4 (9 ασθενείς - 21.4%), με βάση την προγνωστική ταξινόμηση σε στάδιο I (19 περιστατικά - 44.2%), σε στάδιο II (9 περιστατικά - 20,9%), σε στάδιο III (13 περιστατικά - 30,2%) και στάδιο IV (2 περιστατικά - 4,7%), με βάση την ύπαρξη νέκρωσης (15 περιστατικά - 46.9% ή την απουσία νέκρωσης (17 περιστατικά - 53.1%). Τέλος τα περιστατικά ταξινομήθηκαν επιπλέον με βάση την μορφολογία τους. Αναγνωρίζεται παρουσία επιθηλιοειδών κυττάρων σε 8/37 περιστατικά (21,6%) και παρουσία ατρακτοειδών κυττάρων σε 5/37 περιστατικά (13,5%). Στον Πίνακα 2 καταγράφεται η διακύμανση των H-score.

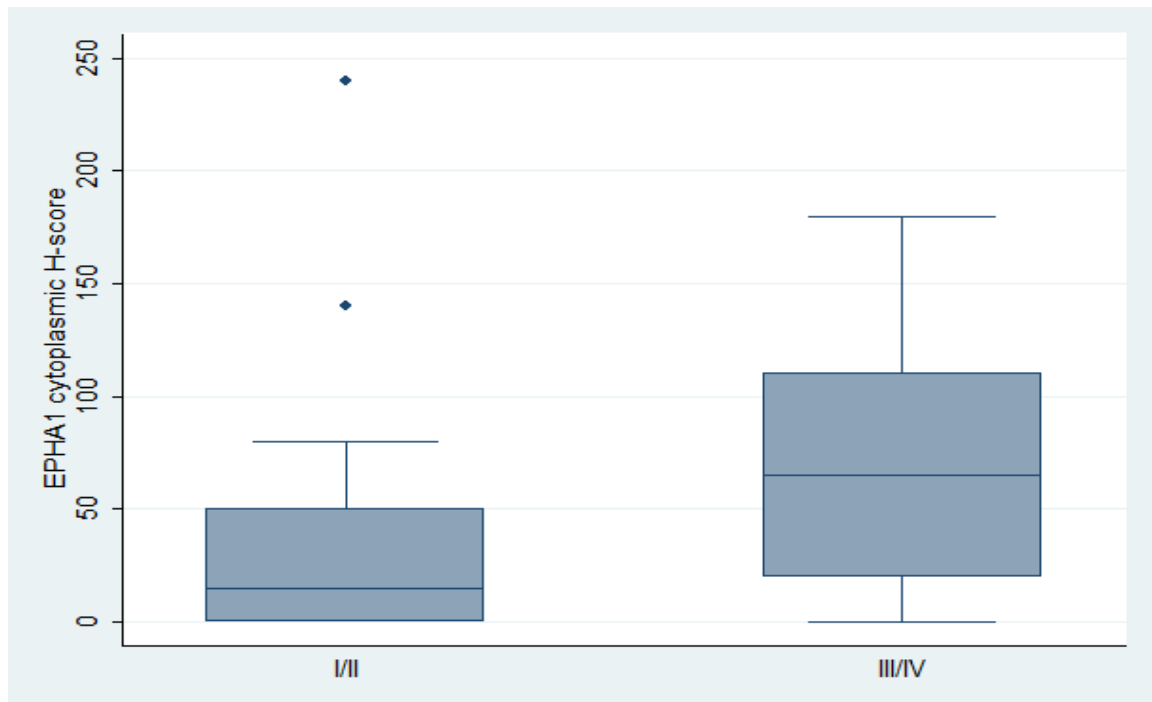
	H-score, διάμεσος τιμή	εύρος
EPHA1 κυτταροπλασματική έκφραση	20	0-240
EPHA1 πυρηνική έκφραση	7	0-120
EPHA2 κυτταροπλασματική έκφραση	210	0-300
EPHA2 πυρηνική έκφραση	20	0-270
EPHA4 κυτταροπλασματική έκφραση	0	0-180
EPHA4 πυρηνική έκφραση	70	0-160
EPHA6 κυτταροπλασματική έκφραση	0	0-120
EPHB4 κυτταροπλασματική έκφραση	0	0-120

Πίνακας 2: Η διακύμανση των H-score στα υπό μελέτη μόρια.

Έκφραση EPHA1

Κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε 22 περιστατικά (79.1%) και πυρηνική έκφραση σε 34 (51.2%) περιστατικά. Τόσο η πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική έκφραση ήταν κυρίως ήπιας έως μέτριας έντασης με μόλις 2 περιστατικά να εμφανίζουν έντονη κυτταροπλαστική θετικότητα. Η διακύμανση του H-score παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Η υψηλότερη κυτταροπλασματική έκφραση της EPHA1 σχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση I/II vs III/IV (Mann-Whitney U test, $p=0.0118$ για το ποσοστό έκφρασης, $p=0.0048$ για το H-score, βλ. Εικόνα 7)



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης κυτταροπλασματικής έκφρασης EPHA1 με την προγνωστική υποομάδα

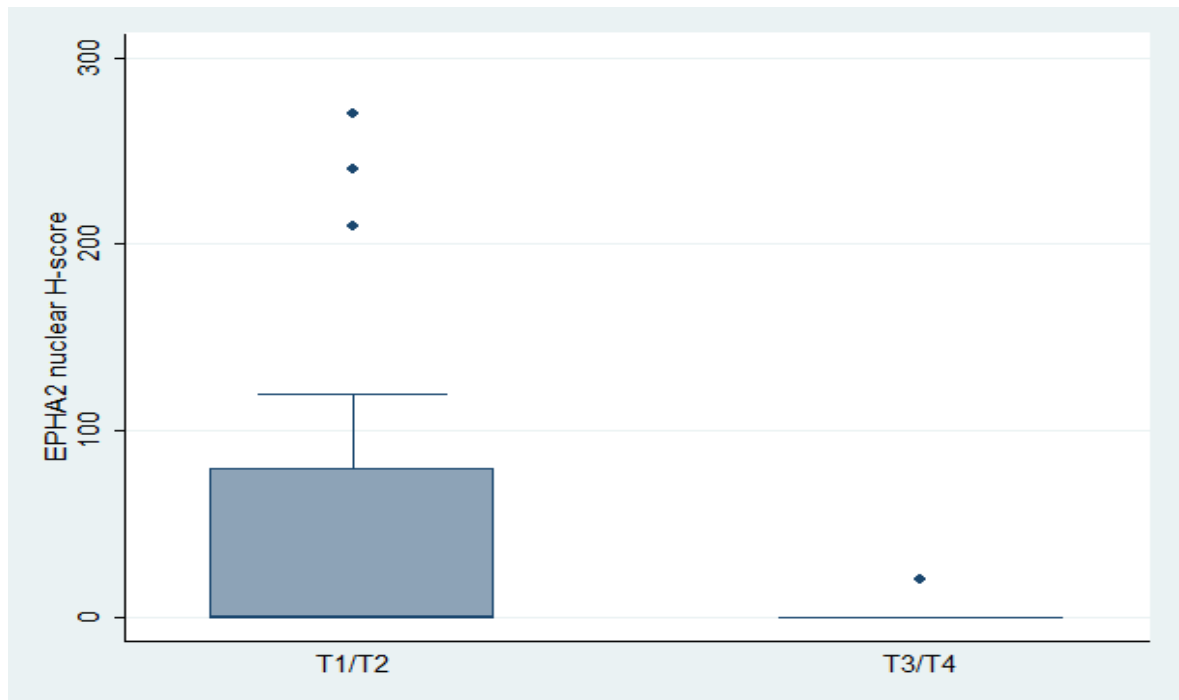
Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης με το T-status, τον αριθμό μιτώσεων και την παρουσία νέκρωσης ($p > 0.10$).

Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της πυρηνικής έκφρασης EPHA1 με το T-status, τον αριθμό μιτώσεων, την παρουσία νέκρωσης και την προγνωστική υποομάδα ($p > 0.10$).

Έκφραση EPHA2

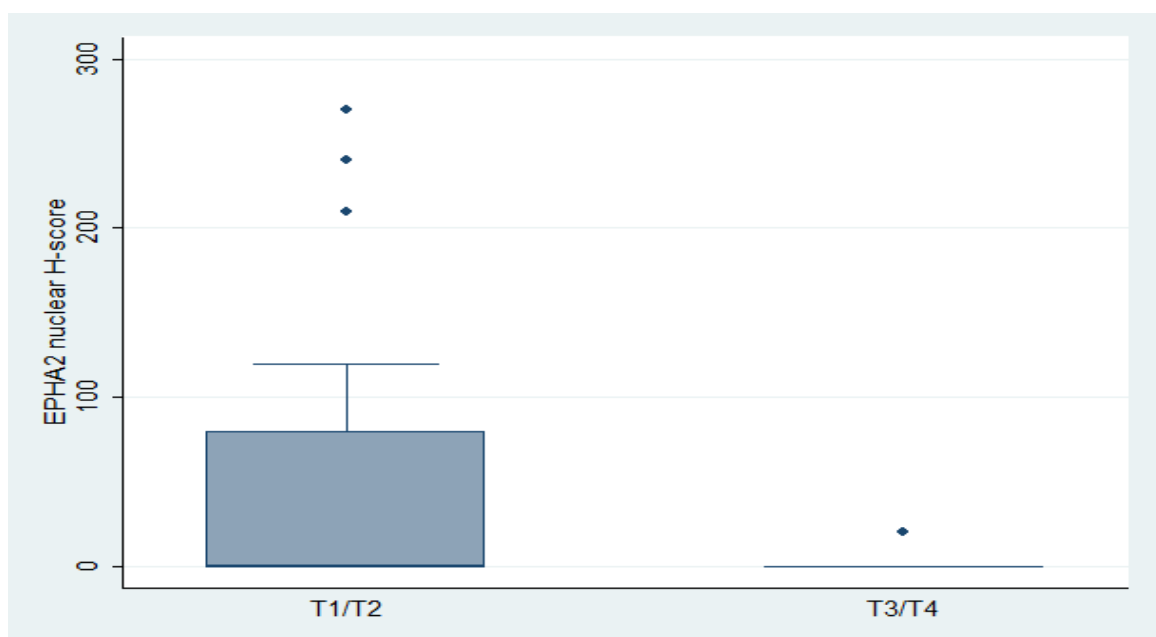
Κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε 40 περιστατικά (93%) και πυρηνική έκφραση σε 12 (27.9%) περιστατικά. Η διακύμανση του H-score παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα.

Η υψηλότερη πυρηνική έκφραση της EPHA2 σχετίστηκε με χαμηλότερο T-status (Mann-Whitney U test, $p = 0.0013$ τόσο για το ποσοστό έκφρασης όσο και για H-score, T1/T2 versus T3/T4, βλ. Εικόνα 8), ενώ η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων προχωρημένου σταδίου (95.2%) δεν εμφάνιζαν πυρηνική έκφραση της EPHA2 (Fisher's exact test, $p = 0.004$)



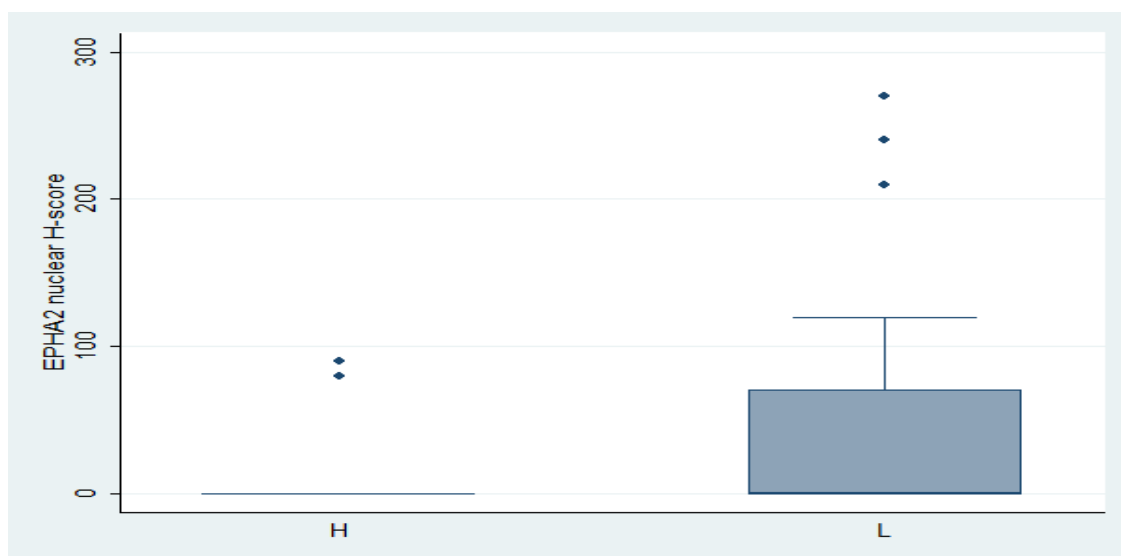
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης πυρηνικής έκφρασης EPHA1 με την T-σταδιοποίηση.

Παρόμοια συσχέτιση παρατηρήθηκε και μεταξύ της πυρηνικής έκφραση EPHA2 με το prognostic group, όπου η υψηλότερη πυρηνική έκφραση της EPHA2 σχετίστηκε με χαμηλότερο prognostic group (Mann-Whitney U test, $p = 0.0296$ τόσο για το ποσοστό έκφρασης όσο και για H-score, I/II versus III/IV, βλ. Εικόνα 9), ενώ η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων προχωρημένου σταδίου (93.3%) δεν εμφάνιζαν πυρηνική έκφραση της EPHA2 (Fisher's exact test, $p=0,033$)



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης πυρηνικής έκφρασης EPHA1 με την προγνωστική υποομάδα

Η υψηλότερη πυρηνική έκφραση της EPHA2 σχετίστηκε με χαμηλότερο μιτωτικό δείκτη (Mann-Whitney U test, $p=0,043$ τόσο για το ποσοστό έκφρασης όσο και για H-score, βλ. Εικόνα 10), ενώ η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων με αυξημένο μιτωτικό δείκτη (88.9%) δεν εμφάνιζαν πυρηνική έκφραση της EPHA2 (Fisher's exact test, $p=0.046$)



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης πυρηνικής έκφρασης EPHA2 με το μιτωτικό δείκτη (H: high, L:low).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης EPHA2 με την T-σταδιοποίηση, τον μιτωτικό δείκτη, την παρουσία νέκρωσης και την προγνωστική υποομάδα ($p>0.10$).

Έκφραση EPHA4

Κυτταροπλασματική έκφραση παρατηρήθηκε σε 21 περιστατικά (49%) και πυρηνική έκφραση σε 40 (93%) περιστατικά. Η διακύμανση του H-score παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα. Τόσο η πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική έκφραση ήταν κυρίως ήπιας έως μέτριας έντασης με μόλις 1 περιστατικό να εμφανίζει έντονη κυτταροπλαστική θετικότητα.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της κυτταροπλασματικής ή πυρηνικής έκφρασης με την T-σταδιοποίηση, το μιτωτικό δείκτη, το προγνωστικό στάδιο και την παρουσία νέκρωσης ($p>0.10$).

Έκφραση ERHA6

Παρατηρήθηκε μόνο κυτταροπλασματική έκφραση σε 19 περιστατικά (44%). Η πλειοψηφία των περιστατικών παρουσίασε ήπιας έως μέτριας έντασης έκφραση με μόλις 1 να εμφανίζει έντονη έκφραση. Η διακύμανση του H-score παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την T σταδιοποίηση, τον μιτωτικό δείκτη, το προγνωστικό στάδιο και την παρουσία νέκρωσης ($p>0.10$).

Έκφραση ERHB4

Παρατηρήθηκε μόνο κυτταροπλασματική έκφραση σε 21 περιστατικά (49%). Η διακύμανση του H-score παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την T σταδιοποίηση, τον μιτωτικό δείκτη, το προγνωστικό στάδιο και την παρουσία νέκρωσης ($p>0.10$).

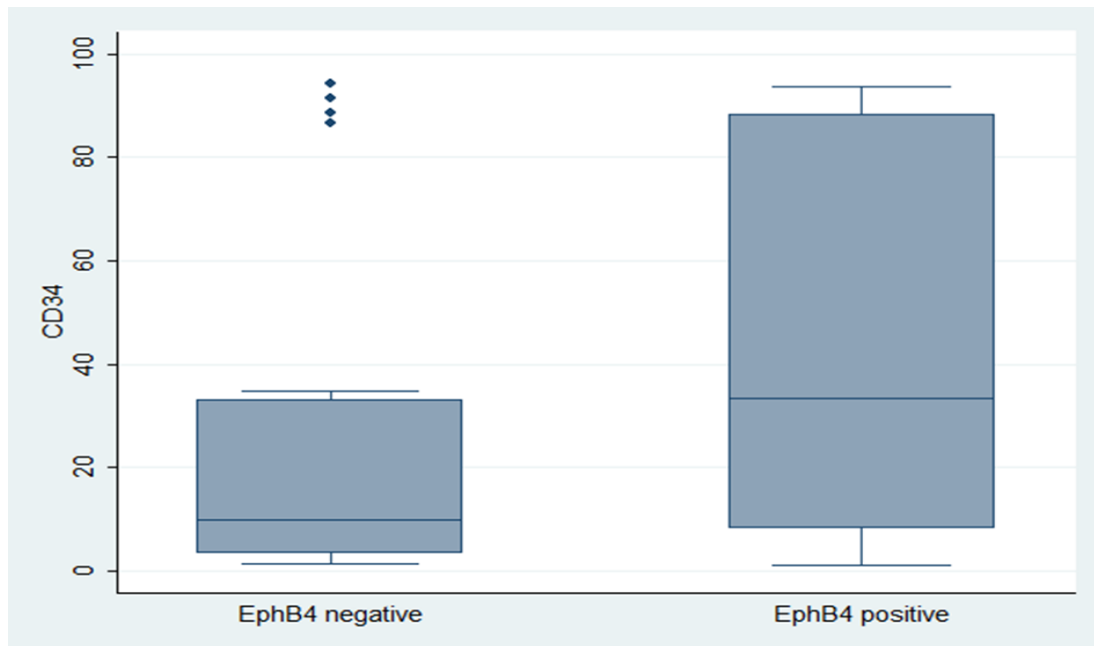
Έκφραση CD34

Η συνολική έκφραση του CD34 τόσο στα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα κυμαίνεται από 1 έως 96,85% με διάμεσο τιμή 16,85%. Στα νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρήθηκε έκφραση σε 23 περιστατικά με διακύμανση από 0 έως 94.3% (διάμεσος τιμή 1.5%). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε έκφραση από 0 έως 19.9% με διάμεσο τιμή 2.8%.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την T σταδιοποίηση, τον μιτωτικό δείκτη, το προγνωστικό στάδιο και την παρουσία νέκρωσης ($p>0.10$).

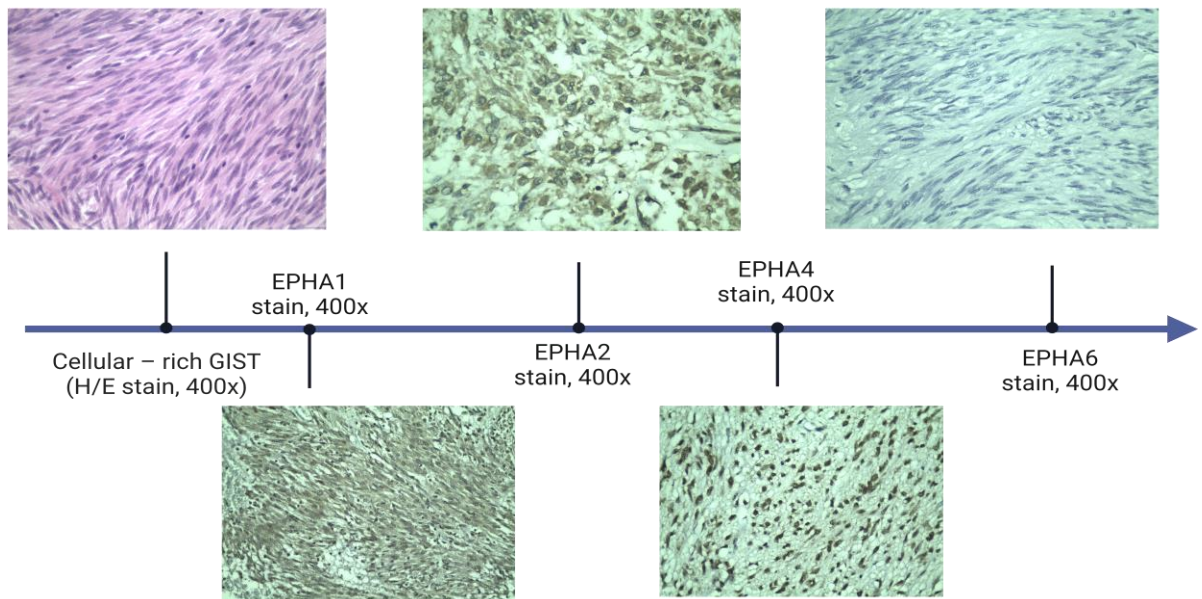
Η υψηλότερη συνολική έκφραση του CD34 καθώς και η υψηλότερη κυτταροπλασματική έκφραση CD34 στα νεοπλασματικά κύτταρα σχετίστηκε με παρουσία θετικής έκφρασης ERHB4, μία συσχέτιση η οποία ωστόσο ήταν οριακής στατιστικής σημαντικότητας (Mann-Whintey

U test, CD34 συνολικά $p=0.089$, CD34 στα νεοπλασματικά κύτταρα $p=0.070$, βλ. Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης της συνολικής έκφρασης CD34 με την έκφραση ΕΡΗΒ4.

Η έκφραση των EPHA1, EPHA2, EPHA4, και EPHA6 στα GIST



Εικόνα 12. Παρουσιάζεται η ανοσοϊστοχημική έκφραση των EPHA1, EPHA2, EPHA4 και EPHA6 στα GIST.

7. Συζήτηση

Τα σπουδαιότερα δεδομένα της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Μόριο	Ανοσοϊστοχημικές Παράμετροι	Ιστολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά
ERHA1	Πυρηνική έκφραση (+)	Επιθηλειοειδής μορφολογία
	Υψηλό κυτταροπλασματικό H-score	Υψηλός μιτωτικός δείκτης
		Δυσμενέστερη πρόγνωση
ERHA2	Υψηλό πυρηνικό H-score	Χαμηλότερος μιτωτικός δείκτης
		Ευμενέστερη πρόγνωση
		Χαμηλότερο T-στάδιο
CD34	Υψηλότερη συνολική έκφραση του CD34/Υψηλότερη κυτταροπλασματική έκφραση CD34 στα νεοπλασματικά κύτταρα	ERHB4(+) (οριακή στατιστική σημαντικότητα)

Πίνακας 3. Σταχυολογούνται τα βασικότερα ευρήματα της μελέτης.

Ο CD34 αποτελεί βασικό παθολογοανατομικό δείκτη για τον προσδιορισμό της αγγειογένεσης σε πλήθος νοσημάτων [135] καθώς και στα πλαίσια της νεοπλασίας [136],[137]. Από την μελέτη προκύπτει ότι η έκφραση του CD34 σχετίζεται με την έκφραση του ERHB4.

Το σύστημα ERHB4/erhgrinB2 είναι απαραίτητο για πολλαπλές φάσεις της αγγειακής ανάπτυξης και αγγειογένεσης, περιλαμβάνοντας διαδικασίες όπως ο σχηματισμός, η σταθεροποίηση, η διακλάδωση, η αναδιαμόρφωση και η αρτηριοφλεβική εξειδίκευση των αιμοφόρων αγγείων [138],[139],[140]. Η ERHB4 εντοπίζεται κυρίως στα φλεβικά ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η erhgrinB2 εκφράζεται κυρίως στα αρτηριακά κύτταρα, διευκολύνοντας τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη συγκρότηση των αγγείων [141]. Τα μόρια αυτά επεκτείνουν επίσης την επιρροή τους στα μεσεγχυματικά, τοιχωματικά και καρκινικά κύτταρα, όπου συμβάλλουν σημαντικά στη συναρμολόγηση των

αγγείων, στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, στη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και στη μετάσταση [142],[143],[144].

Η ρύθμιση της έκφρασης του EPHB4 είναι αμφίδρομη, με μελέτες που αναφέρουν τόσο την πλειορρύθμιση όσο και τη μειορύθμιση του συστήματος, συχνά με ταυτόχρονες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της ephrinB2 [138],[145]. Η επίδραση του VEGF-A στην έκφραση του Dll4, μαζί με την ανασταλτική του επίδραση στην EPHB4, ποικίλλει ανάλογα με τις συγκεκριμένες ισομορφές του VEGF [145]. Τα εξαρτώμενα από τις MAPK/ERK μονοπάτια φαίνεται να εμπλέκονται στην επαγόμενη από τον VEGF καταστολή της έκφρασης της EPHB4 [146],[147]. Επιπλέον, η προς τα εμπρός σηματοδότηση της EPHB4 φαίνεται να ενεργοποιείται σε συγκεκριμένες καταστάσεις, όπως το αιμαγγειοπερικύττωμα [148]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Dll4/Notch μπορεί να ασκεί ανασταλτικές επιδράσεις στην EPHB4 μέσω των HERPs (η Hairy and Enhancer of Split-Related Protein είναι οικογένεια γονιδίων που αποτελούν στόχο του σηματοδοτικού συστήματος Notch), αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τη διευκρίνιση αυτής της σχέσης [149]. Επιπλέον, η ephrinB2 έχει αποδειχθεί ότι προάγει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη έκφραση της ephrinB2 μεσολαβεί πρωτίστως στην προωθητική σηματοδότηση της EPHB4, ιδίως κατά την πρώιμη αγγειακή ανάπτυξη και τη μεταγεννητική νεοαγγείωση [146]. Τα παραπάνω παρουσιάζονται αδρά στην Εικόνα 12.

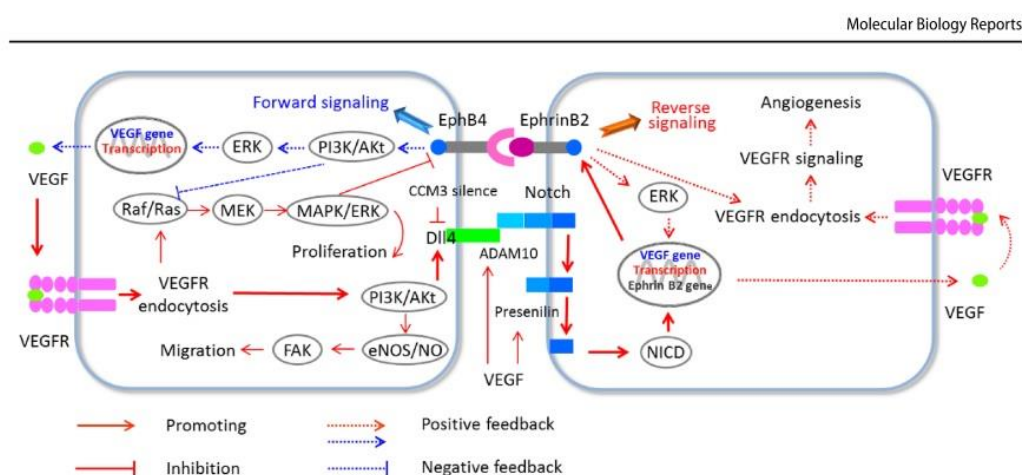


Fig. 3 Proposed pathways relative to VEGF/VEGFR-Dll4/Notch-EphrinB2 cascade

Εικόνα 12. Η αλληλεπίδραση των συστημάτων Notch/EPHB4/VEGF στην αγγειογένεση. Η εικόνα υιοθετήθηκε από το *Du, E., Li, X., He, S. et al. The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis. Mol Biol Rep 47, 4681–4690 (2020).*

Υπάρχουν αρκετοί σημαντικοί περιορισμοί στη μελέτη: Πρώτον, το μικρό δείγμα ασθενών με μόλις 43 περιστατικά, λόγω της σπανιότητας του συγκεκριμένου τύπου όγκου, αποτελεί μείζονα περιορισμό, με ανάγκη για μεγαλύτερο δείγμα για πιο αξιόπιστη στατιστική ανάλυση. Δεύτερον, η έλλειψη κλινικών δεδομένων, όπως η ανταπόκριση και η διάρκεια της θεραπείας, δυσχεραίνουν τη σύνθεση συμπερασμάτων και την αναγνώριση αιτιώδων σχέσεων. Τρίτον, η σπανιότητα του τύπου όγκου περιορίζει τη γενίκευση των αποτελεσμάτων σε ευρύτερους πληθυσμούς και σε άλλες κακοήθειες. Επιπλέον, υπογραμμίζεται η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών προκειμένου να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί δράσης του EPHB4/ephrinB2 στην αγγειογένεση στα GIST. Αυτή η προσέγγιση θα βοηθήσει στην πλήρη κατανόηση των διεργασιών που διαδραματίζονται στη νεοαγγείωση στους GISTs δίνοντας κατεύθυνση για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων. Συνεπώς, είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε αυτούς τους περιορισμούς κατά την ερμηνεία των ευρημάτων της μελέτης και να λάβουμε υπόψη αυτούς τους περιορισμούς κατά τον σχεδιασμό μελλοντικών ερευνητικών εργασιών για την αντιμετώπισή τους.

Συνοψίζοντας, η μελέτη αναδεικνύει σημαντικά συστήματα μοριακής ρύθμισης στα GISTs, αλλά απαιτεί περαιτέρω έρευνα για πληρέστερη κατανόηση και περαιτέρω εφαρμογή στην κλινική πράξη.

8. Συμπεράσματα

Η μελέτη του μονοπατιού EPHB4/ehrinB2 στα GIST προσφέρει μια σημαντική προοπτική για περαιτέρω ερευνητική διερεύνηση. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης, αναδείχθηκε η συσχέτιση της έκφρασης του CD34 με την έκφραση του EPHB4. Το σύστημα EPHB4/ehrinB2 είναι κρίσιμο για την ανάπτυξη των αγγείων και φαίνεται να έχει σημαντική κλινική σημασία στην πρόγνωση των ασθενών με GIST. Συνεπώς, η έρευνα σε αυτή την κατεύθυνση αναμένεται να διασαφηνίσει περαιτέρω τον ρόλο αυτής της αλληλεπίδρασης στη νεοαγγείωση και στην εξέλιξη των GIST, ενισχύοντας την κατανόησή μας για τους μηχανισμούς αγγειογένεσης στους GISTs και ανοίγοντας νέες προοπτικές στον τομέα της έρευνας και της θεραπευτικής.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Blay J-Y, Kang Y-K, Nishida T, von Mehren M. Gastrointestinal stromal tumours. *Nat Rev Dis Prim* 2021;7:22. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00254-5>.
- [2] Wu CE, Tzen CY, Wang SY, Yeh CN. Clinical Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): From the Molecular Genetic Point of View. *Cancers* 2019, Vol 11, Page 679 2019;11:679. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11050679>.
- [3] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577–80. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5350.577>.
- [4] Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152:1259–69.
- [5] Nilsson B, Bümbling P, Meis-Kindblom JM, Odén A, Dortok A, Gustavsson B, et al. Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era - A population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005;103:821–9. <https://doi.org/10.1002/cncr.20862>.
- [6] Søreide K, Sandvik OM, Søreide JA, Giljaca V, Jureckova A, Bulusu VR. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumours (GIST): A systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol* 2016;40:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.10.031>.
- [7] van der Graaf WTA, Tielen R, Bonenkamp JJ, Lemmens V, Verhoeven RHA, de Wilt JHW. Nationwide trends in the incidence and outcome of patients with gastrointestinal stromal tumour in the imatinib era. *Br J Surg* 2018;105:1020–7. <https://doi.org/10.1002/bjs.10809>.
- [8] Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, van Oosterom AT, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* 2006;42:1093–103. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2006.01.030>.
- [9] Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CDM,

- et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:5360–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.4284>.
- [10] Van Glabbeke M. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients. *J Clin Oncol* 2010;28:1247–53. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2099>.
- [11] Pappo AS, Janeway KA. Pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:15–34. <https://doi.org/10.1016/J.HOC.2008.11.005>.
- [12] Von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS, Boles S, Bui MM, Casper ES, et al. Gastrointestinal Stromal Tumors, Version 2.2014. *J Natl Compr Cancer Netw* 2014;12:853–62. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2014.0080>.
- [13] Casali PG, Blay JY, Abecassis N, Bajpai J, Bauer S, Biagini R, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO–EURACAN–GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Ann Oncol* 2022;33:20–33. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.005>.
- [14] Joensuu H, Eriksson M, Sundby Hall K, Reichardt A, Hermes B, Schütte J, et al. Survival Outcomes Associated With 3 Years vs 1 Year of Adjuvant Imatinib for Patients With High-Risk Gastrointestinal Stromal Tumors: An Analysis of a Randomized Clinical Trial After 10-Year Follow-up. *JAMA Oncol* 2020;6:1. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2020.2091>.
- [15] Mehren M von, Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2018;36:136–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.9705>.
- [16] Smith BD, Kaufman MD, Lu WP, Gupta A, Leary CB, Wise SC, et al. Ripretinib (DCC-2618) Is a Switch Control Kinase Inhibitor of a Broad Spectrum of Oncogenic and Drug-Resistant KIT and PDGFRA Variants. *Cancer Cell* 2019;35:738–751.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.006>.
- [17] Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical

- spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD 117 (KIT). *Mod Pathol* 2000;13:1134–42. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880210>.
- [18] Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1401–8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a90e1a>.
- [19] Qu Z, Yao W, Yao R, Liu X, Yu K, Hartzell C. The Ca(2+) -activated Cl(-) channel, ANO1 (TMEM16A), is a double-edged sword in cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Med* 2014;3:453–61. <https://doi.org/10.1002/CAM4.232>.
- [20] Simon S, Grabellus F, Ferrera L, Galiotta L, Schwindenhammer B, Mühlenberg T, et al. DOG1 regulates growth and IGFBP5 in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2013;73:3661–70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3839>.
- [21] Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein kinases expressed by interstitial cells of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004;121:21–30. <https://doi.org/10.1007/S00418-003-0602-8>.
- [22] Wang J, Cai J, Huang Y, Ke Q, Wu B, Wang S, et al. Nestin regulates proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumor cells by altering mitochondrial dynamics. *Oncogene* 2016;35:3139–50. <https://doi.org/10.1038/ONC.2015.370>.
- [23] Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J, Lendahl U, Nakasho K, Sugihara A, et al. Expression of the Intermediate Filament Nestin in Gastrointestinal Stromal Tumors and Interstitial Cells of Cajal. *Am J Pathol* 2001;158:817. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64029-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64029-1).
- [24] Novelli M, Rossi S, Rodriguez-Justo M, Taniere P, Seddon B, Toffolatti L, et al. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2010;57:259–70. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2559.2010.03624.X>.
- [25] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671–4. <https://doi.org/10.1038/386671a0>.
- [26] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011;146:873–87.

- <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>.
- [27] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389–95. <https://doi.org/10.1038/74651>.
- [28] Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: Sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:489–502. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9094-7>.
- [29] Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis* 2023. <https://doi.org/10.1007/S10456-023-09876-7>.
- [30] Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive Angiogenesis: Expansion and Remodeling of Microvascular Networks. *Angiogenesis* 2014;17:499. <https://doi.org/10.1007/S10456-014-9428-3>.
- [31] Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res* 2020;127:310–29. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316851>.
- [32] Cuypers A, Truong ACK, Becker LM, Saavedra-García P, Carmeliet P. Tumor vessel co-option: The past & the future. *Front Oncol* 2022;12:1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.965277>.
- [33] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739–52. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5).
- [34] Sun B, Zhang D, Zhao N, Zhao X, Sun B, Zhang D, et al. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget* 2016;8:30502–10. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.8461>.
- [35] Liu Z, Sun B, Qi L, Li H, Gao J, Leng X. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Sci* 2012;103:813. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2011.02199.X>.
- [36] Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010;468:829–35. <https://doi.org/10.1038/NATURE09624>.
- [37] Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and

- therapeutic targets. *Nat Med* 2011;17:1359–70. <https://doi.org/10.1038/NM.2537>.
- [38] Angara K, Borin TF, Arbab AS. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol* 2017;10:650–60. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2017.04.007>.
- [39] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.
- [40] Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* 2009;20:158–63. <https://doi.org/10.1684/ECN.2009.0170>.
- [41] Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:632–45. <https://doi.org/10.1038/NRC2404>.
- [42] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653–60. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>.
- [43] Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Dev Cell* 2009;16:196–208. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.01.015>.
- [44] Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JJ, et al. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* 2008;456:814–9. <https://doi.org/10.1038/NATURE07445>.
- [45] Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* 2007;130:691–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.054>.
- [46] Tvorogov D, Anisimov A, Zheng W, Leppänen VM, Tammela T, Laurinavicius S, et al. Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell* 2010;18:630–40. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.11.001>.
- [47] Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010;140:460–76. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.045>.

- [48] Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2008;8:942–56. <https://doi.org/10.1038/NRC2524>.
- [49] Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575–83. <https://doi.org/10.1038/87904>.
- [50] Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 2011;19:31–44. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.11.009>.
- [51] Bais C, Wu X, Yao J, Yang S, Crawford Y, McCutcheon K, et al. PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth. *Cell* 2010;141:166–77. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.033>.
- [52] Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H, Pytowski B, Wu Y. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer* 2010;116:1027–32. <https://doi.org/10.1002/CNCR.24789>.
- [53] Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilina M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010;140:268–79. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.12.046>.
- [54] Duda DG, Jain RK. Premetastatic lung “niche”: is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required? *Cancer Res* 2010;70:5670–3. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0119>.
- [55] Heldin CH, Hellberg C, Östman A. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res* 2010;180:103–14. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78281-0_7.
- [56] Quaegebeur A, Segura I, Carmeliet P. Pericytes: blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration? *Neuron* 2010;68:321–3. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.10.024>.

- [57] Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287–95. <https://doi.org/10.1172/JCI17929>.
- [58] McCarty MF, Somcio RJ, Stoeltzing O, Wey J, Fan F, Liu W, et al. Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *J Clin Invest* 2007;117:2114–22. <https://doi.org/10.1172/JCI31334>.
- [59] Sennino B, Kuhnert F, Tabruyn SP, Mancuso MR, Hu-Lowe DD, Kuo CJ, et al. Cellular source and amount of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in tumors determine response to angiogenesis inhibitors. *Cancer Res* 2009;69:4527–36. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3779>.
- [60] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:235–53. <https://doi.org/10.1038/NRD2792>.
- [61] Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan R V., et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 2008;118:3355–66. <https://doi.org/10.1172/JCI35298>.
- [62] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592–603. <https://doi.org/10.1038/NRC2442>.
- [63] Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:165–77. <https://doi.org/10.1038/NRM2639>.
- [64] Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* 2008;10:527–37. <https://doi.org/10.1038/NCB1715>.
- [65] De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi LS, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8:211–26. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2005.08.002>.

- [66] Falcón BL, Hashizume H, Koumoutsakos P, Chou J, Bready J V., Coxon A, et al. Contrasting actions of selective inhibitors of angiotensin-1 and angiotensin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol* 2009;175:2159–70. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2009.090391>.
- [67] Koh YJ, Kim HZ, Hwang SI, Lee JE, Oh N, Jung K, et al. Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiotensins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage. *Cancer Cell* 2010;18:171–84. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.07.001>.
- [68] Benedito R, Roca C, Sörensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 2009;137:1124–35. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.03.025>.
- [69] Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, et al. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell* 2009;16:70–82. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.12.009>.
- [70] Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 2010;12:943–53. <https://doi.org/10.1038/NCB2103>.
- [71] Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2007;7:327–31. <https://doi.org/10.1038/NRC2130>.
- [72] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* 2010;107:943–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223750>.
- [73] Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, et al. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell* 2010;18:938–49. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.05.006>.
- [74] Stergiou IE, Papadakis SP, Karyda A, Tsitsilonis OE, Dimopoulos M-A, Theocharis S. EPH/Ephrin Signaling in Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies: Deciphering Their Intricate Role and Unraveling Possible New Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*

- 2023;15. <https://doi.org/10.3390/cancers15153963>.
- [75] Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:462–75. <https://doi.org/10.1038/NRM1662>.
- [76] Papadakos SP, Petrogiannopoulos L, Pergaris A, Theocharis S. The EPH/Ephrin System in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2022;23:2761. <https://doi.org/10.3390/ijms23052761>.
- [77] Papadakos SP, Stergiou IE, Gkolemi N, Arvanitakis K, Theocharis S. Unraveling the Significance of EPH/Ephrin Signaling in Liver Cancer: Insights into Tumor Progression and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)* 2023;15:3434. <https://doi.org/10.3390/cancers15133434>.
- [78] Papadakos SP, Dedes N, Gkolemi N, Machairas N, Theocharis S. The EPH/Ephrin System in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC): From Pathogenesis to Treatment. *Int J Mol Sci* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24033015>.
- [79] Pasquale EB. Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease. *Cell* 2008;133:38–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.011>.
- [80] Gaitanos T, Dudanova I, Sakkou M, Klein R, Paixão S. The Eph receptor family. *Recept. Tyrosine Kinases Fam. Subfamilies*, Springer, Cham; 2015, p. 165–264. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11888-8_5.
- [81] Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:240–56. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.16>.
- [82] Blits-Huizinga C, Nelersa C, Malhotra A, Liebl D. Ephrins and their Receptors: Binding versus Biology. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)* 2004;56:257–65. <https://doi.org/10.1080/15216540412331270076>.
- [83] Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, et al. Eph Receptors and Ligands Comprise Two Major Specificity Subclasses and Are Reciprocally Compartmentalized during Embryogenesis. *Neuron* 1996;17:9–19. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80276-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80276-7).
- [84] Barquilla A, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins: Therapeutic

- opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:467–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140226>.
- [85] Himanen JP, Yermekbayeva L, Janes PW, Walker JR, Xu K, Atapattu L, et al. Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:10860–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004148107>.
- [86] Miao H, Wang B. EphA receptor signaling-Complexity and emerging themes. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.10.013>.
- [87] Liang L-Y, Patel O, Janes PW, Murphy JM, Lucet IS. Eph receptor signalling: from catalytic to non-catalytic functions. *Oncogene* 2019;38:6567–84. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0931-2>.
- [88] Dravis C, Henkemeyer M. Ephrin-B reverse signaling controls septation events at the embryonic midline through separate tyrosine phosphorylation-independent signaling avenues. *Dev Biol* 2011;355:138–51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.020>.
- [89] Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: Bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010;10:165–80. <https://doi.org/10.1038/nrc2806>.
- [90] Singh A, Winterbottom E, Daar IO. Eph/ephrin signaling in cell-cell and cell-substrate adhesion. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:473–97. <https://doi.org/10.2741/3939>.
- [91] Barquilla A, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:467–87. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-011112-140226>.
- [92] Papadakos SP, Tsagkaris C, Papadakis M, Papazoglou AS, Moysidis D V., Zografos CG, et al. Angiogenesis in gastrointestinal stromal tumors: From bench to bedside. *World J Gastrointest Oncol* 2022;14:1469–77. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i8.1469>.
- [93] Giner F, Machado I, Lopez-Guerrero JA, Mayordomo-Aranda E, Llombart-Bosch A. High-risk gastrointestinal stromal tumour (GIST) and synovial sarcoma display similar angiogenic profiles: a nude mice xenograft study. *Ecancermedicalscience* 2017;11:726. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.726>.
- [94] Chen X, Wang Y, Nelson D, Tian S, Mulvey E, Patel B, et al. CCL2/CCR2 Regulates the Tumor Microenvironment in HER-2/neu-Driven Mammary Carcinomas in Mice. *PLoS One* 2016;11.

- <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165595>.
- [95] Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009;102:19–65. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02002-8).
- [96] Wang N, Wu R, Tang D, Kang R. The BET family in immunity and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2020 61 2021;6:1–22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00384-4>.
- [97] Mu J, Sun P, Ma Z, Sun P. BRD4 promotes tumor progression and NF- κ B/CCL2-dependent tumor-associated macrophage recruitment in GIST. *Cell Death Dis* 2019;10:935. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2170-4>.
- [98] Liu N, Ling R, Tang X, Yu Y, Zhou Y, Chen D. Post-Translational Modifications of BRD4: Therapeutic Targets for Tumor. *Front Oncol* 2022;0:906. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.847701>.
- [99] Calin GA, Di Iasio MG, Caprini E, Vorechovsky I, Natali PG, Sozzi G, et al. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene* 2000;19:1191–5. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1203389>.
- [100] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 2001;353:417. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530417>.
- [101] Xie J, Yoon J, Yang S, Sen, Lin SH, Huang CL. WNK1 Protein Kinase Regulates Embryonic Cardiovascular Development through the OSR1 Signaling Cascade. *J Biol Chem* 2013;288:8566. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.451575>.
- [102] Lai JG, Tsai SM, Tu HC, Chen WC, Kou FJ, Lu JW, et al. Zebrafish WNK lysine deficient protein kinase 1 (wnk1) affects angiogenesis associated with VEGF signaling. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0106129>.
- [103] Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, et al. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut* 2012;61:392–401. <https://doi.org/10.1136/GUT.2011.241034>.
- [104] Geddert H, Braun A, Kayser C, Dimmler A, Faller G, Agaimy A, et al.

- Epigenetic Regulation of CD133 in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Am J Clin Pathol* 2017;147:515–24. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqx028>.
- [105] Lee DH, Kim GW, Jeon YH, Yoo J, Lee SW, Kwon SH. Advances in histone demethylase KDM4 as cancer therapeutic targets. *FASEB J* 2020;34:3461–84. <https://doi.org/10.1096/FJ.201902584R>.
- [106] Hu F, Li H, Liu L, Xu F, Lai S, Luo X, et al. Histone demethylase KDM4D promotes gastrointestinal stromal tumor progression through HIF1 β /VEGFA signalling. *Mol Cancer* 2018;17:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0861-6>.
- [107] Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2298–308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0264>.
- [108] Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129–40. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0013>.
- [109] Gebreyohannes YK, Schöffski P, Van Looy T, Wellens J, Vreys L, Cornillie J, et al. Cabozantinib Is Active against Human Gastrointestinal Stromal Tumor Xenografts Carrying Different KIT Mutations. *Mol Cancer Ther* 2016;15:2845–52. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0224>.
- [110] Huynh H, Lee JWJ, Chow PKH, Ngo VC, Lew G Bin, Lam IWL, et al. Sorafenib induces growth suppression in mouse models of gastrointestinal stromal tumor. *Mol Cancer Ther* 2009;8:152–9. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0553>.
- [111] Agaimy A. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:461.
- [112] Takahashi T, Nakajima K, Nishitani A, Souma Y, Hirota S, Sawa Y, et al. An enhanced risk-group stratification system for more practical prognostication of clinically malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Oncol* 2007;12:369–74.

<https://doi.org/10.1007/S10147-007-0705-7>.

- [113] Sakamoto H, Kitano M, Matsui S, Kamata K, Komaki T, Imai H, et al. Estimation of malignant potential of GI stromal tumors by contrast-enhanced harmonic EUS (with videos). *Gastrointest Endosc* 2011;73:227–37. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2010.10.011>.
- [114] Iannicelli E, Carbonetti F, Federici GF, Martini I, Caterino S, Pillozzi E, et al. Evaluation of the Relationships Between Computed Tomography Features, Pathological Findings, and Prognostic Risk Assessment in Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Comput Assist Tomogr* 2017;41:271–8. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000499>.
- [115] Horton KM, Juluru K, Montgomery E, Fishman EK. Computed tomography imaging of gastrointestinal stromal tumors with pathology correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2004;28:811–7. <https://doi.org/10.1097/00004728-200411000-00014>.
- [116] Baheti AD, Shinagare AB, O’Neill AC, Krajewski KM, Hornick JL, George S, et al. MDCT and clinicopathological features of small bowel gastrointestinal stromal tumours in 102 patients: a single institute experience. *Br J Radiol* 2015;88. <https://doi.org/10.1259/BJR.20150085>.
- [117] Strauss LG, Dimitrakopoulou-Strauss A, Koczan D, Pan L, Hohenberger P. Correlation of dynamic PET and gene array data in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Sci World J* 2012;2012. <https://doi.org/10.1100/2012/721313>.
- [118] Palazzo L, Landi B, Cellier C, Cuillerier E, Roseau G, Barbier JP. Endosonographic features predictive of benign and malignant gastrointestinal stromal cell tumours. *Gut* 2000;46:88–92. <https://doi.org/10.1136/GUT.46.1.88>.
- [119] Chhoda A, Jain D, Surabhi VR, Singhal S. Contrast enhanced harmonic endoscopic ultrasound: A novel approach for diagnosis and management of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Endosc* 2018;51:215–21. <https://doi.org/10.5946/ce.2017.170>.
- [120] Yamashita Y, Kato J, Ueda K, Nakamura Y, Abe H, Tamura T, et al. Contrast-enhanced endoscopic ultrasonography can predict a higher malignant potential of gastrointestinal stromal tumors by visualizing large newly formed vessels. *J Clin Ultrasound* 2015;43:89–97. <https://doi.org/10.1002/jcu.22195>.

- [121] Hadjimichael AC, Pergaris A, Kaspiris A, Foukas AF, Theocharis SE. Liquid Biopsy: A New Translational Diagnostic and Monitoring Tool for Musculoskeletal Tumors. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/IJMS222111526>.
- [122] Masaoutis C, Korkolopoulou P, Theocharis S. Exosomes in sarcomas: Tiny messengers with broad implications in diagnosis, surveillance, prognosis and treatment. *Cancer Lett* 2019;449:172–7. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.02.025>.
- [123] Ko TK, Lee E, Ng CC-Y, Yang VS, Farid M, Teh BT, et al. Circulating Tumor DNA Mutations in Progressive Gastrointestinal Stromal Tumors Identify Biomarkers of Treatment Resistance and Uncover Potential Therapeutic Strategies. *Front Oncol* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.840843>.
- [124] Li J, Guo S, Sun Z, Fu Y. Noncoding RNAs in Drug Resistance of Gastrointestinal Stromal Tumor. *Front Cell Dev Biol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.808591>.
- [125] Zhao Y, Wang Q, Deng X, Zhao Y. Altered angiogenesis gene expression in gastrointestinal stromal tumors: potential use in diagnosis, outcome prediction, and treatment. *Neoplasma* 2012;59:384–92. https://doi.org/10.4149/neo_2012_050.
- [126] Kang BW, Kim JG, Chae YS, Bae HI, Kwon O, Chung HY, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 gene polymorphisms in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Asia Pac J Clin Oncol* 2014;10:e40-5. <https://doi.org/10.1111/ajco.12068>.
- [127] Toda-Ishii M, Akaike K, Suehara Y, Mukaihara K, Kubota D, Kohsaka S, et al. Clinicopathological effects of protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* 2016;29:1424–32. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.138>.
- [128] Liu N, Huang J, Sun S, Zhou Z, Zhang J, Gao F, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor are increased in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:6495–501.
- [129] Takahashi R, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach.

- Oncology 2003;64:266–74. <https://doi.org/10.1159/000069316>.
- [130] Verboom MC, Kloth JSL, Swen JJ, van der Straaten T, Bovée JVMG, Sleijfer S, et al. Genetic polymorphisms in angiogenesis-related genes are associated with worse progression-free survival of patients with advanced gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib. *Eur J Cancer* 2017;86:226–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.09.025>.
- [131] Chen W-T, Huang C-J, Wu M-T, Yang S-F, Su Y-C, Chai C-Y. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:207–13. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyi067>.
- [132] Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VLN. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2015;21:6924–30. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i22.6924>.
- [133] Imamura M, Yamamoto H, Nakamura N, Oda Y, Yao T, Kakeji Y, et al. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc* 2007;20:529–37. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800767>.
- [134] Wang TB, Qiu WS, Wei B, Deng MH, Wei HB, Dong WG. Serum vascular endothelial growth factor and angiogenesis are related to the prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Ir J Med Sci* 2009;178:315–20. <https://doi.org/10.1007/s11845-009-0315-7>.
- [135] Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009;45:1924–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.007>.
- [136] López JI, Erramuzpe A, Guarch R, Cortés JM, Pulido R, Llarena R, et al. CD34 immunostaining enhances a distinct pattern of intratumor angiogenesis with prognostic implications in clear cell renal cell carcinoma. *APMIS* 2017;125:128–33. <https://doi.org/10.1111/apm.12649>.
- [137] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kakusui M, Katagishi T, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry. *Liver* 2008;18:14–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1998.tb00121.x>.

- [138] Du E, Li X, He S, Li X, He S. The critical role of the interplays of EphrinB2/EphB4 and VEGF in the induction of angiogenesis. *Mol Biol Rep* 2020;47:4681–90. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05470-y>.
- [139] Giaginis C, Alexandrou P, Poulaki E, Delladetsima I, Troungos C, Patsouris E, et al. Clinical Significance of EphB4 and EphB6 Expression in Human Malignant and Benign Thyroid Lesions. *Pathol Oncol Res* 2016;22:269–75. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9879-2>.
- [140] Oweida A, Bhatia S, Hirsch K, Calame D, Griego A, Keysar S, et al. Ephrin-B2 overexpression predicts for poor prognosis and response to therapy in solid tumors. *Mol Carcinog* 2017;56:1189–96. <https://doi.org/10.1002/mc.22574>.
- [141] Lee HS, Daar IO. EphrinB reverse signaling in cell-cell adhesion: Is it just par for the course? *Cell Adhes Migr* 2009;3:250–5. <https://doi.org/10.4161/cam.3.3.8211>.
- [142] Arora S, Scott AM, Janes PW. Eph Receptors in Cancer. *Biomedicines* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020315>.
- [143] Rudno-Rudzińska J, Kielan W, Frejlich E, Kotulski K, Hap W, Kurnol K, et al. A review on Eph/ephrin, angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Chinese J Cancer Res* 2017;29:303–12. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2017.04.03>.
- [144] Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:75–85. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(01\)00031-4](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(01)00031-4).
- [145] Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010;465:483–6. <https://doi.org/10.1038/nature09002>.
- [146] Groppa E, Brkic S, Uccelli A, Wirth G, Korpisalo-Pirinen P, Filippova M, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF. *EMBO Rep* 2018;19. <https://doi.org/10.15252/embr.201745054>.
- [147] Hainaud P, Contrerès J-O, Villemain A, Liu L-X, Plouët J, Tobelem G, et al. The Role of the Vascular Endothelial Growth Factor–Delta-like

- 4 Ligand/Notch4-Ephrin B2 Cascade in Tumor Vessel Remodeling and Endothelial Cell Functions. *Cancer Res* 2006;66:8501–10. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4226>.
- [148] Pierscianek D, Michel A, Hindy N El, Keyvani K, Dammann P, Oezkan N, et al. Activation of multiple angiogenic signaling pathways in hemangiopericytoma. *Brain Tumor Pathol* 2016;33:200–8. <https://doi.org/10.1007/s10014-016-0256-6>.
- [149] Iso T, Maeno T, Oike Y, Yamazaki M, Doi H, Arai M, et al. Dll4-selective Notch signaling induces ephrinB2 gene expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:708–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.020>.