



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΠΤΙΚΗ Κ ΟΡΑΣΗ»



Ανάπτυξη ζωικού μοντέλου οφθαλμικού μελανώματος του χοριοειδούς

**Λαρίσα Δ. Ιωαννίδη
Ιατρός**

**Επιβλέπων Καθηγητής : Ευστάθιος Δετοράκης
Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας**

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΠΙΒΛΕΨΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

**Ευστάθιος Δετοράκης : Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας
Μιλτιάδης Τσιλιμπάρης : Καθηγητής Οφθαλμολογίας
Γεώργιος Σουρβίνος : Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδάσκοντες του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και συμφοιτητές, για την πολύτιμη συνεισφορά τους στην εκπαίδευση μου πάνω σε θέματα Οπτικής και Όρασης.

Όσον αφορά την διπλωματική μου εργασία ευχαριστώ τους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής και τον καθηγητή μου κ. Ευστάθιο Δετοράκη για την αμέριστη βοήθεια αλλά και υπομονή για την εκπόνηση της εργασίας. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές μου κ. Θωμά Μαρή, κ. Γιώργο Σουρβίνο, κ. Βίκτωρα Χανιώτη και στην Μελίνα Τσέλιου, υποψήφια διδάκτωρα του Πανεπιστημίου Κρήτης για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπημένη μου οικογένεια για την αμέριστη κατανόηση αλλά και συμπαράστασή της κατά την διάρκεια αυτών των ετών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ : Η εργασία αυτή έχει ως στόχο τη δημιουργία ενός σταθερά επαναλαμβανόμενου και εύχρηστου ζωικού μοντέλου ανάπτυξης οφθαλμικού μελανώματος του χοριοειδούς, το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα σε μελέτες απεικόνισης και στην εφαρμογή μεθόδων θεραπείας.

ΜΕΘΟΔΟΙ : Συνολικά διεξήχθησαν δυο σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη, χρησιμοποιήθηκαν 3 αλφικοί κόνικλοι (albino rabbits) βάρους 2 – 2,5 kg, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε συστηματική ανοσοκαταστολή με ενδομυϊκές ενέσεις δεξαμεθαζόνης 2 mg/kg, 3 φορές την ημέρα με μεσοδιάστημα 6 ωρών. Η διαδικασία της εμφύτευσης των κυττάρων περιλάμβανε για τα 2 πειραματόζωα την έγχυση κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο - ίριδα του δεξιού (ΔΕ) οφθαλμού (κυτταρικές σειρές : A375, 92.1), ενώ για το 3^ο περιλάμβανε την εμφύτευση κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο – ίριδα και υπό τον επιπεφυκότα, στον ΔΕ οφθαλμό στην ευρύτερη περιοχή της 12^{ης} ώρας (κυτταρική σειρά Mel202). Για την δεύτερη σειρά, χρησιμοποιήθηκαν 2 αλφικοί κόνικλοι (albino rabbits) βάρους 2,5 – 3 kg. Τα ζώα υποβλήθηκαν επίσης σε συστηματική ανοσοκαταστολή με ενδομυϊκές ενέσεις 15mg/kg/ημέρα Cyclosporin A, για 3 ημέρες πριν από τον εμβολιασμό κυττάρων μελανώματος και συνέχισαν να λαμβάνουν την ίδια δοσολογία της Cyclosporin A για 26 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι την ημέρα της θυσίας. Η διαδικασία για το πειραματόζωο Mel202 περιλάμβανε τον εμβολιασμό κυττάρων Mel202 στον πρόσθιο θάλαμο του ΔΕ οφθαλμού. Ομοίως, για το 92.1 πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σειράς 92.1, τα οποία προωθήθηκαν στον ΔΕ οφθαλμό του πειραματόζωου υπερχοριοειδικά. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όλα τα ζώα εξετάζονταν κάθε 5 ημέρες με τη χρήση φορητής σχισμοειδούς λυχνίας και διενεργούνταν έμμεση βυθοσκόπηση υπό μυδρίαση. Επιπρόσθετα, για τη δεύτερη σειρά διενεργήθηκε MRI με επιφανειακό πηνίο, ενώ όλοι οι ΔΕ οφθαλμοί εξορύχθηκαν και εξετάστηκαν ιστολογικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ : Κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη ραγοειδικού μελανώματος. Οι ιστολογικές εικόνες από την περιοχή της βλάβης έδειξαν παρουσία λεμφοκυττάρων και πιθανή εικόνα φλεγμονώδους αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου πειράματος, δεν παρατηρήθηκε επίσης ανάπτυξη ραγοειδικού μελανώματος στο πειραματόζωο Mel202. Παρόμοια κλινική εικόνα εμφάνιζε και το πειραματόζωο 92.1, ωστόσο εξαιτίας της θέσης εμφύτευσης των κυττάρων και της δυσκολίας παρατήρησης πιθανού όγκου, εξετάστηκε επιπλέον με μαγνητική τομογραφία με επιφανειακό πηνίο και ακολουθίες T1 και T2 προσανατολισμού στις οποίες απεικονίστηκε πιθανή βλάβη στην περιοχή ενοφθαλμισμού. Ακολούθησε ιστολογική ανάλυση, η οποία επιβεβαίωσε την ύπαρξη μελανώματος στο ακτινωτό σώμα στο συγκεκριμένο ζώο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ : Στην εργασία αυτή, επιχειρήσαμε να δημιουργήσουμε ένα ζωικό μοντέλο ταχείας ανάπτυξης μελανώματος, λαμβάνοντας υπόψη το μικρότερο μέγεθος του αναπτυσσόμενου όγκου και το βιολογικό χρόνο ζωής των κουνελιών. Η πρόκληση σε αυτή την περίπτωση είναι η δυσκολία απεικόνισης και παρακολούθησης ενός τόσο μικρού όγκου με τις συμβατικές τεχνικές. Τελικά, δοκιμάζοντας τις διάφορες μεθόδους εμφύτευσης των κυττάρων, συμπεράναμε ότι η υπερχοριοειδική εμφύτευση ήταν επιτυχής σε σχέση με τις άλλες οδούς. Παρόλη τη μικρή διάρκεια του μοντέλου, είδαμε ότι χρησιμοποιώντας το επιφανειακό πηνίο μπορούμε να απεικονίσουμε τον αναπτυσσόμενο όγκο, που ειδικά στην περίπτωση του ακτινωτού σώματος δεν μπορεί να διακριθεί με άλλο τρόπο λόγω του μικρού μεγέθους του.

ABSTRACT

PURPOSE: The purpose of our study is to create a repeatable and easy-to-use animal model of choroidal ocular melanoma, which may be used as a research tool in imaging studies and treatment methods.

METHODS: Two sets of experiments were conducted. In the first set, 3 albino rabbits weighing 2 - 2.5 kg were used. The animals were subjected to systemic immunosuppression with intramuscular injections of dexamethasone 2 mg / kg, 3 times daily with a 6-hour interval. The process of cell implantation involved the infusion of cells in the anterior chamber – iris of the right (OD) eye for 2 animals (cell lines: A375, 92.1) and the implantation of cells in the anterior chamber - iris and subconjunctival space (12 o'clock area above the sclerocorneal limbus) of the OD eye (cell line Mel202) for 1 animal. In the second set, two albino rabbits weighing 2.5-3 kg were used. The animals were subjected to systemic immunosuppression by intramuscular injections of 15 mg / kg / day CyclosporinA for 3 days prior to the inoculation of melanoma cells and continued to receive the same dose of cyclosporin A for 26 days post-inoculation until the day of sacrifice. The procedure for the Mel202 animal experiment involved the vaccination of Mel202 cells in the anterior chamber of the OD eye. The 92.1 series cells were also used and propagated in the 92.1 experimental OD eye in the supra-choroidal space. During the experiments, all animals were examined every 5 days using a portable slit lamp and indirect ophthalmoscopy. Additionally, MRI with surface coil was performed for the second set of animals, and subsequently all eyes were enucleated and histologically examined.

RESULTS: During the first experiment, no abnormal lesion was observed, suggesting the presence of uveal melanoma. Histological images showed the presence of lymphocytes and a possible picture of an inflammatory reaction. During the second experiment, no damage was also noted suggesting the presence of uveal melanoma in the Mel202 animal. Similar results were seen in experimental animal 92.1 but due to the site of cell implantation and the difficulty of observing a potential tumor, an MRI scan using surface coil with a T1 and T2 – weighted images was performed in which the potential lesion of the suspected area was depicted. An histological analysis followed, which confirmed the presence of melanoma in the ciliary body.

CONCLUSIONS: In this study, we aimed at creating an animal model of rapid uveal melanoma development, taking into account the smaller size of the developing volume. The challenge in this case is the difficulty of imaging and monitoring such a small tumor with conventional techniques. Finally, by testing the various methods of cell implantation, we concluded that suprachoroidal implantation was successful compared to other pathways. Despite the short duration of the model, we have seen that using the surface coil we can depict the small developing tumor, which especially in the case of the ciliary body cannot be distinguished in any other way because of its size.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. Θεωρητικό Μέρος	7
1.1. Βασική Ανατομία Οφθαλμού	8
1.2. Ο Ραγοειδής Χιτώνας.....	9
1.3. Ο Χοριοειδής.....	9
1.3.1.1. Το Υπερχοριοειδικό Πέταλο (Lamina Fusca)	9
1.3.1.2. Το Στρώμα του Χοριοειδή	9
1.3.1.3. Τα Χοριοτριχοειδή	10
1.3.1.4. Η Μembrάνη του Bruch (Basal Lamina)	10
1.4. Λειτουργίες του Ραγοειδή Χιτώνα	10
2.1. Το Μελάνωμα	12
2.1.1. Επιδημιολογία	12
2.1.2. Προδιαθεσικοί Παράγοντες	12
2.1.3. Παθογένεση	13
2.1.4. Συμπτώματα και Κλινικά Χαρακτηριστικά	15
2.1.5. Διαγνωστικές Μέθοδοι.....	16
2.1.6. Διαφορική Διάγνωση.....	24
2.1.7. Συστηματικές Μεταστάσεις στο Ραγοειδικό Μελάνωμα	24
2.1.8. Πρόγνωση του Ραγοειδικού Μελανώματος	25
2.1.9. Θεραπευτικές Προσεγγίσεις.....	27
3.1. Ζωικά Μοντέλα.....	36
3.1.1. Ενδοφθάλμια ένεση με κύτταρα δερματικού μελανώματος	37
3.1.2. Εμφύτευση κυττάρων ανθρώπινου ραγοειδικού μελανώματος.....	38
3.1.3. Διαγονιδιακά Ποντίκια	38
3.1.4. Μοντέλα μεταστατικού ραγοειδικού μελανώματος	39
3.1.5. Επαγόμενα Μοντέλα	39
II. Πειραματικό Μέρος	41
4.1. Εισαγωγή - Σκοπός.....	42
4.2. Κυτταροκαλλιέργειες.....	43

4.3. Πείραμα 1	46
4.4. Πείραμα 2	51
4.5. Συμπεράσματα - Συζήτηση.....	62
Βιβλιογραφία	65

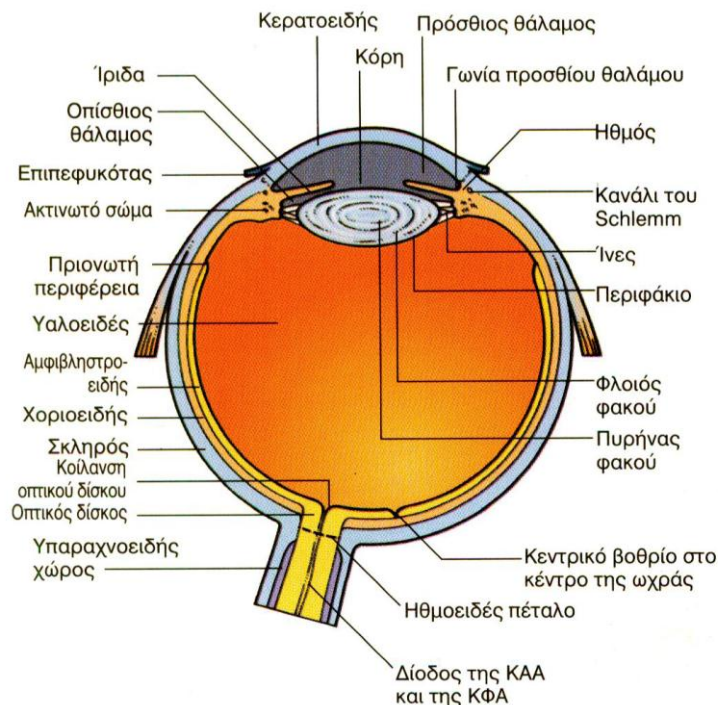
I. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Βασική Ανατομία Οφθαλμού¹

Ο οφθαλμός προσομοιάζει με σφαιροειδές σώμα με ινοαγγειακά τοιχώματα (σκληρός, χοριοειδής χιτώνας) που επενδύονται εσωτερικά από νευροαισθητηριακό χιτώνα (αμφιβληστροειδής χιτώνας) και που περιέχει το υδατοειδές υγρό, τον κρυσταλλοειδή φακό και το υαλοειδές σώμα. Ο διαφανής κερατοειδής καλύπτει το 1/6 της επιφάνειας του οφθαλμού ενώ το υπόλοιπο του ινώδη χιτώνα, ο σκληρός, είναι λευκός και αδιαφανής.

Όταν ο οφθαλμός διατμηθεί εγκάρσια (Εικ. 1) βλέπουμε μέσα σ' αυτόν δύο άνισους χώρους : ένα μικρότερο, τον χώρο του υδατοειδούς, ο οποίος βρίσκεται μπροστά από τον κρυσταλλοειδή φακό και έναν μεγαλύτερο, τον υαλοειδικό χώρο πίσω από τον φακό. Το διάφραγμα της ίριδας χωρίζει τον χώρο του υδατοειδούς σε δύο θαλάμους : έναν πρόσθιο και έναν οπίσθιο. Κάθε θάλαμος περιέχει το υδαρές, διάφανο και άυφο υδατοειδές υγρό που εκκρίνεται στις ακτινοειδείς προβολές του ακτινωτού σώματος και ρέει από τον οπίσθιο προς τον πρόσθιο θάλαμο διαμέσου της φακοκοραϊάς σχισμής και της κόρης. Το συνεχώς παραγόμενο υδατοειδές αποχετεύεται κυρίως στην ιριδοκερατοσκληρική γωνία (γωνία του προσθίου θαλάμου) η οποία εδράζεται στην περιφέρεια του προσθίου θαλάμου. Ο χώρος του υαλοειδούς είναι γεμάτος από έναν ιστό – υγρό πυκνότερο, συνήθως σε κατάσταση γέλης (gel) το υαλοειδές ή υαλώδες σώμα. Οι χιτώνες του οφθαλμού εκτός από τον εξωτερικό που αποτελείται από τον :

- Κερατοειδή και σκληρό είναι :
- Ο ραγοειδής ή αγγειώδης χιτώνας που αποτελείται από χρωστικοφόρο αγγειοβριθή ιστό (χοριοειδής), ο οποίος προς τα εμπρός διαμορφώνεται στο ακτινωτό σώμα και στην ίριδα.
- Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας που αποτελεί τον αισθητηριακό χιτώνα του οφθαλμού.



Εικ. 1. Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής οφθαλμού²

1.2 Ο Ραγοειδής Χιτώνας ¹

Ο ραγοειδής χιτώνας είναι ο μέσος χιτώνας του οφθαλμού και χωρίζεται σε 3 μούρες με διαφορετική μορφολογία και λειτουργική αποστολή. Οι τρεις μούρες από εμπρός προς τα πίσω είναι :

- Η ίριδα
- Το κυκλικό ή ακτινωτό σώμα
- Ο χοριοειδής

1.3 Ο Χοριοειδής ¹

Ανήκει στον ραγοειδή ή αγγειώδη χιτώνα και εκτείνεται από την προνωτή περιφέρεια μέχρι το οπτικό νεύρο μεταξύ του σκληρού και του αμφιβληστροειδή. Ρόλος του είναι η θρέψη των εξωτερικών στιβάδων του αμφιβληστροειδή. Ο χοριοειδής απαρτίζεται κυρίως από αγγεία μεταξύ των οποίων υπάρχει συνδετικός ιστός. Ο χοριοειδής είναι ο χώρος διαμέσου του οποίου οδηγούνται νεύρα και αρτηρίες στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού. Περιέχει χρωστική η οποία απορροφά το φως. Επίσης μπορεί να δράσει ως λεμφογάγγλιο για την καταστολή λοιμώξεων με την παραγωγή λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων και την απελευθέρωση αντισωμάτων. Το πάχος του χοριοειδή ποικίλλει από 0.22 mm στην περιοχή του οπίσθιου πόλου μέχρι 0.1 – 0.15 mm στην περιφέρεια. Στον χοριοειδή διακρίνουμε τις παρακάτω στιβάδες :

- Το υπερχοριοειδικό πέταλο που συνδέει χαλαρά το χοριοειδή με τον σκληρό,
- Τη στιβάδα των αγγείων ή στρώμα στην οποία διακρίνουμε :
 - τη στιβάδα των μεγάλων αγγείων (στιβάδα του Haller), η οποία αρδεύεται από τις 15 και περισσότερες βραχείες ακτινοειδείς αρτηρίες,
 - τη στιβάδα των μεσομεγέθων αγγείων (στιβάδα του Sattler),
- Τη στιβάδα των χοριοτριχοειδών,
- Τη μεμβράνη του Bruch

1.3.1.1 Το Υπερχοριοειδικό Πέταλο (Lamina Fusca)

Αποτελείται από λεπτές χρωστικοφόρες δεσμίδες συνδετικού ιστού που διασχίζουν ένα διάστημα που λέγεται υπερχοριοειδής χώρος μεταξύ σκληρού και χοριοειδικών αγγείων. Τα στοιχεία του υπερχοριοειδικού πετάλου προέρχονται τόσο από το σκληρό (ινοκύτταρα και δεσμίδες κολλαγόνου), όσο και από το χοριοειδικό στρώμα (μελανοκύτταρα). Από το χώρο αυτό διέρχονται οι μακρές οπίσθιες ακτινοειδείς αρτηρίες και τα μακρά οπίσθια ακτινοειδή νεύρα οδεύοντας από το οπίσθιο τμήμα του βολβού προς το πρόσθιο.

1.3.1.2 Το Στρώμα του Χοριοειδή

Περιέχει τα αγγεία τα οποία, όπως είδαμε, οργανώνονται στη στιβάδα των μεγάλων αγγείων (στιβάδα του Haller) και στη στιβάδα των μεσομεγέθων αγγείων (στιβάδα του Sattler). Τα φλεβίδια ενώνονται και σχηματίζουν φλέβες που αποκτούν μια περιδίνητη πορεία και γίνονται οι τέσσερις συνήθως χαρακτηριστικές περιδίνητες φλέβες, οι οποίες εξέρχονται από τα τέσσερα τεταρτημόρια του οφθαλμού. Εκτός από τα αγγεία στο στρώμα του χοριοειδή υπάρχει χαλαρός χρωστικοφόρος συνδετικός ιστός, ο οποίος περιέχει μελανοκύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα. Τα

χοριοειδικά αγγεία νευρώνονται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Η συμπαθητική διέγερση επιφέρει αγγειοσύσπαση, ενώ ο ρόλος του παρασυμπαθητικού είναι ακαθόριστος.

1.3.1.3 Τα Χοριοτριχοειδή

Είναι εξειδικευμένα και διαφοροποιημένα. Σχηματίζουν μία στιβάδα από τριχοειδή αναστομωμένα, που εμφανίζουν ανοίγματα. Γύρω από τα τριχοειδή υπάρχουν σπάνια περικύτταρα, ενώ τα χοριοτριχοειδή είναι πιο πυκνά στην περιοχή της ωχράς κηλίδας.

1.3.1.4 Η μεμβράνη του Bruch (Basal Lamina)

Αποτελεί την εσωτερική στιβάδα του χοριοειδή που βρίσκεται σε επαφή με τον αμφιβληστροειδή. Εκτείνεται από το οπτικό νεύρο μέχρι την προιονωτή περιφέρεια και από εκεί μετά από μεταβολές συνεχίζει στο ακτινωτό σώμα. Η μεμβράνη του Bruch εμφανίζει πέντε επιμέρους στιβάδες :

- τη βασική μεμβράνη των χοριοτριχοειδών η οποία εμφανίζει ανοίγματα,
- την έξω κολλαγόνο ζώνη,
- την ελαστική στιβάδα,
- την έσω κολλαγόνο ζώνη,
- τη βασική στιβάδα των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου του αμφιβληστροειδή (ME).

Από την προιονωτή περιφέρεια και πιο μπροστά η βασική μεμβράνη των χοριοτριχοειδών συνεχίζει ως βασική μεμβράνη των τριχοειδών του ακτινωτού σώματος.

1.4 Λειτουργίες του Ραγοειδή Χιτώνα ¹

- Ίριδα : Η κύρια δράση της ίριδας είναι η ρύθμιση του ποσού του εισερχόμενου μέσα στο βολβό φωτός – λειτουργία οπτικού διαφράγματος. Δευτερευόντως φαίνεται ότι έχει σχέση με την αποχέτευση πολύ μικρού ποσοστού του υδατοειδούς υγρού.
- Ακτινωτό Σώμα :
 - α) παράγει με έκκριση και υπερδιήθηση το υδατοειδές υγρό (YY). Τόσο τα τριχοειδή του ακτινωτού σώματος, τα οποία είναι ευρέα και έχουν πολυάριθμα ανοίγματα τα οποία διευκολύνουν την κίνηση ουσιών από το αίμα και προς αυτό, όσο και οι στιβάδες του επιθηλίου, με ενεργό μεταφορά και έκκριση συμμετέχουν στην παραγωγή του υδατοειδούς υγρού. Ιδιαίτερα το μη χρωστικοφόρο επιθήλιο εκκρίνει ενεργά διάφορα συστατικά του YY μέσα στον οπίσθιο θάλαμο,
 - β) κινεί τον μηχανισμό προσαρμογής. Σύσπαση του ακτινωτού μυός (του οποίου η κυκλική ή κυκλοτερής μοίρα λειτουργεί σαν σφιγκτήρας μυς) ελαττώνει τη διάμετρο του δακτυλίου που σχηματίζει το ακτινωτό σώμα και έτσι μικραίνει η απόσταση από τον κρυσταλλοειδή φακό και χαλαρώνει η τάση των ινών της ζίνειας ζώνης με αποτέλεσμα να πάρει ο φακός περισσότερο σφαιρικό (και άρα περισσότερο διαθλαστικό) σχήμα,
 - γ) βοηθά στην αποχέτευση του YY καθώς η σύσπαση των επιμήκων μυϊκών ινών έλκει μέσω του σκληραίου περνιστήρα τις δοκίδες του trabeculum και ανοίγει τους πόρους του,
 - δ) συμμετέχει στη ραγοειδοσκληρική οδό αποχέτευσης του YY δια της οποίας απάγεται μέχρι και 20% του YY.

- Χοριοειδής : Οι λειτουργίες του χοριοειδή είναι :
 - α) ο μεταβολισμός και η θρέψη της εξωτερικής μοίρας του αμφιβληστροειδή (ραβδία και κωνία),
 - β) η απορρόφηση του υπερβολικού φωτός που περνά από το ΜΕ,
 - γ) δίνει χώρο (υπερχοριοειδές διάστημα) για την πορεία των μακρών οπισθίων ακτινοειδών αρτηριών και νεύρων προς το πρόσθιο τμήμα του βολβού,
 - δ) λειτουργεί ως λεμφογάγγλιο.

2.1 Μελάνωμα

Τα μελανώματα του ραγοειδούς αποτελούν κακοήγη νεοπλάσματα, τα οποία ορμώνται από νευροεκτοδερμικά μελανοκύτταρα, που υπάρχουν στο χοριοειδή, το ακτινωτό σώμα ή την ίριδα. Τα νεοπλάσματα που αφορούν τον χοριοειδή ή το ακτινωτό σώμα αναφέρονται και ως οπίσθιο ραγοειδικό μελάνωμα, ενώ αυτά που αφορούν την ίριδα ως πρόσθιο ραγοειδικό μελάνωμα. Πρόκειται για την συχνότερη πρωτοπαθή κακοήθεια του οφθαλμού σε ενήλικες, με αρκετή αντοχή στις διαθέσιμες θεραπείες, ενώ η ανάπτυξη μεταστάσεων επηρεάζει σημαντικά την πρόγνωση¹. Τα ραγοειδικά μελανώματα αποτελούν περίπου το 98 % όλων των οφθαλμικών μελανωμάτων με το 90 % εξ' αυτών να αφορούν τον χοριοειδή, το 3-4% να αναπτύσσονται στην ίριδα ενώ τα υπόλοιπα στο ακτινωτό σώμα³.

2.1.1. Επιδημιολογία

Το μελάνωμα του ραγοειδούς αποτελεί την πιο συχνή πρωτοπαθή ενδοφθάλμια κακοήθεια και την κύρια πρωτοπαθή ενδοβόλβια νόσο η οποία μπορεί να αποβεί μοιραία για τον ενήλικο πληθυσμό. Στον γενικό πληθυσμό έχει επίπτωση 5.3 – 10.9 περιπτώσεις/ εκατομμύριο/ έτος, ενώ τα τελευταία 30 χρόνια δεν υπήρξε αλλαγή στην επίπτωση στις Η.Π.Α. Καμία αλλαγή επίσης δεν υπήρξε για την Δανία ή την Φινλανδία ενώ στη Σουηδία αναφέρθηκε σχετική μείωση 1 %. Η επίπτωση στον έγχρωμο πληθυσμό είναι χαμηλή είτε για τους Αφρικανούς ή Αφρο – Αμερικανούς, καθώς επίσης και για τους Ασιάτες ή τους Αμερικανούς ασιατικής καταγωγής. Στην Ευρώπη η κλιμακωτή μείωση από Βορρά προς Νότο μεταξύ Ευρωπαϊκών πληθυσμών υποδηλώνει τον πιθανό προστατευτικό ρόλο της μελανίνης. Διαγιγνώσκεται συνήθως κατά την 6^η δεκαετία με μέσο όρο ηλικίας τα 55 χρόνια με την επίπτωση να αυξάνεται προοδευτικά όσο ανεβαίνουμε στην ηλικία των 70 ετών στις Η.Π.Α., αγγίζοντας το μέγιστο τα 75 έτη και μετά φτάνοντας σε ένα plateau. Τα 2 φύλα επηρεάζονται το ίδιο με μια ελαφρά αυξημένη επίπτωση στους άνδρες⁴. Το μελάνωμα της ίριδας είναι πιο συχνό στους νέους (<20 ετών) και αντιπροσωπεύει το 21% όλων των ραγοειδικών μελανωμάτων σε αυτή την ηλικιακή ομάδα, συγκρινόμενη με το 4% και 2% στις ηλικιακές ομάδες 20 – 60 έτη και >60 έτη αντίστοιχα⁵.

2.1.2. Προδιαθεσικοί Παράγοντες

Στους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ραγοειδικού μελανώματος συγκαταλέγεται η λευκή φυλή, το ανοιχτόχρωμο δέρμα και η ανοιχτόχρωμη ίριδα⁶. Παρακάτω, περιγράφεται η επίδραση ορισμένων μελανοκυτταρικών αλλοιώσεων και περιβαλλοντικών παραγόντων οι οποίοι ενδέχεται να οδηγήσουν και αυτοί στην ανάπτυξη μελανώματος :

➤ Μελανοκυτταρικές αλλοιώσεις σχετιζόμενες με μελάνωμα

- Χοριοειδικός σπίλος : ανευρίσκεται σε ποσοστό 3% σε άτομα άνω των 30 ετών και μελέτες δείχνουν πως τα ετήσια επίπεδα κακοήθους μεταλλαγής ποικίλλουν από 1 στα 4.300 σε 1 στα 8.845^{7,8}.
- Οφθαλμική/ Οφθαλμοδερματική μελανοκύττωση : πρόκειται για κατάσταση χαρακτηριζόμενη από υπερχρωμάτωση του επισκληρίου, του ραγοειδούς και του δέρματος και παρατηρείται συνηθέστερα σε μαύρους, ισπανόφωνους και ασιατικούς πληθυσμούς.

Η επίπτωση στη λευκή φυλή είναι 0.04%, ενώ 1 στα 400 περιστατικά αναπτύσσει ραγοειδικό μελάνωμα¹⁰.

- Δερματικός σπίλος : Μελέτες ασθενών – μαρτύρων δείχνουν πως ο δερματικός σπίλος μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για ραγοειδικό μελάνωμα ενώ ασθενείς με σύνδρομο δυσπλαστικών σπύλων έχουν υψηλότερη επίπτωση ραγοειδικού μελανώματος^{11,12}. Αυτό καταδεικνύει την ανάγκη δερματολογικής εκτίμησης σε ασθενείς με μελάνωμα του ραγοειδούς⁹.
- Οικογενές ραγοειδικό μελάνωμα : πρόσφατες μελέτες περιγράφουν ένα σύνδρομο αυτοσωμικού επικρατούς κληρονομούμενου καρκίνου με μεταλλάξεις στο γονίδιο BAP1. Ασθενείς με αυτή την μεταλλαγή έχουν υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης ραγοειδικού μελανώματος, δερματικού μελανώματος, μη τυπικών Spitz όγκων, μεσοθηλιώματος, μηνιγγιώματος, αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και πολλών άλλων τύπων καρκίνου^{13,14}.

➤ Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

- Ηλιακό φως : Σε αντίθεση με το δερματικό μελάνωμα, η υπεριώδης ακτινοβολία δεν έχειδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του ραγοειδικού μελανώματος. Αναφέρεται όμως συσχέτιση μεταξύ έκθεσης σε ακτινοβολία UV-B σε συνδυασμό με μη χρήση γυαλιών ηλίου¹⁶. Σημαντικός παράγοντας κινδύνου παραμένει η επαγγελματική έκθεση π.χ. συγκολλητές μετάλλων^{12,15}.
- Δίαιτα, κάπνισμα και κατανάλωση αλκοόλ : Δεν έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής μελέτες που να επιβεβαιώνουν οποιαδήποτε επίδραση στην επίπτωση του ραγοειδικού μελανώματος⁹.

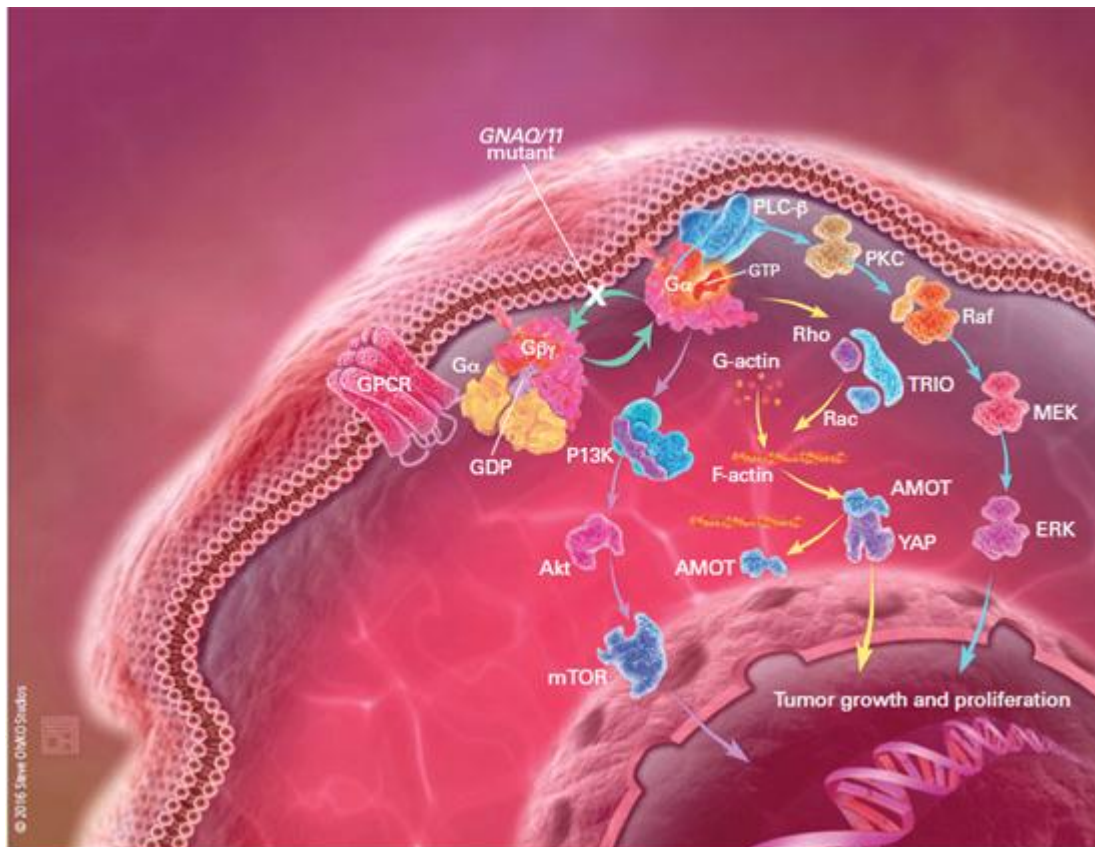
2.1.3. Παθογένεση

Η ανάπτυξη του ραγοειδικού μελανώματος έχει συσχετιστεί με πρώιμες ογκογόνες μεταλλάξεις, οι οποίες επηρεάζουν μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στον έλεγχο της κυτταρικής απόπτωσης.

○ Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω του σταδίου G1-S και η αναστολή αυτή μέσω υπερφωσφορυλίωσης επιτρέπει στα κύτταρα να ξαναμπούν στον κυτταρικό κύκλο¹⁷. Αυτές οι μεταλλάξεις φαίνεται να περιλαμβάνουν το RAF/MEK/ERK μονοπάτι. Έχει αποδειχθεί στο παρελθόν, ότι ένας στόχος αυτής της οδού, ο CCND1, υπεύθυνος παράγοντας για την κωδικοποίηση της κυκλίνης D1, υπερεκφράζεται σε ραγοειδικά μελανώματα οδηγώντας στην φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος στα μελανώματα αυτά¹⁸. Η μεταλλαγή ογκογονιδίων που επηρεάζει αυτό το μονοπάτι αφορά μεταλλαγή στα γονίδια GNAQ και GNA11, στο κωδικόνιο 29. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την GNAQ, την α-υπομονάδα της ετεροδιμερούς G-πρωτεΐνης, η οποία προσδένεται με τη βοήθεια υποδοχέα, σε RAF/MEK/ERK και άλλα ενδοκυττάρια μονοπάτια (Εικ. 2). Τα μονοπάτια αυτά είναι σημαντικά για την διατήρηση της ομοιόστασης των μελανοκυττάρων. Επιπρόσθετα, η GNAQ εμπλέκεται στη σηματοδότηση της ενδοθηλίνης η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των

μελανοκυττάρων πρώιμα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης¹⁹. Η ενεργοποίηση της GNAQ μιμείται τη σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων στα μονοπάτια RAF/MEK/ERK οδηγώντας σε μεταγραφική ενεργοποίηση του CCND1. Η μεταλλαγή στο GNAQ παρατηρήθηκε σε ποσοστό 49% των εξεταζόμενων ραγοειδικών μελανωμάτων σε δείγματα οφθαλμών μετά την εξόρυξη¹⁸ και σε 45% σε δείγματα βιοψιών^{19,20}, γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την πιθανή συμβολή και άλλων μεταλλαγών²⁰. Ακόμη, GNA11 μεταλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε δείγματα ραγοειδικών μελανωμάτων σε ποσοστό 31.9%. Ένα άλλο μοριακό συμβάν που σχετίζεται με δυσλειτουργία της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος αφορά την αδρανοποίηση του INK4A γονιδίου¹⁷.



Εικ. 2. Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης Gα στο ραγοειδικό μελάνωμα. Μεταλλαγές σε GNAQ και GNA11 οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα της Gα υπομονάδας, η οποία επιδρά σε 3 γνωστά μονοπάτια (MAPK, YAP, mTOR) τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων¹⁶

ο Έλεγχος της κυτταρική απόπτωσης

Τα μοριακά γεγονότα τα οποία έχουν συσχετιστεί με την αναστολή της απόπτωσης στο ραγοειδικό μελάνωμα περιλαμβάνουν την απενεργοποίηση του p53 μονοπατιού²¹, αλλοιώσεις στο Bcl-2 μονοπάτι²² και ενεργοποίηση της PI3K-AKT οδού²³.

2.1.4. Συμπτώματα και Κλινικά Χαρακτηριστικά

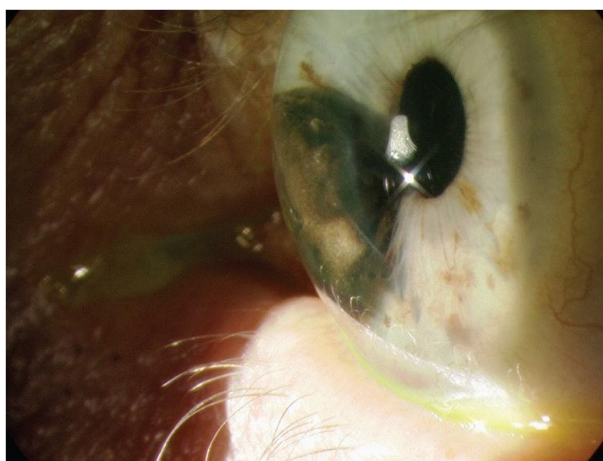
Η παρουσία συμπτωμάτων σε άτομα με ραγοειδικό μελάνωμα κυρίως εξαρτάται από το μέγεθος και την τοποθεσία του όγκου ενώ ενδέχεται να είναι ασυμπτωματικό, εντοπιζόμενο ως τυχαίο εύρημα σε οφθαλμολογική εξέταση, έως υπεύθυνο για την πρόκληση διαφόρων οπτικών διαταραχών ή απώλειας όρασης στο προσβεβλημένο οφθαλμό.

Τη στιγμή της διάγνωσης η πλειοψηφία των ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα είναι συμπτωματικοί, όμως έως και το 30% θα μπορούσε να είναι ασυμπτωματικό^{24,25}. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι : θολή όραση, διαταραχές στο οπτικό πεδίο, φωταψίες, ερεθισμός, πόνος, αλλά και συμπτώματα όπως μεταμορφοψίες, floaters, ερυθρότητα και αίσθημα πίεσης²⁴.

Το χοριοειδικό μελάνωμα συνήθως εμφανίζεται ως μια υπο - αμφιβληστροειδική μάζα σε σχήμα θόλου ή μανιταριού ενώ σπανίως παρουσιάζει μια διαμόρφωση διάχυτης ανάπτυξης²⁶. Η ανάπτυξη του όγκου μπορεί να προκαλέσει δευτερογενώς αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς με συνοδό απώλεια όρασης ή ρήξη της μεμβράνης του Bruch που αποκτά σχήμα μανιταριού ενώ το χρώμα μπορεί να ποικίλει από τυπικό καφέ μέχρι αμελανωτικό²⁷.

Από την άλλη, το μελάνωμα του ακτινωτού σώματος μπορεί να προκαλέσει μετατόπιση φακού με επακόλουθες διαταραχές της διάθλασης και προσαρμογής, τοπικό καταρράκτη ή αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση. Πριν εμφανιστεί κλινικά, μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματικό για μια μακρά περίοδο. Τα αγγεία που το τροφοδοτούν μπορούν να εμφανιστούν στον επικαλυμμένο σκληρό χιτώνα ενώ μελάγχρωση μπορεί να εμφανιστεί σε περιπτώσεις εξωσκληρικής επέκτασης. Το μελάνωμα του ακτινωτού σώματος μπορεί να παρατηρηθεί με διεσταλμένη κόρη ενώ παρουσιάζεται συχνά ως θολωτή ή άμισχη βλάβη.

Το μελάνωμα της ίριδας (Εικ. 3), είναι συνήθως ασυμπτωματικό, το οποίο εκδηλώνεται ως ανάπτυξη προηγούμενης καταγεγραμμένης βλάβης της ίριδας, ή ως ένα νέο μελαγχρωστικό σημείο πάνω στην ίριδα το οποίο οι ίδιοι οι ασθενείς αναγνωρίζουν ή ανακαλύπτουν κατά την διάρκεια μιας τυπικής οφθαλμολογικής εξέτασης. Μπορεί επίσης να προκαλέσει παραμόρφωση της κόρης, τοπικό καταρράκτη, ύφαιμα ή δευτεροπαθές γλαύκωμα εξαιτίας της απόφραξης της ροής του υδατοειδούς υγρού στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού.



Εικ. 3. Μελάνωμα της ίριδας το οποίο καταλαμβάνει ένα σημαντικό ποσοστό του πρόσθιου θαλάμου με συνοδό κορεκτοπία⁴

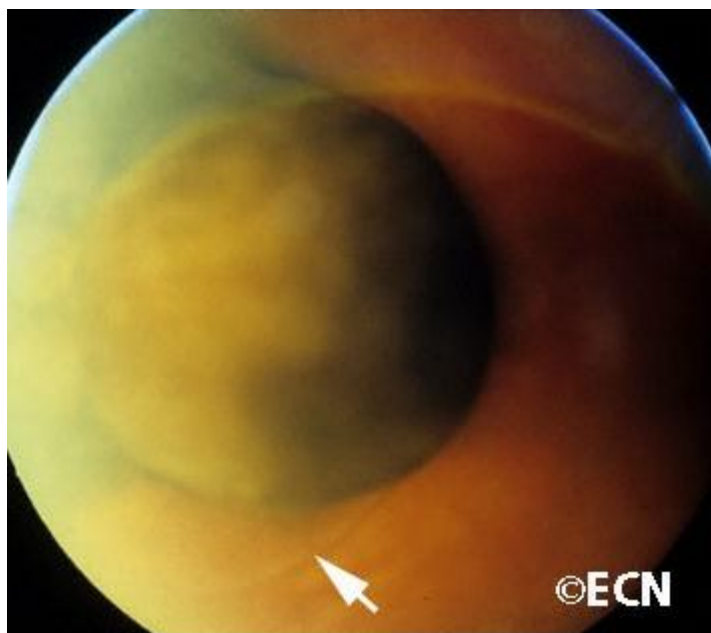
2.1.5. Διαγνωστικές Μέθοδοι

Η διάγνωση του ραγοειδικού μελανώματος βασίζεται κυρίως στην κλινική εξέταση μέσω βιομικροσκόπηση και έμμεσης οφθαλμοσκόπηση. Σε αντίθεση με τις βασικές αρχές της ογκολογίας η ιστολογική και η κυτταρολογική αξιολόγηση δεν αποτελεί διαδικασία ρουτίνας στη διάγνωση των ενδοφθάλμιων νεοπλασιών.

Ο συμπληρωματικός βοηθητικός έλεγχος περιλαμβάνει την έγχρωμη φωτογραφία βυθού, την υπερηχογραφία (USG), την φλουροαγγειογραφία (FFA), την αγγειογραφία με ινδοκυανίνη (IGGA), την οπτική τομογραφία συνοχής (OCT), τον αυτοφθορισμό βυθού (FAF) και τέλος την βιομικροσκόπηση με υπερήχους (UBM). Όλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση ενώ βιοψία λεπτής βελόνης (FNAB) μπορεί να εφαρμοστεί όταν η κλινική διάγνωση είναι ασαφής. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες ενδείξεις για την παρακολούθηση και θεραπεία μικρών χοριοειδικών μελανοκυτταρικών αλλοιώσεων. Με τα κυτταρογενετικά ευρήματα να αποτελούν τον βασικό προγνωστικό παράγοντα μεταστατικής νόσου σε ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα, η εφαρμογή των βιοψιών έχει την τάση να αυξάνεται τον τελευταίο καιρό^{30,31}.

Μελέτες στις οποίες καθυστέρησε η διάγνωση του ραγοειδικού μελανώματος δείχνουν ότι στο 28-37% δεν ανιχνεύθηκε καμία παθολογία κατά την πρώτη εξέταση. Γι' αυτό τον λόγο, είναι απαραίτητο σε ασθενείς που παρουσιάζουν συμπτώματα με υποψία παθολογίας οπισθίου ημιμορίου, όπως φωταγίες, μεταμορφωγίες ή απώλεια όρασης, να διενεργείται βυθοσκόπηση υπό μυδρίαση^{32,33}.

Η κλασική εμφάνιση ενός οπισθίου ραγοειδικού μελανώματος (ακτινωτό σώμα και χοριοειδής) αφορά μια καφέ μάζα, θολωτού ή σχήματος μανιταριού (20%), ή διαφορετικού τύπου (5%). Το 55% των όγκων περιέχουν χρωστική, το 15 % δεν περιέχουν χρωστική ενώ το 30 % είναι μεικτού τύπου.



Εικ. 4. Χοριοειδικό μελάνωμα, σχήματος μανιταριού, συνοδευόμενο εδώ από μια μικρή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς (βέλος)¹²⁵

Τα μελανώματα της ίριδας απαντώνται συχνότερα στο κατώτερο τεταρτημόριο 45%, περιέχουν χρωστική στο 82% των περιπτώσεων και εμφανίζουν ένα από τα ακόλουθα τρία μοτίβα ανάπτυξης : οζώδης, διάχυτη ή δίκην τάπητος^{28,29}.

Σε αντίθεση με τα μελανώματα της ίριδας τα οποία είναι ορατά κατά την κλινική εξέταση, τα μελανώματα του ακτινωτού σώματος μπορούν να κρύβονται πίσω από την ίριδα, πράγμα που τα κάνει δύσκολο να ανιχνευθούν ειδικά όταν είναι μικρά. Ομοίως, τα χοριοειδικά μελανώματα μπορούν να διαφύγουν προσοχής χωρίς προσεκτική βυθοσκόπηση υπό μυδρίαση. Η καταγραφή του μεγέθους και της τοποθεσίας του όγκου μέσω έγχρωμης φωτογραφίας βυθού είναι κρίσιμη κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης με σκοπό να αξιολογηθούν σημεία κακοήθους εξαλλαγής και αύξησης³⁴.

Τα οπίσθια ραγοειδικά μελανώματα γενικά κατατάσσονται βάσει του πάχους του όγκου σε ερευνητικές και κλινικές μελέτες. Σε αυτό το σύστημα ταξινόμησης, μικροί όγκοι έχουν 3 mm ύψος με μία διάμετρο βάσης όχι πάνω από 16 mm, μεσαίοι όγκοι έχουν 3.1 – 8 mm ύψος και διάμετρο βάσης η οποία δεν ξεπερνά τα 16 mm και μεγάλοι όγκοι που έχουν ύψος από 8 mm και διάμετρο βάσης μεγαλύτερη από 16 mm. Έχει διαπιστωθεί ότι η πιθανότητα μετάστασης αυξάνει κατά 5 % για κάθε ένα χιλιοστό αύξησης του ύψους του όγκου μετρούμενο με υπερηχογραφία (USG)³⁵.

Σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης της American Joint Committee on Cancer, το μέγεθος του όγκου αξιολογείται και ορίζεται στην κατηγορία T (1 - 4), η εμπλοκή των λεμφαδένων στην κατηγορία N (NX, N0, N1) και η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων στην κατηγορία M. Όσον αφορά το οπίσθιο ραγοειδικό μελάνωμα, η κατηγορία T ορίζεται βάσει το βασικό πλάτος και το ύψος του όγκου (T1, T2, T3, T4), υποδιαιρούμενο στη συνέχεια σε υποκατηγορίες ανακλώντας την εμπλοκή του ακτινωτού σώματος και εξωσκληρικής επέκτασης του όγκου (a, b, c, d, e) (Πίνακας 1). Μελέτες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο σύστημα ταξινόμησης μπορεί να προβλέψει την πρόγνωση ενώ η 5-ετή επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα της ίριδας υπολογίζεται σε 100% για ασθενείς σταδίου T1, 90.4% για ασθενείς σταδίου T2, 63.6% για ασθενείς σταδίου T2a και 50% για ασθενείς σταδίου T3, T3a ή T4³⁶. Η πιθανότητα μεταστάσεων τα επόμενα 10 έτη για το οπίσθιο ραγοειδικό μελάνωμα είναι 15 % για το στάδιο T1, 25% για το στάδιο T2, 49% για το στάδιο T3 και 63% για το στάδιο T4³⁷.

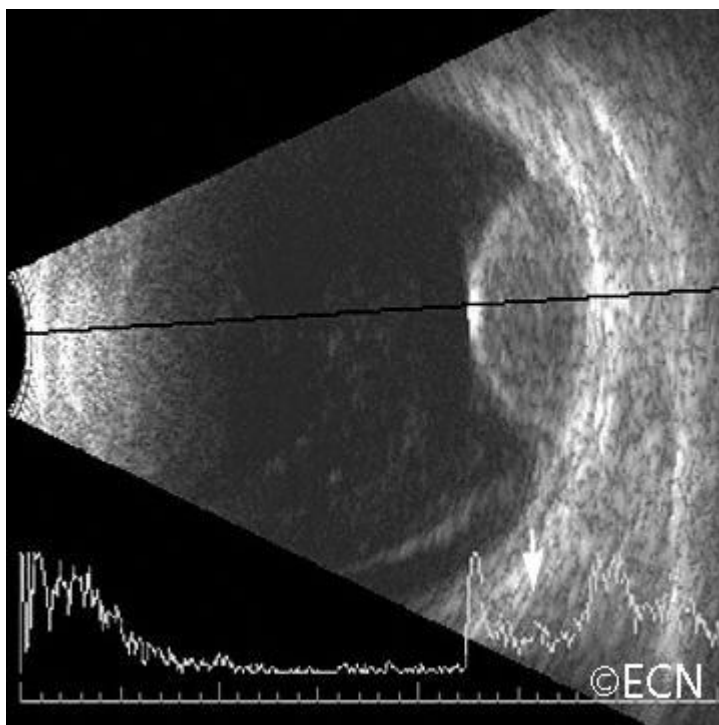
Stage	T (Extent of tumor)	N (Lymph node involvement)	M (Distant metastasis)
I	T1a	N0	M0
IIA	T1b-d, T2a	N0	M0
IIB	T2b, T3a	N0	M0
IIIA	T2c-d, T3b-c, T4a	N0	M0
IIIB	T3d, T4b-c	N0	M0
IIIC	T4d-e	N0	M0
IV	Any T	N1	M0
	Any T	Any N	M1a-c

T: Tumor, N: Node, M: Metastasis
Source: Edge SB, Byrd DR, Compton CC. Malignant Melanoma of the Uvea. In: American Joint Committee on Cancer Staging Manual (7th ed). New York, NY: Springer; 2010:547-560.

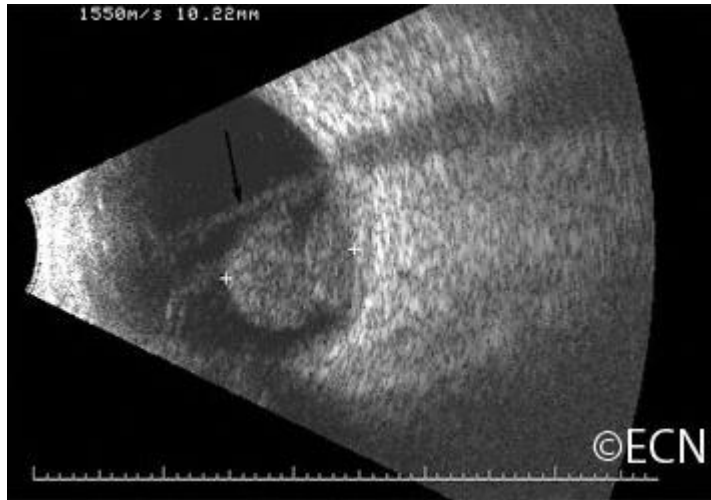
Πίνακας 1. Σύστημα σταδιοποίησης της American Joint Committee on Cancer³⁴

Τα μικρά μελανώματα μπορεί να παρουσιαστούν ως αποπλατυσμένα ή θολωτά. Με την πάροδο του χρόνου, τα μελανώματα καταστρέφουν την μεμβράνη του Bruch σχηματίζοντας την παθολογική μορφή του μαντιταριού, που μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί στον υπέρηχο (USG). Οι ενδοϋαλοειδικές αιμορραγίες μπορούν επίσης να είναι παρούσες αν ο όγκος διηθήσει τον αμφιβληστροειδή μετά την διάρρηξη της μεμβράνης του Bruch³⁸.

Ο υπέρηχος (USG) αποτελεί μια επικουρική μέθοδος που συχνά χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη για τη διάγνωση του ραγοειδικού μελανώματος. Ο όγκος τυπικά εμφανίζει χαμηλή με μέση εσωτερική ανακλαστικότητα στον υπέρηχο Α τύπου (Α - mode USG) (Εικ. 5) , και εμφανίζεται σαν ακουστικό κοίλο μανιτάρι ή ως θολωτή χοριοειδική μάζα σε υπέρηχο Β τύπου (Β - mode USG) (Εικ 6). Στον υπέρηχο Α τύπου, η χαμηλή προς υψηλή εσωτερική ανακλαστικότητα του όγκου μειώνεται πηγαίνοντας προς τον σκληρό. Αυτό επιτρέπει την διάκριση από τα αιμαγγειώματα τα οποία τυπικά εμφανίζουν υψηλή ανακλαστικότητα σε αυτό τον τύπο υπερήχου. Στον υπέρηχο Β τύπου οι όγκοι μοιάζουν σαν υπερηχογραφικές μάζες με χαμηλότερη ανακλαστικότητα απ' ότι ο περιβάλλον χοριοειδής, δίνοντας την εμφάνιση ενός ακουστικού κοίλου. Η χοριοειδική κοίλανση μπορεί επίσης να είναι παρούσα, η οποία είναι πιο συχνή σε μεγάλους όγκους ενώ σκίαση μπορεί να παρατηρηθεί εξίσου. Ο υπέρηχος είναι επίσης χρήσιμος για την εξέλιξη της εξοφθάλμιας επέκτασης του όγκου, όπου περιοχές υποανακλαστικότητας συγκρινόμενες με τον φυσιολογικό οφθαλμικό ιστό θεωρούνται επεκτάσεις του όγκου³⁸.



Εικ. 5. Χοριοειδικό μελάνωμα, θολωτού σχήματος, συνοδευόμενο από αποκόλληση αμφιβληστροειδούς. Παρατηρείται χαμηλή εσωτερική ανακλαστικότητα στο Α-mode USG (βέλος)¹²⁵



Εικ. 6. Χοριοειδικό μελάνωμα σε B-mode USG¹²⁵

Η βιομικροσκόπηση με τη χρήση υπερήχου (UBM) είναι επίσης χρήσιμη για την αξιολόγηση όγκων οι οποίοι εξορμούν από το ακτινωτό σώμα. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την παρατήρηση και την αξιολόγηση υποανακλαστικών πλακών στην επιφάνεια των όγκων, την σχετιζόμενη με τον όγκο αγγείωση, την εσωτερική ανακλαστικότητα και αν είναι παρούσα, την εξοφθάλμια επέκταση³⁹.

Η OCT προσθίου ημιμορίου είναι μια νεότερη τεχνική που χρησιμοποιείται στην απεικόνιση της ίριδας και του ακτινωτού σώματος, αλλά δεν έχει τα ίδια αποτελέσματα ακόμη με τον υπέρηχο (USG) λόγω της απουσίας διείσδυσης σε βαθύτερους ιστούς⁴⁰.

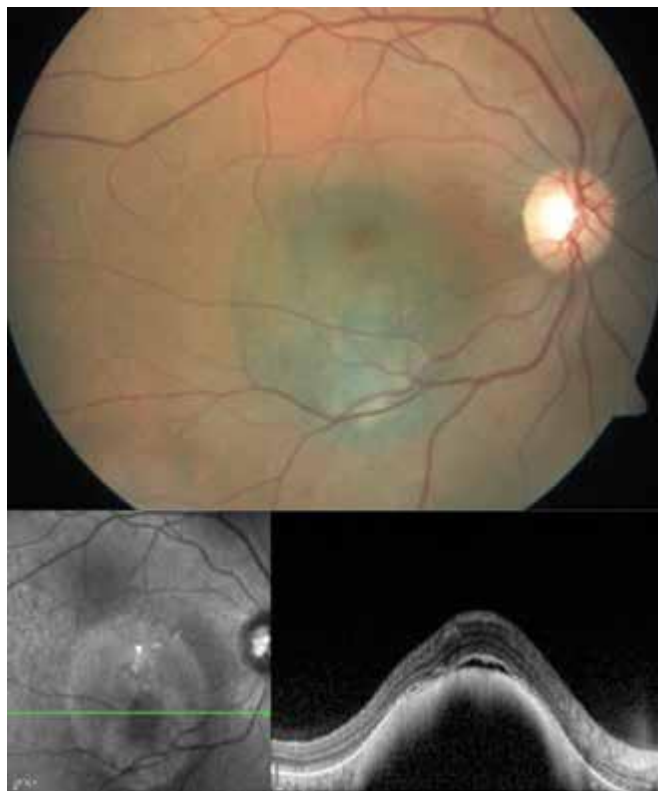
Σε απουσία αυτών των επικουρικών απεικονιστικών μεθόδων, η διαφανοσκόπηση, η γωνιοσκόπηση και η πλάγια βιομικροσκόπηση η οποία επιτρέπει την παρατήρηση του όγκου όταν ο ασθενής κοιτάζει προς την κατεύθυνση της αλλοίωσης μπορεί να βοηθήσει στην παρατήρηση των μελανωμάτων του ακτινωτού σώματος³⁸.

Τα ραγοειδικά μελανώματα διαθέτουν όχι μόνο εγγενή κυκλοφορία αλλά και χοριοειδική κυκλοφορία. Η παρατήρηση αυτού του μοτίβου της διπλής κυκλοφορίας ή η διαρροή από το αγγειακό δίκτυο του όγκου είναι περιστασιακά απαραίτητη για τον σκοπό της επιβεβαίωσης της διάγνωσης. Η φλουοροαγγειογραφία (FFA) μπορεί να αναγνωρίσει αυτές τις ιδιότητες και αποτελεί σημαντική τεχνική για την διαφοροδιάγνωση από άλλες αλλοιώσεις. Η FFA επίσης χρησιμοποιείται στη διάγνωση και στην παρακολούθηση των επιπλοκών που εμφανίζονται μετά τη βραχυθεραπεία όπως η αμφιβληστροειδοπάθεια και η ωχροπάθεια εξ' ακτινοβολίας.

Η OCT μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οφθαλμική ογκολογία ως επικουρικός έλεγχος στην διάγνωση, τον σχεδιασμό της θεραπείας και την αξιολόγηση της ανταπόκρισης. Η SD-OCT επιτρέπει την λεπτομερή αξιολόγηση των αλλαγών του αμφιβληστροειδούς και του μελαγχρόου επιθηλίου (ME) από υπερκείμενες βλάβες στο χοριοειδικό μελάνωμα. Τα χοριοειδικά μελανώματα συνήθως εύκολα διαχωρίζονται από τους χοριοειδικούς σπίλους βασισμένοι στο μέγεθος αλλά αυτή η διάκριση μπορεί να είναι δύσκολη για αλλοιώσεις μικρότερες των 3 mm ύψους. Σε αυτές τις περιπτώσεις η OCT μπορεί να διευκολύνει στην ανίχνευση χαρακτηριστικών όπως υπαμφιβληστροειδικό υγρό, το οποίο θεωρείται ένα από τα υψηλού ρίσκου χαρακτηριστικά πρόβλεψης πιθανής εξαλλαγής σε μελάνωμα^{41,42,43}.

Με τις νέες τεχνικές απεικόνισης, όπως η απεικόνιση αυξημένου βάθους είναι πλέον δυνατόν να εξεταστούν βαθύτεροι ιστοί όπως ο χοριοειδής και ο σκληρός. Με αυτή την τεχνική, οι χοριοειδικοί σπίλοι εμφανίζονται ως θολωτές ή αποπλάτυσμένες αλλοιώσεις που προκαλούν βαθιά σκίαση στον

χοριοειδή εξαρτώμενοι από την μελάγχρωση του όγκου. Το ΜΕ το οποίο είναι υπερκείμενο της μάζας μπορεί να ατροφήσει ή να απουσιάζει με ταυτόχρονη συμπίεση των χοριοτριχοειδών και απώλεια των φωτοϋποδοχέων σε αυτή την περιοχή. Παρ' όλο που τα χοριοειδικά μελανώματα μπορούν να επιδεικνύουν όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, μελέτες έδειξαν ότι οι τραχείς φωτοϋποδοχείς και η ύπαρξη υπαμφιβληστροειδικού υγρού είναι ενδεικτικά ύπαρξης χοριοειδικού μελανώματος στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ σπίλου και χοριοειδικού μελανώματος (Εικ. 7).

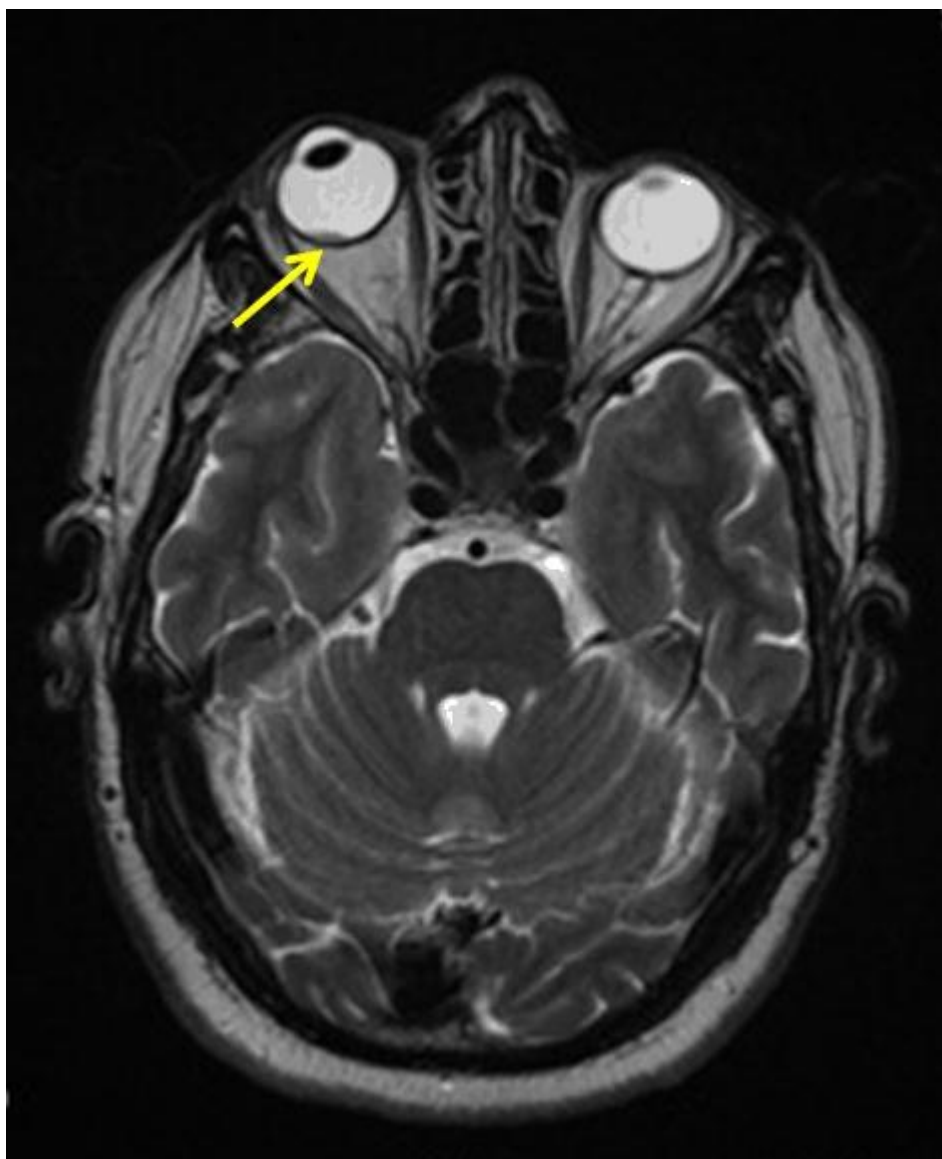


Εικ. 7. Έγχρωμη φωτογραφία βυθού και SD-OCT εικόνα ενός χοριοειδικού μελανώματος στον οπίσθιο πόλο του ΔΕ οφθαλμού πριν την θεραπεία³⁴.

Στην απεικόνιση με FAF (αυτοφθορισμός), μελαγχρωστικοί όγκοι εμφανίζουν μέτριο υποφθορισμό ενώ οι μη μελαγχρωστικοί όγκοι εμφανίζουν μέτριο υπερφθορισμό. Και στους δυο τύπους των όγκων οι περιοχές του υπερφθορισμού μπορούν να φανούν εξαιτίας της παρουσίας πορτοκαλόχρους χρωστικής, drusen, και υπαμφιβληστροειδικού υγρού υπερκείμενου του όγκου. Η παρουσία αυτής της χρωστικής μπορεί να επιβεβαιωθεί συγκρίνοντας τις περιοχές υπερφθορισμού με ύποπτες αλλοιώσεις που έχουν βρεθεί στη βυθοσκόπηση. Αυτή η μέθοδος μπορεί να αποκαλύψει υποφθορισμό λόγω ελλείμματος του ΜΕ, όπως υπερπλασία, ατροφία και ινώδης μεταπλασία ή υπερφθορίζοντα drusen, τα οποία υποδεικνύουν χρόνιο σταθερό σπίλο⁴⁴.

Η υπολογιστική τομογραφία (CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) (Εικ. 8) μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν η απεικόνιση του όγκου μέσω κλινικής εξέτασης αποτελεί μια πρόκληση ειδικότερα σε ασθενείς με θολρότητες των διαθλαστικών μέσων όπως καταρράκτη, ενδοουλοειδική αιμορραγία και/ή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς. Ασθενείς με μονόπλευρο καταρράκτη πρέπει προσεκτικά να αξιολογούνται για ραγοειδικό μελάνωμα, έχοντας κατά νου ότι το μελάνωμα ακτινωτού σώματος μπορεί να προκαλέσει μονόπλευρο ή ασύμμετρο καταρράκτη δια εξωτερικής πίεσεως του φακού⁴⁵. Επίσης σε ασθενείς με μονόπλευρο υπερώριμο καταρράκτη θα πρέπει να σκεφτούμε ότι ο

πυκνός καταρράκτης μπορεί να ομοιάζει με μελάνωμα ακτινωτού σώματος σε πλάγια απεικόνιση του φακού. Το ψευδομελάνωμα λόγω του υπερώριμου καταρράκτη μπορεί να αναγνωριστεί χρησιμοποιώντας τον υπέρηχο (USG).



Εικ. 8. Εγκάρσια τομή σε απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία, ακολουθίας T2 προσανατολισμού. Παρουσία χοριοειδικής μάζας στον ΔΕ οφθαλμό ασθενούς¹²⁵

Ο υπέρηχος (USG) είναι η πρώτη επιλογή όταν η μάζα δεν μπορεί να αξιολογηθεί οπτικά εξαιτίας της θολερότητας των διαθλαστικών μέσων ενώ η CT-MRI μπορεί να χρησιμοποιηθεί εάν η διαφοροδιάγνωση δεν είναι δυνατή μετά τη χρήση του υπέρηχου. Αυτές οι απεικονιστικές μέθοδοι έχουν σημαντικό ρόλο στην αξιολόγηση της εξοφθάλμιας επέκτασης. Σε απεικόνιση με CT εμφανίζεται ως μια υπέρπυκνη μάζα με ήπια / μέτρια αντίθεση και διακριτά όρια. Στη μαγνητική τομογραφία (MRI), ο όγκος επιστρέφει χαρακτηριστικά ένα φωτεινό σήμα σε ακολουθίες T1 προσανατολισμού και ένα σκοτεινό σήμα σε ακολουθίες T2 προσανατολισμού. Ωστόσο, αυτό μπορεί επίσης να παρατηρηθεί στην υποξεία φάση μιας περιορισμένης αιμορραγίας, μιμούμενο την παρουσία μιας ενδοφθάλμιας μάζας. Το περιγεγραμμένο χοριοειδικό αιμαγγείωμα περιλαμβάνεται επίσης στη διαφορική διάγνωση ειδικότερα

των αμελανωτικών μελανωμάτων. Όπως και το μελάνωμα του χοριοειδούς, τα αιμαγγειώματα δίνουν ένα φωτεινό σήμα στην T1-σταθμισμένη μαγνητική τομογραφία, αλλά σε T2-σταθμισμένες εικόνες το σήμα τους είναι ίδιο όπως με το σήμα στο υαλώδες. Αυτές οι μέθοδοι απεικόνισης δεν είναι απολύτως απαραίτητες στο στάδιο της διαφοροδιάγνωσης, αλλά αποτελούν ανάγκη για τον σχεδιασμό της θεραπείας με δέσμες πρωτονίων ή την στερεοτακτική ακτινοθεραπεία (SRT)³⁸.

Οι ενδοφθάλμιοι όγκοι μπορούν να υποβληθούν σε βιοψία με διάφορες μεθόδους. Όγκοι του προσθίου θαλάμου μπορούν να αξιολογηθούν με λήψη του υδατοειδούς υγρού, βιοψία τομής ή εκτομής. Αντίστοιχα, FNAB, βιοψία μετ' υαλοειδεκτομής, βιοψία τομής ή εκτομής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση ενδοφθάλμιων όγκων του οπίσθιου ημιμορίου του οφθαλμού⁴⁶. Μελέτες για τον χρόνο διπλασιασμού του όγκου του χοριοειδικού μελάνωματος δείχνουν ότι μικρομεταστάσεις εμφανίζονται αρκετά χρόνια πριν την διάγνωση^{46,47}. Σε αντίθεση με το δερματικό μελάνωμα, το μελάνωμα του ραγοειδούς εξαπλώνεται μέσω του αίματος και όχι μέσω του λεμφικού συστήματος, εκτός εάν υπάρχει προσβολή του επιπεφυκότα από τον όγκο. Η εξωοφθάλμια επέκταση εμφανίζεται αιματογενώς μέσω διείσδυσης στις περιδίνητες φλέβες και στα αναστομωτικά κανάλια⁴⁸.

Μικρά μελάνωματα αφορούν συνήθως προϋπάρχοντες μικρούς σπίλους που παρακολουθούνται για ανάπτυξη, με το 6-8% των διαγνωσθέντων ραγοειδικών μελανωμάτων να προέρχονται από σπίλο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότεροι ασθενείς δεν είχαν ποτέ εξεταστεί από οφθαλμίατρο πριν από την διάγνωση του ραγοειδικού μελάνωματος ο πραγματικός ρυθμός της εξαλλαγής ενός σπίλου σε μελάνωμα είναι σίγουρα υψηλότερος. Οι Singh et al. βρήκαν ότι η κακοήθης εξαλλαγή των χοριοειδικών σπίλων είναι 1 στους 8845 ασθενείς. Επομένως, οι κλινικοί ιατροί πρέπει να καταγράφουν τους υπάρχοντες χοριοειδικούς σπίλους αξιολογώντας ταυτόχρονα τους παράγοντες κινδύνου εξαλλαγής τους.

Υψηλού κινδύνου προγνωστικοί παράγοντες ανάπτυξης ύποπτων μελαγχρωστικών βλαβών σε μελάνωμα περιλαμβάνουν:

- παρουσία συμπτωμάτων,
- ύψος όγκου μεγαλύτερο από 2 mm,
- παρουσία υπαμφιβληστροειδικού υγρού και πορτοκαλόχρους χρωστικής,
- όρια του όγκου σε απόσταση 3 mm από τον οπτικό δίσκο,
- υπερηχογραφική κοίλανση και
- παρουσία άλους^{49,50,51}.

Το οπίσθιο ραγοειδικό μελάνωμα μπορεί να προσομοιάσει πολλές αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδούς, του ΜΕ και του χοριοειδούς. Σύμφωνα με μελέτες, οι πιο συχνά λανθασμένα διαγνωσμένες αλλοιώσεις είναι σε συχνότητα εμφάνισης οι χοριοειδικοί σπίλοι, η περιφερική εξιδρωματική αιμορραγική χοριοαμφιβληστροειδοπάθεια, η συγγενής υπερτροφία ΜΕ, η αιμορραγική αποκόλληση αμφιβληστροειδούς ή ΜΕ, το περιγεγραμμένο χοριοειδικό αιμαγγείωμα και η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς (AMD)⁵². Η AMD, οι εξωωχρικές δυσκοειδείς αλλοιώσεις, οι αυθόρμητες υπαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες, η πολυποειδική χοριοειδική αγγειοπάθεια και ποικίλες αλλοιώσεις όπως το αρτηριακό μακροανεύρυσμα το οποίο είναι παρόν με αιμορραγία μπορούν να εξομοιωθούν το χοριοειδικό μελάνωμα. Κατά τη διάρκεια της κλινικής εξέτασης θα πρέπει να έχουμε στο μυαλό μας ότι ασθενείς με AMD μπορούν να εμφανίζουν ωχρικές αλλαγές στο άλλο μάτι και εξετάσεις όπως η FFA και το ICGA μπορούν να συνεισφέρουν στη διαφοροδιάγνωση διαχωρίζοντας την ενδογενή κυκλοφορία του όγκου από το χοριοειδικό μελάνωμα⁵².

Κλινικοί προγνωστικοί παράγοντες για το ραγοειδικό μελάνωμα περιλαμβάνουν:

- την μεγάλη ηλικία,
- το ανδρικό φύλο,
- το αυξημένο μέγεθος όγκου,
- την τοποθεσία του όγκου,
- το διάχυτο μοτίβο ανάπτυξης,
- την παρουσία εξοφθάλμιας επέκτασης και
- την εξέλιξη στη σταδιοποίηση του όγκου σύμφωνα με το AJCC.

Ιστοπαθολογικοί παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την πρόγνωση περιλαμβάνουν:

- επιθηλιοειδή κύτταρα,
- αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα,
- αυξημένη διήθηση του όγκου από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα,
- έκφραση του HLA, IGFR-1 και τύπων συγκεκριμένων μοτίβων εξαγγειακής θεμέλιας ουσίας^{53,54}.

Το 1931, ο Callender⁵⁵ ήταν ο πρώτος που ταξινόμησε τα ραγοειδικά μελανώματα από τον ιστολογικό τύπο ως ατρακτοειδή τύπου 1 και τύπου 2, δεσμιδοειδή, επιθηλιοειδή και μεικτού τύπου. Αυτή η ταξινόμηση αργότερα άλλαξε από τους Mclean et al.⁵⁶, και το ραγοειδικό μελάνωμα ταξινομείται πλέον σε τρεις ιστολογικούς υποτύπους, ατρακτοειδή, επιθηλιοειδή και μεικτών κυττάρων. Γενικά είναι αποδεκτό ότι το μελάνωμα των επιθηλιοειδών κυττάρων σχετίζεται με την χειρότερη πρόγνωση ενώ των ατρακτοειδών με την καλύτερη.

Στη μελέτη που αξιολογήθηκε ο θάνατος εκ μεταστάσεων σε 847 ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα οι Coupland et al.⁵⁷, κατέγραψαν το εύρος βάσης του όγκου, τα επιθηλιοειδή κύτταρα, τον μιτωτικό ρυθμό και την εξοφθάλμια επέκταση ως κλινικούς και ιστοπαθολογικούς παράγοντες με προγνωστική αξία. Οι Eskelin et al.⁵⁸, μελέτησαν τον χρόνο διπλασιασμού του όγκου και βρήκαν ότι οι κλινικά ανιχνεύσιμες μεταστάσεις εμφανίζονται συνήθως 5 χρόνια μετά την θεραπεία αλλά υποστήριξαν ότι μεταστάσεις μπορούν να εμφανιστούν μέχρι και 25 χρόνια μετά επειδή οι μικρομεταστάσεις ξεκινούν να σχηματίζονται χρόνια πριν τη θεραπεία. Μελέτες που χρησιμοποιούν ανοσοϊστοχημεία για να καταλάβουν καλύτερα τα χαρακτηριστικά του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του έχουν επιδείξει ότι ο υποδοχέας της χυμοκίνης CCR7 είναι ισχυρά εκφραζόμενος στα κύτταρα του ραγοειδικού μελανώματος και πιθανά να σχετίζεται με συστηματικές μεταστάσεις^{59,60}.

2.1.6. Διαφορική Διάγνωση

Το ραγοειδικό μελάνωμα διαιρείται σε ίριδας, ακτινωτού σώματος και χοριοειδικό μελάνωμα οπότε συγκεκριμένες αλλοιώσεις θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στη διαφορική διάγνωση αυτών των υποτύπων.

Πιθανές διαγνώσεις μιας ύποπτης αλλοίωσης στην ίριδα, εκτός από μελάνωμα ίριδας περιλαμβάνουν:

- σπίλο της ίριδας,
- μελαγχρωστική επιθηλιακή κύστη της ίριδας,
- στρωματική κύστη ίριδας,
- μεταστατικός όγκος της ίριδας,
- μελανοκύττωμα,
- ατροφία της ίριδας και
- σύνδρομο Cogan-Reese.

Επιπρόσθετα, η διαφορική διάγνωση των όγκων του ακτινωτού σώματος περιλαμβάνουν:

- σταφύλωμα,
- μυελοεπιθηλίωμα και
- λειομύωμα.

Η πλειονότητα των ραγοειδικών μελανωμάτων είναι χοριοειδικά, τα οποία μπορούν να προσομοιώσουν μια ποικιλία αλλοιώσεων. Μεταξύ αυτών είναι:

- όγκοι του χοριοειδούς, ειδικά χοριοειδικός σπίλος,
- μεταστατικοί όγκοι,
- αιμαγγείωμα του χοριοειδούς και οστέωμα,
- αιμορραγικές καταστάσεις όπως AMD και αιμορραγική χοριοειδική αποκόλληση,
- όγκοι του αμφιβληστροειδούς όπως συγγενής υπερτροφία ΜΕ του αμφιβληστροειδούς και αδενοκαρκίνωμα του ΜΕ του αμφιβληστροειδή και
- φλεγμονώδεις αλλοιώσεις, όπως οπίσθια σκληρίτιδα.

2.1.7. Συστηματικές Μεταστάσεις στο Ραγοειδικό Μελάνωμα

Σε μελέτη 8.033 ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα, οι Shields et al., βρήκαν συστηματικές μεταστάσεις σε ποσοστά 8%, 15% και 25% σε 3, 5 και 10 χρόνια αντίστοιχα. Σε σχέση με το μέγεθος του όγκου, ανευρέθηκαν μεταστάσεις σε ποσοστό 12% σε μικρά μελανώματα, 26% σε μεσαία μελανώματα και 49% σε μεγάλα μελανώματα με 10 χρόνια follow-up. Στη μελέτη COMS, τα επίπεδα των μεταστάσεων σε 5 και 10 χρόνια στα χοριοειδικά μελανώματα ήταν 25% και 34% αντίστοιχα ανεξαρτήτως μεγέθους όγκου. Η εξέταση σχέσης μεταξύ ηλικίας και μετάστασης αποκάλυψε συστηματικές μεταστάσεις σε 10 χρόνια στο 10% των ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα στην ηλικιακή ομάδα 11-20 χρονών, 21% σε ασθενείς ηλικιακής ομάδας 41-50 χρονών και 30% σε ασθενείς ηλικιακής ομάδας 71-80 χρονών. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη πως τα ποσοστά των συστηματικών μεταστάσεων αυξάνουν με την αύξηση της ηλικίας στο ραγοειδικό μελάνωμα. Οι συστηματικές μεταστάσεις ανευρίσκονται πιο συχνά στο ήπαρ (93%), στους πνεύμονες (24%) και στα οστά (16%). Μετά την δημιουργία μεταστάσεων, ο χρόνος επιβίωσης εξαρτάται από την τοποθεσία της μετάστασης. Ασθενείς με μεταστάσεις στο ήπαρ επιβιώνουν κατά μέσο όρο 4-6 μήνες, ενώ 1 χρόνο

επιβίωση έχει το 10-15%. Αναφερόμενος χρόνος επιβίωσης για ασθενείς με άλλες μεταστάσεις είναι 19-28 μήνες^{61,62}.

2.1.8. Πρόγνωση του Ραγοειδικού Μελανώματος

Παρόλο που το μέγεθος του όγκου θεωρείται ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την πρόγνωση, η σημασία των ιστοπαθολογικών παραγόντων και πρόσφατα των γενετικών παραγόντων έχουν λάβει σημαντικής αναγνώρισης.

➤ Γενετικοί Δείκτες - Κυτταρογενετική και Μοριακή Κυτταρογενετική

Παρά την πρόοδο που έχει γίνει στη διάγνωση και στη θεραπεία, το ραγοειδικό μελάνωμα συνεχίζει να αποτελεί μία απειλητική για τη ζωή κακοήθεια, ενώ συστηματικές μεταστάσεις έχουν ανευρεθεί σε περίπου μισούς ασθενείς κατά τη διάρκεια μιας μακροχρόνιας παρακολούθησης. Μελέτες των τελευταίων 20 ετών έχουν επικεντρωθεί στις μεταλλαγές και στην μοριακή βάση αυτών, οι οποίες ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση αλλά και στον σχηματισμό των συστηματικών μεταστάσεων. Γενετικές αλλαγές, οι οποίες επισυμβαίνουν στο ραγοειδικό μελάνωμα μελετώνται χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως η καρυοτύπιση, γενετικοί πολυμορφισμοί (SNP), φθορίζον in situ υβριδισμός, ανάλυση μικροδορυφορικού DNA και συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση στο επίπεδο του DNA και προφίλ γενετικής έκφρασης (GEP) στο επίπεδο του RNA⁶³.

Η πρώτη χρωμοσωμική μεταλλαγή, η οποία σχετίστηκε με χαμηλή πρόγνωση για το ραγοειδικό μελάνωμα ήταν η μονοσωμία του χρωμοσώματος 3. Σε επακόλουθες μελέτες, αυτή η χρωμοσωμική μεταλλαγή βρέθηκε να σχετίζεται συγκεκριμένα με το μελάνωμα επιθηλιακού τύπου, με παρουσία μικροαγγειακών αγκυλών, με βασική διάμετρο όγκου, εμπλοκή ακτινωτού σώματος και θάνατο προκαλούμενο από μεταστάσεις. Η απώλεια του χρωμοσώματος 3 συνήθως συνδυάζεται με αύξηση στο χρωμόσωμα 8 (8q). Η αύξηση στο χρωμόσωμα 8q ειδικά μαζί με τη μονοσωμία 3, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο μετάστασης. Σε μια μελέτη που περιέλαβε 452 ασθενείς με χοριοειδικό μελάνωμα, οι Damato et al. σύγκριναν ασθενείς με δισωμία 3, μονοσωμία 3, και ταυτοχρόνως μονοσωμία 3 και 8q αύξηση, όπου παρατηρήθηκε η 10-ετής θνητότητα σχετιζόμενη με το μελάνωμα, η οποία ήταν 0%, 55%, 71% στα 3 γκρουπ αντίστοιχα⁶⁴.

Άλλες γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες έχουν περιγραφεί περιλαμβάνουν απώλεια του χρωμοσώματος 1p και προσθήκες στο χρωμόσωμα 6q και 8p. Ασθενείς χωρίς αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 3, συνήθως επιδεικνύουν προσθήκες στο χρωμόσωμα 6p, και αυτά τα ευρήματα σχετίζονται με καλή πρόγνωση^{65,66}.

➤ Γενετικοί Δείκτες - Μοριακή Γενετική

Σε μελέτες GEP στο επίπεδο του RNA, αξιολογώντας την έκφραση του mRNA πολλών γονιδίων, το ραγοειδικό μελάνωμα θα μπορούσε να διαχωριστεί σε 2 ομάδες : ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο μετάστασης (Κατηγορία 1) και ασθενείς με υψηλό κίνδυνο μετάστασης (Κατηγορία 2). Αυτή η κατηγοριοποίηση προτάθηκε από τον Onken et al.⁶⁷, ο οποίος διαπίστωσε πως η 8-ετή επιβίωση ανερχόταν σε ποσοστό 95% για την Κατηγορία 1 και σε 31% για την Κατηγορία 2. Αργότερα μετέφεραν την GEP τεχνική σε μια τεχνική αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναλύοντας την έκφραση του mRNA 12 σχετιζόμενων γονιδίων και 2 γονιδίων ελέγχου με σκοπό να δημιουργήσουν

μια πιο τυποποιημένη δοκιμασία. Οι Trolet et al.⁶⁸, εφάρμοσαν μια ακολουθία βασιζόμενη στην συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση 86 ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα και 66 ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις. Από αυτή την προσπάθεια, ένα από τα σημαντικότερα τους ευρήματα ήταν ότι βρέθηκαν ηπατικές μεταστάσεις σε ποσοστό 14% των ασθενών που ανήκαν στην Κατηγορία 1.

Μια ποικιλία βημάτων, όπως η καταστολή του όγκου, η μεταγωγή σημάτων διαμεσολαβούμενων από G - πρωτεΐνες, η έκφραση μορίων προσκόλλησης και η αντίδραση ρετινοϊκού οξέος έχουν μελετηθεί με σκοπό να διασαφηνιστούν οι μοριακές οδοί που εμπλέκονται στο ραγοειδικό μελάνωμα. Παρόλο που λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων είναι οικογενείς, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτοί οι ασθενείς μεταφέρουν πολλές μεταλλάξεις, κυρίως την μεταλλαγή BAP1, και έχουν προτείνει ότι αυτές είναι πιθανά υπεύθυνες για την μετάδοση σε οικογένειες.

Η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού παίζει ρόλο στην ανάπτυξη πολλών καρκίνων, ειδικά μελανοκυτταρικών νεοπλασμάτων. Αυτή η οδός μπορεί να ενεργοποιηθεί με πολλούς τρόπους μέσω RAS και B-RAF γονιδιακών μεταλλαγών που είναι συνήθεις στο δερματικό μελάνωμα. Παρόλο που η ενεργοποίηση μέσω MAPK έχει παρατηρηθεί στο ραγοειδικό μελάνωμα, οι μεταλλάξεις στο RAS και στο B-RAF είναι σπάνιες. Ορισμένες μελέτες αποδίδουν αυτούς τους περιορισμούς στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται και ισχυρίζονται ότι έχουν ανιχνεύσει B-RAF μεταλλάξεις και στο ραγοειδικό μελάνωμα.

Οι συζευγμένοι με G - πρωτεΐνες υποδοχείς, περιέχουν πολλές α-υπομονάδες. Μια από αυτές ονομάζεται G_q ή G_{q/11} και κωδικοποιείται από τα GNAQ και GNA11 γονίδια. Οι Daniels et al.⁶⁹, βρήκαν ότι το 91% των ασθενών με μεγάλα μελανώματα είχαν μεταλλάξεις στο GNAQ (47%) ή στο GNA11 (44%), ενώ οι Van Raamsdonk et al.⁷⁰, ανίχνευσαν GNAQ μεταλλάξεις σε ασθενείς με σπίλο του Ota και ραγοειδικό μελάνωμα. Σωματικές μεταλλάξεις στο MEK μονοπάτι των GNAQ ή GNA11 γονιδίων, στην φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη 3-κινάση/πρωτεϊνική κινάση B, στην πρωτεϊνική κινάση C και στο YAP μονοπάτι οδήγησαν σε έναν αυξανόμενο αριθμό κλινικών δοκιμών που στοχεύουν σε αυτές τις οδούς για ασθενείς με μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα. Αυτές οι ογκογόνες μεταλλάξεις έχουν αναδειχθεί στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης όπως στον καλοήγη ραγοειδικό σπίλο και δεν συσχετίζονται με τη Κατηγορία 1 ή 2 ή με την ύπαρξη μεταστάσεων. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό επιβίωσης ασθενών με μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα ήταν βελτιωμένο σε ασθενείς που λάμβαναν selumetinib, αναστολέα του μονοπατιού MEK συγκριτικά με αυτούς που λάμβαναν temozolomide.

Το BAP 1 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p21, κωδικοποιεί ένζυμο το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στα ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταστολή του όγκου ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζει την δραστηριότητα μερικών πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί ότι η BAP1 μεταλλαγή εμφανίζεται σε όψιμα στάδια ογκογένεσης προκαλώντας αλλαγές στον φαινότυπο ενώ σχετίζεται με μεταστατική συμπεριφορά των Κατηγορίας 2 γενετικών δομών σε ποσοστό 84% των ασθενών.

2.1.9. Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Η θεραπεία του ραγοειδικού μελανώματος ξεκινά από την στιγμή της διάγνωσης και δεν περιορίζεται στον ενδοφθάλμιο όγκο μόνο. Η διαχείριση του ραγοειδικού μελανώματος επίσης περιλαμβάνει την αξιολόγηση των προγνωστικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη την τρέχουσα περίοδο και όταν είναι απαραίτητο τον σχεδιασμό μεταβαλλόμενων θεραπειών στοχεύοντας στη συστηματική νόσο. Η μεταθεραπευτική παρακολούθηση, ο έλεγχος υποτροπής καθώς και οι πιθανές παρενέργειες, η εξέλιξη της οπτικής λειτουργίας, η οπτική αποκατάσταση χρησιμοποιώντας κατάλληλες θεραπευτικές επιλογές, ο συστηματικός έλεγχος ρουτίνας για την αξιολόγηση του κινδύνου μετάστασης και η ψυχιατρική αξιολόγηση είναι επιβεβλημένα. Αγνοώντας κάποιο από τα παραπάνω βήματα μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη θεραπεία το οποίο στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσει σε θνητότητα παρά στην επιτυχή θεραπεία του όγκου.

Η τρέχουσα αποδεκτή και κλινικά εφαρμοζόμενη κατανόηση της διαχείρισης των όγκων ξεκινά με μια σωστή αξιολόγηση των προγνωστικών παραγόντων, ύστερα από την οποία επιλέγεται η θεραπεία ώστε να ελεγχθεί ο όγκος και να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση στους υγιείς ιστούς. Η διαδικασία της επιλογής για το ποια θεραπεία είναι κατάλληλη λαμβάνει υπόψη το μέγεθος του όγκου, τη θέση και την επέκταση καθώς επίσης και τις επιλογές και προσδοκίες του ασθενούς.

Η τελική πρόγνωση θα μπορούσε να αξιολογηθεί ως ένας συνδυασμός της πρόγνωσης που λαμβάνει υπόψη γενετικούς παράγοντες και της οφθαλμικής καθώς και συστηματικής πρόγνωσης σύμφωνα με τις θεραπευτικές επιλογές που εφαρμόστηκαν. Οι δυο κύριες θεραπευτικές επιλογές του ραγοειδικού μελανώματος χωρίς συστηματικές μεταστάσεις είναι αυτές της διατήρησης του οφθαλμού και αυτές της εξόρυξης. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι παρόλη την ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων και την αυξανόμενη τάση διατήρησης του οφθαλμού, τα τελευταία 30 χρόνια οι ρυθμοί επιβίωσης παρέμειναν ίδιοι. Αυτό δείχνει πιθανόν ότι η επιτυχής τοπική θεραπεία δεν επηρεάζει την επιβίωση. Παρόλα αυτά η αναγνώριση ασθενών με αυξημένο κίνδυνο μετάστασης και η καθοδήγηση τους σε μεταβαλλόμενες θεραπείες σε αντίθεση με την τοπική θεραπεία είναι κρίσιμη³⁴.

➤ **Θεραπεία πρωτοπαθούς όγκου**

Μέχρι σήμερα, η παραδοσιακή προσέγγιση όταν ερχόμαστε αντιμέτωποι με ένα μικρό μελαγχρωστικό χοριοειδικό όγκο είναι να παρατηρούμε την περιοχή μέχρι τα ευρήματα στην έγχρωμη φωτογραφία βυθού να υποδείξουν αύξηση του. Πρέπει όμως κάθε όγκος να θεραπεύεται;

Παρόλο που είναι αδύνατον να ξέρουμε πότε ένας όγκος θα γίνει μεταστατικός πριν φτάσει ένα μέγεθος που να απαιτεί θεραπεία, η καθυστέρηση της θεραπείας μπορεί να οδηγήσει σε μεταστατική διασπορά. Από την άλλη πλευρά, αν λάβουμε υπόψη ότι το 30 - 40 % των μικρών μελανωμάτων βρίσκονται σε γεινίαση με τον οπτικό δίσκο και την ωχρά, θεραπεύοντας πιθανά όλους τους ύποπτους χοριοειδικούς όγκους θα είχε ως αποτέλεσμα την ανεπιθύμητη οφθαλμική καταστροφή και απώλεια όρασης⁷¹.

Επομένως, οι μικροί όγκοι θα πρέπει να αξιολογούνται, βάσει παραγόντων που έχουν αναγνωριστεί από την βιβλιογραφία, οι οποίοι προβλέπουν κακοήγη μεταλλαγή και αποφάσεις θα πρέπει να λαμβάνονται έπειτα από την πλήρη ενημέρωση των ασθενών για τα οφέλη και τους κινδύνους που σχετίζονται με τη θεραπεία. Αντί της απλής παρακολούθησης, η σύγχρονη γνώμη είναι υπέρ του να

ξεκινήσει η θεραπεία όταν οι παράγοντες κινδύνου είναι παρόντες, με την παρακολούθηση σε τακτικά διαστήματα να είναι ακόμη αποδεκτή στη μειοψηφία των περιπτώσεων.

Στη μελέτη COMS, όγκοι με πάχος μικρότερο από 3 mm και βασική διάμετρο έως 16mm έχουν κατηγοριοποιηθεί ως μικρά μελανώματα και 204 περιπτώσεις τέτοιων χοριοειδικών μελανωμάτων έχουν κατηγοριοποιηθεί στο σκέλος των μικρών μελανωμάτων σε αυτή τη μελέτη. Κατά την παρακολούθηση, το 21% αυτών των ασθενών χρειάστηκαν θεραπεία στα 2 χρόνια, το 33% στα 5 χρόνια και το 38% στα 7 χρόνια. Η θνητότητα σχετιζόμενη με το μελάνωμα ήταν 1 % στα 5 χρόνια και 3.7 % στα 8 χρόνια. Στην κατηγορία αυτή η εξόρυξη και η τοπική θεραπεία του όγκου με βραχυθεραπεία είναι ακόμα αμφιλεγόμενες, εξαιτίας της επίπτωσης στην οπτική οξύτητα αλλά και του χαμηλού ποσοστού της θνητότητας σχετιζόμενης με το μελάνωμα^{72,73}.

➤ **Θεραπείες διατήρησης του οφθαλμού**

▪ **Φωτοπηξία**

Η φωτοπηξία χρησιμοποιούταν συχνά στο παρελθόν για να θεραπεύσει μικρά χοριοειδικά μελανώματα, πρώτα με Ξένο και αργότερα με Laser Αργού. Παρά τον καλύτερο έλεγχο του όγκου με φωτοπηξία μέσω Ξένου, το Αργό έχει λιγότερες επιπλοκές. Στις μέρες μας, όγκοι μικρότεροι από 3 mm ύψος και εντοπιζόμενοι περισσότερο από 3 mm από την ωχρά θεραπεύονται με διακορική θερμοθεραπεία (TTT)^{74,75}.

▪ **Διακορική Θερμοθεραπεία – Transpupillary Thermotherapy - TTT**

Πρόκειται για μια μέθοδο που βασίζεται σε δυοδικό laser και χρησιμοποιούταν για να θεραπεύσει μικρά και μεσαίου μεγέθους μελανώματα (ύψος λιγότερο από 4 mm). Στη μετα-ανάλυση τους οι Singh et al., υπολόγισαν έναν μέσο όρο υποτροπής μετά από πρωτοπαθή TTT σε ασθενείς με μικρά μελανώματα, σε ποσοστό περίπου 17% (8-56%) ενώ παρατήρησαν ότι το 7% αυτών των υποτροπών εμφάνισε και εξωσκληρική επέκταση. Συνοψίζοντας, ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα που αντιμετωπίζονται μόνο με TTT θα πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά, έχοντας στο μυαλό ότι παρόλο που η οπτική πρόγνωση είναι καλή παραμένει υψηλός ο κίνδυνος να εμφανιστεί μεταστατική νόσος μακροπρόθεσμα^{74,75}.

▪ **Ραδιοθεραπεία**

Η ραδιοθεραπεία αποτελεί την τρέχουσα πιο κοινή θεραπεία ειδικότερα για το οπίσθιο ραγοειδικό μελάνωμα. Στην κλινική πράξη, η ραδιοθεραπεία εφαρμόζεται με τη μορφή ραδιενεργού πλάκας, ενός εξωτερικού παλμού ραδιοθεραπείας ή μέσω στερεοτακτικής ραδιοθεραπείας (SRT).

Η βραχυθεραπεία αφορά την άμεση ακτινοβόληση του όγκου μέσω εφαρμογής μιας ραδιενεργούς πηγής (ραδιοϊσότοπο) στην επιφάνεια του όγκου ή εσωτερικά. Υπάρχουν δυο τύποι ραδιενεργών πηγών που χρησιμοποιούνται στη βραχυθεραπεία, ισότοπα που εκπέμπουν ακτίνες - γ ή ακτίνες - X και άλλα που εκπέμπουν β - σωματίια. Από τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα στην οφθαλμολογία ραδιοϊσότοπα είναι το Κοβάλτιο - 60, το Παλλάδιο - 103 και το Ιώδιο - 123 τα οποία είναι γ - πηγές και το Ρουθένιο - 106 (Ru - 106) το οποίο είναι πηγή β - σωματίων. Οι πλάκες Ru - 106 έχουν βρεθεί ότι είναι

αποτελεσματικές για μικρού και μεσαίου μεγέθους όγκους (βασική διάμετρο μέχρι 16 mm και ύψος έως 8 mm) όταν εφαρμόζονται μόνα τους ή σε συνδυασμό με την TTT.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης COMS περιλαμβάνονταν όγκοι 2.5-10 mm ύψος με βασική διάμετρο λιγότερο από 16 mm ενώ ταυτόχρονα συγκρίθηκαν ασθενείς που θεραπεύτηκαν με πλάκες βραχυθεραπείας με Ιώδιο - 125 έναντι της εξόρυξης του οφθαλμού. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες σε ότι αφορά τη 10ετή θνησιμότητα. Η θνησιμότητα σχετιζόμενη με το μελάνωμα στα 5, 10 και 12 χρόνια ήταν 10%, 18% και 21% στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε η βραχυθεραπεία έναντι 11%, 17% και 17% στην ομάδα όπου εφαρμόστηκε η εξόρυξη⁷⁶.

Οι Finger et al., αντιμετώπισαν 400 ασθενείς με ραγοειδικά μελανώματα με Παλλάδιο - 123 και βρήκαν ρυθμούς μετάστασης 6% μετά από 51 μήνες παρακολούθησης. Εκτίμησαν επίσης την 5ετή και 10ετή επιβίωση σε ποσοστό 7.3% και 13.4%. Σε μια άλλη μελέτη που αξιολόγησε τους ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με πλάκες Ru - 106 παρατηρήθηκε τοπική υποτροπή του όγκου σε ποσοστό 3.9% και αναφέρθηκαν ρυθμοί μετάστασης στα 5 και 10 χρόνια σε ποσοστό 30.9% και 68.2% αντίστοιχα. Οι μελέτες που χρησιμοποίησαν πλάκες Ru - 106 έδειξαν ότι η χρήση αυτή του ισοτόπου φέρει αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής σε όγκους με ύψος πάνω από 5 mm. Για ύψος όγκου μεταξύ 5 - 8mm (με βασική διάμετρο < 16mm) οι πλάκες Ru - 106 μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά θα πρέπει να υποστηρίζονται από την εφαρμογή TTT στην κορυφή του όγκου^{77,78}.

▪ **Εξωτερική δέσμη θεραπείας**

Η εξωτερική δέσμη θεραπείας είναι η ακτινοβολία ενός όγκου με φορτισμένα σωμάτια όπως πρωτόνια και δέσμες ιόντων He ή με στερεοτακτικές μεθόδους. Ο τύπος αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντιμετωπίσει όγκους μέχρι 14 mm ύψος και βασική διάμετρο μέχρι 28mm.

▪ **Θεραπεία δέσμης πρωτονίων**

Σε αντίθεση με τη βραχυθεραπεία και την επιμεριζόμενη SRT, η θεραπεία με δέσμες πρωτονίων αποδίδει μια ομοιογενή δόση ακτινοβολίας σε όλο τον όγκο και εξαιτίας του φαινομένου Bragg η ακτινοβολία διαχέεται γρήγορα πέρα από τα όρια του στόχου^{79,80}. Αυτό επιτρέπει την απόδοση μια υψηλής δόσης ακτινοβολίας στον όγκο προστατεύοντας τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Παρόλα αυτά ιστοί στο μονοπάτι της δέσμης όπως αυτή μπαίνει στο σώμα και στοχεύει στον όγκο, επίσης λαμβάνουν μια υψηλή δόση ακτινοβολίας.

Στη θεωρία όλα τα ραγοειδικά μελανώματα θα μπορούσαν να θεραπεύονται με δέσμες πρωτονίων, όμως για τα μεγάλα μελανώματα η οπτική πρόγνωση και τα ποσοστά διατήρησης του οφθαλμού παραμένουν χαμηλά.

Η πρώτη επιλογή της θεραπείας για μεγάλους όγκους, που βρίσκονται στο άνω κροταφικό τεταρτημόριο θα πρέπει να είναι οι ραδιενεργές πλάκες ραδιοθεραπείας με σκοπό να διατηρηθούν οι δακρυϊκοί αδένες. Σε μια σειρά 2400 ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με θεραπεία δεσμών πρωτονίων, οι Desjardins et al.⁸¹ ανέφεραν 5 - ετή και 10 - ετή ποσοστά μετάστασης σε 18.5% και 26.6% αντίστοιχα. Τοπική υποτροπή παρατηρήθηκε σε 4 % των ασθενών στα 5 χρόνια και 5% στα 10 χρόνια με τους περισσότερους να υποτροπιάζουν στα πρώτα 3 χρόνια μετά τη θεραπεία. Μετά από μια περίοδο παρακολούθησης 8 ετών οι επιπλοκές που παρατηρήθηκαν ήταν :

- απώλεια βλεφαρίδων (12 %),
- αποκολλήσεις αμφιβληστροειδούς (8.5 %),

- γλαύκωμα (23.4 %),
- ξηροφθαλμία (6 %),
- ανάγκη για χειρουργείο καταρράκτη (15 %),
- οπτική νευροπάθεια (18 %) και
- ωχροπάθεια (37 %)

Η TTT χρησιμοποιήθηκε ως συμπληρωματική θεραπεία είτε όταν ο όγκος ήταν κοντά στην ωχρά ή προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα νεοαγγειακού γλαυκώματος και υποτροπή δεν παρατηρήθηκε σε αυτούς τους ασθενείς.

▪ **Στερεοτακτική ραδιοθεραπεία (Stereotactic radiotherapy – SRT)**

Η SRT αφορά την ακτινοβολία του όγκου με μια δέσμη φωτονίων. Στην SRT η ακτινοβολία αποδίδεται σε μία μόνο δόση, ενώ κατά την επιμεριζόμενη SRT η συνολική δόση αποδίδεται σε μικρότερες ισοδύναμες δόσεις. Το πλεονέκτημα της θεραπείας με την SRT είναι ότι δεν απαιτείται καμία χειρουργική διαδικασία για να οριστεί η τοποθεσία του όγκου, με τα σύνορα του όγκου να οριοθετούνται μέσω MRI και CT.

Παρόλο που η θεραπεία μέσω δεσμών πρωτονίων (θεραπεία φορτισμένων σωματιδίων) είναι θεωρητικά ανώτερη στο θέμα διατήρησης υγιούς ιστού από τις επιδράσεις της ακτινοβολίας, η στερεοτακτική ραδιοχειρουργική ίσως να πλεονεκτεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις αφού δεν απαιτεί προχειρουργική επεμβατική σήμανση και είναι λιγότερο κοστοβόρα^{83,84}. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται στην στερεοτακτική ακτινοβολία δεσμών φωτονίου είναι το Gamma Knife, ο γραμμικός επιταχυντής και το CyberKnife. Η οφθαλμική ακινητοποίηση απαιτείται και για τις δυο στερεοτακτικές ραδιοχειρουργικές και SRT τεχνικές. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με οπισθοβόλβια αναισθησία ή ακινητοποίηση μέσω εξαρτήματος υποβοήθησης κενού στο Gamma Knife καθώς και χρήση καμερών για την παρατήρηση των οφθαλμικών κινήσεων στον γραμμικό επιταχυντή⁸².

▪ **Gamma Knife**

Πρώτο - χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία εγκεφαλικών όγκων και από τότε έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ραγοειδικών μελανωμάτων με επιτυχή αποτελέσματα. Παρόλα αυτά δεν είναι η προτιμώμενη θεραπεία εξαιτίας των υψηλών καταγεγραμμένων ποσοστών αμφιβληστροειδοπάθειας εξ ακτινοβολίας και νεοαγγειακού γλαυκώματος (8.6 – 64 %). Το κύριο πρόβλημα με αυτή την τεχνική είναι η οφθαλμική προσήλωση^{85,86}. Οι Zehetmayer et al.⁸⁷, χρησιμοποίησαν το Gamma Knife για να θεραπεύσουν 62 ασθενείς με μελανώματα που ήταν ακατάλληλοι για βραχυθεραπεία με πλάκες Ru – 106 και ανέφεραν υψηλότερη νοσηρότητα σε όγκους μεγαλύτερους από 8 mm ενώ η δόση των 10 Gy/τομέα αποτέλεσε υψηλού κινδύνου παράγοντα για φλεγμονή επαγόμενη από την ακτινοβολία.

▪ **CyberKnife**

Επίσης πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε στην χειρουργική του εγκεφάλου και τώρα χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει το ραγοειδικό μελάνωμα. Οι Zorlu et al.⁸⁸, το χρησιμοποίησαν για να θεραπεύσουν 5 ασθενείς οι οποίοι δεν ήταν επιλέξιμοι για πλάκες βραχυθεραπείας ή τοπική εκτομή και παρατήρησαν ότι οι 3 ασθενείς εμφάνισαν μείωση του μεγέθους του όγκου στο 8 - μηννο διάστημα παρακολούθησης.

Στο ίδιο κέντρο, 163 ασθενείς με ραγοειδικά μελανώματα αντιμετωπίστηκαν με CyberKnife και κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου παρακολούθησης, η οποία ήταν κατά μέσο όρο 24.2 μήνες (εύρος 2-79 μήνες), ο τοπικός έλεγχος είχε επιτευχθεί στο 74% των ασθενών ενώ εξέλιξη παρατηρήθηκε στο 17.2 %.

▪ **Γραμμικός επιταχυντής**

Ο γραμμικός επιταχυντής χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει το ραγοειδικό μελάνωμα μέσω στερεοτακτικής υποτμηματικής ραδιοθεραπείας. Τα πλεονεκτήματα αυτής της εφαρμογής είναι η λιγότερη έκθεση σε ακτινοβολία για τους υγιείς ιστούς παρακείμενους στον όγκο και η αποφυγή των μακράς διάρκειας ανεπιθύμητων παρενεργειών. Μη επεμβατικά συστήματα προσήλωσης σχεδιάστηκαν για χρήση σε γραμμικούς επιταχυντές αυξάνοντας την άνεση του ασθενούς και τη συμμόρφωση με την θεραπεία⁸⁹.

➤ **Επιπλοκές της ραδιοθεραπείας**

▪ **Αμφιβληστροειδοπάθεια εξ' ακτινοβολίας**

Πρόκειται για χρόνια, εξελισσόμενη αγγειοπάθεια των αμφιβληστροειδικών τριχοειδών ως αποτέλεσμα της βλάβης που επάγεται από την ραδιοθεραπεία στο αγγειακό ενδοθήλιο. Αυτή η βλάβη προκαλεί διάταση των τριχοειδών, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, θρόμβωση, αμφιβληστροειδικά εξιδρώματα και αιμορραγία που τελικά οδηγούν σε ολικού πάχους αμφιβληστροειδική ατροφία. Μη τριχοειδική διάχυση είναι ένα στοιχείο στην FFA και αποτελεί το gold standard στη διάγνωση της αμφιβληστροειδοπάθειας εξ ακτινοβολίας.

Η αμφιβληστροειδοπάθεια εξ ακτινοβολίας παρατηρείται στο 42% των ασθενών 5 χρόνια μετά την βραχυθεραπεία και συνήθως εμφανίζεται στα πρώτα 2 χρόνια μετά την θεραπεία. Το πρώτο σύμπτωμα μπορεί να είναι μια μείωση της οπτικής οξύτητας εξαιτίας υποκλινικού οιδήματος της ωχράς ενώ στην πραγματικότητα η ανίχνευση οιδήματος της ωχράς στο OCT είναι ένας δείκτης ότι η ωχροπάθεια εξ ακτινοβολίας θα αναπτυχθεί σε κατά μέσο όρο 5 μήνες αργότερα. Η αμφιβληστροπάθεια εξαρτάται από την ολική δόση της ραδιοθεραπείας που έλαβε η περιοχή του αμφιβληστροειδούς που ακτινοβολήθηκε. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αμφιβληστροειδοπάθεια επέρχεται σπανιότερα με δόσεις ακτινοβολίας <35 Gy ενώ εμφανίζεται στους μισούς ασθενείς που έχουν λάβει 65 Gy ή περισσότερα. Ισχαιμική αμφιβληστροειδοπάθεια μπορεί επίσης να εξελιχθεί σε παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια η οποία παρατηρείται σε περίπου 2.5 έτη μετά την ραδιοθεραπεία ενώ επίσης αιμορραγίες του υαλοειδούς μπορούν να αναπτυχθούν στο 15.1 % των ασθενών 5 χρόνια μετά τη θεραπεία. Οι Guyer et al.⁹⁰, παρατήρησαν ότι η επίπτωση της ωχροπάθειας εξ ακτινοβολίας μετά από ραδιοθεραπεία με δέσμη πρωτονίων ανέρχεται σε ποσοστό 90%.

Θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν την παναμφιβληστροειδική ή εστιακή laser φωτοπηξία, την φωτοδυναμική θεραπεία, τις ενδοϋαλοειδικές ή παραβόλβιες εγχύσεις τριαμσινολόνης, την από του στόματος χορήγηση πεντοξυφυλλίνης, το υπερβαρικό οξυγόνο, την χορήγηση ενδοϋαλοειδικών αντι-αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (anti – VEGF) και την ενδοϋαλοειδική εφαρμογή σιλκόνης πριν από την βραχυθεραπεία. Οι Missotten et al.⁹¹, έδειξαν πως τα επίπεδα των VEGF-A είναι υψηλότερα στο υδατοειδές υγρό σε ασθενείς με θεραπευμένο και μη θεραπευμένο ραγοειδικό μελάνωμα. Λαμβάνοντας υπόψη πως τα επίπεδα των VEGF είναι υψηλότερα σε ασθενείς με ραγοειδικό

μελάνωμα και ακόμη πιο αυξημένα στην αμφιβληστροειδοπάθεια εξ ακτινοβολίας, οι Shah et al.⁹², χορήγησαν bevacizumab (Avastin) για 2 χρόνια σε 292 από τους 392 ασθενείς που θεραπεύτηκαν με πλάκα ραδιοθεραπείας ενώ οι υπόλοιποι 126 ασθενείς παρακολούθηθηκαν χωρίς περαιτέρω θεραπεία. Παρατήρησαν ότι τα χαμηλότερα ποσοστά ωχρικού οιδήματος στο OCT και αμφιβληστροειδοπάθειας εξ ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης ανευρίσκονταν στους ασθενείς που θεραπεύτηκαν με bevacizumab (Avastin).

▪ **Οπτική Νευροπάθεια επαγόμενη από την ακτινοβολία**

Η οπτική νευροπάθεια επαγόμενη από την ακτινοβολία τυπικά προκαλεί απότομη, επώδυνη, μονόπλευρη απώλεια όρασης που ξεκινά από 3 μήνες έως και 8 χρόνια από την έκθεση στην ακτινοβολία. Από την στιγμή που η παθογένεση της βλάβης του οπτικού νεύρου δεν είναι πλήρως κατανοητή η επάγουσα από την ακτινοβολία οπτική νευροπάθεια θεωρείται ότι οφείλεται από την ακτινονέκρωση του οπτικού νεύρου και του χιάσματος. Αυτοί οι ασθενείς κλινικά παρουσιάζουν οίδημα οπτικού δίσκου, με συσσώρευση λιπιδίων και αιμορραγιών, ενώ αργότερα παρατηρείται οπτική ατροφία με αγγεία φαντάσματα (ghost – vessels). Η συστηματική και ενδοϋαλοειδική χορήγηση κορτικοστεροειδών, η θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο, αντιπηκτικών και ενδοϋαλοειδικών anti-VEGF παραγόντων έχουν χρησιμοποιηθεί στη διαχείριση. Οι Finger και Chin⁹³ αντιμετώπισαν 14 ασθενείς με χοριοειδικό μελάνωμα οι οποίοι ανέπτυξαν οπτική νευροπάθεια εξ ακτινοβολίας μετά από ραδιοθεραπεία με πλάκα, με ενδοϋαλοειδικές anti-VEGF εγχύσεις (το λιγότερο 2 εγχύσεις με μεσοδιάστημα 6-8 εβδομάδων) και παρατήρησαν υποστροφή του οιδήματος του οπτικού δίσκου και βελτίωση της αιμορραγίας της θηλής⁹³.

➤ **Χειρουργείο**

▪ **Εξόρυξη, εξεντέρωση, τοπική εκτομή**

Παρόλο που η εξόρυξη ήταν η πιο συχνή θεραπευτική επιλογή στο παρελθόν, τώρα τελευταία χρησιμοποιείται μόνο για περιπτώσεις με τη χειρότερη οπτική πρόγνωση όπως σε ασθενείς με μεγάλα ραγοειδικά μελανώματα (ύψος όγκου >8 mm), σε χοριοειδικά μελανώματα που περιβάλλουν το οπτικό νεύρο, ή παρουσία σοβαρών αιμορραγιών, αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς ή υαλοειδικής αιμορραγίας.

Δεν υπάρχει συναίνεση όσον αφορά το μέγιστο ύψος όγκου το οποίο θα μπορούσε να θεραπευτεί με ραδιοθεραπεία. Εάν η μελέτη COMS είναι αποδεκτή ως οδηγός, η εφαρμογή της πλάκας θα πρέπει να επεκτείνεται των ορίων του όγκου κατά 2 mm. Στην πράξη, η επισκληρική εφαρμογή πλάκας πάνω από 25 mm δεν είναι δυνατή, περιορίζοντας τη χρήση των πλακών ραδιοθεραπείας σε όγκους με μέγιστη βασική διάμετρο τα 21 mm. Μόνο τα μεσαίου μεγέθους μελανώματα θεραπεύονται με πλάκες ραδιοθεραπείας στην μελέτη COMS. Για μεγαλύτερα μελανώματα, η εξόρυξη από μόνη της ή σε συνδυασμό με προεγχειρητική εξωτερική ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται. Δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην δεκαετή επιβίωση ανάμεσα στην ομάδα ασθενών η οποία έλαβε προεγχειρητική ακτινοθεραπεία και στην ομάδα που δεν έλαβε. Οι μελέτες στις οποίες μεγάλοι όγκοι (βασική διάμετρος >16mm και ύψος >8mm) θεραπεύτηκαν με πλάκες ακτινοθεραπείας είχαν πτωχή οπτική πρόγνωση ακόμη και όταν το μάτι διατηρήθηκε^{94,95}.

Σε όρους επιβίωσης, πολλές μελέτες έχουν δείξει μη σημαντική διαφορά στην θνησιμότητα μεταξύ θεραπειών που διατηρούν τον οφθαλμό και χειρουργικών τεχνικών. Η σύγκριση της μελέτης COMS

των ασθενών με μεσαία μελανώματα που αντιμετωπίστηκαν με πλάκα βραχυθεραπείας και αυτών στους οποίους πραγματοποιήθηκε εξόρυξη έδειξε μη σημαντική διαφορά όσον αφορά την μακρόχρονη επιβίωση. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια οι θεραπείες διατήρησης του οφθαλμού έχουν κερδίσει έδαφος έναντι της εξόρυξης του οφθαλμού.

Η τοπική εκτομή είναι μια εναλλακτική θεραπεία επιλογής για το χοριοειδικό μελάνωμα ασθενών η οποία διατηρεί το μάτι και περισσότερο επιτρέπει μια λεπτομερή ιστοπαθολογική και κυτταρογενετική ανάλυση. Η διαδικασία προτιμάται περισσότερο σε περιπτώσεις μελανώματος της ίριδας και του ακτινωτού σώματος. Η ιριδεκτομή αποτελεί πλέον την πρώτη επιλογή για τους όγκους της ίριδας και ενδείκνυται σε όγκους που καλύπτουν μέχρι το 1/3 της ίριδας αλλά δεν επεκτείνονται στη γωνία. Παρόλα αυτά η θεραπεία με δέσμη πρωτονίων ίσως να είναι προτιμητέα της ιριδεκτομής με σκοπό να αποφευχθεί ένα χειρουργικό κολόβωμα. Η ιριδοκυκλοτομή ενδείκνυται για όγκους που εμπλέκουν τη γωνία ή το ακτινωτό σώμα ενώ η χοριοειδεκτομή επιτελείται από πολύ μικρό αριθμό χειρουργών εξαιτίας των τεχνικών προκλήσεων.

Οι όγκοι μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά δια - αμφιβληστροειδικά (ενδοεκτομή) ή διασκληρικά (εξωεκτομή). Οι πλάκες ραδιοθεραπείας προτιμώνται ως συμπληρωματικές της εξωεκτομής για προστασία της υποτροπής του όγκου. Ακόμη η προληπτική εφαρμογή πλάκας ραδιοθεραπείας πριν την ενδοεκτομή είναι ακόμη αμφιλεγόμενη. Κύριες επιπλοκές όπως η ενδοαμφιβληστροειδική αποκόλληση και η υαλοειδική αιμορραγία έχουν επίσης παρατηρηθεί και στις 2 τεχνικές. Εντόπιση του όγκου σε απόσταση μιας θηλαίας διαμέτρου από τον οπτικό δίσκο έχει παρατηρηθεί ως ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για σοβαρή απώλεια όρασης ακολουθούμενη της τοπικής εκτομής.

Η εξωεκτομή συστήνεται σε περιπτώσεις συνδρόμου τοξικού όγκου, μια κατάσταση στην οποία ο ακτινοβολημένος όγκος γίνεται ισχαιμικός και εξιδρωματικός έχοντας ως αποτέλεσμα το οίδημα ωχράς, την εξίδρωση, την ορώδη αποκόλληση αμφιβληστροειδούς, την ραγοειδίτιδα, την νεοαγγείωση της ίριδας ή το νεοαγγειακό γλαύκωμα⁹⁶.

➤ Συστηματική αξιολόγηση

Δεν υπάρχει ένας απόλυτος κλινικός οδηγός ή ένα σύμφωνο με το οποίο θα επιτελούνται προληπτικά τεστ για συστηματικές μεταστάσεις σε ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα. Επιμέρους κλινικές εξετάσεις για την παρουσία υποδόριων οζιδίων και οργανομεγαλίας είναι επιτακτικές ενώ η αξιολόγηση της ηπατικής λειτουργίας μέσω δοκιμασιών περιλαμβάνει έλεγχο ηπατικών ενζύμων και επίπεδα χολερυθρίνης. Εξαιτίας της χαμηλότερης ευαισθησίας και ειδικότητας που εμφανίζουν οι δοκιμασίες μη φυσιολογικής λειτουργίας του ήπατος, συγκρινόμενες με την απεικονιστική διερεύνηση αυτές οι εξετάσεις θα πρέπει να διενεργούνται συμπληρωματικά. Οι μεταστάσεις που είναι μη ανιχνεύσιμες με τις δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας ίσως να είναι παρούσες στον υπέρηχο. Σε αντίθεση η MRI είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την απεικόνιση του ήπατος, η CT έχει υψηλή ευαισθησία αλλά η δυνατότητά της να διαφοροδιακρίνει τις καλοήθεις αλλοιώσεις είναι αδύναμη.

Όπως στο να επιλέξουμε την θεραπεία είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η εξατομικευμένη φροντίδα του κάθε ασθενούς, συνυπολογίζοντας το ρίσκο για αυτόν μετά τη διάγνωση του ραγοειδικού μελανώματος, οι κλινικοί και ιστοπαθολογικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωρίσουν τους ασθενείς σε κατηγορίες γενικού κινδύνου αλλά δεν είναι αρκετά ακριβείς για να χρησιμοποιηθούν για την εξατομικευμένη φροντίδα του ασθενούς. Περαιτέρω χρωμοσωμικές αλλαγές περιλαμβάνοντας απώλεια στο χρωμόσωμα 1p, απώλεια στο χρωμόσωμα 3, προσθήκη στο χρωμόσωμα

8q και 6p ίσως να μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κλινική πρόγνωση αλλά έχει αποδειχθεί ότι χρειάζεται να συνδυαστούν μαζί οι κλινικοί και ιστοπαθολογικοί παράγοντες κινδύνου.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το GEP του ραγοειδικού μελανώματος επιτρέπει την ακριβή κατηγοριοποίηση των πρωτοπαθών όγκων ως χαμηλού μεταστατικού κινδύνου (Κατηγορία 1) και υψηλού μεταστατικού κινδύνου (Κατηγορία 2). Τα τεστ γονιδιακής έκφρασης που αναπτύχθηκαν για την κλινική καθημερινότητα, επικυρώθηκαν σε μια προοπτική πολυκεντρική μελέτη η οποία παρατήρησε ότι το GEP τεστ έχει προγνωστική ακρίβεια η οποία είναι ανώτερη της κλινικοπαθολογικής σταδιοποίησης και της μονοσωμίας 3. Οι Field και Harbour⁹⁷ συστήνουν ετήσια απεικόνιση ήπατος για τους ασθενείς κατηγορίας 1A (χαμηλού ρίσκου) βασιζόμενοι στην GEP ανάλυση, αξιολόγηση κάθε 6 μήνες εναλλακτικά ανάμεσα στην απεικόνιση ήπατος και στις δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας για την κατηγορία 1B (μέσου κινδύνου) και αξιολόγηση κάθε 3 μήνες εναλλακτικά με απεικόνιση ήπατος ή ηπατικών λειτουργιών για την κατηγορία 2 (υψηλού κινδύνου).

➤ **Επικουρικές Θεραπείες**

Παρά τις προόδους στη διάγνωση και στη θεραπεία του ραγοειδικού μελανώματος η ολική θνησιμότητα παραμένει υψηλή εξαιτίας της μεταστατικής νόσου. Είναι επομένως εξαιρετικά σημαντικό να ανιχνευθούν οι ασθενείς με υψηλό μεταστατικό ρίσκο και πολλές μελέτες διερευνούν αυτό το πεδίο αυτή την περίοδο.

Από την άλλη μεριά, μελέτες υπολογισμού του ρυθμού αύξησης του όγκου δείχνουν ότι τα ραγοειδικά μελανώματα έχουν κάνει μετάσταση πριν την διάγνωση. Η ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα τη στιγμή της διάγνωσης το υποστηρίζουν περισσότερο. Το μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα είναι ανθεκτικό στην θεραπεία και δεν υπάρχει απόδειξη ότι οι τρέχουσες θεραπείες είναι ικανές να επεκτείνουν την επιβίωση. Η αποτελεσματικότητα της συστηματικής θεραπείας θα μπορούσε να βελτιωθεί με συμπληρωματικές θεραπείες οι οποίες στοχεύουν στις μεταστάσεις αντί των μακρομεταστάσεων. Συμπληρωματικές θεραπείες περιλαμβάνουν την ακτινοθεραπεία και τη συστηματική θεραπεία οι οποίες στοχεύουν κλινικά ανιχνευμένες μακρομεταστάσεις.

Συστηματικές θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν την χημειοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία, την ορμονοθεραπεία, την θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες και την στοχευμένη θεραπεία. Σε αντίθεση με άλλους όγκους, είναι ακόμα λίγες οι μελέτες που αναφέρονται στο ραγοειδικό μελάνωμα. Μη τυχαιοποιημένες μελέτες, μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιήσει δακαρβαζίνη, βακίλλια Calmette - Guerin και συστηματική ιντερφερόνη, αλλά δεν έχουν αναφέρει ακόμη ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα αντιμετωπίστηκαν με συστηματική ιντερφερόνη άλφα - 2α υποδόρια 3 φορές την εβδομάδα για 2 χρόνια αλλά δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στη θνησιμότητα.

Η fotemustine, ένας αλκαλικός κυτταροτοξικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία ασθενών με ηπατικές μεταστάσεις μέσω ενδοφλέβιας χημειοθεραπείας και ενδοαρτηριακής ηπατικής χημειοθεραπείας. Η ενδοαρτηριακή ηπατική εφαρμογή επέφερε καλύτερη ανταπόκριση του όγκου από ότι η συστηματική εφαρμογή αλλά δεν αύξησε την επιβίωση σε βάθος χρόνου. Το MAPK μονοπάτι που ενεργοποιείται από GNAQ μεταλλαγές παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη παθογένεση του ραγοειδικού μελανώματος, παρόλα αυτά ο αναστολέας του MEK selumetinib, δεν βελτίωσε την επιβίωση στο δερματικό μελάνωμα, όμως όταν εφαρμόστηκε σε ασθενείς με ραγοειδικό μελάνωμα με GNAQ μεταλλαγή επέκτεινε την ελεύθερας νόσου επιβίωση. Ο μόνος περιορισμός των

αναστολέων MAPK είναι ότι το φάρμακο είναι αποτελεσματικό για διάστημα 6-10 μήνες και πιστεύεται ότι μπορεί να οδηγήσει σε πιο επιθετικές υποτροπές.

Μελέτες πρόληψης μεταστάσεων και επέκτασης επιβίωσης σε ασθενείς με υψηλού ρίσκου ραγοειδικά μελανώματα βρίσκονται υπό εξέλιξη. Το ipilimumab ακόμα αξιολογείται ως συστηματική συμπληρωματική θεραπεία ακολουθώντας την θεραπεία πρωτοπαθούς όγκου σε ασθενείς Κατηγορίας 2 μέσω RNA ανάλυσης, παρουσίας μονοσωμίας 3 στην ανάλυση DNA, ή σε όγκους πάνω από 8 mm ύψος.

Η επιλογή των ασθενών έχει ολοκληρωθεί για μια κλινική μελέτη αξιολόγησης της θεραπευτικής απάντησης στην δακαρβαζίνη και στην ιντερφερόνη αλφα - 2β σε ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν μονοσωμία 3 ή 8q προσθήκη χωρίς άλλη μετάσταση, αλλά τα αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί. Ομοίως, ο αναστολέας του ογκογονιδίου c-Ros, crizotinib εφαρμόζεται σε ασθενείς Κατηγορίας 2 στη δεύτερη φάση της κλινικής δοκιμής αλλά η εγγραφή των ασθενών βρίσκεται σε εξέλιξη και αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί. Μια κλινική δοκιμή του sunitinib και του βαλπροϊκού οξέος σε ασθενείς με γενετικά υψηλό κίνδυνο μετάστασης βρίσκεται και αυτή σε εξέλιξη⁹⁸.

Τα τελευταία χρόνια, πρωτεομικές μελέτες προσπαθούν να κάνουν διαθέσιμη την πρόιμη ανίχνευση των μεταστάσεων και έχουν αποκτήσει εξέχουσα σημασία. Η osteopontin, το S100, το MIA (melanoma inhibitory activity), οι VEGF και το TPS (ιστικό πολυπεπτιδικό ειδικό αντιγόνο) είναι πρωτεωμικοί δείκτες οι οποίοι αυξάνονται στον ορό ασθενών με μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα. Αυξημένη έκφραση των S100, MCAM, NKI-C3, E-cadherin, c-Met και MIA έχουν αναπτυχθεί στον ιστό των μεταστατικών μελανωμάτων.

Συνοψίζοντας, παρά την εξέλιξη στη διάγνωση του ραγοειδικού μελανώματος και στη θεραπεία της τοπικής νόσου πάνω από το μισό των ασθενών θα αναπτύξουν τελικά θανατηφόρα μεταστατική νόσο. Με την εξέλιξη στην κατανόηση του μοριακού τοπίου του όγκου και της ανάπτυξης θεραπειών που στοχεύουν στα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι παρακάτω μεταλλάξεις – επιγενετικοί μηχανισμοί των GNAQ/GNA11, BAP1, EIF1AX, SF3B1, στο κοντινό μέλλον θα είναι πιθανό να προληφθεί η εξέλιξη των μικρομεταστάσεων⁹⁹.

3.1 Ζωικά Μοντέλα

Τα ζωικά μοντέλα του καρκίνου του ανθρώπου είναι σαφές ότι μπορούν να συμβάλλουν τόσο στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του καρκίνου όσο και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων. Ο απώτερος στόχος είναι να μεταφράσουμε αυτή την επιστημονική πρόοδο από τη βασική έρευνα (in vitro – in vivo) μέσω προκλινικών μελετών σε ζώα, τελικά σε κλινικές μελέτες σε ανθρώπους προκειμένου να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα αλλά και η ασφάλεια των θεραπευτικών μεθόδων που χρησιμοποιούμε.

Η απουσία ενός αποτελεσματικού in vivo συστήματος, το οποίο να μιμείται επιτυχώς την ανθρώπινη νόσο και να προβλέπει με αξιοπιστία την κλινική αποτελεσματικότητα, έχει εμποδίσει την ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων και φαρμακευτικών σκευασμάτων στον κλάδο της ογκολογίας¹⁰⁰.

Παρά τα χαμηλά ποσοστά επιτυχούς μεταφοράς των ζωικών μοντέλων σε κλινικές μελέτες καρκίνου¹⁰², τα in vivo μοντέλα έχουν φέρει επανάσταση καθώς προσφέρουν δυνατότητες μελέτης της βιολογίας του καρκίνου αλλά και καλύτερη κατανόηση των μοριακών και γενετικών μηχανισμών του. Ξενομοσχεύματα καρκίνου και γενετικά τροποποιημένα ποντίκια είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα για κάποιες ογκολογικές οντότητες¹⁰².

Στο μελάνωμα του δέρματος, μοντέλα γενετικών τροποποιημένων ποντικίων χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για τη δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης αντικαρκινικών θεραπειών και ανταπόκρισης του ασθενούς σε αυτές. Παρόμοια μοντέλα διαγονιδιακών ποντικίων έχουν αναπτυχθεί ήδη για πολλές ογκολογικές οντότητες επιτρέποντας την πιο λεπτομερή και πολυδιάστατη μελέτη με σκοπό την βασική έρευνα αλλά και την δοκιμή προκλινικών φαρμάκων.

Παρόλα αυτά, σε ορισμένες καρκινικές νόσους, όπως το ραγοειδικό μελάνωμα θεμελιώδεις προκλήσεις δημιουργίας ενός ζωικού μοντέλου το οποίο να πληροί τα ειδικά χαρακτηριστικά του όγκου, δεν έχουν ακόμη υπερνικηθεί. Ακόμα κι αν είναι διαθέσιμο φρέσκο υλικό όγκου, η δημιουργία κυτταρικών σειρών από ραγοειδικό μελάνωμα παραμένει δύσκολη και συχνά ανεπιτυχής.

Μέχρι στιγμής, υπάρχει περιορισμένος αριθμός μόνιμων κυτταρικών σειρών, ο οποίος χρησιμοποιείται για την έρευνα του ραγοειδικού μελανώματος, ενώ οι περισσότερες εξ' αυτών έχουν δημιουργηθεί πριν από αρκετό καιρό γεγονός που μπορεί να έχει οδηγήσει σε αλλοιώσεις των βιολογικών και γενετικών ιδιοτήτων του όγκου. Επομένως, η ανάγκη για ένα αποτελεσματικό ζωικό μοντέλο ραγοειδικού μελανώματος το οποίο να μιμείται με ακρίβεια διαφορετικά χαρακτηριστικά (μονοσωμία 3, GNAQ/GNA11, BAP1 μεταλλάξεις και αιματογενής εξάπλωση στο ήπαρ) είναι επιτακτική.

Ενδοφθάλμια μελανώματα έχουν σπανίως περιγραφεί σε οικόσιτα ζώα όπως σκύλοι, γάτες και άλλα όπως (άλογα, αγελάδες κ.τ.λ.). Τα μελανώματα αυτά, λόγω του ότι δημιουργούνται αυθόρμητα, σποραδικά και κυρίως δεν δίνουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα, δεν πληρούν τις προϋποθέσεις για χρήση τους ως ζωικό μοντέλο. Επομένως, είναι κοινώς από δεκτό ότι η ιατρογενής πρόκληση καρκινικών μοντέλων αποτελεί την καλύτερη επιλογή για την έρευνα στην ογκολογία. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την εμφύτευση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών ραγοειδικού μελανώματος σε οφθαλμούς ζώων, προκειμένου να προσομοιαστεί η συμπεριφορά του όγκου.

Μέχρι στιγμής υπάρχουν 4 βασικοί τύποι ζωικών μοντέλων που έχουν αναπτυχθεί και περιλαμβάνουν :

- ενδοφθάλμιο ενοφθαλμισμό με κυτταροσειρές δερματικού μελανώματος σε αγρίου τύπου ποντίκια,
- εμφύτευση κυττάρων από ανθρώπινο ραγοειδικό μελάνωμα με συνοδό ανοσοκαταστολή,

- νέες προσεγγίσεις με στόχο την διασταύρωση ή παραγωγή γενετικά τροποποιημένων ποντικών τα οποία αυθόρμητα αναπτύσσουν ενδοφθάλμια μελανώματα και,
- επαγωγή πολλαπλότητας των μελανοκυττάρων με τη χρήση χημικών, ακτινοβολίας ή ιών¹⁰³.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να μελετηθεί το μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα, διαφορετικά μοντέλα ηπατικών μεταστάσεων έχουν αναπτυχθεί. Άλλα χρησιμοποιούμενα ζώα είναι τα έμβρυα όρνιθας, οι μύγες *drosophila*, τα *zebrafish*, οι αρουραίοι και τα κουνέλια.

Καθώς δεν υπάρχει ένα βέλτιστο ζωικό μοντέλο το οποίο να αναπαράγει πιστά την συμπεριφορά της ανθρώπινης νόσου (δηλ. να δημιουργείται αυθόρμητα και ταυτόχρονα να προκαλεί μεταστάσεις), όλα τα μέχρι στιγμής καθιερωμένα ζωικά μοντέλα αντιπροσωπεύουν συμβιβασμούς και αντιμετωπίζουν ορισμένους περιορισμούς¹⁰⁴.

3.1.1. Ενδοφθάλμια ένεση με κύτταρα δερματικού μελανώματος

Τα συγγενετικά μοντέλα είναι χρήσιμα για να μελετήσουμε ή να τροποποιήσουμε ανοσολογικές αποκρίσεις οι οποίες απαιτούν ένα άθικτο ανοσοποιητικό σύστημα.

Το B16 μελάνωμα προέρχεται από ένα αυθόρμητα προκύπτουν μελάνωμα σε ένα C57BL / 6J ποντικό το οποίο στη συνέχεια καθιερώθηκε ως μόνιμη κυτταρική σειρά. Διαφορετικές υποκατηγορίες της B16 κυτταρικής σειράς (F10, LS9, κ.ά.) με διαφορετικά ποσοστά μεταστάσεων και άλλες κυτταροσειρές δερματικού μελανώματος όπως το HCmel12 έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Στο μοντέλο αυτό, σχηματίζεται ένα συμπαγές ενδοφθάλμιο μελάνωμα με χαρακτηριστικές ιδιότητες της ανάπτυξης του όγκου το οποίο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μοντέλο ενδοφθάλμιου μελανώματος. Ακόμη, η υποσειρά B16LS9 αποτελεί τη μοναδική σειρά η οποία οδηγεί σε μεταστάσεις στο ήπαρ. Τα παραπάνω μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ανοσολογικών και αγγειογενετικών πτυχών, καθώς και για την διερεύνηση της εξέλιξης του όγκου και μεθοδολογίας της απεικόνισης.

Εκτός από τα μοντέλα ποντικών, ενοφθαλμισμός με κύτταρα δερματικού μελανώματος έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλα τρωκτικά. Πειράματα έχουν γίνει σε χάμστερ μέσω εμφύτευσης Greene και αργότερα Bomirski κυτταροσειρών (προερχόμενα από κόνικλους) στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού. Τα μοντέλα κόνικλων προσφέρουν το πλεονέκτημα των μεγάλων οφθαλμών, παρέχοντας μια άνετη εξέταση του ενδοφθάλμιου μελανώματος. Το μελάνωμα Green εμφυτεύθηκε στον πρόσθιο ή οπίσθιο θάλαμο καθώς και στο υποχωριοειδικό διάστημα σε κόνικλους, ενώ χρησιμοποιήθηκε κυρίως για την αξιολόγηση των θεραπευτικών επιδράσεων. Παρόλα αυτά, η ραγδαία αύξηση του όγκου και άλλες επιπλοκές απέτρεψαν την περαιτέρω χρησιμοποίηση αυτού του μοντέλου.

Τα πλεονεκτήματα αυτών των συγγενετικών μοντέλων περιλαμβάνουν αρχικά την φαινομενική ομοιότητα του ενδοφθάλμιου δερματικού μελανώματος με το ανθρώπινο ραγοειδικό μελάνωμα και την αξιόπιστη επαναληψιμότητα αυτής της τεχνικής. Το μελάνωμα μέσα σε αυτό το ενδοφθάλμιο μικροπεριβάλλον είναι δυνατόν να μελετηθεί σε άθικτο ανοσολογικά ποντίκι ή άλλον ξενιστή.

Όμως, η εφαρμογή διαφορετικών κυτταρικών σειρών σε διαφορετικές θέσεις ενοφθαλμισμού (πρόσθιος θάλαμος, οπίσθιος θάλαμος, ενδοϋαλοειδικά, υποαμφιβληστροειδικά ή οπισθοκογχικά) περιπλέκει τη σύγκριση των αναφερόμενων αποτελεσμάτων. Το πιο σημαντικό απ' όλα, είναι ότι θα πρέπει να έχουμε πάντοτε κατά νου τις διαφορές ανάμεσα στο δερματικό και το ραγοειδικό μελάνωμα σε γενετικό επίπεδο, στην εξέλιξη της νόσου και των μεταστάσεων, καθιστώντας μας προσεκτικούς στην ερμηνεία των αντίστοιχων ευρημάτων όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας στον άνθρωπο¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

3.1.2. Εμφύτευση κυττάρων ανθρώπινου ραγοειδικού μελανώματος

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ανάπτυξη του ενδοφθάλμιου μελανώματος και διαφόρων θεραπευτικών στρατηγικών, ανθρώπινα ξενομοσχεύματα (ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ραγοειδικού μελανώματος ή τμήματα πρωτοπαθούς όγκου) έχουν εξεταστεί και αρκετά από αυτά τα μοντέλα έχουν περιγραφεί. Μόνιμες κυτταρικές σειρές που αναπτύχθηκαν από ανθρώπινα ραγοειδικά μελανώματα μπορούν να χαρακτηριστούν είτε ιστολογικά ή μέσω ανάλυσης γενετικού προφίλ. Η διαδικασία αυτή προσφέρει την δυνατότητα να διερευνηθούν βιολογικές και φαρμακολογικές πτυχές είτε *in vitro* ή σε ένα ζωικό μοντέλο. Γενικά, τα ξενομοσχεύματα αυτά εμφυτεύονται σε οφθαλμό ανοσοκατεσταλμένου ζώου ή σε ορισμένες περιπτώσεις ενίονται οπισθοβολβικά. Δυστυχώς, σχετικά λίγες μόνιμες κυτταρικές σειρές ραγοειδικού μελανώματος είναι διαθέσιμες για την έρευνα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρξε κάποια εσφαλμένη αναγνώριση αυτών (π.χ. η κυτταροσειρά C918 πιθανά να προέρχεται από κύτταρα δερματικού μελανώματος).

Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί κυτταροσειρές από πρωτοπαθές και μεταστατικό ραγοειδικό μελάνωμα, οι οποίες επιδεικνύουν το χαρακτηριστικό γενετικό προφίλ (μεταλλάξεις σε GNAQ, GNA11 ή BAP1)¹⁰⁹ και επιτρέπουν την περαιτέρω μελέτη των μοριακών μονοπατιών και το πώς αυτά επηρεάζουν την εξέλιξη και μετάσταση του όγκου. Ειδικότερα, η σήμανση των κυτταρικών σειρών και η χρήση προηγμένων διαδικασιών απεικόνισης του όγκου βοηθά στην ευκολότερη ανίχνευση των μεταστάσεων σε ήπαρ και πνεύμονα. Η επιλογή της κυτταρικής σειράς που φαινοτυπικά και γενετικά αντανακλά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά είναι μεγίστης σημασίας.

Στις μέρες μας, μοντέλα με ξενομοσχεύματα προερχόμενα από συγκεκριμένο ασθενή (*individual patient – derived xenograft (PDX)*) υπόσχονται μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση για τη φροντίδα των ασθενών. Τα καρκινικά κύτταρα λαμβάνονται από τον ασθενή και εμφυτεύονται άμεσα στο ζωικό μοντέλο και έτσι η PDX μοντελοποίηση επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου, της μετάστασης, καθώς και την επιλογή διαφορετικών θεραπευτικών στρατηγικών.

Στα μειονεκτήματα αυτής της κατηγορίας, συγκαταλέγονται η ανοσοκαταστολή που απαιτείται. Σε ανοσοπρονομιούχες θέσεις, στις οποίες αναπτύσσεται το ραγοειδικό μελάνωμα, όπως είναι ο οφθαλμός, η εξέλιξη του όγκου και το μικροπεριβάλλον του επηρεάζονται έντονα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι, η επιτυχής διαλογή φαρμάκων δεν προβλέπει αναγκαστικά παρόμοιες επιδράσεις και στους ανθρώπους¹¹⁰.

3.1.3. Διαγονιδιακά Ποντίκια

Τα τελευταία 30 χρόνια καινοτόμες τεχνολογίες οι οποίες τροποποιούν ειδικά το γονιδίωμα επέτρεψαν την δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών ποντικού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την δημιουργία και χρήση αυτών των μοντέλων είναι να περιλαμβάνουν την ίδια μεταλλαγή που εμφανίζεται και στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια πλέον θεωρούνται ιδανικά εργασία για τη μελέτη μοριακών και γενετικών μονοπατιών στην έρευνα του καρκίνου αλλά και άλλων νόσων του ανθρώπου.

Συγκεκριμένες τεχνικές, έχουν την δυνατότητα να κατασκευάσουν στελέχη ποντικών που αναπτύσσουν αυθόρμητα ορισμένες μορφές κακοηθειών (π.χ. για το μελάνωμα του δέρματος : RET διαγονιδιακά ποντίκια). Δυστυχώς, μέχρι στιγμής κάτι τέτοιο δεν έχει αναπτυχθεί για το ραγοειδικό μελάνωμα.

Οι Schiffner et al.¹¹¹, περιέγραψαν ένα Tg(Grm1) διαγονιδιακό ποντίκι, με αυθόρμητο μελάνωμα του δέρματος το οποίο εμφάνισε μελαγχρωστικό χοριοειδικό πολλαπλασιασμό, μιμούμενο το αυθόρμητο ραγοειδικό μελάνωμα. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου μοντέλου για τη μελέτη ενδοφθάλμιων μελανωμάτων παραμένει αμφιλεγόμενη και η ανάγκη περαιτέρω έρευνας παραμένει. Συνολικά, οι περισσότερες προσπάθειες εύρεσης ενός πρωτοπαθούς και μεταστατικού ραγοειδικού μελανώματος σε μοντέλα δερματικού μελανώματος ήταν ανεπιτυχείς.

Πρόσφατα, διαγονιδιακό ποντίκι με GNAQ μεταλλαγή περιγράφηκε, ενώ εμφάνισε νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό όχι μόνο σε δομές του χοριοειδούς αλλά επιπλέον σε δερματικό σπίλο και σε άλλα μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα. Το σημαντικότερο σε ότι αφορά το παραπάνω μοντέλο ήταν ότι αυτά τα ποντίκια εμφάνισαν απομακρυσμένες μεταστάσεις, κυρίως στους πνεύμονες¹¹². Είναι σαφές, πως περισσότερη έρευνα χρειάζεται και σε αυτό τον τομέα.

3.1.4. Μοντέλα μεταστατικού ραγοειδικού μελανώματος

Το 10 - 40% των ασθενών με ραγοειδικό μελάνωμα τελικά αναπτύσσουν μεταστατική νόσο σε διάστημα 10 ετών μετά την αρχική διάγνωση, με τις περισσότερες εξ' αυτών να διαδίδονται αιματογενώς στο ήπαρ και σπανιότερα στους πνεύμονες και σε άλλα όργανα. Για αυτούς τους λόγους, η σχεδίαση ενός κατάλληλου ζωικού μοντέλου ηπατικής μετάστασης, αντιπροσωπεύει μία ακόμη πρόκληση¹¹⁴.

Προσπάθειες έχουν γίνει, μέσω άμεσης ενδοηπατικής διάδοσης, εμφύτευσης στον σπλήνα με ακόλουθη αιματογενή διασπορά στο ήπαρ ή άμεση ενδοφλέβια / ενδοκαρδιακή ένεση με αιματογενή διάδοση. Με αυτό τον τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα φτάνουν στο ήπαρ απευθείας ή αποκτούν πρόσβαση στην αιματική κυκλοφορία με σκοπό να πολλαπλασιαστούν σε επόμενη τοποθεσία^{115,116}.

Πρωτοπαθείς κυτταρικές σειρές ανθρώπινου ραγοειδικού μελανώματος μπορούν να ενεθούν σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα (ποντικοί, κόνικλοι), οδηγώντας σε μεταστατική νόσο στις περισσότερες εκ των περιπτώσεων. Επομένως, είναι πιθανά προτιμότερο να λαμβάνουμε κυτταρικές σειρές που δημιουργούνται από επιβεβαιωμένο μεταστατικό νεόπλασμα. Νέες προσεγγίσεις έχουν επιχειρηθεί, οι οποίες χρησιμοποιούν τα zebrafish ή έμβρυα όρνιθων¹¹³.

Ωστόσο, ένα ισχυρό μοντέλο που να προσομοιάζει τη διαδικασία διάδοσης των καρκινικών κυττάρων από ένα ενδοφθάλμιο ραγοειδικό μελάνωμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε ανοσοεπαρκή ζώα εξακολουθεί να λείπει.

3.1.5. Επαγόμενα μοντέλα

Τα ζώα μπορούν χαρακτηριστικά να αναπτύξουν νεοπλασίες ύστερα από έκθεση τους σε κάποια καρκινογόνο ουσία ή παράγοντα. Ο παράγοντας μπορεί να είναι χημικός, ακτινοβολία, ουσία φυσικής ή βιολογικής προέλευσης ενώ το αντίκτυπό τους μπορεί να προκαλέσει αλλαγές ή μεταλλαγές οι οποίες οδηγούν σε μη ελεγχόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ακόμη, ορισμένοι ιοί οι οποίοι εγχύονται ενδοφθάλμια είναι και αυτοί ικανοί να επάγουν νεοπλάσματα συμπεριλαμβανομένων των μελανωμάτων^{117,118}. Πρώιμες προσπάθειες οδήγησαν σε ενδοφθάλμιους όγκους, αλλά δεν οδήγησαν σε αναπαραγώγιμα ζωικά μοντέλα. Η ανεξέλεγκτη και μη κατευθυνόμενη καρκινογένεση προσφέρει μικρή δυνατότητα ελέγχου και δυνατότητα αναπαραγωγής.

Ωστόσο, διαγονιδιακά ποντίκια που φιλοξενούν μια προδιαθεσική γενετική μεταλλαγή σε ένα ογκογονίδιο, υπεύθυνη για μελανοκυτταρικούς πολλαπλασιασμούς μπορεί να δώσει την ευκαιρία ενός νέου ζωικού μοντέλου. Με ενδοφθάλμια εφαρμογή ενός καρκινογόνου παράγοντα, όπως 7,12-διμεθυλβενζ [α] ανθρακενίου (DMBA), η ογκογένεση μπορεί να επιταχυνθεί με ένα ελεγχόμενο τρόπο¹¹⁹. Τέτοια μοντέλα υπάρχουν ήδη για άλλες ογκολογικές οντότητες, αλλά δεν έχουν εξετασθεί για το ραγοειδικό μελάνωμα ακόμα.

II. Πειραματικό Μέρος

4.1. Εισαγωγή - Σκοπός

Το ραγοειδικό μελάνωμα, όπως αναλύσαμε και στις προηγούμενες ενότητες, αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη κακοήθεια στον ενήλικο οφθαλμό και είναι το δεύτερο σε συχνότητα μελάνωμα μετά από αυτό του δέρματος, αποτελώντας ακόμη τον συχνότερο πρωτοπαθή ενδοφθάλμιο όγκο στον ενήλικο Καυκάσιο πληθυσμό (6 εκατομμ./έτος στις Η.Π.Α.)¹²⁰.

Πλήθος θεραπευτικών προσεγγίσεων και ανάπτυξη εξίσου πολυάριθμων ζωικών μοντέλων έχουν συντελέσει στην προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας να κατανοήσει την παθοφυσιολογία αυτής της ενδοφθάλμιας κακοήθειας αλλά και να ερευνήσει νέες ακόμη πιο αποτελεσματικές θεραπείες οι οποίες έχουν ως στόχο να βελτιώσουν την πρόγνωση των ασθενών αυτών. Οι προς το παρόν, πιο διαδεδομένες θεραπευτικές τεχνικές περιλαμβάνουν την βραχυθεραπεία με πλάκες Ru-106 και τις δέσμες πρωτονίων. Η δεύτερη απαιτεί να υπερνικηθεί ο σκόπελος της κατασκευής μιας κατάλληλης βιομηχανικής μονάδας, η οποία θα έχει ως στόχο να αναπαράγει και να διοχετεύει κατάλληλα και με εξαιρετική ακρίβεια τη δέσμη αυτή στον καρκινικό ιστό. Μια τέτοια μονάδα, βρίσκεται αυτή την στιγμή υπό κατασκευή στο Κέντρο Φυσικής Πλάσματος και Laser στον Ν. Ρεθύμνου (Κρήτη). Μια εξέλιξη η οποία θα αλλάξει τα δεδομένα στην θεραπεία του καρκίνου στην Ελλάδα, ανοίγοντας τον δρόμο για την εγκατάσταση ενός κέντρου θεραπείας με πρωτόνια, τεχνολογικά την πιο σύγχρονη και ιατρικά πιο αποτελεσματική μέθοδο ακτινοθεραπείας για πολλούς όγκους εκτός του ραγοειδικού μελανώματος.

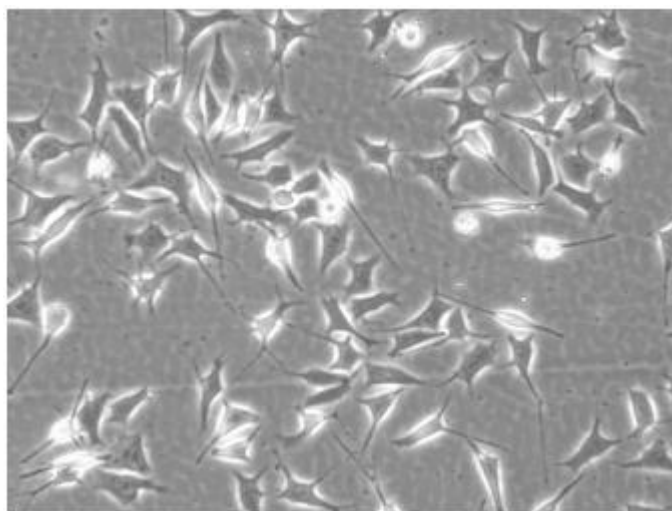
Στην συγκεκριμένη μελέτη θα γίνει χρήση κονίκλων, υπό διαφορετικούς τύπους ανοσοκαταστολής ενώ παράλληλα θα πραγματοποιηθεί διερεύνηση των μεθόδων εμφύτευσης των μελανοκυττάρων καθώς και το είδος της κυτταρικής σειράς που θα χρησιμοποιηθεί στους οφθαλμούς αυτών. Επίσης, η εργασία αυτή έχει ως στόχο τη δημιουργία ενός σταθερά επαναλαμβανόμενου και εύχρηστου ζωικού μοντέλου ανάπτυξης οφθαλμικού μελανώματος του χοριοειδούς, το οποίο θα έχει ως απώτερο στόχο να βοηθήσει μετέπειτα σε μελέτες απεικόνισης και κυρίως μεθόδων θεραπείας στο υπό κατασκευή κέντρο που προαναφέρθηκε.

4.2. Κυτταροκαλλιέργειες

Για την ανάπτυξη του ζωικού μοντέλου είναι επιβεβλημένη η χρήση κυτταρικών σειρών μελανώματος, όπως είδαμε στο θεωρητικό μέρος. Για τον σκοπό αυτό, κατεψυγμένα κύτταρα μελανώματος κυτταρικών σειρών 92.1, Mel202 και A375 χρησιμοποιήθηκαν. Τα κύτταρα των σειρών 92.1 και Mel202 ελήφθησαν από το Εργαστήριο Οφθαλμολογίας του Leiden University, Ολλανδία (ευγενική προσφορά των καθηγητών Martine Jager και Dr. Mieke Versluis). Πρόκειται για κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος τα οποία στάλθηκαν σε κατεψυγμένα φιαλίδια (-80 ° C), που το καθένα περιέχει 5-10 εκατομμύρια κύτταρα σε 20% DMSO και αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο. Η κυτταρική σειρά A375 ελήφθη από το Εργαστήριο Δερματολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (ευγενική προσφορά του καθηγητή Κων/νου Κρασαγάκη). Πρόκειται για ανθρώπινα κύτταρα δερματικού μελανώματος τα οποία καλλιεργήθηκαν και αποθηκεύτηκαν και αυτά σε υγρό άζωτο.

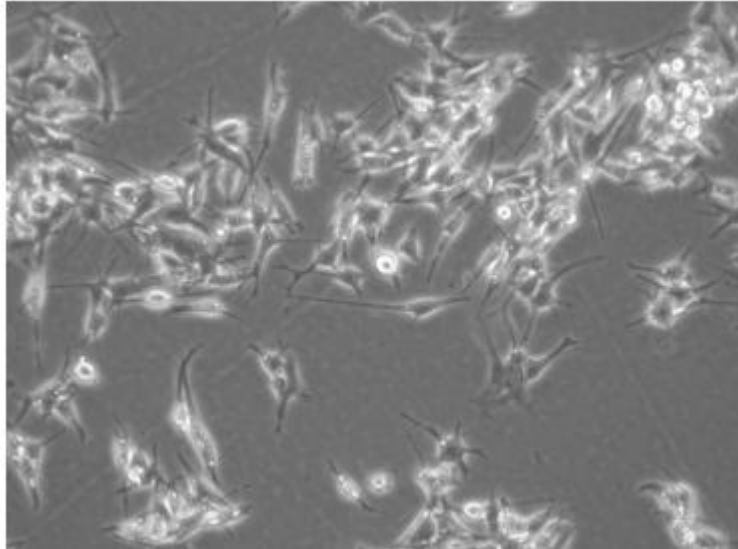
Για την απόψυξη και καλλιέργεια των κυττάρων, το εναιώρημα βυθίστηκε σε λουτρό ύδατος 37 ° C και μόλις ολοκληρώθηκε σχεδόν η απόψυξη μεταφέρθηκαν 9 ml τροποποιημένου βασικού μέσου Eagle (Biosera, UK) ενώ φυγοκεντρίστηκαν για να ληφθεί το κυτταρικό ίζημα. Εν συνεχεία, το ίζημα αυτό πλύθηκε άλλη μια φορά με έναν όγκο μέσου και σπάρθηκε σε μια φιάλη καλλιέργειας T25. Το μέσο καλλιέργειας ήταν το RPMI 1640 (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ), συμπληρωμένο με 10% FBS, 3 mM L-γλουταμίνη, 2% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Μία ή δύο εβδομάδες μετά την απόψυξη, τα κύτταρα διαχωρίστηκαν δύο φορές την εβδομάδα με αναλογία 1: 3.

- Η 92-1 κυτταρική σειρά συλλέχθηκε από ένα πρωτογενές μελάνωμα του ραγοειδούς στον δεξιό οφθαλμό μιας γυναίκας ηλικίας 76 ετών. Η κυτταρική σειρά 92-1 είναι μία από τις 170 περισσότερο χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές μελανώματος που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του έργου ESTDAB (European Database of Tumor Line Database) του πέμπτου προγράμματος υποδομής πλαισίου της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (σύμβαση αριθ. QLRI-CT-2001-01325).



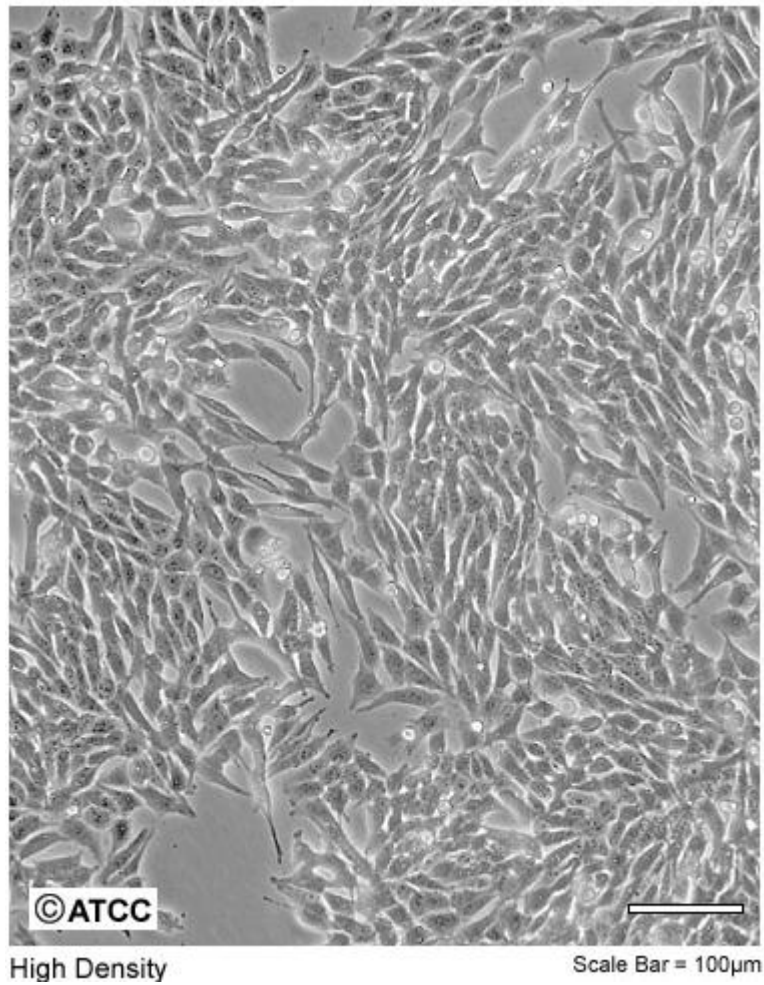
Εικ. 9. Κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος, επιθηλιακού τύπου 92.1 κυτταρικής σειράς.

- Η Mel-202 κυτταρική σειρά συλλέχθηκε από ένα πρωτογενές μελάνωμα του ραγοειδούς. Η κυτταρική σειρά Mel-202 είναι επίσης μία από τις 170 περισσότερο χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές μελανώματος που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του έργου ESTDAB (European Database of Tumor Line Database) του πέμπτου προγράμματος υποδομής πλαισίου της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (συμβόλαιο αριθ. QLRI-CT- 2001-01325).



Εικ. 10. Κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος, επιθηλιακού τύπου Mel202 κυτταρικής σειράς.

- Η A375 κυτταρική σειρά συλλέχθηκε από ένα δερματικό μελάνωμα μιας γυναίκας ηλικίας 54 ετών.



Εικ. 11. Κύτταρα δερματικού μελανώματος, επιθηλιακού τύπου A375 κυτταρικής σειράς.

4.3. Πείραμα 1

➤ Μέθοδος

Χρησιμοποιήθηκαν 3 αλφικοί κόνικλοι (albino rabbits) βάρους 2 – 2,5 kg. Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε συστηματική ανοσοκαταστολή με ενδομυϊκές ενέσεις δεξαμεθαζόνης 2 mg/kg (amp. Dexaton 4 mg/ml), 3 φορές την ημέρα με μεσοδιάστημα 6 ωρών¹²¹. Η χορήγηση της δεξαμεθαζόνης διήρκησε 1 ημέρα πριν την εμφύτευση των κυττάρων έως και 3 ημέρες μετά. Για το χειρουργείο εμβολιασμού, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με υποδόριες ενέσεις 1 ml διαλύματος υδροχλωρικής ξυλαζίνης 20 mg / ml (Rompun, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Germany) και 1 ml διαλύματος υδροχλωρικής κεταμίνης 100 mg / ml (Merial SAS, Lyon, Γαλλία).

Η διαδικασία της εμφύτευσης των κυττάρων περιλάμβανε για τα 2 πειραματόζωα την έγχυση 2 εκατομμ. κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο - ίριδα του ΔΕ οφθαλμού (κυτταρικές σειρές : A375, 92.1), ενώ για το 3^ο περιλάμβανε την εμφύτευση 2 εκ. κυττάρων στον πρόσθιο θάλαμο – ίριδα και υπό τον επιπεφυκότα λόγω διάνοιξης του, στον ΔΕ οφθαλμό στην ευρύτερη περιοχή 12^{ης} ώρας (κυτταρική σειρά Mel202). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε σύριγγα των 1 ml με βελόνη 27G, η οποία προωθήθηκε καταλλήλως σε κάθε πειραματόζωο όπως αναφέρεται παραπάνω.

Μετεγχειρητικά, όλα τα πειραματόζωα έλαβαν οφθαλμικές σταγόνες τομπραμυκίνης (0,3%) - δεξαμεθαζόνης (0,1%) (Tobradex, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX, ΗΠΑ) μέχρι την στιγμή της θυσίας (20 ημέρες μετά την εμφύτευση). Κατά τη διάρκεια του πειράματος αυτού, τα πειραματόζωα εξετάζονταν κάθε 5 ημέρες με τη χρήση φορητής σχισμοειδούς λυχνίας και διενεργούνταν έμμεση βυθοσκόπηση με τη χρήση μυδριατικών σκευασμάτων (τροπικαμίδη, κυκλοπεντολάτη, φαινυλεφρίνη).

Την τελευταία ημέρα, τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν, ενώ βρίσκονταν υπό αναισθησία, με ένεση αέρα 10 ml στην κύρια φλέβα του αυτιού. Ακολούθως, το δεξιό μάτι εξορύχθηκε και εξετάστηκε ιστολογικά.

Αυτή η προοπτική πειραματική (ζωική) μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Οφθαλμολογίας και Τμήμα Ιατρικής Απεικόνισης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του νοσοκομείου μας και τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τους εθνικούς (ελληνικούς) νόμους που αφορούν πειράματα σε ζώα.



Εικ. 12. Εμφύτευση κυττάρων στην περιοχή της 12^{ης} ώρας στο Mel202 πειραματόζωο.

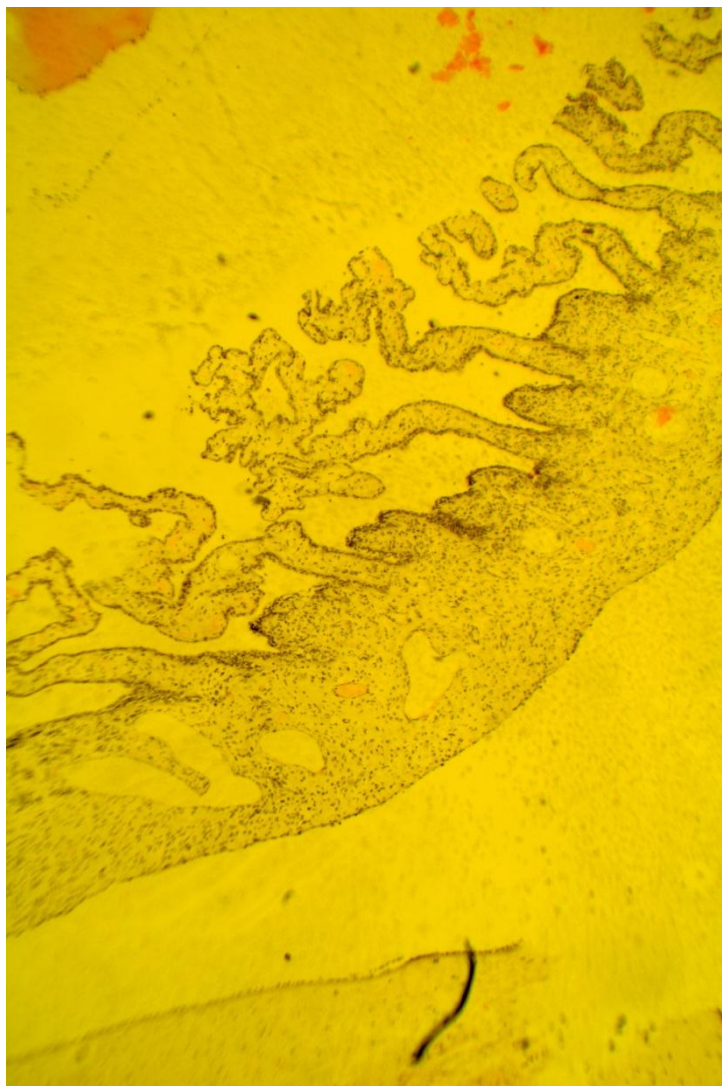
➤ Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, δεν παρατηρήθηκε κάποια βλάβη, η οποία να υπονοεί την ύπαρξη ραγοειδικού μελανώματος. Κατά την εξέταση με την σχισμοειδή λυχνία παρατηρήθηκε τις επόμενες 2 ημέρες μετά την εμφύτευση, μια ελαφριά υπέγερση της ίριδας και στα 3 ζώα η οποία όμως στη συνέχεια ελαττώθηκε, ενώ ταυτόχρονα ο πρόσθιος θάλαμος ήταν καθαρός. Στο Mel202 πειραματόζωο, την τρίτη ημέρα μετά την εμφύτευση εμφανίστηκε μακροσκοπικά μια μελαγχρωστική βλάβη υπό τον επιπεφυκότα, η οποία όμως δεν διατήρησε την έκταση της τις επόμενες ημέρες.

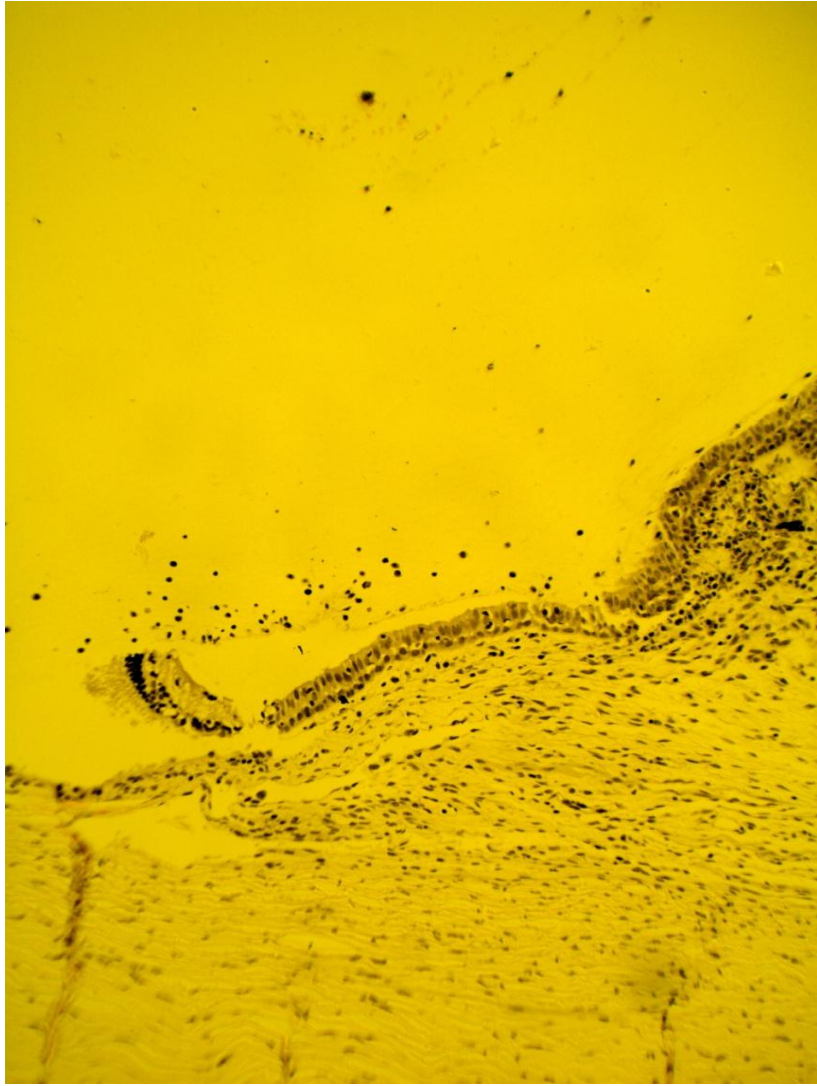


Εικ. 13. Μελαγχρωστική βλάβη στην περιοχή της 12^{ης} ώρας (θέσης εμφύτευσης) στο Mel202 πειραματόζωο.

Οι ιστολογικές εικόνες από την περιοχή της βλάβης στο Me1202 πειραματόζωο έδειξαν παρουσία λεμφοκυττάρων και πιθανά εικόνα φλεγμονώδους αντίδρασης.



Εικ. 14. Παρουσία λεμφοκυττάρων και πιθανή εικόνα φλεγμονής στο ακτινωτό σώμα (Me1202).



Εικ. 15. Παρουσία λεμφοκυττάρων και πιθανή εικόνα φλεγμονής στο ακτινωτό σώμα (MeI202).

4.4. Πείραμα 2

➤ Μέθοδος

Χρησιμοποιήθηκαν 2 αλφικοί κόνικλοι (albino rabbits) βάρους 2,5 – 3 kg. Τα ζώα υποβλήθηκαν σε συστηματική ανοσοκαταστολή με ενδομυϊκές ενέσεις 15mg/kg/ημέρα CyclosporinA (Sandimmune 50 mg / ml, Novartis, NJ, ΗΠΑ), για 3 ημέρες πριν από τον εμβολιασμό κυττάρων μελανώματος και συνέχισαν να λαμβάνουν την ίδια δοσολογία της κυκλοσπορίνης A για 26 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό, μέχρι την ημέρα της θυσίας¹²².

Για το χειρουργείο εμβολιασμού, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με υποδόριες ενέσεις 1 ml διαλύματος υδροχλωρικής ξυλαζίνης 20 mg / ml (Rompun, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Germany) και 1 ml διαλύματος υδροχλωρικής κεταμίνης 100 mg / ml (Merial SAS, Lyon, Γαλλία).

Η διαδικασία για το πειραματόζωο Mel202 περιλάμβανε τον εμβολιασμό 7 εκατομμ. κυττάρων κυτταρικής σειράς Mel202, με τα κύτταρα να τοποθετούνται σε σύριγγα των 1 ml με βελόνη 27G, η οποία προωθήθηκε στον πρόσθιο θάλαμο του ΔΕ οφθαλμού.

Ομοίως, για το 92.1 πειραματόζωο χρησιμοποιήθηκαν 14 εκατομμ. κυττάρων σειράς 92.1 και προωθήθηκαν στον ΔΕ οφθαλμό του 92.1 πειραματόζωου στους περιφερικούς υπερ-χοριοειδείς χώρους. Η διαδικασία περιλάμβανε ανώτερη 180° διατομή του επιπεφυκότα στην περιοχή του κερατοειδικού χιτώνα, ακολουθούμενη από το σχηματισμό ενός τοπικού επιφανειακού πτερυγίου σκληρού χιτώνα. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε σύριγγα των 1 ml με βελόνη 27G, η οποία προωθήθηκε κάτω από το επιφανειακό σκληρικό πτερύγιο στο υποκείμενο υπερ-χοριοειδές διάστημα. Εν συνεχεία τα κύτταρα εγχύθηκαν με υδατοστεγή τρόπο και το επιφανειακό σκληρικό πτερύγιο συρράφθηκε για να αποτραπεί η διαφυγή των κυττάρων στον υπο-επιπεφυκότα χώρο. Μετεγχειρητικά, όλα τα ζώα έλαβαν οφθαλμικές σταγόνες τομπραμυκίνης (0,3%) - δεξαμεθαζόνης (0,1%) (Tobradex, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX, ΗΠΑ) μέχρι την στιγμή της θυσίας.

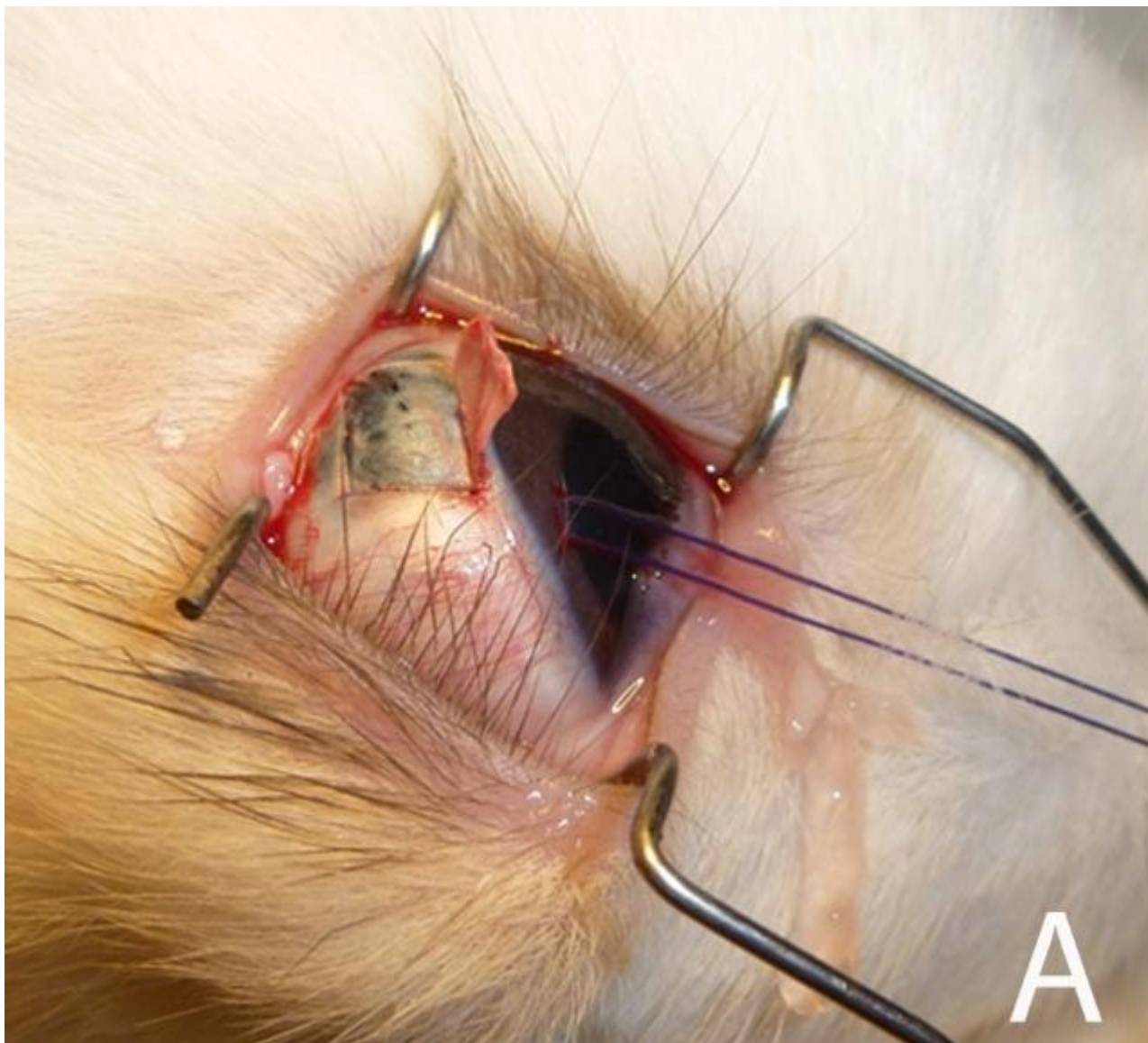
Κατά τη διάρκεια του πειράματος αυτού, τα πειραματόζωα εξετάζονταν κάθε 5 ημέρες με τη χρήση φορητής σχισμοειδούς λυχνία και διενεργούνταν έμμεση βυθοσκόπηση με τη χρήση μυδριατικών σκευασμάτων (τροπικαμίδη, κυκλοπεντολάτη, φαινυλεφρίνη). Από την κλινική οφθαλμολογική εξέταση, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί την τελευταία ημέρα, εξέταση μαγνητικής τομογραφίας με επιφανειακό πηνίο στο πειραματόζωο 92.1.

Η διαδικασία σάρωσης με μαγνητική τομογραφία πραγματοποιήθηκε σε σαρωτή 1,5-T (SonataVision, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany), όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες¹²³. Μετά από την κατάλληλη αναισθησία, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε ένα δοχείο σχεδιασμένο για το σκοπό αυτό με μια σειρά από επιφανειακά πηνία που αναπτύχθηκαν στην δεξιά τους τροχιά. Αξονικές, στεφανιαίες και οβελιαίες εικόνες ελήφθησαν σε πάχος 2 mm χρησιμοποιώντας μήτρα 256 x 224 σε οπτικό πεδίο 18,3 x 21,0 cm. Μετά την ολοκλήρωση της σάρωσης με μαγνητική τομογραφία, τα ζώα θυσιάστηκαν, ενώ ακόμα υπό αναισθησία, με ένεση αέρα των 10 ml στην κύρια φλέβα του αυτιού. Ακολούθως, το δεξιό μάτι εξορύχθηκε και εξετάστηκε ιστολογικά.

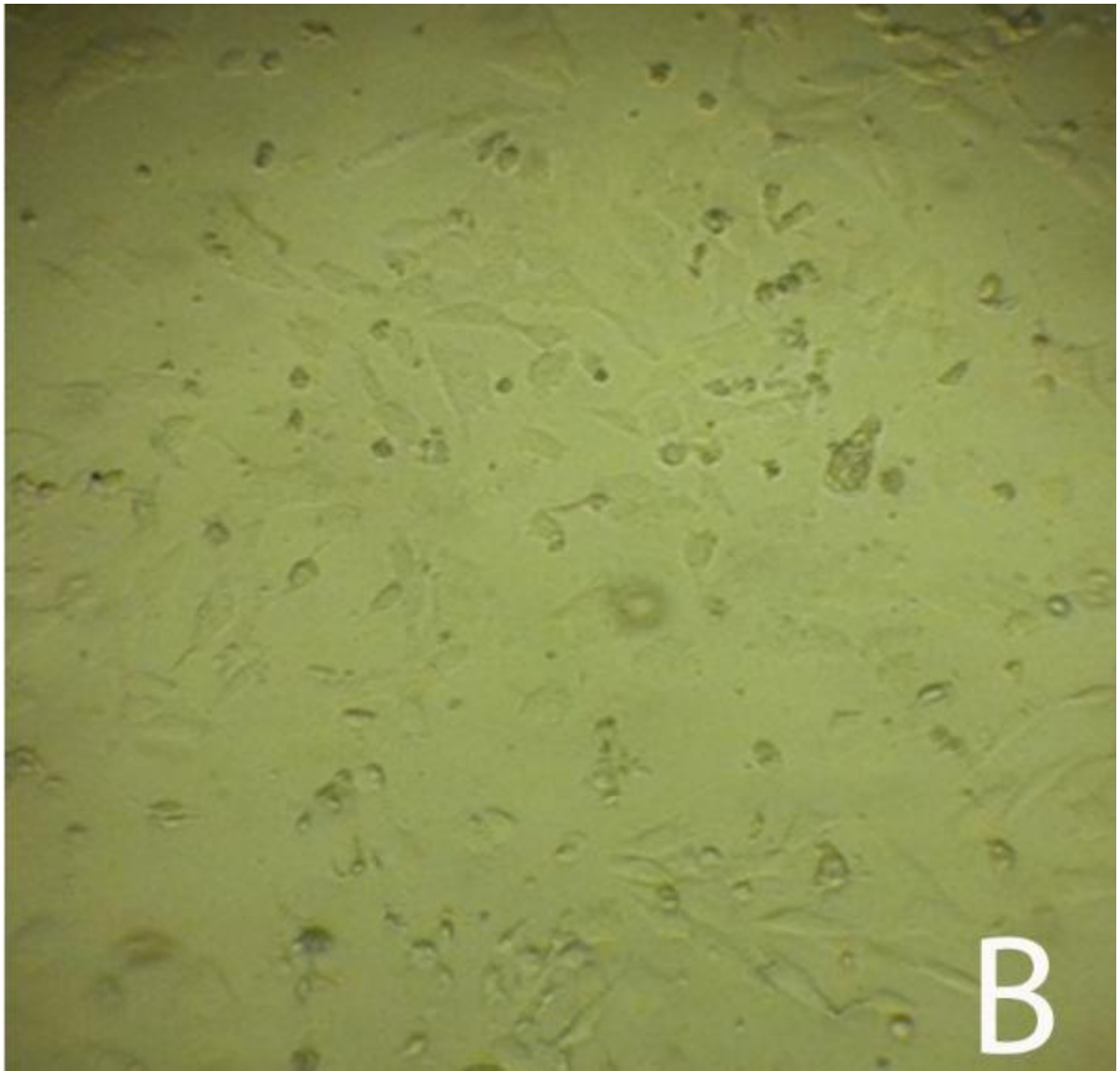
Οι εικόνες DICOM αναλύθηκαν με τον σταθμό εργασίας efilm (eFilm Medical Inc, Τορόντο, Οντάριο, Καναδά) και τον σταθμό εργασίας EvoRad RIS-PACS (EvoRad Medical Information Systems, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα). Η ανάλυση περιλάμβανε την ταυτοποίηση του όγκου εντός της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI), που αντιστοιχεί στη θέση εμβολιασμού κυττάρων μελανώματος στο ανώτερο περιφερειακό βάθος ακριβώς πίσω από τη ρίζα της ίριδας. Η σαφήνεια του ορισμού των ορίων

των όγκων σε όλες τις αλληλουχίες και τους προσανατολισμούς (αξονική, ισοροπημένη, στεφανιαία) καθώς και η παρουσία αντικειμένων αξιολογήθηκε υποκειμενικά χρησιμοποιώντας κλίμακα 5 σημείων, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες έρευνες¹²³.

Αυτή η προοπτική πειραματική (ζωική) μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Οφθαλμολογίας και Τμήμα Ιατρικής Απεικόνισης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του νοσοκομείου μας και τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τους εθνικούς (ελληνικούς) νόμους που αφορούν πειράματα σε ζώα.



Εικ. 16. Μέθοδος εμφύτευσης κυττάρων σειράς 92.1 στο πειραματόζωο 92.1.



Εικ. 17. Κύτταρα ραγοειδικού μελανώματος σειράς 92.1.



Εικ. 18. Πειραματική διάταξη μαγνητικού τομογράφου εφαρμοζόμενη στο πειραματόζωο 92.1.

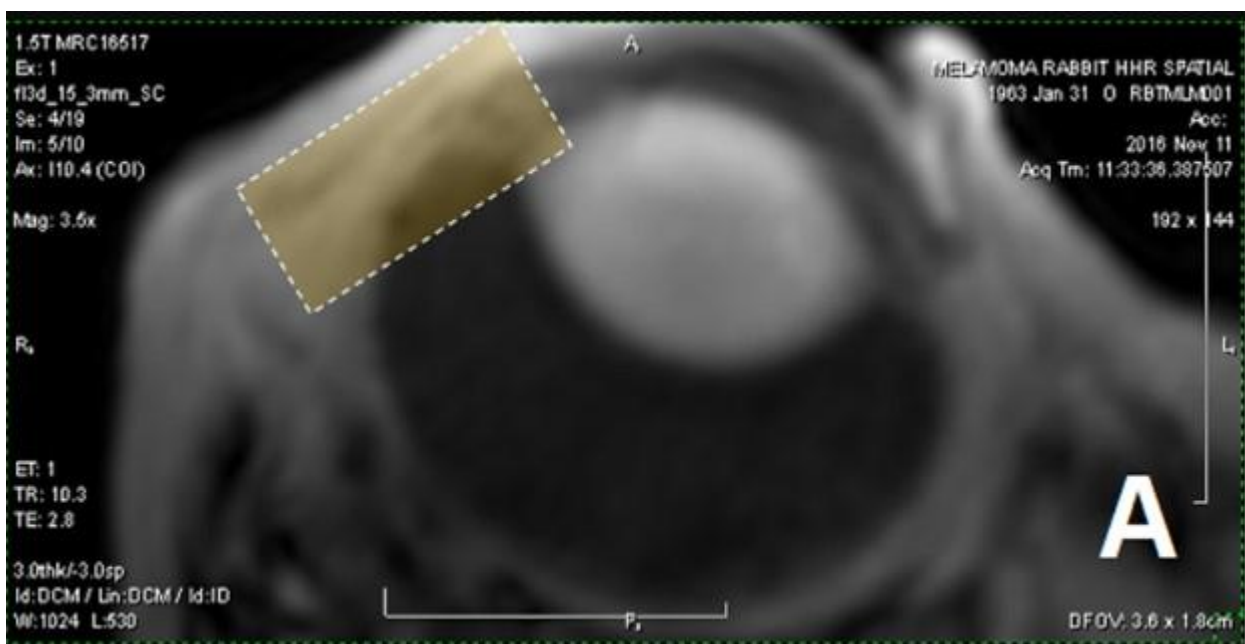


Εικ. 19. Εφαρμογή επιφανειακού πηνίου στον ΔΕ οφθαλμό του πειραματοζώου 92.1.

➤ Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, δεν παρατηρήθηκε κάποια βλάβη, η οποία να υπονοεί την ύπαρξη ραγοειδικού μελανώματος στο πειραματόζωο Mel202. Κατά την εξέταση με την σχισμοειδή λυχνία παρατηρήθηκε τις επόμενες 2 ημέρες μετά την εμφύτευση ο πρόσθιος θάλαμος, ο οποίος ήταν καθαρός. Παρόμοια κλινική εικόνα εμφάνιζε και το πειραματόζωο 92.1, πάραυτα εξαιτίας της θέσης εμφύτευσης των κυττάρων και της δυσκολίας παρατήρησης πιθανού όγκου, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση μαγνητικής τομογραφίας με επιφανειακό πηνίο όπως περιγράφηκε παραπάνω. Και στα δύο πειραματόζωα, δεν παρατηρήθηκε καμία από τις ανεπιθύμητες ενέργειες χορήγησης κυκλοσπορίνης Α.

Όσον αφορά το πειραματόζωο 92.1, στα αποτελέσματα της μαγνητικής τομογραφίας η περιοχή του όγκου εντοπίστηκε καλύτερα σε στεφανιαία τμήματα. Η περιοχή συσχετίστηκε με τοπική αποκόλληση χοριοειδούς και αμφιβληστροειδούς και η εγγύτητά της με τη ρίζα της ίριδας είχε ως αποτέλεσμα κακώς καθορισμένα πρόσθια όρια. Κατά μήκος του οπίσθιου περιθωρίου, η περιοχή του όγκου οριοθετήθηκε καλύτερα σε αλληλουχίες με προσανατολισμό T2.



Εικ. 20. Τοποθεσία εμφύτευσης κυττάρων 92.1 στον ΔΕ οφθαλμό του πειραματοζώου 92.1.



Εικ. 21. Οβελιαία τομή του πειραματόζώου 92.1.



Εικ. 22. Ακολουθία T1 προσανατολισμού – ΔΕ οφθαλμός πειραματόζώου 92.1.



Εικ. 23. Ακολουθία T2 προσανατολισμού – ΔΕ οφθαλμός πειραματοζώου 92.1.



Εικ. 24. Ιστολογική εικόνα – ΔΕ οφθαλμός πειραματοζώου 92.1. Η περιοχή αντιστοιχεί στον ανώτερο βολβό όπου έγινε ο ενοφθαλμισμός υπερχοριοειδικά (διακρίνεται ο "άνω ορθός" μυς), ενώ παρατηρείται χοριοειδική πάχυνση (391.09 μm).



Εικ. 25. Ιστολογική εικόνα – ΔΕ οφθαλμός πειραματοζώου 92.1, όπου παρατηρείται αρχόμενος όγκος στη γωνία του χοριοειδή χιτώνα (με κόκκινο βέλος – αρχόμενος όγκος, με πράσινο χρώμα – αμφιβληστροειδής χιτώνας, με καφέ χρώμα – χοριοειδής χιτώνας, με μπλε χρώμα – σκληρός χιτώνας)

4.5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Όπως αναλύσαμε στο θεωρητικό μέρος, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανάπτυξης ενός ζωικού μοντέλου το οποίο να μιμείται σε ικανοποιητικό βαθμό το ραγοειδικό μελάνωμα στον άνθρωπο. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχει ένα μοναδικό μοντέλο το οποίο να μπορεί να χρησιμοποιείται ευρέως για εφαρμογές διάγνωσης και θεραπείας του μελανώματος. Οι διαφορές μεταξύ των μοντέλων αφορούν το είδος της ανοσοκαταστολής, την διάρκεια ανάπτυξης του όγκου καθώς, το είδος των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται κάθε φορά και τέλος η μέθοδος εμφύτευσής τους στον οφθαλμό των πειραματόζωων.

Πρόσφατα, οι Blanco et al.¹²², ανέπτυξαν παρόμοιο ζωικό μοντέλο χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά 92.1, σε ανοσοκατεσταλμένους με κυκλοσπορίνη A κόνικλους, στοχεύοντας στην δημιουργία μεταστατικού ραγοειδικού μελανώματος. Για να το επιτύχουν αυτό, απαιτήθηκε η συντήρηση και η παρακολούθηση των πειραματόζωων για 10 εβδομάδες, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός όγκου πλάτους περίπου 10 mm στο ραγοειδή χιτώνα καθώς και την επίτευξη μεταστάσεων.

Στη δική μας περίπτωση προσανατολιζόμαστε στο να δημιουργήσουμε ένα ζωικό μοντέλο μικρότερης διάρκειας, όσον αφορά τον χρόνο διατήρησης των πειραματόζωων, λαμβάνοντας υπόψη το μικρότερο μέγεθος του αναπτυσσόμενου όγκου. Η πρόκληση σε αυτή την περίπτωση είναι η δυσκολία απεικόνισης και παρακολούθησης ενός τέτοιου μικρού όγκου με τις συμβατικές τεχνικές. Τελικά, δοκιμάζοντας τις διάφορες μεθόδους εμφύτευσης των κυττάρων, συμπεράναμε ότι η υπερχοριοειδική εμφύτευση ήταν επιτυχής σε σχέση με τις άλλες οδούς.

Παρόλη τη μικρή διάρκεια του μοντέλου, είδαμε ότι χρησιμοποιώντας το επιφανειακό πηνίο μπορούμε να καταγράψουμε απεικονιστικά τον μικρό αναπτυσσόμενο όγκο, που ειδικά στην περίπτωση του ακτινωτού σώματος δεν μπορεί να διακριθεί με άλλο τρόπο λόγω του μεγέθους του. Όσον αφορά την επιλογή της ανοσοκαταστολής, έχει ήδη δειχθεί ότι οι παρενέργειές της είναι μικρές για τόσο περιορισμένο διάστημα εφαρμογής, επομένως σε μελλοντικές προσπάθειες θα μπορούσαμε να επαναλάβουμε την εφαρμογή με μικρές απώλειες σε πειραματόζωα.

Η επιτυχής και επαναλήψιμη ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μελανώματος σε οφθαλμό κονίκλου στο κέντρο μας θα επιτρέψει τη μελλοντική εφαρμογή διαγνωστικών (απεικονιστικών) και θεραπευτικών πρωτοκόλλων, όπως η τηλεθεραπεία με δέσμη πρωτονίων, που πιθανώς θα είναι διαθέσιμη στο προσεχές διάστημα στην Κρήτη.

Βιβλιογραφία

1. «Κλινική Οφθαλμολογία», Νικόλαος Τρ. Στάγκος, University Studio Press, 2002
2. «Οφθαλμολογία : Εικονογραφημένο Έγχρωμο Εγχειρίδιο», Battenbury, Bowling, Murphy, 3^η έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνου, 2010
3. B.E. Damato, and S.E. Coupland, Differences in uveal melanomas between men and women from the British Isles, *Eye (Lond)* 2012;26:292-9
4. Vasilios P. Papastefanou and Victoria M. L. Cohen, Review Article – Uveal Melanoma, *Journal of Skin Cancer*, Volume 2011, Article ID 573974, 13 pages
5. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi A, Shields JA, Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases, *Retina* 2012;32:1363-72
6. Weis E, Shah CP, Lajous M, Shields JA, Shields CL, The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis, *Arch Ophthalmol.* 2006;124:54-60
7. Singh AD, Kalyani P, Topham A., Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* 2005;112:1784-1789
8. Sumich P, Mitchell P, Wang JJ. Choroidal nevi in a white population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:645-650.
9. Berçin Tarlan, Hayyam Kiratlı, Uveal Melanoma: current trends in diagnosis and management, *Turk J Ophthalmol* 2016;46:123-137
10. Shields CL, Kaliki S, Livesey M, Walker B, Garoon R, Bucci M, Feinstein E, Pesch A, Gonzalez C, Lally SE, Mashayekhi A, Shields J, Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131:993-1003.
11. Grin JM, Grant-Kels JM, Grin CM, Berke A, Kels BD, Ocular melanomas and melanocytic lesions of the eye. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:716-730.
12. Seddon JM, Gragoudas ES, Glynn RJ, Egan KM, Albert DM, Blitzer PH, Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:1274-1280.
13. Martorano LM, Winkelmann RR, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Campbell SM., Ocular melanoma and the BAP1 hereditary cancer syndrome: implications for the dermatologist. *Int J Dermatol.* 2014;53:657-663.
14. Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, Windpassinger C, Wackernagel W, Loy S, Wolf I, Viale A, Lash AE, Pirun M, Succi ND, Rütten A, Palmedo G, Abramson D, Offit K, Ott A, Becker JC, Cerroni L, Kutzner H, Bastian BC, Speicher MR., Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet.* 2011;43:1018-1021.
15. Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL., Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology.* 2005;112:1599-1607.
16. Elyse S. Blum et al., Clinical Management of Uveal and Conjunctival Melanoma, Review Article, January 15, 2016, Cancer Network.
17. S. Landreville, O. A. Agapova, and J. W. Hartbour, “Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma,” *Future Oncology*, vol. 4, no. 5, pp. 629–636, 2008.

18. M. D. Onken, L. A. Worley, M. D. Long et al., "Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 49, no. 12, pp. 5230–5234, 2008.
19. C. D. Van Raamsdonk, V. Bezrookove, G. Green et al., "Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi," *Nature*, vol. 457, no. 7229, pp. 599–602, 2009.
20. C. D. Van Raamsdonk, K. G. Griewank, M. B. Crosby et al., "Mutations in GNA11 in uveal melanoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 23, pp. 2191–2199, 2010.
21. M. A. Brantley Jr. and J. W. Harbour, "Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma," *American Journal of Pathology*, vol. 157, no. 6, pp. 1795–1801, 2000.
22. Y. Sun, B. N. Tran, L. A. Worley, R. B. Delston, and J. W. Harbour, "Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 46, no. 5, pp. 1561–1564, 2005.
23. J. P. Ehlers, L. Worley, M. D. Onken, and J. W. Harbour, "Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 1, pp. 115–122, 2008.
24. Eskelin S, Kivelä T. Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 333-8.
25. Damato EM, Damato BE. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. *Ophthalmology* 2012; 119: 1582-9.
26. Shields CL, Shields JA, De Potter P, Cater J, Tardio D, Barrett J. Diffuse choroidal melanoma. Clinical features predictive of metastasis. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 956-63.
27. Lee DS, Anderson SF, Perez EM, Townsend JC. Amelanotic choroidal nevus and melanoma: cytology, tumor size, and pigmentation as prognostic indicators. *Optom Vis Sci* 2001; 78: 483-91.
28. Conway RM, Chua WC, Qureshi C, Billson FA. Primary iris melanoma: diagnostic features and outcome of conservative surgical treatment. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 848-54.
29. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, Nagori S, Mashayekhi A, Lally DR, Kelly CC, Rudich DS, Nagori AV, Wakade OA, Mehta S, Forte L, Long A, Dellacava EF, Kaplan B, Shields JA. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 989-98.
30. Pereira PR, Odashiro AN, Lim LA, Miyamoto C, Blanco PL, Odashiro M, Maloney S, De Souza DF, Burnier MN Jr. Current and emerging treatment options for uveal melanoma. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:1669-1682.
31. Coupland SE. Analysis of intraocular biopsies. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:96-116.
32. Ah-Fat FG, Damato BE. Delays in the diagnosis of uveal melanoma and effect on treatment. *Eye (Lond)*. 1998;12:781-782.
33. Bove R, Char DH. Nondiagnosed uveal melanomas. *Ophthalmology*. 2004;111:554-557.
34. Berçin Tarlan, Hayyam Kıratlı. Uveal Melanoma: Current Trends in Diagnosis and Management, *Turk J Ophthalmol* 2016;46:123-137
35. Diener-West M, Earle JD, Fine SL, Hawkins BS, Moy CS, Reynolds SM, Schachat AP, Straatsma BR; Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma, II: characteristics of patients enrolled and not enrolled. COMS Report No. 17. *Arch Ophthalmol*. 2001;119: 951-965.
36. Khan S, Finger PT, Yu GP, Razzaq L, Jager MJ, de Keizer RJ, Sandkull P, Seregard S, Gologorsky D, Scheffler AC, Murray TG, Kivelä T, Giuliari GP, McGowan H, Simpson ER,

- Corriveau C, Coupland SE, Damato BE. Clinical and pathologic characteristics of biopsy-proven iris melanoma: a multicenter international study. *Arch Ophthalmol*. 2012;130:57-64.
37. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients. *Ophthalmology*. 2013;120:2066-2071.
 38. Kivelä T. Diagnosis of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:1-15.
 39. Giuliari GP, McGowan HD, Pavlin CJ, Heathcote JG, Simpson ER. Ultrasound biomicroscopic imaging of iris melanoma: a clinicopathologic study. *Am J Ophthalmol*. 2011;151:579-585.
 40. Bianciotto C, Shields CL, Guzman JM, Romanelli-Gobbi M, Mazzuca D Jr, Green WR, Shields JA. Assessment of anterior segment tumors with ultrasound biomicroscopy versus anterior segment optical coherence tomography in 200 cases. *Ophthalmology*. 2011;118:1297-1302.
 41. Espinoza G, Rosenblatt B, Harbour JW. Optical coherence tomography in the evaluation of retinal changes associated with suspicious choroidal melanocytic tumors. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:90-95.
 42. Sayanagi K, Pelayes DE, Kaiser PK, Singh AD. 3D Spectral domain optical coherence tomography findings in choroidal tumors. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21:271-275.
 43. Shields CL, Kaliki S, Rojanaporn D, Ferenczy SR, Shields JA. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of small choroidal melanoma: comparison with choroidal nevus. *Arch Ophthalmol*. 2012;130:850-856.
 44. Almeida A, Kaliki S, Shields CL. Autofluorescence of intraocular tumours. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013;24:222-232.
 45. Collaborative Ocular Melanoma Study Group, Boldt HC, Byrne SF, Gilson MM, Finger PT, Green RL, Straatsma BR, Simpson ER, Hawkins BS. Baseline echographic characteristics of tumors in eyes of patients enrolled in the Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS report no. 29. *Ophthalmology*. 2008;115:1390-1397.
 46. Midena E, Parrozzani R. Biopsies in uveal melanoma. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:81-95. Eskelin S, Pyrhönen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivelä T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology*. 2000;107:1443-1449.
 47. Singh AD. Uveal melanoma: implications of tumor doubling time. *Ophthalmology*. 2001;108:829-831.
 48. Kivelä T, Kujala E. Prognostication in eye cancer: the latest tumor, node, metastasis classification and beyond. *Eye (Lond)*. 2013;27:243-252.
 49. Shields CL, Shields JA, Kiratli H, De Potter P, Cater JR. Risk factors for growth and metastasis of small choroidal melanocytic lesions. *Ophthalmology*. 1995;102:1351-1361.
 50. Shields CL, Furuta M, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, Dinh DH, Mashayekhi A, Shields JA. Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol*. 2009;127:981-987.
 51. Gass JD. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanoma. XXXIII Edward Jackson Memorial lecture. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1977;83:19-48.
 52. Shields JA, Mashayekhi A, Ra S, Shields CL. Pseudomelanomas of the posterior uveal tract: the 2006 Taylor R. Smith Lecture. *Retina*. 2005;25:767-771.

53. Singh AD, Shields CL, Shields JA. Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2001;11:255-263.
54. Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer.* 1990;66:1596-1600.
55. Callender GR. Malignant melanotic tumors of the eye: a study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1931;36:131-142.
56. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol.* 1983;96:502-509.
57. Coupland SE, Campbell I, Damato B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: risk factors and influence on survival probability. *Ophthalmology.* 2008;115:1778-1785.
58. Eskelin S, Pyrhönen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivelä T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology.* 2000;107:1443-1449.
59. Dobner BC, Riechardt AI, Jousen AM, Englert S, Bechrakis NE. Expression of haematogenous and lymphogenous chemokine receptors and their ligands on uveal melanoma in association with liver metastasis. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:638-644.
60. Van den Bosch T, Koopmans AE, Vaarwater J, van den Berg M, de Klein A, Verdijk RM. Chemokine receptor CCR7 expression predicts poor outcome in uveal melanoma and relates to liver metastasis whereas expression of CXCR4 is not of clinical relevance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:7354-7361.
61. Gragoudas ES, Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Walsh SM, Finn SM, Munzenrider JE, Spar MD. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology.* 1991;98:383-389.
62. Singh AD, Borden EC. Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol Clin North Am.* 2005;18:143-150.
63. Damato BE, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, Douglas A, Howard P. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology.* 2007;114:1925-1931.
64. Damato BE, Dopierala JA, Coupland SE. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res.* 2010;16:6083-6092.
65. Damato BE, Dopierala J, Klaasen A, van Dijk M, Sibbring J, Coupland SE. Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: correlation with metastatic death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:3048-3055.
66. White VA, Chambers JD, Courtright PD, Chang WY, Horsman DE. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer.* 1998;83:354-359.
67. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res.* 2004;64:7205-7209.
68. Trolet J, Hupé P, Huon I, Lebigot I, Decraene C, Delattre O, Sastre-Garau X, Saule S, Thiéry JP, Plancher C, Asselain B, Desjardins L, Mariani P, Piperno-Neumann S, Barillot E, Couturier J. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:2572-2580.
69. Daniels AB, Lee JE, MacConaill LE, Palescandolo E, Van Hummelen P, Adams SM, DeAngelis MM, Hahn WC, Gragoudas ES, Harbour JW, Garraway LA, Kim IK. High throughput mass

- spectrometry-based mutation profiling of primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:6991-6996.
70. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457:599-602.
 71. Damato BE. Treatment selection for uveal melanoma. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:16-26.
 72. No authors listed. Mortality in patients with small choroidal melanoma. COMS report no. 4. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *ARC Ophthalmol*. 1997;115:886-893.
 73. No authors listed. Factors predictive of growth and treatment of small choroidal melanoma: COMS Report No. 5. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:1537-1544.
 74. Mashayekhi A, Shields CL, Rishi P, Atalay HT, Pellegrini M, McLaughlin JP, Patrick KA, Morton SJ, Remmer MH, Parendo A, Schlitt MA, Shields JA. Primary transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma in 391 cases: importance of risk factors in tumor control. *Ophthalmology*. 2015;122:600-609.
 75. Shields CL, Shields JA, Perez N, Singh AD, Cater J. Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: outcomes and limitations. *Ophthalmology*. 2002;109:225-234.
 76. Diener-West M, Earle JD, Fine SL, Hawkins BS, Moy CS, Reynolds SM, Schachat AP, Straatsma BR; Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma, III: initial mortality findings. COMS Report No. 18. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:969-982.
 77. Papageorgiou KI, Cohen VM, Bunce C, Kinsella M, Hungerford JL. Predicting local control of choroidal melanomas following Ru-106 plaque brachytherapy. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:166-170.
 78. Bartlema YM, Oosterhuis JA, Journée-De Korver JG, Tjho-Heslinga RE, Keunen JE. Combined plaque radiotherapy and transpupillary thermotherapy in choroidal melanoma: 5 years' experience. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1370-1373.
 79. Gragoudas ES. The Bragg peak of proton beams for treatment of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin*. 1980;20:123-133.
 80. Nauraye C, Mazal A, Delacroix S, Bridier A, Chavaudra J, Rosenwald JC. An experimental approach to the design of a scattering system for a proton therapy beam line dedicated to ophthalmological applications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;32:1177-1183.
 81. Desjardins L, Lumbroso-Le Rouic L, Levy-Gabriel C, Cassoux N, Dendale R, Mazal A, Delacroix S, Sastre X, Plancher C, Asselain B. Treatment of uveal melanoma by accelerated proton beam. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:41-57.
 82. Zehetmayer M. Stereotactic photon beam irradiation of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol*. 2012;49:58-65.
 83. Höcht S, Stark R, Seiler F, Heufelder J, Bechrakis NE, Cordini D, Marnitz S, Kluge H, Foerster MH, Hinkelbein W. Proton or stereotactic photon irradiation for posterior uveal melanoma? A planning intercomparison. *Strahlenther Onkol*. 2005;181:783-788.
 84. Zytkovicz A, Daftari I, Phillips TL, Chuang CF, Verhey L, Petti PL. Peripheral dose in ocular treatments with CyberKnife and Gamma Knife radiosurgery compared to proton radiotherapy. *Phys Med Biol*. 2007;52:5957-5971.

85. Simonová G, Novotný J Jr, Liscák R, Pilbauer J. Leksell gamma knife treatment of uveal melanoma. *J Neurosurg.* 2002;97(Suppl 5):635-639.
86. Modorati G, Miserocchi E, Galli L, Picozzi P, Rama P. Gamma knife radiosurgery for uveal melanoma: 12 years of experience. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:40-44.
87. Zehetmayer M, Kitz K, Menapace R, Ertl A, Heinzl H, Ruhswurm I, Georgopoulos M, Dieckmann K, Pötter R. Local tumor control and morbidity after one to three fractions of stereotactic external beam irradiation for uveal melanoma. *Radiother Oncol.* 2000;55:135-144.
88. Zorlu F, Selek U, Kiratli H. Initial results of fractionated CyberKnife radiosurgery for uveal melanoma. *J Neurooncol.* 2009;94:111-117.
89. Zehetmayer M. Stereotactic photon beam irradiation of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol.* 2012;49:58-65.
90. Guyer DR, Mukai S, Egan KM, Seddon JM, Walsh SM, Gragoudas ES. Radiation maculopathy after proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Ophthalmology.* 1992;99:1278-1285.
91. Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, Zijlmans HJ, Lau C, Eilers PH, Keunen JE, Jager MJ. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:1428-1434.
92. Shah SU, Shields CL, Bianciotto CG, Iturralde J, Al-Dahmash SA, Say EA, Badal J, Mashayekhi A, Shields JA. Intravitreal bevacizumab at 4-month intervals for prevention of macular edema after plaque radiotherapy of uveal melanoma. *Ophthalmology.* 2014;121:269-275.
93. Finger PT, Chin KJ. Antivascular endothelial growth factor bevacizumab for radiation optic neuropathy: secondary to plaque radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82:789-798.
94. Shields CL, Naseripour M, Cater J, Shields JA, Demirci H, Youseff A, Freire J. Plaque radiotherapy for large posterior uveal melanomas (> or =8-mm thick) in 354 consecutive patients. *Ophthalmology.* 2002;109:1838-1849.
95. Puusaari I, Heikkonen J, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Iodine brachytherapy as an alternative to enucleation for large uveal melanomas. *Ophthalmology.* 2003;110:2223-2234.
96. Damato BE. Progress in the management of patients with uveal melanoma. The 2012 Ashton Lecture. *Eye (Lond).* 2012;26:1157-1172.
97. Field MG, Harbour JW. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol.* 2014;25:234-239.
98. Luke JJ, Triozzi PL, McKenna KC, Van Meir EG, Gershenwald JE, Bastian BC, Gutkind JS, Bowcock AM, Streicher HZ, Patel PM, Sato T, Sossman JA, Sznol M, Welch J, Thurin M, Selig S, Flaherty KT, Carvajal RD. Biology of advanced uveal melanoma and next steps for clinical therapeutics. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;28:135-147.
99. Abildgaard SK, Vorum H. Proteomics of uveal melanoma: a minireview. *J Oncol* 2013;2013:820953.
100. I. W. Y. Mak, N. Evaniew, and M. Ghert, "Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment," *American Journal of Translational Research*, vol. 6, no. 2, pp. 114–118, 2014.
101. D. G. Hackam and D. A. Redelmeier, "Translation of research evidence from animals to humans," *The Journal of the American Medical Association*, vol. 296, no. 14, pp. 1731–1732, 2006.

102. G. Damia and M. D'Incalci, "Contemporary pre-clinical development of anticancer agents—what are the optimal preclinical models?" *European Journal of Cancer*, vol. 45, no. 16, pp. 2768–2781, 2009.
103. H. E. Grossniklaus, S. Dithmar, and D. M. Albert, "Animal models of uveal melanoma," *Melanoma Research*, vol. 10, no. 3, pp. 195–211, 2000.
104. Marta M. Stei, Karin U. Loeffler, Frank G. Holz, and Martina C. Herwig, "Animal Models of Uveal Melanoma: Methods, Applicability, and Limitations", Hindawi Publishing Corporation, *BioMed Research International* Volume 2016, Article ID 4521807, 9 pages
105. M. Krause, K. K. Kwong, J. Xiong, E. S. Gragoudas, and L. H. Y. Young, "MRI of blood volume and cellular uptake of superparamagnetic iron in an animal model of choroidal melanoma," *Ophthalmic Research*, vol. 34, no. 4, pp. 241–250, 2002.
106. L. K. Hu, K. Huh, E. S. Gragoudas, and L. H. Y. Young, "Establishment of pigmented choroidal melanomas in a rabbit model," *Retina*, vol. 14, no. 3, pp. 264–269, 1994.
107. K.G.Griewank, H. Westekemper, R. Murali et al., "Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 12, pp. 3143–3152, 2013.
108. J. M. Mehnert and H. M. Kluger, "Driver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to-bedside studies," *Current Oncology Reports*, vol. 14, no. 5, pp. 449–457, 2012.
109. N. Amirouchene-Angelozzi, F. Nemat, D. Gentien et al., "Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target," *Molecular Oncology*, vol. 8, no. 8, pp. 1508–1520, 2014.
110. I. H. Bronkhorst and M. J. Jager, "Inflammation in uveal melanoma," *Eye*, vol. 27, no. 2, pp. 217–223, 2013.
111. S. Schiffner, B. M. Braunger, M. M. de Jel, S. E. Coupland, E. R. Tamm, and A. K. Bosserhoff, "Tg(*Grm1*) transgenic mice: a murine model that mimics spontaneous uveal melanoma in humans?" *Experimental Eye Research*, vol. 127, pp. 59–68, 2014.
112. J. L.-Y. Huang, O. Urtatiz, and C. D. Van Raamsdonk, "Oncogenic G protein GNAQ induces uveal melanoma and intravasation in mice," *Cancer Research*, vol. 75, no. 16, pp. 3384–3397, 2015.
113. H. Shahidipour, S. E. Coupland, D. Moss, B. E. Damato, and H. Kalirai, "Chick embryo model systems to study uveal melanoma metastasis," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 55, no. 13, article 5075, 2014.
114. R. Folberg, L. Leach, K. Valyi-Nagy et al., "Modeling the behavior of uveal melanoma in the liver," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48, no. 7, pp. 2967–2974, 2007.
115. H. Li, H. Alizadeh, and J. Y. Niederkorn, "Differential expression of chemokine receptors on uveal melanoma cells and their metastases," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 49, no. 2, pp. 636–643, 2008.
116. I. C. Notting, J. T. Buijs, I. Que et al., "Whole-body bioluminescent imaging of human uveal melanoma in a new mouse model of local tumor growth and metastasis," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 46, no. 5, pp. 1581–1587, 2005.
117. D. M. Albert, J. A. Shaddock, J. L. Craft, and J. Y. Niederkorn, "Feline uveal melanoma model induced with feline sarcoma virus," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 20, no. 5, pp. 606–624, 1981.

118. D.M. Albert, A. S. Rabson, and A. J. Dalton, “In vitroneoplastic transformation of uveal and retinal tissue by oncogenic DNA viruses,” *Investigative Ophthalmology*, vol. 7, no. 4, pp. 357–365, 1968.
119. D. Tormo, A. Ferrer, E. Gaffal et al., “Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation,” *The American Journal of Pathology*, vol. 169, no. 2, pp. 665–672, 2006.
120. Garcia Gonzalez et al., “Comparative Study of Experimental Ocular Melanoma Using Two Implantation Techniques of B16-F10 Melanocytes”, *Pigment Cell Res* 1995; 8:179-179
121. Edita Jeklova, Lenka Leva, Zoran Jaglic, Martin Faldyna, “Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model”, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122 (2008) 231–240
122. Paula L. Blanco, Jean Claude A. Marshall, Emilia Anteck, Sonia A. Callejo, Joao P. Souza Filho, Vinicius Saraiva, and Miguel N. Burnier, Jr, “Characterization of Ocular and Metastatic Uveal Melanoma in an Animal Model”, *IOVS*, December 2005, Vol. 46, No. 12
123. Tsiapa I, Tsilimbaris MK, Papadaki E, Bouziotis P, Pallikaris IG, Karantanas AH3, Maris TG. High resolution MR eye protocol optimization: Comparison between 3D-CISS, 3D-PSIF and 3D-VIBE sequences. *Phys Med*. 2015;31:774-80
124. Πηγή Φωτογραφιών : <https://eyecancer.com>
125. Πηγή Φωτογραφιών : “International Journal of Case Reports and Images” - <http://www.ijcasereportsandimages.com>