

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Αν. Καθ. Αγγ. Ρουσσάκη - Σούλτσε

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ

ΜΕΛΑΝΩΜΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ Β. ΡΑΜΜΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ - ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5472/1
Ημερ. Εισ.: 21-07-2009
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
616.994 77
ΡΑΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083623

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Αν. Καθ. Αγγ. Ρουσσάκη - Σούλτσε

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ

ΜΕΛΑΝΩΜΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ Β. ΡΑΜΜΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ - ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2005

"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου

Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα"

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αντώνιος Μανιάτης

Καθηγητής Μικροβιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Ευάγγελος Αθανασίου

Επικ. Καθηγητής Χειρουργικής

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Επιβλέπων: Αγγ. Ρουσσάκη - Σούλτσε

Αν. Καθηγήτρια Δερμ/γίας – Αφροδ/γίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αντώνιος Μανιάτης

Καθηγητής Μικροβιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Ευάγγελος Αθανασίου

Επικ. Καθηγητής Χειρουργικής

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Αγγ. Ρουσσάκη - Σούλτσε

Αν. Καθηγήτρια Δερμ/γίας – Αφροδ/γίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

4. Πετεινακη Εφη

Επικ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5. Χατζηθεοφίλου Κων/νος

Καθηγητής Χειρουργικής

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6. Μολυβδας Πασχάλης

Καθηγητής Φυσιολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στην Καθηγήτριά μου

Αγγελική Ρουσσάκη – Σούτσε με αγάπη,
σεβασμό, εκτίμηση και ευγνωμοσύνη

Στην Εύα

Στο Βασίλη

Στους γονείς μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πέρασαν έξι χρόνια από τότε που συνάντησα την καθηγήτριά μου κ. Αγγελική Ρουσσάκη και πέντε από τη στιγμή που με τίμησε και με εμπιστεύθηκε στην εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Η κεντρική ιδέα για το θέμα της προήλθε από το γεγονός της αυξανόμενης επίπτωσης του μελανώματος στο γενικό πληθυσμό κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών η οποία έχει προκαλέσει πολλή ερευνητική εργασία, στοχεύοντας να προσδιορίσει την πιθανή σχέση μεταξύ των παλαιών και νέων αιτιολογικών παραγόντων που λαμβάνουν μέρος στην παθογένεση αυτού του όγκου. Η συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης του δέρματος με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων papillomavirus (HPV) και του καρκίνου του δέρματος εκτός μελανώματος επί ηλιοεκτεθειμένων περιοχών δέρματος προσδιορίστηκε αρχικά στους ασθενείς με μυρμηκιοειδή επιδερμοδυσπλασία των Lewandowsky και Lutz και αργότερα στους ασθενείς παραλήπτες οργάνων από μεταμόσχευση. Ο ρόλος της μόλυνσης HPV στην καρκινογένεση δέρματος ως συμβάλλον παράγοντας σε συνδυασμό με την ηλιακή UV έκθεση, την κατανάλωση τσιγάρων και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος υποστηρίζεται στη λογοτεχνία ^{71, 72}.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να καθοριστεί η παρουσία η όχι του DNA του HPV στα δείγματα βιοψιών των μελανωμάτων που μελετήθηκαν και να αξιολογηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της μόλυνσης με HPV, της ηλιακής UV έκθεσης, της κατανάλωσης καπνού και της κλινικής έκβασης αυτών των πασχόντων από κακόηθες μελανωμα ασθενών.

Στην πολύχρονη και επίπονη αυτή ερευνητική εργασία τα χρόνια αυτά, μου συμπαραστάθηκε καθοδηγώντας με σαν δασκάλα και φίλη. Μου δίδαξε πρώτη τις αρχές και την ομορφιά της Δερματολογίας, μιας ειδικότητας που το μεγαλείο της έχει να κάνει με την ομορφιά των άπειρων εικόνων των δερματικών παθήσεων που αυτή πραγματεύεται και θεραπεύει.

Μου συμπαραστάθηκε σε δύσκολες στιγμές και με συμβούλευσε για την καριέρα μου. Αν έχω επιτύχει κάτι μέχρι τώρα αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη τύχη που είχα να γνωρίσω και να έχω πλάι μου στην αρχή της καριέρας μου την καθηγήτρια και άνθρωπο Αγγελική Ρουσσάκη.

Την ευγνωμονώ και την τιμώ για πάντα.

Εκφράζω επίσης τις βαθιές και ειλικρινές ευχαριστίες μου στον παθολογοανατόμο Αναστάσιο Τερζή καθώς και στο προσωπικό του παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Γεν. Νοσοκομείου Λάρισας όπως επίσης και στον Διευθυντή του Ογκολογικού Σταθμού Λάρισας Νίκο Αρχοντόνη και το προσωπικό του Ογκολογικού Σταθμού για το υλικό που μου παραχώρησαν ώστε να γίνει δυνατή η ερευνητική μου εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθειά τους στη μελέτη μου την Επικ.Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Πετεινάκη και τον Δ/ντή του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Παν/κού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Αντώνη Μανιάτη.

Τέλος, θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον Μοριακό Βιολόγο Φανούρη Κοντο για την πολύωρη, επίπονη και εξειδικευμένη επιστημονική δουλειά που έκανε μαζί μου στο πειραματικό μέρος της μελέτης στο εργαστήριο της Μικροβιολογίας του Παν/κού Νοσ/μείου Λάρισας.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα	ΧΡΗΣΤΟΣ ΡΑΜΜΟΣ
Όνομα Πατρός	ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ
Όνομα Μητρός	Στυλιανή
Διεύθυνση	Δημοσθένους 6 Λάρισα
Τηλέφωνο	2410230568 -6945988049
e-mail	drrammos@hotmail.com
ΑΦΜ	037283090
Διεύθυνση Ιατρείου	Νεοφύτου 1 Λάρισα
Τηλ. Ιατρείου	2410284007
Προσωπικές Πληροφορίες	
	Ημερ. Γέννησης 12/3/1970
	Τόπος Γέννησης Λάρισα
	Οικογεν. κατάσταση Έγγαμος (1 παιδί)
	Εθνικότητα Ελληνική
Ημ/νία Λήψης Πτυχίου Ιατρικής Α.Π.Θ.:	7/7/93
Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος:	12678: 22/7/93
	Δ/νση Υγιεινής/Νομαρχία Λάρισας
Τίτλος Ειδικότητας Δερμ/γίας Αφροδ/γίας:	Αριθ. Πρωτ. Γ2/46.076/5/12/02
	Δ/νση Δημόσιας Υγείας κ Υγιεινής
	Νομαρχιακή Αυτοδ/ση Θεσ/νίκης
Άδεια Λειτουργίας Ιδιωτικού Ιατρείου Δερ/γου Αφρ/γου στη Λάρισα:	Αριθ. Πρωτ. 9344: 16/12/2002
Εκπαίδευση	Κατά το έτος 1987 μέσω των Γενικών εξετάσεων έγινε η εισαγωγή μου στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (θέση 31 σε σύνολο 220

	<p>εισακτέων). Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου έλαβα υποτροφία από το ΙΚΥ ευρισκόμενος στους 10 πρώτους σε επίδοση φοιτητές της Σχολής μου κατά το 2^ο, 3^ο, 4^ο, και 5^ο, έτος των σπουδών μου.</p>
Κατάρτιση-Επιμόρφωση	<p>Τον Απρίλιο του 1991 συμμετείχα στο 2^ο Πανελλήνιο Φοιτητικό Συνέδριο με εργασία της Δερματολογικής Κλινικής του ΑΠΘ. Έλαβα το πτυχίο μου στις 7/7/1993 με βαθμό 8,12. Κατά τα έτη 1999-2002 εκπονώ την διδακτορική μου διατριβή στην Ιατρική σχολή Λάρισας με θέμα HPV και κακόηθες μελανωμα (Χρησιμοποιώντας στην ερευνητική μου εργασία την μέθοδο Polymerase chain reaction - PCR για ανίχνευση HPV, μετά από εκπαίδευση στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του καθηγητή κ.Μανιάτη στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας).</p> <p>Από τον 10/2000 έως 1/2001 μετεκπαιδεύτηκα μέσω του προγράμματος ERASMUS-SOCRATES στην Πανεπιστημιακή δερματολογική κλινική του πανεπιστημίου Ροστόκ Γερμανίας στους τομείς της Δερματοχειρουργικής, Δερματικής ογκολογίας, Αλλεργιολογίας, Φωτοθεραπειών, & Laser θεραπειών στη Δερματολογία.</p>
Εργασιακή Εμπειρία	<p>Εργάστηκα στο Αγροτικό Ιατρείο Εξοχής Ν.Πιερίας κατά τα έτη 1993-1994.</p> <p>Τον Φεβρουάριο 1996 έγινα πλήρες μέλος του General Medical Council της Μεγάλης Βρετανίας. Κατά τα έτη 1995-1996 εργάστηκα ως Ιατρός της Ογκολογικής Κλινικής του ΓΝΛ ασκούμενος στην Παθολογία για ένα έτος, άσκηση που απαιτείται για τη λήψη της ειδικότητας της Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας. Στη συνέχεια εργάστηκα για περίοδο 11 μηνών ως υπεράριθμος ιατρός στην Καρδιολογική Κλινική του ΓΝΛ. Από τον Σεπτέμβριο του 1998 εργάζομαι ως αμ. επιστημονικός συνεργάτης στο εργαστήριο Δερματολογίας- Αφροδισιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.</p> <p>Τον Ιούνιο 1999 ξεκίνησα τη διδακτορική μου διατριβή στο Δερματολογικό τμήμα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από τις 3/9/99 έως 3/9/02 ειδικεύτηκα στην κλινική ειδικότητα της Δερματολογίας- Αφροδισιολογίας στο Νοσοκομείο Δερματικών & Αφροδισίων νόσων Θεσ/νίκης.</p> <p>Από 1/1/2003 διατηρώ ιδιωτικό ιατρείο στη Λάρισα και κατέχω έμμισθη θέση στον ΟΑΕΕ-ΤΕΒΕ για το έτος 2004-05.</p>
Εθελοντική Εμπειρία	<p>Κατά τα έτη 1993-1994 ήμουν βοηθός στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του καθ. Κ. Κρικέλη της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από το έτος 1999 είμαι επιστημονικός βοηθός της Δερματολογικής κλινικής της Ιατρικής σχολής Λάρισας (διευθύντρια Καθ. Α. Ρουσσάκη)</p>
Ενασχολήσεις/Ενδιαφέροντα	<p>Κατά τα έτη 2000-2001 εργάστηκα περιστασιακά στο τμήμα Laser και Ιατρικής αισθητικής των κερτων MEDI JEUNESSE Θεσσαλονίκης, για την απόκτηση εργασιακής εμπειρίας στον</p>

επιστημονικό κλάδο που θα ασχοληθώ επαγγελματικά.

Από το έτος 2003 είμαι επιστημονικός συνεργάτης στο τμήμα εφαρμογών Laser των LASERLINE CLINICS Λάρισα.

Γλώσσες

Γερμανικά

Αγγλικά

Γαλλικά

Ευρεσιτεχνίες και δημοσιεύσεις

EADV, Geneva 2000 έκανα την ακόλουθη poster ανακοίνωση: Hypertrophic scars and keloids: silicon gel sheet and betamethasone acetate + betamethasone disodium phosphate injection treatment.

Στο Συνέδριο της Διεθνούς Society of Dermatology στη Ρόδο, Σεπτεμβριος 2001, έκανα 3 ανακοινώσεις που ήταν: α) the increasing incidence of malignant melanoma in Greece during the last decade, β) the evaluation of clinical efficacy and safety of adapalene 0.1% gel vs tretinoin 0.025% cream with a multicenter comparison in patients with acne vulgaris και επίσης γ) Mycophenolate mophetyl effectiveness in recalcitrant Pemphigus vulgaris.

Τον Οκτώβριο 2001 στο EADV στο Μόναχο έκανα την ακόλουθη poster ανακοίνωση: Chemical peelings in Northern Greece.

Εξάλλου, στο Πανερωπαϊκό EADV 2002 τον Οκτώβριο στη Πράγα, ανακοινώθηκαν 2 εργασίες μου με θέματα: α) Indications and effectiveness of intermittent isotretinoin in acne treatment και β) Assesment of local bath-PUVA therapy with 8-MOP ethanolic lotion for the treatment of chronic palmoplantar eczema.

Ξένες Δημοσιεύσεις: Το Σεπτέμβριο του 2005 έγιναν δεκτά προς δημοσίευση τα εξής δύο άρθρα μου α. "Increasing incidence of melanoma in central Greece: a retrospective epidemiological study" στο διεθνές ιατρικό περιοδικό International journal of Tissue Reactions-INT.J.TISSUE REACT.XXVII(4)173-179(2005), β. "Identification of Human papillomavirus (HPV) DNA in melanoma biopsy specimens of Greek population" στο διεθνές περιοδικό International journal of Clinical Pharmacology Research-INT.J.CLIN.PHARM.RES.XXV(3)145-150(2005).

Συστάσεις

1. Αγγελικη-Βικτωρία Ρουσσάκη Αναπλ. Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. G. Gross Καθηγητής Δερματολογίας – Αφροδισιολογίας Πανεπιστημίου ROSTOCK Γερμανίας

3. Αρίστιππος Μηνάς Καθηγητής Δερματολογίας –

Αφροδισιολογίας Θεσσαλονίκης

4. Αντώνης Μανιάτης Καθηγητής Μικροβιολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5. Κ. Ι. Γουργουλιάνης, Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6. Dr Βασίλης Κρικέλης Bsc., Dip. Bact., Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7. Ν. Αρχοντώνης, Δ/ντής Ογκολογικής Κλινικής ΓΝΛ

8. Απ. Καραντάνας MD, Ph.D., Δ/ντης Αξονικού Τομογράφου
ΓΝΛ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	11
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	15
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	17
SUMMARY	19
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
1. ΜΕΛΑΝΩΜΑ	23
1.1 ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	23
1.2 ΠΡΟΛΗΨΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ 21Ο ΑΙΩΝΑ.....	23
1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
1.2.2 ΠΡΟΛΗΨΗ.....	24
Α. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΤΟΜΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	24
Β. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	25
1.2.3 ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	26
1.2.4 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	27
Α. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	28
Β. ΒΙΟΨΙΑ ΤΟΥ ΦΡΟΥΡΟΥ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ (Β.Φ.Λ.).....	29
Γ. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟ-ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	31
Δ. ΕΜΒΟΛΙΑ.....	32
Ε. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	34
1.2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	34
1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΓΚΑΙΡΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ.....	35
1.3.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	35
1.3.2 ΔΕΡΜΑΤΟΣΚΟΠΗΣΗ (ELM).....	36
1.4 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ.....	41
1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	41
1.5.1 ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΒΛΑΒΕΣ.....	42
1.5.2 ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ.....	42
1.5.3 ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ (ΑΤΥΠΟΙ ΣΠΙΛΟΙ).....	46
1.5.4 ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΣΠΙΛΟΙ.....	50
1.5.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	56
1.5.6 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ.....	59
1.5.7 ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ.....	64
1.6 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ & ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	67
1.6.1 UV ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ.....	68
1.6.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	69
1.6.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	70
1.6.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ.....	73
1.6.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	75
1.6.6 ΠΡΟΛΗΨΗ.....	78
1.7 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....	79
1.8 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	80
2. HPV (HUMAN PAPILLOMA VIRUS).....	81
2.1 ΛΟΙΜΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ.....	81
2.1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	81
2.1.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	83
2.1.3 ΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.....	86
2.2 ΙΟΙ: ΑΝΑΓΚΑΣΤΙΚΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΑ HPV-DNA VIRUS.....	87
2.3 ΜΥΡΜΗΚΙΕΣ ΚΑΙ ΚΟΝΔΥΛΩΜΑΤΑ.....	92
2.4 ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV.....	97

2.5 ΈΓΚΡΙΣΗ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΗΡV ΤΕΣΤ	98
2.6 ΙΟΥΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV) - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	100
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	103
1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	105
1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ PCR ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΔΗΛΑΔΗ ΑΝ ΥΠΑΡΧΕΙ DNA ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ 48 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	107
1.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ PCR ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	108
1.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	109
1.3.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	109
1.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΤΜΗΜΑΤΑ DNA ΓΝΩΣΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ.....	110
1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	111
1.4.1 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΗΡV (ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ).....	112
1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ PCR.....	112
1.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΙΛΤΡΩΝ (CRUDE DNA).....	119
1.6.1 ΥΛΙΚΑ.....	119
1.6.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	119
1.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ.....	120
1.8 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ PCR.....	121
1.9 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR.....	123
1.10 ΕΚΤΕΛΕΣΗ.....	124
1.10.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	125
1.11 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ.....	127
1.11.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ.....	127
1.11.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΣΕ ΛΕΚΑΝΑΚΙΑ.....	128
1.12 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	131
1.12.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	131
1.12.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	133
2. ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ ΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΔΕΚΑΕΤΙΑ	135
2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	135
2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	137
2.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	138
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	139
2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	141
2.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	141
3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΨΙΩΝ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	151
3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	151
3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	153
3.3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	154
3.3.1 ΥΛΙΚΟ ΒΙΟΨΙΩΝ.....	154
3.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΩΝ (PCR)	154
3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	155
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	156
3.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	157
HPV.....	162
Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	167
1. ΚΑΚΟΗΘΗ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΑ ΝΟΜΟΥ ΛΑΡΙΣΑΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ, 1988-1998	167
2. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	169
Δ. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΕΙΣ	170
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	171

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΟΒΑΘΡΟ: Η έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη (UV) ακτινοβολία είναι πιθανώς η αρχική περιβαλλοντική αιτία της πρόκλησης μελανώματος για τα δύο τρίτα αυτού του όγκου. Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) μελετώνται για να συνδεθούν πιθανώς με τους πολυάριθμους κακοήθεις όγκους του δέρματος συμπεριλαμβανομένων και των καρκινωμάτων δέρματος εκτός μελανώματος. Ο ρόλος της μόλυνσης από HPV στην ανάπτυξη μελανώματος είναι υπό διερεύνηση.

ΣΤΟΧΟΙ: Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθούν τα δείγματα βιοψιών μελανώματος του ελληνικού πληθυσμού για την παρουσία του DNA του HPV και να καθοριστεί η πιθανή σχέση μεταξύ της μόλυνσης HPV, της κατανάλωσης τσιγάρων, της έκθεσης στον ήλιο και της κλινικής έκβασης των ασθενών πασχόντων από μελάνωμα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Τα είκοσι εννιά δείγματα βιοψιών μελανώματος, 20 από πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα και 9 από μετάσταση κακοήθους μελανώματος ελήφθησαν από 29 ασθενείς. Τα δείγματα βιοψιών βρίσκονταν διατηρημένα-μονιμοποιημένα σε block παραφίνης. Η ομάδα ελέγχου αποτελείτο από τρεις συνδεσμικούς σπιλοκυτταρικούς σπίλους, που επιβεβαιώθηκαν ιστολογικά από τρεις ασθενείς και τρεις βιοψίες από φυσιολογικό δέρμα που ελήφθησαν από τρία κατά τ'άλλα υγιή άτομα. Η παρουσία και οι τύποι των DNA HPV αξιολογήθηκαν από την ενίσχυση ενός τεμαχίου της L1 περιοχής από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - polymerase chain reaction (pcr) που συνδυάστηκε με την ανάλυση περιορισμού μήκους τεμαχίων (RFLP). Σε κάθε δείγμα βιοψιών που αξιολογήθηκε, HPV 6, HPV 11, HPV 16 και HPV 18 θετικοί μάρτυρες ελέγχου συμπεριλήφθηκαν στην pcr. Τα επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενών συμπεριλαμβανομένης της κατανάλωσης τσιγάρου, του επαγγέλματος και της προηγούμενης μόλυνσης με HPV καταγράφηκαν επίσης.

ΟΔΗΓΟΙ: Πέντε από 29 (17.20%) δείγματα μελανώματος βιοψιών ήταν θετικά για το DNA HPV. Αντιθέτως, HPV δεν ανιχνεύθηκε σε οποιαδήποτε από τα δείγματα βιοψιών της ομάδας ελέγχου (0/6). HPV προερχόμενος από ιό τύπος 16 βρέθηκε σε δύο δείγματα και HPV

6 DNA σε τρία. Τα αποτελέσματά μας, σχετικά με την πιθανή σχέση μεταξύ του μελανώματος και του DNA HPV, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p>0.05$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα συμπεράσματά μας προτείνουν ότι η UV ηλιακή έκθεση παραμένει η κύρια αιτία του μελανώματος στην περιοχή μας και φαίνεται ότι το κάπνισμα συμβάλλει στη φτωχότερη έκβαση των ασθενών που πάσχουν από μελάνωμα. Ο ρόλος της δερματικής μόλυνσης HPV στην παθογένεση του μελανώματος παραμένει αόριστος.

Βασικές λέξεις: HPV, κάπνισμα, UV-έκθεση, μελάνωμα.

SUMMARY

BACKGROUND: Exposure to solar ultraviolet (UV) radiation is probably the primary environmental cause of melanoma accounting for about two thirds of this tumor. Human papillomaviruses (HPVs) are considered to be associated with numerous malignant tumors including non-melanoma skin carcinomas. The role of HPV infection in melanoma development is obscure.

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate melanoma biopsy specimens of Greek population for the presence of HPV DNA and to determine the possible relationship between HPV infection, smoking consumption, sun exposure and the clinical outcome of melanoma patients.

MATERIAL AND METHODS: Twenty-nine melanoma biopsy specimens, 20 from primary cutaneous melanoma and 9 from melanoma metastasis were obtained from 29 patients. The biopsy samples were formalin-fixed and paraffin wax-embedded. The control group was consisted of three junctional melanocytic naevi, histologically confirmed, from three patients and three punch biopsies from normal skin that were obtained from three other healthy individuals. The presence and types of HPV DNA were assessed by the amplification of a fragment of the L1 region by consensus primer polymerase chain reaction (PCR) combined with Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLPA). In each biopsy specimen that was evaluated, HPV 6, HPV 11, HPV 16 and HPV 18 positive controls from genital HPV lesions were included. Epidemiological data of the patients including tobacco consumption, occupation and history of previous HPV infection were also recorded.

RESULTS: Five of 29 (17,20%) biopsy melanoma specimens were positive for HPV DNA. Conversely, HPV was not detected in any of the biopsy specimens of the control group (0/6). HPV viral type 16 was found in two samples and HPV 6 DNA in three. Our results, regarding the possible relationship between melanoma and HPV DNA, weren't statistically significant ($p>0.05$).

CONCLUSIONS: Our findings suggest that UV sun exposure remains the main cause of melanoma in our region and it seems that smoking contributes to the poorer outcome of melanoma patients. The role of cutaneous HPV infection in the pathogenesis of melanoma remains elusive.

Key words: HPV, smoking, UV-exposure, Melanoma

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΕΛΑΝΩΜΑ

1.1 ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.

1.2 ΠΡΟΛΗΨΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ 21Ο ΑΙΩΝΑ

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κακόηθες μελάνωμα του δέρματος (Κ.Μ.) αποτελεί έναν αυξανόμενο και σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι η αύξηση της επίπτωσης του Κ.Μ. είναι της τάξης του 3-8%, γεγονός που καθιστά το Κ.Μ. ένα από τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα κακοήγη νεοπλάσματα στον άνθρωπο¹. Με βάση τα σύγχρονα δεδομένα, 1 στους 75 Ευρωπαίους θα νοσήσει από Κ.Μ. Αντιπροσωπεύει το 3% όλων των κακοηθών νεοπλασιών και ευθύνεται για το 1% των θανάτων από καρκίνο (με εξαίρεση τους μη μελανωματικούς όγκους του δέρματος)².

Αν και η θνητότητα από το Κ.Μ. αυξάνεται ετησίως κατά 2%, η πενταετής επιβίωση αυξήθηκε επίσης από 40% το 1940 σε >80%. Το γεγονός αυτό αποδίδεται περισσότερο στην πρόωμη διάγνωση και λιγότερο στην εφαρμογή της ανοσοχημειοθεραπείας. Όλοι οι ερευνητές συμφωνούν ότι η επιβίωση στο Κ.Μ. σχετίζεται άμεσα με την πρόωμη διάγνωση, αφού το πάχος διήθησης (μετρούμενο σε mm κατά Breslow) είναι ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας. Η πενταετής επιβίωση στα λεπτά Κ.Μ. (<1,5 mm) είναι 94%, στα μέσου πάχους Κ.Μ. (1,5-4 mm) είναι 68% και στα μεγαλύτερα Κ.Μ. (>4 mm) 42%³⁻⁴. Παρά την αύξηση της διετούς επιβίωσης, η θνητότητα αυξάνεται λόγω της εκθετικής αύξησης της επίπτωσης και της υψηλής μεταστατικής ικανότητας του όγκου αυτού⁵⁻⁶.

Για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μετάστασης, πρέπει το Κ.Μ. να ανιχνευθεί έγκαιρα. Άλλωστε, στις περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις αναπτύσσεται επί δυσπλαστικών, συγγενών ή επίκτητων σπύλων⁷. Για το λόγο αυτό, η ενημέρωση του κοινού και των ιατρών, η γρήγορη ανακάλυψη της νεοπλασματικής εξαλλαγής των σπύλων και η αποτελεσματική

θεραπεία συνιστούν τους κύριους στόχους στην αυγή του 21ου αιώνα.

1.2.2 ΠΡΟΛΗΨΗ

A. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΤΟΜΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί ότι ευνοούν την ανάπτυξη του Κ.Μ. είναι η έντονη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, το σύνδρομο των άτυπων σπύλων, τα ηλιακά εγκαύματα 2ου βαθμού, η ανοσοκαταστολή, το τεχνητό μαύρισμα, το υψηλό κοινωνικοοικονομικό περιβάλλον και το ιστορικό Κ.Μ. σε συγγενή πρώτου βαθμού ⁷.

Φαινοτυπικοί παράγοντες - όπως τα γαλάζια-πράσινα μάτια, οι ξανθιές-κόκκινες τρίχες, οι εφηλίδες, η φωτοευαισθησία, η αδυναμία μαυρίσματος στον ήλιο συσχετίστηκαν επίσης με το Κ.Μ. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι το ιστορικό καρκίνου του δέρματος, ο μεγάλος αριθμός σπύλων στην παιδική ηλικία και η μελαγχρωματική ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum) ⁸.

Με τη μέθοδο της πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης βρέθηκε ότι 6 παράγοντες επιδρούν ανεξάρτητα στον κίνδυνο εμφάνισης του Κ.Μ. ⁹: α) Οικογενειακό ιστορικό Κ.Μ., β) ξανθιές-κόκκινες τρίχες, ανοιχτόχρωμο δέρμα, γ) εφηλίδες στην άνω ράχη, δ) τρία ή περισσότερα ηλιακά εγκαύματα πριν την ηλικία των 20 ετών, ε) 3 ή περισσότερα έτη με θερινή εργασία στον ήλιο κατά την εφηβική ηλικία, στ) ακτινική κεράτωση. Άτομα με 1-2 παράγοντες έχουν 3,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για Κ.Μ. από τον υπόλοιπο πληθυσμό, ενώ στα άτομα με 3-4 παράγοντες ο σχετικός κίνδυνος είναι 20 φορές μεγαλύτερος.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν επίσης στο Κ.Μ. είναι η διαμονή κοντά στον Ισημερινό, η μετανάστευση σε περιοχές με ηλιοφάνεια πριν την ηλικία των 10 ετών και η μείωση του όζοντος της ατμόσφαιρας. Ασθενείς με Κ.Μ. έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν και δεύτερο Κ.Μ. (4-30%) ¹⁰.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανάλυσης σύνδεσης σε οικογένειες με πολλαπλά περιστατικά μελανώματος, χαρτογραφήθηκε η γονιδιακή περιοχή που προδιαθέτει για Κ.Μ.

στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος⁹ (9p21)¹¹. Στη θέση αυτή εντοπίζεται το όγκο κατασταλτικό γονίδιο p16INK4, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνη-αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDKN4-CDKN6, αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Συνεπώς, μεταλλάξεις του γονιδίου p16 αίρουν τον ανασταλτικό έλεγχο στον κυτταρικό κύκλο, προδιαθέτοντας τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Μεταλλάξεις του p16 έχουν παρατηρηθεί σε 40-50% των ασθενών με οικογενές μελάνωμα και σε 25% των ασθενών με σποραδικό μελάνωμα. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις αυτές ήταν διπλές αντικαταστάσεις βάσεων κυττοσίνης-θυμίνης, που προκαλούνται σχεδόν αποκλειστικά από την υπεριώδη (UVB) ακτινοβολία¹². Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι σε ορισμένα Κ.Μ. το γονίδιο p16 μπορεί να είναι στόχος της μεταλλαξιογόνου δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η έρευνα για την ταυτοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου συνεχίζεται ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός γενετικά ατόμων με υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης του Κ.Μ.

B. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Ουσιαστικά, όλοι οι προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση Κ.Μ. σχετίζονται με τη φωτοευαισθησία και το μέγεθος της έκθεσης στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία. Η προστασία από την επίδραση του ήλιου είναι ο ακρογωνιαίος λίθος στην πολιτική της πρόληψης και ο στόχος των υπηρεσιών υγείας στις χώρες όπου το Κ.Μ. αυξάνεται ραγδαία. Έτσι, στις Η.Π.Α. ξοδεύονται 500 εκατομμύρια δολάρια σε αντιηλιακά προϊόντα και στην Αυστραλία το 74% του πληθυσμού χρησιμοποιεί καθημερινά αντιηλιακή προστασία¹³. Τόσο στα άτομα λευκής φυλής στη Χαβάη όσο και στους Αυστραλούς, ομάδες υψηλού κινδύνου με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης Κ.Μ. στον κόσμο, η συχνότητα εμφάνισης και η θνητότητα ελαττώνεται¹⁴.

Συμπερασματικά, τα μέχρι τώρα δεδομένα αναδρομικών ερευνών στις χώρες αυτές δείχνουν ότι η αντιηλιακή προστασία με επαρκή ρουχισμό, αποφυγή έκθεσης στον ήλιο το μεσημέρι και τακτική χρήση ευρέος φάσματος υψηλού δείκτη αντιηλιακών προϊόντων, είναι

δυνατό να ελαττώσει τον κίνδυνο Κ.Μ., σε ορισμένους πληθυσμούς.

1.2.3 ΠΡΩΙΜΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η πρώιμη αναγνώριση μιας ύποπτης μελαγχρωματικής βλάβης του δέρματος στηρίζεται στα εξής οδηγία κλινικά χαρακτηριστικά: Α: Ασυμμετρία, Β: Ανώμαλα όρια, Γ: Ανομοιογένεια χρώματος, Δ: Διάμετρος > 6 mm, Ε: Εκτροπή των χειλέων του σπίλου, ΣΤ: Απώλεια της επιπέδωσης του σπίλου.

Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται το αμελανωτικό Κ.Μ., το οποίο μπορεί να μοιάζει με πυογενές κοκκίωμα ή βασικοκυτταρικό επιθηλίωμα. Επίσης, το Κ.Μ. πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από τη σμηγματορροϊκή κερατίαση, τις εφηλίδες και τους καλοήθεις σπίλους.

Ιστολογικά, το Κ.Μ. χαρακτηρίζεται από άτυπα μελανοκύτταρα με αυξημένες μιτώσεις. Σε αδιαφοροποίητους όγκους, ειδικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (S-100, HMB45, Mel-45) βοηθούν στην οριστική διάγνωση, ιδιαίτερα σε ατρακτοκυτταρικούς όγκους που μοιάζουν με σάρκωμα, ακανθοκυτταρικό επιθηλίωμα, άτυπο ινοξάνθωμα.

Σημαντική είναι η συμβολή των ειδικών χρώσεων στη διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος, με άγνωστη πρωτοπαθή δερματική εστία. Το μελάνωμα αυτό αποτελεί το 4-10% των περιπτώσεων Κ.Μ. και εμφανίζεται συχνότερα ως λεμφαδενική διόγκωση και σπανιότερα ως υποδόρια ογκίδια και όγκοι του γαστρεντερικού σωλήνα. Στο μέλλον, οι ειδικές χρώσεις θα χρησιμεύουν στον καθορισμό υγιών ορίων εκτομής κατά την ταχεία βιοψία, επιτρέποντας πιο συντηρητικές χειρουργικές εκτομές.

Στους ασθενείς με σύνδρομο άτυπων σπίλων, η παρακολούθηση με φωτογράφιση των ύποπτων σπίλων οδηγεί στη βιοψία μιας δερματικής βλάβης με πρόσφατη αλλαγή των χαρακτηριστικών της (όρια, χρώμα, αιμορραγία).

Μία σύγχρονη διαγνωστική μέθοδος εκτίμησης των μελαγχρωματικών βλαβών του δέρματος είναι η δερματομικροσκόπηση¹⁵. Ο ύποπτος σπίλος εξετάζεται, μετά την

επίστρωση ελαιώδους διαλύματος με το δερματοσκόπιο (οφθαλμοσκόπιο με φακό μεγέθυνσης X10). Με τον τρόπο αυτό γίνονται ορατά χαρακτηριστικά του χόριου και της εν τω βάθει επιδερμίδας, τα οποία θέτουν άμεσα τη διάγνωση του Κ.Μ. in vivo. Στο μέλλον, η ψηφιακή ανάλυση των φωτογραφιών που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή αναμένεται να αυξήσει την πρώιμη διάγνωση του Κ.Μ., με βάση τις παρατηρούμενες μεταβολές στα ποσοτικά, μετρήσιμα χαρακτηριστικά της ύποπτης βλάβης (εμβαδόν, φωτεινότητα, βάθος διήθησης)¹⁶.

Η έγκαιρη διάγνωση του μελανώματος μπορεί να γίνει εφικτή με απλά κλινικά και εργαστηριακά μέσα (φωτεινή πηγή, μεγεθυντικός φακός, αεροστεγνοτήρας μαλλιών για τον έλεγχο του τριχωτού της κεφαλής). Η τακτική κλινική εξέταση σε άτομα υψηλού κινδύνου, αλλά και αυτοεξέταση από τον ίδιο τον ενδιαφερόμενο με τη βοήθεια καθρέπτη ή ενός δεύτερου προσώπου (για τον έλεγχο περιοχών της ράχης ή της κεφαλής) άρχισε να εφαρμόζεται στις Η.Π.Α. ετησίως. Το αποτέλεσμα είναι χιλιάδες μελανώματα να έχουν διαγνωσθεί σε αρχικό στάδιο. Άλλωστε, τα περισσότερα "λεπτά" Κ.Μ. είναι "κηλιδώδη" και απλώς αυξάνονται στη διάμετρο τους, πριν αποκτήσουν οζώδη χαρακτηριστικά. Ο στόχος είναι να ανακαλυφθούν τα λεπτά Κ.Μ., όταν είναι επίπεδα και θεραπεύσιμα χειρουργικά. Ο περιορισμός του ελέγχου του πληθυσμού στα άτομα με παράγοντες κινδύνου που αναφέρθηκαν παραπάνω, αναμένεται να ελαττώσει το κόστος μιας τέτοιας πολιτικής δημόσιας υγείας.

1.2.4 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Γενικότερα, το Κ.Μ. είναι ένα επιθετικό νεόπλασμα με υψηλή μεταστατική ικανότητα κυρίως προς τους λεμφαδένες, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο, τα οστά και το λεπτό έντερο. Επειδή οι κυριότεροι προγνωστικοί παράγοντες είναι το πάχος διήθησης κατά Brierslow και το στάδιο της νόσου (μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες). Οι θεραπευτικές επιλογές καθορίζονται από τους παράγοντες αυτούς.

Η πρωταρχική θεραπευτική μέθοδος είναι βέβαια η χειρουργική εκτομή που εξασφαλίζει ποσοστά πενταετούς επιβίωσης >94% στα λεπτά μελανώματα και 100% στα in situ μελανώματα. Η συμπληρωματική χημειοθεραπεία και οι ανοσολογικές θεραπείες με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες και εμβόλια, παρέχουν πρόσθετη θεραπευτική λύση στα πιο προχωρημένα μελανώματα. Σχήματα με συνδυασμό χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας δοκιμάζονται με επιτυχία, ενώ στο μεταστατικό μελάνωμα σταδίου IV τα αποτελέσματα είναι ακόμη απογοητευτικά με ποσοστά επιτυχίας της τάξης του 20% .

A. ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η σύγχρονη τάση της χειρουργικής θεραπείας του Κ.Μ. είναι η συντηρητικότερη εκτομή, δηλαδή με στενότερα όρια υγιούς δέρματος λιπώδους ιστού¹⁷. Προτείνεται από τους περισσότερους συγγραφείς όριο εκτομής 0,5 cm για το in situ Κ.Μ. και 1 cm για τα Κ.Μ. πάχους <1mm. Για τα Κ.Μ. πάχους 1-2 mm τα όρια εκτομής μπορεί να φθάνουν με ασφάλεια τα 2 cm, ενώ για τα βαθύτερα Κ.Μ. (έως 4 mm) τα 2-3 cm είναι αποδεκτά. Τα μεγάλα μελανώματα (>4 mm κατά Breslow) θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με όρια εκτομής τουλάχιστον 3 cm, ανάλογα βέβαια και με την ανατομική εντόπιση. Το βάθος εκτομής πρέπει να φθάνει μέχρι την υποκείμενη περιτονία, χωρίς να την περιλαμβάνει, αφού δεν διαπιστώθηκε όφελος από την αφαίρεση της.

Η ευρεία εκτομή του Κ.Μ. είναι αδύνατη σε ορισμένες ανατομικές θέσεις (πρόσωπο) χωρίς διαταραχή της κοσμητικής εμφάνισης. Τοπικοί κρημνοί ή ελεύθερα δερματικά μοσχεύματα ολικού πάχους χρησιμοποιούνται για την καλύτερη αποκατάσταση του ελλείμματος. Ορισμένοι χειρουργοί προτείνουν τη μικρογραφική χειρουργική του Mohs στη θεραπεία του μελανώματος επί κακοήθους εφηλίδος (lentigo Maligna Melanoma), γιατί εξασφαλίζει υγιή όρια εκτομής και συντηρητική εγχείρηση με καλό αισθητικό αποτέλεσμα¹⁸. Το μειονέκτημα είναι η αδυναμία τακτοποίησης των άτυπων μελανοκυττάρων στη ταχεία βιοψία. Γίνεται προσπάθεια ακριβέστερης εκτίμησης των ορίων εκτομής με τη χρήση

νεώτερων ειδικών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων (Mel-45).

Ο ρόλος της επιλεκτικής ή προφυλακτικής λεμφαδενεκτομής στους ασθενείς κλινικού σταδίου I, με Κ.Μ. μέσου βάθους (1,5-4 mm κατά Breslow) υπήρξε το αντικείμενο πολλών αντικρουόμενων ανακοινώσεων και εργασιών¹⁹⁻²⁰. Η γενικώς παραδεκτή άποψη είναι ότι οι ασθενείς που πρόκειται να ωφεληθούν από την εγχείρηση αυτή είναι όσοι έχουν λανθάνουσες μικρομεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες και μικρό κίνδυνο απομακρυσμένης διασποράς. Το Κ.Μ. μέσου πάχους (1-4 mm) μπορεί να υποκρύπτει λανθάνουσα νόσο στο 40% των περιπτώσεων και να εμφανίζει σπλαχνικές μεταστάσεις στο 10% των περιπτώσεων. Αντιθέτως, ασθενείς με Κ.Μ. > 4 mm έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες (60%) και ακόμα μεγαλύτερη πιθανότητα απομακρυσμένης μετάστασης (70-80%). Επομένως, οι ασθενείς αυτοί δεν θα κερδίσουν από την προφυλακτική λεμφαδενεκτομή περισσότερο χρόνο επιβίωσης στο σύνολο τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης WHO Trial No1, που αφορούσαν το Κ.Μ. ανεξαρτήτως του βάθους διήθησης, δεν έδειξαν να ωφελούνται οι ασθενείς από την Ε.Λ., ενώ η μελέτη WHO Trial No14 βρήκε καλύτερα ποσοστά επιβίωσης στους ασθενείς σταδίου III (με θετικούς λεμφαδένες). Όμως, η μελέτη Intergroup Melanoma Trial ανακάλυψε ότι η Ε.Λ. αυξάνει την ολική επιβίωση στους ασθενείς ηλικίας <60 έτη ή με Κ.Μ. πάχους 1-2 mm ανεξαρτήτως της ανατομικής θέσεως¹⁹. Οι κατήγοροι της Ε.Λ. αντιτάσσουν το πρόβλημα των επιπλοκών και κυρίως το μετεγχειρητικό λεμφοίδημα που μειώνει την ποιότητα ζωής. Στο καίριο ερώτημα: πώς να ταυτο-ττοιήσουμε τους ασθενείς με λανθάνουσες μικρο-λεμφαδενικές μεταστάσεις και καλή πρόγνωση, χωρίς σπλαχνική διασπορά, έρχεται να δώσει λύση μία σύγχρονη χειρουργική μέθοδος: η βιοψία του Φρουρού Λεμφαδένα.

B. ΒΙΟΨΙΑ ΤΟΥ ΦΡΟΥΡΟΥ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ (Β.Φ.Λ.)

Ο Φ.Λ. είναι το πρώτο λεμφογάγγλιο που δέχεται τη λέμφο της δερματικής περιοχής, όπου εντοπίζεται το Κ.Μ. Ο Φ.Λ. αναγνωρίζεται με τη βοήθεια της ενδοδερμικής έγχυσης

γύρω από τον όγκο κυανής χρωστικής (Patent V Blue dye) και ραδιοϊσοτόπου (Tc^{99m}), το οποίο ανιχνεύεται διεγχειρητικά με τη βοήθεια γ-κάμερας (C-Trak, Navigator)²¹. Μέχρι σήμερα, η ακρίβεια ανεύρεσης του Φ.Λ. ακόμα και με τοπική αναισθησία στα εξειδικευμένα Ογκολογικά Κέντρα ξεπερνά το 95%. Η ιστολογική εξέταση του Φ.Λ. με τη βοήθεια ειδικών χρώσεων (S-100, HMB45), προσδιορίζει την παρουσία μεταστατικών νεοπλασματικών μελανοκυττάρων κι επομένως σταδιοποιεί τον επιχώριο λεμφικό κόμβο. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ανέρχονται στο 1%. Με αυτόν τον τρόπο, ο ασθενής μπορεί να μην υποβληθεί στην Ε.Λ. χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος της ανεπαρκούς αντιμετώπισης στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Η εφαρμογή της Β.Φ.Λ. φαίνεται να ωφελεί τους ασθενείς με υψηλό μεταστατικό κίνδυνο, γιατί υποβάλλονται σε ολική θεραπευτική λεμφαδενεκτομή, αν ο Φ.Λ. αποδειχθεί θετικός. Η λεμφαδενεκτομή μετά τη Β.Φ.Λ. φαίνεται να αποτελεί μία ασφαλή εναλλακτική εγχείρηση της Ε.Λ. Στο μέλλον, αναμένεται η χρησιμοποίηση νέων μοριακών τεχνικών, η ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών, αλλά και πιο αξιόπιστων προγνωστικών παραγόντων.

Έτσι, η σταδιοποίηση των επιχώριων λεμφαδένων θα είναι ακριβής και η ριζική θεραπευτική λεμφαδενεκτομή σε συνδυασμό με τη συμπληρωματική ανοσοθεραπεία, θα εφαρμόζεται σε όσους ασθενείς τη χρειάζονται ουσιαστικά. **Η Αλυσωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)** θα έχει σημαντική συμβολή στην αναγνώριση των μεταστατικών λεμφαδένων στο μέλλον. Η ανίχνευση ειδικών αντιγόνων του μελανώματος (τυροσινάση) με τη μέθοδο της RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) στο λεμφαδένα φρουρό οδηγεί σε ακριβέστερη διάγνωση των μικρομεταστάσεων κατά τη Β.Φ.Λ. Έχει βρεθεί ότι τα ποσοστά υποτροπής ήταν μεγαλύτερα στους ασθενείς με PCR θετικούς λεμφαδένες²². Επιπλέον, η ανίχνευση της τυροσινάσης με τη μέθοδο RT-PCR ή του ειδικού αντισώματος S-100 στο αίμα ασθενών με Κ.Μ., θα βοηθήσει στην αναγνώριση των ασθενών με αιματογενή διασπορά καρκινικών κυττάρων, οι οποίοι πιθανώς δεν θα ωφεληθούν από τη προφυλακτική

λεμφαδενεκτομή.

Γ. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟ-ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Γενικά, η χορήγηση αντινεοπλασματικών φαρμάκων στο Κ.Μ. είχε ως τώρα απογοητευτικά αποτελέσματα. Κανένα μεμονωμένο αντινεοπλασματικό (Ντακαρμπαζίνη, Vindesine, νιτροζουρίες) δεν πέτυχε ποσοστά απάντησης μεγαλύτερα του 25%. Συνδυασμένα σχήματα με αποτελέσματα της τάξης 10-50% έχουν αναφερθεί και περιλαμβάνουν τα εξής: BOLD (Bleomycin, Vincristine, carmoustine, dacarbazine), CVD (cisplatin, vinblastine, dacarbazine). Η temozolamide (Tomudal) αποδείχθηκε πρόσφατα ότι είναι εξίσου αποτελεσματική με τη Ντακαρμπαζίνη (DTIC), ιδίως στις εγκεφαλικές μεταστάσεις, αλλά με λιγότερες παρενέργειες. Ερευνάται η δράση της ως συμπληρωματική χημειοθεραπεία στα μέσου πάχους μελανώματα, υψηλού κινδύνου για υποτροπή. Η πρόκληση για τους ογκολόγους είναι να βρεθεί ο συνδυασμός των αντινεοπλασματικών και ανοσοβιολογικών φαρμάκων που θα βελτιώσουν την πορεία του μεταστατικού Κ.Μ..

Ως συμπληρωματική ανοσοθεραπεία του Κ.Μ. έχει εγκριθεί η ιντερφερόνη a-2b, ιδιαίτερα στα στάδια IIB-III. Ο σκοπός της ανοσοθεραπείας σε ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου (1,5-4 mm Breslow) και υψηλού κινδύνου για υποτροπή (Breslow >4 mm / μετάσταση στους λεμφαδένες), είναι η αντιμετώπιση των μικρομεταστάσεων και η ελάττωση της πιθανότητας εμφάνισης απομακρυσμένης μετάστασης. Στην προφυλακτική χορήγηση ιντερφερόνης δοκιμάστηκαν και χαμηλές δόσεις για 3 μήνες έως 3 έτη με παράταση του ελεύθερου νόσου διαστήματος. Η μελέτη όμως E1684 του Kirkiwood απέδειξε τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των υψηλών δόσεων IFNa-2b (20 Mu/m²) ενδοφλεβίως για 12 μήνες, τόσο στο ελεύθερο νόσου διάστημα όσο και στην συνολική επιβίωση. Η μελέτη E1694 που ακολούθησε επιβεβαίωσε την υπεροχή της IFN-a έναντι του εμβολίου GMK-Q21. Η IFN-a μείωσε κατά 33% τους θανάτους και τις υποτροπές στα 2 χρόνια εφαρμογής της²³. Για πρώτη φορά λοιπόν, καθιερώνεται διεθνώς αντινεοπλασματικός παράγοντας κατά του Κ.Μ., ο

οποίος χορηγείται προφυλακτικά μετά τη χειρουργική εκτομή και αυξάνει την επιβίωση.

Στο μεταστατικό μελάνωμα η ιντερφερόνη δεν έχει ξεπεράσει τα ποσοστά απάντησης των άλλων αντινεοπλασματικών φαρμάκων (<20%). Ελπιδοφόρες είναι οι μελέτες που συνδυάζουν την IFN-a με εμβόλια όπως το GMK (γαγγλιοσίδη GM-2) και το CancerVax (εμβόλιο αλλογενών κυττάρων με Detox)²⁴. Βρέθηκε ότι η IFN-a ενισχύει την παραγωγή αντισωμάτων και TIL-λεμφοκινών κατά αντιγόνων του μελανώματος στους ασθενείς αυτούς.

Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) σε υψηλές δόσεις έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος είτε σε συνδυασμό με αντινεοπλασματικά είτε ως πρόσθετη παθητική ανοσοθεραπεία με αυτόλογα κυτταροτοξικά κύτταρα LAK (Lymphokine-activated Killer cells)²⁵. Ολική απάντηση είχε το 20% των ασθενών, από τους οποίους το 60% είχε ελεύθερο νόσου διάστημα τα 5 έτη. Δεν βρέθηκε, όμως, να αυξάνει μόνη της τη συνολική επιβίωση.

Γενικότερα, η ανοσοθεραπεία επιτυγχάνει ύφεση της νόσου για μεγάλο χρονικό διάστημα αναστέλλοντας τη διασπορά. Πολλά υπόσχονται νεώτερες έρευνες, στις οποίες έχουν προστεθεί IFN-a και IL-2, μαζί ή χωριστά στο σχήμα CVD. Οι υψηλότερες απαντήσεις αναφέρθηκαν σε ποσοστά ως και 63% και πλήρη ύφεση μακροχρόνια 9%, με σημαντικό μειονέκτημα την υψηλή τοξικότητα²⁶. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η βιοχημειοθεραπεία στο μελάνωμα θα επικρατήσει στο μέλλον, αλλά οι προσπάθειες πρέπει να επικεντρωθούν στην αναζήτηση προγνωστικών παραγόντων μακροχρόνιας ύφεσης, ώστε μόνο αυτή η ομάδα να υποβάλλεται σε τοξική θεραπεία.

Δ. ΕΜΒΟΛΙΑ

Η μέση επιβίωση του Κ.Μ. στο στάδιο IV είναι 6-9 μήνες και υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να βελτιωθεί με την ενίσχυση της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού με ειδικά εμβόλια. Χρησιμοποιώντας τροποποιημένα, νεκρά ή αδρανοποιημένα κύτταρα και καρκινικά αντιγόνα (MAA -Melanoma Associated Antigens), έχουν παρασκευασθεί εμβόλια για τη

θεραπεία του μεταστατικού Κ.Μ. Συχνά προστίθενται ανοσοενισχυτικές ουσίες που αυξάνουν την κυτταρική και χημική ανοσολογική απάντηση (BCG, ιοί, γλυκοπρωτεΐνες μικροβιακού τοιχώματος, ένζυμα, Q21, χημικές ουσίες, νευροαμινιδάση, ημισουξινική χοληστερίνη). Τελευταία, σημαντική έμφαση δίνεται στα αλλογενή κύτταρα Κ.Μ., τις γαγγλιοσίδες, τα δενδριτικά κύτταρα και πεπτίδια που συνδέονται με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC I και II)¹⁸. Η ειδική ενεργητική ανοσοποίηση του ασθενούς στοχεύει στη χορήγηση αντιγόνων MAA, που κινητοποιεί την ανοσολογική καταστροφή του όγκου²⁷⁻²⁸. Η μερική υποστροφή του Κ.Μ. έχει διαπιστωθεί ιστολογικά στο 20% των περιπτώσεων, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις πλήρους υποστροφής, είτε του ίδιου του όγκου είτε των μεταστάσεων.

Τα MAA είναι πεπτίδια (MAGE-1, MAGE-3, BAGE, τυροσινάση, melan-A/MART-1, gp100, gp75) και γαγγλιοσίδες (GM2, GD2, DG3,9-0-acetyl-GD3). Η χορήγηση γαγγλιοσίδων GM2 με ανοσοδιεγερτική πρωτεΐνη Keyhole-limpet και QS-21 (saropin-derived) ανακοινώθηκε από την American Joint Committee of Cancer να αυξάνει το διάστημα ελεύθερο νόσου (23%) και την πιθανότητα επιβίωσης (14%) σε ασθενείς σταδίου III, συγκριτικά με το BCG²⁸⁻²⁹.

Τα δενδριτικά κύτταρα παρέχουν μόρια του MHC τύπου II και παρουσιάζουν τα MAA στα CD4 T-λεμφο κύτταρα, ενεργοποιώντας την κυτταροτοξική αντίδραση του ασθενούς. Αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα απομονώνονται από το αίμα του ασθενούς, καλλιεργούνται με MAA (MART-1/melan A, gp100, tyrosinase), συνδέονται με κυττοκίνες (GM-CSF, TNF, α) και χορηγούνται στον ασθενή ως εμβόλιο με ικανοποιητικά ως τώρα αποτελέσματα²⁹⁻³⁰.

Με ενδιαφέρον αναμένονται τα αποτελέσματα ερευνών που χρησιμοποιούν τα αλλογενή εμβόλια Melacine και CancerVax (κυτταρόλυση αλλογενών μελανοκυττάρων) με επανενεργοποιηθείσα ενδοτοξίνη του σκελετικού μικροβιακού τοιχώματος (Detox) ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς μέσου πάχους κατά Breslow και αρνητικούς

λεμφαδένες (στάδιο ΙΙΒ). Τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν μικρή αύξηση του χρόνου ελεύθερου νόσου³¹.

Ε. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια μορφή ειδικής ενεργητικής ανοσοθεραπείας κατά την οποία σε αυτόλογα νεοπλασματικά κύτταρα εμφυτεύονται γονίδια που παράγουν κυπαροτοξικούς παράγοντες (IL-2, IL-4, TNF, GM-CSF), και τα κύτταρα αυτά επαναχορηγούνται στον ασθενή. Τα γονίδια που παράγουν HLA αντιγόνα (B7-1) ενεργοποιούν επίσης την ανοσολογική καταστροφή του όγκου. Τα γονίδια αυτοκτονίας (θυμιδινοκινάση του ιού του απλού έρπητα) ενίονται στα κύτταρα του μεταστατικού μελανώματος και τα καθιστούν ευαίσθητα στο αντικό φάρμακο ganciclovir με αποτέλεσμα τη νέκρωση του όγκου³².

1.2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Παρά τις αλματώδεις προόδους στη θεραπεία του Κ.Μ., η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση παραμένουν η μόνη ελπίδα επιτυχούς αντιμετώπισης του νεοπλασματος αυτού. Η χειρουργική εκτομή ενός αρχόμενου Κ.Μ. με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής εξασφαλίζει μεγάλα ποσοστά επιβίωσης, αφού τόσο η χημειοθεραπεία όσο και η ανοσοθεραπεία δεν έχουν κατορθώσει ακόμη να μειώσουν δραστικά την υποτροπή και τη μετάσταση στο προχωρημένο μελάνωμα (III-IV). Νεώτερες τεχνικές, όπως η Β.Φ.Λ. και η χρήση ιντερφερόνης-εμβολίων προφυλακτικά, υπόσχονται στο μέλλον αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ασθενών που έχουν ενδιάμεσο κίνδυνο για υποτροπή. Ο ακριβέστερος προσδιορισμός των προγνωστικών παραγόντων (κλινικών-ιστολογικών-μοριακών) και η βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων σταδιοποίησης (PCR) θα βοηθήσει στον καθορισμό των ασθενών που θα ωφεληθούν περισσότερο από τις συμπληρωματικές θεραπείες. Με αυτό τον τρόπο θα γίνει δυνατό να καταπολεμηθούν οι μικρομεταστάσεις, χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες κι επιπλοκές, αυξάνοντας την πιθανότητα επιβίωσης.

1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΓΚΑΙΡΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ

Είναι βέβαιο ότι στην παρούσα μελέτη, όσο εμπειριστατωμένο και αν είναι, δεν μπορούν να αποτυπωθούν σε όλη τους την έκταση και να αναλυθούν λεπτομερώς οι παράμετροι που ενδιαφέρουν τον κλινικό γιατρό, τον μαχόμενο στην πρώτη γραμμή συνάδελφο που έχει την υποχρέωση αλλά και την ανάγκη των απαραίτητων γνώσεων για την έγκαιρη διάγνωση του ΚΜ. Σ' αυτόν ακριβώς τον τομέα εστιάζεται το ενδιαφέρον των ιατρικών, κοινωνικών και κρατικών φορέων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Υπενθυμίζεται ότι η αφαίρεση του ΚΜ σε ένα αρχικό στάδιο, όταν το πάχος του είναι μικρότερο των 0,76 χλσμ. συνεπάγεται 10 ετή επιβίωση στο 95-99% των πασχόντων. Αντίθετα, μόνο το 30% θα παραμείνει στη ζωή εφ' όσον το πάχος της βλάβης φθάσει ή ξεπεράσει τα 4 χλσμ². Είναι συχνό το παράδοξο φαινόμενο που συναντάται ακόμη και μεταξύ των Δερματολόγων, να νοιώθουν ικανοποίηση για την επιτυχή διάγνωση ενός ΚΜ και απογοήτευση διότι αυτή ήρθε καθυστερημένα! Από ευρείες έρευνες που δημοσιεύθηκαν πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι περισσότερο καθυστερημένη ήταν η διάγνωση σε όσους είχαν βλάβες στο κεφάλι ή τον αυχένα και σε όσους διαπίστωσαν μόνοι τους τις βλάβες σε σύγκριση με εκείνους που προσήλθαν μετά από σχετική παρατήρηση και προτροπή του συντρόφου τους ³⁵. Περισσότερο όμως συχνή αιτία μη έγκαιρης διάγνωσης ήταν η εσφαλμένη αρχική εκτίμηση του ιατρού διότι ο ένας στους 5 είχε θεωρήσει ένα ΚΜ ως καλοήγη βλάβη. Εάν αναλογισθεί κάποιος το πλήθος των μελανό κυτταρικών βλαβών που παρουσιάζει ένας εξεταζόμενος, ιδιαίτερα μεσογειακής προέλευσης όπως της ελληνικής, γίνεται επιτακτική η ανάγκη της σωστής διαγνωστικής προσπέλασης και διάκρισης τους.

1.3.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Πριν από 15 έτη ο Rigel και οι συν. ανέπτυξαν ένα μνημονικό κανόνα για τη διάγνωση του ΚΜ, γνωστού ως ABCD, όπου Α (Asymmetry) νοείται η γεωμετρική ασυμμετρία στους

δύο άξονες, B (Border) η ανωμαλία με εγκοπές ή προεξοχές της περιφέρειας της βλάβης, C (Color) η παρουσία τουλάχιστον δύο διαφορετικών χρωμάτων, εκτός από τη συνήθη συμμετρική υπέρχρωση του κέντρου της βλάβης η οποία αποτελεί τυπική εικόνα του συνδεσμικού σπίλου, και D (Diameter) η διάμετρος άνω των 6 χλσμ³⁶ Ένα πέμπτο κριτήριο, το E (Enlargement - Elevation), προστέθηκε αργότερα βασιζόμενο στο αναμνηστικό ιστορικό των εξεταζομένων, δηλ. κατά πόσον η βλάβη μεγάλωσε, άλλαξε χρώμα ή διογκώθηκε το τελευταίο έτος³⁷.

Παρά τη μεγάλη διαγνωστική βοήθεια που προσέφερε ο μνημονικός αυτός κανόνας η κλινική διαγνωστική ακρίβεια ακόμη και στα εξειδικευμένα Κέντρα δεν ξεπερνούσε το 64%³⁸. Είναι φανερό ότι ο αποκλεισμός από τη διάγνωση του ΚΜ των δερματικών αλλοιώσεων με διάμετρο μικρότερη των 6 χλσμ. εφησύχαζε τον κλινικό γιατρό που εξέταζε μία βλάβη μικρότερη από το πίσω μέρος ενός στυλό η μολυβιού γραφής και οδηγούσε στην εσφαλμένη διάγνωση ως καλοηθών βλαβών των πρώιμων ΚΜ. Τα τελευταία συνιστούν περί το 17% του συνόλου των ΚΜ και παρουσιάζονται 7-10 έτη ενωρίτερα (μέση τιμή 44 έτη) απ' ό,τι εκείνα που πληρούν το κριτήριο D7. Η κατάργηση όμως αυτού του κριτηρίου θα μείωνε σημαντικά την κλινική διαγνωστική ειδικότητα και θα οδηγούσε σε μη αναγκαίες εξαιρέσεις σημαντικού αριθμού μελαγχρωματικών σπύλων. Η ανάγκη για νέες διαγνωστικές μεθόδους ήταν φανερή και η απάντηση ήρθε με την εφαρμογή μιας νέας in vivo διαγνωστικής προσπέλασης, της Δερματοσκόπησης (Dermatoscopy, Dermoscopy, Epiluminescence microscopy).

1.3.2 ΔΕΡΜΑΤΟΣΚΟΠΗΣΗ (ELM)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1951⁴⁰, αλλά στη δεκαετία του 1980 έκανε τα σημαντικότερα βήματα, ιδιαίτερα με τη μελέτη 3000 και πλέον μελαγχρωματικών βλαβών από τους Αυστριακούς συγγραφείς Pehamberger, Steiner και Wolff⁴¹. Ο σκοπός της ήταν η απεικόνιση διάφορων μορφολογικών χαρακτηριστικών του δέρματος που δεν είναι ορατά με τον γυμνό οφθαλμό. Η τεχνική είναι μη επεμβατική και χρησιμοποιεί το προσπίπτον

φως, μεγεθυντικό σύστημα και λάδι καταδυτικού φακού για την μικροσκόπηση του δέρματος. Εάν εξαιρεθούν τα σύνθετα ή στερεομικροσκόπησης μηχανήματα τα οποία είναι δύσχρηστα και ακριβά, το πλέον εύχρηστο στην καθημερινή κλινική πράξη Δερματοσκόπιο μοιάζει με ωτοσκόπιο και διαθέτει στην άκρη του λάμπα αλογόνου με φωτισμό προσπίπτοντα σε γωνία 20 μοιρών. Με τον τρόπο αυτό το φως δεν αντανακλάται αλλά διαθλά την επιδερμίδα και με τη βοήθεια σταγόνας λαδιού και μεγεθυντικού φακού 10X επιτρέπει την εκτίμηση μέχρι το βάθος του άνω χορίου. Η μελαγχρωστική απεικονίζεται ανάλογα με τη θέση της στο δέρμα, δηλ. μαύρη όταν είναι στην κεράτινη στιβάδα, ανοικτή έως σκούρα καφέ στα κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας, γκρι στο θηλώδες χόριο και ατσάλινο - μπλε στο δικτυωτό στρώμα του δέρματος⁴².

Μέχρι τώρα έχουν δημοσιευθεί 5 μέθοδοι διαγνωστικής προσπέλασης με το Δερματοσκόπιο. Ως πλέον πρόσφορη, προτείνεται να αρχίζει η διαγνωστική προσπέλαση με την εκτίμηση εάν πρόκειται για μελανοκυτταρική ή μη μελανοκυτταρική βλάβη. Όταν διαπιστωθούν μελαγχρωματικό δίκτυο ή καφέ σφαιρίδια, η βλάβη θεωρείται μελαγχρωματική, γεγονός το οποίο ενισχύεται από την τυχόν παρουσία ψευδοποδίων ή ακτινωτής διάταξης. Στη συνέχεια θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψη οι παρακάτω κανόνες⁴³. **1.** Η παρουσία ενός διαγνωστικού κριτηρίου είναι περισσότερο σημαντική από την απουσία του. **2.** Ένα και μόνο κριτήριο συνήθως δεν είναι αρκετό για τη διάγνωση. **3.** Μερικά κριτήρια (π.χ. ανώμαλο και έντονα χρωματισμένο δίκτυο, ανώμαλα κατανεμημένα ψευδοπόδια) είναι περισσότερο σημαντικά στη θετική διάγνωση απ' ό,τι άλλα (π.χ. ανώμαλα καφέ σφαιρίδια, αποχρωματισμός). **4.** Η απουσία καθορισμένων κριτηρίων δεν επιτρέπει τη διάγνωση με τη Δερματοσκόπηση.

Είναι όμως φανερό ότι για να τεθεί η διάγνωση από όσο το δυνατόν περισσότερους γιατρούς απαιτούνται μέθοδοι που να είναι σαφείς, να αναπαράγονται εύκολα και να είναι μετρήσιμοι. Γι αυτό και σήμερα επικρατεί η μέθοδος ABCD της Δερματοσκόπησης³⁸,

σύμφωνα με την οποία ως **A (Asymmetry)** εκτιμάται η **Ασυμμετρία** όσον αφορά στο χρώμα και τη σύνθεση της βλάβης σε σχέση με τους δύο κάθετους άξονες της, οι οποίοι επιλέγονται έτσι ώστε να υπάρχει η χαμηλότερη βαθμολογία ασυμμετρίας. Η απουσία ασυμμετρίας βαθμολογείται με 0, η ασυμμετρία σε έναν μόνον άξονα έχει βαθμό 1, ενώ όταν περιλαμβάνει και τους δύο άξονες έχει βαθμό 2 (πιθανός βαθμός 0-2). Ως **B (Border)**, εκτιμάται το **Όριο** με βάση τη διαίρεση της περιφέρειας της βλάβης σε 8 ισομεγέθη τμήματα. Η απότομη διακοπή του χρωματισμού του ορίου βαθμολογείται με τη μονάδα (πιθανός βαθμός 0-8). Ως **C (Color)** υπολογίζεται το κριτήριο του **Χρώματος** με βάση τον αριθμό των διαφορετικών χρωμάτων που υπάρχουν μέσα στη βλάβη, δηλ. λευκό, ερυθρό, ανοικτό καφέ, σκούρο καφέ, γκρι - μπλε και μαύρο (πιθανός βαθμός 1-6). Ως **D (Differential dermatoscopic Structure)** θεωρείται η διαφορετικότητα στη **Σύσταση** της βλάβης με βάση την παρουσία δικτύου, ομογενών περιοχών, κηλίδων, σφαιριδίων και δοκίδων (πιθανός βαθμός 1-5).

Κάθε κριτήριο πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο παράγοντα βαρύτητας που είναι 1.3 για την ασυμμετρία, 0.1 για το όριο, 0.5 για το χρώμα και 0.5 για τη σύσταση, ώστε να καθορισθεί η τελική βαθμολογία (TDS) ⁴⁴. Οι παρατηρήσεις σε μεγάλο αριθμό βλαβών, έδειξαν ότι συνολικό σκορ (TDS) κάτω από 4.75 αντιστοιχούσε στις καλοήθεις βλάβες ενώ οι τιμές άνω του 5.45 αναφέρονταν στα Κακοήθη Μελανώματα. Οι αμφίβολες περιπτώσεις είχαν ενδιάμεση βαθμολογία. Ο τρόπος αυτός βαθμολόγησης επικράτησε και εφαρμόζεται στην αξιολόγηση της φύσης των μελαγχρωματικών βλαβών με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές.

Παρότι η διαγνωστική ακρίβεια βελτιώθηκε σημαντικά, δεν υπερέβη το 80% και οι τιμές διαγνωστικής ευαισθησίας και ειδικότητας το 93% ⁴⁴. Η προσθήκη του κριτηρίου **E (Enlargement)**, το οποίο αναφέρεται στη Μεγέθυνση ή Μεταβολή της βλάβης στο τελευταίο έτος, παρότι στηρίζεται στην προσωπική εκτίμηση του ασθενούς βελτίωσε τη διαγνωστική ευαισθησία ⁴⁵.

Γενικά, η Δερματοσκόπηση αυξάνει τη διαγνωστική ακρίβεια των ΚΜ τουλάχιστον κατά 15%. ενώ διπλασιάζει την ικανότητα ανίχνευσης τους . Η τεχνική αυτή είναι εξ ίσου σημαντική στη διάγνωση και άλλων μελαγχρωματικών βλαβών. Έτσι, η διαγνωστική ακρίβεια αυξάνεται από 73% στο 83% των Συνδεδσμικών Σπίλων, από 56% στο 93% των σπίλων της Spitz (Νεανικό Μελάνωμα), από 50% στο 83% για το in situ επεκτεινόμενο επιπολής Μελάνωμα, από 54% στο 91% για το επιθετικό επιπολής επεκτεινόμενο ΚΜ, από 46% στο 62% για το Οζώδες ΚΜ ³⁵.

Μια άλλη σημαντική βοήθεια που μπορεί να προσφέρει η Δερματοσκόπηση είναι η αύξηση της δυνατότητας προεγχειρητικού υπολογισμού του πάχους των ΚΜ. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας μόνον μελαγχρωματικού δικτύου και πάχους ΚΜ μικρότερου του 0.76 χλσμ., ενώ η παρουσία γκρι - μπλε περιοχών και άτυπου αγγειακού δικτύου ήταν υπέρ της διάγνωσης ΚΜ μεγαλύτερου πάχους ⁴⁷. Η βαθμολόγηση πάνω από 6.8 σύμφωνα με τον αλγόριθμο ABCD προσδίδει ακρίβεια 82% στη διάγνωση ΚΜ πάχους μεγαλύτερου των 0.76 χλσμ ⁴⁸.

Στα τελευταία 15 έτη η δραστηριότητα των κρατικών φορέων επικεντρώθηκε στον τομέα της έγκαιρης διάγνωσης του ΚΜ σε ένα αρχικό πρώιμο στάδιο, δεδομένου ότι οι όψιμες βλάβες εξακολουθούν να έχουν πτωχή πρόγνωση. Στη Μεγάλη Βρετανία προβλήθηκαν στα ΜΜΕ εβδομάδες ενημέρωσης των πολιτών (Seminar Awareness), ενώ δημιουργήθηκαν νέες και επεκτάθηκαν πολλές υφιστάμενες Κλινικές - Κέντρα ελέγχου των μελανοκυτταρικών βλαβών (Pigmented Lesions Clinics) ⁴⁹. Μετά από ανάλογη προσπάθεια στη Γλασκόβη, ακολούθησε αύξηση κατά 278% στον αριθμό των επισκέψεων στις Κλινικές αυτές ενώ αυξήθηκε και ο αριθμός των ΚΜ που διαγιγνώσκονται κατά 131%⁴⁹.

Η Ευρωπαϊκή Ακαδημία Δερματολογίας έχει εφαρμόσει σε πανευρωπαϊκό επίπεδο την Ημέρα Μελανώματος που για λόγους ευφημισμού αποκαλείται ΜΜ (Melanoma Monday-Malignant Melanoma) και αντιστοιχεί σε κάποια Δευτέρα ενός ανοιξιάτικου ή καλοκαιρινού

μήνα του έτους. Τη συγκεκριμένη αυτή Δευτέρα, εξετάζονται δωρεάν όσοι ενδιαφέρονται να ελέγξουν το δέρμα τους για τις ελιές (σπίλους) τους. Στη χώρα μας υπήρξε σημαντική προσέλευση τόσο το 2003 (5 Ιουνίου) όσο και το 2004 (14 Μαΐου) με αποτέλεσμα να ελεγχθούν 2054 ασθενείς και να διαπιστωθούν 112 κακοήθη μελανώματα. Εξ ίσου σημαντική ήταν και η ευαισθητοποίηση του κοινού τουλάχιστον για το μετέπειτα χρονικό διάστημα.

Είναι επιτακτική επομένως η ανάγκη να δραστηριοποιηθούν στον τομέα αυτόν οι κρατικοί φορείς ώστε να αναπτυχθούν οι αντίστοιχες με την υπόλοιπη Ευρώπη Κλινικές PLC. Επιβάλλεται επίσης να γίνεται συνεχής εκπαίδευση και μετεκπαίδευση των γιατρών στις νέες διαγνωστικές μεθόδους. Υπενθυμίζεται ότι η χρήση της μεθόδου της Δερματοσκόπησης χωρίς την κατάλληλη εκπαίδευση μπορεί να οδηγήσει σε λάθος αποτέλεσμα. Οι δερματολόγοι που δεν παρακολούθησαν το 9ωρο κατάλληλο πρόγραμμα και χρησιμοποίησαν το Δερματοσκόπιο παρουσίασαν μικρότερη ικανότητα διάγνωσης του ΚΜ απ' όσην είχαν προηγουμένως και βασιζόταν μόνο στην κλινική παρατήρηση ⁵⁰. Επομένως, τα διαφημιζόμενα Συστήματα διάγνωσης των Μελανωμάτων, ένα των οποίων προβλήθηκε πρόσφατα στην πόλη μας, μπορούν να αποβούν καταστροφικά για τον γιατρό και βέβαια για τον άρρωστο εφ' όσον δεν συνοδεύονται από συγκεκριμένο επιστημονικό εκπαιδευτικό πρόγραμμα. Είναι φανερό τέλος ότι όλοι οι γιατροί που εμπλέκονται στη διάγνωση και αντιμετώπιση του ΚΜ, δηλ. Δερματολόγοι, Χειρουργοί, Ιστοπαθολόγοι και Ογκολόγοι θα πρέπει να συνεργασθούν σε θεσμοθετημένη, συνεχή και ειλικρινή βάση για την προάσπιση της υγείας των συναθρώπων μας. Είναι και δική μας ντροπή, γι αυτό και αποφεύγουμε να απαντήσουμε ευθέως στα ερωτήματα των συναδέλφων μας του Εξωτερικού, να μην υπάρχει συνολική καταγραφή των ΚΜ στη χώρα μας! Και βέβαια, δεν πρέπει να ξεχνούμε ότι διαπιστώνοντας έγκαιρα ένα ΚΜ σώζουμε μια ζωή και ότι σώζοντας μια ζωή σώζουμε τον κόσμο όλο!

1.4 ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΑΙ ΟΙ

ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ

1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών ⁵¹, βελτιώθηκαν οι επιστημονικές πληροφορίες που σχετίζονται με το μελάνωμα. Καινούργιες πληροφορίες όσον αφορά επίκτητους σπίλους, δυσπλαστικούς (άτυπους) και συγγενείς σπίλους μας βοήθησαν να κατανοήσουμε αυτές τις πρόδρομες βλάβες και τις σχέσεις τους με το κακόηθες μελάνωμα.

Οι ρόλοι των εργαστηριακών ελέγχων, της φωτογράφισης και των νεότερων διαγνωστικών εργαλείων (δερματοσκόπιο) ως προς την αξιολόγηση των ασθενών για μελάνωμα ή πρόδρομες βλάβες εξαντλήθηκαν κάτω από εξονυχιστική έρευνα.

Παραδοσιακές χειρουργικές θεραπευτικές παρεμβάσεις εξακολουθούν να αντικαθίστανται από λιγότερο επιθετικά πρωτόκολλα βασιζόμενα σε προοπτικές, τυχαιοποιημένες μελέτες.

Πολλές νέες παρεμβάσεις με μεθόδους όπως ο φρουρός - λεμφαδένας έχουν αξιολογηθεί, προσφάτως, στα ερευνητικά / αναφορικά κέντρα σε όλο τον κόσμο.

Δεδομένης της έλλειψης επιστημονικών πληροφοριών, το πρότυπο της φροντίδας σχετικά με τη θεραπεία των ασθενών με μελάνωμα στις αρχές του εικοστού αιώνα απαιτούσε εκτεταμένη ακρωτηριαστική χειρουργική, τοπικό ακρωτηριασμό των περιοχών του σώματος που εμπλέκονται ή και τα δύο.

Στα μέσα του εικοστού αιώνα οι επιθετικές λεμφαδενικές εκτομές ήταν δημοφιλείς, σε μία προσπάθεια για έλεγχο της μεταστατικής νόσου, παρά την έλλειψη επιστημονικών πληροφοριών ότι τέτοιες μέθοδοι όντως επηρέαζαν την επιβίωση των ασθενών με μελάνωμα.

Ο σκοπός αυτής της ανασκόπησης είναι να παρουσιάσει μια περίληψη της πρόσφατης βιβλιογραφίας, βασιζόμενη σε μαρτυρίες που αφορούν στο πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα, στη διάγνωσή του, στις πρόδρομες βλάβες και στη θεραπεία του. Όλοι οι ασθενείς

δεν είναι δυνατόν να αναφέρονται σε ένα κέντρο μελανώματος ή να εγγράφονται σε προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες. Για την πλειοψηφία των ασθενών που παρακολουθούνται εκτός αυτών των ερευνητικών κέντρων, ελπίζουμε ότι η ακόλουθη ανασκόπηση θα βοηθήσει τον κλινικό ιατρό να επιλέξει διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις βασιζόμενες σε γεγονότα όπως τα γνωρίζουμε σήμερα, αντί να λαμβάνει αποφάσεις πάνω στην αντιμετώπιση αυτών των ασθενών βασιζόμενος στην "παράδοση".

1.5.1 ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΒΛΑΒΕΣ

1.5.2 ΕΠΙΚΤΗΤΟΙ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ

Οι συνήθεις επίκτητοι σπίλοι, τυπικά, εμφανίζονται μετά τους 6 έως 12 μήνες της ζωής. Αυτοί οι σπίλοι αυξάνουν σε μέγεθος και αριθμό στην πρώτη παιδική ηλικία και κατά την εφηβεία. Οι πλέον συνήθεις επίκτητοι σπίλοι παραμένουν μικρότεροι των 5 mm σε διάμετρο.

Οι σπίλοι συνεχίζουν να αυξάνουν σε αριθμό κατά τη διάρκεια της τρίτης και τέταρτης δεκαετίας και κατόπιν εξαφανίζονται με αργό ρυθμό, Από τους ενηλίκους το 55% έχουν από 10 έως 45 σπίλους, διαμέτρου μεγαλύτερης των 2 mm.

Αρκετές μελέτες δημοσιεύθηκαν σχετικά με την υπερίσχυση των φυσιολογικών σπλών στους ενηλίκους, με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Παρόλο ότι οι Holly και συν. βρήκαν τουλάχιστον έναν σπίλο σε όλους σχεδόν τους ενήλικες, οι Swerdlow, English, και MacKie παρατήρησαν ότι κατά προσέγγιση το 20% των ενηλίκων ασθενών δεν έχουν κατά την κλινική εξέταση οποιουδήποτε είδους σπίλους (>2 mm). Οι Bataille και συν. βρήκαν ότι το 21% των ενηλίκων είχαν περισσότερους από 50 σπίλους, σε αντίθεση με τον Tucker και συν., οι οποίοι βρήκαν ότι μόνο το 10% των 998 μαρτύρων είχαν περισσότερους από 50 σπίλους⁴⁹.

Περιβαλλοντολογικοί, γενετικοί και ανοσολογικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στον προσδιορισμό του αριθμού των μελανοκυτταρικών σπλών που θα αναπτυχθούν σε ένα άτομο. Οι σπίλοι στα παιδιά τείνουν να συγκεντρώνονται σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές, ιδιαίτερα σ' εκείνες τις περιοχές του σώματος που θεωρούνται υψηλού κινδύνου για ηλιακό

έγκαυμα, Αρκετές μελέτες ελεγχόμενες εξετάστηκαν ως προς τη σχέση μεταξύ του αριθμού των καλοήθων επίκτητων σπύλων και του κινδύνου για ανάπτυξη κακοήθους μελανώματος.

Οι Swerdlow, English, και MacKie συνέκριναν 180 ασθενείς με δερματικό κακόηθες μελάνωμα με 197 ασθενείς - μάρτυρες και έδειξαν ότι ο κίνδυνος για μελάνωμα είναι ισχυρά συνδεδεμένος με τον αριθμό των καλοήθων μελονοκυτταρικών σπύλων. Ασθενείς με σπίλους των οποίων η διάμετρος υπερέβαινε τα 7mm και είχαν ανομοιογένεια χρώματος και ανώμαλα πλευρικά όρια, είχαν 54 φορές υψηλότερο σχετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη μελανώματος συγκρινόμενοι με ασθενείς χωρίς παρουσία σπύλων. Ο σχετικός κίνδυνος για μελάνωμα σε ασθενείς με περισσότερους από 50 σπίλους ήταν 12,1, παρόλη την απουσία μεγάλων διαμέτρων, ανομοιογένειας χρώματος ή ανώμαλων ορίων⁴².

Οι Bataille και συν. συνέκριναν 426 περιπτώσεις μελανώματος με 416 περιπτώσεις μαρτύρων, Ασθενείς με 50 έως 100 σπίλους είχαν κίνδυνο για ανάπτυξη μελανώματος 3,2 φορές περισσότερο απ' ότι οι ασθενείς με κανέναν έως 4 σπίλους. Εκείνοι οι ασθενείς με περισσότερους από 100 σπίλους σε όλο το σώμα είχαν ένα σχετικό κίνδυνο 7,7, συγκρινόμενο με ασθενείς που είχαν κανέναν έως 4 σπίλους.

Οι Weiss, Bertz και Jing συνέκριναν 204 ασθενείς με μελάνωμα, με 200 ασθενείς - μάρτυρες. Ο συνολικός αριθμός των καλοήθων σπύλων απεδείχθη ως η πιο κατάλληλη παράμετρος πρόβλεψης για την ανάπτυξη μελανώματος, με το σχετικό κίνδυνο του 14,9 σε εκείνους τους ασθενείς που είχαν περισσότερους από 50 σπίλους⁴⁹.

Οι Grob και συν. εξέτασαν 207 ασθενείς με μη οικογενές μελάνωμα οι οποίοι ήταν μεγαλύτεροι των 18 ετών, σε σύγκριση με 295 ασθενείς - μάρτυρες. Η παρουσία περισσότερων από 120 σπύλων με διάμετρο μικρότερη από 5 mm συνδεόταν με σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος της τάξης του 19,6, συγκρινόμενο με ασθενείς που είχαν λιγότερους από 10 σπίλους. Η παρουσία τουλάχιστον 5 σπύλων μεγαλύτερων από 5mm συνδέθηκε με ένα σχετικό κίνδυνο 10, συγκρινόμενο με ασθενείς χωρίς τέτοιους σπίλους.

Οι Grob και συν. διαπίστωσαν, στη συνέχεια, ότι η συσχέτιση μεταξύ κλινικά άτυπων σπύλων και μη οικογενούς μελανώματος θα μπορούσε να εξηγηθεί πλήρως με τη συσχέτιση του μελανώματος με πολλούς σπύλους, μεγαλύτερους των 5 mm σε διάμετρο.

Δεν βρέθηκε σημαντικός σχετικός κίνδυνος για εκείνους τους σπύλους που κλινικά χαρακτηρίστηκαν άτυποι, συμπεραίνοντας ότι ο κίνδυνος για ανάπτυξη μελανώματος εξαρτιόταν από το συνολικό αριθμό των σπύλων που ήταν μεγαλύτεροι των 5mm, αδιάφορα με το κατά πόσον ή όχι αυτοί ήταν κλινικά άτυποι.

Αυτά τα ευρήματα ήταν σε άμεση σύγκρουση με μία μελέτη από τους Roush και συν., που εξέτασαν 246 περιπτώσεις ασθενών με μελάνωμα συγκριτικά με 134 μάρτυρες χωρίς μελάνωμα ⁴⁸.

Αυτοί οι συγγραφείς βρήκαν ότι αν και ο σχετικός κίνδυνος μελανώματος σε ασθενείς με περισσότερους από 15 σπύλους ήταν σημαντικά ψηλότερος, κατά 1,8, αυτός ο κίνδυνος έγινε στατιστικά μη σημαντικός μετά από διόρθωση για δυσπλαστικούς σπύλους. Περαιτέρω, ο σχετικός κίνδυνος για ανάπτυξη μελανώματος σε ασθενείς με οποιονδήποτε δυσπλαστικό σπίλο ήταν 7,6, ο οποίος παρέμεινε χωρίς να αλλάξει, ακόμη και μετά τη διόρθωση για όλους τους σπύλους.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα από τους Grob και συν. ήταν ότι οι σπύλοι που εντοπίζονταν στους γλουτούς ήταν ένας σπουδαίος παράγοντας κινδύνου για μελάνωμα, με λόγο υπεροχής της τάξεως του 10,9 για 5 ή περισσότερους σπύλους γλουτών, σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς τέτοιους σπύλους.

Οι Bataille και συν. επιβεβαίωσαν ότι σπύλοι ευρισκόμενοι σε ασυνήθιστες θέσεις (ραχιαία επιφάνεια άκρων ποδών, γλουτοί, πρόσθια επιφάνεια τριχωτού κεφαλής) αποτελούσαν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος και παρέμειναν σημαντικοί, ακόμη και μετά τη διόρθωση για άτυπους σπύλους.

Αν και οι στατιστικές από διάφορες μελέτες ποικίλλουν, η μαρτυρία στηρίζει τη

συσχέτιση μεταξύ μεγάλου αριθμού σπύλων και αυξημένου κινδύνου να αναπτυχθεί μελάνωμα. Αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για αυτόν τον αυξημένο κίνδυνο.

Άτομα με πολλούς καλοήθεις σπύλους έχουν περισσότερα δερματικά σπιλομελανοκύτταρα και ως εκ τούτου, έχουν συνολικά περισσότερα μελανοκύτταρα, με κίνδυνο να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή, σε σχέση με άτομα που έχουν λίγους σπύλους. Πολυάριθμες φακίδες είναι επίσης δυνατόν να δείχνουν μία μεγαλύτερη γενετική τάση για σχηματισμό μελανώματος. Επιπροσθέτως, η εμφάνιση πολυάριθμων σπύλων είναι δυνατόν να δείχνει προγενέστερη έκθεση σε περιβαλλοντολογικούς παράγοντες, όπως αυξημένη έκθεση στον ήλιο, με αποτέλεσμα να προκαλείται συγχρόνως και μενάλος αριθμός φακίδων και αυξημένος κίνδυνος σχηματισμού μελανώματος⁴⁹.

Τελικά, η υπόθεση ότι τα μελανοκύτταρα στους σπύλους είναι ιδιαίτερα επιρρεπή να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή υποστηρίζεται από τις μελέτες, στις οποίες 20% έως 30% των κακοηθών μελανωμάτων, συσχετίστηκαν με έναν καλοήγη ή δυσπλαστικό σπίλο σε ιστολογική συνέχεια.

Συμπερασματικά, η πλειοψηφία των μαρτυριών δείχνει ότι ασθενείς με αυξημένο αριθμό καλοηθών μελανοκυτταρικών σπύλων έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν μελάνωμα.

Ο κρίσιμος αριθμός κατά τον οποίο ο σχετικός κίνδυνος γίνεται σημαντικός πιθανότατα ποικίλλει από άτομο σε άτομο, εξαρτώμενος όχι μόνο από τον αριθμό των σπύλων αλλά, επίσης, από άλλους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου (οικογενειακό ιστορικό, περιβαλλοντική έκθεση στον ήλιο).

Λόγω του ότι, 80% από όλους τους ασθενείς είχαν έως 50 καλοήθεις σπύλους, πρακτικά, ένας οριακός αριθμός σπύλων πάνω από τον οποίο οι ασθενείς είναι δυνατόν να βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη μελανώματος θα μπορούσε να είναι το 50.

Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος, σε ασθενείς με περισσότερους από 50

σπίλους, σε σύγκριση με "το φυσιολογικό", είναι αδύνατον να διακριθεί από την τρέχουσα βιβλιογραφία. Ο σχετικός κίνδυνος για εκείνους τους ασθενείς εκτεινόταν από 3 έως 15 όταν συγκρινόταν με το σχετικό κίνδυνο για ασθενείς που είτε δεν είχαν καθόλου σπίλους, είτε είχαν λιγότερους από 5 σπίλους.

Ως εκ τούτου, οι ανωτέρω αναφερόμενοι αριθμοί είναι πιθανό διογκωμένοι, διότι, κατά προσέγγιση, μόνο το 20% των φυσιολογικών ατόμων δεν έχουν καθόλου σπίλους.

Μία καλύτερη ομάδα μαρτύρων για αυτές τις μελέτες, θα ήταν ασθενείς με 10 έως 50 σπίλους, που αριθμούν το 55% του φυσιολογικού πληθυσμού ενηλίκων. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, που να απορρέουν από τη χρησιμοποίηση καταλληλότερης ομάδας ελέγχου.

1.5.3 ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ (ΑΤΥΠΟΙ ΣΠΙΛΟΙ)

Το 1978, πρώτος ο Wallace Clark περιέγραφε ευδιάκριτες μελανοκυτταρικές φακίδες, παρούσες σε ασθενείς από 6 οικογένειες με μελάνωμα. Κλινικά αυτές οι φακίδες παρουσίαζαν διακυμάνσεις σε μέγεθος, περίγραμμα και χρωματικό συνδυασμό. Είχαν τάση να εμφανίζονται στον άνω κορμό και τα άκρα και γενικά εμφανίστηκαν σε μεγάλους αριθμούς⁵⁶.

Οι οικογένειες με τέτοιες φακίδες -που αρχικά ορίστηκαν ως "σύνδρομο B-K φακίδων"- διαπιστώθηκε ότι είχαν πολύ υψηλό βαθμό ανάπτυξης μελανώματος.

Από τις πρώτες αναφερόμενες περιπτώσεις του Clark, αυτό το οικογενές μοντέλο μελανώματος κωδικοποιήθηκε και περιγράφηκε με διάφορα συνώνυμα, περιλαμβάνοντας το σύνδρομο δυσπλαστικού σπίλου, το σύνδρομο των οικογενών άτυπων φακίδων και μελανώματος. Για περισσότερη ευκολία ως προς τη χρήση προτιμούμε, και σε αυτή την ανασκόπηση θα χρησιμοποιήσουμε τους όρους "δυσπλαστικοί σπίλοι" και "σύνδρομο δυσπλαστικών σπλών".

Δυσπλαστικοί σπίλοι είναι δυνατό να παρατηρούνται σε άτομα με ή χωρίς μελάνωμα

και είναι δυνατόν να κληρονομούνται σε ένα οικογενές μοντέλο ή να εμφανίζονται σποραδικά, Είναι συνήθως σε διάμετρο μεγαλύτεροι από 5mm και είναι επίπεδοι ή επίπεδοι με υπερυψωμένο κέντρο (δίκηνη "τηγανητού αυγού"). Είναι σκουρόχρωμοι ή μη ομαλά κεχρωσμένοι, με καστανές και ροζ σκιές και συνήθως έχουν ανώμαλα ή ακαθόριστα όρια. Οι δυσπλαστικοί σπίλοι είναι σχετικά συνήθεις με ένα βαθμό υπερίσχυσης που εκτιμάται κατά προσέγγιση στο 5%, όπως τεκμηριώνεται από παρασκευάσματα βιοψίας.

Κλινικά, οι δυσπλαστικοί σπίλοι διαφέρουν από τους κοινούς επίκτητους σπίλους ως προς:

(α) Την έναρξη εμφάνισης κοντά στην εφηβεία, αντί της παιδικής ηλικίας.

(β) Παραμένουν δραστικοί σ' όλη τη διάρκεια της ενηλικίωσης, με μία αύξηση ή μείωση ως προς την ατυπία.

(γ) Εξακολουθούν να αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ζωής και μετά την τέταρτη δεκαετία.

Αν και τα κλινικά γνωρίσματα των δυσπλαστικών σπίλων είναι σαφώς τυπικά, τα ιστολογικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση των δυσπλαστικών σπίλων είναι λιγότερο ξεκάθαρα. Αυτή η σύγχυση κατέληξε στον καθορισμό, από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας κατά το Συναινετικό Συνέδριο για τη Διάγνωση και Θεραπεία του Πρώιμου Μελανώματος, των ιστολογικών κριτηρίων ως ακολούθως:

- Διαταραχή της αρχιτεκτονικής με ασυμμετρία, υποεπιδερμική ανάπτυξη συνδετικού ιστού (συγκέντρωση ηωσινοφιλική και / είτε φυλλώδης) και υπερπλασία μελανοκυτταρικών εφηλίδων με ατρακτοειδή ή επιθηλιοειδή μελανοκύτταρα, συσσωρευόμενα σε φωλεές ποικίλου μεγέθους και σχηματίζοντας γέφυρες μεταξύ γειτονικών θηλών του χορίου.

- Η μελανοκυτταρική ατυπία μπορεί να είναι παρούσα σε ποικίλο βαθμό.

- Επιπροσθέτως, μπορεί να υπάρχει δερματική διήθηση από λεμφοκύτταρα και το φαινόμενο "shoulder" (ενδοεπιδερμικά μελανοκύτταρα εκτεινόμενα μεμονωμένα ή σε

φωλεές, επιπλέον του στοιχείου που επικρατεί στο χόριο).

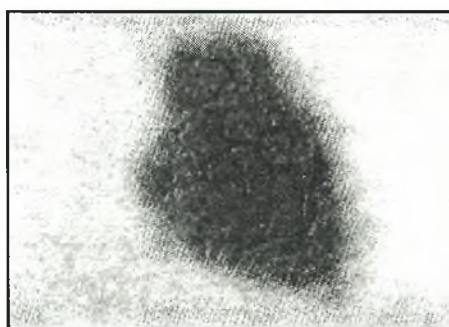
Το συνέδριο του Αμερικανικού Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας εισηγήθηκε επίσης την αλλαγή του ονόματος από "σύνδρομο δυσπλαστικού σπίλου" σε "σύνδρομο οिका-γενών άτυπων εφηλίδων και μελανώματος". Αυτό το σύνδρομο προσδιορίστηκε ως:

- Εμφάνιση περιστατικών κακοήθους μελανώματος σε ένα ή περισσότερους συγγενείς, πρώτου ή δεύτερου βαθμού.

- Παρουσία μεγάλου αριθμού μελανοκυτταρικών σπίλων, συχνά περισσότερων από 50, κάποιιοι από τους οποίους είναι άτυποι και συχνά ποικίλλουν σε μέγεθος.

- Μελονοκυτταρικοί σπίλοι με ιδιαίτερα ιστολογικά χαρακτηριστικά.

Η ύπαρξη του συνδρόμου του οικογενούς δυσπλαστικού σπίλου είναι ευρέως αποδεκτή. Ως προς το οικογενές μελάνωμα, ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος έδειξε να αυξάνεται 184 φορές συγκρινόμενος με τον γενικό πληθυσμό για τα μέλη οικογενειών με δυσπλαστικούς σπίλους, αλλά χωρίς προηγούμενο ιστορικό μελανώματος. Ο κίνδυνος αυξήθηκε έως 500 φορές για τα επηρεασμένα μέλη οικογενειών με προηγούμενο μελάνωμα.



Δυσπλαστικός σπίλος

Ασθενείς με δυσπλαστικούς σπίλους εκτός του οικογενούς μελανώματος είναι επίσης υπό σκέψη ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη μελανώματος. Οποσδήποτε, η αναλογία είναι πολύ χαμηλότερη απ' ό,τι σ' εκείνα τα άτομα με οικογενές μελάνωμα. Σε μία μελέτη ελεγχόμενη, από τους Tucker και συν., 716 συνεχόμενοι ασθενείς με πρόσφατα

διαγνωσμένο μελάνωμα συγκρίθηκαν με 1014 ασθενείς μάρτυρες. Ένας κλινικά δυσπλαστικός σπίλος συνδέθηκε με διπλάσιο κίνδυνο για ανάπτυξη μελανώματος, παρ' όλο που 10 ή περισσότεροι δυσπλαστικοί σπίλοι έδωσαν έναν κατά 12 φορές αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς δυσπλαστικούς σπίλους.

Οι Bataille και συν. σύγκριναν 426 περιπτώσεις δερματικού μελανώματος με 416 μάρτυρες. Βρήκαν ότι η παρουσία 4 ή περισσότερων άτυπων σπίλων συνδεόταν με ένα σχετικό κίνδυνο της τάξεως του 14,3 για την ανάπτυξη μελανώματος, αν και η παρουσία ενός άτυπου σπίλου έδωσε τριπλάσιο κίνδυνο⁵⁷.

Ένα μέγιστο πρόβλημα στο να εξακριβώσουμε τους βαθμούς υπερίσχυσης και τους σχετικούς κινδύνους σε σποραδικούς δυσπλαστικούς σπίλους είναι η πτωχή συσχέτιση μεταξύ του κλινικού φαινοτύπου και των ιστολογικών κριτηρίων που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση των δυσπλαστικών σπίλων. Οι Roush και συν. εξέτασαν δείγματα βιοψίας από 91 κλινικά δυσπλαστικούς σπίλους και βρήκαν ότι μόνο 23 από εκείνους ήταν ταξινομήσιμοι ιστολογικά ως δυσπλαστικοί.

Αντιστρόφως, οι Klein και Barr εξέτασαν 58 συνδεσμικούς και μικτούς σπίλους μικροσκοπικά, χωρίς κλινικά σημεία δυσπλασίας. Ένα ή περισσότερα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνδεδεμένα με δυσπλαστικούς σπίλους ήταν παρόντα στο 87,8% των βλαβών, δύο ή περισσότερα ήταν παρόντα στο 69% και τρία ιστολογικά χαρακτηριστικά βρέθηκαν στο 29,3%. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι κλασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά δυσπλαστικών σπίλων, συνήθως, εμφανίζονται σε καλοήθεις επίκτητους σπίλους.

Οι Pierkorn και συν. βρήκαν μία υπερίσχυση των δυσπλαστικών σπίλων της τάξεως του 53% σε άτομα της Καυκάσιας φυλής στη Γιούτα, όταν χρησιμοποιούσαν μόνο ιστολογικά κριτήρια για τη διάγνωση των δυσπλαστικών σπίλων.

Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα της κλινικοϊστολογικής συσχέτισης

στην πραγματοποίηση της διάγνωσης των δυσπλαστικών σπλών. Οι Roush και Barnhill βρήκαν ότι η ιστολογική διάγνωση των δυσπλαστικών σπλών ήταν ισχυρά συνδεδεμένη με το συνολικό αριθμό των σπλών οποιουδήποτε τύπου στο σώμα. Κατέληξαν ότι ο συνολικός αριθμός σπλών σε αυτούς τους ασθενείς (είτε φυσιολογικών είτε κλινικά άτυπων) συσχετίζεται με την πυρηνική και αρχιτεκτονική ιστολογική δυσπλασία στα ευρήματα της βιοψίας των πλέον ατύπων κεχρωσμένων βλαβών.

Συνοψίζοντας, οι δυσπλαστικοί σπίλοι εμφανίζονται τόσο σποραδικά όσο και σε οικογενή βάση. Σε αξιολόγηση ασθενών με δυσπλαστικούς σπίλους, είναι σημαντικό να συσχετίζονται τα ιστολογικά ευρήματα με τον κλινικό φαινότυπο.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε ασθενείς με δυσπλαστικούς σπίλους είναι περισσότερο πιθανό να σχετίζεται με πολλαπλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του συνολικού αριθμού των σπλών (τόσο δυσπλαστικών όσο και καλοηθών) και του οικογενειακού ιστορικού.

Οι δυσπλαστικοί σπίλοι κατά πάσα πιθανότητα αντιπροσωπεύουν τόσο ένα "δείκτη" για εκείνους τους ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη μελανώματος, όσο και μια πρόδρομη βλάβη για μελάνωμα.

Ως εκ τούτου, η προληπτική απομάκρυνση των δυσπλαστικών σπλών δεν απαλείφει τον κίνδυνο ενός επακόλουθου σχηματισμού μελανώματος. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τον καθορισμό της υποτιθέμενης επίδρασης που θα είχε μία τέτοια απομάκρυνση στη μείωση του κινδύνου για μελλοντική ανάπτυξη μελανώματος.

1.5.4 ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΣΠΙΛΟΙ

Πριν μπορέσει να επιχειρήσει κάποιος να προσδιορίσει κατά πόσο οι συγγενείς σπίλοι αντιπροσωπεύουν μία πρόδρομη βλάβη κακοήθους μελανώματος, πρέπει να τεθεί ένας αυστηρός ορισμός του "Συγγενούς σπίλου". Δυστυχώς, οι διαφορετικοί συγγραφείς δεν κατάφεραν να συμφωνήσουν σε έναν ενιαίο ορισμό του "συγγενούς σπίλου".

Το Αμερικανικό Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας συγκάλεσε συνέδριο με θέμα "Πρόδρομες βλάβες κακόηθους μελανώματος" στις 24 Οκτωβρίου 1983. Ευρήματα αυτού του συνεδρίου δημοσιεύτηκαν το 1984 και περιέλαβαν την ανακοίνωση ότι "ο συγγενής σπίλος είναι ένας μελανό κυτταρικός σπίλος, παρών κατά τη γέννηση." (σελ. 1865). Οπωσδήποτε, οι συμμετέχοντες συμφώνησαν ότι μερικές βλάβες πρωτοεμφανίζονται κατά τη διάρκεια της βρεφονηπιακής ηλικίας και όταν συμβαίνει αυτό, συμπεραίνεται ότι προϋπάρχοντα σπιλοκύτταρα ήσαν παρόντα ⁵⁶.

Αυτή η ομάδα κατέληξε ότι η "κλασική" μικροσκοπική περιγραφή των συγγενών σπύλων περιλαμβάνει κύτταρα σπύλων στις ακόλουθες περιοχές:

- στα κατώτερα 2/3 του χορίου, σποραδικά εκτεινόμενα στο υπόδερμα,
- μεταξύ των δεσμίδων του κολλαγόνου, κατανεμημένων ως μονά κύτταρα ή κύτταρα σε μονή σειρά ή και τα δύο και
- στα κατώτερα 2/3 του δικτυωτού χορίου ή στο υπόδερμα, σχετιζόμενων με εξαρτήματα, νεύρα και αγγεία. Οπωσδήποτε, μερικοί συγγενείς σπίλοι δεν έχουν αυτά τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά.

Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε ασυμφωνίες, αφού μελέτες που εξετάζουν το κακόηθες δυναμικό των συγγενών σπύλων στηρίζονται περισσότερο σε μικροσκοπικά ευρήματα, παρά σε κλινικά δεδομένα.

Οι συγγενείς σπίλοι, αυθαιρέτως, διαιρέθηκαν σε ομάδες, σύμφωνα με το μέγεθος τους κατά τη διάρκεια της βρεφονηπιακής ηλικίας:

- μικροί (<1,5 cm σε διάμετρο),
- μεσαίοι (1,5-20 cm σε διάμετρο) και
- μεγάλοι (>20 cm σε διάμετρο).

Οι μεγάλοι συγγενείς σπίλοι, συνήθως, έχουν τα κλασικά μικροσκοπικά ευρήματα των συγγενών σπύλων, ενώ οι μικροί συγγενείς σπίλοι, τις περισσότερες φορές, δεν δείχνουν

εκείνα τα κλασικά χαρακτηριστικά. Οι μεσαίου μεγέθους συγγενείς σπίλοι μπορεί να παρουσιάζουν ή όχι αυτά τα κλασικά μικροσκοπικά χαρακτηριστικά.

Το 1982 οι Rhodes και Melski προσπάθησαν να εκτιμήσουν τον κίνδυνο μελανώματος, σε σχέση με μικρούς συγγενείς σπίλους. Αυτή η εργασία αναφέρεται συχνά σε άρθρα ανασκοπήσεων, διότι είναι ένα από τα λίγα άρθρα που επιχειρεί να προσδιορίσει ποσοτικά έναν κίνδυνο βασισμένο σε μαθηματικούς υπολογισμούς. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι υπήρχε μία αύξηση 21 φορές στον κίνδυνο μελανώματος για άτομα με μικρούς συγγενείς σπίλους, όταν οι σπίλοι είχαν διαπιστωθεί από το ιστορικό, και μία αύξηση του κινδύνου 5 έως 10 φορές, όταν οι σπίλοι είχαν διαπιστωθεί ιστολογικά.

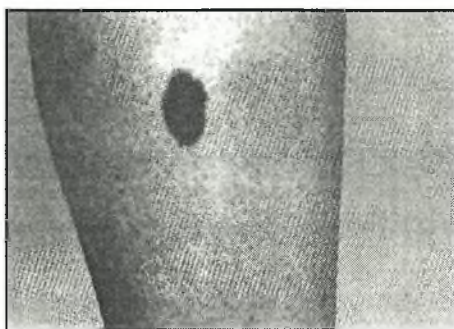
Δυστυχώς, σε αυτήν τη μελέτη υπήρχαν αρκετά ελαττώματα. Μόνο 5 από τους 20 συγγενείς σπίλους που βρέθηκαν σε συσχέτιση με το μελάνωμα, με τη μέθοδο του "κλινικού ιστορικού", επιβεβαιώθηκε ότι υπήρχαν κατά τη γέννηση. 15 από τις 20 περιπτώσεις ήταν έμμεσα διαπιστωμένες μόνο από προγενέστερες δηλώσεις των γονέων προς τους ασθενείς.

Οι Walton, Jacobs και Con παρατήρησαν ότι όποτε χρησιμοποιήθηκαν ιστορικά ερωτηματολόγια μελών της οικογενείας, μόνο το ένα τρίτο των κεχρωσμένων βλαβών στη βρεφική ηλικία επιβεβαιώθηκε ότι ήταν σπιλοκυτταρικοί σπίλοι, κατά τη μικροσκοπική εξέταση. Ένα δεύτερο πρόβλημα με τη μελέτη των Rhodes και Melski ήταν πιθανό συστηματικό σφάλμα στην επιλογή του δείγματος.

Από τα 234 δικά τους παρασκευάσματα με μελάνωμα, 8,1% συσχετίστηκαν ιστολογικά με ένα σπιλοκυτταρικό σπίλο με συγγενή χαρακτηριστικά, Αυτή η συσχέτιση είναι 8 φορές υψηλότερη από τα στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από τους Kopf, Barb και Hennessey. Ως εκ τούτου, η σπουδαιότητα των συμπερασμάτων, είναι αμφισβητούμενη.

Οι Illig και συν. ανασκόπησαν 48 μικρούς συγγενείς μελανοκυτταρικούς σπίλους <10 cm σε διάμετρο, σύμφωνα με τον ορισμό τους. Μόνο δύο από αυτές τις βλάβες ιστολογικά απεκάλυψαν σπιλοκύτταρα στο κατώτερο τρίτο του χορίου ή στο υπόδημα. Οι υπόλοιπες 46

βλάβες είχαν σπιλοκύτταρα περιορισμένα στα ανώτερα 2/3 του χορίου.



Συγγενής σπίλος

Όλα τα μελανώματα που σχηματίστηκαν σ' αυτούς τους ασθενείς ήταν "επιδερμικής" προέλευσης και όλα δημιουργήθηκαν μετά την ηλικία των 18 ετών. Κανένα από αυτά τα μελανώματα δεν φανέρωσε τη νευρομεσεγχυματική αρχιτεκτονική που παρατηρείται συνήθως στο μελάνωμα, συνδεδεμένη με τους γιγάντιους συγγενείς σπίλους. Στην πραγματικότητα, η μη επιδερμική προέλευση ενός δερματικού μελανώματος σε μικρούς συγγενείς σπίλους είναι υπερβολικά σπάνια, αντίθετα προς τη συχνή εμφάνιση τέτοιων βλαβών σε γιγάντιους συγγενείς σπίλους.

Οι Swerdlow, English και Ciao παρακολούθησαν 265 ασθενείς με συγγενείς σπίλους. Αν και 2 από τους 33 ασθενείς με συγγενείς σπίλους, που κάλυπταν περισσότερο από το 5% της επιφάνειας του σώματος, πέθαναν από μελάνωμα, κανένα μελάνωμα δεν ανιχνεύθηκε στους 232 ασθενείς, στους οποίους οι συγγενείς σπίλοι κάλυπταν λιγότερο από το 5% της επιφάνειας του σώματος⁵⁸.

Παρομοίως, οι Sahin και συν, μελέτησαν 230 συγγενείς μελανοκυτταρικούς σπίλους μεσαίου μεγέθους επί 6,7 έτη κατά μέσο όρο (σε ένα μέσο όρο ηλικίας των 25,5 ετών). Σε αυτή την ομάδα δεν εμφανίσθηκαν μελανώματα και οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η μικρής διάρκειας παρακολούθησης μελέτη τους δεν στήριξε την άποψη ότι υπάρχει ένας κλινικά σημαντικός αυξημένος κίνδυνος κακοήθους μελανώματος, που να ξεκινάει σε συνηθισμένης

εμφάνισης, μεσαίου μεγέθους συγγενείς μελανοκυτταρικούς σπίλους. Ο κίνδυνος, κατά τη διάρκεια της ζωής, για κακοήθη εξαλλαγή σε ασθενείς με μεγάλους συγγενείς σπίλους εκτιμήθηκε ότι είναι από 5% έως 20%.

Οι Egan και συν, σε μία προοπτική μελέτη παρακολούθησαν 46 ασθενείς με μεγάλους συγγενείς σπίλους και βρήκαν ότι ο αθροιστικός 5ετής κίνδυνος για την ανάπτυξη δερματικού μελανώματος σε αυτούς τους ασθενείς ήταν 5,7%. Συχνά, νεοπλάσματα ανερχόμενα σε γιγάντιους συγγενείς σπίλους έχουν μία ετερογενή μορφολογική εμφάνιση, που είναι αποτέλεσμα ανώμαλων μεταναστεύσεων των πρωτογενών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας.

Κατά προσέγγιση, 60% των μελανωμάτων, που αναπτύσσονται σε γιγάντιους συγγενείς σπίλους, εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της πρώτης δεκαετίας της ζωής με τον πιο υψηλό βαθμό κακοήθειας κατά την διάρκεια των πρώτων 5 ετών της ζωής. Όσα από τα δύο τρίτα των μελανωμάτων αναπτύσσονται σε γιγάντιους συγγενείς μελανοκυτταρικούς σπίλους, έχουν εξωεπιδερμική προέλευση, Έτσι, σε αυτούς τους ασθενείς με μεγάλους συγγενείς σπίλους η προσέγγιση με "κλινική παρατήρηση" θα αποτύχει να ανιχνεύσει τις περισσότερες κακοήθεις εξαλλαγές.

Από θεραπευτική σκοπιά, επειδή σχεδόν όλα τα μελανώματα που αναπτύσσονται σε μικρούς συγγενείς σπίλους είναι επιδερμικού τύπου και η επίπτωση της κακοήθους εξαλλαγής είναι εξαιρετικά χαμηλή, η προληπτική απομάκρυνση αυτών των μικρών σπίλων δεν είναι απαραίτητη. Η κλινική παρατήρηση θα ανιχνεύσει κακοήθεις αλλαγές σε αυτούς τους μικρούς συγγενείς σπίλους.

Εάν μικροί συγγενείς σπίλοι πρόκειται να εξαιρεθούν, θα ήταν πιο πρόσφορο να καθυστερήσει αυτή η διαδικασία μέχρι ακριβώς πριν την εφηβεία, διότι μικροί συγγενείς σπίλοι δεν υφίστανται κακοήθη εξαλλαγή στις ομάδες προεφηβικής ηλικίας,

Λόγω του υψηλού κινδύνου κακοήθους εξαλλαγής σε γιγάντιους συγγενείς σπίλους,

συχνά συνιστάται προληπτική εξαίρεση. Δυστυχώς αυτό δεν είναι πάντα εφικτό σε αυτούς τους μεγάλους σπίλους, λόγω του μεγέθους τους και των πολλαπλών δορυφόρων βλαβών.

Εκτομή έως την περιτονία δεν εξαλείφει πάντοτε πλήρως τον κίνδυνο κακοήθους μελανώματος, διότι αυτά τα νευρογενή αρχέονα κύτταρα συχνά παραμένουν στους βαθύτερους ιστούς, ιδιαίτερα στις λεπτές μήνιγγες.

Σε αντίθεση με τους μικρούς συγγενείς σπίλους, ο μέγιστος κίνδυνος για κακοήθη εξαλλαγή σε γιγάντιους συγγενείς σπίλους υπάρχει πριν την ηλικία των 10 ετών. Ως εκ τούτου, για να αποκομίσουμε ένα όφελος από την προληπτική απομάκρυνση, αυτές οι μέθοδοι θα πρέπει να πραγματοποιούνται νωρίς κατά τη διάρκεια της ζωής.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το κακόηθες δυναμικό των "συγγενών σπίλων" μπορεί να είναι περισσότερο εξαρτώμενο από τον ιστολογικό τύπο της βλάβης, παρά από το κλινικό μέγεθος του σπίλου. Μικροί συγγενείς σπίλοι, συχνό, στερούνται μελανοκυττάρων στο βαθύτερο χόριο, που κλασικά συσχετίζονται με την ιστολογική διάγνωση των συγγενών σπίλων.

Ο αυξημένος κίνδυνος σχηματισμού μελανώματος σε μεγάλους συγγενείς σπίλους μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μετάλλαξης των πλευροδυναμικών νευρο-μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία εδρεύουν βαθιά στο χόριο.

Η προσέγγιση σ' αυτές τις βλάβες "ας περιμένουμε για να δούμε" δεν είναι η κατάλληλη, διότι τα μελανώματα σχηματίζονται βαθιά στο χόριο και είναι θανατηφόρα, πριν καν παρατηρηθούν αλλαγές στην επιφάνεια. Ίσως η καλύτερη προσέγγιση για τους μεσαίου μεγέθους συγγενείς σπίλους θα ήταν η προεγχειρητική βιοψία, με κυλινδρικό νυστέρι (punch) ή μικρή τομή, για τον προσδιορισμό του ιστολογικού μεγέθους του σπίλου. Εάν ο ιστολογικός τύπος είναι εκείνος ενός επίκτητου σπίλου (επιφανειακή ποικιλία των συγγενών σπίλων), τότε θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το κακόηθες δυναμικό είναι εξαιρετικά μικρό και κάθε κακοήθης εξαλλαγή θα ήταν πιο πιθανό να είναι επιδερμικής προέλευσης, γεγονός

ανιχνεύσιμο με την κλινική παρατήρηση. Εάν, παρόλα αυτά, ο ιστολογικός τύπος είναι εκείνος του βαθύτερου χοριακού όγκου, τότε ένας σημαντικός κίνδυνος μπορεί να είναι παρών. Σε αυτή την περίπτωση, θα ήταν πιθανώς ενδεδειγμένη μία προληπτική εξαίρεση στο πλέον πρώιμο στάδιο.

1.5.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ - ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η αρχική ταξινόμηση του μελανώματος ήταν πολύ απλή, αλλά επίσης πολύ ανακριβής. Οι ασθενείς εθεωρείτο ότι είχαν νόσο "σταδίου I" αν το μελάνωμα ήταν περιορισμένο στην πρωτοπαθή θέση. Νόσος "σταδίου N" σήμαινε μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες, αλλά όχι πέρα απ' αυτούς. Νόσος "σταδίου III" σήμαινε απομακρυσμένες μεταστάσεις. Επειδή κάθε στάδιο περιελάμβανε ασθενείς με ένα ευρύ φάσμα πρόγνωσης, αυτό το σύστημα σταδιοποίησης απέβη ελάχιστα μόνο ωφέλιμο ⁵⁷.

Ο Dr Clark και αργότερα ο Dr Breslow δημοσίευσαν τις παρατηρήσεις ότι το επίπεδο διεύδυσης στο χόριο ή το υποδόριο λίπος του πρωτοπαθούς δερματικού μελανώματος έχει άμεση συσχέτιση με την έκβαση της νόσου. Τα επίπεδα κατά Clark έχουν ως εξής:

- 1) Επίπεδο I: όγκος που περιορίζεται στην επιδερμίδα με άθικτη τη βασική μεμβράνη (π.χ. μελάνωμα in situ).
- 2) Επίπεδο II: μελάνωμα που επεκτείνεται διαμέσου της βασικής μεμβράνης στο θηλώδες χόριο.
- 3) Επίπεδο III: κύτταρα του όγκου διηθούν και πληρούν το θηλώδες χόριο.
- 4) Επίπεδο IV: επέκταση στο δικτυωτό χόριο.
- 5) Επίπεδο V: επέκταση στο υποδόριο λίπος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ 1988 ΤΗΣ AMERICAN JOINT COMMITTEE AND CANCER		
Στάδιο	Κριτήρια	TNM
IA	Εντοπισμένο μελάνωμα < 0,75 mm ή επίπεδο II	T1 No Mo
IB	Εντοπισμένο μελάνωμα 0,76 - 1,5 mm ή επίπεδο III	T2 No Mo
IIA	Εντοπισμένο μελάνωμα 1,5 - 4 mm ή επίπεδο IV	T3 No Mo
IIB	Εντοπισμένο μελάνωμα > 4 mm ή επίπεδο V	T4 No Mo
III	Λεμφαδενικές μεταστάσεις που αφορούν μία μόνο επιχώρια	Κάθε T. N. Mo

	λεμφαδενική δεξαμενή ή λιγότερες από 5 in transit μεταστάσεις απουσία λεμφαδενικής νόσου	
IV	Προχωρημένες επιχώριες μεταστάσεις ή απομακρυσμένες μεταστάσεις	Κάθε T. Κάθε N. M1 ή 2
Αν το πάχος και το επίπεδο διείσδυσης δε συμπίπτουν σε μία T σταδιοποίηση, το πάχος έχει προτεραιότητα.		

Η τεχνική μικροσταδιοποίησης κατά Breslow χρησιμοποιεί ένα οφθαλμικό μικρότερο για να μετρήσει το κατακόρυφο πάχος του μελανώματος από την κοκκιώδη στοιβάδα (ή τη βάση έλκους αν υπάρχει) ως το βαθύτερο τμήμα του μελανώματος που δεν συνέχεται με εξαρτηματικές δομές (πίνακας 1).

Το βάθος κατά Breslow βρέθηκε, ακολούθως, να έχει ισχυρότερη προγνωστική αξία από το επίπεδο κατά Clark. Οπωσδήποτε, πολλοί δερματολόγοι ακόμη αναφέρουν το επίπεδο κατά Clark γιατί μπορεί να είναι προγνωστικά σημαντικό σε επιλεγμένες περιπτώσεις.

Το 1988 η American Joint Committee on Cancer (AJCC) αναθεώρησε το σύστημα σταδιοποίησης του μελανώματος για να ενσωματώσει το πάχος κατά Breslow και το επίπεδο κατά Clark, σε μια "TNM" (T για το πάχος, N= λεμφαδενική μετάσταση, M= απομακρυσμένη μετάσταση) βάση. Η αρχική AJCC ταξινόμηση σταδιοποίησης χρησιμοποιείται ακόμα συχνά και δίδεται περιληπτικά στον πίνακα I.

Το 1997 ένα νέο σύστημα σταδιοποίησης προτάθηκε στη βάση μιας κριτικής ανάλυσης της ακρίβειας της ταξινόμησης της AJCC. Αυτή η ανάλυση επιτεύχθηκε με τη χρήση των καμπυλών επιβίωσης του Kaplan - Meier από προηγουμένως δημοσιευμένες μεγάλες σειρές που εξετάζουν την επίδραση στην επιβίωση του επιπέδου διείσδυσης, της παρουσίας εξέλκωσης, των τοπικών υποτροπών, των δορυφόρων μεταστάσεων, των in transit μεταστάσεων και της έκτασης των λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Η εκτελεστική επιτροπή της AJCC ενέκρινε αυτή την πρόταση αρχικά τον Ιούνιο του 1999, με τελικές συστάσεις να αναμένονταν το έτος 2001.

Οι ακόλουθες αλλαγές προτάθηκαν προκειμένου να βελτιωθεί η ακρίβεια της αρχικής

ταξινόμησης σταδιοποίησης της AJCC:

(1) Το επίπεδο διείσδυσης κατά Clark εξαλείφθηκε από το σύστημα, καθώς προσθέτει λίγα στην πρόγνωση και τείνει να είναι λιγότερο ακριβές και λιγότερο αναπαραγωγίμο από το βάθος κατά Breslow.

(2) Τα όρια της διαίρεσης του πάχους του όγκου άλλαξαν σε 1,2 και 4 mm, καθώς αυτά τα νούμερα παρείχαν μια καλύτερη πρόβλεψη της πρόγνωσης και ήταν ευκολότερο να χρησιμοποιηθούν από τα προηγουμένως χρησιμοποιούμενα όρια των 0,75, 1,5 και 4 mm.

(3) Καθώς η μικροσκοπική εξέγκωση βρέθηκε περισσότερο στατιστικά σημαντικό, ανεξάρτητο δυσμενές προγνωστικό παθολογικό χαρακτηριστικό, πέρα από το πάχος του όγκου, ενσωματώνεται στο σύστημα ταξινόμησης προσθέτοντας ένα "a" στο νούμερο "T" ως ένδειξη απουσίας εξέγκωσης ή ένα "b" ως ένδειξη παρουσίας εξέγκωσης.

(4) Η παρουσία μικροδορυφορικών στοιχείων (ιστολογικά) έχει την ίδιο προγνωστική σημασία με τα μακρο - δορυφορικά στοιχεία (εμφανών κλινικά) και την τοπική υποτροπή. Όλα τώρα ταξινομούνται ως στάδιο III της νόσου.

(5) In - transit ή δορυφόρες βλάβες στην κεφαλή και τον τράχηλο ή περιοχές του κορμιού προμηγύνουν χειρότερη πρόγνωση απ' όταν παρουσιάζονται στα άκρα και οι περιπτώσεις αυτές αναβαθμίζονται σε στάδιο III b.

(6) Ο αριθμός των προσβεβλημένων επιχωρίων λεμφαδένων είναι ένας πολύ πιο ισχυρός προγνωστικός παράγον επιβίωσης από την έκταση της προσβολής των λεμφαδένων ξεχωριστά με φυσική ή ιστοπαθολογική εξέταση.

Συμπερασματικά, η αναθεώρηση του συστήματος σταδιοποίησης για τους ασθενείς με δερματικό μελάνωμα αντανακλά πρόοδο στην ικανότητα μας να κατατάσσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τους ασθενείς σε προγνωστικές κατηγορίες. Το τίμημα για την αυξημένη ακρίβεια είναι η αυξημένη πολυπλοκότητα με κάθε αναθεώρηση . Οι ατέλειες όλων των συστημάτων σταδιοποίησης περιλαμβάνουν την έλλειψη ενσωμάτωσης των

ιδιαιτέρων χαρακτηριστικών, όπως η ανατομική εντόπιση και το γένος (φυλή), τα οποία έχουν και τα δύο ανεξάρτητη προγνωστική σημασία.

Επιπλέον, σημαντικοί παθολογικοί δείκτες της βιολογικής συμπεριφοράς, όπως η υποστροφή και η λεμφαγγειακή διείσδυση δεν θα πρέπει να αγνοούνται όταν είναι παρόντες,

Τελικά, θα πρέπει κανείς να συνειδητοποιήσει ότι η προγνωστική πληροφόρηση που αποκτάται από τα συστήματα σταδιοποίησης που συζητήθηκαν μπορεί να μην αντανακλά με ακρίβεια παραλλαγές του μελανώματος, περιλαμβανομένου του δερματοπλαστικού, του νευροτροπικού, του μελανώματος των βλεννογόνων και του οφθαλμικού μελανώματος.

1.5.6 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Για αρκετά χρόνια, οι περισσότεροι ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί να έχουν κακόηθες μελάνωμα είχαν υποβληθεί σε εκτεταμένη εργαστηριακή εκτίμηση, που περιελάμβανε διάφορες αιματολογικές αναλύσεις, ακτινογραφίες θώρακα και πιο προηγμένες εξετάσεις σταδιοποίησης (π.χ. υπολογιστικές τομογραφίες). Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έθεσαν υπό ερώτηση την αναγκαιότητα για απεικονιστικές εργαστηριακές εξετάσεις σε ασθενείς που δεν έχουν συστηματικά σημεία ή συμπτώματα ενδεικτικά μεταστατικής νόσου. Η Melanoma Consensus Conference του 1992 υποστηριζόμενη από το NH κατέληξε ότι δοκιμασίες σταδιοποίησης δεν ενδείκνυνται σε μελάνωματα πάχους 1,00 mm ή λιγότερο.

Οι Weiss και συν. μελέτησαν 261 ασθενείς με κακόηθες μελάνωμα πάχους μεγαλύτερου των 1,69 mm με ή χωρίς επιχώρια λεμφαδενική προσβολή. Από τους 145 ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο, το 68% είχε διαπιστωθεί από το ιστορικό και μόνο. Η φυσική εξέταση των ασθενών χωρίς συμπτώματα οδήγησε στη διάγνωση υποτροπιάζουσας νόσου σε ένα επιπλέον 26%. Τα εργαστηριακά αποτελέσματα δεν ήταν ποτέ ένας μοναδικός δείκτης της υποτροπιάζουσας νόσου. Παρόλο που ούτε η πλήρης αιματολογική ανάλυση ούτε οι εξετάσεις ηπατικής λειτουργίας ήταν παθολογικές στο 11% των ασθενών, καθένας απ' αυτούς τους ασθενείς είχε συμπτώματα ή φυσικά ευρήματα ενδεικτικά μετάστασης προτού

αποκτηθούν εργαστηριακά στοιχεία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣΚΟΠΗΣΗΣ (ELM) ΚΑΙ ΟΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ	
ELM	Ιστολογική συσχέτιση
Άτυπο μελαγχρωματικό δίκτυο	Υπερμελαγχρωματική ή ευρεία δικτυωτή περιφέρεια με ανώμαλο σχήμα ή κατανομή
Γκρι - μπλε περιοχές	Κεχρωσμένα μελανοφάγα ή μελανοκύτταρα εντοπισμένα στη μέση δικτυωτή δερμίδα
Άτυπο αγγειακό σχέδιο	Νεοαγγείωση ή αγγειοβριθείς Φωλιές από αμελανωτικά κύτταρα
Ακτινοειδείς γραμμές (streaks) και ψευδοπόδια	Συρρεύσεις ακτινωτές συνδεσμικές φωλεές μελανοκυττάρων
Ανώμαλη διάχυτη μελάχρωση (blotches)	Υπερμελάγχρωση καθ' όλη την έκταση όλων των επιπέδων της επιδερμίδας ή της άνω δερμίδας (σε μελανοκύτταρα ή μελανοφάγα)
Ανώμαλα στίγματα και σφαιρίδια	Αθροίσματα χρωστικής εντοπισμένης στην κερατίνη στιβάδα, επιδερματικό σύνδεσμο ή δερμίδα
Δείγμα υποστροφής	Περιοχές με απώλεια χρωστικής και ινοπλασία με διάσπαρτα δερματικά μελανοφάγα

Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η ανάλυση αίματος ρουτίνας είχε περιορισμένη αξία στη μετεγχειρητική παρακολούθηση ασθενών με αφαιρεθέν μέσου και υψηλού κινδύνου μελάνωμα. Οι Jillela, Mani και Nair εκτέλεσαν μια παρόμοια μελέτη σε 279 ασθενείς με AJCC σταδίου ΙΙΙ κακώθες μελάνωμα. Αυτοί οι ασθενείς παρακολουθούνται από το ιστορικό, την κλινική εξέταση, την εργαστηριακή αξιολόγηση και την ακτινογραφία θώρακα. Από τους 49 ασθενείς με υποτροπές, καμία υποτροπή δεν ανιχνεύθηκε από τις αναλύσεις αίματος.

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) είχε υποστηριχθεί από ορισμένους ως χρήσιμος δείκτης για τις ηπατικές μεταστάσεις. Από τους 121 ασθενείς με νόσο AJCC σταδίου ΙΙ και ΙV που μελετήθηκαν από τους Finck, Guiliano και Morton, η αυξημένη LDH ήταν ο πρώτος δείκτης υποτροπιάζουσας νόσου σε 15 ασθενείς (12,5%). Πάντως οι Buzaid και συν. ανέφεραν χαμηλή ευαισθησία της LDH ως δείκτη απομακρυσμένων μεταστάσεων, Τα επίπεδα της LDH στον ορό μπορεί να είναι ένδειξη απομακρυσμένων μεταστάσεων κυρίως του ήπατος, αλλά η ειδικότητα και η ευαισθησία είναι χαμηλές, Πιο σημαντικό, η πρόωρη

ανίχνευση των ηπατικών μεταστάσεων σπάνια επηρεάζει τη μακροπρόθεσμη επιβίωση των ασθενών, γιατί οι ηπατικές μεταστάσεις συμβαίνουν τυπικά στο κλινικό πλαίσιο της εκτεταμένης μεταστατικής νόσου⁵⁸.

Οι Tehune, Swanson και Johnson αξιολόγησαν τη χρήση της αρχικής ακτινογραφίας θώρακα για τη σταδιοποίηση σε 876 ασθενείς με εντοπισμένο μελάνωμα. Μόνο ένας (0,1%) είχε μια αληθώς θετική ακτινογραφία θώρακα, δεικτική πνευμονικών μεταστάσεων κατά τις αρχικές εξετάσεις. Αυτή η μία αληθώς - θετική ποσοστό του 15% οδήγησε σε δαπανηρούς ελέγχους και συνέβαλε στην αύξηση του επιπέδου αγωνίας των ασθενών.

Όταν το μελάνωμα μεθίσταται στους πνεύμονες, συνήθως εμφανίζεται σε βλάβες του 1 cm ή μεγαλύτερες, οι ακτινογραφίες θώρακα ρουτίνας έχουν περιορισμένη ικανότητα να ανιχνεύουν αυτές τις πρώιμες μεταστάσεις.

Οι Weiss και συν., επίσης, αξιολόγησαν τη χρησιμότητα των ακτινογραφιών θώρακα ως εξετάσεις παρακολούθησης για την ανίχνευση υποτροπιάζουσας νόσου σε ασθενείς με μέσου και υψηλού κινδύνου μελανώματα. Από τους 145 ασθενείς στους οποίους αναπτύχθηκε υποτροπιάζον μελάνωμα, μόνο 9 ασθενείς (6%) με υποτροπιάζουσα νόσο είχαν παθολογική ακτινογραφία θώρακα ως το μόνο παθολογικό εύρημα.

Παρόλο που 5 από αυτούς τους ασθενείς υπεβλήθησαν σε θωρακοτομή, μόνο ένας ασθενής παρέμεινε ελεύθερος νόσου για μακρά περίοδο, ως αποτέλεσμα διαγνωσθέντος υποτροπιάζοντος μελανώματος από την ακτινογραφία θώρακα.

Οι Jillela, Mani και Nair απέδειξαν ότι όταν οι ασθενείς είχαν επανειλημμένως εκπαιδευθεί σχετικά με τα σημεία και τα συμπτώματα της υποτροπής του μελανώματος, το 94% αυτών των ασθενών με υποτροπές της νόσου τους ανίχνευσαν τις υποτροπές μόνοι τους. Σ' εκείνους τους ασθενείς των οποίων το αρχικό μελάνωμα ήταν αρνητικό για λεμφαδένες, 100% των υποτροπών ανιχνεύθηκαν από τους ασθενείς.

Παρόλο που δεν έχουν γίνει τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες ως προς το

αποτέλεσμα που έχουν οι ακτινογραφίες θώρακος ρουτίνας στη διάρκεια επιβίωσης ασθενών με κακόηθες μελάνωμα, τέτοιες μελέτες είναι των ερευνητών του GIVIO στις οποίες 1320 ασθενείς με καρκίνο μαστού παρακολούθηθηκαν για πάνω από 5 χρόνια. Οι μισοί απ' αυτούς τους ασθενείς παρακολούθηθηκαν από το ιστορικό και τη φυσική εξέταση, καθώς και την ετήσια μαστογραφία.

Το άλλο μισό του πληθυσμού της μελέτης υποβλήθηκε, επίσης, σε πρόσθετες εξετάσεις, περιλαμβανομένων scans οστών, scans ήπατος, ακτινογραφιών θώρακα και αιματολογικών εξετάσεων. Δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ως προς τη συνολική επιβίωση, το χρόνο ανίχνευσης μιας υποτροπής ή τις σχετιζόμενες με την υγεία μετρήσεις της ποιότητας ζωής, συναισθηματική ευημερία, εικόνα του σώματος, κοινωνική λειτουργικότητα, συμπτώματα και ικανοποίηση από τη φροντίδα.

Εξαιτίας της περιορισμένης ικανότητας των ακτινογραφιών θώρακα να συλλάβουν την πρώιμη μεταστατική νόσο, η χρήση της υπολογιστικής τομογραφίας έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε μια προσπάθεια να διαγνωσθεί η πρώιμη μεταστατική νόσος.

Στη μεγαλύτερη αναδρομική μελέτη ως σήμερα, οι Buzaid και συν. αξιολόγησαν τη χρησιμότητα της υπολογιστικής τομογραφίας (CT scans) θώρακα και κοιλίας στην ανίχνευση υποκρυπτόμενης μεταστατικής νόσου. Είκοσι - εννέα (19%) από τους 151 ασθενείς είχαν CT scan που θεωρήθηκε ύποπτο για μετάσταση. Από αυτούς τους 29 ασθενείς, μόνο ένας ασθενής βρέθηκε να έχει επιχώρια λεμφαδενική νόσο και ένας επιπλέον ασθενής είχε απομακρυσμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Οι CT scans σταδιοποίησης απέτυχαν να ανιχνεύσουν υποκρυπτόμενες μεταστάσεις στο σύνολο 35 ασθενών που, ακολούθως, εμφάνισαν μεταστάσεις σε απομακρυσμένες θέσεις και στο σύνολο 7 ασθενών, στους οποίους αναπτύχθηκαν ακολούθως επιχώριες λεμφαδενικές υποτροπές. Επί πλέον, 21 ασθενείς (17%) είχαν ψευδώς - θετικά ευρήματα που απαιτούσαν περαιτέρω δαπανηρό έλεγχο. Αυτές οι πρόσθετες εξετάσεις (π.χ. θωρακοτομή, βιοψίες

ήπατος) πρόσθεσαν σημαντικά στη νοσηρότητα και την αγωνία του ασθενούς. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι οι CT scans δεν ήταν χρήσιμες στην ανίχνευση κρυφών μεταστάσεων μελανώματος σε ασθενείς με πρωτοπαθές μελάνωμα.

Οι Iswe και συν. έκαναν ανασκόπηση σε 393 ασθενείς με κακόηθες μελάνωμα σταδίου I για να εξακριβώσουν την αξία των εξετάσεων σταδιοποίησης. Ένα σύνολο από 264 εξετάσεις αίματος, 345 ακτινογραφίες θώρακα, 50 CT scans θώρακα, 52 CT scans εγκεφάλου, 72 bipedal lymphangiograms, 207 (radiomucclide) CT scans ήπατος, σπλήνα και 166 scans οστών πραγματοποιήθηκαν. Η κλινική κατάσταση άλλαξε σε ένα μόνο ασθενή ως αποτέλεσμα μιας θετικής λεμφαγγειογραφίας⁵⁹.

Αρκετές άλλες παρόμοιες μελέτες έχουν δημοσιευτεί, αποτυγχάνοντας να πιστοποιήσουν το όφελος από τις προηγμένες απεικονιστικές εξετάσεις προς αναζήτηση υποκρυπτόμενης κακοήθειας σε κατά τα άλλα ασυμπτωματικούς ασθενείς.

Οι Roth και συν., Thomas και συν., Evans και συν., Au και συν. και Johnson και συν. έκαναν έρευνα σε ένα σύνολο 520 ασθενών με μελάνωμα χωρίς ένδειξη μεταστάσεων από το ιστορικό ή τη φυσική εξέταση και δεν βρήκαν αξία στην απεικόνιση του ήπατος, εγκεφάλου, οστών ή όλου του σώματος, γιατί καμία υποκρυπτόμενη μετάσταση δεν αποκαλύφθηκε μ' αυτές τις μεθόδους,

Παρόλο που αυτές οι αναδρομικές μελέτες δεν κατευθύνουν τον έλεγχο των ασθενών με υψηλού κινδύνου ή υποτροπιάζουσα νόσο, η ένδειξη ως τώρα δεν στηρίζει τη συνεχή χρήση αυτών των tests στον έλεγχο των ασυμπτωματικών ασθενών με πρωτοπαθές μελάνωμα.

Η κύρια εξαίρεση στην απόκτηση αυτών των εξετάσεων σε ασυμπτωματικούς ασθενείς θα μπορούσε να είναι σ' αυτά τα πολυπειθαρχικά κέντρα αναφοράς, που διευθύνουν τρέχουσες προοπτικές μελέτες. Πάντως, ακόμα και σε κέντρα αναφοράς, όπως το University of Michigan Multi - Disciplinary Melanoma Clinic, "αναλύσεις ορού, ακτινογραφίες θώρακα,

ή υπολογιστικές τομογραφίες δεν παραγγέλλονται ως εξετάσεις ρουτίνας για ασθενείς με τοπική νόσο εκτός και αν υπάρχει κλινική υποψία".

Νεώτερες τεχνικές για να συμπληρώσουν ή τελικά να αντικαταστήσουν τις τρέχουσες εξετάσεις βρίσκονται αυτόν τον καιρό σε ερευνητικό στάδιο. Μία απ' αυτές, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, βασίζεται στην υπόθεση ότι οι κακοήθεις όγκοι έχουν έναν υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό από τους φυσιολογικούς ιστούς και ως εκ τούτου χρησιμοποιούν περισσότερη γλυκόζη.

Ο σκοπός της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων είναι να καταστεί ικανή να απεικονίσει όλο το σώμα για υποκρυπτόμενες μεταστάσεις. Αρχικές αναφορές υποδηλώνουν ότι οι μεταστάσεις μπορεί να είναι ανιχνεύσιμες μέχρι και 6 μήνες νωρίτερα απ' ό,τι με τη φυσική εξέταση ή τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους. Κλινική εφαρμογή ρουτίνας είναι επί του παρόντος περιορισμένη σε λίγα μόνο ερευνητικά κέντρα.

1.5.7 ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

Ο καλύτερος τρόπος για να μειωθεί η θνησιμότητα από το δερματικό μελάνωμα είναι μέσω της πρώιμης διάγνωσης, όταν ο όγκος είναι λεπτός,

Υψηλού κινδύνου ασθενείς που παρακολουθούνται με περιοδική επιτήρηση αποδείχθηκε ότι είχαν σημαντικά λεπτότερα και λιγότερο επιθετικά μελανώματα, σε σύγκριση με ασθενείς των οποίων οι όγκοι διαγνώστηκαν στην αρχή τυχαία.

Έχει γίνει παραδεκτό ότι μικροί όγκοι μπορούν να προβλεφθούν απουσία μιας φωτογράφισης αναφοράς, Γενικά, όγκοι μικρής διαμέτρου είναι πιθανότερο να είναι λεπτότεροι ή *in situ*, συγκρινόμενοι με μεγαλύτερης διαμέτρου μελανώματα.

Φωτογράφιση ολόκληρου του σώματος, έχει υποστηριχθεί από πολλούς συγγραφείς, για να τεκμηριώνεται σταθερότητα ή μη σταθερότητα των στηλών σε άτομα υψηλού κινδύνου για δερματικό μελάνωμα. Η φιλοσοφία πίσω από τη χρήση ολόσωμης φωτογράφισης είναι ότι οι σχετικά λεπτές αλλαγές σε προϋπάρχοντες σπίλους, που θα

μπορούσαν αλλιώς να παραβλεφθούν χωρίς φωτογράφιση αναφοράς, μπορούν να ανιχνευθούν σε πρώιμο χρόνο.

Επιπλέον, η τεκμηρίωση νέων σπύλων θα μπορούσε να βελτιωθεί με τη φωτογράφιση αναφοράς, κατά προσέγγιση 41% των ανταποκρινομένων σε μια επιθεώρηση της Nonmilitary - Accredited Dermatology Residency Programs στις Ηνωμένες Πολιτείες, χρησιμοποιούν τη φωτογράφιση αναφοράς, σε 90% ή περισσότερο των ασθενών τους που έχουν δυσπλαστικούς σπύλους. Αρκετές τεχνικές λήψης σειρών φωτογραφιών σ' αυτούς τους ασθενείς έχουν περιγραφεί. Καμία τυποποιημένη τεχνική πάντως δεν έχει καθολικά διασκευαστεί⁵⁸.

Αρκετές αναφορές έχουν δημοσιευθεί αναζητώντας τα οφέλη της ολόσωμης φωτογράφισης στη διάγνωση του δυνητικώς θεραπεύσιμου δερματικού μελανώματος. Οι Rivers και συν. ισχυρίζονται ότι οι 10 από τους 18 ασθενείς που παρακολουθούνται για άτυπους σπύλους είχαν μια πρώιμη διάγνωση του δερματικού μελανώματος, ως άμεσο αποτέλεσμα των αλλαγών που ανιχνεύθηκαν στη σύγκριση με τη φωτογράφιση αναφοράς.

Παρομοίως, οι Kelly και συν, ανίχνευσαν 11 από 20 δερματικά μελανώματα εξ' αιτίας των αλλαγών σε σύγκριση με φωτογραφίες αναφοράς σε 278 ασθενείς που ήταν υπό προοπτική παρακολούθηση.

Δυστυχώς, τελικές μελέτες στις οποίες ασθενείς υψηλού κινδύνου να παρακολουθούνται προοπτικά με και χωρίς τη χρήση ολόσωμων φωτο-γραφιών αναφοράς δεν έχουν πραγματοποιηθεί, προκειμένου να καθορισθεί αν η χρήση της φωτογραφίας βελτιώνει τη μακροπρόθεσμη επιβίωση στους ασθενείς υψηλού κινδύνου.

Οι υποστηρικτές της ολόσωμης φωτογραφίας ισχυρίζονται ότι οι φωτογραφίες βοηθούν στην ανίχνευση νέων ή μεταβαλλόμενων σπύλων σε υψηλού κινδύνου ασθενείς, οι οποίοι μπορούν μετά να αφαιρεθούν. Οι ενάντιοι ισχυρίζονται ότι η φωτογράφιση ασθενών με πολλαπλούς, άτυπους σπύλους οδηγεί σε μη απαραίτητη χειρουργική αφαίρεση πολλών

σπίλων.

Εξ' ορισμού, οι ασθενείς με σύνδρομο δυσπλαστικών σπίλων συνεχίζουν να αναπτύσσουν νέες θέσεις στη διάρκεια της ζωής τους. Επί πλέον, οι δυσπλαστικοί σπίλοι, εξ' ορισμού, υφίστανται με το χρόνο μορφολογικές αλλαγές. Από ιατρονομική πλευράς οι ολόσωμες φωτογραφίες θα ωθούσαν τους ιατρούς να αφαιρούν κάθε μεταβαλλόμενο ή νέο σπίλο σ' αυτούς τους ασθενείς.

Ειρωνικά, η φωτογραφία θα μπορούσε να είναι περισσότερο χρήσιμη σε ασθενείς χωρίς πολλαπλούς ή δυσπλαστικούς σπίλους, στους οποίους αναπτύσσονται σποραδικά μελανώματα.

Αυτοί οι ασθενείς τυπικά δεν αναπτύσσουν νέους σπίλους αργότερα στη ζωή, έτσι ώστε η φωτογραφική τεκμηρίωση εμφανίσεως νέων σπίλων σ' αυτούς τους ασθενείς θα μπορούσε πραγματικά να αντιπροσωπεύει ένα ασύνηθες βιολογικό συμβάν που δικαιολογεί βιοψία. Ίσως, ο πιο επιτακτικός λόγος για τη χρήση φωτογραφίας σ' αυτή την ομάδα ασθενών είναι για να καθησυχάσουν τους ασθενείς ότι ο σπίλος τον οποίο θεωρούν νέο είτε μεταβαλλόμενο είναι στην πραγματικότητα σταθερός όπως εξακριβώνεται από τη φωτογραφία (πίνακας 2).

Περίληπτικά, η ELM είναι μια γρήγορη και μη επιθετική διαδικασία που μπορεί να αυξήσει την ικανότητα του κλινικού να διαγνώσει μια μελαγχρωματική περιοχή ως μελάνωμα ή παρέχει ικανοποιητικές ενδείξεις μιας καλοήθους εξεργασίας, όπως μια σμηγματορροϊκή υπερκεράτωση ή ένα αγγειακό νεόπλασμα σε μορφολογικά δύσκολες περιπτώσεις.

Πολύ μεγάλη προσοχή πρέπει να υπάρχει με την τεχνική, γιατί ακόμα και οι πεπειραμένοι χρήστες μπορεί να αποκτήσουν μια ψευδή αίσθηση ασφάλειας σε 20% ή περισσότερο των περιπτώσεων μελανώματος που στερούνται τα κλασικά χαρακτηριστικά της ELM για το μελάνωμα. Σε άπειρα χέρια, η ELM πραγματικά μειώνει τη διαγνωστική εκπαίδευση.

Μία 9ωρη σειρά μαθημάτων με ενεργή συμμετοχή των διδασκομένων,

μέσα σε 3 ημέρες με γνώστες και έμπειρους εκπαιδευτές έχει αναφερθεί ως επαρκής για τους εκπαιδευτικούς σκοπούς πάνω στην ELM. Η απόφαση να πραγματοποιείται βιοψία μιας περιοχής μέτριας ως υψηλής κλινικής υποψίας για το μελάνωμα πριν την παρατήρηση με ELM δεν θα πρέπει να αλλάζει από την έλλειψη κριτηρίων της ELM για το μελάνωμα.

1.6 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ & ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Ακριβείς πληροφορίες ⁵² για τη συχνότητα και τη θνησιμότητα από καρκίνο του δέρματος είναι δύσκολο να ληφθούν. Εξαιρώντας το μελάνωμα του δέρματος, ο καρκίνος του δέρματος γενικά δεν αναφέρεται στις καταγραφές των καρκίνων και ο καρκίνος του δέρματος σαν αιτία θανάτου πιθανότατα αναφέρεται λιγότερο από ότι είναι στην πραγματικότητα.

Εντούτοις, η επίπτωση του καρκίνου του δέρματος (πλην του μελανώματος) πιστεύεται ότι έχει αυξηθεί από τις αρχές του εικοστού αιώνα και ειδικές έρευνες έδειξαν ότι συνεχίζει να αυξάνεται.

Οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος (πλην του μελανώματος) πιστεύεται ότι οφείλονται στη χρόνια έκθεση του δέρματος στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (UVR). Αυτή η ιδέα γεννήθηκε γύρω στα μέσα του αιώνα από την έξυπνη παρατήρηση ιατρών, οι οποίοι σημείωσαν ότι οι καρκίνοι του δέρματος συνέβαιναν στα ηλιοεκτεθειμένα μέρη του δέρματος ανθρώπων που ακολουθούσαν εξωτερικές εργασίες. Έτσι, το ηλιακό φως ήταν ένας από τους πρώτους παράγοντες που αναγνωρίστηκε ως καρκινογόνος για τους ανθρώπους.

Η αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του δέρματος, συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος, έχει αποδοθεί στην αυξανόμενη έκθεση του πληθυσμού στο ηλιακό φως. Κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, αλλαγές στο στυλ ντυσίματος, ψυχαγωγικές δραστηριότητες, η μακροζωία και άλλες πλευρές του τρόπου ζωής, είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση της έκθεσης στο ηλιακό φως. Άλλοι παράγοντες, όπως χημικά ή ιώσεις, είναι πιθανό επίσης να έχουν παίξει κάποιο ρόλο στην αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του δέρματος,

αλλά προς το παρόν δεν υπάρχουν αποδείξεις που να υποστηρίζουν αυτή την ιδέα. Τα μήκη κύματος της ηλιακής ακτινοβολίας που ενοχοποιούνται για τη δημιουργία του όγκου φαίνεται να είναι εντός της υπεριώδους (UV) περιοχής του φάσματος (μήκη κύματος μεταξύ 200 και 400 nm), ειδικά για το φάσμα της UVB (290-320 nm). Μόνο ένα μικρό μέρος της UVB ακτινοβολίας είναι παρόν στο ηλιακό φως, γιατί τα μήκη κύματος σε αυτή την περιοχή απορροφούνται ισχυρά από το στρώμα του όζοντος που βρίσκεται στο υψηλότερο τμήμα της ατμόσφαιρας. Τα μήκη κύματος της UV κάτω από 290 nm (UVC ακτινοβολία) απορροφούνται τελείως από το όζον και γι' αυτό δεν είναι παρόντα στο φυσικό φως. Πειραματικές αποδείξεις δείχνουν ότι το όζον της ατμόσφαιρας μειώνεται από το 1980 περίπου και περαιτέρω μειώσεις του όζοντος αναμένονται εξαιτίας της απελευθέρωσης στην ατμόσφαιρα συγκεντρώσεων χλωροφλουοροάνθρακα. Η μείωση της συγκέντρωσης του όζοντος στην ατμόσφαιρα θα προκαλέσει μια αντίστοιχη αύξηση στο ποσό της UVR στο ηλιακό φως και ιδιαίτερα, της UVB.

Η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου του δέρματος (πλην του μελανώματος), από τη μέχρι τώρα εμπειρία μας, φαίνεται ότι είναι απίθανο να σχετίζεται με τη μείωση του όζοντος. Αυτό συμβαίνει γιατί οι υπολογισμένες μειώσεις των συγκεντρώσεων του όζοντος πάνω από κατοικημένες περιοχές της υδρογείου είναι μικρές και πιθανότατα, έχουν συμβεί πολύ πρόσφατα για να έχουν μια σχέση με την επίπτωση του καρκίνου του δέρματος. Από την άλλη πλευρά, η πιθανότητα ότι οι συγκεντρώσεις του όζοντος θα συνεχίσουν να μειώνονται υποδηλώνει ότι η επίπτωση του καρκίνου του δέρματος δεν έχει ακόμη κορυφωθεί και θα συνεχίσει να αυξάνεται στο μέλλον.

1.6.1 UV ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Αν και δεν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ευθέως ότι το ηλιακό φως και ειδικά η UVB ακτινοβολία στο ηλιακό φως προκαλεί καρκίνο του δέρματος στους ανθρώπους, υπάρχουν αποδείξεις για το ρόλο της.

Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι η επανειλημμένη, συσσωρευτική έκθεση στην ηλιακή UVR ακτινοβολία είναι η αρχική αιτία για τους περισσότερους καρκίνους του δέρματος (πλην του μελανώματος) στους ηλιοεκτεθειμένους πληθυσμούς.

1.6.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η απόδειξη που υποστηρίζει την ιδέα ότι το ηλιακό φως προκαλεί καρκίνο του δέρματος (πλην του μελανώματος) προέρχεται από μια ποικιλία παρατηρήσεων σε ανθρώπους.

Περισσότερο αποδεικτικό είναι το γεγονός ότι αυτοί οι καρκίνοι του δέρματος και ειδικά τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, εμφανίζονται στις περιοχές του σώματος που υφίστανται τη μεγαλύτερη έκθεση στο ηλιακό φως, με αποτέλεσμα χρόνια UV βλάβη.



Ακανθοκυτταρικό επιθηλίωμα. Η βλάβη ελκώνεται, εμφανίζοντας σαφώς ανυψωμένα, υπόσκληρα όρια.

Το πρόσωπο, το μέτωπο, ο λαιμός, η ραχιαία επιφάνεια των χεριών και οι βραχίονες είναι οι πιο συνηθισμένες θέσεις για ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος, πλην του μελανώματος.

Η επίπτωση αυτών των καρκίνων του δέρματος αυξάνει με την ηλικία, υποδηλώνοντας ότι η συσσωρευτική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ζωής ευθύνεται για την καρκινογενετική δραστηριότητα.

Γεωγραφικά, υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ του ποσού της ηλιακής ακτινοβολίας του περιβάλλοντος και της επίπτωσης του καρκίνου του δέρματος σε ηλιοεκτεθειμένα άτομα

στον πληθυσμό. Έτσι, η επίπτωση του καρκίνου του δέρματος στη λευκή φυλή αυξάνει καθώς πλησιάζουμε στον ισημερινό.

Αυτό αφορά περισσότερο στο ακανθοκυτταρικό επιθηλιώμα και λιγότερο το βασικοκυτταρικό. Η έκθεση στο ηλιακό φως είναι η αιτία για τους περισσότερους καρκίνους του δέρματος (πλην του μελανώματος).

Προς τούτο, οι μελέτες σε ασθενείς με xeroderma pigmentosum και σύνδρομο βασικοκυτταρικού σπίλου και των ψαράδων του Maryland υποδηλώνουν ισχυρά ότι τα καρκινογόνα μήκη κύματος στο ηλιακό φως πέτουν εντός της UVB περιοχής στο ηλιακό φάσμα.

Αυτή η υπόθεση έχει τεκμηριωθεί με πολλούς τύπους πειραμάτων σε πειραματόζωα.

1.6.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Είναι σαφές ότι η ευαισθησία για καρκίνο του δέρματος, πλην του μελανώματος, υπαγορεύεται από ένα συνδυασμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου της συνήθειας της έκθεσης στον ήλιο, της απασχόλησης και του βαθμού της μελάγχρωσης του δέρματος.

Επιπρόσθετα σε αυτούς τους μείζονες παράγοντες, άλλοι λιγότερο φανεροί πιθανόν να συμβάλλουν στην ατομική ευαισθησία στην ηλιακή καρκινογένεση. Για παράδειγμα, άτομα με erythrodysplasia verruciformis (μυρμηκιδώδης ερυθροδυσπλασία), μερικές φορές, αναπτύσσουν άκανθο κυτταρικά επιθηλιώματα. Όταν συμβαίνει αυτό, οι όγκοι γενικά εμφανίζονται σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές του σώματος. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι πιθανόν να υπάρχει μία αλληλεπίδραση μεταξύ των ιών των θηλωμάτων και της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, που προκαλεί την ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος.

Το εύρημα που προέκυψε από μία μελέτη⁵³, ότι το 20% των βασικοκυτταρικών και των ακανθοκυτταρικών επιθηλιωμάτων από ηλιοεκτεθειμένες περιοχές του σώματος περιείχε DNA ιού papilloma, ενώ φυσιολογικό δέρμα από τα ίδια άτομα δεν περιείχε, συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η μόλυνση με συγκεκριμένους τύπους ιών papilloma αυξάνει τον κίνδυνο

ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος.

Από τη στιγμή που ένα άτομο έχει εμφανίσει καρκίνο του δέρματος που δεν είναι όμως μελάνωμα, η πιθανότητα να αναπτύξει και ένα δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο του δέρματος είναι πολύ μεγαλύτερη από ένα άτομο με παρόμοιο τύπο δέρματος που δεν έχει εμφανίσει άλλο καρκίνο του δέρματος.

Σε μία μελέτη, το ένα τρίτο ασθενών που είχαν βασικοκυτταρικό επιθηλίωμα ανέπτυξε ένα δεύτερο ακόμη, μέσα στα επόμενα 5 χρόνια.

Πιθανώς αυτό να συμβαίνει γιατί άτομα που ήδη έχουν αναπτύξει καρκίνο του δέρματος έχουν φτάσει στο σημείο να συσσωρεύουν μία δόση - καρκινογόνου - UVR.

Ανεξάρτητα από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται, η παρατήρηση αυτή καταδεικνύει πως η ύπαρξη καρκίνου του δέρματος σε ένα άτομο εγκαθιδρύει ένα παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη επακόλουθων όγκων.

Ένας παράγοντας που αναμειγνύεται σίγουρα στην αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος -που δεν είναι όμως μελάνωμα- είναι σίγουρα η χρόνια ανοσοκαταστολή.

Η παρατήρηση αυτή προέρχεται από μελέτες με εμφάνιση καρκίνου σε άτομα που έχουν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού, γεγονός που καταδεικνύει πως ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος έχει αυξηθεί κατά 4 έως και 7 φορές σε περιοχές που δεν είναι ηλιοεκτεθειμένες και πάνω από 20 φορές σε περιοχές που είναι ηλιοεκτεθειμένες.

Οι όγκοι αυτοί αρχικά εμφανίζονται σε περιοχές του σώματος που είναι ηλιοεκτεθειμένες και παρατηρούνται μέσα σε λίγα χρόνια μετά τη μεταμόσχευση.

Ανάλυση ασθενών οι οποίοι ελάμβαναν διάφορους τύπους ανοσοκατασταλτικής θεραπείας σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης νεφρού καθώς και ασθενών με μεταμόσχευση άλλων οργάνων δείχνει πως το κοινό σημείο σε όλες αυτές τις περιπτώσεις που συνδυάζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος είναι η χρόνια ανοσοκαταστολή -η

οποία βέβαια είναι απαραίτητη για να μη γίνει η απόρριψη του μοσχεύματος-, Επομένως, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος ενός ατόμου παίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος.

Είναι επίσης πιθανό ότι η έκθεση σε ορισμένα χημικά προϊόντα μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του δέρματος από την UVR. Μελέτες που έγιναν σε μοντέλα ζώων έδειξαν πως υπάρχουν πολλοί τύποι αντιδράσεων -σχέσεων μεταξύ χημικών ουσιών και UVR- που μπορεί να αυξήσουν ή να ελαττώσουν το σχηματισμό όγκου. Για παράδειγμα, επανειλημμένες επαλείψεις ενός χημικού παράγοντα που προκαλεί την ανάπτυξη όγκου όπως το croton oil στο δέρμα σε συνδυασμό με UVR -σε ποντίκια- οδηγεί σε ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος, παρόλο που η έκθεση μόνο στον παράγοντα αυτό προκαλούσε Ca σε μικρό ή καθόλου ποσοστό. Βέβαιο, στους ανθρώπους τέτοιες συσχετίσεις έχουν παρατηρηθεί μόνο με τα ψωραλένια που είναι φωτοευαισθητοποιήσιμα παράγοντες.

Έτσι, σε ορισμένες μελέτες η μακρόχρονη θεραπεία με 8 μεθοξυ-ψωραλένιο και UVA ακτινοβολία (PUVA) για τη θεραπεία της ψωρίασης έχει συσχετισθεί με αυξημένη επίπτωση SCC. Παρόλα αυτά, αυτοί οι τύποι καρκίνου του δέρματος δεν εμφανίζονται ιδιαίτερα σε μέρη του σώματος που προσλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό UVR. Έτσι, οι μορφές αυτές καρκίνου του δέρματος έχουν να κάνουν μάλλον με τη θεραπεία και όχι με τη συσχέτιση μεταξύ ηλιακής UVR και θεραπείας με PUVA.

Μετά από μελέτες που έγιναν σε περιπτώσεις ασθενών με μελαγχρωματική ξηροδερμία, φαίνεται ότι η ικανότητα των κυττάρων ενός ατόμου -που το DNA έχει υποστεί βλάβες από την UV- να τις διορθώνει επηρεάζει και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου δέρματος.



Κακότηδες μελάνωμα
τύπου κακοήθους φακής.
Η βλάβη αρχίζει να
παχύνεται καθώς
διεισδύει προς το χόριο.

Επειδή πολλά γονίδια αναμιγνύονται στη διαδικασία διόρθωσης του ελαττωματικού DNA, μπορεί κάποιος να περιμένει ότι τα κύτταρα κάθε ατόμου έχουν διαφορετική ικανότητα να διορθώνουν το "βλαμμένο" DNA που προέρχεται από συνδυασμό χημικών προϊόντων και ακτινοβολίας και επομένως, παρατηρούνται διαφορές στο φαινόμενο της UV καρκινογένεσης. Μια τέτοια παρατήρηση σημειώθηκε σε μια σύγκριση της ικανότητας επιδιόρθωσης βλαβών στο επίπεδο της πυριμιδίνης (που είχαν προκληθεί *in vitro* από UVR) μεταξύ του δέρματος ασθενών που είχαν αναπτύξει βασικοκυτταρικό επιθηλίωμα και ασθενών με φυσιολογικό δέρμα.

Η ύπαρξη BCC συσχετιζόταν με μειωμένη ικανότητα διόρθωσης τέτοιων βλαβών στο DNA.

Γ' αυτό και η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA που έχει ένα άτομο μπορεί να συμβάλλει στους παράγοντες ανάπτυξης του καρκίνου του δέρματος.

1.6.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

Μετά από πρόσφατες μελέτες που έγιναν σχετικά με την UV καρκινογένεση σε ποντικούς, έγινε φανερό πως υπάρχει ένας ανοσολογικός χαρακτήρας -παράμετρος- στο θέμα της πρόκλησης καρκίνου. Μελέτες που αφορούν στους αντιγονικούς δείκτες στον καρκίνο του δέρματος που προκαλείται σε τριχωτά, νεογέννητα ποντίκια έδειξε ότι αυτοί οι όγκοι ήταν ισχυρά αντιγονικοί (όταν μεταμοσχεύθηκαν σε υγιή αλλά γενετικά ίδια ποντίκια, απορρίφθηκαν από το ανοσολογικό σύστημα των υγιών ποντικών, παρόλο που μπορεί να

αναπτυχθούν προοδευτικά σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια). Αυτό το εύρημα έφερε στην επιφάνεια το ερώτημα πώς αυτοί οι ιδιαίτερα αντιγονικοί (με αντιγονικούς δείκτες) όγκοι ήταν δυνατόν να επιμένουν και να αναπτύσσονται στον αρχικό ξενιστή.

Πειράματα με μεταμόσχευση έδειξαν πως πολύ νωρίς σε περιπτώσεις χρόνιας UV ακτινοβολίας και πριν ακόμα οι πρωτοπαθής όγκοι γίνουν έκδηλοι, οι ποντικοί έχαναν την ικανότητα τους να απορρίπτουν τους όγκους που προκαλούνταν από την UV.

Πέρα από αυτό, η UV ακτινοβολία έχει συστηματική δράση στα ποντίκια που εμπλέκεται με το φαινόμενο απόρριψης όγκου. Η σπουδαιότητα της συστηματικής δράσης στην πρόκληση όγκου φάνηκε με πειράματα στα οποία ποντίκια εκτέθηκαν σε UVR για περιορισμένο χρονικό διάστημα, ώστε να προκληθεί το συστηματικό αποτέλεσμα και στη συνέχεια, σε άλλη περιοχή του δέρματος τους εκτέθηκαν σε καρκινογόνες δόσεις⁵⁴.

Ποντίκια που είχαν προακτινοβοληθεί σε απομακρυσμένο σημείο παρουσίασαν αύξηση στο ρυθμό της πρόκλησης Ca. Παρόμοιες μελέτες που χρησιμοποίησαν UVR σαν εναρκτήριο παράγοντα και croton oil σαν προαγωγό έδειξαν συστηματική δράση της UV ακτινοβολίας που ήταν καθοριστική κατά τη διάρκεια του σταδίου της προώθησης όσον αφορά τα δύο στάδια της καρκινογένεσης. Η ανικανότητα των ακτινοβολούμενων ποντικών να απορρίψουν τους όγκους που προκλήθηκαν από την UV μπορεί παθητικά να μεταφέρεται με λεμφικά κύτταρα, καταδεικνύοντας την ύπαρξη μιας συστηματικής διαφοροποίησης η οποία ήταν ανοσολογικής φύσης. Μελέτες έδειξαν ότι τα λεμφοκύτταρα ήταν υπεύθυνα γι' αυτό το αποτέλεσμα και ότι αυτά τα κατασταλτικά κύτταρα ανέστειλαν την απόρριψη των πρωτοπαθών, UV-προκλητών, καρκίνων του δέρματος.

Οι μελέτες αυτές έδειξαν πως η έκθεση του δέρματος στην UVR προκαλούσε προφανείς, συστηματικές αλλαγές στην ανοσολογική λειτουργία και ακόμη περισσότερο, πως οι ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες της UV ακτινοβολίας είχαν κριτική σημασία στη διαδικασία της UV-καρκινογένεσης.

Η εύρεση της συχνότητας ανάπτυξης Ca του δέρματος σε ανοσοκατασταλμένα ανθρώπινα υλικά στηρίζει την άποψη πως ανοσολογικοί παράγοντες είναι επίσης σημαντικοί στην UV καρκινογένεση στους ανθρώπους. Πολύ δε περισσότερο, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως ασθενείς που εμφάνιζαν Ca του δέρματος που σχετιζόταν με έκθεση στον ήλιο, ήταν πιο ευαίσθητοι σε ανοσοκαταστολή λόγω της έκθεσης στην UV, απ' ότι φυσιολογικοί ασθενείς. Επιπρόσθετα, αυτό το εύρημα υπονοεί πως η ευαισθησία στην ανοσολογική δράση της UVR μπορεί να είναι ο καθοριστικός παράγοντας στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος στους ανθρώπους.

1.6.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Από εμπειρικές μελέτες που αφορούσαν στη UV καρκινογένεση, είναι φανερό πως η παίζει μία σειρά ρόλων στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Η UVR μπορεί να είναι ένας αυτοτελής καρκινογενετικός παράγοντας και να προκαλεί την εμφάνιση καρκίνων σε ζώα καθώς και σε κύτταρα *in vitro*, επί απουσίας οποιουδήποτε άλλου ερεθιστικού παράγοντα (εκλυτικού). Μπορεί να είναι ένας αρχικός παράγοντας στη με πολλές διαβαθμίσεις διαδικασία της καρκινογένεσης, στην οποία απαιτούνται παράγοντες προώθησης για την ανάπτυξη του όγκου. Η UVR μοιράζεται μερίδιο μαζί με χημικούς παράγοντες που προωθούν τη διαδικασία δημιουργίας όγκου, όπως την πρόκληση πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τη διέγερση της παραγωγής ενζύμων που έχουν σχέση με την ανάπτυξη του όγκου και την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης, όπου όλα αυτά - πιθανώς - να συνεισφέρουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η ανοσοκατασταλτική δράση της UVR επίσης, συνεισφέρει στην καρκινογόνο δράση της.

Επιπρόσθετο, η UVR μπορεί να έχει και άλλες δράσεις στο επίπεδο του "τοπικού" περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσεται ο όγκος, όπως για παράδειγμα να αυξάνει την αγγειοβρίθεια και την παραγωγή παραγόντων ανάπτυξης - growth factors - τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Επίσης, οποιαδήποτε από αυτές τις

δράσεις της UVR μπορεί να συνεισφέρει στη διαδικασία εμφάνισης όγκου του δέρματος με τη βοήθεια και άλλων παραγόντων όπως οι ακτίνες-X, ιοί ή και χημικά καρκινογόνα - ουσίες. Έτσι, η UVR μπορεί να συνεισφέρει (ως συνπαράγοντας) και σε άλλους τύπους καρκινογένεσης του δέρματος,

Οι μοριακοί μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους η UVR προκαλεί μια ποικιλία δράσεων δεν είναι σαφώς γνωστοί και κατανοητοί. Η διαδικασία της καρκινογένεσης πιθανώς εμπλέκει πολλαπλά, διαδοχικά στάδια, εκ των οποίων μερικά -αλλά όχι όλα- έχουν να κάνουν με διαδικασίες διαφοροποίησης της αρχιτεκτονικής δομής του DNA -μεταλλάξεις-. Υπάρχει απόδειξη πως οι βλάβες που υπάρχουν στο DNA και προκαλούνται από την UV έχουν σχέση με την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Στους ανθρώπους και συγκεκριμένα σε περιπτώσεις ασθενών με μελαγχρωματική ξηροδερμία, η σχέση μεταξύ διόρθωσης "ελαττωματικού" DNA και καρκίνου δέρματος που προκαλούνται από την έκθεση στον ήλιο μας προσφέρει ισχυρές αποδείξεις για τη συμμετοχή της UV στην πρόκληση βλαβών στο DNA.

Πειραματικές μελέτες που χρησιμοποιούσαν είδη των οποίων τα κύτταρα περιείχαν ένα ένζυμο το οποίο βοηθούσε τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA και ενεργοποιόταν από την παρουσία φωτός, προτείνουν πως διμερείς ενώσεις που προκαλούνται από τη UVR μεταξύ γειτονικών βάσεων προς την πυριμιδίνη στο ίδιο σκέλος του DNA είναι το κριτικό σημείο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μελέτες με το Amazon molly (*poecilia bruesia*) δείχνουν πως η δημιουργία καρκίνου -που προκαλείται από UVR - στο θυρεοειδικό ιστό μπορεί να προληφθεί με έκθεση του ιστού στο ορατό φως μετά από ακτινοβολία με UV. Το ορατό φως ενεργοποιεί ένα ένζυμο το οποίο ειδικά επιδιορθώνει διμερείς ενώσεις πυριμιδίνης στο DNA. Μελέτες με το South America opossum (*Morodelphis domestica*) δείχνουν, παρόμοια, πως η πρόκληση καρκίνου του δέρματος από χρόνια UV ακτινοβολία μπορεί να προληφθεί με έκθεση του δέρματος σε UVA στο ορατό φως, μετά βέβαια από κάθε UV ακτινοβολία.

Θεωρητικά, οποιαδήποτε διαφοροποίηση ικανή να προκαλέσει μετάλλαξη σε ειδικό στόχο γονιδίων μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ μετάλλαξης και μεταλλαγής από την UVR.

Άλλες βλάβες στο DNA προκαλούνται μετά από UVB ακτινοβολήση και οδηγούν σε φωτοπροϊόντα (παράγωγα), παράγωγα που-ρινών, παράγωγα κυτοσίνης, ανταλλαγές χρωματίδων κ.λπ. Επιπρόσθετα, βλάβες στο DNA μπορεί να προκληθούν από ενεργά οξυγονούχα παράγωγα, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τα οποία γεννιούνται κατά τη διάρκεια έκθεσης κυττάρων των θηλαστικών στην UVR.

Ο ρόλος αυτών των βλαβών στη διαδικασία της καρκινογένεσης δεν είναι σαφής. Παρόλα αυτά, η ικανότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων να ελαττώνουν την επίπτωση της εμφάνισης καρκίνου του δέρματος, οφειλόμενου στη UV σε πειραματικά μοντέλα προτείνει έστω και μικρά κομμάτια στη διαδικασία της UV καρκινογένεσης, η οποία τελικά μπορεί να είναι οξυνοοξεαρτώμενη. Πρόσφατα, έχει γίνει κάποια πρόοδος στην αναγνώριση ειδικών γονιδίων, το οποίο μπορεί να σχετίζονται με τη UV καρκινογένεση. Διάφοροι τύποι καρκίνων έχουν αποδοθεί σε μεταλλάξεις γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη.

Μερικά γονίδια διευκολύνουν την κυτταρική ανάπτυξη -κυτταρικά ογκογόνα γονίδια-, ενώ άλλα αναστέλλουν αυτή τη διαδικασία -γονίδια κατασταλτικά στην ανάπτυξη όγκων-. Μία μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση ή υπερέκφραση ενός ογκογονιδίου ή σε παραγωγή ενός διαφοροποιημένου προϊόντος ογκογονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία καρκίνων⁵⁵.

Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τα γονίδια εκείνα που έχουν κατασταλτική δράση στην κυτταρική ανάπτυξη μπορεί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Μεταλλάξεις σε κυτταρικά ογκογονίδια βρέθηκαν σε περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος σε ασθενείς με μελαγχρωματική ξηροδερμία. Μερικές από αυτές είναι μεταλλάξεις που αφορούν σημεία που βρίσκονται σε αντίθετα σημεία από τις θέσεις των δεσμών της θυμίνης στο μη

μεταγραφόμενο κλώνο του DNA. Έχει αναφερθεί ενεργοποίηση και ενίσχυση μερικών ογκογονιδίων στους δερματικούς καρκίνους στον άνθρωπο, Επίσης, έχουν αναγνωρισθεί διαφοροποιήσεις σε πολλαπλά ογκογονίδια σε καρκίνο δέρματος ατόμων που πάσχουν από μελαγχρωματική ξηροδερμία.

Οι μελέτες αυτές προτείνουν πως διαφοροποιήσεις στα κυτταρικά ογκογονίδια μπορεί να συγκροτούν ένα ή και περισσότερα στάδια στην πολύπλοκη διαδικασία της UV καρκινογένεσης,

1.6.6 ΠΡΟΛΗΨΗ

Για τους όγκους του δέρματος πλην του μελανώματος, η πιο λογική προσέγγιση όσον αφορά στην πρόληψη είναι η ελάττωση, ή όσον το δυνατόν ο περιορισμός της έκθεσης του δέρματος σε φυσικές ή τεχνητές πηγές UVR. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους, ανάμεσα στους οποίους είναι:

- Η χρήση αντηλιακών.
- Η αποφυγή των δραστηριοτήτων εκτός σπιτιού τις ώρες γύρω από το μεσημέρι, όπου το ποσό της UVR στο ηλιακό φως είναι το μέγιστο.

- Η χρήση προστατευτικών ρούχων.

Ελαττώνοντας τη δόση της UVR που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της ζωής μειώνουμε τον κίνδυνο εμφάνισης Ca δέρματος σε ποντίκια και στον άνθρωπο επίσης. Επειδή η δράση της UVR στην πρόκληση Ca δέρματος, εκτός του μελανώματος, είναι αθροιστική, περιμένουμε η ελάττωση της έκθεσης στο ηλιακό φως να επιβραδύνει το ρυθμό ανάπτυξης όγκου.

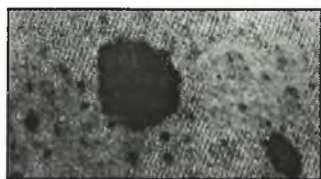
Για το μελάνωμα δεν είναι σαφές ποια ακριβώς στρατηγική θα ήταν αποτελεσματική, γιατί δεν υπάρχει μια απλή, απευθείας σχέση μεταξύ δόσεων UVR και πρόκλησης μελανώματος. Για παράδειγμα, αν το μελάνωμα οφείλεται στην από παιδικής ηλικίας έκθεση του ατόμου στη UVR, όπως έχει προταθεί, η ελάττωση της έκθεσης στο ηλιακό φως κατά τη

διάρκεια της ενήλικης ζωής δε θα είναι αποτελεσματική στην προσπάθεια ελάττωσης της εμφάνισης του μελανώματος.

Προφανώς, χρειάζονται περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά στη δόση, το μήκος κύματος και τους μηχανισμούς δράσης της UVR στην πρόκληση μελανώματος, ώστε να καθοριστούν οι στρατηγικές κινήσεις στην πρόληψη ακόμα και των μελανωμάτων που έχουν σχέση με το ηλιακό φως.

1.7 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Η σχέση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και Κακοήθους Μελανώματος (Κ.Μ.)⁵³ έχει παρατηρηθεί τις τελευταίες πέντε δεκαετίες, εστιάζοντας στη διαρκώς αυξανόμενη συχνότητα του Κ.Μ. σε άτομα λευκού φαινοτύπου δέρματος, που μετανάστευσαν σε νότιες ηλιόλουστες χώρες / περιοχές (Αυστραλία, Καλιφόρνια - ΗΠΑ, κ.ά).



Επιφανειοκά επεκτεινόμενο κακόηθες μελάνωμα.

Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος για τα άτομα που εκτίθενται περιοδικά στον ήλιο συνηθίζοντας να ασχολούνται με κάποιο υπαίθρια σπορ (κολύμβηση, ιστιοσανίδα, ορειβασία κ.λπ.) μία ή δύο φορές το χρόνο, ενώ σαφώς επιβεβαιωμένο επιβαρυντικό παράγοντα αποτελεί η ύπαρξη ιστορικού ηλιακών εγκαυμάτων κατά τη νηπιακή - παιδική ηλικία. Η χρήση αντιηλιακών ως προφυλακτικού μέσου αποτελεί ένα ερώτημα προς το παρόν ως προς την τελική αποτελεσματικότητά της. Η σχέση της UV με τους γνωστούς παράγοντες καρκινογένεσης σε κυτταρικό επίπεδο (ογκογονίδια - όγκοπρωτεΐνες, growth factors, κυτταροσκελετικές αλλαγές κ.ά.), δεν έχει ακόμη καταδειχθεί πειστικά σε πειράματα πάνω σε μελανοκύτταρα, σε αντίθεση με τα κερατινοκύτταρα όπου αυτή η σχέση παρατηρείται

σταθερά. Τα πλέον πρόσφατα πειραματικά δεδομένα σε ινδικά χοιρίδια υπό UVB συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η συνεχής, ήπια, επαναλαμβανόμενη έκθεση σε UV ακτινοβολία αναπτύσσει κάποιον τύπο ανοχής στο Κ.Μ., ενώ η πρώιμη έντονη έκθεση προδιαθέτει (μαζί με άλλους φαινοτυπικούς παράγοντες) στην εμφάνιση Κ.Μ.

1.8 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος (χημικά καρκινογόνα, υπεριώδης ακτινοβολία, ιονίζουσα ακτινοβολία, τοπικά κυτταροτοξικά φάρμακα, ιοί, και ανοσοκαταστολή)⁵⁴.

Εξ' αυτών, η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ένα καρκινογόνο το οποίο είναι πανταχού παρόν και επιπλέον, θεωρείται πλήρες καρκινογόνο (αρχίζει και προάγει την καρκινογένεση). Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί παραγωγή ελεύθερων ριζών και διαταραχές του DNA και των γονιδίων. Ιδιαίτερη σημασία έχει η διαταραχή της ισορροπίας των πρωτοογκογονιδίων και κατασταλτικών ογκογονιδίων που έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας της απόπτωσης.

Επίσης, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασιών παίζει και η συνυπάρχουσα ανοσοκαταστολή που επέρχεται από τη χρόνια και συνεχή έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.

2. HPV (HUMAN PAPILLOMA VIRUS)

2.1 ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ

Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 100 γονότυποι των ιών των ανθρωπίνων θηλωμάτων, Human Papilloma Viruses (HPV)⁵⁵. Οι HPV προκαλούν πολλές αλλοιώσεις, καλοήθειες και κακοήθειες, στο δέρμα και τους βλεννογόνους του ανθρώπινου σώματος. Περίπου 23 γονότυποι των HPV προσβάλλουν το επιθήλιο του κατώτερου γεννητικού συστήματος και της πρωκτογεννητικής χώρας. Ο χρόνος επώασης της λοίμωξης ποικίλλει σημαντικά.

2.1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η μόλυνση του επιθηλίου από τον ιό έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση κλινικής, υποκλινικής ή λανθάνουσας νόσου.

Ως κλινική νόσος ορίζεται η ύπαρξη οποιασδήποτε αλλοίωσης που είναι ορατή με γυμνό μάτι. Εδώ υπάγονται τα κονδυλώματα της πρωκτογεννητικής περιοχής. Τα κονδυλώματα μπορεί να είναι οξυτενή (ανευρίσκονται κυρίως στους βλεννογόνους), βλατιδώδη (ανευρίσκονται κυρίως στο κερατινοποιημένο επιθήλιο) ή κηλιδώδη (ανευρίσκονται στους βλεννογόνους). Άλλη κλινική εκδήλωση είναι η ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, που εκδηλώνεται ως μποβενοειδής βλατίδωση ή ως νόσος του Bowen. Τα κονδυλώματα προκαλούνται συνήθως από τους μη ογκογόνους γονότυπους 6 και 11. Ωστόσο, οι ασθενείς με κονδυλώματα μπορεί να έχουν ταυτόχρονα μολυνθεί και με ογκογόνους γονότυπους (16, 18 και άλλοι), οι οποίοι συνήθως προκαλούν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και καρκίνο της πρωκτογεννητικής χώρας.

Στην υποκλινική νόσο, οι αλλοιώσεις που προκαλούνται από τους HPV δεν είναι εμφανείς στην απλή κλινική εξέταση και εντοπίζονται μόνο με τεχνική βοήθεια (κολποσκόπιο, μικροσκόπιο). Υποψία υποκλινικής νόσου στον τράχηλο της μήτρας τίθεται συχνά με την εξέταση κατά Παπανικολάου.

Εάν δεν υπάρχουν κλινικές ή υποκλινικές αλλοιώσεις και απλώς ανιχνεύεται το DNA των HPV με *in situ* υβριδισμό ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), τότε πρόκειται για λανθάνουσα μόλυνση.

Η μετάπτωση από τη μια μορφή μόλυνσης (κλινική, υποκλινική, λανθάνουσα) σε άλλη είναι συχνή.

Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε στη διάγνωση και την αντιμετώπιση των κονδυλωμάτων.

Τα κονδυλώματα θα πρέπει να διαφοροδιαγνωστούν από τη μολυσματική τέρμινθο, τις σμηγματορροϊκές υπερκερατώσεις, τις μαργαριταροειδείς βλατίδες του πέους και τη μικροθηλωμάτωση του αιδοίου. Η τελευταία αποτελεί φυσιολογική ανατομική παραλλαγή, κατά την οποία οι φυσιολογικές θηλές που βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια των μικρών χειλέων και στην είσοδο του κόλπου είναι πολυάριθμες και υπερπλαστικές. Στην περίπτωση των κονδυλωμάτων, οι θηλές έχουν κοινή βάση από την οποία εξορμώνται, ενώ στη μικροθηλωμάτωση η κάθε θηλή έχει δική της μονήρη βάση.

Βιοψία συνήθως δεν απαιτείται για τη διάγνωση των οξυτενών κονδυλωμάτων, μπορεί όμως να χρειαστεί για τη διάγνωση άτυπων βλαβών ή για τη διαφορική διάγνωση από την μποβеноειδή βλατίδωση ή τη νόσο του Bowen. Σε ασθενείς με ουρηθρικά κονδυλώματα, η ουρηθροσκόπηση μπορεί να αποβεί χρήσιμη. Αν υπάρχουν περιπρωκτικά κονδυλώματα, πρέπει να διενεργείται πρωκτοσκόπηση μέχρι την οδοντωτή γραμμή.

Στις γυναίκες, ένας λεπτομερής έλεγχος για την ανεύρεση κολπικών και τραχηλικών αλλοιώσεων είναι απαραίτητος. Επί θετικής εξέτασης κατά Παπανικολάου, διενεργείται κολποσκόπηση και λαμβάνονται βιοψίες.

Ανίχνευση του DNA των HPV μπορεί να γίνει, όπως προαναφέρθηκε, με *in situ* υβριδισμό και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

2.1.2 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Καμία από τις μεθόδους που θα αναπτυχθούν παρακάτω δεν εκριζώνει τη λοίμωξη από τους HPV. Ο στόχος κάθε θεραπευτικής αγωγής είναι η καταστροφή των κονδυλωμάτων. Τα ποσοστά υποτροπής κυμαίνονται από 20-30%. Η μολυσματικότητα των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία φαίνεται να μειώνεται, αλλά δεν μηδενίζεται. Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν η μείωση του ιικού φορτίου, που επιτυγχάνεται με την καταστροφή των κονδυλωμάτων, επιδρά στην πιθανότητα μετάδοσης των ιών σε μελλοντικούς συντρόφους.

Οι μέθοδοι αντιμετώπισης των εξωτερικών κονδυλωμάτων διακρίνονται σε:

α. Εφαρμοζόμενες από τον ασθενή

- Ποδοφυλλοτοξίνη (κρέμα 0,15% και διάλυμα 0,5%)
- Ιμικουιμόδη (κρέμα 5%).

β. Εφαρμοζόμενες από το γιατρό

- Κρυοθεραπεία
- Τριχλωροξικό οξύ
- Χειρουργική αφαίρεση
- Διαθερμοπηξία
- Laser.

Δεν υπάρχουν στοιχεία που να κατοχυρώνουν τη σαφή υπεροχή μιας μεθόδου έναντι των άλλων και καμία μέθοδος δεν είναι ιδανική για όλα τα κονδυλώματα και για όλους τους ασθενείς. Η επιλογή της μεθόδου θα πρέπει να γίνεται σε συνεργασία με τον ασθενή. Η επιμονή ή η επανεμφάνιση ενός κονδυλώματος που είχε υποχωρήσει αποτελεί συνήθως ένδειξη αλλαγής της θεραπευτικής αγωγής. Καθώς τα κονδυλώματα ενδέχεται να υποστραφούν αυτόματα, η απλή παρακολούθηση είναι, σε ορισμένες περιπτώσεις, μια αποδεκτή αντιμετώπιση⁵⁶.

α. Αγωγές εφαρμοζόμενες από τον ασθενή

- Ποδοφυλλοτοξίνη. Η ποδοφυλλοτοξίνη αναστέλλει τη μιτωτική διαίρεση των κυττάρων και προκαλεί νέκρωση των κονδυλωμάτων. Εφαρμόζεται δύο φορές ημερησίως για 3 ημέρες και ακολουθούν 4 ημέρες διακοπής της αγωγής (ένας κύκλος). Ο κύκλος μπορεί να επαναληφθεί μέχρι τέσσερις φορές. Αν στο τέλος του 4ου κύκλου δεν έχουν υποχωρήσει τα κονδυλώματα, η αγωγή πρέπει να συνεχιστεί με άλλη μέθοδο. Το διάλυμα είναι πιο εύχρηστο για τα κονδυλώματα του πέους, ενώ η κρέμα για τις βλάβες του αιδοίου και του πρωκτού. Μετά από 1 - 4 κύκλους αγωγής, τα κονδυλώματα έχουν αποδράμει πλήρως στο 60-80% των ασθενών. Οι υποτροπές κυμαίνονται από 7-38%. Οι ενδοουρηθρικές βλάβες και τα κονδυλώματα του κερατινοποιημένου δέρματος είναι συχνά ανθεκτικά στην αγωγή. Ανεπιθύμητες ενέργειες εμφανίζονται στο 50-65% των ασθενών και περιλαμβάνουν αίσθημα καύσου, ευαισθησία, ερύθημα και διαβρώσεις. Οι ενοχλήσεις αυτές είναι συνήθως παροδικές. Η ποδοφυλλοτοξίνη αντενδείκνυται στην κύηση.

- Ιμικουιμόδη. Η ιμικουιμόδη είναι ένας ανοσοτροποποιητικός παράγοντας, ο οποίος δρα διεγείροντας την τοπική παραγωγή ιντερφερόνης-α, ιντερλευκίνης-6, παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α, καθώς και άλλων κυτταροκινών. Δεν ασκεί η ίδια αντι-ικική δράση. Η αποτελεσματικότητα της προέρχεται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της δράσης των κυτταροκινών. Η ενεργοποίηση αυτή ευθύνεται για την υποστροφή των κονδυλωμάτων, η οποία συνοδεύεται από μείωση του DNA των HPV. Η ιμικουιμόδη εφαρμόζεται στα κονδυλώματα τρεις φορές την εβδομάδα κατά τη βραδινή κατάκλιση. Το πρωί ακολουθεί πλύσιμο με νερό και ήπιο σαπούνι. Η αγωγή συνεχίζεται μέχρι την αποδρομή των κονδυλωμάτων ή έως τη συμπλήρωση 16 εβδομάδων αγωγής. Πλήρης υποχώρηση των κονδυλωμάτων έχει παρατηρηθεί στο 65-77% των γυναικών και στο 40% των ανδρών που ολοκλήρωσαν την αγωγή των 16 εβδομάδων. Το ποσοστό υποτροπής είναι 15% κατά το πρώτο εξάμηνο μετά τη διακοπή της αγωγής. Οι συνηθέστερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι το ερύθημα, το οίδημα και οι διαβρώσεις. Οι αντιδράσεις αυτές

συνήθως υποχωρούν μετά από ολιγοήμερη διακοπή της αγωγής. Η μικροϊμόδη δεν έχει βρεθεί τερατογόνος σε πειραματόζωα, ωστόσο δεν υπάρχουν περαιτέρω στοιχεία για την ασφάλειά της κατά τη διάρκεια της κύησης.

β. Αγωγές εφαρμοζόμενες από τον ιατρό

- Κρυοθεραπεία. Ο μηχανισμός δράσης της κρυοθεραπείας περιλαμβάνει τη νέκρωση της επιδερμίδας και του χορίου και τη θρόμβωση των αγγείων. Το υγρό άζωτο εφαρμόζεται πάνω στις βλάβες είτε με βαμβακοφόρο στείλεο είτε με ψεκασμό. Ψύχεται όλη η επιφάνεια της βλάβης, καθώς και ένα όριο υγιούς ιστού 1-2 mm. Ο χρόνος ψύξης είναι 10-20 sec. Ο διπλός κύκλος ψύξης - απόψυξης είναι πιο αποτελεσματικός. Οι συνεδρίες επαναλαμβάνονται κάθε 10-15 ημέρες. Η αποδρομή των κονδυλωμάτων κυμαίνεται από 63-89%. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες (ουλοποίηση, υπομελάγχρωση) είναι ιδιαίτερα σπάνιες.

- Τριχλωροοξικό οξύ (διάλυμα 80-90%). Το τριχλωροοξικό οξύ προκαλεί κυτταρική νέκρωση. Εφαρμόζεται απευθείας πάνω στο κονδύλωμα με βαμβακοφόρο στείλεο. Ενδείκνυται κυρίως για μικρά οξυτενή ή βλατιδώδη κονδυλώματα. Μπορεί να γίνουν περισσότερες της μίας συνεδρίες, με μεσοδιαστήματα 1-2 εβδομάδων. Η ανταπόκριση στη θεραπεία είναι 70-81%, αλλά οι υποτροπές ανέρχονται στο 36%. Το τριχλωροοξικό οξύ είναι ιδιαίτερα διαβρωτικό και η μη προσεκτική χρήση μπορεί να προκαλέσει έντονο άλγος, έλκη και ουλοποίηση. Το τριχλωροοξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εγκυμοσύνη.

- Χειρουργική αφαίρεση. Τα κονδυλώματα μπορούν να αφαιρεθούν και χειρουργικά, τις περισσότερες φορές υπό τοπική αναισθησία. Η τοπική εφαρμογή αναισθητικής κρέμας για 10-15 min πριν από την τοπική αναισθησία μειώνει σημαντικά το άλγος από τις διηθήσεις. Η αφαίρεση του ιστού δεν πρέπει να επεκτείνεται πέρα από το θηλώδες χόριο, διότι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος ουλοποίησης. Όταν εφαρμοστεί σωστά, η χειρουργική αφαίρεση επιτυγχάνει καλό αισθητικό αποτέλεσμα. Το ποσοστό υποτροπής είναι 20-30%. Πολλαπλά κονδυλώματα στην ακροποσθία μπορούν να αντιμετωπιστούν με περι-τομή. Με

τον τρόπο αυτόν εξαλείφεται και ο κίνδυνος φίμωσης, η οποία μπορεί να προκληθεί από την εφαρμογή άλλων θεραπευτικών μεθόδων στη συγκεκριμένη περιοχή.

- Διαθερμοπηξία, laser. Η διαθερμοπηξία και το laser διοξειδίου του άνθρακα αποτελούν δύο άλλες μεθόδους αντιμετώπισης των κονδυλωμάτων. Με τη διαθερμοπηξία πρέπει να ελέγχεται το βάθος της καυτηρίασης, για την αποφυγή ουλοποίησης. Το laser διοξειδίου του άνθρακα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση εκτεταμένων και ενδοουρηθρικών κονδυλωμάτων, κυρίως σε ασθενείς που δεν έχουν ανταποκριθεί σε άλλες αγωγές.

Τόσο η διαθερμοπηξία όσο και το laser πρέπει να διενεργούνται με χειρουργικές μάσκες και με σύστημα αναρρόφησης του καπνού, διότι στον τελευταίο ανευρίσκονται συχνά σωματίδια των ιών.

γ. Άλλες μέθοδοι αντιμετώπισης των κονδυλωμάτων, που δεν αποτελούν αγωγές πρώτης γραμμής

Η συστηματική χορήγηση ιντερφερόνης δεν συνιστάται για την αντιμετώπιση των κονδυλωμάτων. Η ενδοβλαβική έγχυση ιντερφερόνης-α ή ιντερφερόνης-β μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά σε άλλες αγωγές σε ανθεκτικά κονδυλώματα. Η ποδοφυλλίνη δεν χρησιμοποιείται ευρέως λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών (μεταλλαξιόγonos δράση, συστηματική τοξικότητα λόγω απορρόφησης)⁵⁷.

2.1.3 ΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Ενδοουρηθρικά και ενδοορθικά κονδυλώματα. Τα ενδοουρηθρικά κονδυλώματα μπορούν να αντιμετωπιστούν με κρυοθεραπεία ή ποδοφυλλοτοξίνη ή laser. Τα ενδοορθικά μπορούν να αντιμετωπιστούν με κρυοθεραπεία ή χειρουργική αφαίρεση.

Εγκυμοσύνη. Στην εγκυμοσύνη, τα κονδυλώματα ενδέχεται να πολλαπλασιαστούν. Η μικουιμόδη και η ποδοφυλλοτοξίνη δεν πρέπει να χορηγούνται σε εγκύους. Η παρουσία κονδυλωμάτων στον τοκετό συσχετίζεται με την εμφάνιση λαρυγγικής θηλωμά-τωσης στο

νεογνό (κίνδυνος 1:400). Το αν η καισαρική τομή προστατεύει από την εμφάνιση λαρυγγικής θηλωμάτωσης δεν είναι γνωστό.

2.2 ΙΟΙ: ΑΝΑΓΚΑΣΤΙΚΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΑΡΑΣΙΤΑ HPV-DNA VIRUS

- Ανακαλύφθηκαν περισσότεροι από 70 γονότυποι ⁵⁶ του ιού HPV.

HPV types and associated clinical lesions	
HPV type	Associated clinical lesions
1	deep plantar warts, common warts
2	common warts, flat warts flat warts
4	common warts, plantar warts
5	epidermodysplasia verruciformis (EV)
6	genital warts, laryngeal papilloma
7	butcher warts
8	EV
9	EV, keratoacanthomas
10	Flat warts
11	laryngeal papillomas, genital warts
12	EV
13	focal epithelial hyperplasia
14,15	EV
16	genital warts, Bowenoid papulosis, cervical dysplasia, cervical carcinoma digital, squamous cell carcinoma, nongenital Bowen's disease
17	EV
18	genital warts, Bowenoid papulosis, cervical dysplasia, cervical carcinoma
19-25	EV, keratoacanthomas
26-29	common warts, flat warts , %
30	laryngeal carcinoma, genital warts

31-32	genital warts, Bowenoid papulosis, cervical dysplasia, . cervical carcinoma
33	cervical carcinoma
34	Bowenoid papulosis, Bowen's disease
35	cervical dysplasia, cervical carcinoma
36	EV
37	EV, keratoacanthomas
38	EV
39	Bowenoid papulosis, cervical carcinoma
41	flat warts
42	genital warts, Bowenoid papulosis, cervical dysplasia, cervical carcinoma
43,44	genital warts, laryngeal papillomas
46,47	EV
48	Bowenoid papulosis, Bowen's disease
49, 50	EV
51-54	Genital warts, Bowenoid papulosis, cervical dysplasia, cervical carcinoma
55	Genital warts, laryngeal papillomas

- Οι τύποι δεν καθορίζονται με ορολογικές μεθόδους διότι λείπουν τα αντιγόνα του ιού, αλλά με το ποσοστό των ομολόγων τμημάτων του DNA. Η σύμβαση είναι ότι λιγότερο από 50% ομοιότητα σημαίνει νέος τύπος του ιού.
- Το καψίδιο (πρωτεΐνες) δεν περιβάλλεται από envelope (πρωτεΐνες και λίπη), γι'αυτό και είναι ανθεκτικό στην ξηρασία και διατηρεί ο ιός τη Λοιμογόνο του δράση όταν αποβάλλεται με τα κύτταρα της κερατίνης στοιβάδας.
- Πρόκειται για επιθηλιότροπους ιούς που προσβάλλουν μόνο τους ανθρώπους και τα πολύστοιβα πλακώδη επιθήλια. Ορισμένοι τύποι παρουσιάζουν συγκεκριμένες εντοπίσεις.

- Δεν καλλιεργούνται.
- Προσκολλώνται σε κύτταρα που ευρίσκονται κάτω από την κερατίνη στοιβάδα, πιθανόν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, διότι τα κερατινοποιημένα κύτταρα δεν επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Εισέρχονται από μικροσκοπικές λύσεις της συνεχείας του δέρματος. Η διείσδυσή τους στο κύτταρο διευκολύνεται από πρωτεΐνη που ονομάζεται clathrin. Τη μετάδοση της λοίμωξης επηρεάζει ο αριθμός των μολυσμένων κυττάρων που επικάθηνται στο δέρμα.
- Η αναπαραγωγή του DNA και ο σχηματισμός του σωματιδίου του ιού γίνονται μέσα στον πυρήνα. Η αναπαραγωγή ωρίμων λοιμογόνων σωματιδίων σε ικανό αριθμό παρατηρείται μόνο στις ανώτερες στοιβάδες της επιδερμίδας, παρ' όλο που η διείσδυση και η εκκίνηση του σχηματισμού των νέων σωματιδίων διαγράφεται στις κατώτερες στοιβάδες.
- Η ακάνθωση εξαρτάται από την αναστολή της απόπτωσης των κερατινοκυττάρων και από τις αυξημένες μιτώσεις που προκαλούν πρωτεΐνες του ιού. Το μέγεθος των κονδυλωμάτων δεν εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων του ιού.
- Στις κακοήθειες βλάβες συνήθως δεν προλαμβάνουν να σχηματισθούν τέλεια σωματίδια, ο σχηματισμός των οποίων ευνοείται από τη φυσιολογική διαφοροποίηση των κυττάρων της επιδερμίδας και όχι από την παθολογική που προκαλείται από το DNA και τις πρωτεΐνες του ιού στις κατώτερες στοιβάδες.
- Η κυτταρική ανοσία συμμετέχει στην υποχώρηση των βλαβών ή στην παραμονή τους όταν είναι υπολλειματική. Ανοσιακή αντίσταση σε μη γεννητικούς τύπους του ιού δε φαίνεται να προστατεύει από μόλυνση με γεννητικούς τύπους. Κλινικές και εργαστηριακές παρατηρήσεις. Δεν είναι γνωστό εάν η κυτταρική ανοσιακή απάντηση κατευθύνεται στον ιό ή στο κύτταρο. Ο τίτλος των κυκλοφορούντων αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του κυττάρου ή του ιού δε συμβαδίζει με την εμφάνιση ή την υποχώρηση των βλαβών.
- Υποκλινικές λανθάνουσες λοιμώξεις κυρίως από τους γεννητικούς τύπους του ιού.

- Επώαση: 3 εβδομάδες έως 8 μήνες. Μέση τιμή 3 μήνες.
- 20-24 έτη. Συνύπαρξη με άλλα νοσήματα. Την τελευταία δεκαετία τα περιστατικά διπλασιάστηκαν ή και τετραπλασιάστηκαν (εξωτερικοί ιατροί). Παιδιά: μετάδοση κατά τον τοκετό, σεξουαλική κακοποίηση, αποπτώντα κερατινοκύτταρα.
- 5% στην ουρήθρα στους άνδρες. Σιωπηρή μετάδοση. Πολύ σπάνια στην κύστη. Ουρηθροκυστεοσκόπηση, κυστεογραφία. Ίσως όμως διασπορά.
Στο 50% των ανδρών με πρωκτική εντόπιση, οι βλάβες εντοπίζονται και στον πρωκτικό σωλήνα.
- Κλινική ή υποκλινική νόσος στον τράχηλο της μήτρας εμφανίζεται στο 50% των γυναικών με κολπική εντόπιση μετά από κυτταρολογική εξέταση ή κολποσκόπηση. Αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό κατά την εγκυμοσύνη εξαιτίας της υγρασίας, των ορμονικών μεταβολών αλλά και της μεταβολής της κυτταρικής ανοσίας⁵⁷.
- Λαρυγγική θηλωμάτωση, εντοπίζεται στις φωνητικές χορδές, σε άλλες περιοχές του λάρυγγα ίσως και στην τραχεία. Νεογνική ηλικία, αλλά και παιδική και ενήλικες. Συχνές υποτροπές μετά από θεραπεία. Δεν αποτελεί απόλυτη ένδειξη καισαρικής τομής διότι αντιμετωπίζονται με κρυοπηξία.
- Γιγαντιαία κονδυλώματα (Loewenstein & Buschke). Συχνότερα στα γεννητικά όργανα των ανδρών. Όψιμες κακοήθεις μεταβολές έχουν ανακοινωθεί. Άλλοι πιστεύουν ότι είναι καλώς διαφοροποιημένα ακανθοκυτταρικά επιθηλιώματα από την αρχή, και άλλοι ότι πρόκειται για καλοήθεις βλάβες με ασυνήθη συμπεριφορά. Δεν έχουν αναφερθεί μεταστάσεις.
- Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας. HPV6, 11 16, 18. Υπάρχουν ενδείξεις μόλυνσης με HPV κυρίως 16 σε εστιακές ενδοεπιθηλιακές προκακοήθεις βλάβες του κόλπου, του αιδοίου της βάλανου και του σώματος του πέους και της περιπρωκτικής περιοχής, όπως νόσος ή βλατίδωση του Bowen, ερυθροπλασία του Queyrat και καρκίνωμα in situ. Ίσως οι τύποι 16 και 18 να δρουν μαζί με άλλους παράγοντες όπως ο ιός του απλού έρπητα, οι βασικές

πρωτεΐνες του σπέρματος ή το κάπνισμα ⁵⁹.

- Βιοψία εάν μη τυπικές βλάβες, ή βλάβες οιδηματώδεις, ελκωτικές ή ανθεκτικές στη θεραπεία. Κονδυλώματα του πέους διακρίνονται από μαργαριταροειδείς βλατίδες, έκτοπους σμηγματογόνους αδένες (Fordyce's spots), μολυσματική τέρμινθο, πλατέα κονδυλώματα, donovanosis και καρκινώματα ιδιαίτερα ανθοκραμβοειδούς μορφής. Κονδυλώματα του αιδοίου διακρίνονται από τα πλατέα, από ινοεπιθηλιακούς πολύποδες και ορισμένους καλοήθεις όγκους όπως ίνωμα, ιδρωταδένωμα, λίπωμα, αδένωμα και ενδομητρίωμα.
- Ποδοφυλλίνη. Αναστέλλει τις μιτώσεις στο στάδιο της μετάφασης. 10-25% σε βάμμα βενζόλης και απομακρύνεται σε 4 ώρες, μία ή δύο φορές την εβδομάδα για όχι περισσότερες από 3-4 εβδομάδες. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται περισσότερο από 0.5 ml διαλύματος 25% κάθε φορά εξαιτίας πιθανών νευρολογικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Πιθανή τερατογόνο δράση.
- Ποδοφυλλοτοξίνη, το δραστικό συστατικό της ποδοφυλλίνης. Διάλυμα 0.5%. Εφαρμογή 2 φορές ημερησίως για 3 ημέρες. Ενδειξη μόνο για τους άνδρες.
- Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί η φλουορουρακίλη (κονδυλώματα ουρήθρας, εφαρμογή μετά από κάθε διούρηση) και το τριχλωροξεϊκό οξύ. Ιδοξουριδίνη και ασυκλοβίρη δεν είναι αποτελεσματικά. Ενδοβλαβική έγχυση ιντερφερονών σε υποτροπές και μεγάλα σε μέγεθος κονδυλώματα. Η χρήση τους περιορίζεται από τη γριππώδη συνδρομή και τη λευκοπενία που προκαλούν.
- Ενδείξεις χειρουργικής αντιμετώπισης: υπερκερατωσικές βλάβες, πολύ μεγάλες και εκτεταμένες βλάβες, βλάβες στον πρωκτικό σωλήνα, ουρηθρικές βλάβες των οποίων η έκταση δε μπορεί καλά να διακριθεί και μόλυνση του τραχήλου της μήτρας, Ηλεκτροκαυτηρίαση, κρυοθεραπεία, χειρουργική αφαίρεση, θεραπεία με ακτίνες Laser.
- Κακοήθης εξαλλαγή παρατηρείται σε σπάνιες περιπτώσεις οξυτενών κονδυλωμάτων στα εξωτερικά γεννητικά όργανα και εκδηλώνεται είτε ως γιγαντιαία κονδυλώματα των

Loewenstein & Buschke είτε ως βλατίδωση του Bowen ή ερυθροπλασία του Queyrat είτε ως καρκίνωμα in situ.

2.3 ΜΥΡΜΗΚΙΕΣ ΚΑΙ ΚΟΝΔΥΛΩΜΑΤΑ

Η τεράστια πρόοδος της μοριακής βιολογίας έχει διευρύνει ιδιαίτερα την κατανόησή μας στη φύση και πορεία της λοίμωξης από τους ιούς HPV. Όμως η πρόοδος αυτή μάλλον περιέπλεξε την πιθανότητα αντιμετώπισης των λοιμώξεων αυτών. Εμείς, ως κλινικοί, αντιμετωπίζουμε πολλές επιλογές, χωρίς όμως γενικότερη συμφωνία των περισσότερων ως προς το πια πρέπει να χρησιμοποιηθεί κάθε φορά, ώστε να καθοδηγήσουμε ανάλογα τους εαυτούς μας. Η κατάσταση επιπλέκεται ακόμη περισσότερο, επειδή η πλειοψηφία των μελετών έχουν δημοσιευθεί σε ουρολογικά και γυναικολογικά περιοδικά, τα οποία τις περισσότερες φορές δε διαβάζονται από τους δερματολόγους. Επιπλέον, τα δημοσιευμένα αποτελέσματα, συχνά, δε συμφωνούν μεταξύ τους. Αυτή η απόκλιση σημαίνει, ότι τέτοιες μελέτες θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή, έως ότου η παρουσία των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων εξηγηθεί⁵⁸.

Ετσι λοιπόν, ορισμένοι και είναι αρκετοί σε ποικίλες δημοσιεύσεις σε πολλές γλώσσες, ισχυρίζονται ότι δεν πρέπει να αντιμετωπίζονται έγκαιρα ή επιθετικά οι μυρμηκίες και τα κονδυλώματα αφού ο ιός, ούτως ή άλλως, δεν εκριζώνεται από τον ανθρώπινο οργανισμό και αφού οι υποτροπές, ιδιαίτερα στα κονδυλώματα ξεπερνούν το 90% των περιπτώσεων και σε μερικές μελέτες αγγίζουν το 100%.

Υπάρχουν, όμως, και αρκετοί λόγοι που οδηγούν σε άμεση αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τους ιούς HPV:

Ψυχολογικοί και αισθητικοί λόγοι. Οι ορατές αλλοιώσεις δεν είναι αποδεκτές. Ανάλογα με την εντόπισή τους μπορεί να επηρεάζουν την επαγγελματική, κοινωνική ή σεξουαλική συμπεριφορά

ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ: Εάν διογκωθούν μπορεί να τραυματισθούν ή να επιμολυνθούν.

Μεγάλα κονδυλώματα μπορεί να αποφράξουν την ουρήθρα ή το αιδοίο. Ο ασθενής επιθυμεί να θεραπευθεί για τον κνησμό, για τη δυσκολία ή την αιμορραγία κατά την επαφή και για άλλα συμπτώματα που συνοδεύουν την εμφάνιση των κονδυλωμάτων. Είναι λογικό να γίνει προσπάθεια θεραπείας του ασθενή για αυτούς τους λόγους και μόνο.

Η ΜΕΤΑΔΟΣΗ: Καθώς η ικανότητά μας να ανιχνεύουμε τη λοίμωξη από τους HPV έχει αυξηθεί, έχουμε αποτιμήσει την υψηλή συχνότητα της λοίμωξης αυτής, Χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR 46% των 467 γυναικών σε γυναικολογικό έλεγχο ρουτίνας βρέθηκε ότι έχουν μολυνθεί από τον ιό . Υπολογίζεται ότι η πιθανότητα μόλυνσης κατά τη διάρκεια της ζωής αγγίζει το 80% περίπου.

Ο σημαντικότερος λόγος για έγκαιρη αντιμετώπιση στο μυαλό των περισσότερων μας είναι η πρόληψη του αυτοεναφθαλισμού του ιού, ή της μετάδοσής του σε άλλους ανθρώπους. Δυστυχώς, αυτή είναι μία από τις περιοχές, στις οποίες η κατανόησή μας είναι πολύ ελλιπής. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι ορατές κλινικές αλλοιώσεις είναι μεταδοτικές. Αυτή η παρατήρηση δικαιολογεί την αρχική αντιμετώπιση των μυρμηκίων στο δέρμα, και ακόμη περισσότερο όταν πρόκειται για παιδιά. Στα παιδιά υποστηρίχθηκε σε μεγάλη μελέτη πριν από αρκετά χρόνια ότι, στα περισσότερα, οι μυρμηκίες υποχώρησαν χωρίς θεραπεία σε διάστημα 2 ετών, ενώ πρόσφατη μελέτη για τα κονδυλώματα κατέληξε σε ανάλογες παρατηρήσεις, αλλά για διάστημα 5 ετών. Ανασκοπώντας τα δικά μου αρχεία ασθενών με περισσότερες από μία μυρμηκίες και μερικά από τα αρχεία του νοσοκομείου βρήκα ότι μερικές, αλλά όχι όλες, οι μυρμηκίες ενός ασθενούς υποχώρησαν στην αντίστοιχη περίοδο των 2 ετών σε λιγότερα από το 50% των παιδιών. Σε κάθε περίπτωση, η περίοδος των 2 ετών, εάν αφήσουμε τις μυρμηκίες χωρίς θεραπεία, είναι αρκετή από πλευράς μεταδοτικότητας και δικαιολογεί κάποια προσπάθεια έγκαιρης θεραπευτικής αντιμετώπισης;

Στην περίπτωση, όμως, των κονδυλωμάτων πολλαπλές παρατηρήσεις καταδεικνύουν ότι, μετά τη θεραπεία και την εξαφάνιση των κλινικών αλλοιώσεων μία κατάσταση είτε

υποκλινικής είτε λανθάνουσας λοίμωξης περίπου πάντα αναπτύσσεται στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, Η μέθοδος ανίχνευσης λευκαζουσών περιοχών με τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της υποκλινικής λοίμωξης. Πρέπει να είμαστε προσεκτικοί, όμως, στην εκτίμηση αυτών των ευρημάτων, διότι δεν είναι παθογνωμονικά. Άλλες φλεγμονώδεις βλάβες επίσης εμφανίζονται με τον τρόπο αυτόν. Η αναγνώριση της λανθάνουσας λοίμωξης είναι μόνο δυνατή με τη χρήση της μεθόδου PCR ή DNA hybridization.

Η ερώτηση, τώρα, που προκύπτει είναι πόσο λοιμώδης είναι η υποκλινική ή η λανθάνουσα λοίμωξη και η ερώτηση αυτή δεν έχει απαντηθεί με βεβαιότητα. Είναι πιθανό να είναι μεταδοτική. Ιστολογικές και μοριακές ενδείξεις ενεργού αναπαραγωγής βιρίων έχει παρατηρηθεί στις υποκλινικές περιοχές. Το DNA του ιού έχει ανιχνευθεί στο δέρμα ή στις τρίχες και φυσιολογικών ανθρώπων. Κλινικά, ίσως οι περισσότεροι θα έχουμε αντιμετωπίσει ανάλογη κατάσταση, κατά την οποία μιά γυναίκα με κονδυλώματα για πρώτη φορά έχει σταθερό σύντροφο χωρίς ιστορικό ορατής κλινικής λοίμωξης, υποδηλώνοντας ότι η μετάδοση μάλλον προήλθε από υποκλινικές αλλοιώσεις του συντρόφου της.

Επομένως, ο σκοπός της θεραπείας, τουλάχιστον θεωρητικά, είναι η εξάλειψη της λοίμωξης είτε κλινικά ορατής, είτε υποκλινικά με τη χρήση οξικού οξέος. Έχει υποστηριχθεί ότι η αντιμετώπιση των υποκλινικών αλλοιώσεων μπορεί να μειώσει τη συχνότητα των υποτροπών, Σε πρόσφατη μελέτη ο μέσος αριθμός των συνεδριών που απαιτήθηκε για την εξάλειψη της υποκλινικής λοίμωξης σε 81 άτομα ήταν 9, ενώ για το 40% των ατόμων χρειάστηκαν λιγότερες από 4 επισκέψεις. Επομένως είναι αντιμετωπίσιμη. Εγώ, συνήθως προσπαθώ να αντιμετωπίσω αυτές τις λευκάζουσες περιοχές, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που θεραπεύονται για πρώτη φορά. Έχοντας αυτή την προσέγγιση στο μυαλό μου μοιάζει ορθότερο να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι με τις οποίες έχουν ανακοινωθεί χαμηλότερα ποσοστά υποτροπών. Με μερικές από τις παρακάτω μεθόδους έχουν ανακοινωθεί και

ποσοστά υποτροπών μέχρι και 20%: η διαθερμοπηξία μπορεί να καταστρέψει το μυρμηκιάδη ιστό, αλλά και τον ιό, μπορεί, όμως, να οδηγήσει σε ανάπτυξη ουλής, η κρυοπηξία, εγώ είμαι γενικά ευχαριστημένος με τη μέθοδο αυτή, αποτελεί και τη θεραπεία εκλογής κατά την εγκυμοσύνη, η φθοριοουρακίλη μόνη ή σε συνδυασμό με επινεφρίνη σε γέλη κολλαγόνου ή και ως επιπρόσθετη θεραπεία μετά από Laser, εγώ δε συνιστώ τα Laser ως αρχική θεραπεία λόγω του υψηλού κόστους, άλλωστε ο ιός δεν εκριζώνεται, παρ' όλα αυτά πρέπει να τονίσω ότι με βοήθησαν σε ορισμένες περιπτώσεις αντοχής σε άλλες θεραπευτικές μεθόδους, αλλά χρειάζεται προσοχή, διότι μπορεί να αφήσουν ουλή, η δια νύξεων εφαρμογή βλεομυκίνης στην περιωνύχιο, πολύ δύσκολη, περιοχή με έχει βοηθήσει μερικές φορές, η ετρετινάτη και η σιμετιδίνη για πολλαπλές βλάβες, νεώτερα κυτταροτοξικά φάρμακα τοπικά και συστηματικά που δεν έχουν κυκλοφορήσει ακόμη, νεώτερα αντιικά, ανάλογα των νουκλεοτιδίων που επίσης δεν έχουν κυκλοφορήσει στη χώρα μας, φάρμακα που τροποποιούν την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού και από όλα αυτά που φαίνονται στη διαφάνεια εγώ δεν είμαι ικανοποιημένος, σε προσωπική εργασία με την ενδοβλαβική έγχυση ιντερφερόνων τα ποσοστά επιτυχίας δεν ξεπερνούσαν το 50%, και ας μη συζητήσουμε για την ταλαιπωρία των ασθενών, με τη γέλη τοπικά τα δημοσιευμένα ποσοστά επιτυχίας είναι γύρω στο 40%, και, τέλος, άφησα ένα νέο φάρμακο, το οποίο αναφέρθηκε από όλους τους κεντρικούς ομιλητές στο τελευταίο συνέδριο της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας, το imiquimod, το οποίο αυξάνει την παραγωγή των κυτταροκινών και θα πρέπει να σημειωθεί ότι, κατά την προσπάθεια εκτίμησης του φορτίου του ιού μετά τη θεραπεία, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης του DNA και του mRNA για τις πρωτείνες του ιού, καταδεικνύοντας ότι στο εγγύς μέλλον ίσως να διαθέτουμε περισσότερο αποτελεσματικές μεθόδους για να αντιμετωπίσουμε την κλινική, αλλά και την υποκλινική λοίμωξη ⁵⁹.

Η μολυσματικότητα της λανθάνουσας λοίμωξης είναι ακόμα λιγότερο αποσαφηνισμένη και ο βαθμός στον οποίον η μετάδοση είναι πιθανή δεν έχει προσδιορισθεί. Μετά από

μακρόχρονη εμπειρία αντιμετώπισης της λοίμωξης σε γυναίκες, μερικοί ερευνητές πιστεύουν ότι η παραμονή ή όχι του DNA του ιού, γιατί περί αυτού πρόκειται όταν έχουν αντιμετωπισθεί και οι λευκάζουσες περιοχές υποκλινικής λοίμωξης, στη υπό θεραπεία περιοχή μπορεί να μην έχει καμία κλινική σημαία και σχέση. Επομένως, η προσπάθεια αντιμετώπισης της υποκλινικής λοίμωξης μπορεί να έχει κάποια σημασία, εάν η παραμένουσα λανθάνουσα λοίμωξη δεν είναι μεταδοτική.

Η καρκινογένεση. Είναι, σήμερα, ξεκάθαρο ότι η λοίμωξη από τους HPV ιούς, παράλληλα και με άλλους παράγοντες, όπως το κάπνισμα και τα αντισυλληπτικά δισκία, έχει σχέση με ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας (ENT) και, πολύ πιθανόν, και διηθητικό καρκίνωμα. Περισσότερα από το 50% όλων των *in situ* και διηθητικών καρκινωμάτων του τραχήλου της μήτρας περιέχουν ογκογόνους τύπους του ιού. Άλλη μελέτη κατέδειξε ότι στο 30% περίπου των γυναικών που ήταν θετικές για HPV λοίμωξη αναπτύχθηκε μέσα σε περίοδο 2 ετών ENT σταδίου 2 και 3 σε σύγκριση με μόνο το 3% αυτών χωρίς λοίμωξη.

Μερικοί τύποι του ιού, όπως οι 16, 18, 31 και 35 είναι οι συχνότερα συσχετιζόμενοι με καρκίνο. Και μάλιστα έχουν προσδιορισθεί και κάποιοι μηχανισμοί που ευνοούν την ανάπτυξη του, έχει δηλαδή υποστηριχθεί ότι μετά την ενσωμάτωση του ιού στο γενετικό υλικό του ξενιστή, μία σειρά μοριακών αντιδράσεων οδηγούν στη λειτουργική απενεργοποίηση του κατασταλτικού ογκογονιδίου P53 ή και του Rb, από τις E6 και E7 ογκοπρωτεΐνες του ιού αντίστοιχα. Αυτά τα κατασταλτικά του όγκου γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όταν το κύτταρο εκφεύγει της φυσιολογικής αναπτυξιακής του πορείας και αποκτά ογκογονική δυνατότητα.

Παρ' όλο που μεγάλες συγκριτικές μελέτες δεν έχουν εκπονηθεί, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η έγκαιρη προσπάθεια αντιμετώπισης της λοίμωξης από τους ιούς HPV μειώνει τη συχνότητα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Οι ασθενείς με τη λοίμωξη αυτή είναι

προτιμότερο να ελέγχονται για πιθανή δυσπλασία, η οποία εάν αντιμετωπισθεί σε ένα πρώιμο στάδιο μπορεί να προληφθεί η ανάπτυξη του καρκίνου.

Αλλά ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας δεν είναι ο μοναδικός που έχει σχέση με την HPV λοίμωξη. Διάφορες μελέτες έχουν συνδέσει τον ιό με ακανθοκυτταρικό επιθηλίωμα του αιδοίου, του πέους του περινέου και της περιπρωκτικής περιοχής ή με καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα. Ακανθοκυτταρικό επιθηλίωμα των δακτύλων και του περιωνυχίου, όπως και ενδοεπιδερμικό καρκίνωμα του όνυχος έχουν δημοσιευθεί και συσχετισθεί με το τύπο 16 του ιού. Έχει αναφερθεί ακόμη και η ανάπτυξη λεμφώματος. Η έγκαιρη θεραπεία μπορεί να είναι ακόμη πιο απαραίτητη στους μεταμοσχευμένους και στους ασθενείς με AIDS.

Διέγερση του ανοσολογικού συστήματος. Η παρουσία του DNA του ιού στο 35% των φυσιολογικών τομών δέρματος που εξετάστηκαν υποδηλώνει ότι ο ιός διαθέτει μεγάλη διασπορά στο δέρμα των ανοσοεπαρκών ατόμων, στα οποία το επαρκές ανοσολογικό σύστημα πιθανόν αναστέλλει την ανάπτυξη της λοίμωξης. Παρ' όλο, λοιπόν που αφήνοντας τις μυρμηκίες χωρίς άμεση θεραπεία μπορεί, στο μεταξύ, να επιτρέψουμε την ανάπτυξη ανοσιακής απάντησης στον ιό, έχουμε σχεδόν όλοι παρατηρήσει ότι, μερικές φορές, μετά την καταστροφή μιας μόνο μυρμηκίας, υποχωρούν από μόνες τους και οι υπόλοιπες. Επομένως, πιθανός σκοπός της θεραπείας των ορατών κλινικά αλλοιώσεων θα μπορούσε να είναι μια προσπάθεια «βοήθειας» του ανοσολογικού συστήματος να αντιμετωπίσει πιο έγκαιρα τον ιό.

Η πρόληψη της λαρυγγικής θηλωμάτωσης. Η έγκαιρη θεραπεία της λοίμωξης κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να προλάβει τη μετάδοση του ιού στο νεογνό.

2.4 ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) είναι επιθηλιοτρόποι ιοί, δηλαδή προσβάλλουν κυρίως το δέρμα και τους βλεννογόνους και προκαλούν θηλωματώδη υπερπλασία στις θέσεις μόλυνσης με πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής. Μέχρι σήμερα έχουν

αναγνωριστεί περισσότεροι από 70 διαφορετικοί υποτύποι, ικανοί να προσβάλλουν το ανθρώπινο σώμα⁵⁷.

Μερικοί από αυτούς τους υποτύπους, όπως ο 16, 18, 33 και ο 58, είναι γνωστοί ως υψηλού κινδύνου υποτύποι. Εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ενώ και ο λάρυγγας και η στοματική κοιλότητα προσβάλλονται από αυτούς.

Μελέτες που πραγματοποιούνται την εμπλοκή του ιού του ανθρώπινου θηλώματος στην ανάπτυξη καρκίνου στη στοματική κοιλότητα αναφέρουν αντιφατικά αποτελέσματα.

Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι εφαρμόζονται μέθοδοι διαφορετικής ευαισθησίας, ενώ διαφέρουν και οι επιδημιολογικοί παράγοντες των εξεταζόμενων ομάδων ασθενών.

2.5 ΈΓΚΡΙΣΗ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ HPV ΤΕΣΤ

Το FDA ενέκρινε την εκτεταμένη χρήση ενός εργαστηριακού τεστ ανίχνευσης της παρουσίας σε γυναίκες του ιού HPV, ενός από τους συχνότερους σεξουαλικά μεταδιδόμενους ιούς.

Υπάρχουν περισσότεροι από 70 τύποι του ιού. Το τεστ, HC2 High Risk HPV DNA Test, που παρασκευάζεται από την εταιρεία Digene Corp., μπορεί να ανιχνεύσει 13 από τους τύπους υψηλού κινδύνου που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το τεστ αυτό δεν ανιχνεύει τον καρκίνο, αλλά τους ιούς HPV που μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στον τράχηλο. Εάν δεν αντιμετωπιστούν οι αλλαγές αυτές μπορεί σε μερικές γυναίκες να οδηγήσουν σε καρκίνο με το πέρασμα του χρόνου⁵⁸.

Το FDA είχε αρχικά εγκρίνει το HPV DNA το Μάρτιο του 2000 για τον έλεγχο γυναικών με ανώμαλα αποτελέσματα στο τεστ Παπ για να καθοριστεί αν χρειάζεται περαιτέρω εξέταση. Η νέα ένδειξη επιτρέπει το τεστ να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση σε συνδυασμό με το τεστ Παπ των γυναικών άνω των 30 ετών με λοίμωξη HPV. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεστ Παπ, με πλήρες ιατρικό ιστορικό και με αξιολόγηση

των άλλων παραγόντων κινδύνου, ώστε να βοηθηθούν οι γιατροί να καθορίσουν ποιο είδος παρακολούθησης είναι αναγκαίο.

«Το να γνωρίζουμε αν μια γυναίκα έχει ή όχι μολυνθεί με HPV υψηλού κινδύνου αποτελεί μια επιπλέον πληροφορία που θα βοηθήσει τους γιατρούς να ανιχνεύσουν και να αντιμετωπίσουν εγκαίρως κυτταρικές μεταβολές που μπορεί να οδηγήσουν κάποια στιγμή σε καρκίνο του τραχήλου», είπε ο Mark B. McClellan, M.D., Ph.D., μέλος της επιτροπής του FDA. «Το FDA θεωρεί καθήκον του να φέρνει γρήγορα στην αγορά ασφαλείς και αποτελεσματικές νέες τεχνολογίες».

Ποσοστό μέχρι 20% του σεξουαλικά ενεργού πληθυσμού των ΗΠΑ πιστεύεται ότι έχει μολυνθεί από τον HPV κάποια χρονική στιγμή στη ζωή του. Οι περισσότερες γυναίκες που μολύνονται από τον HPV παρουσιάζουν εκκρίωση του ιού και δεν υποφέρουν από περαιτέρω συνέπειες στην υγεία τους. Αλλά λίγες γυναίκες αναπτύσσουν επίμονη λοίμωξη που μπορεί τελικά να οδηγήσει σε προκαρκινικές αλλοιώσεις στον τράχηλο.

Το HPV DNA τεστ, όπως το τεστ Παπ, πραγματοποιείται με τη συλλογή κυττάρων από τον τράχηλο και στη συνέχεια αποστολή τους στο εργαστήριο για ανάλυση. Το τεστ ανιχνεύει τύπους του HPV υψηλού κινδύνου στο κυτταρικό DNA ακόμα και πριν να υπάρξουν οποιεσδήποτε ορατές χαρακτηριστικές αλλαγές στα κύτταρα του τραχήλου.

Οι γυναίκες με φυσιολογικά αποτελέσματα στο τεστ Παπ, χωρίς λοίμωξη από τον HPV διατρέχουν πολύ χαμηλό κίνδυνο (0,2%) ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου. Οι γυναίκες με ανώμαλο τεστ Παπ και θετικό HPV τεστ διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο (6-7% ή μεγαλύτερο) ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου, εάν μείνουν χωρίς θεραπεία.

Το FDA ενέκρινε την εκτεταμένη χρήση του τεστ με βάση δημοσιεύσεις που περιγράφουν διασταυρούμενες μελέτες με φυσιολογικά και ανώμαλα αποτελέσματα τεστ Παπ που είχαν θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα για υψηλού κινδύνου τύπους HPV. Το FDA έλαβε επίσης υπ' όψιν τις επιπρόσθετες πληροφορίες από επιστημονικές εταιρείες, τη

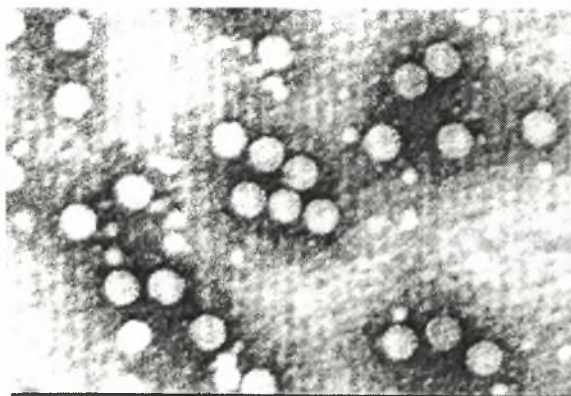
συμβουλευτική επιτροπή του FDA και άλλα ενδιαφερόμενα μέρη για να καταλήξει σε απόφαση.

Το HPV DNA τεστ δεν θα αντικαταστήσει το συνήθη έλεγχο του τεστ Παπ, ούτε και θα χρησιμοποιείται για τον γενικό έλεγχο γυναικών κάτω των 30 ετών με φυσιολογικά αποτελέσματα στο τεστ Παπ. Παρότι το ποσοστό λοίμωξης από τον HPV σε αυτή την ομάδα είναι υψηλό, οι περισσότερες λοιμώξεις είναι βραχύβιες και δεν σχετίζονται με καρκίνο του τραχήλου.

Περίπου 50 εκατομμύρια γυναίκες υποβάλλονται σε τεστ Παπ ετησίως. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου το 2003 σε 12.200 γυναίκες θα διαγνωστεί καρκίνος του τραχήλου και 4.100 θα πεθάνουν από αυτή τη νόσο. Με τον κατάλληλο έλεγχο ο καρκίνος του τραχήλου μπορεί να αποφευχθεί, και εάν ανιχνευτεί εγκαίρως, να ιαθεί.

2.6 ΙΟΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV) - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Τα κονδυλώματα των γεννητικών οργάνων είναι το συχνότερο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα που διαγιγνώσκεται στο Ηνωμένο Βασίλειο, στα ιατρεία αντιμετώπισης νοσημάτων του ουροποιητικού και του γεννητικού σωλήνα. Το 1999, αναφέρθηκαν 72.233 περιστατικά εμφάνισης κονδυλωμάτων της γεννητικής χώρας για πρώτη φορά, μία αύξηση κατά 25% για τους άντρες και 28% για τις γυναίκες, από το 1993. Περίπου το 90% των κονδυλωμάτων της γεννητικής χώρας προκαλούνται από θηλωματο-ιούς (εικόνα 3) τύπου 6 ή 11, αν και τα περισσότερα προσβεβλημένα άτομα δεν έχουν εμφανή κονδυλώματα, με τους λίγους που έχουν, να καλύπτουν πιθανώς ποσοστό 1% ⁵⁷.



Εικόνα 3: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του HPV.

Οι τύποι του HPV μπορούν να ταξινομηθούν ως υψηλού ή χαμηλού κινδύνου, με βάση τη συσχέτιση τους με νεοπλάσματα του γεννητικού σωλήνα, κυρίως του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις αυτού του καρκίνου συσχετίζονται με υψηλού κινδύνου τύπους του HPV, που είναι, κυρίως, ο 16 και ο 18. Οι τύποι 6 και 11 είναι χαμηλού κινδύνου, αν και μπορεί να συμβεί να συνυπάρχει λοίμωξη από περισσότερους του ενός τύπους. Η χρήση δοκιμασιών για τον έλεγχο του DNA με σκοπό την ανίχνευση των υψηλού κινδύνου τύπων είναι υπό αξιολόγηση για τον προσυμπτωματικό έλεγχο για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η χρησιμότητα αυτής της προσέγγισης εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα των δοκιμασιών που θα εφαρμοστούν και τον επιπολασμό των υψηλού κινδύνου τύπων του ιού στον πληθυσμό που θα υποβληθεί στον έλεγχο. Η ευαισθησία των σήμερα υπάρχουσών δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας Hybrid Capture II Assay (Digene, Gaithersburg, MD) ανέρχεται περίπου στο 90%. Ωστόσο, η ειδικότητα της μεθόδου αποτελεί πρόβλημα με ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, 15-20%. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να προσδιορίσουν εάν ο έλεγχος είναι δυνατός και οικονομικά εφαρμόσιμος, καθώς και πώς μπορεί να ενσωματωθεί στα ήδη εφαρμοζόμενα προγράμματα ελέγχου.

Η κατανόηση της επιδημιολογίας του HPV έχει υποβοηθηθεί από τη διαθεσιμότητα των δοκιμασιών ανίχνευσης αντισωμάτων κατά του ιού στον ορό. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία αντισωμάτων κατά του τύπου 16 είναι σπάνια στην παιδική ηλικία, είναι συχνότερη στις γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (51%) από ό,τι σε μάρτυρες (16%) και σχετιζόμενη με διάφορους παράγοντες που αφορούν στη σεξουαλική συμπεριφορά, καθώς και σε κοινωνικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων κατά τη διάρκεια της ζωής, των ετών σεξουαλικής δραστηριότητας, του χρόνου εκπαίδευσης και της προηγούμενης εκδήλωσης γονόρροιας.

Υπό δημιουργία βρίσκονται εμβόλια για τον HPV ως ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες για τα κονδυλώματα της γεννητικής χώρας και για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, αλλά και ως παράγοντες πρόληψης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τεχνητά παρασκευαζόμενα *in vitro* τμήματα του ιού έχουν την ικανότητα πρόκλησης της παραγωγής αντισωμάτων *in vivo*, αλλά η πρόκληση κυτταρικού τύπου ανοσο-απόκρισης αποτελεί σημαντικότερο στόχο. Μία πρωτεΐνη σύντηξης του HPV 6, η L2E7, έχει αποδειχθεί ασφαλής και ανοσογόνος, αλλά οι κλινικές δοκιμές έχουν αποτύχει, μέχρι στιγμής, να αποδείξουν την αποτελεσματικότητά της στη θεραπεία των κονδυλωμάτων της γεννητικής χώρας. Για τους ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στις ογκοπρωτεΐνες του HPV E6 και E7 και πρόσφατα δοκιμάστηκε ένα εμβόλιο με το πεπτίδιο E7 του HPV 16. Υπό εξέλιξη βρίσκονται τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές αυτών των εμβολίων.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Διαδικασία καθαρισμού απ' την παραφίνη και απομόνωσης και καθαρισμού του DNA από τα κύτταρα των ιστών του μελανώματος και των μαρτύρων από τα block παραφίνης των ασθενών και των μαρτύρων που συλλέξαμε.

Χρησιμοποιήθηκαν 48 μελανώματα και 2 μάρτυρες για την έρευνά μας για τον καθαρισμό του DNA των οποίων χρησιμοποιήσαμε το “Easy Nucleic Acid Isolation-E.Z.N.A. Tissue DNA kit D-3495-01 50 preps-OMEGA Bio-tek, Inc.”.

Πήραμε τομές των 5μ. με μικροτόμο από τα block της παραφίνης. Φυγοκεντρίσαμε τις τομές για 5 min σε 13.000 στροφές/min (το μέγιστο της φυγοκέντρου) έτσι ώστε οι τομές να «καθίσουν» στον πυθμένα – πακετάρισμα του υλικού.

Στη συνέχεια, προσθέσαμε 1 ml ξυλόλης (οργανικός διαλύτης) στο κάθε σωληνάριο για να διαλυθεί η παραφίνη. Το αφήσαμε 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρίσαμε για 5 min σε 13.000 στροφές (το μέγιστο της φυγοκέντρου). Αφαιρέσαμε την προστεθείσα αιθανόλη μετά την φυγοκέντρωση προσέχοντας να μην αφαιρέσουμε ιστό.

Η διαδικασία καθαρισμού με την αιθανόλη έγινε 3 φορές έτσι ώστε να μην μείνει καθόλου ξυλόλη στα σωληνάρια. Ως γνωστό η ξυλόλη είναι αναστολέας της PCR. Ακολούθως, τοποθετήσαμε τα σωληνάρια ανοιχτά στους 37°C over night (για 18 ώρες) έτσι ώστε να εξατμισθεί όλη η αιθανόλη.

Ο καθαρισμός του DNA έγινε ως εξής: στο ξηρό υπόλειμμα προσθέσαμε 200 μl Buffer TL (περιλαμβανόταν στο kit), στη συνέχεια προσθέσαμε 25 μl πρωτεΐνάση K σε διάλυμα 20 mg/ml (αυτή διασπά τις πρωτεΐνες του κυττάρου με αποτέλεσμα να διασπώνται τα κύτταρα για να ελευθερωθεί το DNA).

Κάναμε vortex απαλό για mix και στη συνέχεια τοποθετήσαμε τα δείγματα σε

υδατόλουτρο 55°C και επώασαμε με συνεχή ανακίνηση για 48 ώρες. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 220 μl BUFFER BL (περιέχει χυτροπικό παράγοντα που διασπά τις μεμβράνες των κυττάρων και κάνουμε vortex για mix). Επώαζουμε σε υδατόλουτρο 70°C για 10 min.

Κατόπιν, προσθέσαμε 220 μl καθαρής αιθανόλης και κάναμε Vortex για mix έτσι ώστε να γίνει καταβύθιση του DNA και να κατακρατηθεί αυτό ευκολότερα απ' το ειδικό φίλτρο (ρητίνη) που διαθέτει το kit.

Ακολούθως, ετοιμάσαμε τα σωληνάρια με τα ειδικά φίλτρα σημειώνοντας τον αριθμό του κάθε δείγματος πάνω στα φίλτρα και μεταφέραμε το υλικό μέσα στα ειδικά φίλτρα. Μετά φυγοκεντρίσαμε για 1 min στις 10.000 στροφές/min (8.000g) για να προσδεθεί το DNA στο ειδικό φίλτρο.

Στη συνέχεια, παίρνουμε τα ειδικά φίλτρα τα οποία έχουν το DNA που είναι αρνητικά φορτισμένο προσδεμένο στη θετικά φορτισμένη ρητίνη που περιέχουν και τα τοποθετούμε σε νέα καθαρά σωληνάρια που έχει το kit.

Προσθέτουμε 750 μl του Wash Buffer του kit που είναι αραιωμένο με αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/min για 1 min για να ξεπλύνουμε τη στήλη από υλικά που δεν έχουν σχέση με το DNA (πιθανή αναστολή της PCR) και η αιθανόλη που υπάρχει στο Wash Buffer αποτρέπει τη διάλυση του DNA που υπάρχει στα ειδικά φίλτρα.

Επαναπροσθέτουμε στα φίλτρα μετά τη φυγοκέντριση 750 μl Wash Buffer και ξαναφυγοκεντρούμε για 1 min στις 10.000 στροφές/min. Κατόπιν, φυγοκεντρούμε την ξηρή στήλη για 2 min στις 13.000 στροφές/min για να απομακρυνθεί εντελώς το Wash Buffer έτσι ώστε να γίνει στο επόμενο βήμα η καλύτερη δυνατή έκλυση του DNA.

Στη συνέχεια, τοποθετούμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf του 1,5 ml και προσθέτουμε 200 μl του προθερμασμένου στους 70°C διαλύματος

έκλουσης (elution buffer).

Αφήνουμε τα σωληνάρια για 5 min σε υδατόλουτρο 70°C. Για να εκλουσθεί το DNA (αποχωρισμός από τη ρητίνη και διάλυση στο διάλυμα) φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/min για 1 min και επαναλαμβάνουμε την έκλουση του DNA για άλλα 200 μl του elution buffer και επωάζουμε για άλλα 5 min σε υδατόλουτρο 70°C και φυγοκεντρούμε ξανά.

Πετάμε τα ειδικά φίλτρα και γράφουμε τα νούμερα των δειγμάτων στα σωληνάρια erpedorf και τοποθετούμε το DNA στους -70°C.

1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ PCR ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΔΗΛΑΔΗ ΑΝ ΥΠΑΡΧΕΙ DNA ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ 48 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία υπολογίζονται οι ποσότητες από κάθε συστατικό που θα προστεθεί στο mastermix. Η ύπαρξη αυτού του διαλύματος έχει σημασία διότι σε ορισμένες περιπτώσεις που χρειάζονται πολύ μικρές ποσότητες αποφεύγονται σημαντικά λάθη.

Στην έρευνά μας, το μείγμα αυτό έχει την ακόλουθη σύσταση:

Διάλυμα αρχικό	Ποσότητα μl/50 μl	Τελική συγκέντρωση
Polymerase buffer (PCR buffer έτοιμο) x10 η πολυμεράση από την εταιρία Fermentas Λιθουανίας	5	1x
μg Cl 25 mM		
N1 (Β-σφαιρίνης)U PRIMER G 1992 GAA GAG CCA AGGACA GGTAC	5	50 pmol
N2 C PRIMER 62240 (61260) CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	5	50 pmol
Μίγμα d NTP 10 mM	1	0,2 mM
Thermostable	1	1 UNITS

polymerise 2 UNITS/μl		
H ₂ O	28	-

1.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ PCR ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

1.	95°C	4,5 min	} 40x
2.	95°C	30 sec	
3.	55°C	50 sec	
4.	72°C	60 sec	
5.	72°C	7 min	

Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήσαμε είναι THERMAL CYCLER Gene Am p PCR system 2400 (PERUCIN ELMER). Τα σωληνάκια που τοποθετήσαμε στον κυκλοποιητή προετοιμάστηκαν ως εξής:

1) φτιάξαμε πρώτα το mastermix με βάση τους υπολογισμούς που κάναμε χρησιμοποιώντας πάντοτε διαφορετικό ρύγχος με φιλτράκι. Προσθέσαμε πρώτα το συστατικό που είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα (νερό) και μετά τα υπόλοιπα. Τελευταία προσθέσαμε την πολυμεράση την οποία είτε την πήραμε και την βάλουμε κατευθείαν στην κατάψυξη, είτε την είχαμε σε πάγο.

2) Στη συνέχεια, αδειάσαμε το χώρο εργασίας μας από τα συστατικά του mastermix και προχωρήσαμε στην επεξεργασία των δειγμάτων.

3) Χρησιμοποιήσαμε τα μικρά σωληνάκια των 0,2 ml τα οποία τα είχαμε αποστειρώσει μέσα σε δοχεία στους 120°C για 30 min.

4) Πήραμε τα σωληνάκια αυτά, τα τοποθετήσαμε σε ένα stato, τα κλείσαμε (δεν τα αφήσαμε ποτέ ανοιχτά) και τα αριθμήσαμε πλευρικά και στα καπάκια τους.

5) Διαμοιράσαμε τα συστατικά του mastermix στα σωληνάκια (σε κάθε ένα βάλουμε 45 μl) με την διαδικασία του ανοίγω κλείνω.

6) Στη συνέχεια, προσθέσαμε 5 μl από το διάλυμα του DNA σε κάθε σωληνάκι. Στο σωληνάριο με το αρνητικό control προσθέσαμε 5μl νερό και στο σωληνάριο με το θετικό control προσθέσαμε 5μl από τη αλληλουχία που ψάξαμε. Η προσθήκη του διαλύματος DNA γίνεται με τη βοήθεια ρυγχών με φιλτράκια. Επίσης, κάναμε και μία

ελαφρά ανάδευση με την πιπέτα προσέχοντας να μην γίνουν φυσαλίδες. Και σε αυτή την περίπτωση εφαρμόσαμε την τεχνική του ανοίγω κλείνω.

7) Τοποθετήσαμε τα σωληνάκια στον κυκλοποιητή (προτιμήσαμε μεσαίες θέσεις) και αφήσαμε τον κυκλοποιητή να ξεκινήσει.

Το τρίτο και τελευταίο στάδιο της PCR είναι η ανίχνευση των προϊόντων. Στην έρευνά μας χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση ηλεκτροφόριση και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο σε πήκτωμα αγαρόζης. Με την ηλεκτροφόρηση και δεδομένου του μεγέθους του στόχου μπορούμε να εκτιμήσουμε εάν έχει γίνει σωστά η ενίσχυση.

1.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

1.3.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα βρωμιούχου Αιθιδίου: μικρομοριακή ένωση που ενώνεται με το DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως. Είναι τοξικό υλικό και μπορεί να κάνει μεταλλαξιγένεση. Για την βαφή του πηκτώματος χρησιμοποιούμε 1μg/ml το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 5 μl του stock διαλύματος συγκέντρωσης 10 mg/ml για κάθε 100 ml απεσταγμένου νερού.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: είναι διάλυμα TBE, Tris-borate buffer 10x αγορασμένα από την εταιρία Ambion.

Gel loading buffer (6x) (Fermentas): είναι ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει χρωστικές για τον καθορισμό του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και περιέχει: 0,25% μπλε της βρωμοθυμόλης.

40% sucrose.

Παρασκευάζουμε τη σουκρόζη 40% διαλύοντας σε 100 ml απεσταγμένο H₂O 40 gr σουκρόζης. Αποστερωθούμε 127-C (1,2 Atm) για 20 min. Ζυγίζουμε το μπλε της βρωμοθυμόλης και το διαλύουμε στο διάλυμα της σουκρόζης και το loading buffer αυτό φυλάσσεται στο ψυγείο.

1.3.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΤΜΗΜΑΤΑ DNA ΓΝΩΣΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

A. Είναι το προϊόν “1kb plus DNA ladder” (cat no 10787-018) της εταιρίας GibCOBRL.

B. Είναι το προϊόν GeneRuler 100 bp DNA ladder SMO 241 της εταιρίας Fermentas. Η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα είναι 0,5 mg DNA/ml και είναι διαλυμένο σε διάλυμα 10 mM Tris-HCL (pH 7.6) και 1m MEDTA.

Επίσης, μαζί με τη συσκευασία προέρχεται και το διάλυμα 6x loading Dye Solution με την εξής σύσταση:

0,2% μπλε της βρωμοθυμόλης

0,2% xylene Cyanol FF

60% sucrose

60 mM EDTA

Η σουκρόζη χρησιμεύει ώστε να γίνει βαρύτερο το διάλυμα από το H₂O και να μπορεί να καθίσει καλύτερα στο πηγάδι. Θα πρέπει πρωτού ηλεκτροφορηθεί το διάλυμα του DNA να αναμιχθούν σε σωληνάριο: 1λ (0,5 μg) GeneRuler 100 bp

DNA ladder

1 λ 6x Loading Dye solution

4 λ απεσταγμένο νερό.

Το διάλυμα ανακινείται προσεκτικά πριν την ηλεκτροφόρηση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσθέτουμε 0,1 μg (0,2 λ) του DNA για κάθε χιλιοστό πλάτους του πηκτώματος (στην περίπτωσή μας για τα 3 χιλιοστά χρειαζόμαστε 0,3 μgr από το DNA δηλαδή 4 λ έγχρωμου διαλύματος.

Δείγματα (βάζω 10 λ δείγματος)

Στο κάθε δείγμα προστίθεται Gel loading buffer (6x) σε αναλογία 1:6.

1.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Φτιάξαμε τη συσκευή όπου θα τρέξει το πήκτωμα. Φροντίσαμε ώστε το χτένι να απέχει από το πυθμένα απόσταση όσο μία αντικειμενοφόρο (1 mm).

Επίσης, η διάταξη θα πρέπει να είναι τελείως επίπεδη και αυτό το καθορίζω με τη χρήση αλφαδιού.

- Ζυγίσαμε την ποσότητα της αгарόζης σε μεγάλη κωνική φιάλη. Φροντίσαμε ώστε το πάχος του πηκτώματος να είναι περίπου 0,5 cm και γι' αυτό φτιάξαμε τον κατάλληλο όγκο διαλύματος. Για τη συγκεκριμένη συσκευή χρειαζόμαστε 100 ml αгарόζης. Η συγκέντρωση της αгарόζης στο διάλυμα ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που μας ενδιαφέρει να διαχωρίσουμε. Ισχύει ότι: για 500 bp χρειαζόμαστε 1,5-2% αгарόζη. Εμείς είχαμε 260 ζεύγη βάσεων για τη Β-σφαιρίνη (γονιδίωμα) άρα βάζουμε 1,5% αгарόζης. Η αгарόζη διαλύεται σε 0,5x TBE. Το διάλυμα της αгарόζης θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων.

- Απομακρύνεται το χτένι και η συσκευή τοποθετείται στο χώρο της ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα 0,5x TBE διαλύματος ώστε να καλύπτει το πήκτωμα πλήρως και σε βάθος περίπου 2 mm και όχι βαθύτερα.

- Προστίθενται τα δείγματα με προσοχή. Στη συγκεκριμένη συσκευή προστίθενται 10λ δείγματος. Η προσθήκη γίνεται με αυτόματη πιπέτα και προσέχουμε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες μέσα στα πηγαδάκια των δειγμάτων.

- Γίνεται η σύνδεση με την πηγή ώστε το δείγμα να κινηθεί από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+).

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V (με ένταση 60-70 A). Για μικρές συσκευές κρατάει περίπου 2 ώρες.

- Σταματάει η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος και το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (ΠΡΟΣΟΧΗ!!!) όπου ανακινείται για 15 min σε

θερμοκρασία δωματίου.

• Η παρατήρηση γίνεται με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μετά την ηλεκτροφόρηση βρέθηκαν τα εξής δείγματα θετικά στη Β-σφαιρίνη 0, 01, 02, 03, 04, 05, 38, 48, 39, 45, 6, 44, 35, 25, 29, 28, 10, 42, 20, 27, 8, 30, 19, 2, 37, 17, 14, 9, 7, 23, 22, 4, 33, 13, 34 (29 μελανώματα και 6 μάρτυρες).

1.4.1 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ HPV (ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ)

1. PCR MASTER MIX

Διάλυμα αρχικό	Ποσότητα μL/50 μL
Polymerase buffer + MgCl 10x	5
Primers	5
ThermoStable polymerase 5 units/μL	0.5
H ₂ O	30,5
DNA positive control	5

2. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ

1.	94°C	2 min	} 35x
2.	94°C	1 min	
3.	55°C	1 min	
4.	70°C	1 min	
5.	70°C	8 min	
6.	20°C	509 k	

3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα 2% αγαρόζης σε 0,5 TBE με σταθερή τάση 100 V και η εμφάνιση έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο 1μg/ml.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ PCR

Ο εντοπισμός μίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (P.C.R.) περιλαμβάνει τρία σημαντικά στάδια:

α. Απομόνωση του DNA

β. Ενίσχυση της αλληλουχίας του στόχου (amplification)

γ. Εντοπισμός του ενισχυμένου προϊόντος

1. Εκχύλιση του RNA.

1.1. Αρχή της μεθόδου.

Η απομόνωση του DNA γίνεται είτε με κλασικές μεθόδους εκχύλισης είτε με τη βοήθεια ειδικών κιτ που περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια έτοιμα και αποστειρωμένα. Ο λόγος της χρησιμοποίησης των κιτ για την απομόνωση του DNA είναι το γεγονός ότι με την χρήση τους εξασφαλίζεται η απομάκρυνση αναστολέων της πολυμεράσης που μπορεί να υπάρχουν στα κλινικά δείγματα. Επειδή δε τα κλινικά δείγματα είναι αποδεδειγμένο ότι έχουν αναστολείς, η χρήση των κιτ είναι επιτακτική για την απομόνωση του DNA από αυτά. Επίσης τα κιτ απομόνωσης του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε καλλιέργειες μικροβίων το ίδιο αποτελεσματικά. Η πορεία που ακολουθείται για την απομόνωση του DNA συνοπτικά είναι η εξής;

α. Αρχικά γίνεται η λύση όλων των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα (καθώς και εξωκυττάρων σχηματισμών) και απελευθέρωση του DNA.

β. Στο δεύτερο στάδιο το DNA ενσωματώνεται σε ρητίνη (αυτό γίνεται σε κάποιες συνθήκες αυτόματα) η οποία υπάρχει σε ειδικές στήλες μέσα στο κιτ.

γ. Στο τρίτο στάδιο γίνεται έκπλυση της ρητίνης με κάποια διαλύματα ώστε να απομακρυνθούν οι αναστολείς της πολυμεράσης.

δ. Στο τελευταίο στάδιο γίνεται η έκλουση του DNA από τη στήλη και η παραλαβή του σε ένα καινούργιο και καθαρό σωληνάριο. Στο στάδιο αυτό θα πρέπει να γίνει οπωσδήποτε και η μέτρηση της ποσότητας του DNA στο δείγμα για να αποφασιστεί η καταλληλότητά του.

1.2. Υλικά.

α. **Θάλαμος νηματικής ροής αέρα.** Ο θάλαμος αυτός θα χρησιμοποιείται

αποκλειστικά και μόνο για την εκχύλιση του DNA και θα βρίσκεται στο χώρο επεξεργασίας κλινικών δειγμάτων και απομόνωσης DNA. Θα έχει τα δικά του αναλώσιμα όπως ρύγχη, σωληνάρια, καθώς και τις δικές του αυτόματες πιπέτες. Τα παραπάνω δεν θα απομακρύνονται από αυτόν για να χρησιμοποιηθούν σε άλλες διαδικασίες και κυρίως οι πιπέτες. Ο καθαρισμός του θαλάμου μπορεί να γίνει με 1N υδροχλωρικό οξύ ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε πρόσμιξη (π.χ. ξένο DNA). Κάθε φορά που δουλεύουμε στον θάλαμο στρώνουμε φύλλα διηθητικού χαρτιού ώστε οτιδήποτε πέσει σε αυτά να τα απομακρύνουμε χωρίς να λερώσουμε το θάλαμο.

β. Αναλώσιμα όπως είναι:

- Αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf. Η αποστείρωση των σωληναρίων γίνεται στους 120 °C (1 ατμόσφαιρα) για 20 λεπτά, μέσα σε βαζάκια με κοχλιοτό πώμα. Στον πυθμένα των βάζων υπάρχει λίγο γάζα για να απορροφήσει τα νερά μετά το τέλος της αποστείρωσης και τα καπάκια τους είναι τυλιγμένα με λαδόκολλα και λαστιχάκι. Μετά την αποστείρωση τοποθετούνται σε ξηροκλίβανο για να απομακρυνθούν τα νερά που πιθανώς να υπάρχουν.

- Αποστειρωμένα ρύγχη για αυτόματες πιπέτες τα οποία έχουν στο εσωτερικό τους φίλτράκι για αποφεύγεται η επιμόλυνση των πιπετών λόγω του φαινομένου του αεροζόλ. Η προμήθεια τους γίνεται απευθείας από την εταιρία.

γ. Το κιτ για την απομόνωση του DNA. Αυτό περιλαμβάνει όλα τα διαλύματα που θα χρειαστούν και περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο αυτά θα παρασκευαστούν. Επίσης περιέχει σωληνάρια και στήλες για ρητίνη που θα χρησιμοποιηθούν στην απομόνωση του DNA.

δ. Αιθανόλη. Καλό θα είναι να είναι καλής ποιότητας για να μη δημιουργηθούν προβλήματα κατά την απομόνωση. Συνήθως φυλάσσεται σε αποστειρωμένα δοχεία (δεν χρειάζεται αποστείρωση) σε θερμοκρασία δωματίου.

ε. Διάλυμα πρωτεΐνάσης Κ. Το ένζυμο παρέχεται σε λυόφιλη μορφή μέσα στο κάθε κίτ. Προστίθεται απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό σε ποσότητα που καθορίζεται από τον κατασκευαστή και αυτό διαλύεται. Στη συνέχεια αυτό χωρίζεται σε επιμέρους aliquots και φυλάσσεται στους -20°C . Κάθε aliquot θα πρέπει να είναι ποσότητα για περίπου 4 δείγματα (γύρω στα 100 μL). Κάθε φορά θα ξεπαγώνει τόση πρωτεΐνάση όση ακριβώς χρειάζεται.

στ. Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 70°C .

ζ. Αλλά διαλύματα. Επειδή το κάθε κίτ έχει τα δικά του διαλύματα δεν αναφέρεται τι είναι το καθένα.

1.3 Επεξεργασία των δειγμάτων.

Στη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που προέρχονταν από αίμα. Η διαδικασία αυτή αφορά δείγματα που προέρχονται από **ολικό αίμα, ορό, πλάσμα, λευκά αιμοσφαίρια, κύτταρα από κυτταροκαλλιέργειες, πτύελα** και η επεξεργασία έγινε με το Nucleospin blood της εταιρίας Macherey - Nagel.

1. Πρώτα από όλα τοποθετώ τα άδεια erpendorf σε στατώ **τα κλείνω** και τα αριθμώ. Σε κάθε erpendorf προσθέτω **200 μL δείγματος**. Εάν δεν επαρκεί η ποσότητα προσθέτω μια ποσότητα PBS μέχρι τα 200 μL . Τα δείγματα μπορούν να φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα. Καλό είναι εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα δείγματος να χωρίζεται σε aliquots και να διατηρείται στις συνθήκες αυτές. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο στατώ. Επίσης η τακτική που ακολουθείται είναι η τακτική του "ανοίγω - κλείνω". Δηλαδή ανοίγω το σωληνάριο με το δείγμα και παίρνω, το κλείνω, στη συνέχεια ανοίγω το άδειο, προσθέτω το δείγμα και το κλείνω. Σε καμία περίπτωση δεν τα αφήνω όλα ανοιχτά. Κάθε φορά χρησιμοποιώ διαφορετικό ρύγχος. Επίσης καλό είναι να μην είναι μεγάλοι οι σωλήνες με κίνδυνο να μπει η

πιπέτα μέσα σε αυτούς και να επιμολυνθεί με μολυσματικό υλικό. Για να την καθαρίσουμε την πιπέτα χρησιμοποιούμε 1N υδροχλωρικό οξύ (όταν χρειαστεί). Τα ρύγγη τα απορρίπτω σε μεγάλα και άδεια δοχεία.

2. Προσθέτω 200 μ L B3 ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη η οποία είναι χαοτροπικός παράγοντας και έχει την ικανότητα να διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες και να ελευθερώνει το DNA στο διάλυμα. **Στη συνέχεια προσθέτω 25 μ L διαλύματος πρωτεΐνάσης K.** Η πρωτεΐνάση K διασπά τις πρωτεΐνες του δείγματος. **Όταν προσθέσω την πρωτεΐνάση K ανακατεύω με την πιπέτα τρεις φορές και αλλάζω ρύγγος κάθε φορά.** Και σε αυτή την περίπτωση ισχύει η τακτική του ανοίγω- κλείνω. **Ακολουθεί ανακίνηση του δείγματος σε vortex που υποβοηθάει τη διαλυτοποίηση του δείγματος.**

3. Τοποθετούμε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά. Εάν δεν διαλυτοποιηθούν τυχόν ιζήματα επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία.

4. Προσθέτω 210 μ L καθαρής αιθανόλης και ανακινώ το δείγμα σε vortex. Η προσθήκη της αιθανόλης βοηθάει ώστε να κατακαθίσει καλύτερα το DNA και στο δείγμα και στη στήλη.

5. Από τη συσκευασία του kit βγάζω τα σωληνάκια που έχει μέσα και τοποθετώ μέσα σε αυτά τα φιλτράκια τα οποία τα κλείνω μόλις τα τοποθετώ. Αριθμώ την πάνω επιφάνεια των φίλτρων. **Τοποθετώ όλη την ποσότητα του διαλύματος στα φιλτράκια με αυτόματη πιπέτα** και προσέχω ώστε να μη πάει διάλυμα στο δεύτερο χείλος του φίλτρου διότι δεν θα απομακρυνθεί με τη φυγοκέντρηση. Επίσης το διάλυμα δεν θα πρέπει να έχει κομμάτια μέσα για να μην βουλώσει το φίλτρο.

6. Ετοιμάζω μια καινούργια σειρά σωληναρίων (συνήθως είναι 1.5 ml) τα οποία δεν τα αριθμώ και τα αφήνω ανοιχτά. Φυγοκεντρώ για 1 λεπτό σε 6000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό περνάει το διάλυμα μέσα από τα φίλτρα

και το DNA κατακρατείται ενώ τα περισσότερα συστατικά απομακρύνονται. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης ελέγχουμε εάν έχει περάσει όλο το διάλυμα στον κάτω σωλήνα. Εάν δεν έχει περάσει τότε επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση.

7. Τοποθετώ τα φιλτράκια με το DNA μέσα στα καθαρά σωληνάκια αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση και απορρίπτω τα σωληνάκια που έχουν το αρχικό διάλυμα.

8. Στα φιλτράκια προσθέτω 400 μ L BW (Wash Buffer). Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του DNA και περιέχει εκτός των άλλων υδροχλωρική γουανιδίνη με σκοπό να απομακρύνει οτιδήποτε έχει κατακρατηθεί στη στήλη και μπορεί να αποτελέσει αναστολέα της πολυμεράσης (π.χ. αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνες κ.α.). Η ποσότητα αυτή είναι λιγότερη από ότι αναφέρεται στο πρωτόκολλο διότι τα σωληνάκια είναι μικρότερα και θα εμποδιστεί η απομάκρυνση του διαλύματος κατά τη φυγοκέντρηση. **Φυγοκεντρώ για 1 λεπτό σε 6000 g σε θερμοκρασία δωματίου.** Τοποθετώ πρώτα τα φιλτράκια σε καινούργια σωληνάκια τα οποία τα έχω τοποθετήσει στο στατώ πριν τη φυγοκέντρηση και κατόπιν πετάω τα σωληνάκια με το διάλυμα σε μεγάλο δοχείο ώστε να αποφύγω τυχόν επιμολύνσεις.

9. Προσθέτω στα φιλτράκια 400 μ L από το διάλυμα B5 (το διάλυμα αυτό περιέχει αιθανόλη). Το διάλυμα αυτό βοηθάει στο ξέπλυμα των φίλτρων από τα συστατικά των προηγούμενων διαλυμάτων. Φυγοκεντρώ για 1 λεπτό σε 6000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετώ πρώτα τα φιλτράκια σε καινούργια σωληνάκια τα οποία τα έχω τοποθετήσει στο στατώ πριν τη φυγοκέντρηση και κατόπιν πετάω τα σωληνάκια με το διάλυμα όπως προηγουμένως.

10. Προσθέτω στα φιλτράκια άλλα 400 μ L από το διάλυμα B5. Φυγοκεντρώ για 2 λεπτά σε 8000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Επειδή το διάλυμα B5 περιέχει αιθανόλη που είναι αναστολέας της πολυμεράσης θα πρέπει να γίνει πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης και γιαυτό χρειάζεται να φυγοκεντρωθεί σε αυτές τις

συνθήκες. Τοποθετώ πρώτα τα φιλτράκια σε καινούργια και αποστειρωμένα σωληνάρια τα οποία τα έχω τοποθετήσει στο στατώ πριν τη φυγοκέντρηση και κατόπιν πετάω τα παλαιά σωληνάρια με το διάλυμα όπως προηγουμένως. Παρατήρηση: Στις παραπάνω διαδικασίες ελέγχω εάν έχει γίνει η απομάκρυνση του διαλύματος από τα φιλτράκια αλλιώς επαναμβάνω ή πετάω.

11. Πριν το στάδιο αυτό έχω τοποθετήσει το BE (διάλυμα έκλουσης) στο υδατόλουτρο και στους 70°C. Το διάλυμα αυτό ένα διάλυμα 5 mM Tris.HCL pH8.5 και βοηθάει στην έκλουση του DNA από τη στήλη. Για να διευκολυνθεί και να πραγματοποιηθεί όμως η έκλουση θα πρέπει το διάλυμα να βρίσκεται στους 70°C.

Με βάση τα προηγούμενα τοποθετώ 100 μL από το διάλυμα BE στα φιλτράκια και τα τοποθετώ για 5 λεπτά στους 70°C με το καπάκι του υδατόλουτρου ανοιχτό για να μη πέσουν νερά επάνω στα καπάκια και γίνει επιμόλυνση. Φυγοκεντρώ για 1 λεπτό σε 6000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προσθέτω και άλλα 100 μL από το διάλυμα BE στα φιλτράκια τα τοποθετώ για 5 λεπτά στους 70°C και φυγοκεντρώ για 1 λεπτό σε 6000 g σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό γίνεται ώστε να πάρω τη μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα DNA.

13. Στη συνέχεια προσδιορίζω την ποσότητα του DNA στο δείγμα. Αυτό γίνεται ως εξής: Από το αρχικό διάλυμα παίρνω 25 μL και κάνω αραιώση 1:20 (δηλαδή προσθέτω 475 μL νερό). Τοποθετώ το διάλυμα σε κυψελίδες χαλαζία και καταγράφω την απορρόφηση στα 260 και στα 280 nm σε φωτόμετρο με υπεριώδη λάμπα. Από τις μετρήσεις αυτές: α. Υπολογίζω το λόγο της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm. Θα πρέπει να είναι 1.5 με 2, διαφορετικά το δείγμα δεν είναι καλό και θα πρέπει να επαναλάβω τη διαδικασία καθαρισμού.

β. Προσδιορίζω την ποσότητα του DNA ως εξής:

H O.D. (260 nm) ίση με 1 αντιστοιχεί σε 50 μg/ml DNA.

Επίσης για RNA η O.D. (260 nm) ίση με 1 αντιστοιχεί σε 40 µg/ml RNA, ενώ για ολιγονουκλεοτίδια η O.D. (260 nm) ίση με 1 αντιστοιχεί σε 33 µg/ml.

Εάν η απορρόφηση στα 260 nm αραιωμένου δείγματος είναι O.D. τότε η ποσότητα του DNA στο αρχικό δείγμα θα είναι O.D. X 1000.

14. Το DNA που απομονώθηκε μπορεί να διατηρηθεί είτε στους -20 είτε στους -80 για μεγάλο χρονικό διάστημα και να χρησιμοποιηθεί για διάφορες δραστηριότητες.

1.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΙΛΤΡΩΝ (CRUDE DNA).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή ολικού DNA από στυλεούς ή από βακτηριακά κύτταρα (Gram θετικά ή αρνητικά), από κύτταρα καλλιέργειών π.χ. για τον προσδιορισμό χλαμυδίων σε δείγμα ή σε καλλιέργεια κ.α.

1.6.1 ΥΛΙΚΑ.

Τα κυριότερα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι:

- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K σε συγκέντρωση 10 - 20 mg/ml σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό

- το λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer) το οποίο αποτελείται από:

50 mM Tris.HCL pH 7.5

1% Triton X-100

1 mM EDTA

200 µg πρωτεΐνάση K/ml (δεν είναι μέσα στο διάλυμα και προστίθεται στο τέλος από το stock διάλυμα).

- Αποστειρωμένο διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7.4).

1.6.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Τα κύτταρα από την καλλιέργεια επαναιωρούνται σε 1.5 ml PBS (περίπου 0.5 McFarland) μέσα σε σωληνάριο eppendorf.

2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 6000 g για 5 λεπτά.

3. Όταν πρόκειται για δείγμα σε στυλεό ακολουθείται η διαδικασία από εδώ και κάτω η οποία είναι πλέον κοινή και για τα βακτήρια. Ο στυλεός τοποθετείται σε 100 μL Lysis Buffer και γίνεται προσπάθεια να τρυφτεί στον πυθμένα το σωληναρίου ώστε να απομακρυνθεί όλο το υλικό (εναλλακτικά μπορεί να τοποθετηθεί όλο το βαμβάκι μέσα στο σωληνάριο και η διαδικασία να γίνει με το βαμβάκι). Τα βακτήρια επαναιωρούνται στην ίδια ποσότητα διαλύματος.

4. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για πάνω από δύο ώρες.

5. Στη συνέχεια ακολουθεί βράσιμο (95-100°C) για 10 λεπτά.

6. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 14000 rpm (μεγίστη ταχύτητα της φυγοκέντρου) για 10 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σκουπίδια.

7. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο και το ίζημα απορρίπτεται.

8. Ακολουθεί προσδιορισμός του DNA, μιά ποσότητα 5 μL χρησιμοποιείται για ΡΟΚ, και το υπόλοιπο φυλάσσεται.

1.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ.

Για τη διαδικασία αυτή μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κιτ ISOQUICK. Με αυτό μπορεί να γίνει απομόνωση του DNA από ούρα, κόπρανα, E.N.Y., πλευριτικό, αρθρικό.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι:

1. Τοποθετώ 100 λ ούρα σε σωληνάριο erpendorf. Στη συνέχεια προσθέτω 100 λ Lysis buffer και ανακινώ με την αυτόματη πιπέτα.

2. Προσθέτω 500 λ Extraction Matrix αφού πρώτα το έχω ανακινήσει καλά να διαλυθούν τα σφαιρίδια που περιέχει.

3. Προσθέτω άλλα 400 λ Extraction buffer και αναδεύω σε vortex.

4. Επωάζω για 5 λεπτά στους 65°C κατόπιν ανακινώ σε vortex και ξαναεπωάζω για άλλα 5 λεπτά στους 65°C.

5. Φυγοκεντρώ για 5 λεπτά σε 12000 g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παίρνω την υδατική φάση (πάνω φάση) με αυτόματη πιπέτα.

6. Στην υδατική φάση προσθέτω πάλι 500 λ Extraction Matrix αφού πρώτα το έχω ανακινήσει καλά να διαλυθούν τα σφαιρίδια που περιέχει. Φυγοκεντρώ για 5 λεπτά σε 12000 g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παίρνω την υδατική φάση (πάνω φάση). Επειδή η στιβάδα αυτή μπορεί να μην είναι καθαρή φυγοκεντρώ για άλλα 5 λεπτά σε 12000 g και παίρνω το υδατικό κλάσμα με αυτόματη πιπέτα προσπαθώντας να το ογκομετρήσω.

7. Στο υδατικό διάλυμα προσθέτω α. διάλυμα οξικού νατρίου σε αναλογία 1:10 δηλαδή σε 10 λ διαλύματος προσθέτω 1 λ οξικού νατρίου (για το οξικό αμμώνιο χρειάζεται αναλογία 1:2) και β. ίσο όγκο ισοπροπανόλης. Το οξικό νάτριο μετατρέπει το DNA σε αλάτι και η ισοπροπανόλη το καταβυθίζει. Ανακινώ και τοποθετώ το διάλυμα στους -20°C για 10 λεπτά.

8. Φυγοκεντρώ στην μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά και μετά τη φυγοκέντρωση αναρροφώ το διάλυμα προσεκτικά για να μην καταστρέψω το ίζημα. Αυτό γίνεται με πολύ λεπτές πιπέτες Pasteur.

9. Προσθέτω 1 ml διαλύματος αιθανόλης 70% (παρασκευάζεται με ανάμιξη 9 όγκων καθαρής αιθανόλης με 4 όγκους νερού) και φυγοκεντρώ στην μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά και μετά τη φυγοκέντρωση αναρροφώ το διάλυμα προσεκτικά για να μην καταστρέψω το ίζημα.

10. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 – 100 λ νερού.

1.8 ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΤΗΣ PCR.

1. Το πρώτο και καθοριστικότερο βήμα πριν ξεκινήσω την PCR είναι ο

καθορισμός των primers (εκκινιτών). Σε μια ΡΟΚ χρησιμοποιούνται δύο primers, ο ένας βρίσκεται στο ένα άκρο της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει και ο άλλος στο άλλο άκρο. Το μέγεθος τους πρέπει να είναι 17-20 νουκλεοτίδια. Συνήθως χρησιμοποιούμε πληροφορίες από τη βιβλιογραφία. Φροντίζουμε με ειδικά προγράμματα ώστε να μην υπάρχουν παλίνδρομες αλληλουχίες, να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους κ.α. Επίσης θα πρέπει να έχουν τουλάχιστον 60% G ή C. Από τη σύσταση των primers, καθορίζουμε την θερμοκρασία επανασύνδεσης (annealing) που είναι βασική για το ειδικό ταίριασμα των συμπληρωματικών κομματιών. Η θερμοκρασία αυτή υπολογίζεται για κάθε primer ως εξής : $T_m = 4 * (G+C) + 2 * (A+T)$. Επίσης η θερμοκρασία annealing υπολογίζεται ως εξής $T_a = T_m - 5$. Παρόλα αυτά θα πρέπει να προσεχθούν ιδιαίτερα δυο πράγματα.:

α. Η T_a των δύο primers θα πρέπει να διαφέρουν το πολύ κατά τρεις βαθμούς. Αυτό είναι απαραίτητο για να ταιριάζουν και τα δύο στις συμπληρωματικές θέσεις τους περίπου ισάξια. Με βάση λοιπόν την παρατήρηση αυτή επιλέγουμε primers που να έχουν περίπου παρόμοια σύσταση.

β. Η T_a των δύο primers δεν θα πρέπει να είναι μικρότερα από τους 52°C και αυτό διότι σε μικρότερες θερμοκρασίες θα έχουμε μη ειδικό ταίριασμα και πολλά μη ειδικά τμήματα. Με βάση λοιπόν την παρατήρηση αυτή επιλέγουμε primers που να έχουν υψηλό ποσοστό G, C. Η συνήθης συγκέντρωση των primers είναι 20 -50 pmoles.

2. Η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα της αντίδρασης είναι απαραίτητη για να λειτουργήσει η πολυμεράση. Η κάθε πολυμεράση έχει το δικό της ρυθμιστικό διάλυμα και παρέχεται από την εταιρία στη συσκευασία της.

3. Για να γίνει το σωστό ταίριασμα των συμπληρωματικών αλληλουχιών χρειάζεται η σωστή συγκέντρωση Mg. Το Mg παρέχεται στο κίτ της πολυμεράσης με

τη μορφή διαλύματος $MgCl_2$ σε συγκέντρωση κυρίως 25 mM. Η συγκέντρωσή του στο διάλυμα της αντίδρασης είναι κυρίως 1.5 mM αλλά μπορεί να ποικίλλει από 1 - 7 mM.

4. Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι απαραίτητα ως υπόστρωμα για την πολυμεράση. Η συγκέντρωσή τους πρέπει να είναι η ίδια και συνήθως στο δείγμα αντιστοιχεί σε 100-200 μM (0.1 - 0.2 mM) για το κάθε νουκλεοτίδιο.

5. Η πολυμεράση είναι κυρίως η Taq πολυμεράση. Η ενεργότητά της καθορίζει το χρόνο δράσης της. Επίσης η ποσότητά της στο διάλυμα όπου θα γίνει ο πολυμερισμός καθορίζεται από το μέγεθος του στόχου. Η συνήθης ταχύτητα πολυμερισμού είναι 2000 βάσεις/λεπτό. Συνήθως στο διάλυμα της αντίδρασης χρησιμοποιούνται 0.5 - 1 Unit του ενζύμου. Και αυτή η ποσότητα ποικίλλει από αντίδραση σε αντίδραση.

1.9 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ PCR.

1. Αποδιάταξη του DNA. Γίνεται στους 94-96°C για 0.5 - 1 λεπτό. Στη θερμοκρασία αυτή χωρίζει το δίκλωνο μόριο.

2. Επανασύνδεση του DNA (annealing). Είναι το πιο κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας διότι θα γίνει η επανασύνδεση των primers με το στόχο και για αυτό θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν όσα προαναφέρθηκαν για τους primers. Συνήθως το στάδιο αυτό διαρκεί από 0.5 - 1 λεπτό και η θερμοκρασία εξαρτάται από τους primers.

3. Επιμήκυνση των primers. Γίνεται στους κυρίως στους 72°C αλλά εξαρτάται από την πολυμεράση. Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του στόχου με την προϋπόθεση ότι η πολυμεράση έχει ταχύτητα 2000 β/λεπτό.

4. Οι παραπάνω διαδικασίες επαναλαμβάνονται κάποιες φορές ώστε να ενισχυθεί η αλληλουχία του στόχου σημαντικά. Συνήθως γίνονται 35 - 40 κύκλοι.

5. Πριν την έναρξη των κύκλων συνήθως γίνεται επώαση του μίγματος στους

94°C για 5 λεπτά. Μετά το τέλος των κύκλων το μίγμα επωάζεται στους 72°C για 10 λεπτά ώστε να επιμηκυνθούν οι αλυσίδες .

1.10 ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκαν δείγματα πλάσματος για την ύπαρξη κυταρταρομεγαλοϊού.

1. Primers. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την εξής αλληλουχία:

IE1: AGACCTTCATGCAGATCTCC

IE2: GGTGCTCACGCACATTGATC

Με βάση τη θεωρία οι T_m τους είναι $T_{mIE1} = 60$ και $T_{mIE2} = 62$. Επίσης οι συγκεντρώσεις τους είναι 10 pmole/μL.

2. Προτού ξεκινήσει η διαδικασία υπολογίζονται οι ποσότητες από το κάθε συστατικό που θα προστεθούν στο mastermix. Η Ύπαρξη αυτού του διαλύματος έχει σημασία διότι σε ορισμένες περιπτώσεις που χρειάζονται πολύ μικρές ποσότητες αποφεύγονται σημαντικά λάθη. Επομένως το μίγμα αυτό έχει την ακόλουθη σύσταση:

Διάλυμα αρχικό	Ποσότητα μL//50μL	Ποσότητα μL,/1900 μL	Τελική συγκέντρωση
Polymerase Buffer +MgCl 10X	5	190	1X
IE1 (10 pmol/μL)	5	190	50 pmol
IE2(10 pmol/μL)	5	190	50 pmol
Μίγμα dNTP 10 mM	1	38	0.2 mM
Thermostabe polymerase 2 Units/μL.	1	38	21 Units
H ₂ O	28	1064	-

Παρατηρήσεις:

1. Το νερό προέρχεται από τις αμπούλες του απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

2. Στη συγκεκριμένη εξέταση είχαμε 35 δείγματα με DNA, ένα αρνητικό control, και ένα θετικό control. Επίσης στους υπολογισμούς μας βάζουμε και ένα δείγμα παραπάνω για κάθε περίπτωση.

1.10.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

1. Μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής το ειδικό για την PCR στρώνουμε τα διηθητικά χαρτιά που πρέπει.

2. Φτιάχνουμε πρώτα το mastermix με βάση τους υπολογισμούς που κάναμε χρησιμοποιώντας πάντοτε διαφορετικό ρύγχος με φιλτράκι. Προσθέτουμε πρώτα το συστατικό που είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα (νερό) και μετά τα υπόλοιπα.

Τελευταία προσθέτουμε την πολυμεράση την οποία είτε την παίρνουμε και την βάζουμε κατευθείαν στην κατάψυξη, είτε την έχουμε σε πάγο.

3. Στη συνέχεια αδειάζουμε το χώρο εργασίας μας από τα συστατικά του mastermix και προχωρούμε στην επεξεργασία των δειγμάτων.

4. Χρησιμοποιούμε τα μικρά σωληνάκια των 0.2 ml τα οποία τα έχουμε αποστειρώσει μέσα σε δοχεία στους 120°C για 20 λεπτά.

5. Παίρνω τα σωληνάρια αυτά, τα τοποθετώ σε ένα stato, τα κλείνω (δεν τα αφήνω ποτέ ανοιχτά) και τα αριθμώ πλευρικά και στα καπάκια τους.

6. Διαμοιράζω τα συστατικά του mastermix στα σωληνάρια (σε κάθε ένα βάζω 45 μ L) με τη διαδικασία του ανοίγω κλείνω.

7. Στη συνέχεια προσθέτω 5 μ L από το διάλυμα του DNA σε κάθε σωληνάκι. Στο σωληνάριο με το αρνητικό control προσθέτω 5 μ L νερό και στο σωληνάριο με το θετικό control προσθέτω 5 μ L από την αλληλουχία που ψάχνω. Η προσθήκη του διαλύματος του DNA γίνεται με τη βοήθεια ρυγχών με φιλτράκια. Επίσης κάνω και μία ελαφριά ανάδευση με την πιπέτα προσέχοντας να μην γίνουν φυσαλίδες. Και σε αυτή την περίπτωση εφαρμόζω την τεχνική του ανοίγω κλείνω.

8. Τοποθετώ τα σωληνάκια στον κυκλοποιητή (προτιμώ μεσαίες θέσεις) και αφήνω τον κυκλοποιητή να ξεκινήσει. Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε είναι:

1.	94°C	4 min	} 40x
2.	94°C	1 min	
3.	58°C	1 min	
4.	72°C	1 min	
5.	72°C	10 min	

Για τη β-σφαιρίνη:

1.	95°C	4,5 min	} 40x
2.	95°C	30 sec	
3.	55°C	50 sec	
4.	72°C	60 sec	
5.	72°C	7 min	

Όταν θέλουμε να σταντάρουμε μια PCR δουλεύουμε με κάποιες αρχικές συνθήκες και μετά αλλάζουμε κάποιες από αυτές. Δηλαδή θα έχουμε:

Για τη β-σφαιρίνη:

Διάλυμα αρχικό	Τελική συγκέντρωση
primer 1 (10 pmol/μL)	50 pmol
primer 2 (10 pmol/μL)	50 pmol
Μίγμα dNTP 10 mM	0.2 mM
Thermostable polymerase 2 Units/μL	2 Units
DNA	10 και 100 pg
MgCl ₂	1.5 mM

Mastermix PCR για HPV (24 PCR)

Buffer	5 x 24 = 120 μl (λ)
Primers	5 x 24 = 120 μl (λ)
DNTP	4 x 24 = 96 μl

Polymerase	$0,5 \times 24 = 12 \mu\text{l}$
H ₂ O	$30,5 \times 24 = 732 \mu\text{l}$
Άθροισμα	$1080/24 = 45$

Μπορούμε να αλλάξουμε τη συγκέντρωση του MgCl₂, την συγκέντρωση του DNA, την annealing temperature καθώς και τους χρόνους.

1.11 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ.

Το τρίτο και τελευταίο σταδιακής PCR είναι η ανίχνευση των προϊόντων. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει με κάποιους τρόπους. Ο ένας είναι μέσω ηλεκτροφόρησης και χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο (είναι μια ουσία που ενώνεται με το DNA και παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας φθορίζει) σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο δεύτερος περιλαμβάνει υβριδισμό με κάποιο probe είτε σε βοθρία σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης. Με την ηλεκτροφόρηση και δεδομένου του μεγέθους του στόχου μπορούμε να εκτιμήσουμε εάν έχει γίνει σωστά η ενίσχυση. Το πρόβλημα είναι ότι δεν γνωρίζουμε εάν οι ζώνες στο πήκτωμα είναι αυτές που μας ενδιαφέρουν. Από την άλλη με τον υβριδισμό σε βοθρία επιλέγουμε μία περιοχή του στόχου η οποία υβριδίζεται με το ενισχυμένο σήμα. Οπότε η αντίδραση αυτή είναι ειδική και μπορεί να μας δώσει αποτέλεσμα είτε θετικό είτε αρνητικό. Η ιδανικότερη κατάσταση είναι να γίνει αρχικά ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη, μετά μεταφορά σε νιτροκυτταρίνη και τέλος υβριδισμός.

1.11.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ.

Για να λειτουργήσει η διαδικασία εντοπισμού του σήματος με υβριδισμό χρειάζεται μια συνθετική αλληλουχία η οποία να είναι συμπληρωματική με κάποια αλληλουχία που βρίσκεται στο εσωτερικό του στόχου. Το μήκος της πρέπει να είναι 20-30 βάσεις. Η αλληλουχία αυτή μπορεί να παρασκευαστεί συνθετικά από διάφορες εταιρίες. Συνήθως με την παραγγελία της αλληλουχίας έρχεται και η συμπληρωματική της. Επίσης η αλληλουχία αυτή μπορεί είναι συνδεδεμένη στο 5' άκρο της με βιοτίνη.

Για να χρησιμοποιήσουμε την αλληλουχία αυτή χρειαζόμαστε βοήθεια τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους στρεπταβιδίνη. Εάν βάλουμε την βιοτινυλιομένη αλληλουχία σε αυτά τα πηγάδια τότε η βιοτίνη θα ενωθεί με την στρεπταβιδίνη και έτσι στην επιφάνεια των πηγαδιών θα προσκολληθεί το probe που μας ενδιαφέρει. Ορισμένες εταιρείες (Roche) προμηθεύουν πηγάδια με ενσωματωμένο το probe στην επιφάνεια τους. Στην περίπτωση αυτή οι primers της PCR είναι βιοτινυλιομένοι. Βάζοντας το δείγμα του οποίου έχουμε κάνει PCR σε αυτά τα πηγάδια τότε εάν έχει την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει θα υβριδιστεί με το probe και θα δημιουργηθεί ένα δίκλωνο μόριο. Στη συνέχεια υπάρχουν διάφορες επιλογές. Μια από αυτές περιλαμβάνει επώαση με κάποιο αντίσωμα ειδικό για το δίκλωνο DNA (Biosorin) το οποίο θα ενωθεί με το δίκλωνο μόριο. Ακολουθεί επώαση με ένα αντίσωμα έναντι του πρώτου το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση. Με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος και του χρωμογόνου και επώαση για κάποιο χρονικό διάστημα γίνεται η αντίδραση και παραγωγή χρώματος στα θετικά δείγματα.

1.11.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΣΕ ΛΕΚΑΝΑΚΙΑ

1. Παίρνουμε τα λεκανάκια (strips) από το ψυγείο (συνήθως βρίσκονται μέσα στο κίτ) και τα βάζουμε μέσα στους υποδοχείς. Στα δείγματα που έχουμε προσθέτουμε και τέσσερα ακόμη που θα είναι: ένα blank, δυο αρνητικά Controls και ένα θετικό Control.

2. Το στρώσιμο των πρόβες και όλη η διαδικασία υβριδισμού θα πρέπει να γίνεται σε διαφορετικό δωμάτιο από τις προηγούμενες διαδικασίες. Τα διαλύματα θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα καθώς και τα ρύγχη των πιπετών ώστε να μην υπάρχουν νουκλεάσες. Βάζουμε απο 100 λ από το διάλυμα του βιοτινυλιομένου probe σε κάθε strip. Η συγκέντρωση του probe είναι 50 ρg/λ επομένως σε κάθε strip προσθέτω 5 ngrams probe (αυτό ισχύει για την περίπτωση του CMV, σε άλλες

περιπτώσεις θα πρέπει να γίνει τιτλοδότηση της πλάκας).

3. Σκεπάζουμε με αυτοκόλλητο τα strips και τα αφήνουμε στους 4 overnight (18-22 ώρες).

4. Παίρνουμε τα eppendorf της PCR τα τοποθετούμε σε ένα λεπτό φύλλο φελιζόλ και τα επωάζουμε για 15 λεπτά στους 95°C. Αυτό γίνεται για να αποδιαταχθεί το δίκλωνο DNA. Κατόπιν τα τοποθετούμε κατευθείαν σε ένα λουτρό με παγάκια (δηλαδή δοχείο με παγάκια και νερό) όπου τα αφήνουμε τουλάχιστον για 10 λεπτά και καθ' όλη την εκτέλεση της διαδικασίας. Η κατάσταση αυτή διατηρεί τις αλυσίδες ξεχωριστές.

5. Κάνω κάποιο σχεδιάγραμμα όπου αναγράφω τα δείγματα και τις θέσεις τους.

6. Παρασκευάζω σε στείρα δοχεία το wash buffer με αραιώση κατά 1:25 κάποιου πυκνού διαλύματος. Η αραιώση θα πρέπει να γίνει με στείρο απεσταγμένο νερό.

7. Βγάζουμε τα strips από το ψυγείο και χύνουμε απότομα το περιεχόμενο τους και μετά σκουπίζουμε με τινάγματα σε φύλλο διηθητικού χαρτιού. Γράφουμε στην άκρη του κάθε strip ένα νούμερο για να μην μπερδευτούμε.

8. Προσθέτουμε πάνω από 300 λ wash buffer σε κάθε πηγαδάκι (γύρω στα 350 με 400 λ), χύνουμε απότομα το περιεχόμενο των strips και μετά σκουπίζουμε με τινάγματα σε φύλλο διηθητικού χαρτιού. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία άλλες 4 φορές. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν όλα τα μη συνδεδεμένα probes. Στο τέλος με διαδοχικά τινάγματα προσπαθώ να στεγνώσω τα πηγαδάκια.

9. Προσθέτω 100 λ από το buffer του υβριδισμού σε κάθε πηγαδάκι εκτός από το blank. Στη συνέχεια προσθέτω 20 λ από το αρνητικό control στα αντίστοιχα πηγαδάκια, 20 λ από την συμπληρωματική με τον probe αλληλουχία στο πηγαδάκι του θετικού control και 20 λ από το κάθε δείγμα σε κάθε πηγαδάκι. Τα δείγματα

διατηρούνται παγωμένα και κατά τη στιγμή της προσθήκης απομακρύνονται από το παγόλουτρο. Επίσης γίνεται ανάδευση με την αυτόματη πιπέτα. Θα πρέπει εδώ να δοθεί προσοχή στη σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα.

10. Σκεπάζουμε με αυτοκόλλητο και τα τοποθετούμε στους 50°C σε ξηροκλίβανο για 1 ώρα ώστε να γίνει ο υβριδισμός.

11. Αδειάζω το περιεχόμενο των πηγαδιών προσεκτικά τα τινάζω σε διηθητικό χαρτί και προσθέτω πάνω από 300 λ wash buffer σε κάθε πηγαδάκι (γύρω στα 350 με 400 λ), χύνουμε απότομα το περιεχόμενο των strips και μετά σκουπίζουμε με τινάγματα σε φύλλο διηθητικού χαρτιού. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία άλλες 4 φορές. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα μόρια με το ξέπλυμα. Στο τέλος με διαδοχικά τινάγματα προσπαθώ να στεγνώσω τα πηγαδάκια.

12. Αραιώνουμε κατά 1:50 το αντίσωμα έναντι του δίκλωνου DNA, με το αντίστοιχο διάλυμα. Προσθέτω 100 λ από το αραιωμένο αντίσωμα σε κάθε πηγαδάκι εκτός από το blank και επωάζω για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού τα λεκανάκια είναι σκεπασμένα.

13. Αδειάζω το περιεχόμενο των πηγαδιών, τινάζω σε διηθητικό χαρτί και ξεπλένω 5 φορές με wash buffer όπως έχει περιγραφεί.

14. Παρασκευάζω το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος με αραιώση του πυκνού διαλύματος κατά 1:50. Προσθέτω 100 λ σε κάθε πηγαδάκι εκτός του blank και επωάζω για 30 λεπτά τα σκεπασμένα πηγαδάκια σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα του ενζύμου που περισσεύει δεν το πετάω.

15. Αδειάζω το περιεχόμενο των πηγαδιών, τινάζω σε διηθητικό χαρτί και ξεπλένω 5 φορές με wash buffer όπως έχει περιγραφεί.

16. Παρασκευάζω ένα διάλυμα με προσθήκη υποστρώματος και χρωμογόνου σε αναλογία 1:1. Προσθέτω μια μικρή ποσότητα αυτού (200 λ) στο διάλυμα του δεύτερου

αντισώματος και μόλις δω αλλαγή στο χρώμα (που σημαίνει ότι λειτουργεί το υπόστρωμα) προσθέτω 100 λ σε όλα τα πηγαδάκια (και στο blank). Επιάζω στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

17. Προσθέτω 200 λ blocking reagent σε κάθε πηγαδάκι και φωτομετρώ στα 450 nm.

18. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Από τα αρνητικά control βρίσκω το μέσο όρο. Στο μέσο όρο προσθέτω το 0,150. Η τιμή αυτή είναι η τιμή cut off. Όσα δείγματα έχουν απορρόφηση κάτω από αυτήν θεωρούνται αρνητικά. Όσα πάνω από αυτή θα πρέπει να αξιολογηθεί το πόσο υψηλή είναι αυτή.

1.12 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.

1.12.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.

1. **Διάλυμα βρωμιούχου Αιθιδίου.** Παρασκευάζεται ένα Stock διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/ml είτε από ταμπλέτα είτε ζυγίζεται. Για την βαφή του πηκτώματος χρειάζεται διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 μg/ml το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 5 λ του Stock διαλύματος για κάθε 100 ml απεσταγμένου νερού.

2. **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** Είναι διάλυμα TBE ή TAE με την εξής σύσταση:

Tris-borate buffer (TBE) 10X (Tris-borate 0.45 M – 0.01 M EDTA)

108 gr Tris Base

55 gr boric acid

20 ml 0.5 M EDTA (PH 8.0)

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε απεσταγμένο νερό με τελικό όγκο 1000 ml.

Tris-acetate buffer (TAE) 50X (Tris-acetate 2 M – 0.005 M EDTA)

242 gr Tris Base

57.1 gr glacial acetic acid

100 ml 0.5 M EDTA (PH 8.0)

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε απεσταγμένο νερό με τελικό όγκο 1000 ml.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται συνήθως διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 X TBE ή TAE.

3. Gel loading buffer (6X)(Fermentas). Είναι ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει χρωστικές για τον καθορισμό του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και περιέχει:

0.25% μπλε της βρωμοθυμόλης

40% sucrose

4. Διαλύματα που περιέχουν DNA γνωστού μεγέθους.

A. Είναι το προϊόν **“1 Kb plus DNA ladder” (cat no 10787-018)** της εταιρίας Fermentas.

B. Είναι το προϊόν **GeneRuler 100bp DNA Ladder SM0241** της εταιρίας Fermentas.

Η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα είναι 0.5 mg DNA/ml και είναι διαλυμένο σε διάλυμα 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) και 1 mM EDTA. Επίσης, μαζί με τη συσκευασία περιέχεται και το διάλυμα 6X loading Dye Solution με την εξής σύσταση:

0.2% μπλε της βρωμοθυμόλης

0.2% xylene cyanol FF

60% sucrose

60 mM EDTA.

Θα πρέπει προτού ηλεκτροφορηθεί το διάλυμα του DNA να αναμιχθούν σε σωληνάριο:

1 λ (0.5 μg) GeneRuler 100 bp DNA Ladder

1 λ 6X Loading Dye Solution

4 λ απεσταγμένο νερό.

Το διάλυμα ανακινείται προσεκτικά πριν την ηλεκτροφόρηση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσθέτουμε 0.1 μg (0.2 λ) του DNA για κάθε χιλιοστό πλάτους του πηκτώματος (στην περίπτωση_μας για τα 3 χιλιοστά χρειαζόμαστε 0.3 μg DNA από το DNA δηλαδή 4 λ έγχρωμου διαλύματος).

5. Δείγματα.

Στο κάθε δείγμα προστίθεται Gel loading buffer (6X) σε αναλογία 1:6.

1.12.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Φτιάχνω τη συσκευή όπου θα τρέξει το πήκτημα. Φροντίζω ώστε το χτένι να απέχει από τον πυθμένα απόσταση όσο μία αντικειμενοφόρο (1 mm). Επίσης η διάταξη θα πρέπει να είναι τελείως επίπεδη και αυτό το καθορίζω με τη χρήση αλφαδιού.

- Ζυγίζω την ποσότητα της αγαρόζης σε μεγάλη κωνική φιάλη. Φροντίζω ώστε το πάχος του πηκτώματος να είναι περίπου 0.5 cm και γι' αυτό φτιάχνω τον κατάλληλο όγκο διαλύματος. Για τη συγκεκριμένη συσκευή χρειαζόμαστε 100 ml αγαρόζης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο διάλυμα ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που μας ενδιαφέρει να διαχωρίσουμε. Ισχύει ότι:

για base pairs < 500 bp χρειαζόμαστε 1.5 – 2% αγαρόζη

για 500 bp έως 3 - 4 Kb χρειαζόμαστε 1% αγαρόζη

για 4 Kb χρειαζόμαστε 0.7% αγαρόζη

Η αγαρόζη διαλύεται σε 0.5X TBE

- Το διάλυμα της αγαρόζης θερμαίνεται είτε σε φούρνο μικροκυμάτων είτε σε πλάκα ώστε να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη. Πριν την θέρμανση σημαίνεται η στάθμη της αγαρόζης. Εάν μετά τη θέρμανση παρατηρηθεί πτώση της στάθμης της αγαρόζης

τότε προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος απεσταγμένου νερού. Για να χυθεί η αγαρόζη στη συσκευή πρέπει να κρυώσει στους 60- 65 °C. Μόλις γίνει αυτό, το διάλυμα χύνεται στη συσκευή και αφήνεται να στερεοποιηθεί για αρκετό χρόνο.

- Απομακρύνεται το χτένι και η συσκευή τοποθετείται στο χώρο της ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα 0.5X TBE διαλύματος ώστε να καλύπτει το πήκτωμα πλήρως και σε βάθος περίπου 2 mm και όχι βαθύτερα.

- Προστίθενται τα δείγματα με προσοχή. Στη συγκεκριμένη συσκευή προστίθενται 10 λ δείγματος. Η προσθήκη γίνεται με αυτόματη πιπέτα και προσέχουμε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες μέσα στα πηγαδάκια των δειγμάτων.

- Γίνεται η σύνδεση με την πηγή ώστε το δείγμα να κινηθεί από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+).

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V (με ένταση 60-70 A). Για μικρές συσκευές κρατάει περίπου 2 ώρες.

- Σταματάει η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος και το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (ΠΡΟΣΟΧΗ !!!!) όπου ανακινείται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Η παρατήρηση γίνεται με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

2. ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ ΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΔΕΚΑΕΤΙΑ

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο: μελετήσαμε την επίπτωση του μελανώματος στην κεντρική Ελλάδα, ειδικά στη νομαρχία Λάρισας από τον Ιανουάριο του 1988 μέχρι Δεκέμβριο του 1998.

Ο στόχος: ο στόχος της μελέτης ήταν η έρευνα της επιδημιολογίας του μελανώματος στην περιοχή μας.

Οι μέθοδοι: τα στοιχεία συλλέχθηκαν από το γενικό νοσοκομείο Larissa, από όλους τους Δερματολόγους - Αφροδισιολόγους, τους πλαστικούς και γενικούς χειρουργούς, τους ογκολόγους και τους παθολόγους. Εκείνη την περίοδο το περιφερειακό γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας δεν υπήρχε.

Από τον Ιανουάριο του 1988 μέχρι τον Δεκέμβριο του 1998 ανευρέθησαν 71 περιπτώσεις κακοήθους μελανώματος, από τις οποίες 41 ήταν θήλειες και 30 άρρενες ασθενείς. Η επίπτωση από 1,36 σε 100.000 κατοίκους στο πρώτο έτος της μελέτης (1988), ενώ έφθασε στο ποσοστό του 5.2/100.000 κατοίκους στον τελευταίο χρόνο της μελέτης (1998). Οι τύποι δέρματος των ασθενών ήταν (κατά Fitzpatrick) τύπος I 2,8%, τύπος II 52,1%, τύπος III 45,1%. Η ηλικία των ασθενών όταν εντοπίστηκε το μελάνωμα ήταν 24% στην 6η δεκαετία έναντι 26.8% στην 7η δεκαετία. Οι αγρότες ήταν 56.3%. Κακοήθη μελάνωματα συχνότερα βρέθηκαν στο κεφάλι και το λαιμό 36,6%, στα άκρα 30,98% και στο κορμό 11.3%. 78% των περιπτώσεων όταν εντοπίστηκαν ήταν Clark επίπεδο III και IV. Αντίθετα σε κατά Clark επίπεδο I και II ήταν μόνο 22% των ασθενών. Τα επιφανειακώς επεκτεινόμενα μελάνωματα βρέθηκαν σε 44% και τα οζώδη κακοήθη μελάνωματα σε 20% των ασθενών.

Συμπεράσματα: Υπήρξε μια γρήγορη αύξηση στην επίπτωση του κακοήθους μελανώματος στον πληθυσμό της περιοχής μας ειδικά τα τελευταία τρία χρόνια.

Βασικές λέξεις: επίπτωση, κακοήθες μελάνωμα, Ελλάδα

2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κακοήθες μελάνωμα είναι ένας επιθετικός όγκος με τη δυνατότητα να δημιουργεί μεταστάσεις. Αυτός ο καρκίνος έχει παρουσιάσει γρηγορότερη αύξηση στην επίπτωση μεταξύ του λευκού πληθυσμού στις τελευταίες δεκαετίες⁵⁸. Χώρες της Νότιας Ευρώπης παρουσίασαν σημαντικές αυξήσεις των ποσοστών τους κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών⁵⁹.

Στην Ευρώπη η οφειλόμενη σε κακοήθες μελάνωμα θνησιμότητα αντιπροσωπεύει 5.000 θανάτους ετησίως. Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου φαίνεται να είναι η έκθεση στον ήλιο, η οποία είναι η αιτία της μετάλλαξης, στο κρίσιμο γονίδιο καταστολής δημιουργίας του όγκου^{59,60}.

Η UV ακτινοβολία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη δημιουργία καταρράκτη και συμβάλλει στο σχηματισμό των βασικοκυτταρικών επιθυλιωμάτων, των ακανθοκυτταρικών επιθυλιωμάτων και των μελανωμάτων^{61,62,63}.

Η σωρευτική ηλιακή UV έκθεση θεωρείται σοβαρός παράγοντας κινδύνου και η έκθεση στην πολύ νέα ηλικία είναι καταστρεπτικότερη από την έκθεση στους ενήλικες. Οι αλλαγές⁶² του τρόπου ζωής όπως η παρατεταμένη υπαίθρια αναψυχή από το τέλος του τελευταίου αιώνα, το ηλιακό έγκαυμα, η εκτενής έκθεση στον ήλιο στην παιδική ηλικία και η εντατική διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο για απόκτηση σκουρόχρωμου δέρματος είναι επίσης σοβαροί παράγοντες κινδύνου για το μελάνωμα^{58,60}.

Τα ηλιακά εγκαύματα προκαλούνται κυρίως από την UVB ακτινοβολία (280-320 nm)⁶⁵. Η UVB είναι περίπου 1000 φορές αποτελεσματικότερη από την UVA ακτινοβολία (320-400 nm) στην πρόκληση του ηλιακού εγκαύματος, αλλά απ'την άλλη πλευρά η UVA ακτινοβολία είναι αποτελεσματική στην πρόκληση γρηγορότερου σκουρόχρωμου δέρματος⁶⁴.

Κατά τη διάρκεια των πρόσφατων δεκαετιών, το πάχος του στρώματος όζοντος στο βόρειο ημισφαίριο έχει μειωθεί από 10 έως 40% κατά τη διάρκεια των μηνών του χειμώνα και της άνοιξης⁶³. Έτσι, κατ' εκτίμηση μείωση 10% στο στρώμα του όζοντος προκαλεί αύξηση 20% στην UV-ακτινοβολία και μετέπειτα αύξηση 40% στους καρκίνους του δέρματος⁶³.

Το στρώμα όζοντος κυρίως απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία των μικρών κύματος κάτω από 290 nm. Οι μειώσεις των στρατοσφαιρικών επιπέδων όζοντος είναι πιθανό να οδηγήσουν σε αυξανόμενη UVB ακτινοβολία στην επιφάνεια της γης⁶⁵.

Υπολογίζεται ότι περίπου 19%- 50% του ηλιακού UVA μπορούν να φθάσουν στο βάθος των μελανοκυττάρων. Αντίθετα περίπου 9% - 14% της ηλιακής UVB ακτινοβολίας φθάνουν στα μελανοκύτταρα. Αυτή η ιδιότητα της UVA ακτινοβολίας επιτρέπει σε αυτή για να περάσει μέσω των παραθύρων⁶⁴. Έχει αποδειχθεί ότι η UVA ακτινοβολία προκαλεί μεταλλάξεις στα μαστοκύτταρα. Η ζημία στο DNA του ανθρωπίνου δέρματος μπορεί να προκληθεί όχι μόνο από τη UVB αλλά και από την UVA ακτινοβολία⁶⁴.

2.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εκθέτουμε μια αναδρομική μελέτη που περιλαμβάνει 71 ασθενείς που έπασχαν από ιστολογικά επιβεβαιωμένο μελάνωμα. Ο στόχος ήταν να αξιολογηθεί η επίπτωση του μελανώματος στην κεντρική Ελλάδα, ειδικά στο νομό Λάρισας μια σε μεγάλη έκταση γεωργική περιοχή, από τον Ιανουάριο του 1988 μέχρι τον Δεκέμβριο του 1998. Οι επιδημιολογικές παράμετροι που συνεκτιμήθηκαν ήταν η αναλογία και στα δύο φύλα, η ηλικία, το επάγγελμα, ο τύπος δέρματος σύμφωνα με τη κατά Fitzpatrick κατάταξη, ο τύπος και η εντόπιση του μελανώματος, η ύπαρξη και η περιοχή εντόπισης των μεταστάσεων όταν διαγνώστηκαν και η προηγούμενη έκθεση στον ήλιο.

Συλλέξαμε τα στοιχεία το γενικό νοσοκομείο Λάρισας, από όλους τους ιδιώτες Δερματολόγους-Αφροδισιολόγους, τους πλαστικούς και γενικούς χειρουργούς, τους ογκολόγους και τους παθολόγους. Εκείνη την περίοδο το γενικό πανεπιστημιακό νοσοκομείο Λάρισας δεν υπήρχε. Υποβάλαμε όλους τους ασθενείς ή τους συγγενείς τους στο ίδιο ερωτηματολόγιο σύμφωνα με σχηματισθέν πρωτόκολλο.

2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια της δεκαετούς περιόδου από τον Ιανουάριο του 1988 μέχρι τον Δεκέμβριο του 1998 αναλύσαμε 71 περιπτώσεις του κακοήθους μελανώματος, 41 ήταν θήλεις και άρρενες 30 (σχέδιο 1). Η επίπτωση στο πρώτο έτος της μελέτης (1988) ήταν 1,36/100.000 πληθυσμού. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών υπήρξε μια γεωμετρική αύξηση στην επίπτωση του κακοήθους μελανώματος που φθάνει στο ύψος του 5,2/100.000 πληθυσμού στον τελευταίο χρόνο της μελέτης (1998), (σχέδιο 2).

Στο σύνολο των ασθενών μας 42,25% ήταν άρρενες (30/71) και το (41/71) θήλεις, 57,75% είχαν το μελάνωμα ή τη μετάσταση του κακοήθους μελανώματος. Ο τύπος δερμάτων τους κατά Fitzpatrick ήταν τύπος I σε ποσοστό 2,8%, 52,1% τύπος II ενώ III ήταν 45,1% (σχέδιο 3). Ο μέσος όρος της ηλικίας ήταν 61,9 έτη στους 71 ασθενείς, 61,4 έτη στους θήλεις ασθενείς και 62,5 έτη στους άρρενες ασθενείς. Οι ασθενείς σε ποσοστό 24% ήταν στην 6η δεκαετία έναντι 26.8% στην 7η δεκαετία.

Όσον αφορά τα επαγγέλματα των ασθενών, οι αγρότες ήταν 56,34% (40/71), οι κτηνοτρόφοι ήταν 7,04% (5/71), θήλεις απασχολούμενες στην οικία τους 14,08% (10/71), εργάτες 9,86% (7/71), υπάλληλοι 5,63% (4/71), οδηγοί 1,41% (1/71), παίκτες ποδοσφαίρου 1,41% (1/71), ελαιοχρωματιστές 1,41% (1/71), υδραυλικοί 1,41% (1/71), έμποροι 1,41% (1/71), (σχέδιο 4). Από αυτούς τους ασθενείς 67,61% (48/71) είχαν υποστεί σημαντική έκθεση στον ήλιο κατά τη διάρκεια της εργασίας τους. Όλοι σχεδόν οι ασθενείς, ποσοστό 91,55% (65/71) ανέφεραν αυξημένη έκθεση στον ήλιο

κατά την παιδική τους ηλικία και ποσοστό 90% (64/71) ανέφερε περιστασιακή και ανεπαρκής αντιηλιακή προστασία. Ένδεκα ασθενείς (15,48%) ανέφεραν εντατική διαλείπουσα ηλιοθεραπεία.

Τα κακοήθη μελανώματα συχνότερα βρέθηκαν στο κεφάλι και το λαιμό 36,6%, στα άκρα 30,98% και στον κορμό σε ποσοστό 11,3%. 78% των περιπτώσεων όταν εντοπίστηκαν ήταν clark επίπεδο III, IV, ενώ 22% ήταν Clark επίπεδο I και II.

Τα επιφανειακά επεκτεινόμενα μελανώματα βρέθηκαν σε 44% και τα οζώδη κακοήθη μελανώματα σε 20% των ασθενών. 2,8% είχαν οφθαλμικό μελάνωμα χοριοειδούς, 2,8% αμελανωτικό μελάνωμα και μελάνωμα της θηλυκής ουρήθρας (σχέδιο 5).

Δυστυχώς 21% των ασθενών ήρθε με εξελιγμένο με μεταστάσεις κακοήθες μελάνωμα στην πρώτη διάγνωση. Οι περισσότερες από τις μεταστάσεις που παρουσιάστηκαν στους ασθενείς βρέθηκαν στους περιοχικούς λεμφαδένες, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο.

Όσον αφορά την ιστολογική εκτίμηση, οι άρρενες είχαν λεπτότερα κακοήθη μελανώματα από τους θήλεις, ενώ το ποσοστό των παχιών μελανωμάτων (> 3mm) ήταν σχετικά υψηλό και στα δύο φύλα.

Όπως προαναφέρθηκε ποσοστό 90% (64/71) περιστασιακά χρησιμοποίησε αντιηλιακά και εάν χρησιμοποίησαν, ήταν με έναν λανθασμένο τρόπο διότι εφάρμοσαν λιγότερο αντιηλιακό από το συνιστώμενο ποσό που είναι 2mg/cm² ανανεούμενο συχνά.

Εντατική διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο υπήρξε σε ποσοστό 15,49% των ασθενών (11/71). Από αυτούς τους ασθενείς τρεις ήταν αγρότες και ένας κτηνοτρόφος, δύο από αυτούς είχαν τύπο δέρματος II (αγρότες) και δύο είχαν τον τύπο III δέρματος κατά Fitzpatrick (ένας κτηνοτρόφος και ένας αγρότης). Από τους άλλους

επτά ασθενείς, που δεν ήταν αγρότες ή κτηνοτρόφοι, μια γυναίκα ήταν απασχολούμενη στην οικία της και είχε τύπο I δέρματος, δύο γυναίκες απασχολούμενες στην οικία τους και ένας εργάτης είχαν τύπο II δέρματος, ένας παίκτης ποδοσφαίρου, ένας εργάτης και ένας υπάλληλος είχαν τύπο III δέρματος κατά Fitzpatrick.

Από τους ασθενείς ποσοστό 14,08% (10/71), έλαβε χημειοθεραπεία ή χημειοθεραπεία και την ιντερφερόνη άλφα ή μόνο ιντερφερόνη-άλφα. Αυτοί ήταν ασθενείς με μεταστάσεις ή παχιά μελανώματα.

Τον Δεκέμβριο του 1998 (στο τέλος της μελέτης) 25% των ασθενών ήταν νεκροί.

2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Υπήρξε μια γρήγορη αύξηση στην επίπτωση του κακοήθους μελανώματος στον πληθυσμό της περιοχής μας, ειδικά τα τελευταία τρία χρόνια. 67,61% (48/71) εκτέθηκαν στον ήλιο κατά τη διάρκεια της εργασίας τους και οι περισσότεροι από αυτούς (56,34%, συγκεκριμένα οι 40/71) ήταν αγρότες. Δυστυχώς οι περισσότεροι από τους ασθενείς εντοπίστηκαν με Clark επίπεδο III, IV, ή με μεταστάσεις. Επί το πλείστον οι ασθενείς ήταν θήλειες. Το συχνότερο κακοήθες μελάνωμα ήταν επιφανειακό μελάνωμα διάδοσης ssm (επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα) superficial spreading melanoma και ο συχνότερος τύπος δέρματος ήταν II κατά Fitzpatrick.

2.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μελάνωμα έχει παρουσιάσει γρηγορότερη αύξηση στην επίπτωσή του στους περισσότερους λευκούς πληθυσμούς⁵⁸. Θα μπορούσε να είναι ένα αποτέλεσμα της πύο ενεργού αναψυχής σε περιοχές με μεγάλη ηλιοφάνεια από το τέλος του 19ου αιώνα. Στις πρώτες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα η συχνότητα ήταν υψηλότερη για τους άρρενες,

αλλά αργότερα έγινε υψηλότερη για τους θήλεις ⁵⁸. Αυτό αποδείχθηκε και στη δική μας μελέτη.

Στη μελέτη μας 21% των ασθενών ήρθε με εξελιγμένο με μεταστάσεις κακοήθες μελάνωμα στην πρώτη διάγνωση. 78% όταν εντοπίστηκε το μελάνωμα ήταν Clark επίπεδο III και IV. Στο τέλος της μελέτης (Δεκέμβριος 1998) 25% των ασθενών ήταν νεκροί. Η δυνατότητα να εξελιχθεί με μεταστάσεις και η υψηλή θνησιμότητα αυτού του καρκίνου υπογραμμίζουν τη σημασία της έγκαιρης διάγνωσης. Η έγκαιρη διάγνωση και η κατάλληλη θεραπεία μπορούν να παρατείνουν το προσδόκιμο επιβίωσης αυτών των ασθενών ⁵⁸.

Υπολογίζεται ότι 50% -80% της ζημίας του δέρματος από τον ήλιο κατά τη διάρκεια της ζωής του προκαλείται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας. Κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων η έντονη, διαλείπουσα έκθεση στον ήλιο που προκαλεί το ηλιακό έγκαυμα αυξάνει την επίπτωση του κακοήθους μελανώματος ⁶⁷.

Ηλιοθεραπεία και υπαίθρια αναψυχή έλαβε χώρα σε όλους τους ασθενείς μας κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, της εφηβείας και της ενηλικίωσής τους, στον ελεύθερο χρόνο τους, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Μεταξύ Ελλήνων αυτό είναι μια συνήθεια που δεν έχει αλλάξει για δεκαετίες.

Οι προηγούμενες μελέτες έχουν προσδιορίσει την ανεπαρκή προστασία από τον ήλιο των παιδιών κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Τα παιδιά και οι ενήλικοι εφαρμόζουν συχνά λιγότερο αντιηλιακό από το συνιστώμενο ποσό 2mg/cm² δέρματος και όχι όσο συχνά πρέπει. Η συχνότερη περιοχή της εφαρμογής του αντιηλιακού είναι το πρόσωπο, ενώ περιορισμένη εφαρμογή γίνεται στο σώμα ⁶⁷ όπου οι αποτελεσματικές πρακτικές προστασίας από τον ήλιο θα μπορούσαν να βοηθήσουν να μειωθεί ο αριθμός των ηλιακών εγκαυμάτων ⁶⁷.

Στη μελέτη μας όλοι οι ασθενείς είχαν ανεπαρκή προστασία από τον ήλιο.

Εκσεσημασμένο μαύρισμα από τον ήλιο μέσω της υπερβολικής ηλιακής έκθεσης, έχει καθοριστεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του μελανώματος⁶⁴. Τα ηλιακά εγκαύματα προκαλούνται κυρίως από την UVB ακτινοβολία (280-320 nm), η οποία απορροφάται έντονα από το κυτταρικό DNA, το οποίο οδηγεί σε χρωμοσωμική ανωμαλία και εμπλέκεται ως πιθανός συμβάλλον παράγοντας στην παθογένεση του μελανώματος^{64, 66}. Υπολογίζεται ότι 90-95% της ηλιακής UV ακτινοβολίας που φθάνει στην επιφάνεια της γης είναι UVA, και μόνο 5-10% από αυτήν είναι UVB⁶⁴. Η UVB ακτινοβολία εμποδίζεται να εισέλθει από το γυαλί των παραθύρων⁶⁶ ενώ αντίθετα η ακτινοβολία UVA περνά μέσω των παραθύρων. Η ακτινοβολία UVA προκαλεί άμεσο και επίμονο μαύρισμα δέρματος και είναι 1000 φορές λιγότερο ισχυρή από την ακτινοβολία UVB στην πρόκληση του ηλιακού εγκαύματος (WANG). Η ακτινοβολία UVA προκαλεί το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου που οδηγούν στη συνέχεια στη θραύση –σκελών DNA, την πυρηνική ζημία βάσεων, και τις μεταλλάξεις. Ο ρόλος της UVA ακτινοβολίας στην πρόκληση του μελανώματος είναι αμφισβητούμενος⁶⁴.

Στη μελέτη μας 67,61% (48/71) των ασθενών εκτέθηκε στον ήλιο κατά τη διάρκεια της εργασίας τους. Ανάμεσά τους οι αγρότες ήταν 56,34% (40/71), ενώ οι κτηνοτρόφοι ήταν 7,04% (5/71).

Η εντατική διαλείπουσα ηλιοθεραπεία, μια νέα σχετικά συνήθεια πραγματοποιήθηκε κατά 15,49% των ασθενών (11/71). Από αυτούς τους ασθενείς τρεις ήταν αγρότες και ένας κτηνοτρόφος, δύο από αυτούς είχαν τύπο δέρματος II κατά Fitzpatrick (αγρότες) και δύο με τον τύπο III δέρματος (ένας κτηνοτρόφος και ένας αγρότης). Από τους άλλους επτά ασθενείς, που δεν ήταν αγρότες ή κτηνοτρόφοι, μια γυναίκα απασχολούμενη στην οικία της είχε τύπο I δέρματος, δύο γυναίκες

απασχολούμενες στην οικία τους και ένας εργάτης είχαν τον τύπο II δέρματος, ένας παίκτης ποδοσφαίρου, ένας εργάτης και ένας υπάλληλος είχαν τον τύπο III δέρματος.

Στη μελέτη μας υπήρξε μια γρήγορη αύξηση της επίπτωσης του μελανώματος. Στο πρώτο έτος της μελέτης (1988) ήταν 1,36/100.000 πλυθησμού. Κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών υπήρξε μια γεωμετρική αύξηση στην επίπτωση του κακοήθους μελανώματος που έφθασε στο ποσοστό του 5,2/100.000 πλυθησμού στον τελευταίο χρόνο της μελέτης (1998). Μέσω της εργασίας τους 67,61% (48/71) εκτέθηκε στον ήλιο. Δεν τους προστάτευαν υπόστεγα από τον ήλιο, εκτός από ένα καπέλο, όπως γίνεται για δεκαετίες στην περιοχή μας.

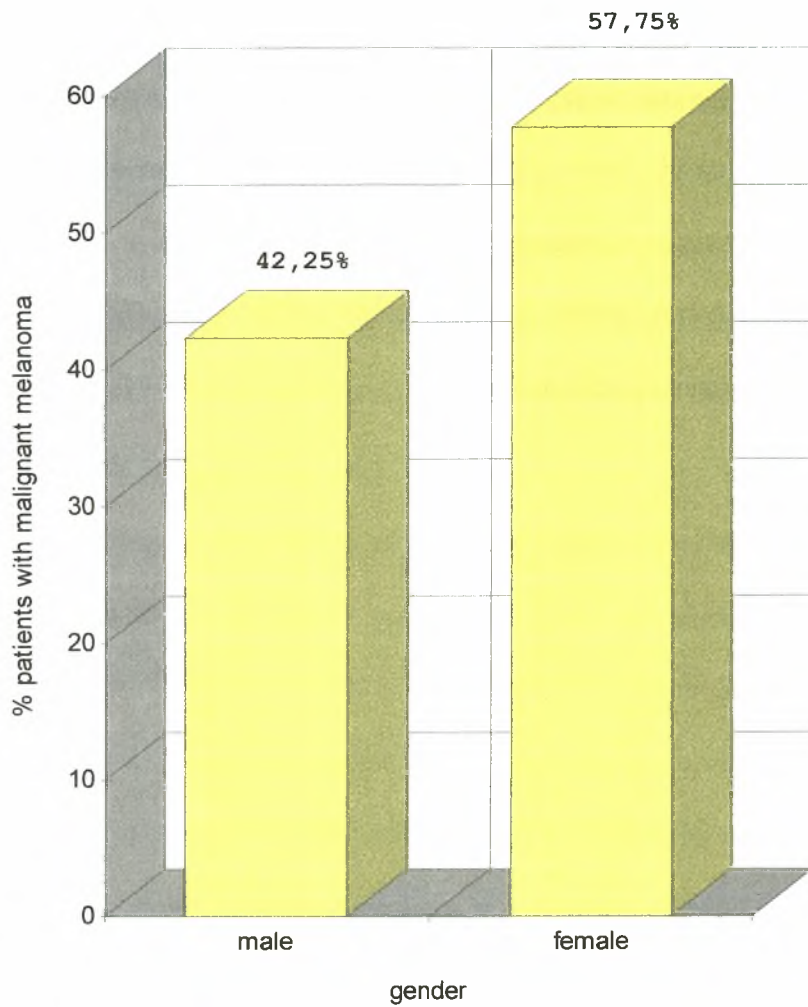
Κατά τη διάρκεια της μελέτης μας από τη δεκαετία από το 1988 ως το 1998 υπήρξε μείωση όζοντος στο βόρειο ημισφαίριο. Κατά τη διάρκεια του 1979-97 οι δορυφορικές μετρήσεις έδειξαν ότι η μείωση όζοντος της στρατόσφαιρας στο βόρειο ημισφαίριο την άνοιξη ήταν χειρότερη κυρίως πάνω από την Ευρώπη και τη Ρωσία ⁶⁸.

Άλλες παράμετροι από το όζον μπορούν να έχουν επιπτώσεις στην εισερχόμενη ηλιακή UV ακτινοβολία εμφανώς, ειδικά, τα σύννεφα και albedo επιφάνειες. Οι UV δόσεις είναι οι υψηλότερες τις ασυνέφιαστες ημέρες. Τα σύννεφα μπορούν να ενισχύσουν τις UV εκλάμψεις για έναν ορισμένο χρόνο, λόγω της αντανάκλασης της ηλιακής ακτινοβολίας στα σύννεφα ⁶⁹.

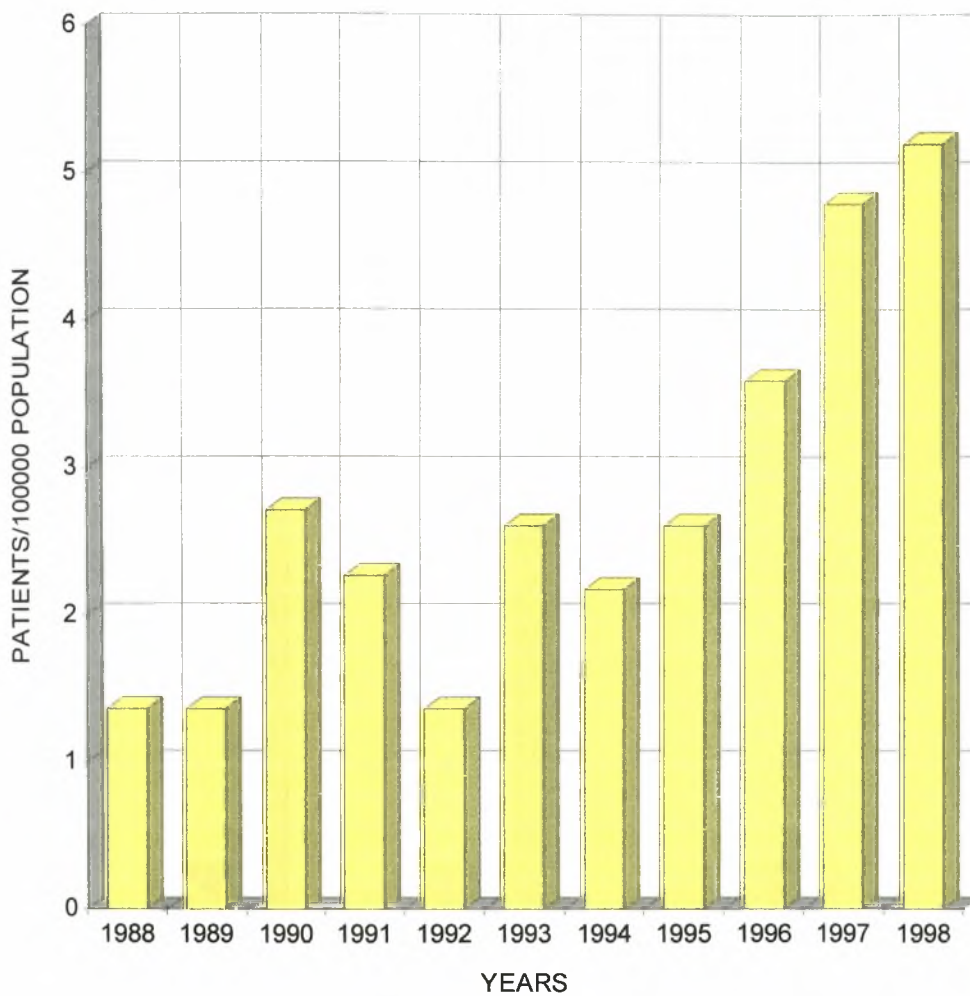
Σύμφωνα με μελέτες του Reuder και συνεργατών ⁶⁹ τα μελλοντικά σενάρια για τη μείωση του όζοντος έδειξαν ότι η τάση που παρατηρείται από το 1970 ως το 1990 δεν θα συνεχίζει στην ίδια ένταση στην κεντρική Ευρώπη. Η μείωση όζοντος κάλυψε μεγάλη περιοχή της κεντρικής Ευρώπης συνεπεία των εκρήξεων Pinatubo και του El Chino. Εξάλλου, η επέκταση της στρατοσφαιρικής μείωσης όζοντος μπορεί να αλλάξει προς τη θετική κατεύθυνση συνεπεία των μειωμένων ανθρωπογενών εκπομπών λόγω των συμφωνιών ⁶⁹.

Στη μελέτη που πραγματοποιήσαμε στην περιοχή μας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε μια γεωμετρική αύξηση στην επίπτωση του κακοήθους μελανώματος. Πολύ υψηλό ποσοστό των ασθενών εκτέθηκε στον ήλιο κατά τη διάρκεια της εργασίας τους, και δεν τους προστάτευαν υπόστεγα από τον ήλιο εκτός από από ένα καπέλο, όπως γίνεται για δεκαετίες στην περιοχή μας. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου υπήρξε σημαντική μείωση του όζοντος στο βόρειο ημισφαίριο.

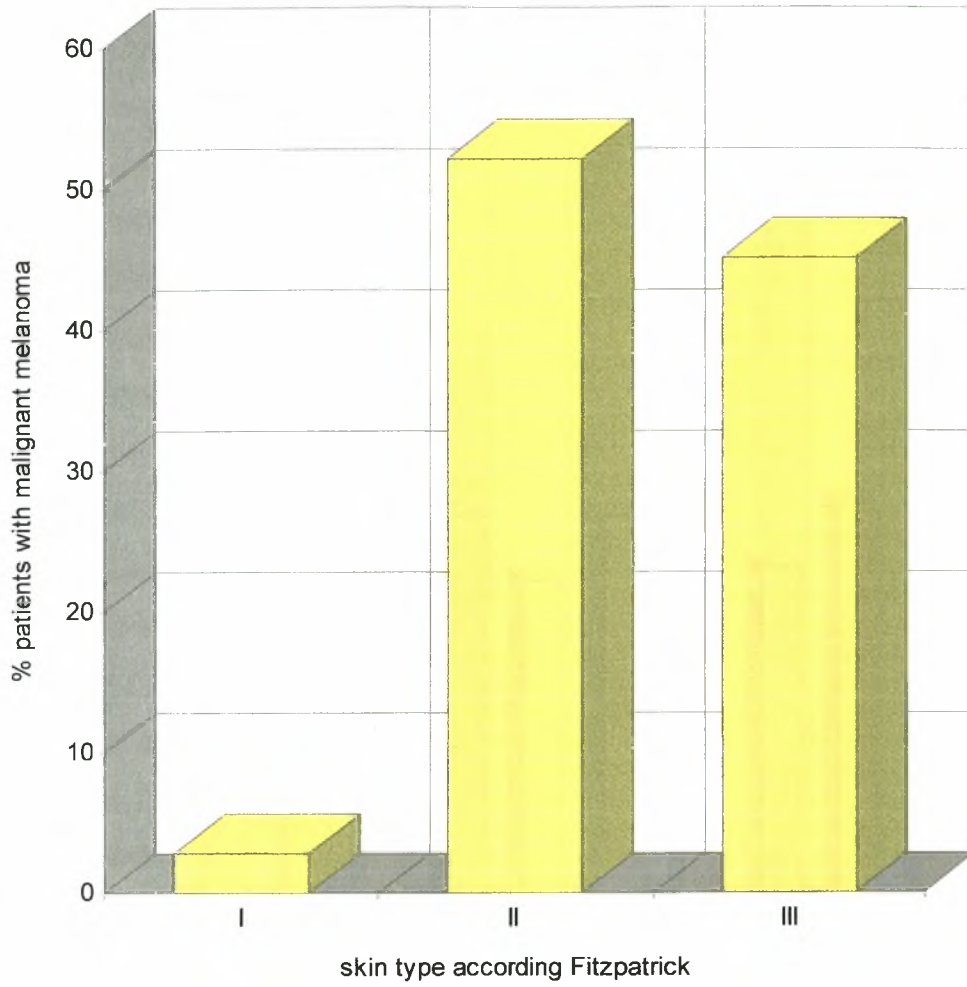
Από τα συμπεράσματά μας, φαίνεται ότι η μείωση όζοντος συνέβαλε στην αύξηση της επίπτωσης μελανώματος στην περιοχή μας.



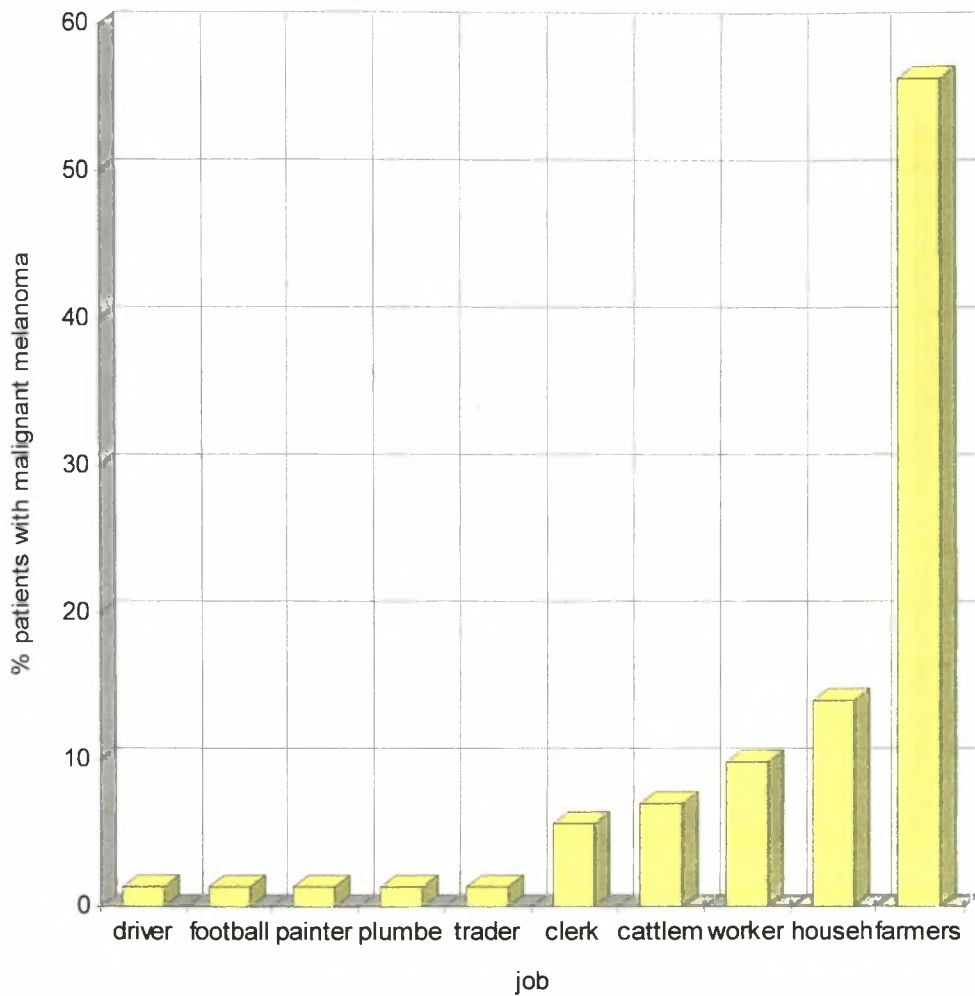
Σχέδιο 1. Φύλο και κακοήγη μελανώματα του Ν. Λάρισας κατά τα έτη 1988-1998, n=71 ασθενείς, male: άρρενες, female: θήλειες



Σχέδιο 2. Επίπτωση του κακοήθους μελανώματος στο Νομό Λάρισας κατά τα έτη 1988-1998 του κακοήθους μελανώματος, n=71 ασθενείς

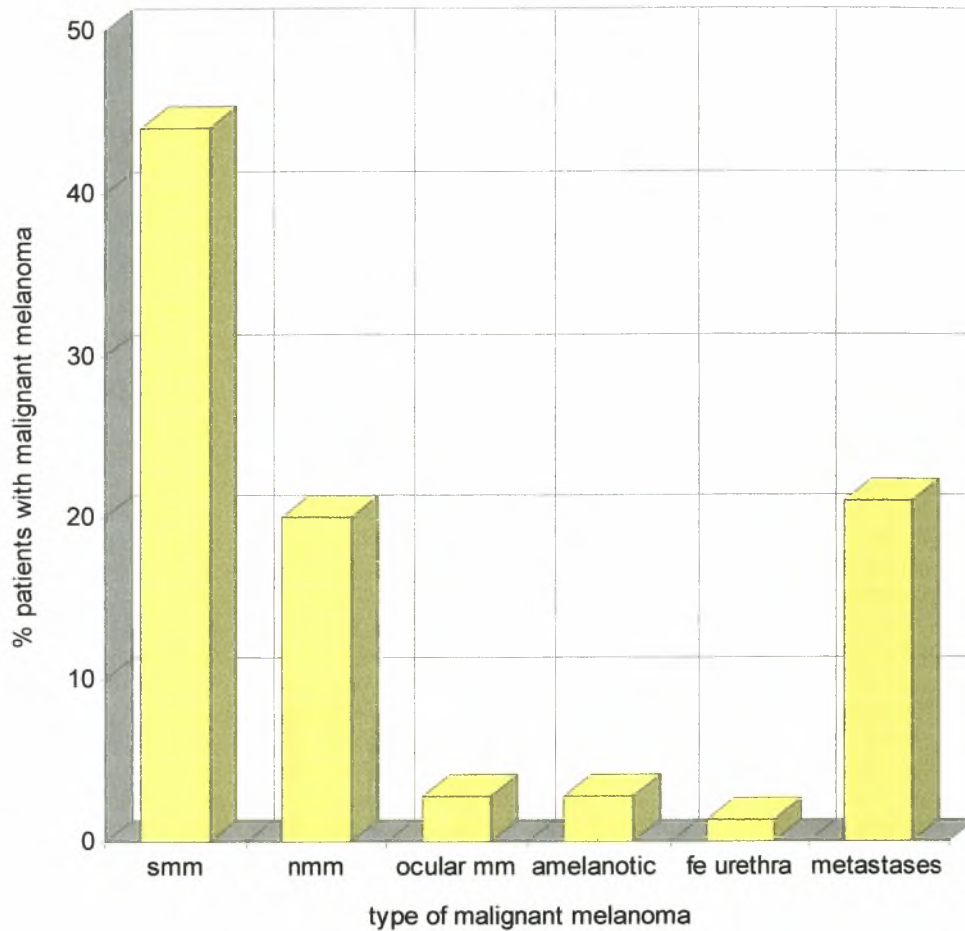


Σχέδιο 3. Τύπος δέρματος των ασθενών της μελέτης κατά Fitzpatrick, n=71 ασθενείς



Σχέδιο 4. Εργασία και κακοήθες μελάνωμα, n=71 ασθενείς.

Driver: οδηγός, football: παίκτης ποδοσφαίρου, painter: ελαιοχρωματιστής, plumbe: υδραυλικός, trader: έμπορος, clerk: υπάλληλος, cattlem: κτηνοτρόφος, house: απασχολούμενος σε οικία, farmers: αγρότες



Σχέδιο 5. Τύπος του κακοήθους μελανώματος, n=71 ασθενείς.

smm: επιφανειακώς επεκτεινόμενο κακοήθες μελάνωμα, nmm: οζώδες κακοήθες μελάνωμα, ocular mm: οφθαλμικό κακοήθες μελάνωμα, amelanotic: αμελανωτικό κακοήθες μελάνωμα, fe urethra: θηλυκή ουρήθρα, metastases: μεταστάσεις του κακοήθους μελανώματος

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΒΙΟΨΙΩΝ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΥΠΟΒΑΘΡΟ: Η έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη (UV) ακτινοβολία είναι πιθανώς η αρχική περιβαλλοντική αιτία της πρόκλησης μελανώματος για τα δύο τρίτα αυτού του όγκου. Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPVs) μελετώνται για να συνδεθούν πιθανώς με τους πολυάριθμους κακοήθεις όγκους του δέρματος συμπεριλαμβανομένων και των καρκινωμάτων δέρματος εκτός μελανώματος. Ο ρόλος της μόλυνσης από HPV στην ανάπτυξη μελανώματος είναι υπό διερεύνηση.

ΣΤΟΧΟΙ: Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογηθούν τα δείγματα βιοψιών μελανώματος του ελληνικού πληθυσμού για την παρουσία του DNA του HPV και να καθοριστεί η πιθανή σχέση μεταξύ της μόλυνσης HPV, της κατανάλωσης τσιγάρων, της έκθεσης στον ήλιο και της κλινικής έκβασης των ασθενών πασχόντων από μελάνωμα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Τα είκοσι εννιά δείγματα βιοψιών μελανώματος, 20 από πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα και 9 από μετάσταση κακοήθους μελανώματος λήφθηκαν από 29 ασθενείς. Τα δείγματα βιοψιών βρίσκονταν διατηρημένα-μονιμοποιημένα σε block παραφίνης. Η ομάδα ελέγχου αποτελείτο από τρεις συνδεσμικούς σπυλοκυτταρικούς σπύλους, που επιβεβαιώθηκαν ιστολογικά, από τρεις ασθενείς και τρεις βιοψίες από φυσιολογικό δέρμα που λήφθηκαν από τρία κατά τ'άλλα υγιή άτομα. Η παρουσία και οι τύποι των DNA HPV αξιολογήθηκαν από την ενίσχυση ενός τεμαχίου της L1 περιοχής από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - polymerase chain reaction (pcr) που συνδυάστηκε με την ανάλυση περιορισμού μήκους τεμαχίων (RFLP). Σε κάθε δείγμα βιοψιών που αξιολογήθηκε, HPV 6, HPV 11, HPV 16 και HPV 18 θετικοί μάρτυρες ελέγχου συμπεριλήφθηκαν στην pcr. Τα επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενών συμπεριλαμβανομένης της κατανάλωσης τσιγάρου, του επαγγέλματος και της προηγούμενης μόλυνσης με HPV καταγράφηκαν επίσης.

ΟΔΗΓΟΙ: Πέντε από 29 (17.20%) δείγματα μελανώματος βιοψιών ήταν θετικά για το DNA HPV. Αντιθέτως, HPV δεν ανιχνεύθηκε σε οποιαδήποτε από τα δείγματα βιοψιών της ομάδας ελέγχου (0/6). HPV προερχόμενος από ιό τύπος 16 βρέθηκε σε δύο δείγματα και HPV 6 DNA σε τρία. Τα αποτελέσματά μας, σχετικά με την πιθανή σχέση μεταξύ του μελανώματος και του DNA HPV, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p>0.05$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα συμπεράσματά μας προτείνουν ότι η UV ηλιακή έκθεση παραμένει η κύρια αιτία του μελανώματος στην περιοχή μας και φαίνεται ότι το κάπνισμα συμβάλλει στη φτωχότερη έκβαση των ασθενών που πάσχουν από μελάνωμα. Ο ρόλος της δερματικής μόλυνσης HPV στην παθογένεση του μελανώματος παραμένει αόριστος.

Βασικές λέξεις: HPV, κάπνισμα, UV-έκθεση, μελάνωμα.

3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυξανόμενη επίπτωση του μελανώματος στο γενικό πληθυσμό κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει προκαλέσει πολλή ερευνητική εργασία, στοχεύοντας να προσδιορίσει την πιθανή σχέση μεταξύ των παλαιών και νέων αιτιολογικών παραγόντων που περιλαμβάνονται στην παθογένεση αυτού του όγκου.

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία, ο συνολικός αριθμός νεύι, το σύνδρομο δυσπλαστικών σπίλων, ο τύπος δερμάτων (ανοικτό χρώμα, κυρίως τύπου I και II και λιγότερο III κατά Fitzpatrick) και η κληρονομική προδιάθεση έχουν προσδιοριστεί ως παράγοντας κινδύνου για προκλήση του κακοήθους μελανώματος.

Η συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης του δέρματος με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων papillomavirus (HPV) και του καρκίνου του δέρματος εκτός μελανώματος επί ηλιοεκτεθειμένων περιοχών δέρματος προσδιορίστηκε αρχικά στους ασθενείς με μυρμηκιοειδή επιδερμοδυσπλασία των Lewandowsky και Lutz και αργότερα στους ασθενείς παραλήπτες οργάνων από μεταμόσχευση. Ο ρόλος της μόλυνσης HPV στην καρκινογένεση δερμάτων ως συμβάλλον παράγοντας σε συνδυασμό με την ηλιακή UV έκθεση, κατανάλωση τσιγάρων και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος υποστηρίζεται στη λογοτεχνία^{71, 72}.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να καθοριστεί η παρουσία του DNA HPV στα δείγματα βιοψιών μελανώματος και να αξιολογηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της μόλυνσης HPV, της κατανάλωσης καπνου, της ηλιακής έκθεσης UV και της κλινικής έκβασης αυτών των ασθενών. Το μελάνωμα και το κακοήθες μελάνωμα είναι τώρα χρησιμοποιημένα συνώνυμα. Σε αυτήν την μελέτη χρησιμοποιούμε τον όρο μελάνωμα.

3.3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 ΥΛΙΚΟ ΒΙΟΨΙΩΝ

Τριάντα τέσσερις μονιμοποιημένες σε παραφίνη βιοψίες επιλέχθηκαν από 34 άτομα. Είκοσι δείγματα ήταν από 20 ασθενείς με πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα, 9 δείγματα από ασθενείς με μεταστάσεις μελανώματος και 6 ήταν δείγματα δέρματος υγιούς (ομάδα ελέγχου). Η ομάδα ελέγχου αποτελείτο από τρεις συνδεσμικούς μελανοκυτταρικούς σπίλους και τρεις punch-βιοψίες από κανονικό δέρμα που επιλέχθηκαν από τρία κατά τ'άλλα υγιή άτομα. Η κλινική διάγνωση επιβεβαιώθηκε εν πάση περιπτώσει από την ιστολογική εξέταση των μελανωμάτων που αφαιρέθηκαν, των σπιλοκυτταρικών σπίλων, και των βιοψιών του κανονικού δέρματος.

Οι όγκοι μελανώματος αφαιρέθηκαν με χειρουργική μέθοδο και λήφθηκαν από τους ασθενείς που έζησαν στο νομό Λάρισας, Ελλάδα.

Σε κάθε δείγμα βιοψιών που αξιολογήθηκε, HPV 6, HPV 11, HPV 16 και HPV 18 θετικοί έλεγχοι (positive controls) συμπεριλήφθηκαν στην αντίδραση PCR.

3.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΩΝ (PCR)

Ιστοί από βιοψίες μελανωμάτων ενσωματωμένοι σε Block παραφίνης εξετάστηκαν για το DNA HPV με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερασών (pcr). Χρησιμοποιήθηκαν 5-10 τομές πάχους 5 mm των δειγμάτων. Για να αποφευχθεί η πιθανή μόλυνση, ο μικροτόμος πλύθηκε με διάλυμα ξυλόλης 99% και οι πρώτες 10 τομές πάχους 5 mm η καθεμιά των δειγμάτων απορρίφθηκαν.

Το DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το kit E. Z. N.A. DNA ιστού (ωμέγα Biotech, A.E.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η παρουσία του ενισχυμένου (amplified) DNA στα μεμονωμένα δείγματα, κάθε δείγμα ενισχύθηκε με β-σφαιρίνη primers, οι οποίοι ενισχύουν ένα

τμήμα 268-ζευγών βάσεων της ανθρωπίνου β-σφαιρίνης ⁷⁵. Τα δείγματα με το ενισχυμένο DNA ελέχθηκαν στη συνέχεια με τους consensus primers HPV MY09 και MY11 ως εξής: Το μίγμα αντίδρασης (50 μl) περιείχε 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40, 2 mM MgCl₂, 20 pmol (κάθε ένα) consensus primers (MY09: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3", MY11: GCMCAGGGWCATAAYAATGG, M=A+C, W=A+T, Y=C+T και R=A+G [10]) 200 Mm (κάθε ένα) dNTPs, 2,5 μονάδων της πολυμεράσης DNA [MBI Fermentas] και 20 μl του δείγματος στόχων. Το PCR πρόγραμμα είχε ρυθμιστεί ως εξής: από 94°C για 5 λ. (94°C για 30 sec, 45°C για 1 λ. και 72°C για 1min) για 40 κύκλους και 72°C για 10 λεπτά.

Η παρουσία ενισχυμένων προϊόντων (450 ζεύγη βάσεων) επιβεβαιώθηκε από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα υποπολλαπλάσια 10 μL του ακατέργαστου PCR προϊόντος αναμίχθηκαν με 50 του αντίστοιχου ενζύμου περιορισμού (Hae III, RsaI) και του συγκεκριμένου buffer ισοτονικού διαλύματος σε έναν συνολικό όγκο 20 μL. Οι αντιδράσεις επωάστηκαν σε ένα λουτρό ύδατος 37°C για 18h. Τα προϊόντα της αντιδράσεως χωρίστηκαν από την ηλεκτροφόρηση σε 120V σε ένα πήκτωμα αγαρόζης μεταφοράς 3%.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν οπτικά και τα μεγέθη των τεμαχίων συγκρίθηκαν με τα μοριακά πρότυπα μεγέθους. Οι τύποι HPV αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο που περιγράφηκε πιο πάνω ⁷⁶.

3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα χαρακτηριστικά των υλικών μελετης των ασθενών αναλύθηκαν υπό το FISCHER'S exact test. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν σημαντικά όταν η αξία p ήταν ίση ή λιγότερο από 0,05. Για τη μελέτη το στατιστικό λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε

ήταν στατιστικό πακέτο για τις κοινωνικές επιστήμες (SPSS for Windows release 8.00) και Sigma plot version 1.02. (Jandel επιστημονικό).

3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το DNA εξήχθη επιτυχώς από όλα τα 35 δείγματα βιοψιών. Πέντε από τα 29 δείγματα όγκων μελανώματος (17,20%) ήταν θετικά για το DNA HPV με pcr που χρησιμοποίησε τους consensus primers MY09, MY11 (πίνακας 1, Εικόνα 1). Σύμφωνα με τον αλγόριθμο PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Εικόνα 1) δύο δείγματα ήταν θετικά για HPV 16 DNA και τρία, ήταν θετικά για HPV 6 DNA.

Στα 3 κανονικά δείγματα υγιούς δέρματος και στα 3 συνδεσμικών σπλοκυτταρικών σπύλων που χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγματα ελέγχου βρέθηκαν αρνητικά τα αποτελέσματα της PCR για ανίχνευση HPV DNA, αν και αυτή η τεχνική ανίχνευσε επιτυχώς και προσδιόρισε τους τύπους HPV στα θετικά δείγματα των βιοψιών των ασθενών της μελέτης.

Το πρώτο θετικό δείγμα για το DNA HPV16 λήφθηκε από μια μετάσταση μελανώματος στο δέρμα της κοιλιακής χώρας ενός άρρενος ασθενούς ηλικίας 68 ετών. Το δεύτερο θετικό δείγμα DNA HPV16 ήταν από μια πρωτοπαθή βλάβη δερματικού μελανώματος που βρέθηκε στο αριστερό μάγουλο μιας θήλεως ασθενούς ηλικίας 72 ετών.

Το πρώτο των τριών δειγμάτων που ήταν θετικά για HPV 6 λήφθηκε από το δεξιό γόνατο ενός άρρενος ασθενούς ηλικίας 80 ετών, όπου μια μετάσταση μελανώματος αναπτύχθηκε. Το δεύτερο θετικό δείγμα προήλθε από το δεξιό γλουτό ενός άρρενος ασθενούς ηλικίας 67 ετών όπου είχε παρουσιαστεί μια μετάσταση μελανώματος και τελικά το τρίτο θετικό δείγμα λήφθηκε από τη μετάσταση μελανώματος που βρέθηκε στο ορθό ενός άρρενος ασθενούς 70 ετών.

Όλοι οι θετικοί ασθενείς με μετάσταση στους οποίους ανιχνεύθηκε DNA του

HPV είχαν ιστορικό παρατεταμένης έκθεσης στον ήλιο λόγω του υπαίθριου επαγγέλματός τους. Τέσσερις από πέντε θετικούς ασθενείς (80%), όλοι οι άρρενες, είχαν τύπο III δέρματος κατά Fitzpatrick και ήταν επίσης καπνιστές (με έναν μέσο όρο 25 τσιγάρων ανά ημέρα). Το πέμπτο θετικό άτομο (που ήταν, η ασθενής με το πρωτοπαθές μελάνωμα) ήταν αγρότισσα με δέρμα τύπου II κατά Fitzpatrick και δεν κάπνιζε. Οι τέσσερις θετικοί άρρενες είχαν ήδη τη μετάσταση κατά την διάρκεια της διάγνωσης και HPV απομονώθηκε από τις περιοχές μεταστάσεων. Όλοι οι θετικοί ασθενείς HPV ήταν άνω των 66 ετών και μόνο ένας από αυτούς είχε πενταετές ιστορικό θεραπευθείσας HPV μόλυνσης (ιστορικό κοινών μυρμηκιών στα χέρια).

Εικοσιτέσσερις ασθενείς με μελάνωμα (14 γυναίκες και 10 άνδρες) ήταν αρνητικοί για το HPV-DNA. Από αυτήν την ομάδα, 3 γυναίκες και 8 άνδρες ήταν καπνιστές (με έναν μέσο όρο 23 τσιγάρων ανά ημέρα) και 9 είχαν ένα ιστορικό προηγούμενης μόλυνσης HPV σε διάφορες περιοχές που δεν υπήρχε μελάνωμα. Όσον αφορά το επάγγελμά τους, 5 ασθενείς ήταν αγρότες, 3 ήταν υπαίθριοι εργάτες, 1 ήταν ζωγράφος και οι υπόλοιποι 15 είχαν επαγγέλματα εσωτερικών χώρων.

Τα συμπεράσματά μας, σχετικά με την πιθανή σχέση μεταξύ του μελανώματος και του DNA HPV, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p>0.05$) (πίνακας 1).

3.6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκθεση στην ηλιακή UV ακτινοβολία είναι πιθανώς η σημαντικότερη περιβαλλοντική αιτία πρόκλησης του μελανώματος, που ευθύνεται για τα δύο τρίτα της παγκόσμιας επίπτωσης αυτού του όγκου⁷⁷. Η διαλείπουσα ηλιακή έκθεση και τα σοβαρά ηλιακά εγκαύματα, ειδικά κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της χρήσης των κρεβατιών solarium για μαύρισμα έχουν συνδεθεί με έναν αυξανόμενο κίνδυνο πρόκλησης μελανώματος^{76, 77, 81}.

Πολλή έρευνα μελετά τις σχέσεις συνεισφοράς των μηκών κύματος UVA (320 –

400 nm) και των μηκών κύματος UVB (290 – 320 nm) στη φωτοκαρκινογένεση, ιδιαίτερα στην ανάπτυξη κακοήθους μελανώματος^{78, 82, 83}. Υπολογίζεται ότι 50% - 80% των ζημιών του δέρματος από τον ήλιο σ'όλη τη ζωή μας υφίστανται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας. Επίσης θεωρείται ότι 19% 50% της ηλιακής UVA ακτινοβολίας και περίπου 9% 14% της ηλιακής UVB ακτινοβολίας φθάνουν στα μελανοκύτταρα. Η UVA περνά μέσω των περισσότερων παραθύρων γραφείων, αυτοκινήτων και οικιακών παραθύρων αντιθέτως προς τη UVB που εμποδίζεται από το γυαλί παραθύρων. Επιπλέον, η UV προστασία που προσφέρεται από τα υφάσματα βαμβακιού που χρησιμοποιούνται το καλοκαίρι, επιτρέπει τη μεγαλύτερη μετάδοση επί τοις εκατό της UVA ακτινοβολίας, έναντι της UVB ακτινοβολίας.

Η UV ακτινοβολία συμβάλλει στο σχηματισμό των βασικοκυτταρικών επιθηλιωμάτων, των ακανθοκυτταρικών επιθηλιωμάτων και των δερματικών μελανωμάτων^{84, 85}.

Η UVB είναι συντριπτικά αρμόδια για το σχηματισμό των κύριων βλαβών DNA, των οποίων η ανεπαρκής επισκευή οδηγεί σε μεταλλάξεις^{80, 81}.

Η UVA είναι αφθονότερη στο φως του ήλιου από τη UVB ακτινοβολία και προκαλεί οξειδωτική ζημία στο DNA των κυττάρων που είναι επίσης δυνητικά μεταλλαξιογόνως.

Το μελάνωμα θεωρείται εξάλλου ως ανοσολογικός όγκος και οι ανοσοκατασταλαμένοι ασθενείς φαίνεται να έχουν έναν υψηλότερο κίνδυνο για να υποστούν αυτό το νεόπλασμα⁸⁹. Η καταστολή ορισμένων ανοσοαπαντήσεων έχει αναγνωριστεί μετά από την UV ηλιακή έκθεση 73. Η ακτινοβολία UVA και ειδικά η UVB θεωρείται να συμβάλλει ουσιαστικά σε πρόκληση ανοσοκαταστολής.

Το στρώμα του όζοντος πρωταρχικώς απορροφά την UV ακτινοβολία κάτω από

290 nm. Οι μειώσεις των στρατοσφαιρικών επιπέδων όζοντος είναι πιθανό να οδηγούν σε αυξανόμενη UVB ακτινοβολία που φθάνει στην επιφάνεια της γης. Κατά τη διάρκεια των πρόσφατων δεκαετιών, πάνω από το βόρειο ημισφαίριο το στρώμα όζοντος έχει μειωθεί κατά 10 έως 40 τοις εκατό κατά τη διάρκεια των μηνών χειμώνα και άνοιξης. Συνεπώς η UV-ακτινοβολία (UVB) που φθάνει στη γήινη επιφάνεια έχει αυξηθεί. Μια μείωση 10 τοις εκατό του στρώματος όζοντος είναι αρμόδια για την αύξηση 20% στην υπεριώδη ακτινοβολία που φθάνει στην επιφάνεια της γης και αύξηση 40% στους καρκίνους του δέρματος ⁹¹.

Ο ιός HPV έχει συνδεθεί με τα κακοήγη μελανώματα, προκακοήθεις βλάβες, τα ακανθοκυτταρικά και τα βασικοκυτταρικά επιθηλιώματα. Στους μη-μελανωματιούς δερματικούς όγκους έχουν ανιχνευθεί HPV 3, 5, 8, 10, 18, 28, 77 και οι συνηθέστερα ευρισκόμενοι τύποι είναι HPV 8 και HPV18 ^{95,96}.

Σε κακοήγη μελανώματα, HPV 16, 35, 38 έχουν ανιχνευθεί ^{75, 97, 99}. Στη μελέτη μας, προσδιορίσαμε HPV 16 σε 2 δείγματα με πρωτοπαθές μελάνωμα και HPV 6 σε 3 δείγματα μεταστάσεων μελανώματος. Απο ό,τι ξέρουμε αυτή είναι η πρώτη διεθνής αναφορά της ανίχνευσης HPV 6 σε δείγματα μελανώματος.

Σε μια μελέτη, θετικές βιοψίες για το DNA του ιού HPV με ανοσοιστοχημεία λήφθηκαν από τους ασθενείς στάδιο III και IV μελανώματα και συσχετίστηκαν με τη γρήγορη εξέλιξη αυτών των μελανωμάτων ⁷⁴. Και στα με ανοσολογική ανεπάρκεια άτομα, οι δερματικοί τύποι HPV προσδιορίστηκαν σε υψηλή συχνότητα, καθώς επίσης και πολλαπλοί τύποι HPV μέσα σε ένα μεμονωμένο μη μελανωματικό όγκο δείγματος.

Οι μολύνσεις δέρματος με HPV έχουν μια παγκόσμια επίπτωση με ένα ευρύ φάσμα των γενοτύπων. Ο πιο επικρατών τύπος HPV είναι ο HPV-5, με μια γενική επίπτωση 6,5% ¹⁰⁰. HPV ανιχνεύεται επίσης σε μια υψηλή επικράτηση στο κανονικό δέρμα των υγιών ενηλίκων. Σε αυτές τις περιπτώσεις η μόλυνση εμφανίζεται συνήθως

στην πρόωρη παιδική ηλικία ¹⁰¹.

Στην καρκινογένεση δέρματος η μόλυνση με HPV μπορεί να είναι συμβάλλον παράγοντας με τη UV ακτινοβολία και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος ⁷².

Έχει αναφερθεί ότι η UV ακτινοβολία προκαλεί την απελευθέρωση των προφλεγμονοδών κυτοκινών από τα κερατινοκύτταρα, η οποία ενισχύεται από την παρουσία των δερματικών τύπων HPV 20 και 27 ¹⁰². Πρόσφατα, μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ UVR, των δερματικών E6 πρωτεϊνών HPV και μιας κυτταρικής προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης έχει αναφερθεί. Αυτό εμφανίζεται κλινικά σχετικό, επειδή HPV - θετικοί καρκίνοι είχαν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα Bak σε αντίθεση με τους HPV - αρνητικούς καρκίνους ¹⁰².

Η κατανάλωση τσιγάρων επιδεινώνει διάφορες δερματικές ασθένειες τα δυσμενή αποτελέσματα συνδέονται κυρίως με την ψωρίαση, ακανθοκυτταρικά καρκινώματα και με τη φτωχότερη έκβαση του μελανώματος ^{75, 103}.

Η τελευταία διαπίστωση είναι σε συμφωνία με τα συμπεράσματα αυτής της μελέτης όπου όλοι οι HPV - θετικοί άρρνες που είχαν μελανώματα, ήταν καπνιστές.

Σε μια μελέτη, αναφέρεται ότι η παραμονή και η πρόοδος της μόλυνσης με HPV συμβάλλει στην αύξηση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε συνδυασμό με την κατανάλωση τσιγάρων και αντισυλληπτικών και παρουσία πολλών ερωτικών συντρόφων.

Η μελέτη μας είχε ως σκοπό να καθορίσει εάν το HPV - DNA ήταν παρόν στα δείγματα βιοψιών μελανώματος, και σε αυτή την περίπτωση, να συσχετίσει την πιθανή αυτή παρουσία με την κλινική έκβαση. Από τα 29 δείγματα που αξιολογήθηκαν, μόνο 5 (17,20%) ήταν θετικά για DNA HPV (πίνακας 1, αριθμός 1). Δύο δείγματα ήταν θετικά για HPV 16 DNA και τρία, ήταν θετικά για HPV 6 DNA. Όλοι οι θετικοί

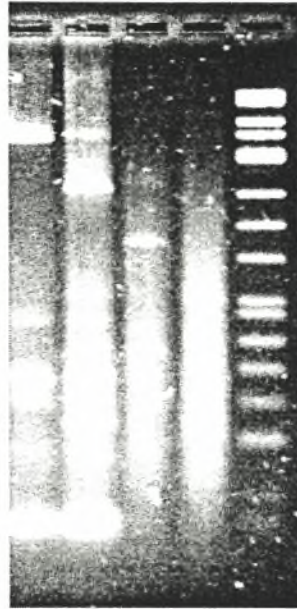
ασθενείς HPV ήταν άνω των 66 ετών. Τα συμπεράσματά μας, σχετικά με την πιθανή σχέση μεταξύ του μελανώματος και του DNA HPV, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p>0.05$) (πίνακας 1).

Τελικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προτείνουν ότι η UV - έκθεση παραμένει η κύρια αιτία του μελανώματος στην περιοχή μας και φαίνεται ότι το κάπνισμα συμβάλλει στη φτωχότερη έκβαση του μελανώματος. Ο ρόλος της δερματικής μόλυνσης HPV στην παθογένεση του μελανώματος παραμένει αόριστος.

		HPV		Total
		NO	YES	
MELANOMA	N	24	5	29
	%	82,8%	17,2%	100,0%
CONTROL GROUP	N	6	0	6
	%	100,0%	0%	100,0%
TOTAL	N	30	5	35
	%	85,7%	14,3%	100,0%

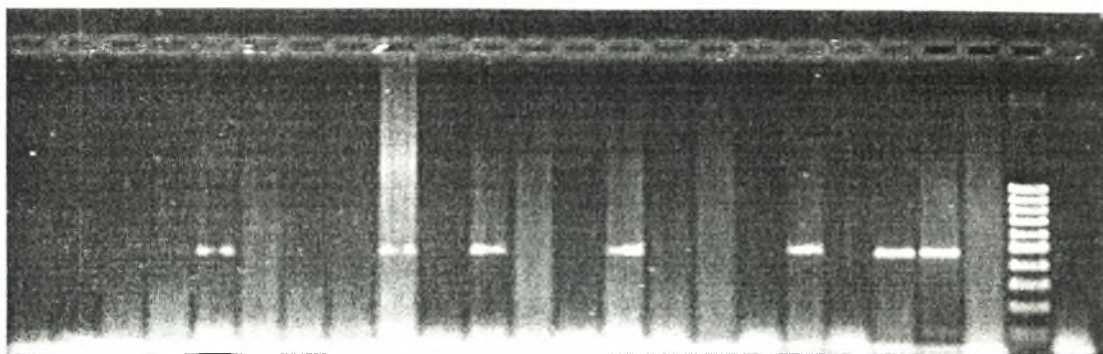
	p-value
Fisher's Exact Test	0.561

Πίνακας 1: HPV θετικά μελανώματα. Η παρουσία του HPV DNA επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο PCR (polymerase chain reaction).



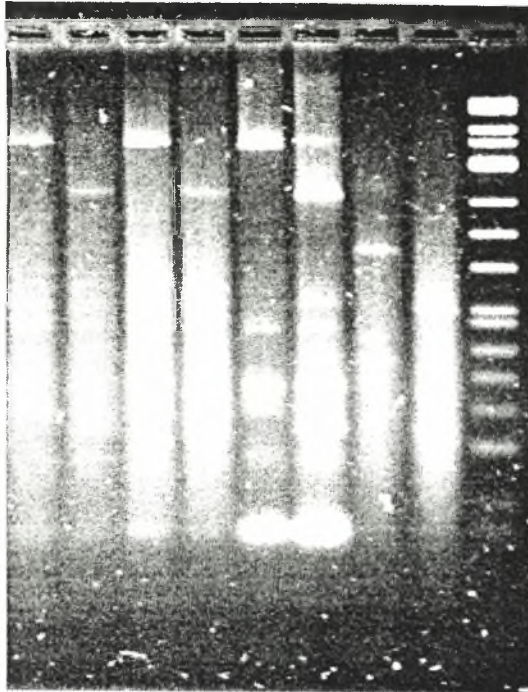
1 2 3 4 M

Εικόνα 1: Επίδειξη των τμημάτων ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης που παρήχθησαν με έγχυση MY09/MY11 ενίσχυσης προϊόντων PCR, με RFLPs: Hae III (1, 3) και RsaI (2, 4). Επιδεικνύονται αντιπροσωπευτικά δείγματα του HPV type 16 (1, 2) και HPV type 6 (3, 4). Γραμμή M: δείκτες μοριακού μεγέθους (έγχυση HinfI φΧ174 DNA).



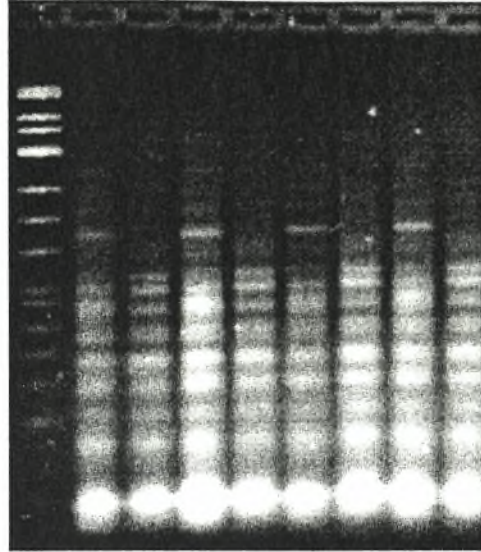
Εικόνα 2: Επεξεργασία των δειγμάτων με consensus primers MY 09-11 (5 θετικά δείγματα)

Control Control
HPV 16 HPV 6



Εικόνα 3: RLFPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) στα θετικά δείγματα μελανώματος - ανίχνευση HPV 16.

Control
HPV 6



Εικόνα 4: RLFPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)
στα θετικά δείγματα μελανώματος - ανίχνευση HPV 6

Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΚΑΚΟΗΘΗ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΑ ΝΟΜΟΥ ΛΑΡΙΣΑΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ. 1988-1998

Α/Α	ΟΝΟΜ/ΝΥΜΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΗΜ/ΝΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ
1	Κ Ε	68	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	3/88
2	Λ Ε	67	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΑΤΩ ΑΚΡΟΥ	4/88
3	Ψ Α	70	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ	9/88
4	Κ Κ	28	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	7/89
5	Χ Ε	39	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΟΙΛΙΑΚΩΝ ΤΟΙΧΩΜΑΤΩΝ	12/89
6	Ι Γ	30	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞ ΑΝΤΙΒΡΑΧΙΟΥ	12/89
7	Λ Σ	78	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΚΟΙΛ ΤΟΙΧ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	2/90
8	Μ Φ	50	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΒΟΛΒ ΕΠΙΠΕΦ ΔΕΞ ΟΦΘΑΛΜΟΥ	3/90
9	Φ Χ	68	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΥΠΟΔ ΚΟΙΛΙΑΣ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	3/90
10	Μ Π	83	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞ ΠΑΡΕΙΑΣ	4/90
11	Γ Γ	38	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞ ΠΑΡΕΙΑΣ	7/90
12	Ν Ν	70	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΙΧ ΕΝΤΕΡΟΥ ΑΠΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	12/90
13	Σ Σ	75	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	1/91
14	Μ Κ	85	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜ ΑΡ ΑΝΤΙΒΡΑΧΙΟΥ	8/91
15	Σ Σ	67	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	9/91
16	Ο Α	48	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	9/91
17	Γ Α	76	ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΜΕΤΩΠΙΟΥ	9/91
18	Κ Α	53	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΜΦ ΑΡ ΤΡΑΧ ΧΩΡΑΣ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	1/92
19	Π Σ	75	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΥΠΟΔΟΡΙΟΥ ΘΩΡΑΚΟΣ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	4/92
20	Τ Ε	33	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤ. ΒΡΑΧΙΟΝΟΣ	7/92
21	Π Ζ	72	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΒΛΕΝΝΟΓ ΡΙΝΟΣ	3/93
22	Π Α	65	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΑΝΤΙΧΕΙΡΑ	4/93
23	Κ Ε	40	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΡΟΣΘΙΑΣ ΕΠΙΦ ΚΝΗΜΗΣ	4/93
24	Α Ε	72	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡ ΠΑΡΕΙΑΣ	6/93
25	Τ Α	68	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	8/93
26	Χ Κ	70	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΟΡΘΟΥ	12/93
27	Ζ Β	64	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΤΕΡ. ΩΤΟΣ	2/94
28	Κ Κ	72	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤΕΡΑΣ ΠΑΡΕΙΑΣ	4/94
29	Σ Μ	53	ΜΕΛΑΝΩΜΑ (Δ) ΚΝΗΜΗΣ	4/94
30	Α Ι	35	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΡΑΧΗΛΟΥ	5/94
31	Π Θ	62	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤΕΡΑΣ ΠΑΡΕΙΑΣ	10/94
32	Π Ν	89	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΒΛΕΝ. ΣΤΟΜΑΤΟΣ	4/95
33	Λ Ι	60	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΕΛΜΑΤΟΣ	5/95
34	Κ Α	33	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	5/95
35	Κ Α	42	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	9/95
36	Π Ε	52	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΒΟΥΒ. ΛΕΜΦ. ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	9/95

37	Τ Ε	82	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΜΕΤΩΠΙΟΥ	9/95
38	Κ Σ	43	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΡΑΧΗΣ	1/96
39	Σ Ε	38	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΜΗΡΟΥ	3/96
40	Γ Ε	76	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΟΦΡΥΟΣ	3/96
41	Β Γ	65	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΟΦΡΥΟΣ	5/96
42	Π Α	68	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ	6/96
43	Σ Η	78	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	7/96
44	Γ Ε	84	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤΕΡΟΥ ΩΤΟΣ	11/96
45	Γ Α	80	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΠΡΩΚΤΟ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	11/96
46	Σ Γ	70	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΧΟΡΙΟΕΙΔΟΥΣ ΑΡΙΣΤΕΡΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ	11/96
47	Σ Μ	75	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΕΛΜΑΤΟΣ	2/97
48	Κ Ν	61	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΡΙΧΩΤΟΥ ΚΕΦΑΛΗΣ	3/97
49	Π Α	45	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΡΙΧΩΤΟΥ ΚΕΦΑΛΗΣ	4/97
50	Π Ε	40	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΡΙΧΩΤΟΥ ΚΕΦΑΛΗΣ	5/97
51	Ζ Ξ	50	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΝΗΜΗΣ	5/97
52	Π Ξ	57	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΒΡΑΧΙΟΝΟΣ	8/97
53	Π Π	82	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΣΤΗ ΔΕΞΙΑ ΚΝΗΜΗ	9/97
54	Τ Α	48	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΥΠΟΔΟΡΙΟΥ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	10/97
55	Φ Φ	61	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ ΑΠΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	10/97
56	Κ Κ	80	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΟΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΒΟΥΒΩΝΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	11/97
57	Σ Σ	70	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΒΟΥΒΩΝΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	11/97
58	Κ Κ	80	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΑΝΤΙΒΡΑΧΙΩΝΑ	11/97
59	Σ Β	69	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΣΕ ΙΓΝΥΑΚΗ ΧΩΡΑ ΑΡΙΣΤΕΡΑ	1/98
60	Κ Α	45	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΚΝΗΜΗΣ	1/98
61	Ξ Φ	39	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΜΑΣΧΑΛΗΣ	2/98
62	Ζ Α	80	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΞΙΟΥ ΙΓΜΟΡΕΙΟΥ	3/98
63	Γ Α	78	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΑΡΕΙΑΣ	4/98
64	Π Κ	74	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΡΟΤΑΦΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	5/98
65	Τ Π	60	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤ. ΚΑΤΩ ΑΚΡΟΥ	5/98
66	Α Δ	72	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΑΡΕΙΑΣ	9/98
67	Ν Μ	75	ΥΠΟΝΥΧΙΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΝΤΙΧΕΙΡΑ	9/98
68	Τ Η	65	ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΑΡΙΣΤ. ΑΚΡΟΥ ΠΟΔΟΣ	9/98
69	Μ Ε	52	ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	10/98
70	Γ Α	67	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ. ΑΡΙΣΤΕΡΟΥ ΓΛΟΥΤΟΥ ΑΠΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	11/98
71	Π Ε	54	ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΠΛΑΤΗΣ	11/98

Δ. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΕΙΣ

Σημαντική υπήρξε η υποστήριξη του παθολογοανατομικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, του Ογκολογικού τμήματος, του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του ΠΠΓΝΛ και του διευθυντού του, καθηγ. Α. Μανιάτη όπως και της Επικ.Καθηγητριας κ. Ε.Πετεινάκη για την εκτέλεση της μελέτης. Η συνεισφορά του Μοριακού Βιολόγου κ. Κοντου Φανουρη υπήρξε πραγματικά πολύτιμη.

Ειδικές ευχαριστίες στην κ. C. H. Ostwald, τμήμα βιοχημείας, πανεπιστήμιο του Ρόστοκ, Γερμανία, για τα positive control δείγματα της PCR.

Επίσης, δε επιθυμώ να ευχαριστήσω τον καθηγ. G. Gross, τμήμα δερματολογίας και αφοροδισιολογίας, πανεπιστήμιο του Ρόστοκ, Γερμανίας για την υποστήριξη και την ενθάρρυνσή του καθώς επίσης και τις πολύτιμες προτάσεις του.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω τον κ. Γ .Ιντζεογλου (ΙΝΠΙΑ) για τη συμβολή του στην έκδοση της διατριβής αυτής.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Greenlee R., Murray T., Bolden S.: Cancer Statistics 2000. CA Cancer J. Clin. 2000; SO:7-33.
2. Winyo P., Ries L, Giovino G. Annual report to the nation on the status of cancer 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91:675-690.
3. Diagnosis and treatment of early melanoma. NIH Consens Statement 1992Jan{10):1-26.
4. Sahins S., Kao B., Kopf A.: The incidence of malignant melanoma in the US. Issues as we approach the 21st century. J. Am. Acad. Dermatol. 1996; 34:839-847.
5. Rigel D., Friedman R., Kopf A.: Predicting ten- year survival of patients with primary cutaneous melanoma: Corroboration of a prognostic model. Cancer 1997; 80: 1426.
6. Rigel D., Friedman R., Kopf A.: Melanoma Incidence. Arch. Dermatol. 1997; 133:656-9.
7. Rigel DS: Identification of those at highest risk for development of malignant melanoma. Adv. Dermatol.1995; 10:151- 170.
8. Gloster H, Brodland D: The epidemiology of skin cancer. Dermatol Surg 1996; 22:217-226.
9. Rigel DS: Epidemiology and prognostic factors of malignant melanoma. Ann Plast Surg 1992;28:7-8.
10. Kang S, Barnhill R, Mihm M Jr, et al: Multiple primary cutaneous melanoma. Cancer 1992;70:1911-1916.
11. Chana J, Grover R, Wilson G, et al : An analysis of p16 tumour suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. Brit J Plast Surg 2000; 53:46-50.

12. Gretarsdottir S, Olafsdottir G, Borg A : Five novel somatic CDKN2/p16 mutations identified in melanoma, glioma and pancreatic cancer. *Mutations in brief* no. 170. Online. *Hum Mutat* 1998;12:212.
13. Martin R: Relationship between risk factors, knowledge and preventive behaviour relevant to skin cancer in South Australia. *Br J Gen Pract* 1995; 45:365-367.
14. Chuang T, Charles J, Reizner G, et al: Melanoma in Kauai, Hawaii, 1981-1990: The significance of in situ melanoma and the incidence trend. *Int J Dermatol* 1999;38:101-107,
15. Binder M, Kittler H, Seeber A, et al: Epiluminescence microscopy-based classification of pigmented skin lesions using computerized image analysis and an artificial neural network. *Melanoma Res* 1998;8:261-266.
16. Debeir O, Decaestecker C, Pasteels J, et al: Computer-assisted analysis of epiluminescence microscopy images of pigmented skin lesions. *Cytometry* 1999; 37:255-256.
17. Zitelli A, Brown C, Hanusa B : Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37:422-429.
18. Cohen L, McCall M, Zax R: Mohs micrographic surgery for lentigo malignant melanoma. A follow up study. *Dermatol Surg* 1998; 28:673-677.
19. Balch Cm, Soong SJ, Bartolucci A, et al: Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 -4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Ann Surg* 1996; 224:255- 266.
20. Evans RA: Elective regional lymph node dissection for malignant melanoma. *Ann Surg* 1995; 221:435-436.
21. Cafiero F, Peressini A, Gipponi M, et al: Sentinel node biopsy in patients

with cutaneous malignant melanoma. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 284-286.

22. Bostwick P, Morton D, Turner R, et al Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and RT-PCR in early stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999;17:3238-3244.

23. Kirkwood JM: Systemic adjuvant treatment of high risk melanoma patients. The role of interferon α -2b and other immunotherapies. *Eur J Cancer* 1998; 34Suppl3:S12-17.

24. Mitchell MS: Perspective of allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* 1998;25:623-635.

25. Keilholz U, Eggermont A: The role of interleukin-2 in the management of stage IV melanoma: The EORTC melanoma cooperative group program. *Cancer J Sci Am* 2000; 6 Suppl 1: S99-103.

26. Legha S, ring S, Eton O, et al: Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon α -2b and interleukin-2 for stage IV melanoma patients. *L Clin Oncol* 1998; 16:1752- 1759.

27. Conforti A, Ollila D, Kelley M, et al: Update on active specific immunotherapy with melanoma vaccines. *J Surg Oncol* 1997;66:55-64.

28. Eton O, Kharkevitch D, Gianan M, et al: Active specific immunotherapy with ultraviolet B- irradiated autologous melanoma cells plus DETOX in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:619-627.

29. Timmerman J, Levy R: Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annual Rev Med* 1999;50:507-529.

30. Livingston P, Wong G, Adluri S, et al: Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: A randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin Oncol* 1994; 12:1036-1044.

31. Nestle F, Burg G, Dummer R: New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999; 20:5-7.
32. Smith K, Skelton H: Immune and gene therapy for melanoma patients-The immunobiology of melanoma. *Int J Dermatol* 1999; 38:490-508.
33. Αγγελόπουλος Β. Κακόηθες Μελάνωμα του δέρματος. Πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία στον 21 ο αιώνα. *Ιατρικά θέματα* 2001,22: 57-63
34. Thorn M, Ponten F, Bergstrom R et al. Clinical and histopathological predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population - based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 761-769
35. Blum A, Brand CU, Ellwanger U, et al. Awareness and early detection of cutaneous melanoma: an analysis of factors related to delay in treatment. *Br J Dermatol* 1999; 141:783-787
36. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self examination of the skin *Cancer* 1985; 35:130-151
37. Carli P, Borgognoni L, Reali UM, Giannotti B. Clinicopathological features of small diameter malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1994; 4:440-442
38. Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, et al. Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1990; 126:763-766
39. Shaw E, Me Carthy WH. Small - diameter malignant melanoma: a common diagnosis in New South Wales, Australia. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 679-682
40. Goldman L. Some investigative studies of pigmented nevi with cutaneous microscopy. *J Invest Dermatol* 1951; 16: 407-426
41. Steiner A, Pehamberger H, Wolff K. In vivo epiluminescence of pigmented skin lesions. II. Diagnosis of small pigmented skin lesions and early detection of

malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 584-591

42. Yadav S, Vossaert KA, Kopf AW et al. Histopathological correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy). *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 297-305

43. Pehamberger H, Binder M, Steiner A et al. In vivo epiluminescence microscopy: improvement of early diagnosis of melanoma. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 356s-362s

44. Nachbar F, Stolz W, Merkle T et al. The ABCD rule of dermoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocyte skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30:551-559

45. Kittler H, Seltenheim M, Dawid M et al. Morphologic changes of pigmented skin lesions: a useful extension of the ABCD rule for dermoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 558-562

46. Carli P, De Giorgi V, Naldi L et al. Reliability and inter - observer agreement of dermoscopic diagnosis of melanoma and melanocytic naevi. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7:16-23.

47. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P et al. Epiluminescence microscopy: criteria of cutaneous melanoma progression. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37:68-74

48. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P et al. Clinical and dermoscopic criteria for the preoperative evaluation of cutaneous melanoma thickness. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 61-68

49. Doherty VR (Editorial) Why are there delays in patients presenting with melanoma? *Br J Dermatol* 1999; 141:780-782

50. Binder M, Schwarz M, Winkler A et al. Epiluminescence microscopy: a useful tool for the diagnosis of pigmented skin lesions for formally trained

dermatologists. Arch Dermatol 1995; 131:286-291

51. Ε. Πεντέρη – Πετράτου, Κ. Ρεσβάνη, Π.Γ. Κωστάκης, INFODERMA 2002; 41: 6-17
52. Αθ. Πετρίδης, Νοσ/μείο «Α. Συγγρός», INFODERMA 2002; 40: 3-7
53. Γ. Κατσαντώνης, Παν/κό Νοσ/μείο Κρήτης, INFODERMA 2002; 40: 14
54. Αθ. Πετρίδης, Νοσ/μείο «Α. Συγγρός», INFODERMA 2002; 40: 15
55. ΕΛΛ. ΕΠΙΘ. ΔΕΡΜ. ΑΦΡ. 15:267-278, 2004
56. Variants of human wart virus infection. Reproduced with permission from Melton, J.L. and Rasmussen, J.E. (1991) Clinical manifestations of human papillomavirus infection in nongenital sites Dermatologic Clinics 9: 219-233.
57. High risk HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa Modern Pathology 2000; 13(6):644-653 Bouda M, Gorgulis V, Kastrinakis, Giannudis A, Tsoli E, Danassi D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington S, Kittas C.
58. Aase A, Bentham G. Gender, geography and socio-economic status in the diffusion of malignant melanoma risk. Soc-Sci-Med Jun 1996; 42 (12): 1621-1637.
59. Armstrong BK, Kricger A, English DR. Australas J Dermatol Jun 1997; 38 Suppl 1; S1-6.
60. Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. Arch Dermatol. Apr 1996; 132 (4): 444-450.
61. Diffey R. Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. Phys Biol 2004 Jan 7; 49 (1):R1-11.
62. de Gruijl FR, Longstreth J, Norval M, Cullen AP, SlaperH, Kripke ML, Takizawa Y, van der Leun JC. Photochem Photobiol Sci Mar 2003; 2(3): 354.

63. Oikarinen A, Raitio A. Melanoma and other skin cancers in circumpolar areas. *Int J Circumpolar Health* 2000 Jan; 59(1): 52-56.

64. Wang S.Q., Setlow R., Berwick M., Polsky D., Marghoob A.A., Kopf A., Bart R.S. Ultraviolet and melanoma: A review. *J Am Acad Dermatol* 2000 May; 44: 837-846.

65. Moseley H, Mackie RM. Ultraviolet B radiation was increased at ground level in Scotland during a period of ozone depletion. *Br J Dermatol* 1997 Jul; 137 (1): 101-102.

66. Bentham G, Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989, association with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad.

67. Robinson K J, Rigel S D, Amonette A R Summertime sun protection used by adults for their children. *J Am Acad Dermatol* 2000 May; 42: 746-753.

68. Knudsen BM, Andersen SB. Geophysics. Longitudinal variation in springtime ozone trends. *Nature* 2001 Oct 18; 413 (6857):699-700.

69. Reuder J, Demeris M, Koepke P. *J Photochem Photobiol B.* 2001 Aug 30; 61 (3): 94-105.

70. Voigt H. Epidemiologische Aspekte, Praevention und Aufklaerung. In: Voigt H, Kleeberg UR editors. *Malignes Melanom*, Springer Verlag, Heidelberg, 1986: 3-22.

71. Acevedo-Nuno E, Gonzalez-Ojeda A, Vazquez-Camacho G, Balderas-Pena Luz Ma A, Moreno-Villa H, Montoya-Fuentes H. Human Papillomavirus DNA and protein in tissue Samples of oesophageal cancer, Barrett' soesophagus and oersophagitis. *Anticancer Research* 2004; 24 (2C): 1319-24.

72. Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Mouglin C, Laurent R. Nonmelanoma skin

cancers and human papillomavirus. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130 (12 Pt 1): 1131-8.

73. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340 (17): 1341-8

74. Dreau D, Culberson C, Wyatt S, Holder WD Jr. Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and its relation to melanoma progression. *Ann Surg* 2000; 231 (5): 664-71.

75. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 (4732): 1350-4.

76. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (4): 1030-4.

77. Holland R, Harvey I. Adult vs childhood susceptibility to melanoma: is there a difference? *Arch Dermatol* 2002; 138 (9): 1234-5

78. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004; 351 (10): 998-1012

79. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer* 1997; 73: 198-203

80. Tsao H, Sober AJ. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Clin Dermatol* 1998; 16: 67-73

81. Robinson J, Rigel D, Amonette R. Summertime sun protection used by adults for their children. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42 (5 Pt 1): 746-53.

82. Langford IH, Bentham G, McDonald AL. Multi-level modelling of

geographically aggregated health data: a case study on malignant melanoma mortality and UV exposure in the European community. *Stat Med* 1998; 17: 41-57

83. Bentham G, Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 1132-8

84. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994; 170 (5): 1077-85.

85. Moan J, Dahlback A. The relationship between skin cancers, solar radiation and ozone depletion. *Br J Cancer* 1992; 65 (6): 916-21.

86. Mitchell DL, Nairn RS. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 1989; 49: 805-19

87. Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE. Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 741-6

88. Kochevar IE, Pathak MA, Parrish JA. Photophysics, photochemistry and photobiology. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (eds) *Dermatology in General Medicine*. 4th ed. Vol 1. New York: McGraw-Hill, 1993: 1627-38

89. Wang S, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob A, Kopf A, Bart R. Ultraviolet A and Melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44 (5): 837-46.

90. Moseley H, Mackie RM. Ultraviolet B radiation was increased at ground level in Scotland during a period of ozone depletion. *Br J Dermatol* 1997; 137 (1):

101-2.

91. Oikarinen A, Raitio A. Melanoma and other skin cancers in circumpolar areas. *Int J Circumpolar Health* 2000; 59 (1): 52-6.

92. de Gruijl FR, Longstreth J, Norval M, Cullen AP, Slaper H, Kripke ML, Takizawa Y, van der Leun JC. Health effects from stratospheric ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 2003; 2 (1): 16-28.

93. Gissmann L, Boshart M, Durst M, Ikenberg H, Wagner D, zur Hausen H. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol* 1984; 83 (1 Suppl): 265-288.

94. Harwood CA, Proby CM. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15 (2): 101-14.

95. Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, Proby CM. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 2000; 61 (3): 289-97.

96. Biliris KA, Koumantakis E, Dokianakis DN, Sourvinos G, Spandidos DA. Human papillomavirus infection of non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Cancer Lett* 2000; 161 (1): 83-8.

97. Cooper K, Taylor L, Govind S. Human papillomavirus DNA in oesophageal carcinomas in South Africa. *J Pathol* 1995; 175 (3): 273-7.

98. Miracco C, Palumbo N, Lavergne D, Nyongo A, Tosi P, de Villiers EM. Malignant melanomas: search for human papillomaviruses. *Arch Dermatol* 2001; 137 (6): 826-7.

99. Scheurlen W, Gissmann L, Gross G, zur Hausen H. Molecular cloning of two new human papillomavirus types (HPV 37 and HPV 38) from a keratoacanthoma and a

malignant melanoma. *Int J Cancer* 1986; 37 (4): 505-10.

100. Antonsson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, Kataoka A, Hossain S, Hakangard C, Hansson BG. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 2003; 84 (7): 1881-6.

101. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG: General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (6): 2509-14.

102. Takamiyagi A, Asato T, Nakashima Y, Nonaka S. Association of human papillomavirus type 16 with malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1998; 20 (1): 69-73.

103. Sela BA. Dermatological manifestations of smoking. *Harefuah* 2002; 141 (8): 736-40, 760.

104. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127 (8): 930-4.