ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ
ΩΤΟΡΙΝΟΛΑΡΥΓΓΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ
ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ

Η ΠΟΛΥΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Π. ΠΡΟΚΟΠΑΚΗΣ
Χειρουργός Ωτορινολαρυγγολόγος

Διδακτορική Διατριβή
Ηράκλειο 2006

Διδακτορική Διατριβή
Εμμανουήλ Π. Προκοπάκη,
με θέμα: ***«Η ΠΟΛΥΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΩΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ»***

Ηράκλειο 2006

Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Εμμανουήλ Χελιδόνης, καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας
Νικόλαος Γκουρτσογιάννης, καθηγητής Ακτινολογίας
Κωνσταντίνος Φωτάκης, καθηγητής Φυσικής

Μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Εμμανουήλ Χελιδόνης, καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας
Νικόλαος Γκουρτσογιάννης, καθηγητής Ακτινολογίας
Κωνσταντίνος Φωτάκης, καθηγητής Φυσικής
Αστέριος Κατσαμούρης, καθηγητής Αγγειοχειρουργικής
Ευγένιος Κουμαντάκης, καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
Ιωάννης Παλλήκαρης, καθηγητής Οφθαλμολογίας
Ανδρονίκη Τόσκα, καθηγήτρια Δερματολογίας

Προλεγόμενα

Η επιστημονική γνώση δεν χαρίζεται σε κανέναν. Αποκτάται με κόπο και στερήσεις και όποιος είναι κοινωνός της γνωρίζει όχι μόνον την αξία της, αλλά και το σε ποιον πρέπει ή δεν πρέπει να μεταδοθεί.

Η επιστημονική γνώση που συνοδεύει και χαρακτηρίζει έναν κλινικό ιατρό αποτελεί αποτέλεσμα επεξεργασίας υλικού μετάγγισης από παλαιότερους. Γνώση που πέρασε και σε αυτούς από προγενέστερους, γνώση που ακολούθως –ενδεχομένως- αυξήθηκε σε ποσότητα και ποιότητα. Διότι η γνώση χαρακτηρίζεται και από ποσότητα και από ποιότητα. Καθήκον κάθε κλινικού ιατρού είναι να εκμεταλλευτεί αυτήν την διαχρονική βάση δεδομένων που του παρέχεται, αλλά και με τη σειρά του να συνεισφέρει. Να συνεισφέρει έστω και κατά μία γραμμή γνώσης, στον τομέα που επέλεξε να υπηρετήσει. Πρωτίστως όμως, είναι καθήκον του να συνεχίσει την μετάδοση αυτής της γνώσης σε νεώτερους. Να χαρεί που οι μαθητές του μάθανε από αυτόν και να χαρεί διπλά, που οι μαθητές του ενδεχομένως τον ξεπεράσανε.

Η αληθινή γνώση όμως δεν είναι προϊόν μοναχικής και ιδιοτελούς πορείας. Δεν είναι κάτι που ο καθένας, έτσι απλά μπορεί να την αντλήσει από ένα βιβλίο ή από κάποια ιστοσελίδα του διαδικτύου. Βασίζεται κυρίως σε ένα συστηματικό αλγόριθμο σκέψης και συμπεριφοράς, που αποκτάται μέσω προσωπικής επαφής με το δάσκαλο, μέσω βιωματικής επεξεργασίας απλών καθημερινών στιγμών του δασκάλου. Εκεί στα έδρανα της ιατρικής σχολής, εκεί στο πλευρό του αρρώστου, στο τραπέζι του χειρουργείου, στο καφενείο πίνοντας έναν καφέ μαζί του ύστερα από μια κοπιαστική μέρα. Είναι όμως και η ίδια η στάση ζωής του δασκάλου, που σαν εικόνα θα πρέπει να σαγηνεύει τον μαθητή. Είναι η στάση ζωής του δασκάλου, που θα τον καταστήσει πρότυπο. Διότι δεν υπάρχει όραμα χωρίς να υπάρχει πρότυπο, κατά τον ίδιο τρόπο που δεν υπάρχει απάντηση χωρίς να υπάρχει ερώτημα.

Είμαι υπερήφανος για τα πρότυπά μου.

Ευγνωμονώ τους δασκάλους μου, αυτούς που είναι τιμή μου να τους αποκαλώ έτσι, για τους λόγους που προανέφερα. Αλλά και διότι εμένα προσωπικά μου έχουν αποδείξει, ότι δεν υπάρχουν άπαρτα κάστρα, απλά μόνον δύσκολες πολιορκίες:

- *Τον Φώτιο Κοτρώτσο, δάσκαλο των παιδικών μου χρόνων, για την απίστευτη υπομονή του.*
- *Τον Δημήτρη Εμμανουήλ, καθηγητή μου στην Ιατρική Σχολή, για τις ατελείωτες συζητήσεις μας.*
- *Τον Jonas T. Johnson, καθηγητή μου στο Pittsburgh, για τις ευκαιρίες που μου έδωσε, την στιγμή που μου τις έδωσε.*
- *Τον Γεώργιο Βελεγράκη, καθηγητή μου και διευθυντή μου, διότι με έμαθε να αναγνωρίζω και να μετατρέπω τα μειονεκτήματά μου σε πλεονεκτήματα, δίνοντάς μου έτσι την ευκαιρία να είμαι αρωγός στα οράματά του.*
- *Ιδιαιτέρως όμως ευγνωμονώ τον Εμμανουήλ Χελιδόνη, καθηγητή μου, για την πατρική, κριτική, αυστηρή, αλλά κυρίως διορατική και συνεχή καθοδήγηση του, από τα πρώιμα φοιτητικά μου χρόνια μέχρι σήμερα.*

Η παρούσα δουλειά δεν θα ήταν ποτέ εφικτή χωρίς την συνδρομή και αμέριστη συμπαράσταση ορισμένων προσώπων:

- *Ευχαριστώ πρωτίστως τον αναπληρωτή καθηγητή Κώστα Μπάλα, για την θεμελιώδη συνεισφορά του στο παρόν έργο, αλλά επίσης διότι με τιμά με την φιλία του.*
- *Ευχαριστώ όλους τους κατά καιρούς συνεργάτες του ΙΤΕ, για τις ατελείωτες ώρες που δουλέψαμε μαζί.*
- *Ευχαριστώ τα μέλη ΔΕΠ της ΩΡΛ κλινικής του ΠαΓΝΗ κ. Ιωάννη Μπιζάκη και κ. Παναγιώτη Χριστοδούλου για την συνεχιζόμενη όλα αυτά τα χρόνια θερμή υποστήριξη και καθοδήγησή τους.*
- *Ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Αγγελόπουλο και την κ. Γιάννα Αγγελοπούλου-Δασκαλάκη για την οικονομική και ηθική υποστήριξη.*
- *Ιδιαιτέρως ευχαριστώ τα Μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, για την συμβολή τους στο παρόν πόνημα.*

Αφιερώνω την διδακτορική μου διατριβή στην ιερά μνήμη του πατέρα μου. Στην μητέρα μου και στον αδερφό μου. Στη Βάνια...

Ε.Π.Π.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό Μέρος

Α. Ο ρόλος της πολυφασματικής απεικόνισης στην μη επεμβατική διάγνωση των ιστικών αλλοιώσεων
Β. Παθογένεση και ανάπτυξη του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας

Ειδικό Μέρος

Α. Στόχοι, σκοπός, σχεδιασμός
Β. Εκτίμηση της αιματικής παροχής του ρινικού βλεννογόνου μέσω ποσοτικής ενδοσκοπικής απεικόνισης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός
Γ. Δυνατότητες εφαρμογής της πολυφασματικής απεικόνισης στην διάγνωση και αξιολόγηση ατοπικών ασθενών
Δ. Πολυφασματική απεικόνιση τυμπανικής μεμβράνης, βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και των οπτικών ιδιοτήτων της
Ε. In vivo ανίχνευση και χαρτογράφηση των ιστικών αλλοιώσεων της τραχηλοπροσωπικής χώρας
ΣΤ. Προτεινόμενο μοντέλο επισήμανσης κακοηθών και δυσπλαστικών ιστών με χρώση οξικού οξέος

Δημοσιεύσεις-ανακοινώσεις-βραβεία

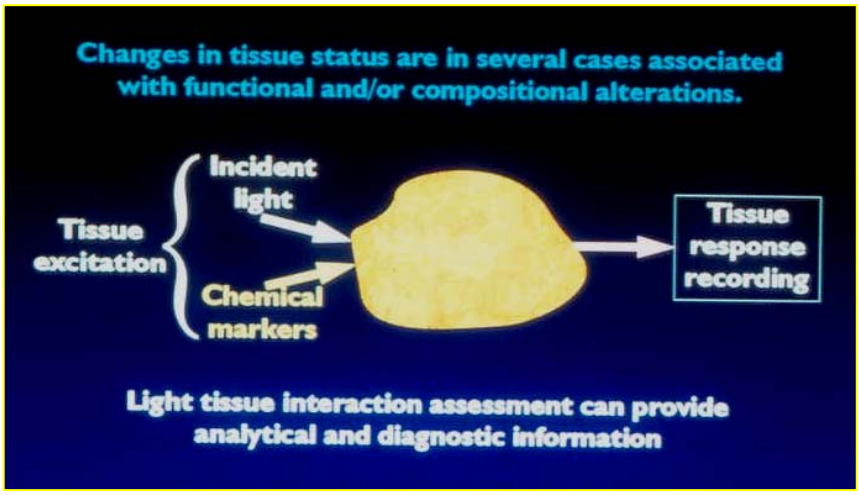
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΜΗ-ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ

1. Εισαγωγή
2. Η προέλευση της εντύπωσης του χρώματος
3. Τεχνολογία φασματικών απεικονιστικών συστημάτων
4. Η έννοια της Φασματικής Απεικόνισης
5. Η πολυφασματική απεικόνιση στη μη επεμβατική διάγνωση των ιστικών αλλοιώσεων
6. Φυσικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός-ιστού
6.1. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία
6.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός-ιστού
6.3. Φασματοσκοπία και μη επεμβατική διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων
6.4. Παράγοντες ενίσχυσης αντίθεσης
6.5. Αλληλεπίδραση δέρματος-φωτός. Δερματικές στιβάδες
7. Η δυναμική των φασματικών απεικονιστικών συστημάτων στη βιοιατρική
7.1. Φασματοσκοπία φθορισμού
7.2. Raman φασματοσκοπία
7.3. Φασματοσκοπία οπτικής σκέδασης
7.4. Εστιακή μικροσκοπία
7.5. Φασματοσκοπία ανάκλασης
8. Εφαρμογές της πολυφασματικής απεικόνισης στην Ωτορινολαρυγγολογία
9. Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται διεθνώς, σειρά κλινικών και ερευνητικών δραστηριοτήτων προκειμένου να αναπτυχθούν καινοτόμες, μη επεμβατικές μέθοδοι αλλά και τεχνογνωσία συνδεόμενη με την διάγνωση διαφόρων ιστικών αλλοιώσεων. Ο όρος οπτική βιοψία χρησιμοποιείται αρκετά συχνά για να περιγράψει αυτές τις διαγνωστικές προσεγγίσεις. Ο στόχος είναι η δημιουργία ενός ικανού απεικονιστικού συστήματος που να ανιχνεύει ιστικές αλλοιώσεις σε πρώιμα στάδια, αποφεύγοντας έτσι πολλαπλές χειρουργικές βιοψίες και επιτρέποντας την ταχεία και επαρκή διάγνωση, την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας, αλλά και της αξιολόγησης με αντικειμενικά κριτήρια του θεραπευτικού αποτελέσματος. Η in vivo διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων βασίζεται στην ανάλυση των δεδομένων που προέρχονται από την μεταβολή του υπό εξέταση ιστικού δείγματος, ύστερα από χημική ή/και οπτική διέγερση. Διαγραμματικά, η κεντρική ιδέα της οπτικής βιοψίας παρουσιάζεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Η έννοια της Οπτικής Βιοψίας συνίσταται στην καταγραφή της απόκρισης του ιστού σε χημική ή/και οπτική διέγερση.

Η συνεχής αύξηση των περιπτώσεων προκαρκινικών βλαβών στην περιοχή της τραχηλοπροσωπικής χώρας και ειδικά της περιοχής του λάρυγγα, σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες δυσκολίες ανίχνευσης και ταυτοποίησης αυτών των αλλοιώσεων έχουν οδηγήσει στην ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων, περισσότερο διαγνωστικά επαρκών μεθόδων και τεχνολογικού εξοπλισμού. Στόχος είναι η ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων ανίχνευσης προκαρκινικών αλλά και καρκινικών αλλοιώσεων. Την τελευταία 15ετία έχουν γίνει πολλές τέτοιες προσπάθειες, που στόχο έχουν την μετάβαση από την απλή τυχαία βιοψία της υπό εξέταση περιοχής, σε μία πιο ακριβή επιλογή των προς βιοψία δειγμάτων, σε περιπτώσεις δυσπλασίας ή άλλων προκαρκινικών καταστάσεων διαφόρων περιοχών της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

Οι οπτικές τεχνικές φαίνεται να είναι κατάλληλες για αυτόν τον σκοπό, αφού δεν απαιτούν την απομάκρυνση ιστού, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να πραγματοποιηθούν in vivo επιτρέποντας την διάγνωση σε αληθινό χρόνο, ανιχνεύοντας παράλληλα αλλοιώσεις με μέγεθος ακόμα και μικρότερο από ένα χιλιοστό. Παρόλο που η χρήση των οπτικών τεχνικών για την εξέταση διαφόρων οργάνων μπορεί να τύχει ευρείας εφαρμογής στο ανθρώπινο σώμα, είναι φανερό ότι η απόλυτη ένδειξη χρήσεως των είναι τα όργανα στα οποία η πρόσβαση γίνεται άμεσα ή με την επικουρία οπτικών ινών, όπως για παράδειγμα στα όργανα της τραχηλοπροσωπικής χώρας, του πεπτικού σωλήνα, του αναπνευστικού, της ουρητηρικής οδού και του γυναικείου συστήματος αναπαραγωγής.

Η οπτική βιοψία αποτελεί μία καινοτόμο διαγνωστική προσέγγιση, όπου οπτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ιστικών μεταβολών με μη επεμβατικό τρόπο. Η εμφάνιση και η εξέλιξη των διαφόρων κακοηθειών χαρακτηρίζεται από μία ποικιλία μορφολογικών συστατικών και λειτουργικών ιστικών αλλαγών, όπου ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια δεν μεταβάλλουν σημαντικά και ειδικά την ιστική εμφάνιση αυτών των αλλοιώσεων. Κατά την οπτική βιοψία στον υπό εξέταση ιστό προσπίπτει φως με συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως μήκος κύματος, πόλωση, διάρκεια παλμού. Ακολούθως, με ειδικό εξοπλισμό και συνδεσμολογία, το φως συλλέγεται από τον ιστό και αναλύεται. Η αλληλεπίδραση του φωτός με τον ιστό εξαρτάται όχι μόνον από τα χαρακτηριστικά του προσπίπτοντος φωτός, αλλά και από τα ιστικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση δείγματος. Συνεπώς, το φως το οποίο συλλέγεται και αναλύεται, περιέχει σημαντική πληροφορία για τα δομικά συστατικά

του ιδίου του ιστού, μια που κατά την αλληλεπίδραση λαμβάνουν χώρα φαινόμενα απορρόφησης, ανάκλασης, σκέδασης ή/και φθορισμού.

Κάθε οπτική μέθοδος χρησιμοποιεί φως με συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες, ενώ από το φως που συλλέγεται εκτιμώνται διάφορες χαρακτηριστικές παράμετροι (μήκος κύματος, καθυστέρηση, πόλωση κτλ). Συνεπώς, αρκετά ιστικά χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με την εξέλιξη μιας κακοήθειας μπορεί έτσι να ανιχνευθούν. Διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές είναι ευαίσθητες σε διαφορετικού τύπου ιστικών αλλοιώσεων. Για παράδειγμα, η φασματοσκοπία φθορισμού με την βοήθεια laser και η Raman φασματοσκοπία είναι ευαίσθητες σε μοριακές αλλοιώσεις, ενώ η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης καθώς και η φασματοσκοπία σκέδασης είναι ιδανικές για να δίδουν πληροφορία σχετικά με τις μορφολογικές δομές του ιστού σε κυτταρικό και μακροσκοπικό επίπεδο.

2. Η προέλευση της εντύπωσης του χρώματος

Το χρώμα είναι μια ιδιότητα της ύλης και η αντίληψή του αποτελεί ένα υποκειμενικό φαινόμενο, που η ερμηνεία του είναι εν πολλής άγνωστη. Οι αλληλεπιδράσεις φωτεινών κυμάτων με τα ηλεκτρόνια απασχόλησαν πολλούς ερευνητές κατά τον 20° αιώνα κι έτσι δεν είναι τυχαία η προσπάθεια ερμηνείας του μηχανισμού αντίληψης του χρώματος βάση φυσικών θεωριών. Την ίδια ώρα, η επιστήμη του χρώματος παίζει βασικό ρόλο στις επιχειρήσεις, την επιστήμη και την βιομηχανία. Φαίνεται λογικό να υποθέσουμε ότι η αντίληψη του χρώματος αποτελεί συνδυασμό μίας μέτρησης του ματιού και μίας εγκεφαλικής εκτίμησης του μήκους κύματος ή της συχνότητας ή της ενέργειας του φωτεινού κύματος. Όσον αφορά τα μήκη κύματος του εύρους της ανθρώπινης όρασης, αυτά εκτείνονται από τα 380nm έως τα 750nm.

Η αντίληψη του χρώματος συνδέεται άμεσα με: **α.** την πηγή φωτός, **β.** το αντικείμενο που φωτίζεται, και **γ.** το μάτι.

α. Πηγή Φωτός: Κάθε πηγή φωτός εκπέμπει πλήθος φωτονίων διαφόρων ενεργειακών επιπέδων οδηγώντας σε φασματική κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας. Η φασματική κατανομή είναι δυνατόν να διαφοροποιείται προσωρινά στην ίδια πηγή ή μεταξύ διαφορετικών πηγών. Έτσι, όταν μία πηγή εκπέμπει ενέργεια συνεχώς μέσα στο ορατό φάσμα της ανθρώπινης όρασης (380-750nm), η αντίληψη από το μάτι είναι αυτή του λευκού και περιγράφεται ως «λευκό φως». Όταν η εκπομπή δεν είναι συνεχής αλλά σε διακριτές φασματικές περιοχές, η αντίληψη του χρώματος αντιστοιχεί στο μήκος κύματος με την μεγαλύτερη ένταση.

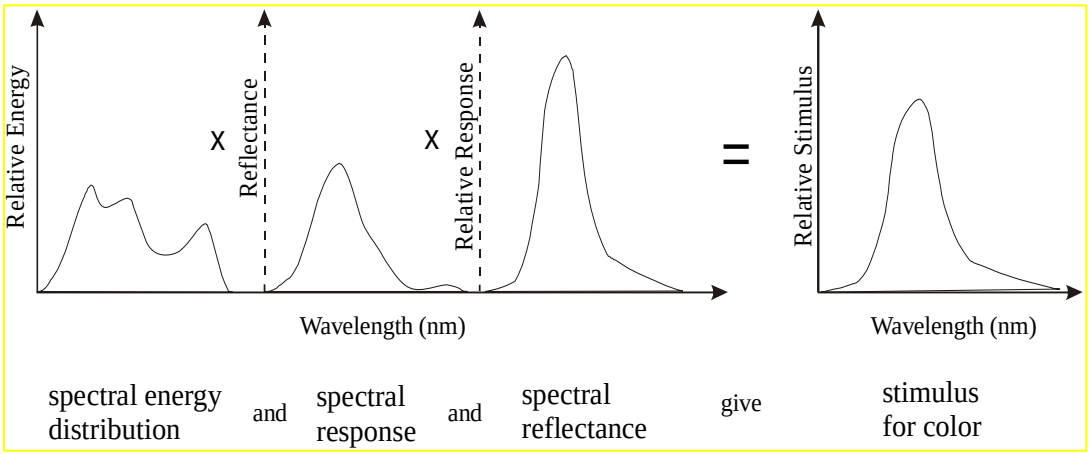
β. Το αντικείμενο που φωτίζεται: Η οπτική εντύπωση ενός αντικειμένου από το μάτι σχετίζεται με τις μεταβολές του προσπίπτοντος στο αντικείμενο φωτός, μέσω μηχανισμών απορρόφησης, ανάκλασης, σκέδασης, περίθλασης, διασποράς και συμβολής.

γ. Το μάτι: Υπάρχει μία πλειάδα ανιχνευτών χρώματος και ίσως ο πιο γνωστός είναι το ανθρώπινο μάτι. Η εντύπωση του χρώματος που δημιουργείται λόγω απορρόφησης σε ένα περιορισμένου εύρους μήκος κύματος καθορίζεται από την ευαισθησία του ματιού. Έτσι, εάν τα μήκη κύματος στο πράσινο απορροφώνται από ένα αντικείμενο, τότε το μάτι αντιλαμβάνεται τα εναπομείναντα μήκη, δηλαδή τον συνδυασμό μπλε και κόκκινου.

Τα χρώματα προκύπτουν διαμέσου αλληλεπίδρασης φωτεινών κυμάτων και ηλεκτρονίων. Οι κύριες ηλεκτρονιακές διαδικασίες της ύλης, που ως αποτέλεσμα έχουν την αντίληψη του χρώματος μέσω επιλεκτικής απορρόφησης είναι:

i. Ηλεκτρονιακές και δονητικές μεταπτώσεις σε ελεύθερα άτομα και μόρια: α. ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, β. δονητικές διεγέρσεις.
ii. Μεταπτώσεις κρυσταλλικού πεδίου: α. μεταπτώσεις σε μεταλλικά μέρη, β. μεταπτώσεις σε μεταλλικές προσμίξεις, γ. χρωματικά κέντρα.
iii. Μεταπτώσεις μεταξύ μοριακών στιβάδων: α. μεταφορά φορτίου, β. συζευγμένοι δεσμοί.
iv. Μεταπτώσεις σχετικές με ενεργειακές ζώνες: α. μεταλλικοί αγωγοί, β. ημιαγωγοί, γ. διεγερμένοι ημιαγωγοί.
v. Αλληλεπίδραση φωτός με συμπυκνωμένο υλικό: α. οπισθοσκέδαση, β. διάθλαση, γ. συμβολή, δ. περίθλαση.

Το φώς οποιασδήποτε πηγής μπορεί να περιγραφεί σε σχέση με την σχετική ενέργεια που εκπέμπεται σε κάθε μήκος κύματος. Απεικονίζοντας σε γράφημα την ενέργεια ως προς τα διακριτά μήκη κύματος λαμβάνουμε την κατανομή της φασματικής ενεργειακής καμπύλης, για κάθε πηγή φωτός. Όσον αφορά το χρώμα, η επίδραση του φωτός σε ένα αντικείμενο μπορεί να περιγραφεί από την φασματική καμπύλη διαπερατότητος ή ανάκλασης του, όταν πρόκειται για διαφανή ή για μη διαφανή υλικά, αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι για τα ημιδιαπερατά ή ημιδιαφανή υλικά, όπως οι διάφοροι ανθρώπινοι ιστοί για παράδειγμα, χρειάζονται και οι δύο καμπύλες. Αυτές οι φασματοφωτομετρικές καμπύλες αποτυπώνουν τη συνιστώσα του φωτός σε κάθε μήκος κύματος που διαπερνά ή ανακλάται από ένα υλικό. Το ερέθισμα που κάποιος ανιχνευτής (όπως το μάτι) μεταφράζει ως χρώμα, αποτελείται από την καμπύλη κατανομής φασματικής ενέργειας επί την καμπύλη φασματικής ανάκλασης ή διαπερατότητος ενός αντικειμένου, επί την φασματική καμπύλη ευαισθησίας του ανιχνευτή. (Σχήμα 2)



Σχήμα 2. Διαδικασία αντίληψης του χρώματος.

3. Τεχνολογία φασματικών απεικονιστικών συστημάτων

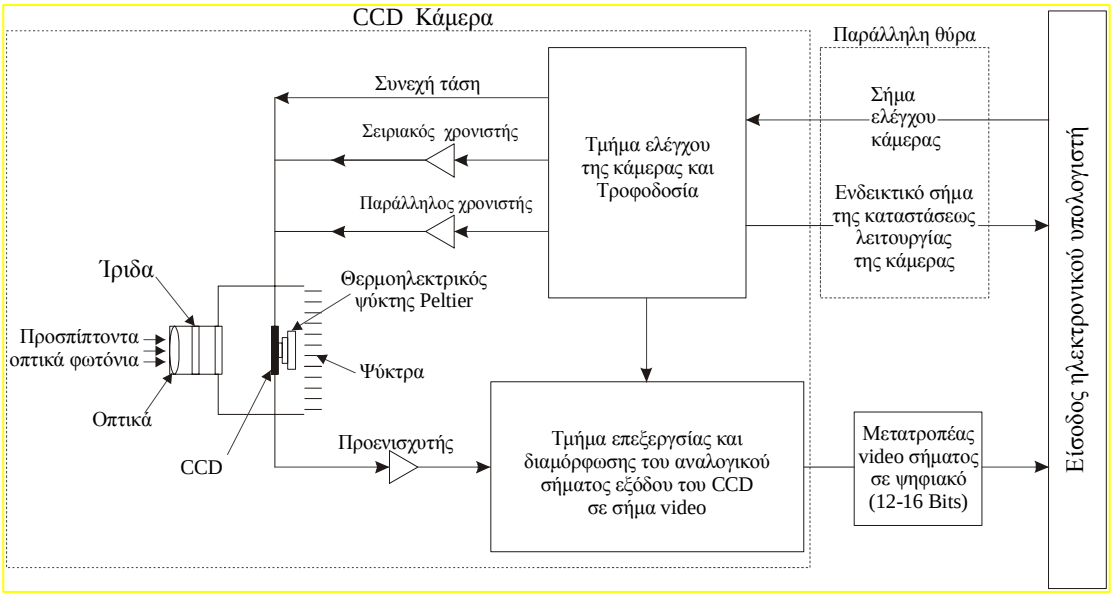
i. Απεικονιστικοί Μονοχρωμάτορες

Τα Ρυθμιζόμενα Φίλτρα Υγρών Κρυστάλλων (LCTF) αποτελούνται από πολλά πακέτα σε σειρά, με κάθε πακέτο να περιέχει ένα διπλοθλαστικό υλικό τοποθετημένο ανάμεσα σε δύο γραμμικούς πολωτές. Οι άξονες διαπερατότητας των πολωτών βρίσκονται σε γωνία 45^0 σε σχέση με το διπλοθλαστικό υλικό, το οποίο αποτελείται από κρύσταλλο quartz και μεταβλητό "waveplate" υγρού κρυστάλλου, σε σειρά. Γραμμικά πολωμένο φως, το οποίο εξέρχεται από τον πολωτή εισόδου περνά από το διπλοθλαστικό υλικό, το οποίο χωρίζει τη δέσμη σε δύο ίσες συνιστώσες: την κύρια και την δευτερεύουσα. Το υλικό εισάγει μια διαφορά φάσης (καθυστέρηση) ανάμεσα στις δύο ορθογώνιες γραμμικές συνιστώσες, η οποία εξαρτάται πρώτον από τη διπλοθλαστικότητα του υλικού και δεύτερον από το μήκος κύματος του φωτός.

Κατά την έξοδο του από το μέσο οι συνιστώσες επανασυνδέονται σε μία γραμμικά, ελειπτικά ή κυκλικά πολωμένη ακτίνα, με βάση τους παραπάνω παράγοντες. Μόνο οι συνιστώσες των κύριων και δευτερευουσών ακτινών που ταλαντώνονται στη διεύθυνση του άξονα διαπερατότητας του πολωτή εξόδου (αναλυτής) θα περάσουν και θα καταγραφούν από τον ανιχνευτή. Αν το προσπίπτον φως είναι πολυχρωματικό τότε συγκεκριμένα μήκη κύματος σχηματίζουν ένα επίπεδο πόλωσης το οποίο είναι γραμμικό και παράλληλο με τον άξονα διαπερατότητας του αναλυτή. Τα άλλα μήκη κύματος θα είναι γραμμικά ή ελειπτικά και κατά μήκος του άξονα απόσβεσης του αναλυτή. Κάθε πακέτο είναι οπτικά διαμορφωμένο να διαδίδει συγκεκριμένες φασματικές περιοχές με την κατάλληλη επιλογή του πάχους του κρυστάλλου quartz.

ii. Ηλεκτρονικά απεικονιστικά συστήματα

Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα βασικά μέρη ενός τυπικού ηλεκτρονικού απεικονιστικού συστήματος. Οι φακοί συγκεντρώνουν τις οπτικές εικόνες στην διάταξη ανίχνευσης. Οι κοινές κάμερες του εμπορίου συνήθως διαθέτουν ένα προστατευτικό φίλτρο υπερύθρων προκειμένου να περιορίζεται η φασματική απόκριση τους αποκλειστικά στην μπάντα του ορατού. Αναλόγως δε των εφαρμογών (ερευνητικές, βιομηχανικές, στρατιωτικές), η κάθε κάμερα δυνατόν να έχει ή να μην έχει αυτό το φίλτρο. Οι έγχρωμες κάμερες έχουν φασματικό εύρος μόνον στο ορατό. Επίσης, οι ψηφιακές κάμερες διαθέτουν ψηφιακό επεξεργαστή εικόνος, με την βοήθεια ενός εσωτερικού μετατροπέα του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC). Είναι φανερό ότι οι αναλογικές κάμερες δεν διαθέτουν τέτοιο μετατροπέα.



Σχήμα 3. Ένα τυπικό ηλεκτρονικό απεικονιστικό σύστημα τύπου Charged Coupled Device (CCD).

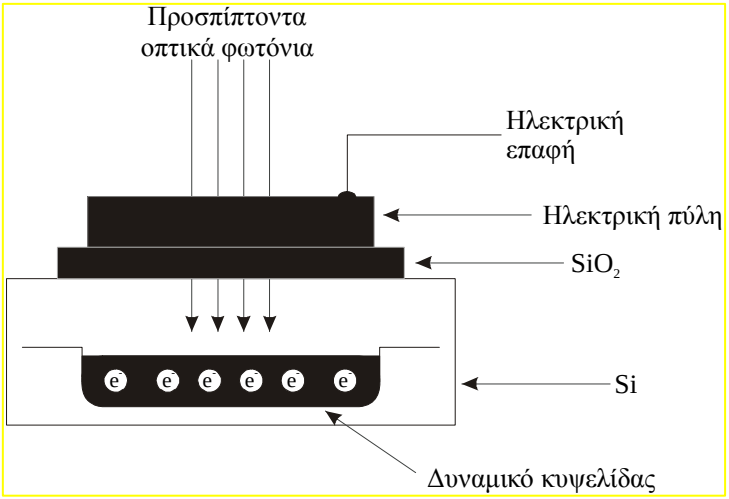
Κατά την διαδικασία ψηφιακής απεικόνισης ή ανακατασκευής εικόνας γίνεται ανασύνθεση των δεδομένων σε σήματα, που μπορεί με την σειρά τους να μεταβιβαστούν ή να επεξεργασθούν. Τα σήματα αυτά μπορεί αυτομάτως να μεταβιβαστούν σε οπτικούς επεξεργαστές, συστήματα μηχανικής όρασης ή ψηφιακές βάσεις δεδομένων. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιείται αναλογική κάμερα, η ίδια διαδικασία επεξεργασίας εικόνας πρέπει να γίνει δια εξωτερικού ψηφιακού μετατροπέα του αναλογικού σήματος. Αυτές οι πολλαπλές μετατροπές του σήματος προκαλούν την τροποποίηση και την αλλοίωσή του. Είναι φανερό λοιπόν, ότι η ψηφιακή τεχνολογία επεξεργασίας εικόνων είναι αυτή που προσφέρει την καλύτερη ποιότητα σήματος.

Προκειμένου να επιτευχθεί η γραμμική μετατροπή από μία εικόνα σε έναν παρατηρητή (monitor), πρέπει αρχικά να γίνει μία αλγοριθμική γ-διόρθωση (gamma correction) για τις ανάγκες των μη γραμμικών αποκρίσεων των monitors. Η γ-διόρθωση είναι αναγκαία κυρίως σε περιπτώσεις όπου υπάρχει καθοδικός σωλήνας (cathode ray tube-CRT). Καθώς η τεχνολογία χρησιμοποιεί όλο και περισσότερο επίπεδες διατάξεις, η γ-διόρθωση δεν είναι απαραίτητη. Ωστόσο, η μικρή έστω ενίσχυση σήματος που προσφέρει η γ-διόρθωση δικαιολογεί την όποια χρήση της. Γενικά πάντως, η γ-διόρθωση δεν χρησιμοποιείται σε διατάξεις μηχανικής όρασης ή για ερευνητικούς σκοπούς.

Ο μετατροπέας του ψηφιακού σε αναλογικό σήμα (digital to analog converter-DAC), καθώς και το κύκλωμα αποθήκευσης εικόνων (sample and hold) οδηγούν σε μία σταδιακή τελική ανασύνθεση του αναλογικού σήματος. Ένα επιπλέον φίλτρο ύστερα από την αναλογική ανασύνθεση, μας δίνει μία τελική εικόνα, που απαρτίζεται από πολλά επιμέρους μη διακριτά μεταξύ των εικονοστοιχεία.

Οι διατάξεις σύζευξης φορτίου (charge coupled device-CCD) αποτελούν ανιχνευτές φωτονίων. Το φωτεινό σήμα μετατρέπεται σε ανιχνεύσιμο ηλεκτρικό φορτίο, μέσω διαδικασίας μεσολάβησης επιμέρους οπτικών ανιχνευτών, των οποίων η πληροφορία αποτελεί την στοιχειώδη πληροφορία της εστιαζόμενης στο CCD εικόνας, το εικονοστοιχείο (pixel). Τα περισσότερα CCD είναι φτιαγμένα από πυρίτιο. Στο κρυσταλλικό πλέγμα του πυριτίου κάθε άτομο είναι στενά συνδεδεμένο

με τα γειτονικά του. Σε κάθε άτομο οι ενεργειακές στάθμες είναι διακριτές. Στην περίπτωση του πλέγματος και λόγω της μικρής απόστασης των ατόμων μεταξύ τους, αλλά και των δυνάμεων που ασκούνται, η κίνηση των ηλεκτρονίων γίνεται σε σύνθετες τροχιές που ανήκουν σε περισσότερα του ενός άτομα. Λόγω λοιπόν του μεγάλου αριθμού των ατόμων του κρυσταλλικού πλέγματος πυριτίου, δημιουργούνται πολλαπλές ζώνες. Διακρίνουμε την ζώνη σθένους (εξωτερικά ηλεκτρόνια), την απαγορευμένη ενεργειακή ζώνη (Eg) στην οποία δεν υπάρχουν ενεργειακές στάθμες και δεν φιλοξενούνται ηλεκτρόνια, και, την ζώνη αγωγιμότητας στην οποία εισέρχονται τα ηλεκτρόνια όταν αποκτήσουν ικανή ενέργεια ώστε να διασπάσουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Η ενέργεια αυτή είναι μεγαλύτερη ή ίση με το εύρος της απαγορευμένης ζώνης. Για τους ημιαγωγούς πυριτίου το πλάτος της απαγορευμένης ζώνης είναι Eg_0=1.2eV (στους 0° K). Η Eg ελαττώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στον κρύσταλλο. Όταν στο κρυσταλλικό πλέγμα πυριτίου τα ηλεκτρόνια σθένους αποκτήσουν ικανή ενέργεια, είτε λόγω απορρόφησης των φωτονίων στο CCD είτε λόγω αύξησης θερμοκρασίας, ανέρχονται στην ζώνη αγωγιμότητας και σχηματίζονται ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών. Προσπίπτουσα ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με την μορφή φωτονίων μήκους κύματος μικρότερης του 1 micron έχει αρκετή ενέργεια για να δημιουργηθούν ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών. Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται διαγραμματικά η συμπεριφορά του πυριτίου σε διάφορες μορφές προσπίπτουσας ενέργειας.



Σχήμα 3. Το κρυσταλλικό πλέγμα πυριτίου σε διάφορες φάσεις διέγερσης.

Στο πυρίτιο υπάρχει μία γραμμική σχέση μεταξύ του μήκους κύματος του προσπίπτοντος φωτός και του βάθους απορρόφησης των φωτονίων: όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος, τόσο μικρότερο είναι το βάθος διείσδυσης στον κρύσταλλο πυριτίου. Το πυρίτιο γίνεται διαπερατό στα 1100nm, ενώ μπορούμε να ανιχνεύσουμε φωτόνια μέχρι τα 400nm. Καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος μπορεί να γίνει είτε λόγω ενδεχόμενης ακτινοβολίας σωματιδίων υψηλής ενέργειας ή λόγω ακτίνων X ή κοσμικής ακτινοβολίας ή και λόγω θερμικής καταστροφής.

Η ψηφιοποίηση είναι η διαδικασία μετατροπής του αναλογικού σε ψηφιακό σήμα. Κατά την ψηφιοποίηση το ηλεκτρικό φορτίο του CCD μετατρέπεται σε δυαδική μορφή ικανή να χρησιμοποιηθεί από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο όρος δυαδικός αναφέρεται στην βάση των δύο αριθμών που ένα υπολογιστικό σύστημα μπορεί να λειτουργήσει. Μία κάμερα 12 bit έχει ικανότητα επεξεργασίας 2^{12} (ήτοι

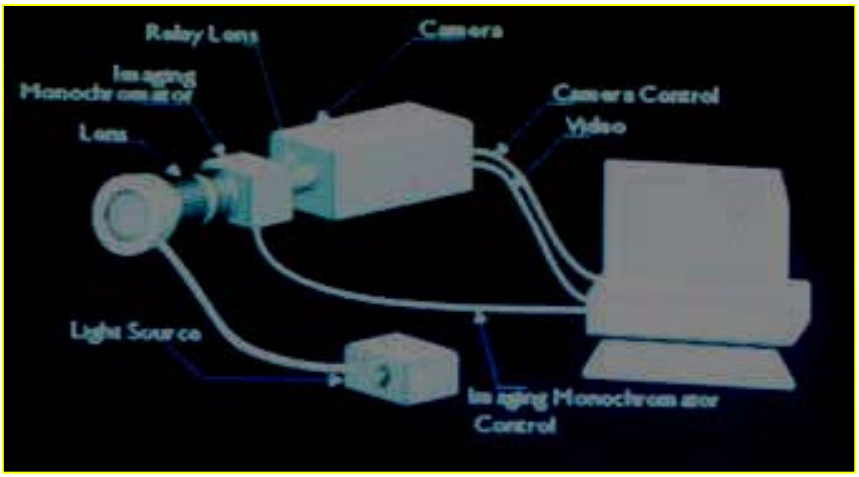
4096) συνδυασμών. Παρομοίως, μία κάμερα 16 bit έχει ικανότητα επεξεργασίας 2^{16} (ήτοι 65536) συνδυασμών.

4. Η έννοια της φασματικής απεικόνισης

Η φασματική απεικόνιση αποτελεί τον συνδυασμό της συμβατικής απεικόνισης με την φασματοσκοπία. Κατά την συμβατική απεικόνιση μία μακροσκοπική ή μικροσκοπική εικόνα καταγράφεται και αποθηκεύεται ως μία σειρά τιμών έντασης κάθε εικονοστοιχείου. Με τις παραδοσιακές φασματοσκοπικές τεχνικές, η χημική σύσταση του υπό εξέταση δείγματος καθορίζεται από την ανάλυση του φωτός που απορροφάται ή εκπέμπεται από αυτό. Σε αυτές τις μετρήσεις, τα δεδομένα παίρνουν μορφή σειράς τιμών εντάσεως σε διάφορα μήκη κύματος. Η εξέλιξη της τεχνολογίας έχει επιφέρει τον συνδυασμό της απεικόνισης με την φασματοσκοπία. Παράλληλα, η χρήση των CCD έχει ως αποτέλεσμα τον χαμηλό θόρυβο, αλλά και την πολυκάναλη καταγραφή δεδομένων συνδυασμού απεικόνισης και φασματοσκοπίας.

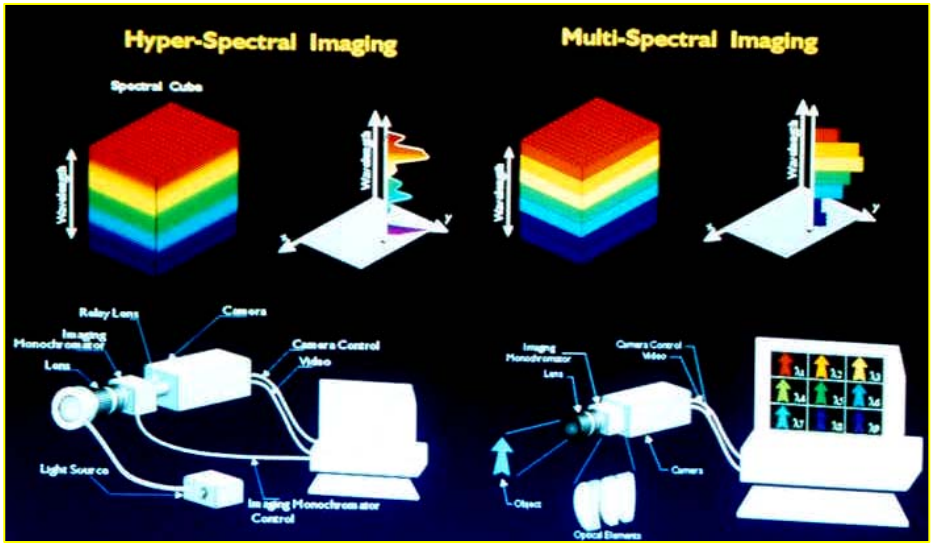
Τα σύγχρονα συστήματα απεικόνισης βασίζονται στην «μετάφραση» της σχετικής πληροφορίας από οπτικούς ανιχνευτές. Ο οπτικός ανιχνευτής προσαρμόζεται στα οπτικά συστήματα (ενδοσκόπια, μικροσκόπια) και είναι σχεδιασμένος στην όσο το δυνατόν προσομοίωση με την ανθρώπινη όραση. Το αποτέλεσμα είναι μία έγχρωμη εικόνα στο εύρος του ορατού φάσματος, που είναι ευαίσθητο το ανθρώπινο μάτι (380-750nm). Αυτό επιτυγχάνεται με την ανίχνευση του φωτός σε τρεις διαφορετικές φασματικές περιοχές (κόκκινο, πράσινο και μπλε). Αυτή η ανιχνευτική διαδικασία χαρακτηρίζεται από πλήθος περιορισμών στην διαφοροποίηση και ταυτοποίηση αντικειμένων, με τα ίδια ή παρόμοια χρωματικά χαρακτηριστικά, αλλά με διαφορετική χημική σύσταση. Στην κλινική πράξη και ειδικά για τους υπό εξέταση ιστούς, αυτό το γεγονός έχει πολλά συνοδά μειονεκτήματα. Έτσι, παρατηρείται διαγνωστική ανεπάρκεια, λόγω του ότι μεταβολικές ή δομικές ιστικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη μιας υπερκείμενης νόσου, δεν συνδυάζονται με στατιστικά σημαντική και ειδικά ανιχνεύσιμη χρωματική μεταβολή στον μη φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον διαγνωστική πληροφορία μπορεί να αποκτηθεί με την ανάπτυξη συστημάτων ανίχνευσης, που επεκτείνουν τις ικανότητες της ανθρώπινης όρασης στον τομέα της φασματικής ευαισθησίας και ανάλυσης. Αυτό δυνητικά θα επιτρέψει την ανίχνευση και διαφοροποίηση (χωρική και φασματική) διαφόρων ιστικών αλλοιώσεων που εμφανίζουν παρόμοια χρωματικά χαρακτηριστικά, βασιζόμενη στις φασματικές διαφορές που εμφανίζονται εντός στενών φασματικών περιοχών στο ορατό ή το μη ορατό φάσμα. Τούτο επιτυγχάνεται με την Φασματική Απεικόνιση.

Η αρχιτεκτονική και τα μέρη ενός τυπικού φασματικού απεικονιστικού συστήματος παρουσιάζονται στο σχήμα 5. Αυτό αποτελείται από *ι)* τον απεικονιστικό μονοχρωμάτορα, που είναι ένα μεταβλητό οπτικό φίλτρο που επιτρέπει την μεταβίβαση εικόνων σε στενές φασματικές περιοχές, και *ιι)* από μία CCD διάταξη για την καταγραφή των μεταβιβαζόμενων εικόνων. Τόσο ο απεικονιστικός μονοχρωμάτορας όσο και η CCD κάμερα χρειάζονται ειδικούς ρυθμιστές (controllers). Ο δε συγχρονισμός μεταξύ τους επιτυγχάνεται με την βοήθεια υπολογιστή με το κατάλληλο software και hardware.



Σχήμα 5. Τυπική δομή φασματικού απεικονιστικού συστήματος.

Στην Φασματική Απεικόνιση, η ένταση του φωτός καταγράφεται ως συνάρτηση του μήκους κύματος σε μία συγκεκριμένη θέση (σχήμα 6). Πιο συγκεκριμένα, το απεικονιστικό μέρος περιλαμβάνει μία πλήρη εικόνα σε κάθε διακριτό μήκος κύματος, με ένα καθορισμένο εύρος του φάσματος. Από φασματοσκοπικής πλευράς, ένα πλήρες φάσμα μπορεί να καταγραφεί σε κάθε ένα εικονοστοιχείο (pixel). Ο αριθμός των φασματικών περιοχών που ένα φασματικό απεικονιστικό σύστημα είναι ικανό να δουλέψει, καθορίζει και την ταξινόμησή τους σε Πολυφασματικά (δεκάδες φασματικές περιοχές) ή Υπερφασματικά (εκατοντάδες φασματικές περιοχές).



Σχήμα 6. Η γενική ιδέα των Πολυ- και Υπερφασματικών απεικονιστικών συστημάτων.

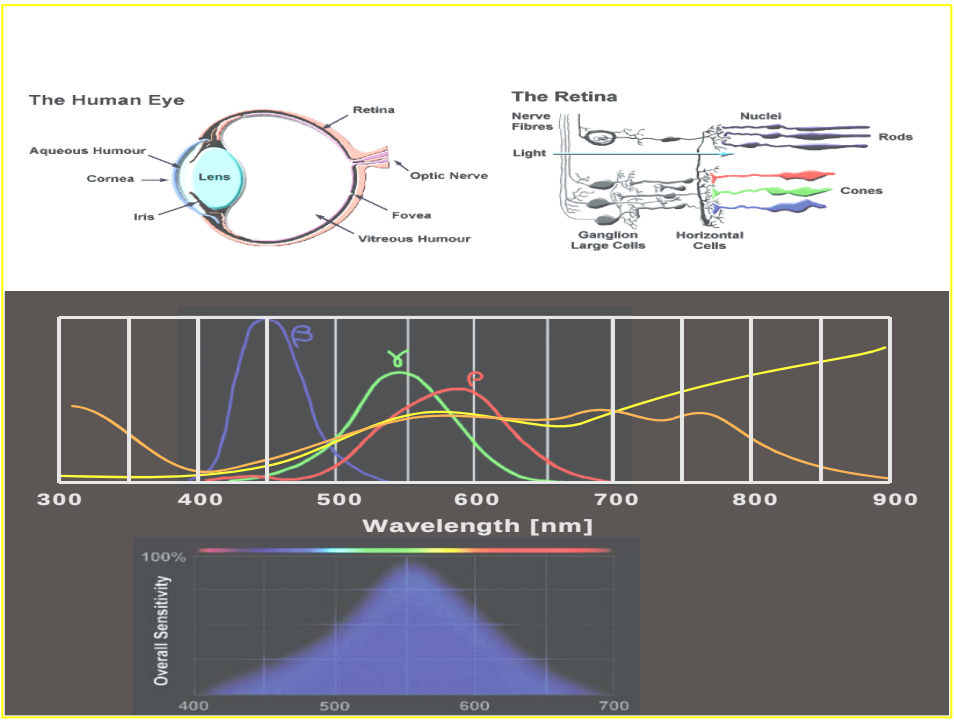
Τα Φασματικά Απεικονιστικά συστήματα προσφέρουν ταυτόχρονη χωρική και δομική πληροφορία, επιτρέποντας την δυνητική εξέταση ιστικών αλλοιώσεων ή ακόμα και δυναμικών ως προς τον χρόνο φαινομένων που συμβαίνουν στον ιστό, με εκπληκτική αναλυτική δυνατότητα. Η φασματική πληροφορία μπορεί δυνητικά να συμβάλλει στην in vivo ταυτοποίηση ιστικών αλλοιώσεων, βασιζόμενη σε

συγκεκριμένες βιοχημικές και δομικές ιστικές παραμέτρους. Ως αποτέλεσμα, η πολυφασματική απεικόνιση επιτρέπει την δυναμική και επιλεκτική απεικόνιση, όπως και τη χαρτογράφηση συγκεκριμένων ιστικών χαρακτηριστικών υψηλής διαγνωστικής αξίας προσφέροντας αναλυτικές φασματικές πληροφορίες, για κάθε χωρικό σημείο της εικόνας. Από την άλλη μεριά, η εκλεκτική απεικόνιση σε συγκεκριμένες φασματικές περιοχές συμβάλλει στην μέγιστη διαφοροποίηση των φασματικών χαρακτηριστικών, μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, με αποτέλεσμα την καταγραφή σήματος μέγιστης αντίθεσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνον την καλύτερη εντόπιση της όποιας ιστικής αλλοίωσης, αλλά και τον επακριβή καθορισμό αυτής υπό υγιών ορίων, γεγονός ύψιστης σημασίας στον σχεδιασμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Η υπερφασματική απεικονιστική τεχνολογία χαρακτηρίζεται από καταγραφές υψηλής φασματικής ανάλυσης, προσφέροντας ταυτόχρονα in situ ιστική μη επεμβατική πληροφορία. Συνιστά έτσι ένα πολύ ισχυρό ερευνητικό εργαλείο, του οποίου η εφαρμογή σε in vivo και in vitro πειραμάτα θα οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων διαγνωστικών μεθόδων και κριτηρίων. Με βάση τα ερευνητικά αυτά δεδομένα είναι δυνατόν να κατασκευαστούν πολυφασματικά απεικονιστικά συστήματα εξειδικευμένων κλινικών εφαρμογών, χρήσιμων σε πλήθος ιατρικών ειδικοτήτων. Επιπροσθέτως, σε πολλές ερευνητικές και βιομηχανικές εφαρμογές γίνεται χρήση μεθόδων ηλεκτρονικής απεικόνισης προκειμένου να καθοριστεί η μορφολογία, γεωμετρία ή αρχιτεκτονική του υπό εξέταση αντικειμένου, σε άμεση συχνά καταγραφή δυναμικών ως προς τον χρόνο των γεγονότων. Επεκτείνοντας τα υπάρχοντα όρια της σύγχρονης γνώσης, η Φασματική Απεικόνιση συνυσφέρει στην ανάπτυκη καινοτόμων διαγνωστικών μεθόδων και συστημάτων, αποκαλύπτοντας ταυτόχρονα νέα πεδία ερευνητικής δραστηρίοτητας.

5. Η πολυφασματική απεικόνιση στη μη επεμβατική διάγνωση των ιστικών αλλοιώσεων

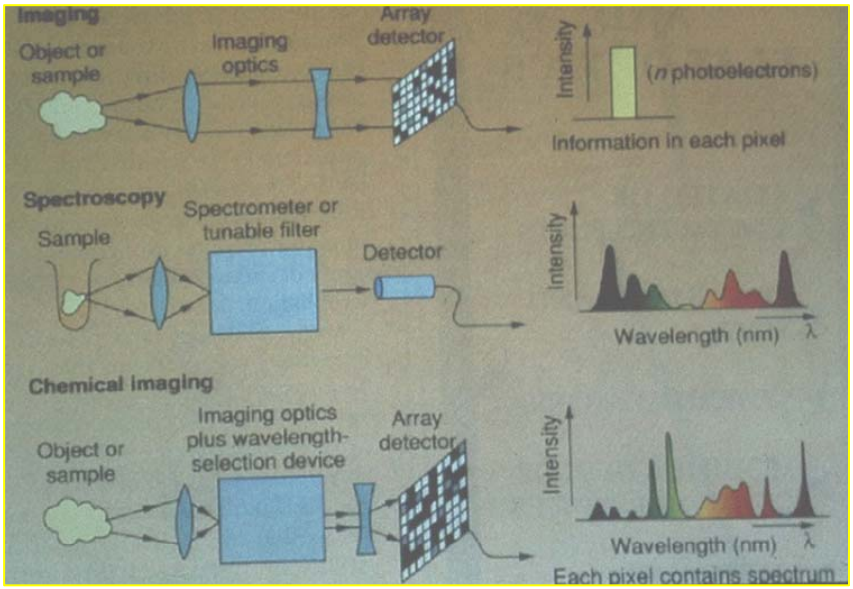
Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση του φωτός με κάποιον ιστό επηρεάζεται έντονα από τη χημική σύνθεση και την κυτταρική δομή του ιδίου του ιστού. Ταυτόχρονα, υπάρχουν αρκετές παθολογικές καταστάσεις, όπου η μεταβολή της σύστασης του ιστού, όπως λόγου χάρη από φυσιολογικού σε καρκινικού, συσχετίζεται με χημικές και δομικές αλλαγές. Έτσι, όταν ένα δείγμα ιστού διεγείρεται από μία δέσμη φωτός, η φασματική κατανομή του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός περιέχει διαγνωστικές πληροφορίες χαρακτηριστικές για τον ιστό, που δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη διαφοροποίηση διαφόρων αλλοιώσεων, όσο και στην, σε μερικές περιπτώσεις, ταυτοποίησή τους. Αυτές οι ιδιότητες του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός δεν δύνανται να αξιοποιηθούν από το ανθρώπινο οπτικό σύστημα, εξαιτίας της περιορισμένης φασματικής του ανάλυσης (τριχρωματική όραση), αλλά και του δυναμικού του εύρους (σχήμα 7). Γι αυτόν τον λόγο, η ταυτοποίηση των ιστικών αλλοιώσεων πραγματοποιείται μέσω της κλασικής ιστοπαθολογικής εξέτασης, ύστερα από λήψη βιοψιών.



Σχήμα 7. Η τριχρωματική όραση. Το ορατό φάσμα.

Για την αποφυγή των μειονεκτημάτων που σχετίζονται με τις συνηθισμένες τεχνικές βιοψίας (υποκειμενική ερμηνεία, χρόνος, κόστος, επιλεκτική λήψη ιστοτεμαχίων, χειρουργική προσέγγιση, κ.α.), έχουν χρησιμοποιηθεί σημειακές φασματοσκοπικές μέθοδοι που βασίζονται στην διασπορά του φωτός, όπως ο φθορισμός, η σκέδαση Raman, ο φωσφορισμός, η ελαστική σκέδαση κ.α.. Οι μέθοδοι αυτές παρέχουν μη επεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και ανάλυση των ιστών (οπτική βιοψία). Τα αποτελέσματα χρήσεως των μεθόδων αυτών δείχνουν ότι η οπτική βιοψία εξελίσσεται ως μία νέα σημαντική διαγνωστική οντότητα. Τα ίδια αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι οι διαγνωστικές δυνατότητες αυτών των μη απεικονιστικών φασματοσκοπικών τεχνικών, περιορίζονται από το γεγονός ότι δεν παρέχουν χωρική πληροφορία, η οποία όμως είναι πολύ σημαντική στον οπτικό χαρακτηρισμό ανομοιογενών υλικών, όπως οι περισσότεροι βιολογικοί ιστοί.

Επιπροσθέτως, η επιλογή των υπό εξέταση ιστικών περιοχών είναι υποκειμενική και βασίζεται στις ανθρώπινες δυνατότητες όρασης. Βασιζόμενοι στην πρόσφατες τεχνολογικές καινοτομίες (υψηλής απόδοσης CCD κάμερες, infrared focal plane arrays, μεταβλητού μήκους κύματος λέιζερ και φασματικά φίλτρα) είναι πλέον δυνατό να συνδυάσουμε την απεικόνιση με την φασματοσκοπία, σε ένα νέο τομέα που ονομάζεται πολυφασματική απεικόνιση, όπου η ένταση του φωτός καταγράφεται ως μια συνάρτηση του μήκους κύματος και της θέσης (σχήμα 8). Το απεικονιστικό μέρος περιλαμβάνει μία πλήρη εικόνα σε κάθε διακριτό μήκος κύματος, σε ένα μεγάλο εύρος του φάσματος. Στο φασματοσκοπικό μέρος, ένα πλήρες φάσμα μπορεί να καταγραφεί για κάθε εικονοστοιχείο.



Σχήμα 8. Η πολυφασματική απεικόνιση επιτρέπει την δυναμική και επιλεκτική απεικόνιση και χαρτογράφηση συγκεκριμένων ιστικών συστατικών υψηλής διαγνωστικής αξίας προσφέροντας αναλυτικές πληροφορίες για κάθε χωρικό σημείο της εικόνας. Η έννοια της πολυφασματικής και υπερφασματικής απεικόνισης.

Στο εργαστήριο οπτικής φασματικής απεικόνισης του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) έχουν αναπτυχθεί καινοτόμα απεικονιστικά συστήματα που συνδυάζουν απεικόνιση και φασματοσκοπία, καταγράφοντας την ένταση του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος και της θέσης. Η ανάπτυξη των οπτικών και αναλυτικών δυνατοτήτων της πολυφασματικής απεικόνισης, συσχετίζεται με πλήθος εφαρμογών στην ιατρική. Η πολυφασματική απεικόνιση αποτελεί μια νέα προοπτική στην ταυτοποίηση και μελέτη των ιστικών αλλοιώσεων, προχωρώντας πέρα από το όριο της συμβατικής κλινικής διάγνωσης, σε νέους τομείς που μέλλει να ερευνηθούν.

6. Φυσικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός-ιστού

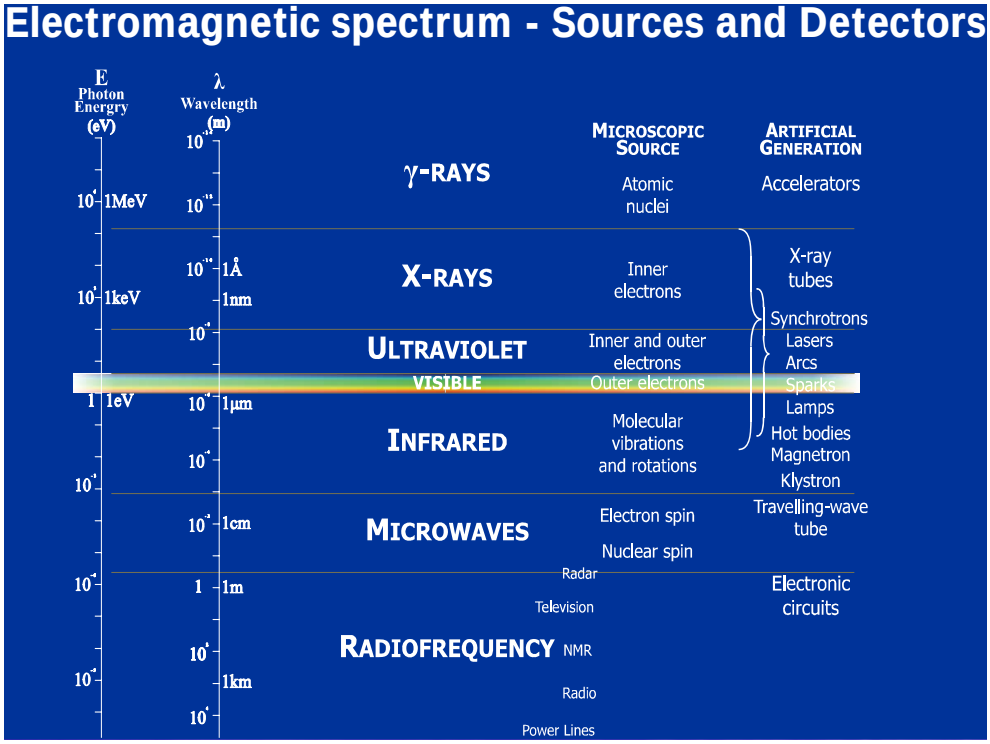
6.1. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς δείκτες της δομής και δυναμικής της ύλης. Η μελέτη της απορρόφησης της υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για τα ενεργειακά επίπεδα των μορίων και αποτελεί μέσο εκτίμησης της πολύπλοκης δομής των.

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα διαιρείται σε επιμέρους μήκη κύματος. Το ορατό κομμάτι του φάσματος, στο οποίο είναι ευαίσθητο το ανθρώπινο μάτι, αποτελεί ένα ελάχιστο τμήμα σε σχέση με τις υπόλοιπες φασματικές περιοχές (σχήμα 9).

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Είδος ακτινοβολίας	Εύρος συχνοτήτων (Hz)	Μήκος κύματος	Τύπος μετάδοσης
Ακτίνες Gamma	10^{20}-10^{24}	<10^{-12} m	Nuclear
Ακτίνες X	10^{17}-10^{20}	1 nm-1 pm	inner electron
Υπεριώδες	10^{15}-10^{17}	1 nm-400 nm	outer electron
Ορατό	4-7.5x10^{14}	400 nm-750 nm	outer electron
Κοντινό Υπέρυθρο	1x10^{14}-4x10^{14}	750 nm-2.5 um	outer electron molecular vibrations
Υπέρυθρο	10^{13}-10^{14}	2.5 um-25 um	molecular vibrations
Μικροκύματα	3x10^{11}-10^{13}	25 um-1 mm	molecular rotations, electron spin flips*
Ραδιοκύματα	<3x10^{11}	>1 mm	nuclear spin flips*



Σχήμα 9. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Οι ανθρώπινοι ιστοι αποτελούν ένα πολύπλοκο είδος ύλης και διεξάγονται λεπτομερείς έρευνες όσον αφορά την αλληλεπίδρασή της με το φως. Οι οπτικές διαδικασίες που κυριαρχούν σε αυτή την αλληλεπίδραση είναι η απορρόφηση και η σκέδαση.

Το δέρμα είναι ο πιο εκτενής ανθρώπινος ιστός και είναι ο πρώτος που έρχεται σε επαφή απευθείας με το φως. Μια καθημερινή εμπειρία του φαινομένου είναι η επαφή με το ηλιακό φως. Η διερεύνηση των οπτικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου δέρματος είναι δυνατόν να μας παράσχει στοιχεία για την κατανόηση

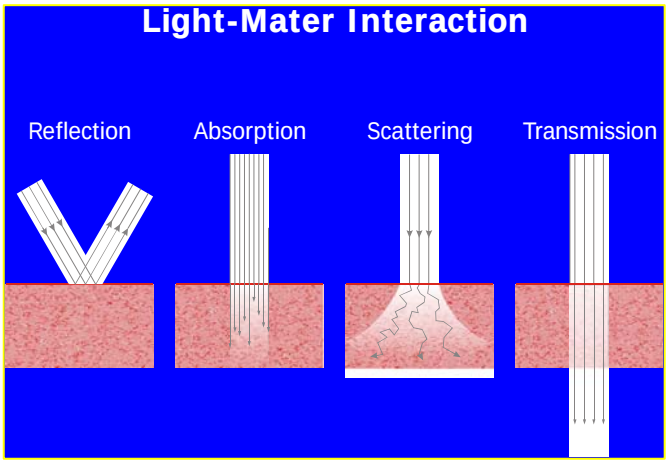
της αλληλεπίδρασης του φωτός με άλλους ανθρώπινους ιστούς. Τα πράγματα περιπλέκονται από την συνύπαρξη διαφόρων κύριων απορροφητικών μορίων στο δέρμα σε συνδυασμό με την ετερογένεια των οπτικών τους ιδιοτήτων. Οι ευρείες και πολλαπλές ζώνες απορρόφησης των δερματικών χρωστικών και η διάχυτη σκέδαση του εισερχόμενου φωτός κάνει δύσκολη την εντόπιση των οπτικών χαρακτηριστικών.

6.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός-ιστού

Το φως, συνήθως, διαμορφώνεται όταν προσπίπτει πάνω σε ένα αντικείμενο -ιστός στην περίπτωσή μας-. Η διαμόρφωση αυτή εξαρτάται από τα δομικά χαρακτηριστικά του ίδιου του ιστού. Συνεπώς, η διερεύνηση και ανάλυση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός προσφέρει σημαντική πληροφορία για τον ίδιον τον ιστό. Ο επιστημονικός τομέας που ασχολείται με τις μεθόδους αναλυτικής μελέτης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός είναι η φασματοσκοπία.

Φασματοσκοπία καλείται ο επιστημονικός τομέας μελέτης των μηχανισμών απορρόφησης, εκπομπής ή σκέδασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από άτομα ή μόρια, προκείμενου ποιοτικά ή ποσοτικά να μελετηθούν αυτά τα άτομα ή μόρια, καθώς και τα φαινόμενα σχετιζόμενα με συνοδές φυσικές διεργασίες, κατά την αλληλεπίδρασή τους με ένα αντικείμενο. Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με ένα αντικείμενο μπορεί δυνητικά να προκαλέσει αλλαγή της διεύθυνσης της ακτινοβολίας ή/και μεταβολές των ενεργειακών επιπέδων των εμπλεκομένων ατόμων ή μορίων. Η μετάπτωση από ένα χαμηλό σε ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο με σύγχρονη μεταβίβαση ενέργειας από το πεδίο ακτινοβολίας στο άτομο ή στο μόριο καλείται απορρόφηση (absorption). Η μετάπτωση από ένα υψηλό σε ένα χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο καλείται εκπομπή (emission) εάν η απελευθερωμένη ενέργεια αποδίδεται στο πεδίο ακτινοβολίας ή μη ραδιενεργός αποσύνθεση (decay) εάν δεν εκπέμπεται ακτινοβολία. Αλλαγή της διεύθυνσης του φωτός λόγω της αλληλεπίδρασής του με ένα αντικείμενο (π.χ. ιστός), καλείται σκέδαση (scattering) και δύναται ή όχι να συνοδεύεται με μεταφορά ενέργειας. Έτσι, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία μπορεί να έχει ίδιο ή ελαφρώς διαφορετικό μήκος κύματος.

Η δυνητική ικανότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών στο να παράσχουν μη επεμβατική, αντικειμενικώς καταγεγραμμένη ποσοτική πληροφορία, σχετικά με την διαφοροποίηση των ύποπτων δυσπλαστικών ή κακοήθων ιστικών αλλοιώσεων αποτελεί επιστημονικό θώκο πολλών ερευνητών. Το πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών τεχνικών έγκειται στην ικανότητα της ανίχνευσης και ποσοτικής εκτίμησης αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και σε επίπεδο αρχιτεκτονικής ιστού σχετιζόμενης με την εξέλιξη της αλλοίωσης. Αρκετές φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στον τομέα της οπτικής διάγνωσης βασιζόμενες στην διερεύνηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης φωτός-ιστού. Υπάρχουν αρκετοί, διαφορετικοί, πλην όμως σχετιζόμενοι μηχανισμοί (σχήμα 10). Ακολούθως, παρουσιάζεται η περιγραφή των μηχανισμών αυτών εν συντομία.



Σχήμα 10. Αλληλεπίδραση φωτός-ιστού. Απεικόνιση μηχανισμού ανάκλασης, απορρόφησης, σκέδασης και διαπέρασης.

Απορρόφηση

Όταν άτομα ή μόρια απορροφούν φως ή μεταβιβαζόμενη ενέργεια διεγείρει συγκεκριμένες δομές σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο. Ο τύπος της διεγέρσεως σχετίζεται με το μήκος κύματος του φωτός. Έτσι, το μεν υπεριώδες ή το ορατό φως προκαλούν μετακίνηση ηλεκτρονίων σε υψηλότερη τροχιά, το υπεριώδες φως προκαλεί στα ηλεκτρόνια δονήσεις, ενώ τα μικροκύματα προκαλούν περιστροφές. Συνεπώς, ένα φάσμα απορρόφησης εκφράζει την απορρόφηση του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Το φάσμα ενός ατόμου ή μορίου εξαρτάται από την ενεργειακή του στάθμη και συνεπώς τα φάσματα απορρόφησης είναι πολύ χρήσιμα στην ταυτοποίηση των συστατικών ενός δείγματος.

- Η μέτρηση της συγκέντρωσης των συστατικών ενός δείγματος αναλόγως των φασμάτων απορρόφησης, γίνεται με την εφαρμογή του νόμου των Beer-Lambert: Έστω δέσμη παράλληλης μονοχρωματικής ακτινοβολίας, ισχύος P_0, χτυπά κύτταρο το οποίο περιέχει διάλυμα συγκεντρώσεως C σε απορροφητικό υλικό και πάχους b cm. Ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ φωτονίων και απορροφητικών σωματιδίων, η ισχύς της δέσμης εξασθενεί από P_0 σε P.

Η διαπερατότητα T του διαλύματος καθορίζεται σαν το κλάσμα:
$T=P/P_0$
Η διαπερατότητα του διαλύματος εκφράζεται ως:

$$A= -\log T = -\log P/P_0 \text{ (Beer's Law)}$$

Επίσης:

$$A = abC = P/P_0$$

Όπου: C = η συγκέντρωση του διαλύματος σε moles/lt
b = το μήκος του κυττάρου σε cm
a = η μοριακή αγωγιμότητα σε lt/cm x mole

Εκπομπή

Άτομα ή μόρια που διεγείρονται σε υψηλά ενεργειακά επίπεδα μπορεί να μεταπέσουν σε χαμηλότερα επίπεδα, εκπέμποντας παράλληλα ακτινοβολία. Για άτομα που διεγείρονται από ενεργειακή πηγή υψηλής θερμοκρασίας, αυτή η εκπομπή φωτός καλείται ατομική ή οπτική εκπομπή, ενώ για άτομα που διεγείρονται με το φως η εκπομπή καλείται ατομικός φθορισμός. Για τα μόρια, φθορισμός καλείται όταν η μετάπτωση γίνεται μεταξύ καταστάσεων της ιδίας ενεργειακής τροχιάς (spin), ενώ φωσφορισμός όταν η μετάπτωση γίνεται μεταξύ καταστάσεων διαφορετικής ενεργειακής τροχιάς. Η ένταση εκπομπής μίας ουσίας είναι γραμμικώς ανάλογη με την συγκέντρωση της ουσίας και συνεπώς η μέτρησή της είναι χρήσιμη στον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας αυτής. Ο μοριακός φθορισμός είναι η οπτική εκπομπή από μόρια που έχουν διεγερθεί σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, λόγω απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το μεγάλο πλεονέκτημα της ανίχνευσης του φθορισμού έναντι της μέτρησης της απορρόφησης είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία της μέτρησης, μια που το σήμα του φθορισμού εξ ορισμού έχει μηδενικό φόντο (background). Οι αναλυτικές εφαρμογές περιλαμβάνουν ποσοτικές μετρήσεις διαφόρων μορίων σε διαλύματα, καθώς και ανίχνευση φθορισμού σε υγρή χρωματογραφία.

- <u>Συγκέντρωση και ένταση φθορισμού:</u> Η ένταση φθορισμού ενός φθορίζοντος μορίου είναι ανάλογη της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης, η οποία απορροφάται από το σύστημα.

Αυτό δίνει:

$$F = K (P_0 – P) \qquad (1)$$

Όπου: K = η σταθερά ρυθμού που εξαρτάται από την ποσότητα παραγωγής φθορισμού

P_0 = η ισχύς της ακτινοβολίας διέγερσης (προσπίπτουσα ακτίνα)

P = η ισχύς της ακτινοβολίας φθορισμού (ανακλώμενη ακτίνα)

Η απορρόφηση ενός διαλύματος δίνεται από την εξίσωση:

$$A = -\log P/P_0 \quad (2)$$

Όπου: $A = abC$

και $P/P_0 = 10^{-abC}$

Ο συνδυασμός των εξισώσεων (1) και (2) δίνει:

$$F = K P_0 (1-10^{-abC})$$

Σε χαμηλές απορροφήσεις (i.e. $A = abC < 0.05$) μπορεί να θεωρηθεί ότι ισχύει το:

$$F = 2.3 K abC P_0 \text{ ή } F = K'C$$

Η τελευταία αυτή εξίσωση οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι γραμμική σχέση μεταξύ ακτινοβολίας φθορισμού, F, και συγκεντρώσεως του διαλύματος , C, υπάρχει μόνο στην περίπτωση που η δεύτερη είναι χαμηλή.

Σε υψηλές συγκεντρώσεις η γραμμική σχέση χάνεται:

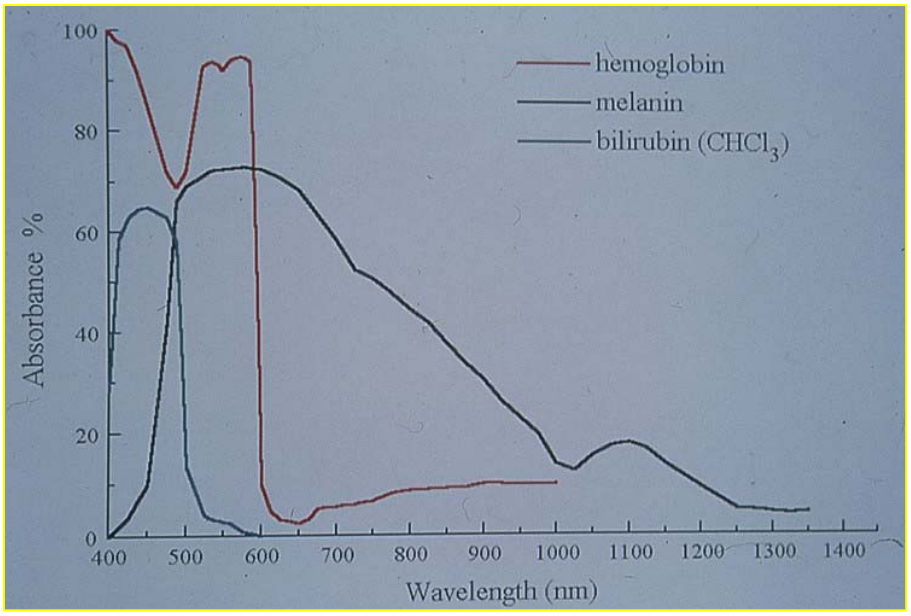
Σκέδαση

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περνά μέσα από ένα υλικό (π.χ. ιστικό δείγμα), ένα κλάσμα της αλλάζει κατεύθυνση. Όταν το φως σκεδάζεται στο ίδιο μήκος κύματος με το προσπίπτον σε ένα αντικείμενο φως, έχουμε σκέδαση Rayleigh. Σε περιπτώσεις διαφανών στερεών, όπου το φως σκεδάζεται λόγω δονήσεων (phonons) έχουμε σκέδαση Brillouin. Στην σκέδαση Brillouin υπάρχει χαρακτηριστική απόκλιση 0.1-1 cm^{-1} από το προσπίπτον φως. Όταν το φως σκεδάζεται σε στερεά, λόγω μοριακών δονήσεων ή οπτικών phonons έχουμε σκέδαση Raman. Στην σκέδαση Raman υπάρχει χαρακτηριστική απόκλειση 4000 cm^{-1} από το προσπίπτον φως.

Σε αντίθεση με την διάταξη των φασματόμετρων απορρόφησης, στα φασματόμετρα φθορισμού το υπό εξέταση αντικείμενο φωτίζεται με μονοχρωματικό φως, σε διάφορα μήκη κύματος, με την βοήθεια ενός μονοχρωμάτορα διέγερσης. Και στις δύο περιπτώσεις, η διέγερση και επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας μπορεί να γίνει με την βοήθεια οπτικών ινών, επιτυγχάνοντας in situ μη επεμβατική ανάλυση.

6.3. Φασματοσκοπία και μη επεμβατική διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων

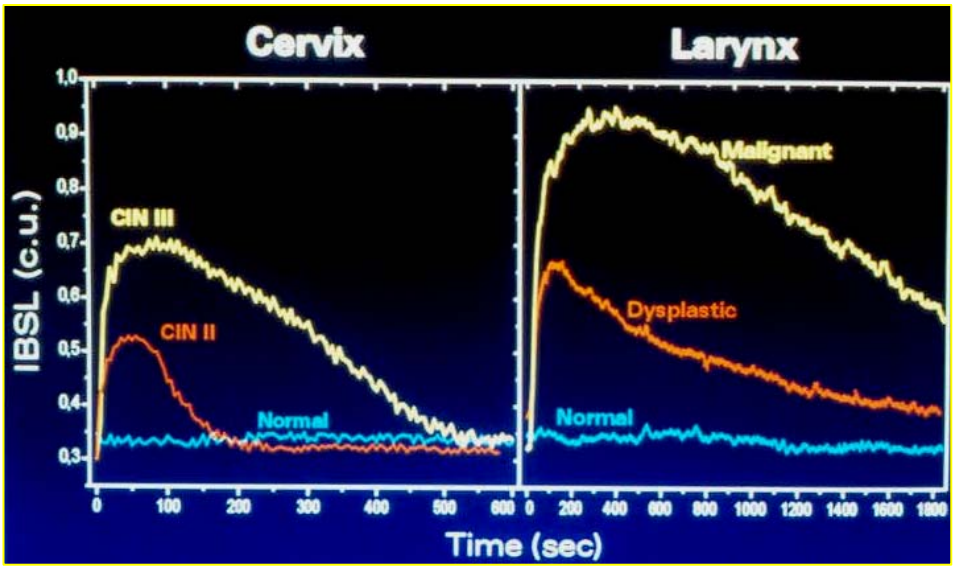
Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται σε έναν ιστό, το διεγερμένο μόριο μπορεί να επιστρέψει στην αρχική ενεργειακή κατάσταση με ακτινοβολία. Το φάσμα του εκπεμπόμενου φωτός «φέρει» πληροφορία, τόσο για την παρουσία διάφορων μορίων στον ιστό, όσο και για τυχών δομικές αλλαγές στον ίδιο τον ιστό. Πρέπει σε αυτό το σημείο να τονιστεί ότι κατά την αποδιαφοροποίηση του φυσιολογικού ιστού σε καρκινικό συμβαίνουν πολλές αλλαγές τόσο στην δομή όσο και στην σύσταση του ιστού. Οι μεταβολές σύστασης σχετιζόμενες με κάποια παθολογική κατάσταση του ιστού μπορεί να καταγραφούν μετρώντας σήματα απορρόφησης, φθορισμού ή της σκέδασης (ελαστικής, μη ελαστικής). Παράλληλα, δομικές και μορφολογικές πληροφορίες μπορεί να αποχτηθούν με τεχνικές που διερευνούν τις ιδιότητες ελαστικής σκέδασης του ιστού. Οι ιστοί περιέχουν χρωμοφόρες και φθορίζουσες ουσίες μεγάλης διαγνωστικής σημασίας, όπως η τρυπτοφάνη, η ελαστίνη, το κολλαγόνο, το νικοτιναμίδιο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADH) και οι φλαβίνες. Τα φασματικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στο σχήμα 11.



Σχήμα 11. Φασματικά χαρακτηριστικά κοινών ιστικών χρωμοφόρων.

Σε παθολογικές καταστάσεις, η σχετική συγκέντρωση αυτών των συστατικών στον ιστό δυνατόν να διαφοροποιηθεί. Αυτό το γεγονός, συνεπάγεται την φασματική διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού. Αυτές οι πολύ απλές βασικές αρχές είναι θεμελιώδεις, τόσο για την ανίχνευση του καρκίνου όσο και σε άλλες εφαρμογές, όπως η ανίχνευση του κορεσμού του οξυγόνου, η ανίχνευση της αθηρωμάτωσης, κ.τ.λ.

Το ερέθισμα για την χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού στην διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων αποτελεί το γεγονός, ότι ο φθορισμός είναι ευαίσθητος σε μεταβολές που συμβαίνουν σε βιοχημικό επίπεδο. Έτσι, η μέτρηση του ιστικού φάσματος είναι δυνατόν να συνεπάγεται την εκτίμηση της βιοχημικής κατάστασης του υπό εξέταση ιστού. Υπάρχει πλήθος in vivo και in vitro μελετών σε διάφορα όργανα και συστήματα, που επιτυχώς παρουσιάζουν τις δυνατότητες της φασματοσκοπίας στην διαφοροποίηση φυσιολογικών από μη φυσιολογικούς ιστούς. Ως αποτέλεσμα, η καταγραφή φασματικών καμπυλών δίνει ποσοτική διαγνωστική πληροφορία, αντανακλώντας συγκεκριμένες βιοχημικές διαφορές οι οποίες σχετίζονται με συγκεκριμένες παθολογικές κατάστασεις των ιστών. Στην κατεύθυνση τέτοιου τύπου καταγραφών έχει συνεισφέρει κατά πολύ και η παρούσα διατριβή, όπως θα αναπτυχθεί με λεπτομέρεια στο «ειδικό μέρος» (σχήμα 12).



Σχήμα 12. Φασματικές καμπύλες ενδεικτικές συγκεκριμένης παθολογίας.

Ωστόσο, η μέτρηση του φθορισμού σε έναν ιστό δεν στερείται δυσκολιών ή και εμπλοκών. Η σκέδαση στους ανθρώπινους ιστούς είναι πολύ μεγάλη, με αποτέλεσμα να υπάρχει παραμόρφωση του σήματος του φθορισμού. Έτσι, είναι πολύ συχνό το φαινόμενο - σε διάφορες οπτικές διατάξεις-, η αυξημένη σκέδαση να προκαλεί διαφοροποίηση της φασματικής καμπύλης φθορισμού. Οι ιστοί περιέχουν επίσης και μη φθορίζουσες χρωμοφόρες, όπως η αιμοσφαιρίνη. Η απορρόφηση από τις μη φθορίζουσες χρωμοφόρες, του εκπεμπόμενου από τις φθορίζουσες ουσίες φωτός έχει ως αποτέλεσμα την διαστρέβλωση της καμπύλης φθορισμού.

Η χρήση μίας τεχνικής που να είναι ευαίσθητη στις μεταβολές του μήκους κύματος ανάλογα με την σκέδαση, καθώς επίσης και στις μεταβολές απορρόφησης είναι αναγκαία. Κι αυτό διότι η συντριπτική πλειοψηφία των ιστικών αλλοιώσεων, όπως οι καρκινικές βλάβες, συνοδεύονται με σημαντικές αρχιτεκτονικές δομές σε κυτταρικό και ενδοκυτταρικό επίπεδο. Η ανίχνευση και διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων με την βοήθεια φασματικών δεδομένων του ελαστικά σκεδαζόμενου φωτός είναι μία ευαίσθητη μέθοδος, αφού υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης των ιδιοτήτων σκέδασης και απορρόφησης του ιστού, σε πολλά μήκη κύματος. Σκοπός λοιπόν αυτής της τεχνικής είναι η αντιστοίχηση συγκεκριμένων φασματικών χαρακτηριστικών με συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτές καθορίζονται από τους παθολογοανατόμους.

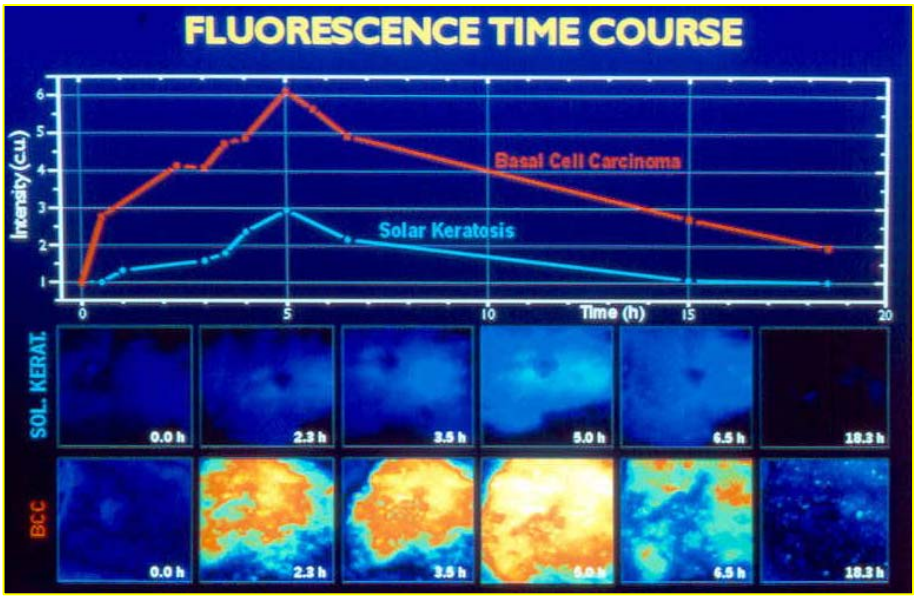
Παράλληλα με την φασματοσκοπία φθορισμού, σκέδασης ή απορρόφησης του ίδιου του ιστού, δυνατόν να υπάρχουν και συνδυασμένες μετρήσεις. Αυτές γίνονται με εξωγενή χορήγηση φθοριζουσών ουσιών ή χρωμοφόρων (ουσίες ενίσχυσης αντίθεσης) προκειμένου να υπάρξει βελτίωση του διαγνωστικού σήματος των φασματικών μετρήσεων.

Μία μείζονος σημασίας παράμετρος που χαρακτηρίζει γενικότερα τις ιστικές δομές, είναι η μεγάλη χωρική διαφοροποίηση των συστατικών και δομικών των χαρακτηριστικών. Αυτό το γεγονός κάνει αναγκαία την χρήση εξειδικευμένου εξοπλισμού προκειμένου να υπάρχει η καταγραφή του οπτικού σήματος, που «μεταφέρει» την χρήσιμη διαγνωστική πληροφορία. Στην καθημερινή κλινική και εργαστηριακή πρακτική, χρησιμοποιούνται τόσο σημειακές μεθοδολογίες απεικόνισης όσο και μέθοδοι απεικόνισης μεγαλυτέρου πεδίου. Έτσι,

χρησιμοποιούνται διατάξεις οπτικών ινών για την σημειακή μέτρηση του φθορισμού σε ένα συγκεκριμένο και περιορισμένο σημείο του ιστού, ενώ εφαρμόζονται διάφορα φίλτρα για την εκλεκτικά φασματική απεικόνιση μεγαλύτερων περιοχών. Όταν συνεπώς λαμβάνει χώρα σημειακή μέτρηση, τότε γίνεται καταγραφή όλου του φάσματος σε ένα σημείο για ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, ενώ η διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται για διαφορετικά μήκη κύματος. Όταν όμως γίνεται απεικόνιση μίας μεγαλύτερης επιφανείας ιστού, τότε γίνεται εκλεκτική και περιορισμένη καταγραφή μικρού μόνον αριθμού συνδυασμών φωτισμού και εκπομπής. Ως συμπέρασμα, οι σημειακές μετρήσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλο εύρος φασματικής πληροφορίας για περιορισμένη όμως ιστική επιφάνεια, ενώ οι μεγαλύτερες χωρικά απεικονίσεις χαρακτηρίζονται από πολύ μικρή φασματική πληροφορία σημαντικής όμως ιστικής επιφάνειας. Δέον επίσης να επισημανθεί το γεγονός, ότι τόσο για την έρευνα όσο και για την καθημερινή κλινική πράξη, η χωρική και η φασματική πληροφορία είναι το ίδιο σημαντικές για την διάγνωση παθολογικών ιστικών αλλοιώσεων. Είναι λοιπόν εμφανής η ανάγκη για την ανάπτυξη προηγμένων διαγνωστικών μεθοδολογιών και εξοπλισμού, ικανών να ξεπεράσουν τα υπάρχοντα μειονεκτήματα που σχετίζονται με την ταυτόχρονη καταγραφή των χωρικών και φασματικών χαρακτηριστικών των διαφόρων ιστικών αλλοιώσεων. Οδηγούμαστε λοιπόν στην ανάπτυξη πολυφασματικών και υπερφασματικών απεικονιστικών συστημάτων, που εκμεταλλεύονται πλήρως τις διαγνωστικές και καταγραφικές δυνατότητες τόσο της απεικόνισης όσο και της φασματοσκοπίας.

6.4. Παράγοντες ενίσχυσης αντίθεσης

Η in vivo διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού επιβοηθείται με την τοπική εφαρμογή ή την συστηματική χορήγηση διαφόρων ουσιών ενίσχυσης αντίθεσης (chemical markers), όπως το διάλυμα οξικού οξέος, το μπλε της τολουιδίνης, φωτοευαισθητοποιητές ή πρόδρομές φωτοευαισθητοποιές ουσίες, κτλ. Η προκύπτουσα εκλεκτική χρώση των παθολογικών ιστικών δομών σχετίζεται με την ικανότητα των ουσιών αυτών να αλληλεπιδρούν με τα διαφοροποιημένα στους παθολογικούς ιστούς μεταβολικά ή δομικά χαρακτηριστικά. Παράλληλα, οι ουσίες αυτές ενισχύουν προοδευτικά και αντιστρεπτά τις ανακλόμενες ή φθορίζουσες διαφορές μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού. Για παράδειγμα, η ιστική φωτοευαισθητοποιός ουσία πρωτοφωτοπορφυρίνη IX (PpIX) είναι πρόδρομη ουσία στο μεταβολικό μονοπάτι σχηματισμού της αίμης. Σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και ιστών, ο ρυθμός σύνθεσης της PpIX σχετίζεται με τον ρυθμό σύνθεσης του 5-αμινολεβουλινικού οξέος (ALA), το οποίο με την σειρά του ρυθμίζεται μέσω μηχανισμού βιοανάδρασης που καθορίζεται από την συγκέντρωση της ελεύθερης αίμης. Η παρουσία εξωγενώς χορηγούμενου ALA παρακάμπτει τον μηχανισμό βιοανάδρασης, οδηγώντας σε εκλεκτική συγκέντρωση της φωτοευαισθητοποιού ουσίας PpIX στα παθολογικά κύτταρα (σχήμα 13).

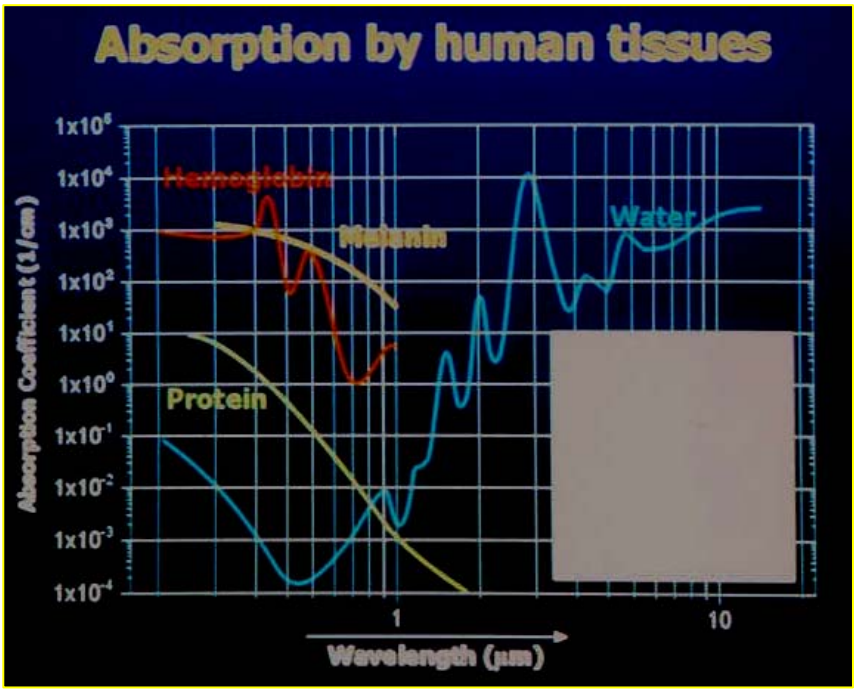


Σχήμα 13. Η τοπική εφαρμογή ALA σε συγκεκριμένες δυσπλαστικές ή κακοήθεις βλάβες μπορεί να προκαλέσει χρήσιμη κλινικά πληροφορία, που εμφανίζεται με την χωρική αποτύπωση της συγκεκριμένης ιστικής αλλοίωσης. Αυτό πραγματοποιείται διεγείροντας την συσσωρευμένη PpIX με υπεριώδες μπλε φως και καταγράφοντας τον προκαλούμενο χαρακτηριστικό φθορισμό. (από διδακτορική διατριβή Μ. Στεφανίδου)

Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι ο βαθμός και η έκταση της ιστικής χρώσης σχετίζονται με τον βαθμό της διαφοροποίησης της παθολογικής αλλοίωσης. Παρόλα αυτά, στην κλινική πράξη η ειδικότητα (specificity) της διαγνωστικής δοκιμασίας είναι στατιστικά ελαττωμένη, αφού η στατική και αποκλειστικώς ποιοτική ερμηνεία αυτού του δυναμικού φαινομένου δεν είναι επαρκής. Έτσι, η διαγνωστική συνεισφορά αυτής της δοκιμασίας περιορίζεται στον καλύτερο χωρικό προσδιορισμό των ύποπτων προς βιοψία παθολογικών ιστικών αλλοιώσεων.

6.5. Αλληλεπίδραση δέρματος-φωτός. Δερματικές στιβάδες.

Οι δερματικές στιβάδες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάδοση του φωτός μεταξύ ζωτικών ιστών, καθώς αυτές καθορίζουν την εξασθένιση της ακτινοβολίας. Έχοντας φτάσει στους ζωτικούς ιστούς, η ακτινοβολία σκεδάζεται και απορροφάται από δομές και χρωστικές που ποικίλλουν δυναμικά μεταξύ ατόμων (σχήμα 14).



Σχήμα 14. Τα φωτοβιολογικά φαινόμενα εξαρτώνται από τη δόση και το μήκος κύματος, καθώς διαφορετικά μήκη κύματος του οπτικού φάσματος φτάνουν σε διαφορετικά βάθη μέσα στον ιστό. Απορρόφηση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από διάφορα συστατικά των ιστών.

Στιβάδα κερατίνης

Η στίβαδα της κερατίνης είναι μια λεπτή μεμβράνη (10μm) που αποτελείται από κερατινοκύτταρα και κονιορτό μελανίνης (διαμέτρου <0.1μm). Η στιβάδα κερατίνης και η επιδερμίδα αποτελούν ένα ενιαίο διαθλαστικό μέσο, με την ιδιότητα να απορροφούν την ακτινοβολία και λιγότερο με το να την σκεδάζουν.

Η απορρόφηση και η σκέδαση του φωτός στην κερατινική στιβάδα προέρχεται μερικώς από πυκνούς και παχείς τριχοειδείς θυλάκους, που το επικαλύπτουν, κάνοντας τον καθορισμό του δερματικού χρώματος δύσκολο. Με άλλα λόγια, το φως που πέφτει πάνω στην στιβάδα της κερατίνης ανακλάται από την επιφάνεια της, λόγω διαφορετικής διαθλαστικής δομής μεταξύ αυτής και του αέρα (αντίστοιχα n = 1.55 και n’ = 1). Το ποσό του φωτός που ανακλάται, είναι ένα μικρό μέρος του προσπίπτοντος φωτός, και καθώς δεν έχει εισέλθει στο δέρμα, δεν μεταφέρει πληροφορίες για αυτό. Επομένως έχει τα φασματικά χαρακτηριστικά της φωτεινής πηγής.

Επιδερμίδα

Η ζωντανή επιδερμίδα αποτελείται από κερατινοκύτταρρα και κύτταρα του Langerhans και έχει πάχος 10μm. Επιπρόσθετα, στην κατοπτρική ανάκλαση του φωτός από την επιφάνεια, η επιδερμίδα επιδρά με δυο σημαντικούς τρόπους : πρώτον, με τη σκέδαση από τα κύτταρα ή τις μεμβράνες και δεύτερον, με την απορρόφηση από τη μελανίνη. Οι βασικές χρωστικές του δέρματος, που απορροφούν

την υπεριώδη ακτινοβολία, είναι η DOPA μελανίνη, το ουροκανικό οξύ, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη, οι οποίες καθορίζουν την δερματική διαπερατότητα. Η μελανίνη και το ουροκανικό οξύ είναι οι βασικές χρωμοφόρες που καθορίζουν το ρόλο του δέρματος στη διαπερατότητα. Και οι δυο αυτές χρωμοφόρες, υπόκεινται σε διακυμάνσεις, τόσο όσων αφορά τη θέση τους πάνω στον ιστό, όσο και την ποσότητά τους.

Η βασική χρωστική στην επιδερμίδα είναι η μελανίνη, η οποία υπάρχει υπό μορφή διάφορων πολυμερών, των οποίων η χρωμοφόρα βασική αλυσίδα επιβιώνει από την επίθεση από πρωτεάσες, οξέα και βάσεις. Το πολυμερές της μελανίνης έχει διαθλαστική δομή n = 1.65, που διαφέρει αυτής του περιβάλλοντος μέσου. Εφόσον η μελανίνη εμφανίζεται σε διάφορες μορφές στην επιδερμίδα, όπως μεμονωμένα μόρια μελανίνης, κόκκοι μελανίνης, μελανοσώματα κ.α. είναι πιθανόν να αλληλεπιδρά με το φως διαφορετικά, ανάλογα με τη μορφή στην οποία βρίσκεται. Συγκεκριμένα, το κλάσμα σκεδαζόμενων προς απορροφούμενων φωτονίων μεταβάλλεται ανάλογα με το τύπο της μελανίνης. Η διασπορά των μελανοσωμάτων στη φυσιολογική επιδερμίδα δεν είναι ομοιόμορφη, καθώς η συγκέντρωσή τους στα μελανινοκύτταρα και κερατινοκύτταρρα κοντά στη βασική μεμβράνη είναι υψηλότερη από αυτή στην εξωτερική επιφάνεια της επιδερμίδας. Η μελανίνη είναι ο βασικός παράγων απορρόφησης της ακτινοβολίας στο φάσμα μήκους κύματος μεταξύ 350-1200nm. Μπορεί να διαμορφώσει κανείς την οπτική της επιδερμίδας με έναν εξομοιωτή διαθλαστικής δομής ή με ερεθισμό in vivo των παραγόντων που απορροφούν στο υπέρυθρο, κυρίως του ουροκανικού οξέος.

Το χόριο

Το χόριο μπορεί να θεωρηθεί ως ένα θολό στρώμα ιστού, όπου η σκέδαση είναι μεγάλης σημασίας. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι το μήκος κύματος μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα προς τη σκέδαση και αυτό καθορίζει την οπτική διείσδυση. Το χόριο διαφέρει από την επιδερμίδα όσων αφορά στη δομή και στη σύστασή του. Αποτελείται από ίνες κολλαγόνου με πολύ διαφορετικό δείκτη διάθλασης από αυτόν του περιβάλλοντος μέσου, προκαλώντας τη βασική σκέδαση του ορατού φωτός από το δέρμα. In vivo, οι βασικοί φορείς απορρόφησης της ορατής ακτινοβολίας στο χόριο είναι η αιμοσφαιρίνη, η οξυαιμοσφαιρίνη, το β-καροτένιο και η χολερυθρίνη.

Η σκέδαση στο χόριο αυξάνει σε μικρότερα μήκη κύματος και παίζει βασικό ρόλο στο καθορισμό του βάθους της διείσδυσης της ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να έχει εδραιωθεί η άποψη ότι τα μήκη κύματος στο UV-ορατό-κοντινό υπέρυθρο του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος διεισδύουν στο χόριο σε μεγαλύτερο βαθμό (μεγαλύτερο βάθος) από ότι μικρότερα μήκη κύματος.

Η βασική χρωμοφόρος στο φυσιολογικό ανθρώπινο χόριο είναι η αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη μπορεί να βρίσκεται σε σύμπλεγμα με O_2. Και στις δυο περιπτώσεις, έχει απορρόφηση στο ορατό του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Μαζί με O_2 απορροφά με μέγιστο στα 515, 540 και 575nm, ενώ χωρίς O_2 απορροφά με μέγιστο στα 430 και 555nm. Η αιμοσφαιρίνη δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στο χόριο, αλλά βρίσκεται αποκλειστικά μέσα στα αγγεία. Η παρουσία αιμοσφαιρίνης στα αγγεία (τριχοειδή αγγεία) και στα ανώτερα αρτηριακά και φλεβικά πλέγματα έχει ως αποτέλεσμα το κόκκινο χρώμα (απόχρωση) του δέρματος στο ορατό. Είναι φανερό ότι η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης είναι υψηλή στα μικρά μήκη κύματος (έως 600nm) ενώ στην περιοχή μεταξύ 600 και 700nm η

απορρόφηση αυτή αντικαθιστάται από την απορρόφηση που προέρχεται από την μελανίνη. Σε ακόμη μεγαλύτερα μήκη κύματος, η απορρόφηση προέρχεται από το νερό του δέρματος. Η σταθερά απορρόφησης του νερού, πάντως, είναι μικρή παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νερού στον ιστό είναι μεγάλη.

Το ερύθημα, το βασικό χαρακτηριστικό της δερματικής φλεγμονής, συνδέεται άμεσα με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης. Η αύξηση τόσο του αριθμού των τριχοειδών αγγείων όσο και της διαμέτρου τους, όπως επίσης και η αύξηση της ροής του αίματος διαμέσου των τριχοειδών αυτών, είναι γνωστά ως ερύθημα. Το ερύθημα που προκαλείται από τη διάταση των τριχοειδών μπορεί να υπολογιστεί με αναδρομή στις μετρήσεις.

Η ύπαρξη των μετέπειτα αγγειακών διαμερισμάτων, ανώτερων φλεβικών και αρτηριακών πλεγμάτων, είναι έμμεσα αποδεδειγμένη, από την αρκετά προχωρημένη διείσδυση του σκεδαζόμενου φωτός, που λαμβάνεται από τα διαμερίσματα αυτά. Η συμβολή του φλεβικού διαμερίσματος μπορεί να υπολογιστεί από τις φασματικές αλλαγές στην συγκέντρωση καθαρής δεσοξυαιμοσφαιρίνης. Πίσω από το χόριο βρίσκονται φλέβες γεμάτες με μεγάλο αριθμό ερυθροκυττάρων.

7. Η δυναμική των φασματικών απεικονιστικών συστημάτων στη βιοιατρική

7.1. Φασματοσκοπία φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μία μη επεμβατική οπτική τεχνική για την διάγνωση νεοπλασιών. Η φασματοσκοπία φθορισμού με την βοήθεια laser, είναι μία μη επεμβατική σε αληθινό χρόνο τεχνική για την εκτίμηση νεοπλασιών, η οποία μετράει τον αυτοφθορισμό των ιστών βασιζόμενη στην ποσότητα φυσικών φθοριζούσων ουσιών.

Η αρχή αυτής της τεχνικής περιλαμβάνει την διέγερση του υπό εξέταση ιστού με μονοχρωματικό φως και μέτρηση του εκπεμπόμενου φάσματος φθορισμού. Η μορφή του φάσματος εξαρτάται από τον αριθμό των φθοριζουσών βιολογικών μορίων στον ιστό, όπως είναι οι φλαβίνες, οι πορφυρίνες, αλλά και οι δομικές πρωτεΐνες όπως είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη. Για αυτό το λόγο η ικανότητα της μεθόδου για την διαφοροδιάγνωση μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού εξαρτάται κυρίως απ τις μεταβολές σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και τις αλλαγές στην ιστική μορφολογία. Είναι δε γνωστό, ότι η επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής αποφασίζεται με βάση τα ιστικά χρωμοφόρα μόρια που συμβάλλουν στην δημιουργία του φάσματος φθορισμού.

Εκτενείς in vitro και in vivo μελέτες σε διάφορες περιοχές, όπως η στοματική κοιλότητα έχουν επιτυχώς επιδείξει την δυνατότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού στην ανίχνευση και διαφοροποίηση φυσιολογικού από μη φυσιολογικού ιστού. Παρόλη την φαινομενική επιτυχία αυτής της τεχνικής, το καταγραφόμενο φάσμα φθορισμού είναι κοινό σε διάφορες μη καρκινικές καταστάσεις, όπως είναι διάφορες φλεγμονές ή δυσπλασίες.

Παρόλο αυτά, τα περισσότερα μόρια συνεισφέρουν στον ιστικό φθορισμό έχοντας το καθένα ένα ευρύ φάσμα εκπομπής, που συνήθως αλληλοεπικαλύπτεται με το φάσμα φθορισμού εκπομπής άλλων μορίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λήψη σήματος που παρέχει πληροφορία χαμηλής διαφοροποίησης μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού. Σε προσπάθεια για την βελτίωση της συγκεκριμένης μεθόδου, ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών ομάδων έχει χρησιμοποιήσει πολλαπλά

συστήματα με διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης. Παρόλο που το γεγονός αυτό δυνατόν να αυξήσει την διακριτική ικανότητα του συστήματος έχει ως συνεπακόλουθο το σύστημα να είναι πολύπλοκο και ακριβό. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι τα υπάρχοντα συστήματα προσφέρουν μέτρηση του εκπεμπόμενου φάσματος φθορισμού μόνο σε ένα σημείο και συνεπώς δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την χωρική ποικιλομορφία και κατανομή της ιστικής αλλοίωσης. Για να υπερπηδήσουν αυτό το εμπόδιο αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει απεικονιστικά συστήματα, που καταγράφουν την χωρική εμφάνιση της έντασης φθορισμού, με συγκεκριμένο όμως συνδυασμό μήκος κύματος διέγερσης-εκπομπής. Παρόλο έτσι που αυτά τα συστήματα μπορεί να παρέχουν χωρική πληροφορία, η καταγραφόμενη φασματική πληροφορία είναι πολύ φτωχή εξαιτίας της αξιοποίησης δεδομένων από ελάχιστες φασματικές περιοχές.

Εξωτερικώς χορηγούμενες ουσίες φθορισμού όπως είναι η φωτοφρίνη (QLT, Βανκούβερ Καναδάς) και η πρωτοπορφυρίνη IX (παραγόμενη μέσω του αμινολεβουλινικού οξέος) μπορεί να ενισχύσουν την καταγραφή φασματικών διαφορών. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της ιδιότητας των ουσιών φθορισμού να συγκεντρώνονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα άτυπα κύτταρα. Αυτή η παρεχόμενη ενίσχυση της αντίθεσης είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη για την εκτίμηση των χωρικών χαρακτηριστικών μιας ιστικής αλλοίωσης. Παράλληλα, η ποσοτική εκτίμηση της κινητικής της συγκέντρωσης των φθοριζουσών ουσιών, η οποία αποκτάται μέσω της μέτρησης της μεταβολής ένταση φθορισμού σε σχέση με το χρόνο, περιέχει σημαντικότατη πληροφορία για την in vivo σταδιοποίηση της ιστικής αλλοίωσης. Όμως, λόγω του χαμηλού δείκτη συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας απαιτούνται επανειλημμένες μετρήσεις μέσα σε διάστημα 12 έως 24 ωρών, ανάλογα με τον υπό εξέταση ιστό. Η ομολογουμένως μακρά περίοδος εξέτασης, που σχετίζεται με την χορήγηση διαφόρων φθοριζουσών ουσιών καθιστά αυτό το είδος των κλινικών μελετών, δύσκολα εφαρμόσιμες.

7.2. Raman φασματοσκοπία

Σε αντίθεση με την φασματοσκοπία φθορισμού τα περισσότερα βιολογικά μόρια είναι Raman ενεργά με συγκεκριμένα ιδιοφασματικά χαρακτηριστικά. Λόγω αυτού του γεγονότος, η δονητική φασματοσκοπία μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις διάγνωσης προκαρκινικών ή καρκινικών αλλοιώσεων. Διάφορες τεχνικές της Raman σκέδασης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση διαφόρων βιολογικών υλικών. Οι διάφορες αυτές τεχνικές περιλαμβάνουν φασματοσκοπία στο κοντινό υπέρυθρο, καθώς και υπέρυθρη ή υπεριώδη Raman φασματοσκοπία σε συνδυασμό με ανάλυση Fourier. Στην Raman φασματοσκοπία του κοντινού υπέρυθρου, χρησιμοποιείται τυπικά ακτινοβολία διέγερσης μεταξύ 800 και 1100 nm. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι παράγεται λίγος φθορισμός, κάνοντας έτσι δυνατή την ανίχνευση ενός αδύνατου Raman σήματος. Στην φασματοσκοπία Raman με την βοήθεια της Fourier ανάλυσης στο υπέρυθρο, η Fourier ανάλυση του σήματος ανιχνεύεται και μετατρέπεται σε ένα αληθινό Raman σήμα. Αυτή η τεχνική ενώ παρέχει πολύ καλά απεικονιστικά δεδομένα απαιτεί πολύ περισσότερο χρόνο (περίπου 30 λεπτά) για την επίτευξη της.

Τα περισσότερα βιολογικά μόρια όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια έχουν συγκεκριμένους Raman χαρακτήρες και διαθέτουν συγκεκριμένες δομικές και περιβαλλοντικές πληροφορίες. Συνεπώς οι μοριακές και κυτταρικές μεταβολές που μπορεί να συμβούν κατά την καρκινογένεση μπορεί να

έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικά Raman φάσματα, για φυσιολογικό και καρκινικό ιστό. Οι παραδοσιακές αλλαγές σε προκαρκινικές βλάβες ή και σε καλοήθεις ανωμαλίες όπως είναι η φλεγμονή παρουσιάζουν επίσης συγκεκριμένες Raman χαρακτηριστικές καμπύλες. Για παράδειγμα, ένα από τα πιο πρώιμα χαρακτηριστικά τα οποία συμβαίνουν κατά την δημιουργία καρκίνου και προκαρκινικών βλαβών είναι η αύξηση της περιεκτικότητας σε κυτταρικό νουκλεϊνικό οξύ. Συνεπώς, η φασματοσκοπία Raman μπορεί να επιδείξει αυτές τις πρώιμες DNA αλλαγές αρκετά εύκολα. Η φασματοσκοπία Raman έχει εφαρμοστεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό για την ανίχνευση καρκίνων σε επιθηλιακές ή σε μεσεγχηματικά εφορμώμενες κακοήθειες στην περιοχή του στήθους, του εγκεφάλου, του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστεως αλλά και σε γυναικολογικούς ιστούς.

7.3. Φασματοσκοπία οπτικής σκέδασης

Η φασματοσκοπία οπτικής σκέδασης είναι μία μη επεμβατική οπτική μέθοδος η οποία είχε χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση διαφόρων βιολογικών ιστών. Ο ιστός ακτινοβολείται είτε με μη πολωμένο είτε με πολωμένο φως, το οποίο ακολούθως σκεδάζεται μέσα στον ιστό λόγω της δομικής αρχιτεκτονικής του. Ακολούθως, το φάσμα του επανασκεδαζόμενου φωτός καταγράφεται και αναλύεται παρέχοντας ένα φάσμα που περιέχει σημαντικές πληροφορίες, που αφορούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού. Η πληροφορία αυτή σχετίζεται με τον αριθμό εμφάνισης διαφόρων πυρήνων, την πυκνότητα τους και το μέγεθος τους σχετικά με το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Ο λόγος της παρουσίας των πυρήνων σε σχέση με το κυτταρόπλασμα είναι υψηλότερος λόγω της παρουσίας χρωματίνης. Αυτού του είδους οι ιστικές μεταβολές σε κυτταρικό επίπεδο αποτελούν πολύ χαρακτηριστικά και μείζονα διαγνωστικά κριτήρια για την ανίχνευση ιστολογικών μεταβολών, όπως είναι η δυσπλασία. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η φασματοσκοπία σκέδασης είναι ικανή για την διαφοροδιάγνωση μεταξύ φυσιολογικών και προ διηθητικών καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων. Μέχρι στιγμής, η ικανότητα αυτής της μεθόδου στην διαφοροδιάγνωση μεταξύ χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίησης της ιστικής αλλοίωσης δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί.

7.4. Εστιακή μικροσκοπία

Η εστιακή μικροσκοπία είναι η τεχνική που επιτρέπει την απεικόνιση λεπτών στιβάδων κοντά στην επιφάνεια του ιστού, όπου είναι συνήθως μη ορατές με τα συμβατικά μικροσκόπια. Αυτό επιτυγχάνεται με την απόρριψη του σήματος του μη εστιασμένου φωτός. Τα εστιακά μικροσκόπια είναι ικανά για την μη επεμβατική απεικόνιση αλλοιώσεων με βάθος διήθησης μικρότερο των 5 μm από την ιστική επιφάνεια, με ταυτόχρονη πλάγια ανάλυση μεγαλύτερη από 1 μm. Με αυτή την τεχνική, η υπό εξέταση ιστικές δομές έχουν πάχος σαφέστατα συγκρινόμενο με το τυπικό πάχος των 5 μm μιας τυπικής ιστοπαθολογικής εξέτασης. Οι πυρήνες καθώς και οι κυτταρικές και μορφολογικές λεπτομέρειες μπορούν εύκολα και μη επεμβατικά να παρατηρηθούν in vivo μέσα στο φυσιολογικό και παθολογικό δέρμα, αλλά και στους πέριξ ιστούς.

Η εστιακή μικροσκοπία έχει ένα σοβαρό μειονέκτημα και αυτό δεν είναι άλλο από την πολύ περιορισμένη υπό εξέταση επιφάνεια, κάνοντας έτσι την εφαρμογή

αυτής της μεθόδου χρήσιμη μόνο για εξέταση πολύ ύποπτων περιοχών. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η αντίθεση είναι πάρα πολύ πτωχή σε μη μελανωτικούς ιστούς. Η προσθήκη δεικτών όπως το οξικό οξύ, ως ενισχυτικό μέσο αντίθεσης, έχει βελτιώσει την παρεχόμενη πληροφορία. Η προσθήκη οξικού οξέος κάνει τους καρκινικούς πυρήνες να εμφανίζονται με πιο φωτεινό σήμα σε σχέση με το σήμα των πέριξ ιστών.

7.5. Φασματοσκοπία ανάκλασης

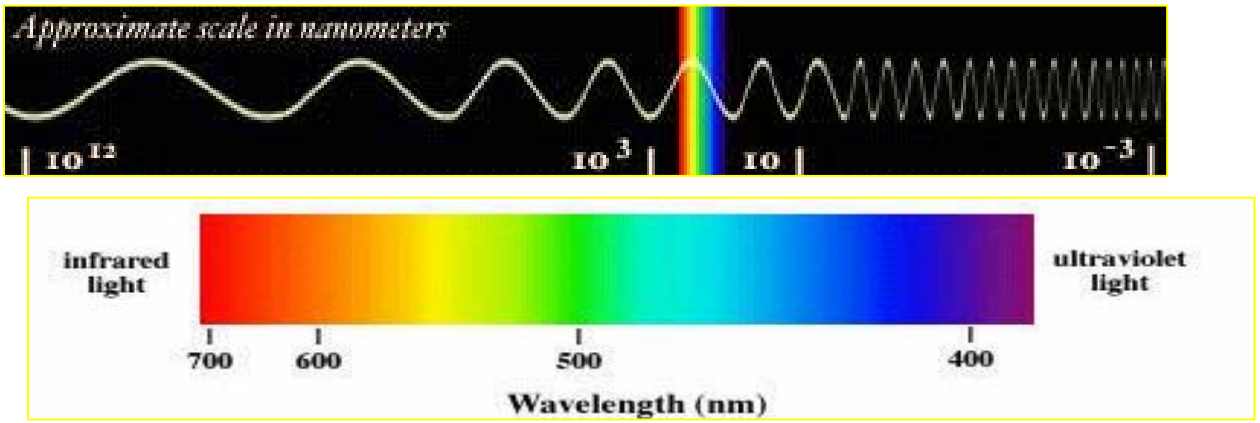
Η φασματοσκοπία ανάκλασης αποτελεί μία πολύ καλή τεχνική για την μελέτη των βιολογικών ιστών. Το προσπίπτον στην υπό εξέταση περιοχή φως υφίσταται ελαστική σκέδαση και απορρόφηση. Ένα μέρος από αυτό επιστρέφει πίσω με διάχυτη ανάκλαση, περιέχοντας ποσοτική πληροφορία σχετικά με την δομή και σύσταση του ιστού. Το μετρούμενο φάσμα αναλύεται με την χρήση αναλυτικού μοντέλου διάχυσης και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία ποσοτική πληροφορία γύρω από τα ιστικά χαρακτηριστικά όπως: συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, κορεσμό αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο, πυκνότητα σκεδαστή, καθώς επίσης και εκτίμηση του μεγέθους του σκεδαστή.

Η φασματοσκοπία ανάκλασης μπορεί να δώσει χρήσιμη πληροφορία, κυρίως για την μορφολογία του ιστού και την διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών αλλοιώσεων in vivo. Όμως, η ικανότητα της τεχνικής για την διάκριση αλλοιώσεων χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίησης, δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί.

8. Εφαρμογές της πολυφασματικής απεικόνισης στην Ωτορινολαρυγγολογία

Το χρώμα αποτελεί μία σημαντική παράμετρο της ανθρώπινης όρασης με μεγάλη διαγνωστική πληροφορία. Η οπτική πληροφορία που παρέχει επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες όπως η γεωμετρία της όρασης, ο περιβάλλων φωτισμός, η εμπειρία και η οπτική οξύτητα του παρατηρητή, κτλ.

Το χρώμα του ανθρώπινου δέρματος και του βλεννογόνου εξαρτάται τόσο από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, όσο κι από τις οπτικές ιδιότητες του ιστού. Η αλληλεπίδραση των φωτονίων με τα διάφορα συστατικά του δέρματος και του βλεννογόνου έχει ως αποτέλεσμα την εκλεκτική απορρόφηση ή σκέδαση συγκεκριμένων μήκων κύματος. Το ανθρώπινο μάτι αναγνωρίζει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μόνο στο φάσμα μεταξύ των 380-750 nm (σχήμα 15) έχοντας την ικανότητα μίας περιορισμένης φασματικής ανάλυσης (τριχρωματική όραση, Κόκκινο - Πράσινο - Μπλε ή RGB), που οφείλεται στην ύπαρξη τριών ειδών κωνίων, καθένα από τα οποία περιέχει ένα διαφορετικό τύπο χρωστικής. Το είδος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος και ποικίλει, από μήκη της τάξεως των χιλιομέτρων όπως τα ραδιοφωνικά κύματα, έως μερικά νανόμετρα όπως η γάμμα ακτινοβολία. (ένα νανόμετρο αντιστοιχεί σε ένα εκατομμυριοστό του μέτρου).



Σχήμα 15. Το ορατό φάσμα.

Λόγω αυτών των περιορισμών, η οπτική επισκόπηση των διαφόρων ιστολογικών αλλοιώσεων με το ανθρώπινο μάτι δυνατόν να μην είναι επαρκής και να οδηγήσει σε διαγνωστικά σφάλματα. Συνεπώς, η οπτική παρατήρηση των ιστικών αλλοιώσεων και η παρακολούθηση της εξέλιξής τους στο χρόνο στερείται πολλές φορές διαγνωστικής ακρίβειας. Επίσης, το σήμα που γίνεται αντιληπτό μέσω της ανθρώπινης όρασης δεν είναι δυνατόν να αναπαραχθεί.

Η απεικονιστική φασματοσκοπία συνδυάζει τη συμβατική απεικόνιση και την φασματοσκοπία. Στην συμβατική απεικόνιση, μια μακροσκοπική ή μικροσκοπική εικόνα, καταγράφεται και αποθηκεύεται ως μία σειρά τιμών έντασης κάθε εικονοστοιχείου αυτής της εικόνας. Στις παραδοσιακές φασματοσκοπικές τεχνικές η χημική σύνθεση καθορίζεται από τη διασπορά του φωτός, που απορροφάται ή εκπέμπεται από ένα δείγμα. Σε αυτές τις μετρήσεις, τα στοιχεία συνήθως παίρνουν την μορφή μιας σειράς τιμών έντασης σε ένα εύρος τιμών μήκους κύματος.

Οι πρόσφατες τεχνολογικές καινοτομίες έχουν συνδέσει την απεικόνιση με την φασματοσκοπία. Οι υψηλής απόδοσης CCD κάμερες προσφέρουν χαμηλό θόρυβο, αλλά και πολυκάναλη συσχέτιση δεδομένων μέσω απεικόνισης και φασματοσκοπίας. Οι σύγχρονές οπτικές και απεικονιστικές διαγνωστικές εφαρμογές βασίζονται στην μετάφραση των πληροφοριών που αποκτήθηκαν από έναν αισθητήρα εικόνας. Τυπικά ο αισθητήρας που συνδέεται σε οπτικά συστήματα (μικροσκόπια, ενδοσκόπια) είναι σχεδιασμένος να προσομοιάζει στην ανθρώπινη όραση καταλήγοντας σε μια έγχρωμη εικόνα στο ορατό πεδίο του ματιού. Αυτό επιτυγχάνεται αναλύοντας το φως σε τρεις μπάντες (Κόκκινο, Πράσινο και Μπλε) μέσα στο ορατό φάσμα (380-750nm). Αυτός ο τρόπος ανάλυσης του φωτός θέτει σοβαρούς περιορισμούς στη διάκριση και στην αναγνώριση των αντικειμένων που έχουν τα ίδια ή παρόμοια χρωματικά χαρακτηριστικά, αλλά διαφορετική χημική σύνθεση. Στην κλινική εφαρμογή αυτό καταλήγει σε διαγνωστική ανεπάρκεια, εξαιτίας του ότι οι μεταβολικές ή δομικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την πρόοδο της ασθένειας, δεν αλλάζουν σημαντικά και εξειδικευμένα τα καταγραφόμενα χρωματικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση ιστού.

Η ανάπτυξη απεικονιστικών συστημάτων που επεκτείνουν τη διαγνωστική ικανότητα των ανθρωπίνου οπτικού συστήματος, τόσο φασματικά όσο και αναλυτικά,

συνεπάγεται επιπρόσθετη διαγνωστική πληροφορία. Έτσι, δύναται η φασματική και χωρική ανίχνευση και διάκριση διαφορετικών ιστών παρομοίου χρώματος, βασιζόμενοι στις φασματικές τους διαφορές σε στενές φασματικές μπάντες, μέσα ή έξω από το ορατό φάσμα. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την Φασματική Απεικόνιση, που συνδυάζει την συμβατική απεικόνιση με την φασματοσκοπία.

Στην συμβατική απεικόνιση, μία μακροσκοπική ή μικροσκοπική εικόνα καταγράφεται και αποθηκεύεται σαν μια σειρά τιμών έντασης σε κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας. Πολλές ερευνητικές και βιομηχανικές εφαρμογές χρησιμοποιούν την ηλεκτρονική απεικόνιση στην εξακρίβωση την μορφολογίας, γεωμετρίας ή της αρχιτεκτονικής ενός δείγματος ή αντικειμένου, συχνά ακολουθώντας δυναμικά γεγονότα σε πραγματικό χρόνο. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στις παραδοσιακές αναλυτικές φασματοσκοπικές τεχνικές η χημική σύνθεση εξακριβώνεται από την διασπορά του φωτός που απορροφάται ή εκπέμπεται από ένα δείγμα. Σε αυτές τις μετρήσεις, τα στοιχεία συνήθως παίρνουν την μορφή μιας σειράς τιμών έντασης σε ένα εύρος τιμών μήκους κύματος. Και οι δύο τομείς –απεικόνιση και φασματοσκοπία- συνεχίζουν να συνδέονται με τεχνολογικές καινοτομίες που επιτρέπουν ταχύτερη απόκτηση καλύτερης ποιότητας στοιχείων. Χάρη στην τεχνολογική πρόοδο, είναι πλέον δυνατό να συνδυάσουμε την απεικόνιση και την φασματοσκόπηση σε ένα νέο τομέα που λέγεται Φασματική Απεικόνιση. Ένα τυπικό φασματικό απεικονιστικό σύστημα αποτελείται από:

-Έναν απεικονιστικό μονοχρωμάτορα που είναι ένα μεταβλητό οπτικό φίλτρο που επιτρέπει την εκπομπή των εικόνων σε στενές φασματικές περιοχές.

-Μία CCD κάμερα. Ο απεικονιστικός μονοχρωμάτορας και η CCD κάμερα συνήθως απαιτούν υπολογιστές εξοπλισμένους με τον κατάλληλο λογισμικό, τόσο για την λήψη κι επεξεργασία της εικόνας, όσο και για τον συγχρονισμό τους.

Αυτό το σύστημα μπορεί να παρέχει δισδιάστατες χρωματικές μετρήσεις και χαρτογραφήσεις χωρίς ιστική επαφή, αλλά και χωρίς τους περιορισμούς και τα σφάλματα, που σχετίζονται με τις συμβατικές τεχνικές. Έτσι, παρέχεται χρωματική ανάλυση, ποσοτική πληροφορία, χαρτογράφηση την εκπεμπόμενης ακτινοβολίας, αλλά και ιστική ευαισθησία και ειδίκευση.

Οι διάφοροι ιστοί δυνατόν να περιέχουν πλήθος από φθορίζουσες χρωστικές, ελαστίνη, κολλαγόνο και φλαβίνες. Έτσι, μετρώντας τον προκληθέν ή τον μεικτό φθορισμό του ιστού θα πρέπει, στην θεωρία, να είναι δυνατό να μάθουμε για την βιοχημική κατάσταση του.

Η εφαρμογή της απεικόνισης σε επιλεγμένες φασματικές περιοχές στο ορατό μπορεί να προσφέρει οπτική και ψηφιακή αντίθεση (contrast) βελτιώνοντας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καλύτερη αναγνώριση της επιφανειακής αγγειακής κατανομής. Αυτό μπορεί να εφαρμοστεί για παράδειγμα στην πρόγνωση επιβίωσης μοσχευμάτων (flap) , στην θεραπεία αιμαγγειωμάτων κτλ

Είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί οπτικός χαρακτηρισμός του βλεννογόνου της κάτω ρινικής κόγχης μετά τον ψεκασμό αγγειοσυσπαστικών ή να μελετήσουμε τον μηχανισμό ανάπτυξης του ερυθήματος στο δέρμα κατά την δοκιμασία νηγμού δια βελόνης (Prick Puncture Tests) επιτρέποντας κατά αυτό τον τρόπο την εκτίμηση των φαρμάκων με αγγειοσυσπαστική αντιφλεγμονώδη και αντιαλλεργική δράση.

Η ταυτοποίηση και αναγνώριση διάφορων αλλεργιογόνων έχει γίνει εφικτή με φασματικές απεικονιστικές τεχνικές συνεισφέροντας έτσι στην αντιμετώπιση αλλεργιών.

Με αυτή τη μέθοδο η αναγνώριση των επιφανειών δέρματος μολυσμένων με μικροοργανισμούς είναι δυνατή λόγω της ύπαρξης φθοριούχων πρωτεινών στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η αναγνώριση μικροοργανισμών ήταν εφικτή σε ασθενείς

που πάσχουν από Erythrasma που προκαλείται από το corynobacterium minutissimum και σε άλλους που πάσχουν από Ποικιλόχρου Πιτυρίαση που προκαλείται από Malassezia. (διδακτορική διατριβή Μ. Κοσμαδάκη)

Η Φασματική Απεικόνιση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την βελτιστοποίηση της PDT (φωτοδυναμική θεραπεία) με ALA (Αμινολεβουλονικό Οξύ) σε ασθενείς με ακτινική υπερκεράτωση και βασικοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε ασθενείς με ακτινική κεράτωση του προσώπου, μετά την ακτινοβόληση με έντονο φως, ένα ερύθημα αναπτύσσεται. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η επέκτασή του συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η πραγματικού χρόνου μέτρηση του ερυθήματος κατά τη διάρκεια PDT μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη ρύθμιση του χρόνου ακτινοβολίας ανάλογα με την ιστική ανταπόκριση. Οι περιορισμοί της οπτικής εντόπισης ύποπτων περιοχών σε συνδυασμό με την πιθανή χωρική μεταβλητότητα του βαθμού κακοήθειας δείχνουν ότι η ανίχνευση ιστικών αλλοιώσεων και η κατάταξη χρησιμοποιώντας συμβατικές κλινικές μεθόδους και ιστολογία δεν είναι πάντα αποτελεσματικές.

Εκτός αυτού, αυτές οι διαγνωστικές μέθοδοι είναι ποιοτικές, υποκειμενικές, χρονοβόρες και απαιτούν υψηλό κόστος και εργασία. Η δειγματοληψία και εξέταση πολλαπλών βιοψιών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μία πιο ακριβή και αντιπροσωπευτική κατάταξη της αλλοίωσης, αλλά αυτό αυξάνει την πιθανότητα να προκληθεί αιμορραγία και/ή να αλλάξει η φυσική ιστορία της επιθηλιακής αλλοίωσης. Η Φασματική Απεικόνιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οπτική βιοψία, μετα την χρήση του Acetic Acid δείκτη σε περιπτώσεις ασθενών που υποφέρουν από καρκίνου εκ πλακώδους επιθηλίου της γλώσσας και του λάρυγγα, αποτελώντας ένα ισχυρότατο εξεταστικό εργαλείο στην ανίχνευση ιστικών ανωμαλιών σε πρώιμα στάδια, αποφεύγωντας πολλαπλές βιοψίες και επιτρέποντας ταχύτερη και αποτελεσματικότερη διάγνωση και θεραπεία.

Στο κοντινό υπέρυθρο φάσμα (NIR) υπάρχει μια βαθύτερη διείσδυση της ακτινοβολίας στους ιστούς και απορρόφηση από το νερό. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καλύτερη μελέτη της εις βάθος έκτασης ορισμένων αλλοιώσεων. Η Φασματική Απεικόνιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εξέταση της φυσιολογικής και παθολογικής εμφάνισης του τυμπανικού υμένα (αγγειακή παροχή, διαπερατότητα) σε περιπτώσεις φλεγμονής και παθολογίας του μέσου ωτός (συλλογή υγρού, όγκοι, φλεγμονώδης διεργασία, ασβεστοποίηση οσταριών κτλ) δίχως την ανάγκη χειρουργικής παρέμβασης.

Η Πολυφασματική Απεικόνιση είναι μία νέα υποσχόμενη και αποτελεσματική τεχνική που αν χρησιμοποιηθεί σωστά μπορεί να προσφέρει στους ιατρούς πολύ βοήθεια, στην πρώιμη διάγνωση και θεραπεία πολλών παθολογικών καταστάσεων συνδυάζοντας ταχύτητα, αποτελεσματικότητα, ακρίβεια, λιγότερη παρέμβαση και σημαντικά λιγότερο κόστος.

9. Βιβλιογραφία

1. Anderson R, Parrish J. The optics of human skin. The journal of Investigative Dermatology 77: 13 – 19, 1981.
2. Andersen PH, Bjerring P. Spectral reflectance of human skin in vivo. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 7: 5 – 12, 1990.
3. Anderson RR, Parrish JA. Optical properties of human skin In: Reagen JD, Parrish JA, ed. The science of photomedicine. New York: Plenum Press, 147 – 193, 1982.
4. Andersen PH, Bjerring P. Noninvasive computerized analysis pf skin chromophores in – vivo by reflectance spectroscopy. Photodermatol Photoimmunol Photomed 7: 249 – 257, 1990.
5. Anderson RR, Blank K I H, Parrish JA. Mechanisms of increased ultraviolet transmittance through human skin after topical applications (abstract) Program and Abstracts, 7th Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Pacific Grone, California, p 141, June 1979.
6. Anderson RR, Hu J, Parrish JA. Optical radiation transfer in the human skin and application ain in – vivo remittance spectroscopy, Proccedings of the Symposium on Bioengineering and the skin, Cardiff, Wales, July 19 – 21, 1979. MTP Press, Ltd., London, 1980.
7. Arnfield M. R., Tulip J., McPhee M. S. Optical propagation in tissue with anisotropic scattering. I.E.E.E. transactions on biomedical engineering 35; 372 – 381, 1988.
8. Balas C. An imaging colorimeter for noncontact tissue color mapping. IEEE Trans Biomed Eng 44:468-474, 1997.
9. Berns RS. Colorimetry Part 1 Optics and photonics news September 23 – 27 and 53, 1995.
10. Brady M. Artificial Intelligence: An International Journal (Special Volume on Computer Vision), 17 (1 – 3), (Aug. 1981) North – Holland, Amsterdam, 1981.
11. Breit R., Kligman AM. Measurement of erythema and pigmentary response to ultraviolet radiation of different spectral qualities. In: Urbach F. ed. The biologic effects of ultraviolet radiation. Oxford: Pergamon press. 267 – 275, 1969.
12. Chamberlin GJ, Chamberlin DG. Color: Its Measurement. Computation and Application. London: Heyden, p. 46, 1980.
13. Champetier G, Rabate H. Physique des Peintures, Vernis et Pigments Dunod (Paris) 1962.
14. Cheong WF, Prahi SA, Welch A J. A review of the optical properties of biological tissues. I.E.E.E. J. of quantum electronics 26; 2166 – 2185, 1990.
15. Dawson JB, Ellis DJ, Grassam E, Cotterill JA, Fisher GW. A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in – vivo skin. Phys Med Biol 25: 695 – 709, 1980.
16. Dillon J. New trends in photobiology. The photophysics and photobiology of the eye. J. Photochem. Photobiolo. B: Biol. 10; 23 – 40, 1991.
17. Everett MA, Anglin JH, Bever AT. Ultraviolet – induced biochemical alterations in skin. Arch Dermatol 84: 717 – 724, 1961.

18. Farr PM., Diffey BL. The vascular response of human skin to ultraviolet radiation. Photochem. Photobiol. 44: 501 – 507, 1986.
19. Farr PM, Diffey BL. Quantitative studies on cutaneous erythema induced by ultraviolet radiation. British Journal of dermatology 111: 673 – 682, 1984.
20. Findlay GH. Blue skin. Br. J. Dermatol 83, 127 – 134, 1970.
21. Gettens RJ. G. L. Stout Painting materials. – A short Endyclopaedia. Dover pub. Inc. New York 1966.
22. Grum F, Becherer RJ. Optical Radiation Measurements. Vol. 1, Radiametry, Academic Press, New York, 1979.
23. Guyton A. Humans' physiology, Third Edition, 515 – 543, 1990.
24. Handelman GJ, Dratz EA. The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant induced damage. Adv. Free Radical Biol. Med. 2: 1 – 89, 1986.
25. Hunt RW. The Reproduction of Color. Wiley, New York, 1967.
26. Jenkins FA, White HE. Funtamentals of Optics 4th ed. New York Mcgraw Hill International Book Co, 1976.
27. Kaidbey KH, Poh – Agin P, Sayre RR, Kligman AM. Photoprotection by melanin. A comparizon of Black and Caucasian skin. J. Am. Acad. Dermatol. 1: 249 – 260, 1979.
28. Kollias N. The Physical Basis of Skin Color and its Evaluation. Clinics in Dermatology, 13: 361 – 367, 1995.
29. Kollias N, Baqer A. Spectroscopic characteristics of human melanin in – vivo. J. Invest Dermatol 85: 593 – 601, 1985.
30. Kollias N, Baqer A. On the assessment of melanin in human skin in – vivo. Photochemistry and photobiology. 43: 45 – 54, 1986.
31. Kollias N, Baqer AH. Quantitative assessment of UV – induced pigmentation and erythema. Photodermatol. Photoimmunol Photomed 5: 53 – 60, 1988.
32. Kubelka P. New contribution to the optics of intensely light – scattering materials. Part II. Non homogeneous layers. J. Opt. Soc. Am. 44: 330 – 335, 1954.
33. Kuhn KJ. Conventional Analog Television – An Introduction, 1998.
34. Kurtz SK, Kozikowskis, Wolfram LJ. Optical constants of solid melanin determined from reflection measurements in the visible spectrum (abstract) Br. J. Dermatol. 109 (suppl 25): 89 – 98, 1983.
35. Makridakis SG. Multiply regression, In: Forecasting methods and Applications. New York John Wiley and Sons. 21: 246 – 317, 1983.
36. Mendelson Y., Kent JC, Yocum BL., Birle MJ. Design and evaluation of a new reflectance pulse oximer sensor. Med. Instrument 22: 167 – 173, 1988.
37. Nazif A. A Survey of Color, Boundary Information and Texture as Features for Low – Level Image Processind. TR 78 – 7R, 1978.
38. Nilsson GE, Tenland T, ∅berg P∅. Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. IEEE Trans Biomed En 198&&&; 27: 597 – 604.
39. Orna MV. The Chemical origins of color. Journal of Chemical Education. 55: 478 – 484, 1978.
40. Pine DJ, Weitz DA, Zhu JX. Herbolzheimer E. Diffusing – wave spectroscopy: dynamic light scattering in the multiple scattering limit. J. Phys. France 51; 2101 – 2127, 1990.
41. Richardson, S.M.. Am. Mineral 60: 73, 1975.

42. Serup J, Agner T. Colorimetric quantification of erythema – a comparison of two colorimeters (Lange Micro Color and Minolta Chroma Meter CR – 200) with a clinical scoring scheme and Laser – Doppler flowmetry. Clinical and experimental Dermatology. 15: 267 – 272, 1990.
43. Seitz JC, Whitmore CJ. Measurement of erythema and tanning responses in human skin using a tri – stimulus colorimeter Dermatologica 177: 70 – 75, 1988.
44. Shaffer SA, Kunade T. Color Vision. Encyclopedia of artificial Inteligence, 1: 124 – 131, 1987.
45. Trachanas S. Quantum Mechanics. Vol II 3rd edition, 1986.
46. van der Burgt TP, den Bosch JJ, Borsboom PC, Kortsmit WJ. A comparison of new and conventional methods of tooth color. J. Prosth. Dent. 63: 155 – 162, 1990.
47. Wans S, Jaenicke KF, Parrish JA, Comparizon of the erythemogenic eggectiveness of ultraviolet – B (290 – 320 nm) and ultraviolet A (320 – 400 nm) radiation by skin reflectance. Photochem. Photobiol. 37: 547 – 552, 1983.
48. Wolbarsht ML, Walsh AW, George G. Melanin, an unique biological absorber. Appl. Opt. 20: 2184 – 2186, 1981.
49. Wood, DL, Nassau, K. Am. Mineral 53: 777, 1968.
50. Wyszecki G,. Stiles WS. Color science: Concepts and Methods. Quantitative data and formulae, 2nd ed., Wiley, New York, 1982.
51. Zeniske A, Krahl JA. The occurrence of urocanic acid in Sweat. Biochem. Biophys. Acta 12: 479 – 484, 1953.

Β. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ

1. Ο καρκίνος εκ πλακώδους επιθηλίου της τραχηλοπροσωπικής χώρας
1.1. Γενικά στοιχεία-Επιδημιολογία
1.2. Κυτταρικός κύκλος. Η εμφάνιση του καρκίνου. Σημαντικά γεγονότα
1.3. Σταδιοποίηση-Διαφοροποίηση
2. Βασικές έννοιες της βιολογίας των όγκων
2.1. Δημιουργία Κλώνων
2.2. Μοριακά μοντέλα ανάπτυξης
2.3. Θέσεις ανάπτυξης καρκίνου
2.4. Η εμφάνιση του κακόηθους φαινότυπου
2.5. Ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακώδους επιθηλίου σε μη καπνιστές
3. Η γενετική βάση του καρκίνου
4. Βασικά σημεία καρκινογένεσης
4.1. Τα έξι βήματα
4.2. Ανάπτυξη αυτόνομου μηχανισμού πολλαπλασιασμού
4.3. Αναστολή των ανασταλτικών για την ανάπτυξη σημάτων
4.4. Αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Απόπτωση)
4.5. Είσοδος στην αιωνιότητα
4.6. Ανάπτυξη δικτύου αιματικής τροφοδότησης (αγγειογένεση)
4.7. Ιστική διείσδυση και μετάσταση
4.7.1. Η βιολογία της καρκινικής διήθησης
4.7.2. Αποδόμηση του εξωκυττάριου χώρου
5. Μηχανισμοί απόπτωσης
5.1. Ο ρόλος της απόπτωσης στην παθολογία και την θεραπευτική αντιμετώπιση διαφόρων νόσων στην Ωτορινολαρυγγολογία
5.2. Κυτταρικός έλεγχος: πολλαπλασιασμός και θάνατος
5.3. Απόπτωση και νέκρωση
5.4. Μοριακοί μηχανισμοί προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
5.5. Το Bcl-2 στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
5.6. Μιτοχόνδρια και ασβέστιο στην απόπτωση
5.7. Εξωκυττάριοι υποκαταστάτες κυτταρικού θανάτου
5.8. p53 και απόπτωση
5.9. Κλινική εφαρμογή: Καρκίνος
5.10. Συμπεράσματα
6. Βιβλιογραφία

1. Ο καρκίνος εκ πλακώδους επιθηλίου της τραχηλοπροσωπικής χώρας

1.1. Γενικά στοιχεία-Επιδημιολογία

Η σύγχρονη ανάπτυξη της μοριακής φαρμακολογίας βοήθησε στο να γίνει κατανοητό, ότι η ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων είναι αποτέλεσμα της εκτροπής των κυττάρων από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Με την εξέλιξη των πιο σύγχρονων μοριακών τεχνικών, δίνεται η δυνατότητα να κατανοήσουμε τις γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στο κύτταρο κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης. Καθώς αποκομίζουμε περισσότερες γνώσεις για την βιολογία των όγκων και αναπτύσσονται νεότερες μοριακές τεχνικές, είναι ιδιαιτέρως σημαντικό για τους κλινικούς ιατρούς να κατανοήσουν τους μοριακούς μηχανισμούς που υπόκεινται οι νεοπλασματικές νόσοι της τραχηλοπροσωπικής χώρας, έτσι ώστε να αναπτυχθούν νέες ορθολογιστικές θεραπείες.

Περίπου 67.000 καρκίνοι της τραχηλοπροσωπικής χώρας διαγιγνώσκονται στις ΗΠΑ κάθε χρόνο, εκπροσωπώντας το 2-3% όλων των καρκίνων. Οι σχετικές συχνότητες των πρωτοπαθών όγκων της τραχηλοπροσωπικής χώρας ανά περιοχή είναι 40% στην στοματική κοιλότητα, 25% στον λάρυγγα, 15% στον οροφάρυγγα, 7% στους μείζονες σιελογόνους αδένες και 13% στις υπόλοιπες περιοχές. Ο λόγος των ανδρών προς τις γυναίκες που προσβάλλονται είναι 3:1 και η μέση ηλικία κατά την έναρξη της νόσου είναι περίπου τα 50 χρόνια.

Στην τραχηλοπροσωπική χώρα υπάρχει αυξημένη επίπτωση του καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων, στους ασθενείς που έχουν υποστεί σοβαρή έκθεση σε καπνό και αλκοόλ. Μερικές μελέτες έχουν δείξει μια σχέση ανάμεσα στο καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων με την σύφιλη, την προσβολή από ιούς (ιός Epstein-Barr, ιός του απλού έρπητα, ιός του ανθρώπινου θηλώματος), την επαγγελματική έκθεση (πριονίδι, σκόνη από μέταλλα), την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με την παραμέληση της στοματικής υγιεινής.

Το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων είναι σαφώς ο ιστολογικός τύπος που συναντάται συχνότερα, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το 90% όλων των καρκίνων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Ο καρκίνος μπορεί να είναι ενδοεπιθηλιακός (in situ) ή διηθητικός, οπότε και ταξινομείται ως διαφοροποιημένος, μέτρια διαφοροποιημένος, φτωχά διαφοροποιημένος ή αδιαφοροποίητος, με βάση τα συνεχώς μειούμενα ποσά κερατινοποίησης. Αυτή η ιστολογική διαβάθμιση δεν προβλέπει πάντα με σταθερότητα την κλινική συμπεριφορά. Υπάρχουν τέσσερα μορφολογικά αυξητικά μοντέλα: ο εξωφυτικός, ο ελκωτικός, ο διηθητικός και ο ακροχορδονώδης. Ο ελκώδης τύπος είναι πιο κοινός και προμηνύει φτώχη πρόγνωση.

Οι προκαρκινικές βλάβες περιλαμβάνουν την λευκοπλακία (λευκή πλάκα), υπερπλασία (πάχυνση του βλεννογόνου), ερυθροπλακία (βελουδένια κόκκινη περιοχή), και την δυσπλασία. Τα δύο τελευταία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ροπή προς την κακοήθη εξαλλαγή. Περιοχικές μεταστάσεις στους τραχηλικούς λεμφαδένες είναι συχνές και ανάλογες με το μέγεθος και την διήθηση του πρωτοπαθούς όγκου. Οι πιο συχνές περιοχές για απομακρυσμένες μεταστάσεις είναι οι πνεύμονες, το ήπαρ

και τα οστά. Το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας μπορεί να προέλθει από οποιαδήποτε από τις προκαρκινικές βλάβες ή έλκη, που αυξάνουν σε έκταση και βάθος και τελικά διηθούν τις γειτονικές δομές. Τα κλινικά σημεία, τα συμπτώματα και τα αντικειμενικά ευρήματα περιλαμβάνουν έλκος που δεν επουλώνεται, μάζα στον τράχηλο, αιμορραγία, ωταλγία, ανεξήγητος πόνος στο πρόσωπο, ωδυνοφαγία και βράγχος φωνής. Η παρουσία τέτοιων συμπτωμάτων επιτάσσει μια λεπτομερή κλινική εξέταση. Αμφίχειρη ψηλάφηση του τραχήλου, των αμυγδαλών και της βάσης της γλώσσας επιβάλλεται σε κάθε ασθενή. Επιπροσθέτως, η ρινική κοιλότητα, ο οροφάρυγγας, ο ρινοφάρυγγας, ο υποφάρυγγας και ο λάρυγγας πρέπει να εξεταστούν. Σε ικανά χέρια όλες αυτές οι εξετάσεις μπορούν να γίνουν συμβατικά με την βοήθεια κατόπτρου, αλλά επίσης η συμπληρωματική ενδοσκόπηση με το εύκαμπτο ενδοσκόπιο μπορεί να παρέχει επιπρόσθετες πολύτιμες κλινικές πληροφορίες.

Περίπου το 5% των ασθενών με καρκίνο του κεφαλιού και του τραχήλου θα έχουν ένα δεύτερο πρωτοπαθές καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων στο κεφάλι ή στον τράχηλο ή στον οισοφάγο ή στον πνεύμονα, το οποίο μπορεί να εκτιμηθεί καλύτερα με πανενδοσκόπηση (άμεση λαρυγγοσκόπηση, οισοφαγοσκόπηση, και βρογχοσκόπηση με κατευθυνόμενη βιοψία). Μια υπολογιστική τομογραφία (αξονική) με κατεύθυνση από τη βάση του κρανίου προς την κλείδα αποτελεί μια δοκιμασία υπερβολικά ενημερωτική και θα πρέπει να αποτελεί μέρος της κλινικής παρακολούθησης, προηγούμενη της πανενδοσκόπησης και της βιοψίας. Η υπολογιστική τομογραφία είναι χρήσιμη για την αναγνώριση των κρυφών όγκων, της τοπικής επέκτασης κάποιου όγκου, και της έκτασης δυνητικά προσβεβλημένων επιχώριων τραχηλικών λεμφαδένων. Σε ένα ασθενή με ένα κλινικώς προφανή πρωτοπαθή όγκο, ένα δείγμα βιοψίας μπορεί να παρθεί με ένα νυστέρι, με την ειδική διατρητική λαβίδα (punch forceps) ή με τη λεπτή βελόνη σε κάποιο ραντεβού στο ιατρείο. Ένα καρδιογράφημα και οι δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας αποτελούν επαρκείς εξετάσεις πρόληψης για τη μεταστατική σε απομακρυσμένες περιοχές νόσο.

Ένα σχήμα ταξινόμησης των καρκίνων πρέπει να περιλαμβάνει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά του όγκου που καθορίζουν το ιστορικό της ύπαρξής του. Η ταξινόμηση της Επιτροπής της Αμερικανικής Ένωσης για τον Καρκίνο ((American Joint Committee for Cancer-AJCC), είναι βασισμένη στην πρόταση ότι οι καρκίνοι με τα ίδια ανατομικά και ιστολογικά στοιχεία μοιράζονται παρόμοια μοντέλα ανάπτυξης και επέκτασης. Το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου που συμβολίζεται με Τ βασίζεται στην εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου κι επομένως ποικίλει για κάθε περιοχή της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Η πρόγνωση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το στάδιο κατά τη διάγνωση. Σε πολλές περιοχές καρκίνου της τραχηλοπροσωπικής χώρας, η επιβίωση ξεπερνάει το 80% σε ασθενείς με νόσο σταδίου Ι. Οι περισσότεροι όμως από τους ασθενείς κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχουν νόσο σταδίου ΙΙΙ ή IV και ένα ποσοστό επιβίωσης λιγότερο από 40%.

Η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία ή και τα δύο είναι οι συμβατικές μέθοδοι θεραπείας, που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των όγκων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Γενικά η χημειοθεραπεία και η ανοσολογική θεραπεία είναι κατάλληλες μόνο ως μέρη κλινικών πρωτοκόλλων, ως ανακουφιστικά μέτρα σε ασθενείς με ανίατη νόσο ή για όγκους που επιμένουν μετά από τη συμβατική θεραπεία. Η χειρουργική εκτομή γενικά προσφέρει την καλύτερη δυνατότητα για ολοκληρωμένη θεραπεία του όγκου, ενώ η ιστολογική εξέταση του αφαιρεθέντος ιστού χρησιμεύει για την επιβεβαίωση της επάρκειας των ορίων εκτομής. Η θνησιμότητα είναι ελάχιστη, όταν ο όγκος είναι μικρός και προσπελάσιμος, αλλά

σημαντικές αισθητικές και λειτουργικές ανεπάρκειες δεν είναι ασυνήθεις μετά από την εκτομή όλων αυτών των όγκων.

Η ακτινοθεραπεία είναι σε αρκετές περιπτώσεις αρκετά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των όγκων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Το πλεονέκτημα της ακτινοθεραπείας είναι ότι οι ανατομικές δομές μπορούν να διατηρηθούν, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ο έλεγχος του τοπικού όγκου. Παρόλαυτα, η ακτινοβολία της τραχηλοπροσωπικής χώρας προκαλεί οξεία βλεννογονίτιδα και πέρα από ένα χρονικό σημείο, ξηροστομία, ίνωση του δέρματος και των μαλακών ιστών, καθώς και μεταβολή της λειτουργίας της υπόφυσης και του θυρεοειδούς. Η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία συχνά συνδυάζονται για να επιτύχουν τοπικό έλεγχο του καρκίνου της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Η αποκατάσταση είναι σημαντική κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία και περιλαμβάνει φυσιοθεραπεία και εργασιοθεραπεία, αποκατάσταση του λόγου και της κατάποσης, αλλά και διατροφική υποστήριξη. Μια καινούρια και ακόμα σε πειραματικό στάδιο στρατηγική χημειοπροφύλαξης εκτιμήθηκε πρόσφατα σε κλινικές μελέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν την χορήγηση μιγμάτων από παράγωγα ρετινοειδών προκειμένου να μειωθεί η επίπτωση των δεύτερων πρωτογενών όγκων και να προκαλέσουν υποχώρηση των προκακοήθων βλαβών. Ομοίως, κλινικές δοκιμασίες είναι πλέον σε θέση να εκτιμήσουν τη χρησιμότητα της γονιδιακής θεραπείας (π.χ. αποκατάσταση του φυσιολογικού p53 γονιδίου) στην αντιμετώπιση των κακοηθειών της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

Η κατανόηση του τρόπου επέκτασης του καρκίνου του λάρυγγα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και εφαρμογή πιο συντηρητικών χειρουργικών τεχνικών, που σκοπό έχουν την διατήρηση της φώνησης. Από την άλλη μεριά, η χρήση της ακτινοβολίας συσχετίζεται με ελάττωση των μεταστάσεων στους επιχώριους τραχηλικούς λεμφαδένες, ενώ η χρήση επικουρικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων συνοδεύεται με ελαττωμένη πιθανότητα απομακρυσμένων μεταστάσεων σε όργανα όπως ο πνεύμονας, το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Παρόλες όμως τις εξελίξεις των τελευταίων χρόνων, που σχετίζονται με την χειρουργική αλλά και την συντηρητική ή επικουρική θεραπεία του καρκίνου του λάρυγγα, το ποσοστό των ασθενών στους οποίους τελικά συμβαίνει επιχώρια ή απομακρυσμένη μετάσταση παραμένει αρκετά υψηλό. Είναι δε πλέον αποδεδειγμένο, ότι σε περιπτώσεις καρκίνου του λάρυγγα, η παρουσία επιχώριων τραχηλικών μεταστάσεων –ιδίως σε ασθενείς με εξωκαψική διήθηση- σχετίζεται αρνητικά με την επιβίωσή των. Είναι λοιπόν πιθανό, ότι η κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών της μετάστασης στον καρκίνο εκ πλακώδους επιθηλίου της τραχηλοπροσωπικής χώρας (ΚΠΕΤΧ) να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινούργιων θεωριών σχετικά με την επέκταση του καρκίνου και τελικά να συμβάλλει στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης αυτών των ασθενών.

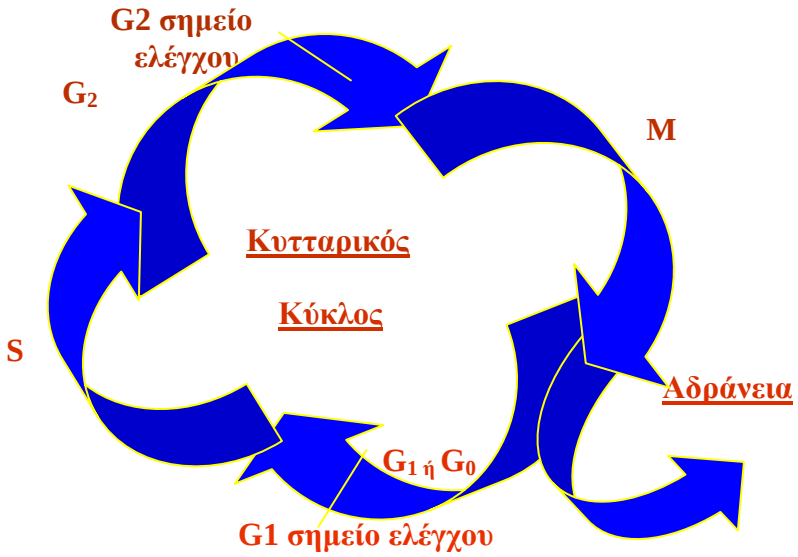
1.2. Κυτταρικός κύκλος. Η εμφάνιση του καρκίνου. Σημαντικά γεγονότα

Ο καρκίνος αποτελεί διαδικασία πολυσταδιακή, κατά την οποία λαμβάνουν χώρα πολλαπλές γενετικές μεταβολές, συνήθως σε ένα χρονικό διάστημα αρκετών χρόνων. Στα σύνδρομα που προδιαθέτουν σε καρκίνο, οι γενετικές αυτές μεταβολές συμβαίνουν στα κύτταρα της γαμετογόνου σειράς. Όμως, οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις αποτελούν αναμφίβολα την εξαίρεση μεταξύ των υπεύθυνων για καρκινικές καταστάσεις παραγόντων. Οι περισσότερες μεταβολές είναι επίκτητες με τη μορφή των αυτοσωματικών μεταλλάξεων: χρωμοσωμικές μεταθέσεις, αφαιρέσεις, αντιστροφές, προσθέσεις και σημειακές μεταλλάξεις. Καθεμιά από αυτές τις

καταστάσεις δύναται να προκαλέσει καρκίνο οδηγώντας στην απόκτηση λειτουργικών μεταλλάξεων, που ενεργοποιούν κάποιο ογκογονίδιο ή στην απώλεια λειτουργικών μεταλλάξεων, που ευθύνονται για την απενεργοποίηση κάποιου κατασταλτικού ογκογονίδιου ή κάποιου αρνητικού αυξητικού ρυθμιστή.

Τα κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα σε καθορισμένες χρονικές στιγμές, με τη λήψη αποφάσεων που αφορούν τη διαίρεση, τη διαφοροποίηση ή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, που ονομάζεται απόπτωση. Όλα αυτά τα αποτελέσματα επηρεάζουν τον απόλυτο αριθμό των κυττάρων και αποτελούν στόχους της δράσης των ογκογονιδίων ή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ένα δίκτυο βιοχημικής επικοινωνίας παρέχει στον κυτταρικό πυρήνα πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος και τον εναρμονισμό των γονιδίων στις απαραίτητες αντιδράσεις. Περιβαλλοντικά μηνύματα μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο, μέσω (1) εξειδικευμένων μεμβρανικών υποδοχέων, που δεσμεύουν κυττοκίνες, χαμηλού μοριακού βάρους ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες κ.τ.λ., από το εξωκυττάριο περιβάλλον και μεταδίδουν μηνύματα από την εξωκυττάρια περιοχή, η οποία δεσμεύει το μόριο-σήμα στην ενδοκυτττάρια περιοχή, πυροδοτώντας μια ενζυμική αντίδραση, και (2) κάποιων περιβαλλοντικών παραγόντων, που μεταναστεύουν απευθείας διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα, ώστε να έρθουν σε επαφή και να δεσμεύσουν πρωτείνες-στόχους μορίων, που φέρουν ρόλο υποδοχέα τους. Ο θεμελειώδης ρόλος καθενός από αυτά τα μονοπάτια μετάδοσης μηνυμάτων είναι να φτάσουν στον πυρήνα και από εκεί και πέρα να τροποποιήσουν συγκεκριμένα μεταγραφικά γεγονότα, τα οποία μπορούν να μεταβάλλουν την κυτταρική συμπεριφορά αναφορικά με τον κυτταρικό μεταβολισμό, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Ανωμαλίες που εμφανίζονται σε αυτά τα μονοπάτια συμβάλλουν στην παθογένεση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

Τα περισσότερα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν μέσω άμεσης εμπλοκής τους στη ρύθμιση του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου ή με άλλα λόγια στη ρύθμιση της κατά σειρά αλληλουχίας γεγονότων με τα οποία το κύτταρο διπλασιάζει το περιεχόμενό του και χωρίζεται στα δύο. Το βιολογικό ρολόι, που καθορίζει τον κυτταρικό κύκλο λειτουργεί με την περιοδική ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνης/ κυκλίνης-εξαρτώμενης κινάσης (Cdk) στα σημεία ελέγχου, δηλαδή τα σημεία που παίρνονται οι αποφάσεις για την περαιτέρω εξέλιξη. Στα σημεία ελέγχου ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να αναχαιτιστεί σε απάντηση σε εισερχόμενα ή εξερχόμενα μηνύματα. Μια σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου των θηλαστικών παρουσιάζεται στην σχήμα 1.



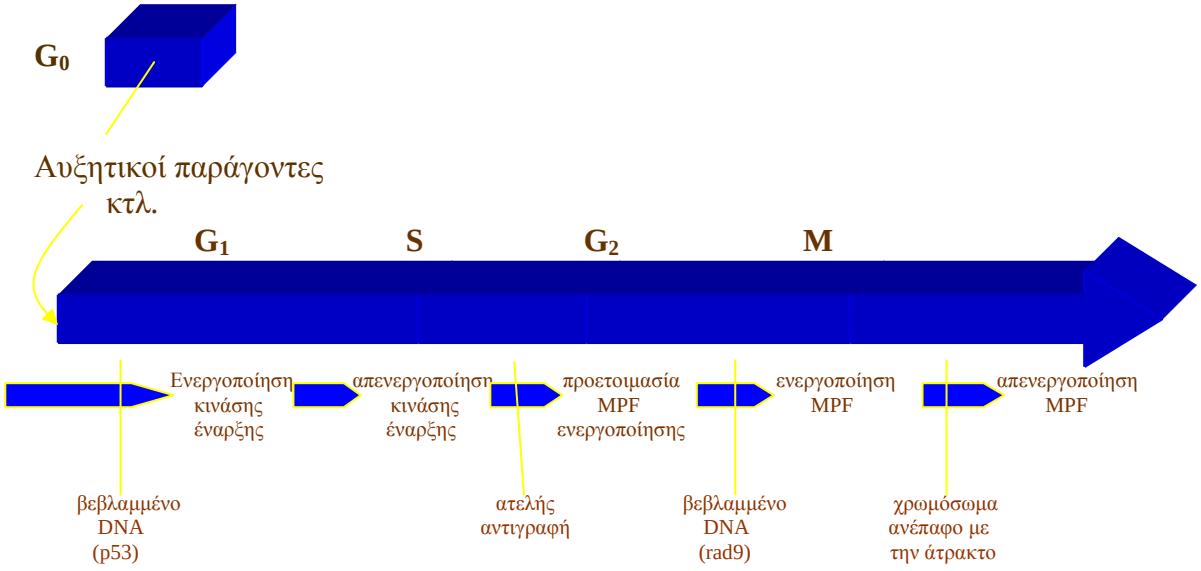
Σχήμα 1. Ο κυτταρικός κύκλος των θηλαστικών είναι βασικά ταυτόσημος με τον κυτταρικό κύκλο των μυκήτων με μείζον σημείο ελέγχου το G1. Όμως σε αντίθεση με εκείνους των μυκήτων, οι κυτταρικοί κύκλοι των θηλαστικών απέχουν από τη φάση πολλαπλασιασμού τους (φάση G0) μέχρις ότου λάβουν συγκεκριμένα μηνύματα από άλλα κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου κυτταρικής διαίρεσης, κάθε κύτταρο πρέπει να αντιγράφει το γενετικό υλικό του, το DNA. Τα περισότερα από τα κύτταρα αυξάνουν και διπλασιάζουν όλο το περιεχόμενό τους. Κατά τη διάρκεια της φάσης M (M για τη μίτωση), τα αντιγραμμένα χρωμοσώματα με τη μίτωση συσπειρώνονται σε δύο ξεχωριστούς πυρήνες, και το κύτταρο χωρίζεται στα δύο με κυτταροκίνηση. Το άλλο πολύ μεγαλύτερο μέρος του κύκλου είναι γνωστό με το όνομα μεσόφαση. Η περίοδος της συνεχούς κυτταρικής ανάπτυξης περιλαμβάνει τη φάση S (S για τη σύνθεση), όταν συμβαίνει η φάση αντιγραφής του DNA, καθώς και δύο μεγάλα κενά διαστήματα, τις φάσεις G1 και G2, μεταξύ των S και M φάσεων. Η αλληλουχία των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου καθορίζεται από ένα σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που κυκλικά πυροδοτεί τις βασικές διαδικασίες της κυτταρικής αναπαραγωγής, όπως την αντιγραφή του DNA και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η κινητήρια δύναμη αυτού του συστήματος είναι ένα σύνολο από πρωτεϊνικά συμπλέγματα, που σχηματίζονται από δύο στοιχειώδη συστατικά: (α) υπομονάδες πρωτεϊνικών κινασών, που ονομάζονται πρωτεϊνες Cdk, και (β) πρωτεϊνικούς ενεργοποιητές, που ονομάζονται κυκλίνες. Τουλάχιστον δύο τέτοια πρωτεϊνικά συμπλέγματα ρυθμίζουν το φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο, ένα στο τέλος περίπου του σημείου ελέγχου G_1, ακριβώς πριν τη φάση S, και το άλλο προς το τέλος της φάσης G_2, πριν από τη φάση M. Αυτά τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα ασκούν έλεγχο μέσω των δράσεων των κινασών τους, οι οποίες απότομα ενεργοποιούνται ή

απενεργοποιούνται όπως το ανοιγμα ή το κλείσιμο ενός διακόπτη σε συγκεκριμένα σημεία του κύκλου.

Όπως ακριβώς τα κύτταρα των μυκήτων όταν στερούνται θρεπτικών συστατικών, έτσι και τα κύτταρα των θηλαστικών όταν στερούνται ορού, σταματούν την ανάπτυξή τους και αναχαιτίζονται συνήθως μεταξύ της φάσης μίτωσης και της φάσης S, σε μια στατική κατάσταση (κατάσταση ηρεμίας) που καλείται φάση G0. Φαίνεται ότι τα θρεπτικά συστατικά που παρέχει ο ορός είναι συγκεκριμένες πρωτεϊνες υψηλής εξειδίκευσης, που καλούνται αυξητικοί παράγοντες, οι περισσότεροι από τους οποίους απαιτούνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξης του 10^9 με 10^{11}M). Οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου μέσω ενός περίπλοκου δικτύου από ενδοκυττάριους καταρράκτες σήμανσης, οι οποίοι βασικά ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή και τη συγκέντρωση και ενεργοποίηση του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, όπως περιγράφτηκε παραπάνω. Πολλά από τα συστατικά αυτών των μονοπατιών μεταφοράς μηνυμάτων έχουν αναγνωρισθεί μέσω μελετών των καρκινικών κυττάρων, στα οποία έχουν συμβεί μεταλλάξεις, είτε με σκοπό να ενεργοποιήσουν γονίδια των οποίων τα προϊόντα προωθούν τον πολλαπλασιασμό (πρωτο-ογκογονίδια), είτε να απενεργοποιήσουν γονίδια των οποίων τα προϊόντα φυσιολογικά περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό (ογκοκατασταλτικά γονίδια). Τα πρωτο-ογκογονιδία παράγουν μερικές ρυθμιστικές των γονιδίων πρωτεϊνες, όπως το Myc, οι οποίες σε μερικούς κυτταρικούς τύπους είναι απαραίτητες και αρκετές να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό. Αντιθέτως, υπάρχουν άλλα (ογκοκατασταλτικά) γονίδια, όπως το Rb, των οποίων τα προϊόντα μπλοκάρουν τον πολλαπλασιασμό μέσω της σύνδεσής τους με τις προαναφερθείσες πρωτείνες-ρυθμιστές γονιδίων. Επιπροσθέτως κάποιοι βραχυπρόθεσμοι μηχανισμοί ελέγχου, όπως εκείνοι που είναι υπεύθυνοι για την προοδευτική απώλεια του δυναμικού πολλαπλασιασμού όταν τα κύτταρα γερνάνε ή για την λεπτομερή επεξεργασία προγραμμάτων κυτταρικής διαίρεσης, απαιτούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής ανάπτυξης.

Τα κύτταρα των θηλαστικών απέχουν από τον πολλαπλασιασμό (εισέρχονται στη φάση G0) μέχρις ότου λάβουν ειδικά μηνύματα από άλλα κύτταρα, ώστε να δράσουν διαφορετικά (σχήμα 2). Επίσης, αρκετοί μηχανισμοί ελέγχου με ανατροφοδότηση λειτουργούν ώστε να περιορίσουν το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μέχρι να ικανοποιηθούν οι απαραίτητες συνθήκες.



Σχήμα 2. Σύνοψη των ανατροφοδοτικών μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου των πολυκύτταρων ζωντανών οργανισμών. Οι κόκκινες λωρίδες δείχνουν τα εμπόδια στην πρόοδο του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Μεταλλάξεις των γονιδίων που ελέγχουν τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μπορεί να προκαλέσουν την απομάκρυνση ενός ή περισσοτέρων αυτών, από τα σημεία βλάβης και την πρόοδο του κύκλου ανεξαρτήτως των ευνοϊκών ή μη ευνοϊκών συνθηκών. Στα φυσιολογικά κύτταρα, στο σημείο ελέγχου G1 σταματάει ο κύκλος σε απάντηση στην απουσία των αυξητικών παραγόντων και σε πιθανή βλάβη του DNA και στο σημείο G2, ο κύκλος σταματάει πάλι σε απάντηση σε βλάβη του DNA. Έχουμε αναφέρει κάποια ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια παραπάνω.

Επιπροσθέτως υπάρχει ένας αριθμός άλλων τέτοιων γονιδίων των οποίων η ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση μπορεί να οδηγήσει αντιστοίχως σε καρκινογένεση.

- ***Γονίδια που εκφράζουν GTP πρωτεϊνες:*** οι πρωτεϊνες GTP παίζουν το ρόλο του μοριακού διακόπτη στο κύτταρο. Σε γενικές γραμμές διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: στις G πρωτεϊνες που αποτελούνται από τις α, β και γ υπομονάδες και τα μέλη της υπεροικογένειας Ras τα οποία είναι μονομερή. Δεσμεύουν GTP ή GDP και έτσι μετατρέπονται στην ενεργή ή ανενεργή μορφή τους αντίστοιχα. Στην περίπτωση που το σύμπλεγμα πρωτεϊνης-GTP έλθει σε μια σταθερή κατάσταση τότε βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησής του κάτι που μπορεί να αποτελέσει αιτιολογικό παράγοντα για την πρόκληση καρκίνου.
- ***Το γονίδιο που εκφράζει το p53:*** το πρωτεϊνικό προϊόν αυτού του γονιδίου αναχαιτίζει τα κύτταρα των θηλαστικών από το να εισέλθουν στη φάση S του κύκλου στο σημείο ελέγχου G1, σε απάντηση σε κάποια βλάβη του DNA. Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου προκαλούν τη γένεση ενός μεγάλου ποσοστού των ανθρωπίνων καρκίνων.

1.3. Σταδιοποίηση-Διαφοροποίηση

Το μέγεθος ενός μη αντιμετωπιζόμενου πρωτοπαθούς καρκίνου της τραχηλοπροσωπικής χώρας (Τ) αυξάνει προοδευτικά και σε κάποιο χρονικό σημείο αρχίζει να εμφανίζεται η εμπλοκή των περιοχικών λεμφαδένων (Ν) και/ή απομακρυσμένων μεταστάσεων (Μ). Ένα απλό σχήμα ταξινόμησης, το οποίο θα μπορεί να συγκροτηθεί σε μια μορφή σταδιοποίησης και να χρησιμοποιηθεί ευρέως, είναι και ο σκοπός του συστήματος TNM της AJCC. Αυτή η ταξινόμηση είναι πανομοιότυπη με εκείνη της Διεθνούς Ένωσης κατά του Καρκίνου (UICC) και αποτελεί ένα απόσταγμα από διάφορα υπάρχοντα συστήματα.

Καθώς ο πρωτοπαθής όγκος (Τ) αυξάνει σε μέγεθος με το χρόνο, συμβαίνει η τοπική επέκταση και διείσδυση στους γύρω ιστούς, που ακολουθείται από επέκταση σε περιοχικούς λεμφαδένες που παροχετεύουν την περιοχή του όγκου και/ή επέκταση σε άλλες απομακρυσμένες περιοχές, μέσω διείσδυσης στα αγγεία του αίματος (Ν). Η περίοδος κατά την οποία αυτή η επέκταση είναι έκδηλη ή ευκρινής με τις υπάρχουσες μεθόδους κλινικής εξέτασης αποτελεί άλλο ένα πολύ σημαντικό δείκτη της ανάπτυξης του καρκίνου. Συνήθως αργότερα, είτε στο μέσο είτε προς το τέλος του χρόνου ζωής του καρκίνου, γίνεται φανερή με την κλινική εξέταση η απομακρυσμένη επέκταση δηλαδή οι απομακρυσμένες μεταστάσεις (Μ). Έτσι οι απομακρυσμένες μεταστάσεις (Μ) αποτελούν κανονικά τον τρίτο δείκτη της καρκινικής εξέλιξης.

Αυτά τα τρία σημαντικά γεγονότα στο ιστορικό της ζωής ενός καρκίνου- η τοπική μεγέθυνση (Τ), η επέκταση σε περιοχικούς λεμφαδένες (Ν), και η μετάσταση (Μ)- χρησιμοποιούνται κατά τον τρόπο που εμφανίζονται (ή δεν εμφανίζονται) κατά την κλινική εξέταση, προτού αρχίσει η οριστική θεραπεία, ώστε να καθοριστεί το ανατομικό εύρος του καρκίνου. Αυτή η σύντομη μέθοδος καθορισμού του εύρους της νόσου (TNM) σε μια καθορισμένη χρονική στιγμή αποτελεί έκφραση του σταδίου του καρκίνου στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο της εξέλιξής του.

Γεγονότα όπως η επέκταση σε περιοχικούς λεμφαδένες και/ή απομακρυσμένες μεταστάσεις συμβαίνουν δυνητικά προτού να γίνουν αντιληπτά από την κλινική εξέταση. Έτσι, η εξέταση κατά τη διάρκεια της χειρουργικής διαδικασίας και η ιστολογική εξέταση των χειρουργικά αφαιρεθέντων ιστών μπορεί να αναγνωρίσει σημαντικά επιπρόσθετα στοιχεία που φανερώνουν την φύση της καρκινικής οντότητος, δηλαδή την πρόγνωση του ασθενούς, κάπως διαφορετικά από εκείνα που μπορούν να γίνουν κλινικώς αντιληπτά προτού ξεκινήσει η θεραπεία. Εφόσον γίνει λοιπόν αυτή η παθολογική ταξινόμηση και η σταδιοποίηση (βασισμένη στην εξέταση χειρουργικώς εκτετμημένου δείγματος με αρκετό ιστό ώστε να εκτιμηθεί ο υψηλότερος βαθμός της κλίμακας ταξινόμησης του συστήματος TNM), αναγράφεται συνοδεύοντας την κλινική ταξινόμηση. Δεν αντικαθιστά την κλινική σταδιοποίηση. Και οι δύο πρέπει να διατηρούνται στο μόνιμο ιατρικό αρχείο του ασθενούς. Το κλινικό στάδιο χρησιμοποιείται σαν οδηγός για την επιλογή του θεραπευτικού πλάνου. Η παθολογοανατομική ταξινόμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετος οδηγός για επιπρόσθετη επικουρική θεραπεία, αλλά και για την εκτίμηση της πρόγνωσης.

Οι θεραπευτικές διαδικασίες ακόμα κι αν δεν οδηγούν στην ίαση, μπορεί να αλλάξουν την πορεία και το ιστορικό της ζωής ενός καρκινοπαθούς. Αν και οι καρκίνοι που υποτροπιάζουν μετά από τη θεραπεία μπορεί να σταδιοποιηθούν με τα ίδια κριτήρια, όπως εκείνα της κλινικής σταδιοποίησης πριν από την εφαρμογή των θεραπευτικών μέσων, η σημασία αυτών των κριτηρίων ίσως να μην είναι η ίδια. Για το λόγο αυτό η ταξινόμηση του υποτροπιάζοντος καρκίνου στο ίδιο στάδιο εκτιμάται ξεχωριστά για την θεραπευτική καθοδήγηση, για την εκτίμηση της πρόγνωσης και για την αναφορά των αποτελεσμάτων του τελικού σταδίου στη συγκεκριμένη στιγμή της κλινικής πορείας του ασθενούς.

Η σημασία των κριτηρίων για τον καθορισμό της ανατομικής έκτασης της νόσου διαφέρουν για όγκους που βρίσκονται σε διαφορετικά ανατομικά μέρη και είναι διαφορετικών ιστολογικών τύπων. Γι αυτό τα κριτήρια για τα T, N, και M πρέπει να καθορίζονται για όγκους κάθε ανατομικού μέρους ώστε να αποκτούν εγκυρότητα. Σε συγκεκριμένους τύπους όγκων, όπως η νόσος Hodgkin's και τα άλλα λεμφώματα, απαιτούνται διαφορετικά συστήματα για τον καθορισμό της ανατομικής έκτασης της νόσου και της σταδιοποίησης, ώστε να επιτευχθεί η εγκυρότητα. Σε αυτές τις εξαιρετικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται άλλα σύμβολα ή περιγραφικά κριτήρια στη θέση των T, N και M.

Ο συνδυασμός των ταξινομήσεων T, N και M σε σύνολα, που εκπροσωπούν στάδια της νόσου, είναι λοιπόν μια μέθοδος καθορισμού της ανατομικής έκτασης του καρκίνου και σχετίζεται με τη φυσική πορεία ενός συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Τείνει να παρέχει ένα τρόπο με τον οποίο αυτή η πληροφορία να μπορεί άμεσα να μεταφερθεί σε άλλους έτσι ώστε να βοηθήσει να ληφθούν αποφάσεις σχετικά με τη θεραπευτική προσέγγιση και να εκτιμηθεί η πρόγνωση. Βασικώς, παρέχει ένα μηχανισμό για τη σύγκριση παρόμοιων ομάδων περιπτώσεων, για την εκτίμηση διαφορετικών δυναμικά θεραπευτικών διαδικασιών.

Η ταξινόμηση με το σύστημα TNM επιτυγχάνει λογικά ακριβή περιγραφή και αναφορά της ανατομικής έκτασης της νόσου. Ένας όγκος με τέσσερις κατηγορίες του T, τρεις κατηγορίες του N και δύο κατηγορίες του M έχει 24 κατηγορίες TNM. Για λόγους κατάταξης σε πίνακες και ανάλυσης, εκτός από τις πολύ μεγάλες σειρές, είναι απαραίτητο να συμπυκνωθούν αυτές οι κατηγορίες σε ένα εύχρηστο αριθμό από ομάδες σταδίων TNM. Η ομαδοποίηση, που υιοθετήθηκε διασφαλίζει όσο γίνεται, ότι κάθε ομάδα σταδίων είναι σχετικά ομοιογενής όσον αφορά την επιβίωση και ότι τα ποσοστά επιβίωσης για αυτές τις ομάδες για κάθε μέρος που έχει προσβληθεί από καρκίνο είναι σαφή. Το καρκίνωμα in situ (εντοπισμένο, μη διηθητικό) κατηγοριοποιείται στο στάδιο 0, ενώ μια περίπτωση με απομακρυσμένες μεταστάσεις κατηγοριοποιείται στο στάδιο IV. Τα στάδια I, II, και III φανερώνουν σχετικά μεγαλύτερη ανατομική επέκταση του καρκίνου σε ένα φάσμα εύρους μεταξύ των σταδίων 0 και IV.

Επιπροσθέτως με την ανατομική επέκταση, η ιστολογική ταξινόμηση και διαβάθμιση του όγκου μπορεί να αποτελούν σημαντικούς καθοριστικούς της πρόγνωσης παράγοντες ως αναφορά την ταξινόμηση σε στάδια. Ο ιστολογικός τύπος του όγκου και ο ιστολογικός βαθμός αποτελούν επίσης σημαντικές μεταβλητές που επηρεάζουν τις επιλογές για θεραπεία. Ο ιστοπαθολογικός τύπος αποτελεί ένα είδος ποιοτικής κατάταξης, όπου ο όγκος κατηγοριοποιείται αναλόγως του τύπου του φυσιολογικού ιστού ή του τύπου των κυττάρων από τον οποίο κυρίως εκπροσωπείται (π.χ. καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων)). Η ιστοπαθολογική διαβάθμιση είναι ένα είδος ποιοτικής κατάταξης του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου, που εκφράζεται ως το βαθμό στον οποίο ο όγκος εκπροσωπείται από φυσιολογικό ιστό της αντίστοιχης περιοχής, και αποδίδεται με αριθμητικούς βαθμούς διαφοροποίησης από το περισσότερο διαφοροποιημένο (Βαθμός 1), στο λιγότερο διαφοροποιημένο (Βαθμός 4) στάδιο.

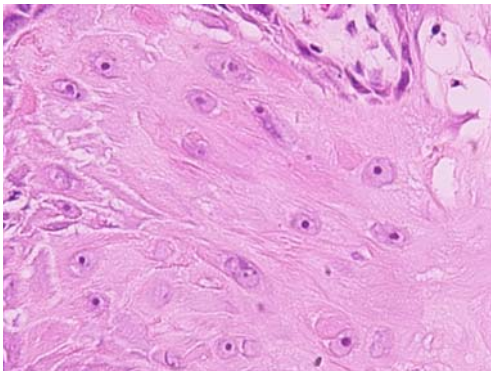
Gx	δεν μπορεί να ταξινομηθεί
G1	καλώς διαφοροποιημένο
G2	μετρίως διαφοροποιημένο
G3	φτωχά διαφοροποιημένο
G4	αδιαφοροποίητο

Αν υπάρχει ένδειξη για πάνω από ένα βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, ο μικρότερος βαθμός αναφέρεται ως ο ιστοπαθολογικός βαθμός. Τα αυξανόμενα όρια του όγκου δεν συνυπολογίζονται στην κατάταξη των βαθμών διαφοροποίησης, μια που είναι μία κατάσταση που δεν συνδέεται με αυτήν. Η χρήση του G4 εξυπηρετεί μόνο τις περιπτώσεις εκείνων των όγκων που δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη διαφοροποίηση ώστε να μπορούν να αναγνωρισθούν ως καρκίνοι που προέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή που εντοπίζονται. Τέτοιοι όγκοι δεν υπάρχουν για τον λάρυγγα και την στοματική κοιλότητα.

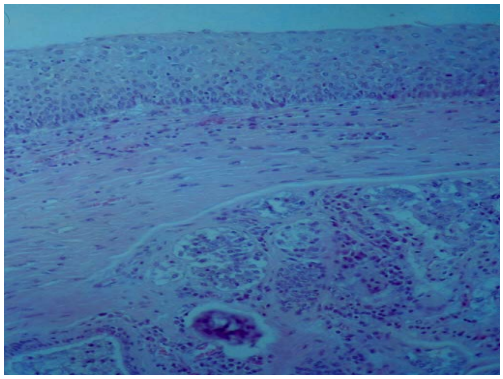
Η ταυτοποίηση της μικροσκοπικής εικόνας των αλλοιώσεων του καλυπτικού επιθηλίου του λάρυγγα αποτελεί σημαντικό καθοριστικό παράγοντα, τόσο για την διάγνωση όσο και για την πρόγνωση και επιλόγή της κατάλληλης θεραπείας. Η πιο σύγχρονη ταξινόμηση των υπερπλαστικών επιθηλιακών βλαβών του λάρυγγα είναι αυτή της Ljubliana. Η δεδομένη ταξινόμηση έχει σημαντικότατη πρακτική αξία στην στρατηγική της διάγνωσης αυτών των αλλοιώσεων. Η ταξινόμηση της Ljubliana περιλαμβάνει σύστημα τεσσάρων μικροσκοπικών αλλοιώσεων, συγκεκριμένης ιστολογικής διαβάθμισης, σύμφωνα με καθορισμένα κριτήρια, από την Ομάδα Εργασίας της Ευρωπαικής Εταιρείας Παθολογοανατόμων το 1999, στην Ljubliana:

1. Απλή υπερπλασία (καλοήθης βλάβη, εικόνα 1)
2. Ανώμαλη υπερπλασία (καλοήθης βλάβη, εικόνα 2)
3. Άτυπη υπερπλασία (εν δυνάμει κακοήθης βλάβη, εικόνα 3)
4. In situ καρκίνωμα (κακοήθης βλάβη, εικόνα 4)

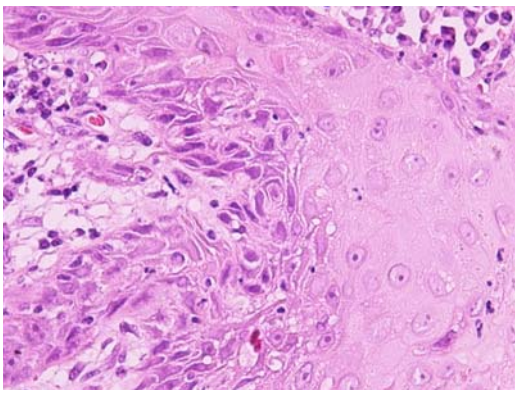
Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων μικροσκοπικών αλλοιώσεων είναι συνεπώς ακριβή και καθορισμένα. Η ταξινόμηση της Ljubliana αποσαφηνίζει την διάκριση μεταξύ των καλοηθών και των εν δυνάμει κακοηθών αλλοιώσεων, διαχωρίζει την άτυπη υπερπλασία από το in situ καρκίνωμα, ενώ απορρίπτει την παρουσία της κεράτινης στιβάδας ως προγνωστικό κριτήριο.



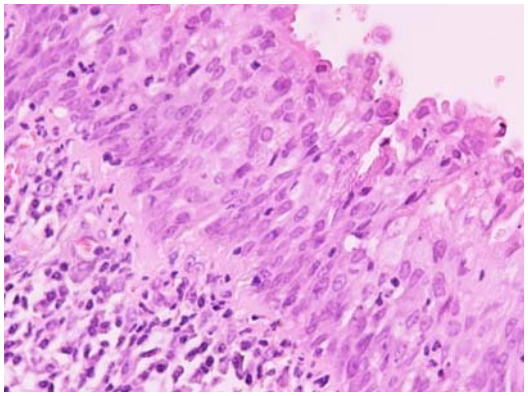
Εικόνα 1. Πάχυνση του επιθηλίου από αύξηση του αριθμού των ακανθοκυττάρων **(απλή υπερπλασία)**



Εικόνα 2. Αύξηση του αριθμού των βασικών-παραβασικών κυττάρων **(ανώμαλη υπερπλασία)**



Εικόνα 3. Πάχυνση του επιθηλίου από αύξηση του αριθμού των βασικών-παραβασικών κυττάρων με ατυπία **(άτυπη υπερπλασία)**



Εικόνα 4. Σαφή στοιχεία κακοήθειας σε όλο το πάχος του επιθηλίου **(in situ καρκίνωμα)**

Η κλινική συσχέτιση κάθε μίας εκ των τεσσάρων μικροσκοπικών αλλοιώσεων περιλαμβάνει μεγάλο εύρος παθήσεων του λάρυγγα. Έτσι, η απλή υπερπλασία συναντάται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 37.6 έως 68.6%, σε λαρυγγικά οζίδια, οίδημα Reinke, κοκκιώματα και θηλώματα. Η ανώμαλη υπερπλασία συναντάται σε ποσοστό 43.9% σε χρόνια λαρυγγίτιδα, με ποσοστό κακοήθους εξαλλαγής 0.3%. Η άτυπη υπερπλασία συναντάται σε χρόνια λαρυγγίτιδα σε ποσοστό 16.1%, σε θηλώματα σε ποσοστό 10.1%, σε λαρυγγικά οζίδια σε ποσοστό 0.9%, αλλά ακόμη και σε αυτό το οίδημα Reinke σε ποσοστό 0.3%. Η δε παρουσία της άτυπης υπερπλασίας, από μόνη της σχετίζεται με 11.6% κακοήθους εξαλλαγής.

2. Βασικές έννοιες της βιολογίας των όγκων

2.1. Δημιουργία Κλώνων

Η θεωρία που ισχύει σχετικά με την ανάπτυξη των όγκων είναι η θεωρία σχηματισμού κλώνων, που αρχικά προτάθηκε από τον Nowell το 1976. Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην φυσική επιλογή και προϋποθέτει, ότι τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν στρατηγικές για να επιβιώσουν στο εχθρικό περιβάλλον του ξενιστή (π.χ. τους ιστικούς φραγμούς, το ανοσοποιητικό σύστημα, τον επαγόμενο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) και χρησιμοποιούν τους πόρους του ξενιστή (όπως οξυγόνο και πρωτεΐνες) για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Στο μοντέλο αυτό, επαναλαμβανόμενες καρκινογενετικές προσβολές ή ανεξάρτητα γεγονότα, συμβαίνουν σε ένα κύτταρο σε γενετικό ή επιγενετικό επίπεδο. Όταν συμβούν αρκετά γεγονότα, το κύτταρο που προσβλήθηκε αποκτά ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης. Καθώς το κύτταρο αυτό πολλαπλασιάζεται, προκύπτουν μεταλλαγμένοι απόγονοι, ως αποτέλεσμα προσβολών και γενομικής αστάθειας. Οι περισσότεροι απόγονοι δεν επιβιώνουν λόγω της ανοσοποιητικής παρέμβασης, της απόπτωσης ή μεταβολικών διαδικασιών. Ωστόσο, τελικά, ένας κυρίαρχος πληθυσμός του κλώνου αναπτύσσεται, και όχι μόνο επιβιώνει αλλά και κυριαρχεί. Ως εξέλιξη του πληθυσμού αυτού του κλώνου είναι η ανάπτυξη νέων κλώνων με καινούρια χαρακτηριστικά, όπως διεισδυτική ικανότητα, που συνεπάγονται καρκίνο. Γι' αυτό, στην κακοήθεια που προκύπτει, μια μεγάλη πλειοψηφία των κυττάρων αναπτύσσονται από ένα και μόνο κλώνο, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να είναι γενοτυπικά όμοια ή κλωνικά.

2.2. Μοριακά μοντέλα ανάπτυξης

Το μοντέλο του Nowell είναι πλέον αποδεκτό και έχει οδηγήσει στο να γίνει κατανοητό ότι οι περισσότερες κακοήθειες προέρχονται από μια διαδικασία, που συγκροτείται από την συσσώρευση πολλών γενετικών γεγονότων. Επιδημιολογικές αναλύσεις υποστηρίζουν ότι έξι από τα δέκα ανεξάρτητα γεγονότα που συμβαίνουν, απαιτούνται για την ανάπτυξη των περισσοτέρων όγκων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Την τελευταία δεκαετία, ερευνητές προσπάθησαν να αποσυνδέσουν τα γεγονότα μεταξύ τους, για να κατανοήσουν καλύτερα τα μονοπάτια που ακολουθούν τα κύτταρα κατά την ανάπτυξη του καρκίνου. Το μοντέλο της μοριακής ανάπτυξης παρουσιάζει το σύνολο αυτών των γεγονότων. Το πρώτο, και ακόμη συζητήσιμο μοντέλο, είναι το μοριακό μοντέλο ανάπτυξης των Fearon και Vogelstein, οι οποίοι διατύπωσαν ένα μοντέλο πολλών βημάτων σχετικά με την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου συμφωνεί με το μοντέλο αυτό, καθώς ακολουθεί μια εξέλιξη που ξεκινά από τον φυσιολογικό βλεννογόνο και εξελίσσεται σε καλοήθη αδενωμάτωση, καρκίνωμα in situ και στη συνέχεια σε διεισδυτικό καρκίνωμα. Στο μοντέλο αυτό, συγκεκριμένα μοριακά γεγονότα, συμπεριλαμβανομένης και της ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των ογκογονιδίων, οδηγούν στην μετάπτωση από την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη στην νεοπλασία και τον σχηματισμό του όγκου. Η ανάπτυξη του καρκίνου οφείλεται πολύ περισσότερο στην επισυσσώρευση των γεγονότων αυτών, παρά στη σειρά με την οποία συμβαίνουν. Το μοντέλο αυτό ταιριάζει με τις πληροφορίες που έχουν προκύψει από επιδημιολογικές μελέτες, στις

οποίες φαίνεται να υπάρχει ένα αυξημένο ποσοστό καρκίνου του παχέος εντέρου σε ηλικιωμένους και σε οικογένειες που έχει διαπιστωθεί ότι απουσιάζει ένα συγκεκριμένο γονίδιο από το γενετικό τους υλικό.

Όπως στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου, έτσι και η καρκινογένεση της τραχηλοπροσωπικής χώρας ακολουθεί συγκεκριμένα βήματα, που σχετίζονται με φαινοτύπους και γονότυπους. Έχει δειχθεί, ότι ιστολογικά συμβαίνει μια επεξεργασία με αλλαγή του φυσιολογικού βλεννογόνου σε δυσπλαστικό, σε καρκίνωμα in situ και σε διηθητικό καρκίνωμα. Τα τελευταία 20 χρόνια, οι ερευνητές έχουν προσδιορίσει έναν αριθμό επίκτητων μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και σε γονίδια κατασταλτικά των ογκογονιδίων, και έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν αυτές τις γονοτυπικές αλλαγές, με τις φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται κλινικά. Αρχικά, ο Van De Riet και οι συνεργάτες του, είχαν συγκεντρώσει σε μια εργασία αυτά τα γενετικά γεγονότα, που προκύπτουν από κυτταρογενετικές αλλαγές, αλληλεπίδραση με ιικά προϊόντα ή καταστροφή από ακτινοβολία ή χημικούς παράγοντες, σε έναν αλλότυπο για τα καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου. Αυτό οδήγησε στην διαμόρφωση ενός μοριακού μοντέλου ανάπτυξης του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου. Και στην περίπτωση αυτή, η επισυσσώρευση των γεγονότων αυτών φαίνεται να συνδέεται με τις φαινοτυπικές εκδηλώσεις, περισσότερο από ότι η σειρά με την οποία συμβαίνουν τα γεγονότα αυτά. Το μοντέλο αυτό είναι σημαντικό όχι μόνο για την κατανόηση της ανάπτυξης του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου, αλλά περισσότερο για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών τεχνικών.

2.3. Θέσεις ανάπτυξης καρκίνου

Υπάρχουν σαφείς στοιχεία, σύμφωνα με τα οποία η σχέση των ογκογονιδίων με τον καπνό είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του μεγαλύτερου ποσοστού καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων στην κεφαλή και τον τράχηλο. Τα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν μοριακές αλλαγές κατά μήκος ολόκληρου του αναπνευστικού συστήματος. Ο Slaughter πρώτος περιέγραψε αυτές τις αλλαγές, ορίζοντας τις θέσεις ανάπτυξης καρκίνου ή αλλιώς τις θέσεις του «καταδικασμένου βλεννογόνου» το 1953. Ο Slaughter υπέθεσε, ότι εξαιτίας της συνεχούς καρκινογενετικής πίεσης, ολόκληρη η ανώτερη αναπνευστική οδός βρίσκεται σε υψηλό κίνδυνο για να αναπτύξει πολλαπλούς όγκους. Η πραγματική υπόθεση ήταν ότι τα πολλαπλά γενετικά γεγονότα που συμβαίνουν κατά μήκος του βλεννογόνου που προσβάλλεται, επιτρέπουν την ανάπτυξη πολλαπλών μοριακά τύπων καρκίνου σε διάφορες περιοχές.

Ωστόσο, πρόσφατα μια εναλλακτική υπόθεση επιζητά τον προσδιορισμό της θέσης ανάπτυξης του καρκίνου. Σ' αυτή, σε μια και μόνο περιοχή της ανώτερης αναπνευστικής οδού αναπτύσσονται πολλαπλές εστίες μέσα από τη διαδικασία της ενδοεπιθηλιακής μετανάστευσης. Αυτό ισχύει, προκειμένου για κάποιες μοριακά καθορισμένες περιοχές που προκύπτουν ανεξάρτητα, από μια ομάδα μοριακά όμοιων μεταλλαγμένων προγονικών κυττάρων, που μεταναστεύουν σε απομακρυσμένες περιοχές, γεγονός που εξηγεί την εμφάνιση πολλαπλών πρωτοπαθών εστιών, μετάχρονων πρωτοπαθών εστιών και πρόσφατων εστιών.

Το γεγονός αυτό στηρίζεται και από τις δύο υποθέσεις. Λόγου χάρη, ο Van Oijen και οι συνεργάτες του ανέλυσαν μετάχρονα πρωτοπαθή καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου σε εννέα ασθενείς, και βρήκαν, ότι όλοι οι ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν συγκεκριμένη μετάλλαξη στο TP53 (P53 όπως ονομαζόταν παλαιότερα) και απώλεια της ετεροζυγωτίας. Αυτό επιβεβαιώθηκε και

από άλλες μελέτες. Σήμερα, μια πρόσφατη έρευνα περιγράφει μοριακά γεγονότα γενετικής αιτιολογίας που συμβαίνουν στην περιοχή που περιβάλλει τον πρωτοπαθή όγκο και έδειξαν, ότι η περιοχή αυτή διαφέρει σε μέγεθος και αποτελείται από γενετικά διαφορετικούς υποκλώνους. Λαμβάνοντας όλα αυτά μαζί υπόψη, οι πληροφορίες αυτές συμφωνούν με την υπόθεση του Slaughter για την περιοχική καρκινογένεση. Από την άλλη ο Bedi και οι συνεργάτες του μελέτησαν ανενεργά τμήματα του Χ-χρωμοσώματος σε κεφαλή και τράχηλο ασθενών με πολλαπλές πρωτοπαθείς εστίες.

Σε τέσσερις ασθενείς που εξετάστηκαν, φάνηκε ότι το Χ χρωμόσωμα ήταν ανενεργό σε όλους τους πρωτοπαθείς όγκους. Στην ίδια μελέτη, ανάλυση της απώλειας της ετεροζυγωτίας αποκάλυψε ίδια ευρήματα σε μερικά ζευγάρια όγκων. Τα στοιχεία αυτά έδωσαν αξιοπιστία στην υπόθεση της μετανάστευσης των κλώνων.

Σήμερα, φαίνεται πιθανόν ότι και οι δύο θεωρίες μπορεί να βοηθήσουν στην εξήγηση της θεωρίας για τον προσδιορισμό των θέσεων ανάπτυξης καρκίνου. Είναι εύκολο να αντιληφθούμε, ότι οι δευτερεύοντες πρωτοπαθείς και οι μετάχρονοι όγκοι, οι οποίοι βρίσκονται ο ένας δίπλα στον άλλο, μπορεί σε αρκετές περιπτώσεις να είναι αποτέλεσμα της θεωρίας περί μετανάστευσης κλώνων, ωστόσο αρκετοί μπορεί να βρίσκονται σε περιοχές που απέχουν αρκετά μεταξύ τους, γεγονός που πιθανά να οφείλεται σε ανεξάρτητα μοριακά γεγονότα. Στοιχεία για αυτό, παρουσίασε πρόσφατα ο Jang και οι συνεργάτες του, που σε μια σειρά 26 ασθενών, οι περισσότεροι από τους πολλαπλούς πρωτοπαθείς όγκους αναπτύχθηκαν από κλωνικά ανεξάρτητα κύτταρα προσκείμενα στην εστία καρκινογένεσης και μόνον ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό ήταν κλωνικά σχετιζόμενο και μπορεί να οφείλεται σε υποβλεννογόνια διασπορά.

2.4. Η εμφάνιση του κακόηθους φαινότυπου

Ο ΚΠΕΤΧ όπως όλοι οι συμπαγείς όγκοι, θεωρείται ότι αναπτύσσεται ύστερα από μία σειρά γενετικών γεγονότων –μεταλλάξεων- που ως αποτέλεσμα έχουν την αυξημένη καταστροφή του DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με την αδρανοποίηση κατασταλτικών γονιδίων, που συνδέονται με τον έλεγχο της αύξησης του όγκου ή με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, που οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η ανάπτυξη λοιπόν καρκινικών όγκων σχετίζεται με μεταβολή των φυσιολογικών μηχανισμών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίηση, καθώς και με αποτυχία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Αυτές οι γονιδιακές μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτυπικών αλλαγών, όπως ελλείμματα κατά την τελική διαφοροποίηση, ελαττωμένο έλεγχο της φυσιολογικής ανάπτυξης, ελλείμματα στην αντίδραση ενδοκυτταρικών μηνυμάτων απόπτωσης, καθώς και αντίσταση στην κυτταροτοξικότητα. Τελικά, όλες αυτές οι μεταβολές προσφέρουν στα καρκινικά κύτταρα έξοχες συνθήκες πολλαπλασιασμού κι ανάπτυξης. Οι προαναφερθείσες γονιδιακές μεταβολές δυνατόν να είναι αυτόματες ή και επίκτητες, όμως πιο συχνά φαίνεται να έπονται της δράσης ιικών ή χημικών μεταλλαξιογόνων ή ακόμα άμεσης DNA καταστροφής λόγω ακτινοβολίας. Είναι βεβαίως δυνατή και η ύπαρξη διαφορετικών επιγενετικών μηχανισμών εμφάνισης ΚΠΕΤΧ χωρίς την παρουσία έκθεσης σε παραδοσιακά μεταλλαξιογόνα.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειώσουμε ότι τα κύτταρα ενός όγκου δεν περιέχουν τις ίδιες γενετικές ανωμαλίες. Αυτό που ισχύει είναι ότι σε κάθε όγκο

ισχύει η ετερογένεια. Υπάρχουν δηλαδή παρούσες διάφορες κυτταρικές υποομάδες με διαφορετικά χαρακτηριστικά ως αναφορά την ανοσοχημεία τους, την διεισδυτικότητά τους, την κινητική τους δυναμική, την ευαισθησία τους σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, αλλά και την ικανότητά τους για μετάσταση. Κι ενώ σε έναν δεδομένο όγκο υπάρχει αυτή η ετερογένεια, το δεδομένο ιστικό περιβάλλον δυνατόν να ευνοεί ή όχι, την ανάπτυξη πιο επιθετικών κλώνων κατά την διαδικασία της μετάστασης. Έτσι, παρατηρείται για παράδειγμα στην κλινική πράξη μία σαφώς πιο επιθετική συμπεριφορά των καρκίνων της υπεργλωττιδικής μοίρας του λάρυγγα σε σχέση με αυτούς της γλωττίδος. Και παρόλο που ο υποπληθυσμός των δυνητικά μεταστατικών κυττάρων σε έναν δεδομένο όγκο μπορεί να είναι μεγάλος, ο αριθμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που απαιτείται για την έναρξη της μετάστασης είναι μικρός (<0.01%).

Οι επιθηλιακοί όγκοι αποτελούν άριστα συστήματα μελέτης της κατά βήμα εξέλιξης σε διηθητικούς καρκίνους. Έτσι, είναι ήδη από καιρό γνωστή η καταγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών κυτταρογενετικών γεγονότων για την εμφάνιση κακόηθων όγκων και μεταστάσεων στην περιοχή του παχέως εντέρου. Παρόμοιοι μηχανισμοί φαίνεται να ισχύουν και στην περίπτωση του ΚΠΕΤΧ. Η μελέτη αυτών των μηχανισμών σχετίζεται με κυτταρογενετικές μεταβολές, με ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων, με μεταβολή των φυσιολογικών μηχανισμών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και με αποτυχία της διαδικασίας απόπτωσης (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Προτεινόμενο μοντέλο που περιγράφει την σταδιακή μετατροπή του φυσιολογικού πλακώδους επιθηλίου σε διηθητικό και μεταστατικό ΚΠΕΤΧ.

2.5. Ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακώδους επιθηλίου σε μη καπνιστές

Παρά το ότι το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων έχει συνδεθεί στενά με το κάπνισμα, πρόσφατα, έχει διαμορφωθεί μια ανησυχητική τάση αύξησης του ποσοστού εμφάνισης σε μη καπνιστές. Το 1975, ο Byers παρακολούθησε μια μικρή υποομάδα ασθενών με στοματικό καρκίνο της γλώσσας, οι οποίοι δεν είχαν κανένα από τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου. Από εκείνη τη στιγμή και μετά, αρκετές μελέτες επαλήθευαν τα αρχικά ευρήματα του Byers, υποστηρίζοντας ότι αυτή η υποομάδα παρουσίαζε το χαρακτηριστικό ότι επρόκειτο για νεαρές γυναίκες (συνήθως κάτω των 40 ετών) με καρκίνο στη στοματική κοιλότητα και την κλινική γενική διαπίστωση της κακής πρόγνωσης. Επιπλέον μελέτες, έχουν δείξει ότι η επίπτωση του καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων στην υποομάδα αυτή αυξάνεται. Ο λόγος προς το παρόν δεν έχει διευκρινιστεί.

Κατά την απουσία της καρκινογενετικής επίδρασης του καπνού, αρκετοί υπεύθυνοι παράγοντες θεωρήθηκε ότι μπορεί να παίζουν ρόλο στην παθογένεση αυτών των καρκίνων. Στους παράγοντες αυτούς, συμπεριλαμβάνεται η κατανάλωση αλκοόλ, η λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus-HPV), η παθητική έκθεση στον καπνό, η ανοσοκαταστολή και η γενετική προδιάθεση.

Η κατανάλωση του αλκοόλ από την αρχή είχε θεωρηθεί ως επιβαρυντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων, ωστόσο είναι δύσκολο να διαχωριστεί η επίδραση αυτού από αυτή του καπνού. Σε μια πρόσφατη μελέτη 826 ατόμων μη-καπνιστών, φάνηκε ότι η κατανάλωση του αλκοόλ ήταν ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου στη στοματική κοιλότητα και τον φάρυγγα. Ωστόσο, ανεξάρτητα από όλα τα επιδημιολογικά δεδομένα που σχετίζουν την ανάπτυξη καρκινώματος εκ πλακωδών με το αλκοόλ, δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να αποδεικνύουν, ότι το αλκοόλ παίζει ένα ξεκάθαρο ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων.

Ένας δεύτερος αιτιολογικός παράγοντας είναι η λοίμωξη από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV). Η οικογένεια των HPV περιλαμβάνει περισσότερους από 70 υπότυπους. Είναι ιοί διπλής έλικας DNA, που ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή μετά από λοίμωξη. Οι HPV πιστεύεται ότι προάγουν την καρκινογένεση με την παραγωγή ιικών ογκοπρωτεϊνών, όπως οι E6 και E7, που δρουν καταστέλλοντας τα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το TP53 και το RB. Οι υψηλού κινδύνου υπότυποι HPV 16 και 18 είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσουν άλλες επιθηλιακές κακοήθειες, όπως καρκίνους του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες. Ωστόσο οι πιο κοινά βρισκόμενοι υπότυποι στην κεφαλή και τον τράχηλο είναι οι HPV-6 και HPV-11, οι οποίοι θεωρούνται χαμηλού κινδύνου υπότυποι. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν είναι επαρκή, αλλά πρόσφατες αναφορές ενισχύουν την υπόθεση, ότι η λοίμωξη από HPV είναι αυξημένου κινδύνου προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων. Τα στοιχεία αυτά φαίνεται να ενισχύουν την άποψη ότι λοίμωξη από HPV είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για ένα μικρό ποσοστό καρκίνων του στοματοφάρυγγα. Σε μια μελέτη, στοματοφαρυγγικές εντοπίσεις συνδεόταν με HPV-θετικό ιστορικό και ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν ο HPV-16. Αυτοί οι όγκοι παρουσιάζονταν λιγότερο συχνά σε μέτριους έως βαρείς καπνιστές και είχαν σε μικρό ποσοστό μετάλλαξη του TP53 σε σχέση με τους ασθενείς με όγκο και HPV-αρνητικό ιστορικό. Επιπλέον, ασθενείς με όγκο και HPV-θετικό ιστορικό είχαν καλύτερη πρόγνωση-ειδική επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με όγκο και HPV-αρνητικό ιστορικό. Με βάση τα στοιχεία αυτά

μπορεί να θεωρηθεί ότι συγκεκριμένοι υπότυποι μπορούν να ασκούν επίδραση στην ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων σε μια υποομάδα ασθενών.

Τέλος, η αυξανόμενη παρουσία αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό, λόγω επίδρασης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων, έχει θεωρηθεί ένας ακόμη αιτιολογικός παράγοντας ανάπτυξης καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων σε μη-καπνιστές. Το κατά πόσο οι γενετικές αλλοιώσεις, που προκαλούν τα καρκινογόνα, μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων, δείχθηκε με τον προσδιορισμό των σπασμένων χρωμοσωμάτων που προκύπτουν, μετά από έκθεση καλλιέργειας λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος σε καρκινογόνα, και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με μάρτυρες. Οι σύγχρονες μελέτες για τον προσδιορισμό της μεταλλακτικής ευαισθησίας σε περιπτώσεις καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μπλεομυκίνης. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι μη-καπνιστές με καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων είναι πιο ευαίσθητοι σε χρωμοσωμιακές βλάβες απ' ότι άτομα που δεν είχαν αναπτύξει καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά, ενισχύθηκαν πρόσφατα με το πιο εμφανές καρκινογόνο του καπνού, το βενζο(α)πυρηνοδιολεποξείδιο ή BPDE. Είχε διατυπωθεί ότι η αυξημένη μεταλλακτική ευαισθησία είναι αποτέλεσμα των διαφόρων προϊόντων μεταβολισμού των καρκινογόνων, της αδυναμίας επιδιόρθωσης του DNA ή και στα δύο. Εν κατακλείδι, μελέτες, σε μικρής ηλικίας ασθενείς που είχαν αναπτύξει καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων, έχουν επιβεβαιώσει την ύπαρξη αλλοιώσεων σε γονίδια υπεύθυνα για το μεταβολισμό των καρκινογόνων (π.χ. στην S-τρανσφεράση της γλουταθειονίνης), σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (π.χ. στο XRCCI) και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. στο TP53).

3. Η γενετική βάση του καρκίνου

Έχει γίνει πλέον κατανοητό ότι ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος, στην οποία γονίδια που φυσιολογικά εμπλέκονται σε ουσιαστικές μοριακές λειτουργίες υπόκεινται μετάλλαξη ή εξαλλαγή, με αποτέλεσμα την εκδήλωση καρκίνου. Τα γονίδια αυτά έχουν κλασσικά ταξινομηθεί σε ογκογονίδια και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια είναι γονίδια που όταν ενεργοποιηθούν μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθειας. Από την άλλη, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια όταν σταματήσουν να εκφράζονται μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Καθώς, οι μοριακοί μηχανισμοί της καρκινογένεσης γίνονται όλο και πιο κατανοητοί, εκτιμάται ότι και άλλοι τύποι γονιδίων συμμετέχουν στην ανάπτυξη των όγκων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που μετέχουν στην αγγειογένεση, την απόπτωση, την διείσδυση και τη μετάσταση, μερικά από τα οποία δεν φαίνεται να ταιριάζουν ικανοποιητικά με το παράδειγμα των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Τα <u>ογκογονίδια</u> είναι γονίδια που όταν ενεργοποιούνται είναι υπεύθυνα για την ογκογένεση. Πριν την ενεργοποίηση τους, αυτά τα γονίδια βρίσκονται στην μορφή των πρωτο-ογκογονιδίων και φαίνεται πως είναι σημαντικά για την φυσιολογική ενδοκυττάρια λειτουργία οδών σηματοδότησης. Τυπικά, η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μπορεί να επηρεάσει την ροή μιας λειτουργίας είτε ποσοτικά (με την αύξηση της παραγωγής μιας μη-διαφοροποιημένης πρωτεΐνης), είτε ποιοτικά (με την παραγωγή μιας διαφοροποιημένης πρωτεΐνης). Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφοροποιήσεων, τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση την ανάπτυξη όγκου. Μια μεγάλη πλειοψηφία των ογκογονιδίων έχουν κάποια λειτουργία που σχετίζεται με την κυτταρική

ανάπτυξη και/ή την διαφοροποίηση, ωστόσο μπορεί να διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στην κυτταρική λειτουργία.

Το πρωτότυπο ογκογονίδιο είναι το RAS. Το γονίδιο RAS και τα πρωτεϊνικά προϊόντα του εμπλέκονται σε ένα σύνθετο καταρράκτη σημάτων, που ξεκινά από την κυτταρική επιφάνεια και φτάνει ως τον πυρήνα, που ενεργοποιεί την κυτταρική ανάπτυξη. Διάφοροι υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας της τυροσινικής κινάσης ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες RAS. Η ενεργή μορφή των RAS, που είναι όταν βρίσκονται συνδεδεμένες με ένα μόριο τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP), ασκούν επίδραση σε ποικίλες πρωτεΐνες-στόχους, όπως την mitogen-activated protein kinase και τον καταρράκτη της 3-φωσφατιδυλοινοσιτόλης, που είναι σημαντικές στην ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όταν δεν χρειάζονται άλλο πια τα σήματα για την ανάπτυξη του κυττάρου, οι πρωτεΐνες RAS επιστρέφουν στην ανενεργή μορφή, κατά την οποία προσδένονται με μόριο διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP), σταματώντας τις διαδικασίες ανάπτυξης του κυττάρου. Έτσι, λειτουργώντας ως διακόπτες, ασκούν σημαντική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Μεταλλαγμένες μορφές των RAS συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα την διαρκή ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του μηχανισμού ανάπτυξης του κυττάρου, επιτρέποντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, δύο βασικές προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του καρκίνου. Το γονίδιο RAS αποτελεί παράδειγμα ογκογενετικής ενεργοποίησης φυσιολογικών κυττάρων που μετατρέπονται σε νεοπλασματικά.

Πλέον είναι κατανοητό, ότι συγκεκριμένα γονίδια παίζουν ένα ζωτικό ρόλο παρεμποδίζοντας τα φυσιολογικά κύτταρα να μετατραπούν σε νεοπλασματικά. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στο ρόλο που παίζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Γενικά, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν ως τροχοπέδη, εμποδίζοντας τα κύτταρα από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διχοτόμηση. Σε φυσιολογική κατάσταση, τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν στον κυτταρικό κύκλο ρύθμισης της μεταγραφής ή απόπτωσης, λειτουργώντας έτσι ως σταθμός ελέγχου, προκειμένου να επιτρέψουν την είσοδο του κυττάρου σε κατάσταση πολλαπλασιασμού ή να προκαλέσουν την απόπτωση. Όταν τα γονίδια αυτά απενεργοποιούνται, λόγω μετάλλαξης ή άλλων αιτιών, τα κύτταρα χάνουν αυτόν τον αρνητικό έλεγχο και είναι ελεύθερα να αναπτυχθούν ή να πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα.

Το πρωτότυπο ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος RB. Περιγράφηκε από τον Knudson, ο οποίος μελετώντας παιδιά με ρετινοβλάστωμα, παρατήρησε την έλλειψη ενός τμήματος του χρωμοσώματος 13 σε όλους τους ασθενείς. Ο Knudson διατύπωσε την υπόθεση ότι δύο γενετικά γεγονότα συμβαίνουν σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο προκειμένου να αναπτυχθεί το ρετινοβλάστωμα. Σε περιπτώσεις ατόμων με συγγένεια, το ένα αλληλόμορφο γονίδιο είχε ήδη μεταλλαχθεί ή έλλειπε από το γενετικό υλικό, ενώ το άλλο φυσιολογικό υπόκειτο σε μετάλλαξη, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του ρετινοβλαστώματος. Ωστόσο, σε σποραδικές περιπτώσεις και τα δύο αλληλόμορφα είχαν υποστεί μετάλλαξη. Η πολύ μικρή πιθανότητα που υπάρχει να συμβεί ταυτόχρονα μετάλλαξη και στα δύο αλληλόμορφα φαίνεται από την πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης αυτού του όγκου, καθώς και από το γεγονός ότι εμφανίζεται σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας.

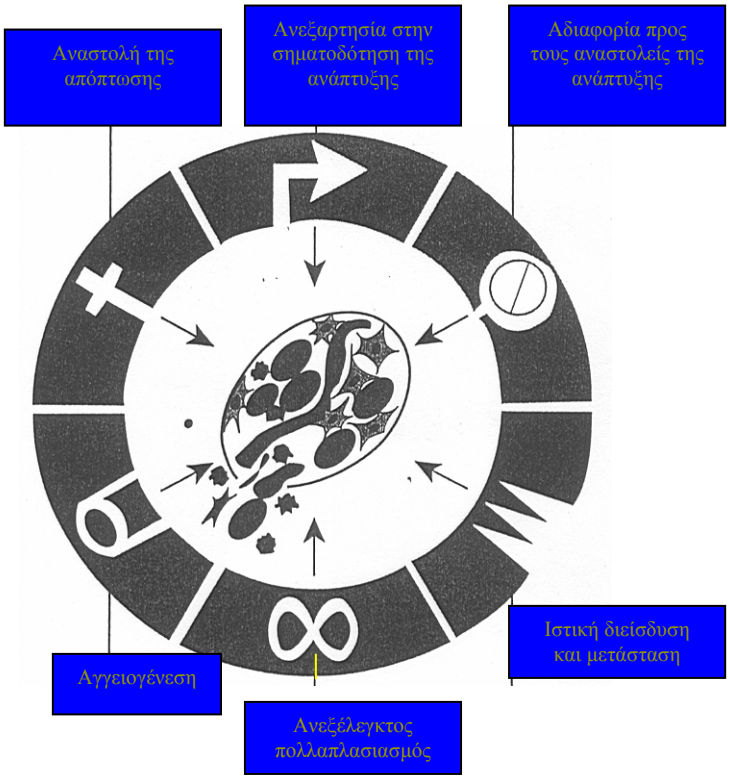
Το αρνητικό αυτό κυρίαρχο μοντέλο του Knudson αποτελεί χρήσιμο παράδειγμα για την αναγνώριση ενός συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη μιας

ποικιλίας τύπων καρκίνου. Μετά την αναγνώριση του RB, αρκετά άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αναγνωριστεί, αρκετά από τα οποία παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων στην κεφαλή και τον τράχηλο.

4. Βασικά σημεία καρκινογένεσης

4.1. Τα έξι βήματα

Τις τελευταίες δεκαετίες σημαντικές εξελίξεις σε διάφορα πεδία έρευνας του καρκίνου έχει επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών παθογένεσης και ανάπτυξης του καρκίνου. Η θεωρία του Nowell περί δημιουργίας κλώνων και το μοντέλο πολλαπλών βημάτων των Fearon και Vogelstein έχει συνδυάσει πληροφορίες, που προέρχονται από διαφορετικά πεδία έρευνας του καρκίνου, σε ένα λογικό εννοιολογικό πλαίσιο. Στο μοντέλο του Nowell, οι όγκοι παρουσιάζονται ως ετερογενείς συλλογές καρκινικών κυττάρων. Πραγματικά καρκινικά κύτταρα είναι αυτά, που αποκτούν τέτοια χαρακτηριστικά, που τους προσδίδουν ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης σε σχέση με τα γειτονικά τους. Η δουλειά των Fearon και Vogelstein οδήγησε στον προσδιορισμό των ασύνδετων γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διεργασία ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου, από τη μορφή των προκαρκινικών πολυπόδων έως το διηθητικό καρκίνωμα. Παρά το ότι η ακριβής σειρά και ο αριθμός των γεγονότων που συμβαίνουν στην ογκογένεση παραμένουν άγνωστα, μια πρόσφατη σειρά πειραμάτων που έγιναν από τον Hahn και τους συνεργάτες του οδήγησε στην διατύπωση έξι σημαντικών βημάτων που θεωρούνται σημαντικά για την ανάπτυξη του καρκίνου. Τα βήματα αυτά περιλαμβάνουν: 1) ανάπτυξη αυτόνομου μηχανισμού πολλαπλασιασμού, 2) αναστολή των ανασταλτικών για την ανάπτυξη σημάτων, 3) αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), 4) πέρασμα στην αιωνιότητα (αθανατοποίηση), 5) ανάπτυξη δικτύου αιματικής τροφοδότησης, και 6) ανάπτυξη ιστικής διεισδυτικότητας και μετάστασης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Έξι βασικά βήματα, σημαντικά για την ανάπτυξη καρκίνου

4.2. Ανάπτυξη αυτόνομου μηχανισμού πολλαπλασιασμού

Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν σήματα ανάπτυξης για να πολλαπλασιαστούν. Το έναυσμα για τα σήματα ανάπτυξης μπορεί να δοθούν με διάφορους τρόπους, όπως με μοριακούς καταρράκτες, μέσω στοιχείων της εξωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης ή με αλληλεπίδραση κύτταρο με κύτταρο. Γενικά, τα σήματα για την ανάπτυξη μεταφέρονται από την εξωτερική μεμβράνη στο πυρήνα του κυττάρου με διάφορα ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσουν αυτονομία από τα εξωγενή μονοπάτια σηματοδότησης της ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα αρκετών ερευνητών έχουν δείξει ότι αυτή η ανώμαλη έκφραση των παραγόντων ανάπτυξης και των υποδοχέων των παραγόντων ανάπτυξης μπορεί να παίζει ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων. Επιπλέον, και άλλες ενδοκυττάριες σηματοδοτικές οδοί μπορεί να διαφέρουν στα νεοπλασματικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην απόκτηση αυτής της αυτονομίας στην ανάπτυξη.

- ***Επιθηλιακός Παράγοντας Ανάπτυξης (EGF)***

Η απομόνωση και η αναγνώριση του Επιθηλιακού Παράγοντα Ανάπτυξης (EGF) και του υποδοχέα του (EGF-R), οδήγησε την περαιτέρω κατανόηση της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού στα φυσιολογικά κύτταρα, και στο πως η ρύθμιση αυτή χάνεται, κατά την ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων. Φαίνεται πως ο EGF αποτελεί τον αρχικό ρυθμιστή ανάπτυξης ενός μεγάλου ποσοστού καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων, ωστόσο η κλινική σημασία αυτής της ρύθμισης είναι αβέβαιη προς το παρόν.

Για τη περαιτέρω μελέτη του ρόλου της έκφρασης του EGF-R στην παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου, αποτιμήθηκαν συστηματικά τα επίπεδα του mRNA που κωδικοποιούν αυτές τις δύο πρωτεΐνες σε ασθενής με καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας λαμβάνοντας τμήματα τόσο από τον όγκο όσο και από φυσιολογικό βλεννογόνο, και σε άτομα με ιστορικό κατανάλωσης αλκοόλ και καπνού. Τα υψηλά επίπεδα mRNA και του παράγοντα και του υποδοχέα στα δείγματα τόσο του όγκου όσο και του φυσιολογικού βλεννογόνου στους ασθενείς με καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας, οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής του παράγοντα ανάπτυξης και την έκφραση του υποδοχέα.

- ***Μετατροπείς και Ενεργοποιητές των πρωτεϊνών μεταγραφής (STATs)***

Οι μετατροπείς και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs) είναι μια οικογένεια κυτοπλασματικών πρωτεϊνών υπεύθυνες για την μεταγωγή σημάτων από την κυτταρική επιφάνεια στον πυρήνα, όπου και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι STATs ενοχοποιούνται ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων όγκων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου. Συγκεκριμένα η STAT3 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κυττάρου μέσω των EGF-TGF. Η ενεργοποίηση του EGF-TGF μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της STAT3, η οποία φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την μείωση της απόπτωσης.

- ***Πυρηνικός παράγοντας κάπα Β (NF-κB)***

Ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB είναι ένας γνωστός μεταγραφικός παράγοντας που δρα στην ρύθμιση γονιδίων που οδηγούν ανοσολογικές και φλεγμονώδεις απαντήσεις. Πρόσφατα, ο NF-κB έχει συνδεθεί με την εκδήλωση πολλαπλών χαρακτηριστικών ανάπτυξης και εξέλιξης καρκίνου. Μέσω της αύξησης της μεταγραφής γονιδίων σημαντικών για τη διαμεσολάβηση στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την αποφυγή της απόπτωσης, την διείσδυση και την αγγειογένεση, φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη όγκου μέσω διαφόρων οδών.

- ***Fibroblast growth factor (FGF)***

Ερευνητές που μελετούν κυτταρικές σειρές όπως και πρωτοπαθείς όγκους έχουν δείξει ότι η έκφραση των παραγόντων FGF-1 και FGF-2 είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τα επίπεδα αυτών σε φυσιολογικό βλεννογόνο. Επειδή κάποιες

βιοχημικές μελέτες υποστηρίζουν ότι αυτές οι κυτταρικές σειρές εκφράζουν τον υποδοχέα του παράγοντα στην κυτταρική τους επιφάνεια, υποθέτουν πως ένα αυτοκρινές μονοπάτι ανάπτυξης στο οποίο εμπλέκεται ο FGF-1 μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων.

- ***Παράγοντας ανάπτυξης ηπατοκυττάρων/ παράγοντας διάχυσης (HGF/SF)***

Ο υποδοχέας του HGF/SF κωδικοποιείται από το e-met πρωτο-ογκογονίδιο. Ο υποδοχέας που κωδικοποιεί το e-met ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων παραγόντων ανάπτυξης και έχει δράση τυροσινικής κινάσης. Πρόσφατα στοιχεία έχουν ενοχοποιήσει και τον HGF/SF και το e-met για την διείσδυση και τη μετάσταση καρκινικών κυτταρικών σειρών στην στοματική κοιλότητα. Γι' αυτό ο HGF/SF και το e-met φαίνεται να παίζουν ένα διαφορετικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου.

4.3. Αναστολή των ανασταλτικών για την ανάπτυξη σημάτων

Στα φυσιολογικά κύτταρα η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση είναι ισχυρά ελεγχόμενες. Παρότι είναι απαραίτητες να συμβούν δομικές ανακατατάξεις στους φυσιολογικούς παράγοντες ανάπτυξης για την δημιουργία όγκου, ωστόσο είναι ανεπαρκείς από μόνες του να προκαλέσουν ογκογενετική μετάλλαξη των φυσιολογικών κυττάρων. Ακόμη, ένα σημαντικό και σχετικό βήμα στην ογκογένεση είναι η απώλεια των φυσιολογικών σημάτων αναστολής της ανάπτυξης. Εκτεταμένες μελέτες περιγράφουν λεπτομερώς μια σύνθετη αλληλεπίδραση παραγόντων, που έχουν ως αποτέλεσμα την ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης σύμφωνα με τον κυτταρικό κύκλο (2-6). Ο κυτταρικός κύκλος είναι η διαδικασία μέσω της οποίας κάθε κύτταρο αντιγράφει το γενετικό του υλικό και διαιρείται. Αποτελείται από διάφορες φάσεις, G1 (φάση ανάπτυξης 1), S (σύνθεση του DNA), G2 (φάση ανάπτυξης 2) και M (μίτωση), κάθε μια από τις οποίες είναι ισχυρά ελεγχόμενες. Στο κέντρο του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται μια ομάδα μορίων, που ονομάζονται κυκλίνες και οι ρυθμιστές τους, κυκλίνη-εξαρτώμενη κινάση (CDKs) και ο αναστολέας της κυκλίνη-εξαρτώμενη κινάση (CDKIs). Οποιοδήποτε μόριο επιδρά ή ρυθμίζει κυκλίνες, CDKs ή CDKIs, θα έχει μια προφανή επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και αποτελεί έναν θετικό καρκινογενετικό μεσολαβητή. Μερικά από αυτά τα μόρια είναι για παράδειγμα η πρωτεΐνη pRB, που κωδικοποιείται από το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος RB, η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο TP53 και το οποίο εκφράζεται από όλους τους ιστούς, η ομάδα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα γονίδια $CDKN2^{INK4}$ (αναστολείς του CDK4), η οικογένεια των κυκλίνων, που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και η οικογένεια των p21, που είναι αναστολείς των CDK.

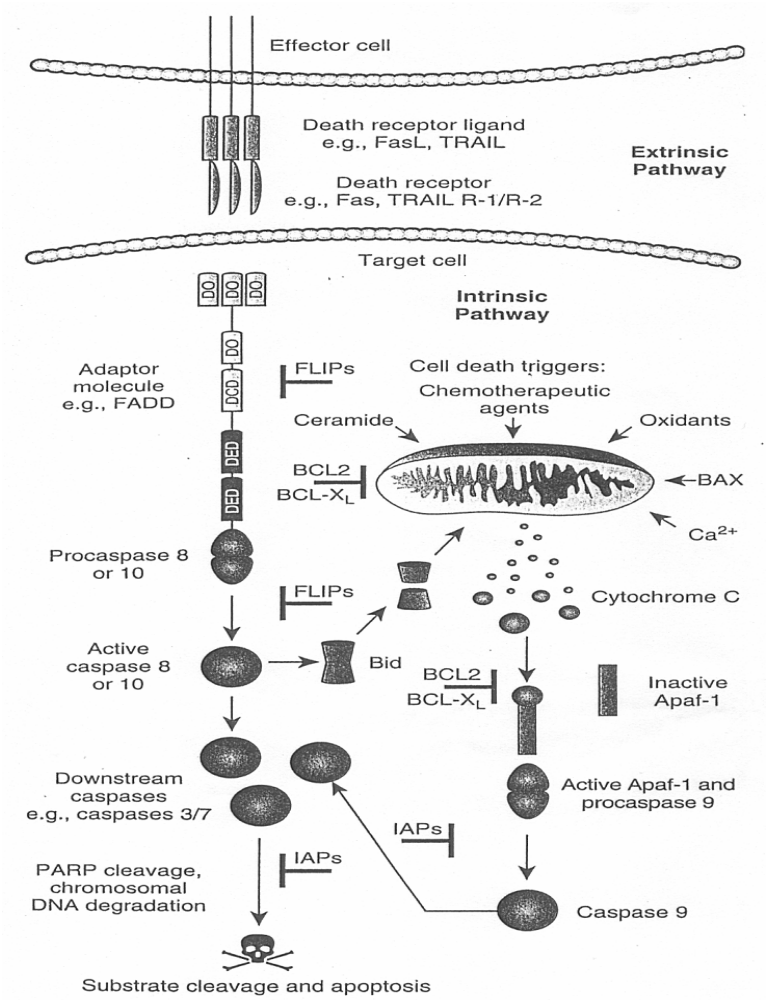
4.4. Αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Απόπτωση)

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ή αλλιώς η απόπτωση, είναι ένα κρίσιμο βήμα στην κυτταρική διαφοροποίηση και αναδιοργάνωση και την ιστική ομοιόσταση. Εκτεταμένες μελέτες σχετικά με το θέμα αυτό τις τελευταίες δεκαετίες

οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση της έναρξης και της ρύθμισης του μηχανισμού της απόπτωσης. Είναι πλέον ξεκάθαρο, ότι μια από τις προϋποθέσεις που χρειάζονται τα καρκινικά κύτταρα για να αναπτυχθούν, είναι η αναστολή της απόπτωσης, μεταβάλλοντας την ισορροπία μεταξύ της κυτταρικής διαίρεσης και του κυτταρικού θανάτου.

Η βιοχημική εξέλιξη της απόπτωσης είναι ένα από τα πιο μελετημένα πεδία της κυτταρικής βιολογίας. Έχει βρεθεί, ότι αποτελεί μια καλά οργανωμένη σειρά βημάτων που πυροδοτούνται από σήματα της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου και οδηγούν στη διάλυση της κυτταρικής μεμβράνης, την καταστροφή του πυρηνικού και κυτταρικού σκελετού, την αποδιάταξη των χρωμοσωμάτων και την διάλυση του πυρήνα (σχήμα 4). Σήμερα, η απόπτωση θεωρείται διαδικασία τριών βημάτων. Το πρώτο βήμα αυτής της διαδικασίας είναι η έναρξη, ή αλλιώς το βήμα σηματοδότησης. Γενικά, ένα σήμα, ενδοκυττάριο ή εξωκυττάριο, πυροδοτεί τον μηχανισμό απόπτωσης. Το δεύτερο βήμα είναι η θανάτωση, ή η ιδία οργάνωση του κυτταρικού θανάτου. Σε αυτή τη φάση, πολλαπλά ενεργά μόρια συμμετέχουν στο γεγονός για να προκαλέσουν την απελευθέρωση από τις κάψες των πρωτεϊνών-καταστροφέων του κυττάρου. Το τρίτο βήμα περιλαμβάνει τις μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στο κύτταρο που πεθαίνει και τις αποκρίσεις των γύρω κυττάρων ως προς αυτό. Όπως θα περίμενε κανείς, για μια τόσο πολύπλοκη διαδικασία χρειάζονται πολλαπλά ρυθμιστικά και ενεργά μόρια για την επιτυχημένη έναρξη και διεκπεραίωση αυτής της διαδικασίας. Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της απόπτωσης, ή μεταβολή των επιπέδων ή της έκφρασής τους, μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη κυτταρική επιβίωση, ένα κρίσιμο βήμα στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης.

Η απόπτωση μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από ενδοκυττάρια είτε από εξωκυττάρια μονοπάτια (σχήμα 4). Εξωκυττάριοι εκκινητές του μηχανισμού της απόπτωσης αποτελούν μόρια που προσδένονται στους υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου, όπως στο CD95, τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-R), TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-2 και Dr-6. Αυτοί ονομάζονται «νεκρωτικοί υποδοχείς». Ο καλύτερα μελετημένος από αυτούς είναι το σύμπλοκο Fas/Fas ligand, το οποίο αποτελεί το μοντέλο και για τους υπόλοιπους υποδοχείς νέκρωσης. Το έναυσμα στο μονοπάτι αυτό είναι η πρόσδεση του Fas-υποδοχέα στο Fas, γεγονός που προκαλεί συσσώρευση σύμπλοκων Fas και την επακόλουθη ενδοκυττάρια πρόσδεση στην Fas-συνδεδεμένη νεκρωτική περιοχή (FADD). Αυτό με τη σειρά του προσελκύει τον εκκινητή caspase, caspase 8, ο οποίος με τη σειρά του εγείρει την απόπτωση με την αποκοπή της επίδρασης του χειμάρρου ενεργών μορίων caspase 3, 6 και 7. Παρότι το μονοπάτι αυτό έχει προσδιοριστεί αρκετά και μελετηθεί σε διάφορες μορφές καρκίνου, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο του στον καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου.



Σχήμα 4. Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μονοπάτια εμπλέκονται στην σειρά των βημάτων που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα μόρια που συμμετέχουν και ρυθμίζουν την απόπτωση.

Ενδοκυττάρια μόρια μπορούν επίσης να δρουν ως εκκινητές της απόπτωσης. Με διαφορά το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα είναι το γονίδιο TP53. Αυτό το γονίδιο, και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί, έχουν πολλαπλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της απόπτωσης ως απάντηση σε καταστροφή του DNA. Αυτή η επαγωγή της απόπτωσης φαίνεται να συμβαίνει μέσω ενός χείμαρρου ενεργών μορίων γνωστών ως BAX-, ισχυρά προαποπτωτικά μόρια. Μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αυτής της λειτουργίας, με αποτέλεσμα την επιβίωση κυττάρων με βλάβη στο DNA. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε γενομική αστάθεια, με ανάπτυξη πολλαπλών γενετικών ανωμαλιών, που μπορούν να ευοδώσουν την ανάπτυξη όγκου. Παρατήρηση του φαινομένου σε καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας έκανε ο Ravi και οι συνεργάτες του, που έδειξαν ότι η παρουσία μεταλλαγμένης TP53 πρωτεΐνης ήταν αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό απόπτωσης σε καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Σημαντική συσχέτιση, επίσης υπήρχε μεταξύ του λόγου BAX/BCL2 και των επιπέδων της κυκλίνης D1 και της απόπτωσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η απόπτωση μειώνεται καθώς αυξάνουν οι ιστολογικές ανωμαλίες, προφανώς λόγω μεταβολών στα επίπεδα των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση.

**Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας του μηχανισμού της απόπτωσης, το όλο φαινόμενο παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.*

4.5. Είσοδος στην αιωνιότητα (αθανατοποίηση)

Τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να αντιγράφονται μέχρι έναν αριθμό πριν γεράσουν, μπουν σε ένα κρίσιμο στάδιο και τελικά πεθάνουν. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να ξεπερνούν αυτό το στάδιο και να αντιγράφονται συνεχώς. Αυτό καλείται αθανατοποίηση. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα κύτταρα αυτά περνούν στην αιωνιότητα βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη. Την τελευταία δεκαετία, έγινε προφανές ότι το DNA στο τέλος του χρωμοσώματος, το οποίο ονομάζεται τελομερικό DNA (τελομερές), φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική γήρανση. Αυτά τα τελομερή φαίνεται να δρουν ως προστατευτικά καλύμματα στο τέλος των χρωμοσωμάτων, εμποδίζοντας την καταστροφή των χρωμοσωμάτων. Είναι πλέον γνωστό ότι σε κάθε κύκλο αντιγραφής ένας μικρός αριθμός τελομερών χάνεται. Έτσι κατά την διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού το μήκος των τελομερών μικραίνει. Όταν πια έχει χαθεί αρκετό τελομερικό DNA, οι άκρες του χρωμοσώματος παύουν να προστατεύονται, οδηγώντας στην σύντηξη του χρωμοσώματος και σε καρυοτυπικές ανωμαλίες, που τελικά επιταχύνουν τον κυτταρικό θάνατο. Σχεδόν όλα τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει τον ένα ή τον άλλο μηχανισμό για να συντηρούν το μήκος των τελομερών. Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός είναι αυτός της έκφρασης του ενζύμου τελομεράση, το οποίο αυξάνει το μήκος των τελομερών. Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η τελομεράση είναι σημαντική στην παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων της τραχηλοπροσωπικής χώρας, έχει προγνωστική αξία και ότι φαίνεται να ενεργοποιείται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης καρκίνου κεφαλής και τραχήλου.

4.6. Ανάπτυξη δικτύου αιματικής τροφοδότησης (αγγειογένεση)

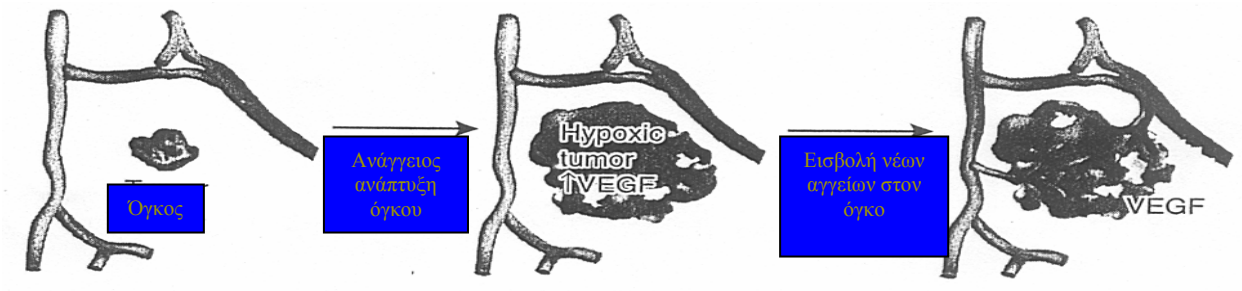
Σε περιπτώσεις ΚΠΕΤΧ, η τοπική διήθηση και επέκταση σε γειτονικές περιοχές συνδετικού ιστού εξαρτάται από την παραγωγή διαφόρων μορίων της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά κι από την ύπαρξη συγκεκριμένων ενζύμων. Παράλληλα με την

παραγωγή αυτών των ενεργών μορίων που δρουν τοπικά, ο ΚΠΕΤΧ είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που δρουν σε απομακρυσμένες ομάδες κυττάρων. Οι κυττοκίνες, για παράδειγμα, είναι μικρού μοριακού βάρους πρωτείνες που σχετίζονται με την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και την έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με την διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση και την μετανάστευση. Παρόλο που η δράση των κυττοκινών έχει μελετηθεί σε σχέση με το ανοσοποιητικό σύστημα, ο ρόλος τους στο νευρικό και αγγειακό σύστημα έχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον. Σε αντίθεση με τις διάφορες ορμόνες, οι κυτοκίνες σχετίζονται με την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων που βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους. Μία ομάδα κυτοκινών που ο ρόλος τους έχει συνδεθεί με την επέκταση διηθητικών και μεταστατικών φαινοτύπων είναι οι αγγειογενείς παράγοντες. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί, κλονοποιηθεί πολλές «αγγειογενείς κυτοκίνες», ενώ σε πολλές περιπτώσεις έχει αναγνωρισθεί η δομή και ο μηχανισμός δράσης τους. Κοινά χαρακτηριστικά αυτών των πολυπεπτιδίων είναι το σχετικά μικρό μοριακό τους βάρος, καθώς και η ικανότητά τους να δεσμεύονται με την ηπαρίνη.

Η ιδιότητα δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση ή νεοαγγείωση) αποτελεί μία ανεξάρτητη διαδικασία κατά την οργανογένεση, την αναπαραγωγή, αλλά και κατά την διάρκεια επούλωσης διαφόρων τραυμάτων. Η παθολογική όμως αγγειογένεση δεν είναι μία αυτορυθμιζόμενη διαδικασία, αλλά συνιστά αποτέλεσμα διαφοροποιήσεων ανάπτυξης σχετιζόμενες με συγκεκριμένους μηχανισμούς διαφόρων παθολογικών οντοτήτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα παθολογικής αγγειογένεσης παρουσιάζονται στους κακοήθεις όγκους, στη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, στην ψωρίαση, αλλά και στις συνδεσμικές φλεγμονώδεις αλλαγές των αρθρίτιδων.

Η σχέση της αγγειογένεσης με τον ΚΠΕΤΧ βασίζεται στην υπόθεση ότι η ανάπτυξη του ιδίου του όγκου εξαρτάται απόλυτα από αυτήν. In vivo δεδομένα καταδεικνύουν ότι η αρχική ανάπτυξη του όγκου ξεκινά με μια «προαγγειακή φάση». Η προαγγειακή φάση χαρακτηρίζεται από μια περίοδο γραμμικής ανάπτυξης του όγκου, την απουσία ενδο-ογκικών αγγείων, ενώ το μέγεθος του όγκου είναι <1mm3. Όταν ο όγκος αρχίζει και αποκτά αγγείωση, ο ρυθμός και ο τρόπος ανάπτυξής του μεταβάλεται, αφού ο όγκος δέχεται τις ουσίες που χρειάζεται και αποβάλλει αυτές που δεν χρειάζεται πολύ πιο εύκολα. Σε αυτήν την «αγγειακή φάση» υπάρχει γεωμετρική ανάπτυξη του όγκου, το μέγεθός του είναι >1mm3, ενώ ιστολογικώς μέσα στον όγκο ανευρίσκονται τριχοειδικά αγγειακά δίκτυα.

Όσο ο όγκος μεγαλώνει, διηθεί και δίνει μεταστάσεις, η ανάπτυξη νέων αγγείων τροφοδότησης είναι κρίσιμη. Παρότι αρκετά καρκινικά κύτταρα έχουν μεταβολικές δυσλειτουργίες, εξακολουθούν να έχουν ανάγκη από ένα καλό δίκτυο τροφοδότησης και αποβολής των αερίων για την επιβίωση τους. Χωρίς ικανοποιητική αιμάτωση, όγκοι μεγαλύτεροι από $1mm^3$ νεκρώνονται. Οι περισσότεροι όγκοι έχουν την δυνατότητα να ξεπερνούν αυτό το πρόβλημα ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τον σχηματισμό νέων αγγείων (σχήμα 5). Η διαδικασία της νεοαγγείωσης ή αγγειογένεσης, είναι από μόνη της μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων που φαίνεται να ρυθμίζεται τόσο από διεγερτικούς όσο και από κατασταλτικούς παράγοντες. Βήματα σημαντικά για την επιτυχή νεοαγγείωση αποτελούν η διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας, ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, η μετανάστευση και η υψηλής οργάνωσης διαμόρφωσή τους. Τα μόρια που ρυθμίζουν την αγγειογένεση μπορούν να επιδρούν σε ένα ή περισσότερα βήματα.



Σχήμα 5. Αγγειογένεση. Καθώς οι όγκοι αναπτύσσονται χρειάζονται επιπλέον αιματική τροφοδότηση για να συνεχίσουν να αναπτύσσονται. Απαιτείται μια πολύπλοκη σειρά μοριακών γεγονότων, συμπεριλαμβανομένης και της ρύθμισης από προ-αγγειογενετικά και αντι-αγγειογενετικά μόρια.

Σε πρόσφατες μελέτες έγινε προσπάθεια να υπολογιστεί ποσοτικά ο αριθμός των νέων αγγείων που αναπτύσσονται σε όγκους. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την σήμανση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων με σημαντές, όπως ο παράγοντας VIII, το CD31 και ο ICAM-1, και την επακόλουθη μέτρηση της «μικροαγγειακής πυκνότητας». Η μέτρηση αυτή βρέθηκε να είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για ασθενείς με καρκίνο μαστού, ωοθηκών, προστάτη και στομάχου.

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητή η διαδικασία αγγειογένεσης στους όγκους, μελέτες που αφορούν στην απομόνωση και την αναγνώριση ειδικών αγγειογενετικών παραγόντων και των ενεργοποιητών τους. Η πολύπλοκη αλληλεπίδραση των θετικών και αρνητικών ρυθμιστών της αγγειογενετικής διαδικασίας καθορίζει τη διαμόρφωση των νεοσχηματιζόμενων αγγείων μέσα και γύρω από τον όγκο. Η μελέτη των μορίων αυτών, αν και περιορισμένη, όσον αφορά τον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου, δείχνει ότι η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στη βιολογία του, ότι μπορεί να είναι κλινικά σημαντική για τη λήψη προγνωστικών πληροφοριών και ότι μπορεί να αποτελέσει στόχο βιολογικής θεραπείας στο μέλλον. Θετικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης είναι ο παράγοντας ανάπτυξης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF), ο βασικός παράγοντας ανάπτυξης των ινοβλαστών (Basic Fibroblast Growth Factor/bFGF), ο αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (Platelet-Derived Endothelial Growth Factor/PD-ECGF) και η Ιντερλευκίνη 8 (IL-8). Αρνητικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης είναι οι ιντερφερόνες, οι θρομβοσπονδίνες και άλλοι παράγοντες όπως για παράδειγμα το νιτρικό οξύ και το γονίδιο PTEN.

4.7. Ιστική διείσδυση και μετάσταση

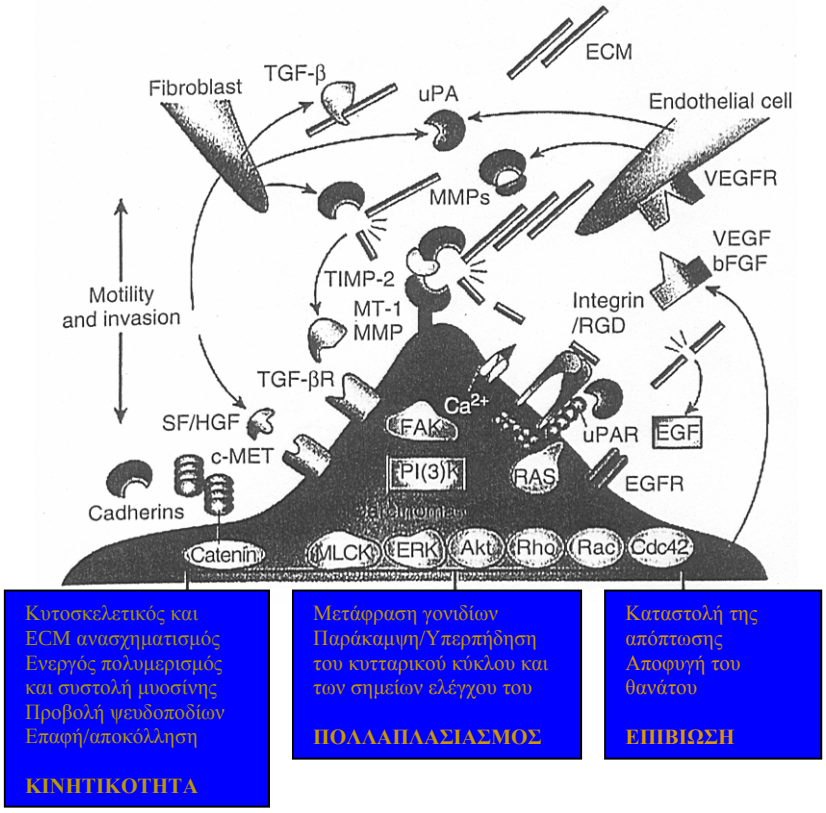
4.7.1. Η βιολογία της καρκινικής διήθησης

Βασικό χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι η ιδιότητά του για μετάσταση τόσο στους επιχώριους λεμφαδένες όσο και σε απομακρυσμένα όργανα. Οι φάσεις που ακολουθούν την ανάπτυξη του όγκου περιλαμβάνουν την ιστική διείσδυση και την μετάσταση. Τα γεγονότα που σχετίζονται με την ικανότητα του επιθηλιακού καρκίνου όγκου να διηθεί και να επεκτείνεται στους πέριξ ιστούς περιλαμβάνουν την λύση της συνέχειας των περιβαλλόντων κυττάρων με την βασική μεμβράνη, καθώς και την παραγωγή ενζύμων ή άλλων ουσιών. Έτσι, προωθείται η διείσδυση των καρκινικών

κυττάρων στον υποκείμενο συνδετικό ιστό, η προσκόλλησή τους σε εξωκυττάρια μεμβρανικά μόρια, αλλά και η έξοδος ή είσοδος τους στην κυκλοφορία μέσω της προσκόλλησης με συγκεκριμένους ενδοθηλιακούς αντλιών. Η σειρά αυτών των γεγονότων συνιστά έναν φαύλο κύκλο που οδηγεί σε απομακρυσμένη μετάσταση σε όργανα στόχους όπως ο πνεύμονας, το ήπαρ, τα οστά ή ο εγκέφαλος.

Ο καρκίνος εκ πλακώδους επιθηλίου της τραχηλοπροσωπικής χώρας (ΚΠΕΤΧ) εξελίσσεται από καρκίνο in situ, σε μικροδιηθητικό καρκίνο και μετά σε διηθητικό καρκίνο των παρακειμένων ιστών, με τελική κατάληξη την εκτεταμένη διήθηση των λεμφαγγείων και την μετάσταση. Το κύριο βήμα για την μετάβαση από καρκίνο in situ σε διηθητικό καρκίνωμα είναι η διάσπαση της βασικής μεμβράνης.

Έχουν προσδιοριστεί τα συγκεκριμένα γεγονότα που πρέπει να λάβουν χώρα για να επιτευχθεί διείσδυση και μετάσταση, ενώ έχει απομονωθεί και αναγνωριστεί ένας αριθμός πρωτεϊνών σε ΚΠΕΤΧ, που εμπλέκονται σ' αυτά (σχήμα 6). Η διείσδυση σε γειτονικό φυσιολογικό ιστό αποτελεί ένα από τα κεντρικά παθολογικά κριτήρια διάγνωσης της κακοήθειας. Τα τρία βασικά βήματα για την επιθηλιακή διείσδυση καρκινικών κυττάρων είναι αρχικά η επαφή των καρκινικών κυττάρων με την βασική μεμβράνη, κατόπιν η πρωτεόλυση της εξωκυτταρικής μήτρας και, τέλος, η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.



Σχήμα 6. Ιστική διείσδυση και Μετάσταση. Μια ποικιλία μοριακών ρυθμιστών απαιτούνται για την επίτευξη της ιστικής διείσδυσης και μετάστασης.

Η βασική μεμβράνη που βρίσκεται κάτω από πλακώδες επιθήλιο λειτουργεί από μόνη της ως φυσικό εμπόδιο στην διείσδυση των καρκινικών κυττάρων. Τόσο το φυσιολογικό όσο και το νεοπλασματικό πλακώδες επιθήλιο έχει βρεθεί ότι έχει ειδικούς υποδοχείς για τα στοιχεία της βασικής μεμβράνης μέσω των οποίων προσκολλώνται στην

εξωκυττάρια μήτρα. Οι ιντεγκρίνες είναι μια οικογένεια μορίων προσκόλλησης. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη στοματικού καρκίνου. Η καντχερίνη-Ε είναι ένας άλλος μοριακός υποδοχέας που παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταξύ των κυττάρων επαφής, χαρακτηριστικό πολύ σημαντικό για τα επιθηλιακά κύτταρα. Μια άλλη ομάδα κυτοπλασματικών πρωτεϊνών, οι κατενίνες, που σχηματίζουν σύμπλοκα με τις καντερίνες φαίνεται να βοηθούν στην πραγματοποίηση αυτής της επαφής. Από μελέτες σε περιπτώσεις καρκίνου της στοματικής κοιλότητας προέκυψε, ότι όπως με την καντχερίνη-Ε, έτσι και με την κατενίνη, τα επίπεδά τους παρουσιάζουν μια διασταυρούμενη αναλογία με τον βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων.

Κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης αποτελούν το κολλαγόνο τύπου IV, η θειική πρωτεογλυκάνη, η λαμινίνη και η εντακτίνη. Σε μοριακό επίπεδο το κολλαγόνο τύπου IV, είναι ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα τμήματα υδροξυπρολίνης και υδροξυλυσίνης, τα οποία όταν πολυμερίζονται σχηματίζουν δίκτυο. Ανάμεσα στο πλέγμα του κολλαγόνου βρίσκεται η μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη λαμινίνη (850000 kilodaltons). Η λαμινίνη σχηματίζεται από τρεις μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι λειτουργικές περιοχές της λαμινίνης δρουν ως υποδοχείς ή θέσεις σύνδεσης με άλλα μόρια λαμινίνης, κολλαγόνο, εντακτίνη και την επιφάνεια επιθηλιακών κυττάρων. Η εντακτίνη είναι μία άλλη γλυκοπρωτεΐνη με δύο θέσεις υψηλής συγγένειας, μία για την λαμινίνη και μία για το κολλαγόνο τύπου IV, έτσι λειτουργεί σαν μία επιπλέον γέφυρα συγκράτησης στη βασική μεμβράνη.

Η διάσπαση του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης έχει συσχετιστεί σημαντικά με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Ατελής ή ελαττωμένη χρώση του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης, καθώς και διακεκομμένη ή φτωχή χρώση για τη λαμινίνη, έχει συσχετιστεί με αυξημένη επίπτωση λεμφαδενικών μεταστάσεων. Μία λογική εξήγηση αυτού του γεγονότος είναι ότι η αυξημένη αποδόμηση της βασικής μεμβράνης σχετίζεται με αυξημένη διήθηση και μετάσταση.

Η ικανότητα προσκόλλησης στη βασική μεμβράνη και σε εξωκυττάρια συστατικά φαίνεται να είναι ένας άλλος τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα του όγκου προκαλούν τοπική διήθηση και μετάσταση. Το 1986, κατά την προσπάθεια απομόνωσης ενός ειδικού καρκινικού δείκτη για τους ΚΠΕΤΧ, η ομάδα του Carey αναγνώρισε μία μεμβρανική πρωτεΐνη μοναδική στα καρκινώματα της περιοχής κεφαλής και τραχήλου. Αυτό το αντιγόνο (Α9) ήταν παρόν σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα αλλά σε υψηλά επίπεδα σε ΚΠΕΤΧ και μάλιστα βρισκόταν στον βασικό πόλο, οδηγώντας στην υπόθεση ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση. Η παρουσία αυξημένης έκφρασης του Α9 αντιγόνου, φάνηκε να σχετίζεται με πρώιμη υποτροπή και μειωμένο ελεύθερο νόσου χρόνο επιβίωσης. Η βιοχημική και δομική ανάλυση του αντιγόνου Α9 το χαρακτήρισαν σαν μία α6-β4 ιντεγκρίνη. Οι ιντεγκρίνες αποτελούν ομάδα διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους σχηματιζόμενες από δύο υπομονάδες (α και β), οι οποίες συνδέονται με εξωκυττάρια συστατικά καθώς και με συστατικά του κυτταροσκελετού. Και οι δύο υπομονάδες α6 και β4 της ιντεγκρίνης μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδοχείς της λαμινίνης και να την δεσμεύσουν. Πειραματικές εργασίες με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων των α ή β υπομονάδων και αναλόγων τω υποδοχέων της λαμινίνης, έδειξαν αναστολή της σύνδεσης με λαμινίνη in vitro και μείωση της επίπτωσης μετάστασης in vivo.

Διαλυτοί παράγοντες προερχόμενοι από ενδοθηλιακά κύτταρα, παροδικά αυξάνουν την προσκόλληση του ΚΠΕΤΧ στην φιμπρονεκτίνη και βιτρονεκτίνη και αυξάνουν την επιφανειακή έκφραση της β1, β4 ιντεγκρίνης αλλά όχι της β3 ιντεγκρίνης. Μεταβολές στην προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων και στη έκφραση αυτών των υποδοχέων

δέσμευσης της κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να διευκολύνουν τη διήθηση, τη μετάσταση και τη νεοαγγείωση. Ο ρόλος της ιντεγκρίνης στην παθολογία της διήθησης, μετάστασης και των ενδοθηλιακών κυτταρικών αλληλεπιδράσεων των ΚΠΕΤΧ είναι υπό έρευνα.

4.7.2. Αποδόμηση του εξωκυττάριου χώρου

Η πρωτεόλυση του εξωκυττάριου χώρου είναι επίσης ένα σημαντικό βήμα στην επίτευξη της διείσδυσης από όγκο. Μια μεγάλη ποικιλία από πρωτεάσες έχουν προσδιοριστεί σε πολλούς τύπους καρκίνου και υπάρχει ένας πλήθος βιβλιογραφίας που υποστηρίζει την θετική δράση αρκετών ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων και των ενεργοποιητών τους στην ανάπτυξη μεταστάσεων σε περιπτώσεις καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων.

Για να διαβρωθεί η βασική μεμβράνη και να διηθηθεί το στρώμα του συνδετικού ιστού, πρέπει το HNSCC να παράγει ένζυμα ικανά να αποδομούν τα εξωκυττάρια συστατικά. Γενικές ομάδες πρωτεολυτικών μορίων περιλαμβάνουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) οι οποίες ονομάζονται έτσι λόγω της ανάγκης παρουσίας Zn^{2+} ως καταλύτη, και οι ενεργοποιητές πλασμινογόνου. Οι MMP μπορούν να υποδιαιρεθούν σε α) διάμεσες κολλαγενάσες, β) στρωμαλυσίνες και γ) ζελατινάσες. Έχουν επίσης αναγνωριστεί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMP-1 και TIMP-2). Αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται με ειδικές ενεργοποιημένες MMP και εμποδίζουν την αποδόμηση του εξωκυττάριου χώρου.

Έχουν αναγνωριστεί σε HNSCC in vitro και in vivo, MMP-1,-2 και –9, υπεύθυνες για την αποδόμηση του ινώδους κολλαγόνου (κολλαγόνα I,II,III,V), των λαμινινών και άλλων συστατικών της βασικής μεμβράνης (κολλαγόνο IV, ζελατίνη). Πρόσφατα, ο Charous και συν. προσπάθησαν να αναδείξουν MMP πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας in situ υβριδισμό. Αν και η έκφραση των MMP-2 και TIMP-1 ήταν σταθερή σε 21 πρωτοπαθή HNSCC που εξετάστηκαν, η έκφραση των MMP-1 και –9 ήταν ποικίλη. Στρωματολυσίνες 2 και 3 έχουν επίσης αναγνωριστεί και σε HNSCC και σε χημικά προκαλούμενο καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. Έχουν μελετηθεί οι γενετικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών. Υπερέκφραση των 3 γονιδίων στρωμαλυσίνης, έχουν φανεί σε 106 από 111 HNSCC με Nothern blot ανάλυση.

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (PA) είναι μία άλλη τάξη πρωτεασών που έχει μελετηθεί όσον αφορά τη διήθηση και μετάσταση σε HNSCC. Οι PA είναι ουδέτερες πρωτεάσες που καταλύουν την σύνθεση πλασμίνης από πλασμινογόνο. Η πλασμίνη είναι ένα ινωδολυτικό ένζυμο, το οποίο δρα επίσης στην αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου IV και της λαμινίνης. Αν και υπάρχουν δύο μορφές του PA, ο τύπος της ουροκινάσης (uPA) έχει παρουσιαστεί από αρκετούς ερευνητές να είναι σημαντικός όσον αφορά τη διήθηση και μετάσταση. Ο Clayman κα συν., έχουν δείξει ότι αυξημένη διήθηση τεχνητών μεμβρανών in vitro, σχετίζεται με υψηλά επίπεδα παραγωγής uPA και απορύθμιση του uPA-mRNA. Ένα ειδικό αντίσωμα εναντίον της καταλυτικής θέσης του uPA, φαίνεται να είναι ικανό να εμποδίζει τη διήθηση από HNSCC σε φίλτρα κατασκευασμένα από βασική μεμβράνη.

5. Μηχανισμοί απόπτωσης

5.1. Ο ρόλος της απόπτωσης στην παθολογία και την θεραπευτική αντιμετώπιση διαφόρων νόσων στην Ωτορινολαρυγγολογία

Κάθε γνώση στηρίζεται σε μία πίστη, αλλά αυτή, προκειμένου να μη γίνει δογματική, θα πρέπει να περιέχει και το στοιχείο της αυτοαναίρεσής της. Η ταχεία κλινική ανάπτυξη που έχει επισυμβεί τις τελευταίες δεκαετίες στην Ωτορινολαρυγγολογία, αλλά και στην ιατρική γενικότερα, συνοδεύεται από μία έκρηξη ανάπτυξης των βασικών επιστημών. Τελευταία δε, τόσο η κλινική όσο και η βασική έρευνα έχει επεκταθεί σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Ο ταχύς ρυθμός της επιστημονικής εξέλιξης απαιτεί όχι μόνο την κατοχή ενός εκτεταμένου πακέτου γνώσεων, αλλά και την επιθυμία για την υιοθέτηση καινοτόμων ιδεών. Απαιτείται επίσης το κατάλληλο σθένος για την αναθεώρηση βασικών βιολογικών αξιωμάτων. Χωρίς αυτόν τον τρόπο στρατηγικής προσέγγισης της επιστημονικής εξέλιξης, οι χειρουργοί του μέλλοντος κινδυνεύουν να καταστούν απλοί χειρουργικοί τεχνίτες, αποτυγχάνοντας της ιστορικής των κληρονομιάς που τους θέλει ενεργούς χορηγούς της ιατρικής προόδου. Η διάθεση ενός κλινικού ιατρού για την υιοθέτηση καινοτόμων ιδεών σχετίζεται άμεσα με τα δεκάδες παραδείγματα περιπτώσεων που καθημερινά συναντά και αφορούν την αναθεώρηση βασικών θέσεων για το μηχανισμό της παθοφυσιολογίας διαφόρων παθήσεων. Ένα τέτοιο παράδειγμα θεμελιώδους αλλαγής είναι ο τρόπος του ελέγχου της απόπτωσης και του μηχανισμού με τον οποίο τα κύτταρα πεθαίνουν. Και αυτό είναι πολύ έκδηλο στους Ωτορινολαρυγγολόγους που ενημερώνονται της διεθνούς βιβλιογραφίας, από το πλήθος των αναφορών που υπάρχουν συσχετίζοντας την ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου με την λειτουργία διαφόρων συστημάτων, όπως το αιθουσαίο σύστημα ή με την εμφάνιση διαφόρων επιθηλιακών νεοπλασιών.

Η απόπτωση ή αλλιώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό τρόπο, με τον οποίο μη χρήσιμα κύτταρα απομακρύνονται αποτελεσματικά από πολυκύτταρους οργανισμούς. Η απόπτωση λοιπόν παίζει έναν πολύ κριτικό ρόλο στην ανάπτυξη όλων των πολυκύτταρων οργανισμών, ενώ είναι υπεύθυνη σε μεγάλο βαθμό για την ομοιόσταση των κυτταρικών υποπληθυσμών ενός ενήλικος ανθρώπινου οργανισμού. Απορύθμιση του μηχανισμού απόπτωσης συνεπάγεται εκτεταμένη απώλεια κυττάρων, όπως σε απώλεια κεντρικών ή περιφερικών ακουστικών νευρώνων ή σε υπερσυγκέντρωση κυττάρων όπως σε περιπτώσεις ΚΠΕΤΧ. Ο ρόλος διαφόρων παθολογικών οντοτήτων της Ωτορινολαρυγγολογίας στην απορύθμιση του μηχανισμού απόπτωσης αποτελεί αυτή την στιγμή ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο της ειδικότητας. Η μελέτη της μοριακής βάσης των μηχανισμών απόπτωσης είναι εμφανές ότι θα οδηγήσει σε ανάπτυξη μεθοδολογιών, που ως σκοπό θα έχουν είτε την πρόληψη του κυτταρικού θανάτου, όπως σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νόσων, είτε την επιτάγχυση του κυτταρικού θανάτου όπως σε περιπτώσεις περίσσιας κυττάρων σε ΚΠΕΤΧ.

5.2. Κυτταρικός έλεγχος: πολλαπλασιασμός και θάνατος

Η ομοιόσταση παραδοσιακά συσχετίζεται με την φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού περιβάλλοντος. Κατά συνέπεια, ο έλεγχος του κυτταρικού αριθμού στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι συνώνυμο της φυσιολογικής ανάπτυξης και εξέλιξης. Θεωρείται ότι ο έλεγχος του κυτταρικού αριθμού εξαρτάται από τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και του κυτταρικού θανάτου. Για έναν συγκεκριμένο ρυθμό

κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ένας ελαττωμένος ρυθμός κυτταρικού θανάτου μπορεί ενδεχομένως να οδηγήσει σε υπερσυσσώρευση κυττάρων και νεοπλασία. Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί την μοριακή βάση δημιουργίας διαφόρων όγκων, όπως τα θυλακιώδη λεμφώματα ή τα ΚΠΕΤΧ με μετάλλαξη του p53. Από την άλλη μεριά, η μη ομαλή ενεργοποίηση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη κυτταρική απώλεια. Γνωρίζοντας δε ότι αυτός είναι ο μηχανισμός δράσης των περισσοτέρων χημειοθεραπευτικών φαρμακευτικών παραγόντων, αλλά και της ακτινοβολίας, η εκ βαθέων προσπάθεια μελέτης του κυτταρικού θανάτου είναι χρήσιμη και στην θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου.

Είναι γνωστό, ότι ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά την ανάπτυξη αλλά και κατά την ενηλικίωση του ανθρώπινου οργανισμού είναι μία συγκεκριμένη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται μία μεγάλη ομάδα θετικών και αρνητικών ρυθμιστών. Οι θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού περιλαμβάνουν μία σειρά αυξητικών παραγόντων και πρωτο-ογκογονιδίων (π.χ. αυξητικός παράγων αιμοπεταλίων και c-myc, αντίστοιχα). Η δε διαταραχή στην έκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων έχει διαπιστωθεί σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου. Οι αρνητικοί ρυθμιστές περιλαμβάνουν τα κατασταλτικά ογκογονίδια, όπως το Rb-1 που εμπλέκεται στην παθογένεση του ρετινοβλαστώματος.

Όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών δύνανται να μετέχουν της διαδικασίας της απόπτωσης, ως κοινωνοί ενός προδιαγεγραμμένου προγράμματος «αυτοκτονίας». Είναι δε εντυπωσιακό, ότι η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου εμφανίζεται και διατηρείται με παρόμοιο τρόπο κατά την εξέλιξη των ειδών. Για παράδειγμα, το ανθρώπινο αντιαποπτωτικό γονίδιο bcl-2 εμφανίζεται και στο νημάτιο (nematode) Caenorhabditis elegans, αλλά και σε ορισμένους DNA ιούς.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου ενός δεδομένου κυττάρου είναι μονίμως παρών, περιμένοντας το κατάλληλο έναυσμα για την έναρξη της αυτοκαταστροφής. Για ποιο λόγο τα κύτταρα είναι τόσο έτοιμα για να πεθάνουν; Για την κατανόηση του ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου είναι ύψιστης σημασίας η γνώση των διαφορών του, με τον μη ελεγχόμενο κυτταρικό θάνατο.

5.3. Απόπτωση και νέκρωση

Σε γενικές γραμμές, δύο τύποι κυτταρικών θανάτων περιγράφονται σε πολυκύτταρους οργανισμούς: η απόπτωση και η νέκρωση. Η νέκρωση είναι μία παθολογική μορφή κυτταρικού θανάτου λόγω οξέος κυτταρικού τραυματισμού, που συνήθως εκδηλώνεται με ενδοκυτταρικό οίδημα και ενδεχομένως με κυτταρική λύση. Η κυτταρική λύση επιφέρει μία μη ελεγχόμενη απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων, που ως αποτέλεσμα έχει την εκδήλωση φλεγμονώδους αντίδρασης. Αντιθέτως, η απόπτωση χαρακτηρίζεται ως μία ελεγχόμενη αυτοπεπτική διαδικασία. Δια μέσω της ενεργοποίησης ενός σαφώς ορισμένου προγράμματος κυτταρικού θανάτου επισυμβαίνει μία σειρά χαρακτηριστικών μορφολογικών αλλαγών. Αυτές περιλαμβάνουν την κυτταρική συρρίκνωση, την συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης σε οξείες κυκλοτερείς μάζες και σε τελικό στάδιο, την φυσαλιδώδη μορφή της κυτταρικής μεμβράνης με την συνοδή δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων. Τα αποπτωτικά αυτά σωματίδια φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και συνεπώς δεν απελευθερώνονται κυτταρολυτικές ουσίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή της όποιας φλεγμονώδους αντίδρασης.

Θα ήταν λοιπόν σκόπιμο να θεωρήσουμε την νέκρωση, ως μία μη ελεγχόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου που δεν σχετίζεται με την φυσιολογική ομοιόσταση και

εξέλιξη, αλλά μάλλον αντιπροσωπεύει το αποτέλεσμα ενός παθοφυσιολογικού τραυματισμού. Αντιθέτως η απόπτωση αντιπροσωπεύει μία ελεγχόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, που επιτρέπει στους πολυκύτταρους οργανισμούς να απομακρύνουν επαρκώς τα άχρηστα ή μη φυσιολογικά κύτταρα χωρίς την συνοδεία φλεγμονώδους αντίδρασης.

5.4. Μοριακοί μηχανισμοί προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Η πολυπλοκότητα των θηλαστικών ανώτερης τάξης καθιστά τη μελέτη των κυττάρων και της κυτταρικής ζωής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μία επιστημονική πρόκληση. Ο νηματώδης C.elegans μας παρέχει ένα παραδειγματικό μοντέλο για τη μελέτη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Αρκετή από τη δουλειά που έγινε κατά τα τελευταία 20 χρόνια για να χαρακτηρισθούν οι μοριακοί μηχανισμοί και η γενετική του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ξεκίνησε στον C.elegans από το Robert Horvitz και την ομάδα του στο Massachusetts Institute of Technology στο Cambridge.Το μικρό μέγεθος αυτού του οργανισμού διευκολύνουν την ακριβή εντόπιση του κάθε κυττάρου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του. Για την ακρίβεια, 131 κύτταρα πέθαναν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ενήλικα οργανισμού των 959 κυττάρων. Αρκετή από τη δουλειά που πραγματοποιήθηκε στην κλωνοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου στο C.elegans φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με αυτό που συμβαίνει στα θηλαστικά. Συγκεκριμένα τα γονίδια ced-3,ced-4 και ced-9 στο νηματώδη δείχνουν να είναι καίρια για την κατανόηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα θηλαστικά τόσο κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής τους ανάπτυξης όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

Τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στον C.elegans μπορούμε να τον σκεφτούμε σε 3 στάδια. Το στάδιο 1(σήμα) γενικά χαρακτηρίζεται από την παρουσίαση ενός σήματος το οποίο θα ενεργοποιήσει στο κύτταρο το πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου. Το σήμα μπορεί να είναι ενδοκυττάριο ή εξωκυττάριο. Τα εξωκυττάρια σήματα περιλαμβάνουν την ιονίζουσα ακτινοβολία, ορμονικά σήματα απόσυρση παραγόντων ανάπτυξης ή απομάκρυνση προσαγωγών αποθεμάτων στο νεοαναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα.

Στο στάδιο 2 (εκτέλεση).το πρόγραμμα του κυτταρικού θανάτου εκτελείται με ενεργοποίηση μιας οικογένειας κυστεινικών πρωτεασών με ειδικότητα στο ασπαρτικό ή κασπασών (γνωστές ως Ιντερλευκίνης 1β-μετατρεπτικές πρωτεάσες) Αυτές εκπροσωπούν μια καινούργια τάξη μεσολαβητών κυτταρικού θανάτου. Δέκα διαφορετικές κασπάσες έχουν βρεθεί να συνυπάρχουν στους ανθρώπους.

Στο στάδιο 3 (μορφολογικές αλλαγές) η ενεργοποίηση των κασπασών οδηγεί σε χαρακτηριστικές αποπτωτικές μορφολογικές αλλαγές (όπως περιγράφηκαν ανωτέρω), πχ. κυτταρική συρρίκνωση, συμπύκνωση πυρηνικής χρωματίνης και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων. Αυτές οι μορφολογικές και δομικές αλλαγές αντιπροσωπεύουν το τελικό στάδιο του καταρράκτη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Στο νηματώδη, το πρωτεϊνικό προϊόν του ced-3 είναι μια κασπάση.Το πρωτεϊνικό προϊόν του ced-4 είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της κασπάσης και είναι ομόλογο του ενεργοποιητικού παράγοντα της ανθρώπινης πρωτεϊνικής αποπτωτικής πρωτεάσης. Επομένως το ced-4 δρα ως ένας ενεργοποιητικός παράγοντας για το ced –3. Η πρωτεΐνη που κωδικεύεται από το ced-9 φαίνεται να δεσμεύει το ced-4 και να αποτρέπει την ενεργοποίηση του ced-3. Το ανθρώπινο ομόλογο του ced-9 είναι το bcl-2, που είναι το πρώτο μέλος μιας οικογένειας ρυθμιστών κυτταρικού θανάτου.

5.5. Το Bcl-2 στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Το bcl-2 είναι το πρώτο περιγραφέν μέλος της οικογένειας των ογκογονιδίων που ενέχονται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αρχικά μελετήθηκε στο θηλακιώδες λέμφωμα, τύπο του non Hodgkin λεμφώματος. Μία (t14;18) μετατόπιση παρούσα στα περισσότερα θηλακιώδη λεμφώματα ανέδειξε το νέο, για τα ως τότε δεδομένα, ογκογονίδιο. Ονομάστηκε bcl-2 από τα αρχικά του B-cell lymphoma\leukemia και η ενεργοποίησή του αποδόθηκε στη συγκεκριμένη αντιμετάθεση. Μία σύγχρονη μελέτη έδειξε ότι οι γονιδιακοί τόποι του bcl-2 στο 18q και της βαριάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών στο14q ανασυνδυάζονται σε μία ισορροπούμενη αντιμετάθεση. Το bcl-2 τελικά βρίσκεται υπό το μεταγραφικό έλεγχο του γονιδίου της βαριάς αλύσου, με επακόλουθη την απορρύθμιση της μεταγραφής του και την υπερέκφραση του άγριου τύπου bcl-2 RNA και της πρωτεΐνης.

Η αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) από το bcl-2 πρώτα δείχθηκε από τους Vanx et al από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια. Με τον όρο διαγονιδιακό περιγράφεται το ποντίκι το γονιδίωμα του οποίου έχει υποστεί αλλαγές. Για παράδειγμα ένα δεδομένο γονίδιο μπορεί να έχει μεταφερθεί σε θέση που ελέγχεται από διαφορετικό εκκινητή, όπως στο συγκεκριμένο παράδειγμα, τροποποιώντας την έκφραση του mRNA και συνεπώς την έκφραση της πρωτείνης. Ένα διαφορετικό μοντέλο είναι το 'knockout' (βλέπε παρακάτω) στο οποίο ένα γονίδιο μπορεί να έχει απενεργοποιηθεί ή απομακρυνθεί.

Οι Vaux et al δημιούργησαν ένα διαγονιδιακό ποντίκι στο οποίο χειρισμοί στο γονιδίωμα είχαν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του αρχικού bcl-2 γονιδίου υπό το μεταγραφικό έλεγχο του ενισχυτή της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, ανάλογο με το αποτέλεσμα της t(14-18) μετατόπισης στο ανθρώπινο λέμφωμα. Αυτό φαίνεται να προκαλεί υπερέκφραση πολυκλωνικών ώριμων Β λεμφοκυττάρων, επιβεβαιώνοντας ένα πιθανό μηχανισμό ανάπτυξης Β κυττάρων στο ανθρώπινο θυλακιώδες λέμφωμα. 10%-15% αυτών των μοντέλων τελικά ανέπτυξε επιθετικό ανοσοβλαστικό Β λέμφωμα.. Αυτό υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση του bcl-2 προκάλεσε την κλωνοποίηση λεμφοκυττάρων με συνέπεια το λέμφωμα. Τη δεδομένη στιγμή ήταν σημαντική η ανακάλυψη ότι ένα μόνο γονίδιο μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο παρεμβαίνοντας στον κυτταρικό κύκλο. Θα μπορούσε από μόνο του το γονίδιο να είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της απόπτωσης;

Υπάρχουν ενδείξεις ότι επιπλέον γονίδια εμπλέκονται στην απόπτωση, ιδιαίτερα κατά την περίοδο της ανάπτυξης, όπως προκύπτει πάλι από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια. Είναι ενδιαφέρον ότι ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη του bcl-2 (knockout) αναπτύσσουν φυσιολογικά (αλλά με καθυστέρηση της ανάπτυξης) και τους 3 ειδικούς ιστικούς φαινοτύπους.

1. μαζικός λεμφικός εκφυλισμός σε 2 μήνες από τη γέννηση
2. άσπρισμα των μαλλιών κατά τη διάρκεια του δεύτερου θυλακικού κύκλου
3. πολυκυστικοί νεφροί με συνέπεια τον θάνατο του μοντέλου μέχρι τον τρίτο μήνα της ζωής

Η ύπαρξη μοντέλων ποντικών knockout ως προς το bcl-2 που αναπτύχθηκαν σχετικά φυσιολογικά δείχνει ότι άλλα γονίδια επίσης ενέχονται στον έλεγχο της απόπτωσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Επιπλέον, σημαντικός αριθμός γονιδίων με ποικίλη ομολογία για το bcl-2 έχει κλωνοποιηθεί. Φαίνεται ότι η οικογένεια του bcl-2 γονιδίου και το πρωτεινικό προιον της σχηματίζουν σύμπλοκο αποτελώντας λειτουργικό σύνολο με το οποίο το κύτταρο ελέγχει το ρυθμό περαιτέρω έκφρασης. Αυτές οι πρωτεινες έχουν αντίθετη δράση, άλλες προάγουν τον κυτταρικό θάνατο ενώ άλλες τον αναστέλλουν.

Για παράδειγμα η BAX, μία πρωτείνη που εντοπίστηκε στην περιοχή του bcl-2, προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Τρέχουσες απόψεις στηρίζουν ότι το bcl-2 και η BAX, αρνητικός και θετικός παράγοντας απόπτωσης, αντιστοιχα, έχουν ανταγωνιστικό ρόλο στον καθορισμό της μοίρας του κυττάρου. Οι πρωτεινες αυτές συνδέονται σε ζεύγη μεταξύ τους είτε όμοιες (ομοδιμερή) είτε διαφορετικές (ετεροδιμερή). Σε αυτό το μοντέλο μία περίσσεια BAX ομοδιμερών ενισχύει τον προγραμματισμό του κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα μία περίσσεια των bcl-2 ομοδιμερών αναστέλλει την απόπτωση. Τα ετεροδιμερή θεωρούνται ουδέτερα.

Τα πράγματα γίνονται πιο πολύπλοκα αν θεωρηθούν τα λοιπά μέλη της οικογένειας (πίνακας 2). Για παράδειγμα μια άλλη πρωτεινη η BAD φαίνεται να ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο σε ένα παρόμοιο ανταγωνιστικό πρότυπο. Εναλλακτικά splicing ενός άλλου μέλους της οικογενείας bcl-x σε επιμήκεις (L) ή βραχείες (S) αλληλουχίες ενισχύει την επιβίωση του κυττάρου (bcl-x L) ή την απόπτωση (bcl-x S). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με ρόλο να ενισχύουν ή να αναστέλλουν σε κάποιο βαθμό την έναρξη της απόπτωσης. Από μια ανάλυση της αλληλουχίας των πρωτεϊνών που παράγονται από αυτή την οικογένεια γονιδίων δείχνει ότι δύο περιοχές είναι σταθερές ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται BH1 και BH2. Η λειτουργία των πρωτεϊνών σε μοριακό επίπεδο είναι αδιευκρίνιστη.

γονίδιο και/ή προϊόν	Δράση
Bcl-2	Αντι-αποπτωτική
Bcl-x_L	Αντι-αποπτωτική
Bcl-x_S BAX BAK BAD BIK	Αποπτωτική Αποπτωτική Αποπτωτική Αποπτωτική Αποπτωτική

Πίνακας 2. Τα μέλη και οι λειτουργίες της οικογένειας bcl-2 στον άνθρωπο.

Εκτεταμένες έρευνες γίνονται για να διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης της οικογένειας bcl-2 σε σχέση με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι μέλη αυτής της οικογένειας δρουν έμμεσα είτε στην έναρξη είτε στην καταστολή της ενεργοποίησης κασπασών. Φαίνεται ότι μέλη αυτής της οικογένειας αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών όπως περιγράφτηκε. Αυτά τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα ή μέλη της οικογένειας bcl-2 που δεν έχουν γίνει διμερή μπορεί να δρουν στη συνέχεια δεσμεύοντας Apaf-1 και έτσι ενισχύουν την ενεργοποίηση κασπασών, ή ενισχύοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα που απαιτείται για την ενεργοποίηση των κασπασών (το κυτόχρωμα c είναι ένα ένζυμο βασικό για την παραγωγή ATP στον αερόβιο μεταβολισμό). Συνεπώς η bcl-2 οικογένεια προγραμματίζει τον κυτταρικό θάνατο όπως φαίνεται στην εικόνα 3 και μελετήθηκε λεπτομερώς από τους Adams και Cory. Η εντόπιση των μελών αυτής της οικογένειας στα μιτοχόνδρια και ο ρόλος του κυτοχρώματος c στην απόπτωση αποδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο των μιτοχονδρίων σε αυτή τη διαδικασία.

5.6. Μιτοχόνδρια και ασβέστιο στην απόπτωση

Το κυτόχρωμα c συντίθεται στον πυρήνα σε ανενεργή μορφή (αποκυτόχρωμα c) και μεταφέρεται διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στο μεσοδιάστημα μεταξύ των μιτοχονδριακών μεμβρανών, όπου συνδυάζεται με αίμη για το σχηματισμό της ενεργού πρωτείνιης ή ολοενζύμου. Ο τρόπος με τον οποίο εξωθείται το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια στην απόπτωση παραμένει ένα μυστήριο. Εχουν προταθεί 2 μοντέλα. Στο πρώτο μοντέλο η μιτοχονδριακή διάβρωση καταλήγει στην απελευθέρωση του ενζύμου. Ενδειξη υπέρ αυτού είναι το γεγονός ότι το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης φαίνεται να ρίχνει τη φυσιολογική του αρνητική τιμή, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Αυτό φαίνεται να οφείλεται σε αλλαγή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης προκαλούμενη από τη διάνοιξη ενός καναλιού που αποτρέπει την είσοδο κυκλοσπορίνης μέσω της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης. Είναι πιθανό ότι το συνακόλουθο οίδημα της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης προκαλεί διάβρωση της εξωτερικής μεμβράνης, επιτρέποντας στο κυτόχρωμα c να διαφύγει στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η θεωρία ενισχύεται από αποδείξεις ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μπορεί να συμβεί πριν τη μεταβολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Ένα δεύτερο μοντέλο προτείνει ότι ένα ειδικό κανάλι επιτρέπει την ενεργοποίηση του κυτοχρώματος c. Σε ενίσχυση αυτού του μοντέλου, μέλη της οικογένειας του bcl-2 έχουν κάποιες δομικές ομόλογες περιοχές με τις περιοχές συγκεκριμένων βακτηριακών τοξινών που σχηματίζουν πόρους, όπως η τοξίνη της διφθερίτιδας. Ακόμη τα bcl-XL και BAX φαίνεται να έχουν ικανότητα σχηματισμού διαύλων. Ακόμη ,το bcl-2 φαίνεται να αποτρέπει την ικανίτητα του BAX να σχηματίζει πόρους καθώς και τη μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης.

Ένα άλλο στοιχείο των αποπτωτικών κυττάρων είναι συχνά μια αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου. Αυξήσεις στο ενδοκυττάριο ασβέστιο θεωρούνται ότι έχουν καίριο ρόλο σε διεγερτικά νευροτοξικά αποτελέσματα. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ασβεστίου σε μια πληθώρα κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων. Η υπερέκφραση του bcl-2 μπορεί να επηρρεάσει τόσο την απόπτωση όσο και την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου σε ορισμένους τύπους κυττάρων. Συνδυάζοντας τα ανωτέρω υπάρχει η ένδειξη ότι το bcl-2 (και οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες) δρουν στο επίπεδο των μιτοχονδρίων για να ρυθμίσουν τον κυτταρικό θανατό.

5.7. Εξωκυττάριοι υποκαταστάτες κυτταρικού θανάτου

Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης κυτταρικού θανάτου. Υπάρχει μη εξαρτώμενη από το bcl-2 ενεργοποίηση των κασπασών και επομένως επαγωγή απόπτωσης, σχετιζόμενη πιθανώς με αυτοάνοσες διαταραχές. Στο ανοσοποιητικό σύστημα η έκφραση της εξωκυτταρικής αποπτωτικής πρωτεΐνης Fas-L πραγματοποιείται στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών Τ-κυττάρων σε απάντηση στην παρουσίαση ξένων πεπτιδίων από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (τάξη Ι) σε αντιγονομιμητικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη Fas-L τότε προσδένεται στον υποδοχέα της Fas στην πλασματική μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Αυτό προκαλεί μια συσχέτιση με Fas-σχετιζόμενες αποπτωτικές πρωτεΐνες (FADD), που καταλήγει στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Αυτός ο μηχανισμός είναι υπεύθυνος για τον κυτταροτοξικό ανοσομεσολαβούμενο κυτταρικό θάνατο καθώς και για την απομάκρυνση των αυτοενεργοποιούμενων λεμφοκυττάρων. Διαταραχές αυτού του συστήματος μπορούν να οδηγήσουν σε αυτοάνοσες νόσους σε 2 επίπεδα: 1) Αποτυχία απομάκρυνσης

αυτοενεργοποιούμενων λεμφοκυττάρων οδηγεί στην παραμονή κυτταροτοξικών κυττάρων στρεφόμενων εναντίον αυτοαντιγόνων. 2) Αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιούν κυτταροτοξικό ανοσομεσολαβούμενο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (μέσω του Fas-L-Fas μονοπατιού) για να καταστρέψουν κύτταρα του ξενιστή.

5.8. p53 και απόπτωση

Ένας αριθμός άλλων ογκογονιδίων μπορεί να δράσει μέσω του αποπτωτικού μονοπατιού και να επηρεάσει νεοπλασματικές διεργασίες, πχ. το p53 πιστεύεται ότι λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό ογκογονίδιο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA. Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου είναι οι πιο συχνές σε ανθρώπινες κακοήθειες. Το p53 κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό ενεργοποιητή που φαίνεται να παίζει ρόλο στην κυτταρική απάντηση σε βλάβη του DNA και πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Όπως και για το bcl-2, σημαντικές πληροφορίες για το p53 λήφθηκαν από την ανάλυση διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη p53. Αυτά τα ποντίκια έδειξαν φυσιολογική ανάπτυξη κατά την ενήλικο ζωή, υποδεικνύοντας ότι το p53 δεν ευθύνεται για τη ρύθμιση της απόπτωσης κατά την ανάπτυξη. Όμως θυμοκύτταρα από αυτά τα ποντίκια είναι ανθεκτικά στην ιονίζουσα ακτινοβολία που διεγείρει την απόπτωση σε θυμοκύτταρα με άγριο τύπο του αλλήλιου. Όμως, τα χωρίς p53 θυμοκύτταρα έχουν φυσιολογική απόπτωση όταν εκτεθούν σε γλυκοκορτικοειδή, ενεργοποίηση υποδοχέων Τ-κυττάρων ή υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Το p53 φαίνεται να προάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση σε απάντηση σε βλάβη του DNA, όπως προκύπτει με ιονίζουσα ακτινοβολία, με ενεργοποίηση γονιδίων που τα προϊόντα τους δίνουν ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας βλάβη μιτοχονδρίων και απελευθέρωση μιτοχονδριακού περιεχομένου. Όπως αναφέρθηκε, απελευθέρωση του κυττοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα από τα μιτοχόνδρια μπορεί να είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κασπασων και την εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου.

Οι κλινικές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι μεταλλάξεις του p53 είναι υπεύθυνες όχι μόνο για επαγωγή νεοπλασίας, αλλά και για αντοχή σε ακτινοθεραπεία. Μεταλλάξεις του p53 βρέθηκαν σε καρκινώματα του τραχήλου και της κεφαλής, και έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ένα εργαλείο μοριακής-βιολογικής σταδιοποίησης. Πραγματικά, υπερέκφραση του p53 (τυπική απάντηση σε μετάλλαξη του αλλήλιου) φαίνεται να προβλέπει μικρή απάντηση στην ακτινοθεραπεία, τουλάχιστον σε μια πρόσφατη έρευνα. Έρευνα της πιθανότητας εισαγωγής του άγριου τύπου p53 σε όγκους κεφαλής-τραχήλου μέσω ιικών φορέων του γόνου φαίνεται πολλά υποσχόμενη.

5.9. Κλινική εφαρμογή: Καρκίνος

Όπως αναφέρθηκε, η διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού αριθμού μπορεί να οδηγήσει σε υπερσυσσωρεύσεις κυττάρων και νεοπλασία. Σχεδόν όλοι οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιώντας μηχανισμούς απόπτωσης, ως μέρος του προγράμματος κυτταρικού θανάτου. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαταραχή της έκφρασης ρυθμιστών του κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει σε μια μορφή αντοχής ενός δεδομένου χημειοθεραπευτικού σχήματος. Έχει περιγραφεί, για παράδειγμα, φαρμακευτική αντοχή κατά την χρήση δοξορουμπισίνης για πολλαπλούν μυέλωμα, σε περίπτωση αυξημένης έκφρασης του γονιδίου bcl-2. Αυτό δυνατόν να αποτελεί μηχανισμό μιας in vivo μελέτης εκλεκτικής χημειοθεραπευτικής αντοχής. Αυξημένη έκφραση του γονιδίου bcl-2 έχει επίσης περιγραφεί και σε περιπτώσεις

αντοχής στην χημειοθεραπεία σε μορφές καρκίνου του μαστού. Οι ογκολόγοι ελπίζουν στην χρησιμοποίηση της γνώσης των βιοχημικών μηχανισμών δράσης της πρωτείνης bcl-2, αλλά και άλλων μελών της ομάδας bcl-2, για την υπερκέραση της κυτταροπροστατευτικής δράσης της υπερέκφρασης του bcl-2 στους χημειο-ανθεκτικούς καρκίνους. Στον καρκίνο του λάρυγγα, παρόλο που έχει αναφερθεί διαταραχή της έκφρασης αυτής της ομάδας πρωτεινών, δεν έχει διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Η μελλοντική λοιπόν ερευνητική προσέγγιση, στην προγνωστική αξία της διαταραχής της έκφρασης ρυθμιστών του κυτταρικού θανάτου σε σχέση με την έκβαση της χημειοθεραπείας, είναι εκ των ων ουκ άνευ.

Αλλά και η ακτινοβολία αυξάνει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Και συνεπώς, η μετάλλαξη ρυθμιστών της απόπτωσης δυνατόν να συνδέεται με ακτινοαντοχή. Για παράδειγμα, το γονίδιο p53 θεωρείται ότι προωθεί την απόπτωση κατά την καταστροφή του DNA λόγω ιονίζουσας ακτινοβολίας. Συνεπώς, όγκοι με μετάλλαξη στο p53 εμφανίζονται λιγότερο ευαίσθητοι στην ακτινοθεραπεία. Έτσι, έχει αναφερθεί η χρήση του p53 ως προγνωστικός δείκτης για την έκβαση της ακτινοβολίας σε ΚΠΕΤΧ. Επίσης, φαίνεται ότι ενώ η υπερέκφραση του p53 σχετίζεται με ελαττωμένη επιβίωση σε περιπτώσεις ΚΠΕΤΧ, το bcl-2 δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόγνωση.

Πάντως, η ανίχνευση της p53 με ανοσοχημικά μέσα έχει τους περιορισμούς της. Για παράδειγμα, η τεχνική αυτή δε διαφέρει απαραίτητα μεταξύ μεταλλαγμένων (μη λειτουργικών) και φυσικών (wild-type) λειτουργικών πρωτεϊνών. Η ανίχνευση της μετάλλαξης με PCR είναι και ακριβή και χρονοβόρα. Επειδή έχει δειχτεί ότι οι μεταλλάξεις στην p53 συμβάλουν στη συνάθροιση της πρωτείνης, η παρουσία αυξημένων επιπέδων της πρωτείνης που ανιχνεύονται με ανοσοιστοχημική ανάλυση μεταφράζεται ως συνώνυμη με μετάλλαξη στο γονίδιο. Πάντως, πρόσφατη εργασία (που δημοσιεύεται στους Prives έχει δείξει ότι αυξημένα επίπεδα p53 δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα μεταλλάξεις στο γονίδιο p53, αλλά αντίθετα σε άλλες σχετιζόμενες πρωτείνες. Δεύτερον, ακόμη και αυξημένη έκφραση αυτού του ρυθμιστή κυτταρικού θανάτου στη φυσική του μορφή μπορεί να μην είναι ικανή να ξεπεράσει τα αποτελέσματα της ελαττωματικής έκφρασης άλλων μελών του μονοπατιού του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου όπως η bcl-2 και η caspase. Αυτός ο πλεονασμός στη μηχανή κυτταρικού θανάτου έχει δειχτεί in vitro σε καρκινικές κυτταρικές σειρές κεφαλής και τραχήλου. Πάντως μια βασική γνώση του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου είναι απαραίτητη για το σωστό διάβασμα τέτοιας βιβλιογραφίας.

5.10. Συμπεράσματα

Η απόπτωση αντιπροσωπεύει μία αρκετά διατηρημένη μέθοδο με την οποία μη επιθυμητά ή μη χρήσιμα κύτταρα απορρίπτονται αποτελεσματικά από πολυκύτταρους οργανισμούς. Η απόπτωση παίζει ένα καίριο ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη όλων των πολυκύτταρων οργανισμών και είναι αρκετά υπεύθυνη για την ομοιόσταση των κυτταρικών πληθυσμών στους ενήλικες οργανισμούς. Αποδιοργάνωση της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη απώλεια κυττάρων, όπως στην απώλεια των κεντρικών ακουστικών νευρώνων σε απότομης έναρξης απώλεια ακοής στους ανθρώπους ή να οδηγήσει σε συνάθροιση κυττάρων όπως σε διάφορες νεοπλασίες, περιλαμβανομένων καρκίνων κεφαλής και τραχήλου. Μια καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε διεργασίες που αποσκοπούν στην πρόληψη του κυτταρικού θανάτου στις περιπτώσεις που είναι υπέρμετρες ή στην επιταχυνσή του στις περιπτώσεις νεοπλαστικών κυτταρικών συναθροίσεων.

Προσπαθήσαμε να δώσουμε μία σύντομη σύνοψη της τρέχουσας κατάστασης της γνώσης στη μελέτη της απόπτωσης με ένα τρόπο που είναι χρήσιμος στην ΩΡΛ, περιλαμβανομένων και αυτών με κλινικό ενδιαφέρον και αυτών που ασχολούνται με βασικές επιστήμες. Ελπίζουμε ότι παρείχαμε πληροφορίες για τη δυνατή κλινική αξιοποίηση αυτών των πληροφοριών. Μόνο συνεχίζοντας να ανανεώνουμε τις αποθήκες της γνώσης μας μπορούμε να κρατήσουμε επαφή με την πρόοδο στη βασική κυτταρική επιστήμη και στη χρήση της προς όφελος των ασθενών.

6. Βιβλιογραφία

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science, 281:1322-1326, 1998.

2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell, ed 3.New York, Garland Publishing, pp 1255-1291, 1994.Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science, 281:1305-1308, 1998.

3. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter] Cell, 87:171, 1996.

4. Atula S, Grenmam R, Laippala P, et al: Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity? Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122:1313-1319, 1996.

5. Bakshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas:clustering around JH on chromosome 14 and neara transcriptional unit on18.Cell, 41:899-906, 1985.

6. Batsakis JG: Tumors of the head and neck, ed 2. Baltimore, Williams &Wilkins, 1979, pp121-129.

7. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, et al. Multiple head and neck tumors: Evidence for a common clonal origin. Cancer Res 56:2484-2487, 1996.

8. Biennan JA, Mao L, Hruban RH et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 332:429-435, 1995.

9. Björlin G, Ljungér H, Wennerberg J, Astedt B. Plasminogen activators in human xenografted oropharyngeal squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol (Stockh), 104:568-572, 1987.

10. Boise LH, Gonzalez-Gracia M, Postema CE, et al. bcl-x abcl-2 related gene that functionsas a dominant regulator of apoptotic cell death.Cell, 74:597-608, 1993.

11. Bosman FT, Havenith MG, Visser R, Cleutjens JPM. Basement membranes in neoplasia. Prog Histochem Cytochem, 24:1-92, 1992.

12. Boyd D. Invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev, 15:77-89, 1996.

13. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 332:429-435, 1995.

14. Byers RM. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. Am J Surg 130:475-478, 1975.

15. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field carcerization. Cancer Res 56:2488-2492, 1996.

16. Carter RL, Burman JF, Barr L, et al. Immunohistochemical localization of basement membrane type VI collagen in invasive and metastatic squamous carcinomas of the head and neck. J Pathol 147:159-164, 1985.

17. Castronovo V. Laminin receptors and laminin- binding proteins during tumor invasion and metastasis. Invasion Metastasis, 13:1-30, 1993.

18. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. J Natl Cancer Inst, 89:1260-1270, 1997.

19. Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol, 106:271-278, 1997.

20. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, et al. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous –cell carcinoma of the head and neck. Int J Cancer 84:220-224, 1999.

21. Chinnayian AM, O'Rourke K, Lane Br, Dixit VM. Interaction of ced-4 with ced-3 and ced-9: a molecular framework for cell death.Science, 275:1122-1126, 1997.

22. Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, et al. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer res 53:1676-1683, 1993.

23. Clayman GL, Liu TJ, Overholt SM et al. Gene therapy for head and neck cancer. Compairing the tumor suppressor gene p53 and a cycle cell regulator WAF1/QPI (p21) Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 122:489-493, 1996.

24. Clayman G, Wang SW, Nicolson GL, Naggar A, Mazar A, Henkin J, Blasi F, Goepfert H, Boyd DD. Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Int J Cancer, 54:73-80, 1993.

25. Cohen RF, Contrino J, Spiro JD, et al. Interleukin-8 expression by head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121:202-209, 1995.

26. Cordon-Cardo C: Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. Am J Pathol 147:545-560, 1995.

27. Counter CM, Hahn WC, Wei W, et al. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. Proc Natl Acad Sci USA 95:14723-14728, 1998.

28. Cusumano RJ, Persky MS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. Head Neck 10:229-234, 1988.

29. Deiry WS. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. Curr Opin Oncol 9:79-87, 1997.

30. Ellis PA, Smith IE, Detre S, et al. Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following postoperative chemotherapy. Breast Cancer Res Treat, 48:107-116, 1998.

31. Erber R, Klein W, Andl T, et al. Aberrant p21 (CIP1/WAF1) protein accumulation in head and neck cancer. Int J Cancer 74:383-389, 1997.
32. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-767, 1990.
33. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms: Origin and implications. Science, 217:998-1003, 1982.
34. Fidler IJ, Kuman R, Bielenberg DR, et al. Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis. Cancer J 4:S58-S66, 1998.
35. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. Oral Oncol 35:375-378, 1999.
36. Fischer DE. Apoptosis in cancer therapy. Crossing the threshold. Cell, 78:539-542, 1994.

37. Folkman J. Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol 12:441-443, 1994.
38. Folkman J. Editorial. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 82:4-6, 1990.

39. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol 3:65-71, 1992.

40. Franceeschi S, Munoz N, Bosch XF, et al. Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract: A review of epidemiological and experimental evidence. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5:567-575, 1996.
41. Fujieda S, Sunaga H, Tsuzuki H, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in oral and oropharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 4:1583-1590, 1998.
42. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: Are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? Curr Opin Oncol 11:191-199, 1999.
43. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 92:709-720, 2000.
44. Gleich LL, Li YQ, Biddinger PW, et al. The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 suppressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. Laryngoscope, 106:1378-1381, 1996.

45. Golstein P. Controlling cell death. Science 275:1081-1082, 1997.

46. Grandis JR, Tweardy DJ. The role of peptide growth factors in head and neck carcinoma. Otolaryngol Clin North Am 25:1105-1115, 1992.
47. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res 53:3579-3584, 1993.
48. Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, et al. Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. J Cell Biochem 69:55-62, 1998.
49. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature 400:464-468, 1999.
50. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70, 2000.
51. Hanna E, Zhang X, Woodlis J, et al. Intramuscular electroporation delivery of IL-12 gene for treatment of squamous cell carcinoma located at distant site. Cancer Gene Ther 8:151-157, 2001.

52. Hasina R, Matsumoto K, Matsumoto-Taniura N, et al. Autocrine and paracrine motility factors and their involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. Br J Cancer 80:1708-1717, 1999.

53. Hedge PU, Brenski AC, Caldarelli DD, Hutchinson J, Panje WR, Wood NB, Le HD, Taylor SG IV, Caldarelli L, Coon JS. Tumor angiogenesis and p53 mutations. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 124:80-85, 1998.

54. Hengartner MO, Horvitz HR. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. Cell, 76:665-676, 1994.

55. Hernandez-Alcoceba R, del Peso L, Lacal JC. The Ras family of GTPases in cancer cell invasion. Cell Mol Life Sci 57:65-76, 2000.

56. Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 279:300-307, 1998.

57. Hirota J, Yoneda K, Osaki T. Basement membrane type IV collagen in oral squamous cell carcinoma. Head Neck 12:400-405, 1990.

58. Hockebery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. J Cell Sci Suppl 18:51-55, 1994.

59. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Hariis CC. p53 mutations in human cancers. Science 253:49-53, 1991.

60. Hooper ML. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. J Cell Sci Suppl 18:13-17, 1994.

61. Jang SJ, Chiba I, Hirai A, et al. Multiple oral squamous epithelial lesions. Are they genetically related? Oncogene 20:2235-2242, 2001.

62. Jiang W, Hiscox S, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor /scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. Crit Rev Oncol Hematol 29:209-248, 1999.

63. Jones J, Sugiyama M, Speight PM, et al. Restoration of alpha v beta 5 integrin expression in neoplastic keratinocytes results in increased capacity for terminal differentiation and suppression of anchorage-independent growth. Oncogene 12:119-126, 1996.

64. Juarez J, Clayman G, Nakajima M, Tanabe KK, Saya H, Nicolson GL, Boyd D. Role and regulation of expression of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) in two invasive squamous-cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. Int J Cancer 55:10-18, 1993.

65. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Br J Cancer 26:239-257, 1972.

66. Kimmel KA, Carey TE. Altered expression in squamous cell carcinoma of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. Cancer Res 46:3614-3623, 1986.

67. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis Science 275:1132-1136, 1997.

68. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci 90:10914-10921, 1993.

69. Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 68:820-823, 1971.

70. Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in non smokers: A distinct clinical and molecular entity. Laryngoscope 109:1544-1551, 1999.

71. Kumagai S, Kojima S, Imai K, Nakagawa K, Yamamoto E, Kawahara E, Nakanishi I. Immunohistologic distribution of basement membrane in oral squamous cell carcinoma. Head Neck 16:51-57, 1994.

72. Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M. Productiion of matrix matalloproteinase 2 (gelatinase/type IV collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured oral squamous cell carcinoma. J Oral Path Med 21:221-224, 1992.

73. Lane D. p53, guardian of the genome. Nature 358: 15-16, 1992.

74. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. Curr Opin Cell Biol 12:634-640, 2000.

75. Levine AJ, Chang A, Dittmer D, et al. The p53 tumour suppressor gene. J Lab Clin Med 123:817-822, 1994.

76. Levine AJ, Nomand J, Finley CA. The p53 tumor suppressor gene. Nature 351:453-456, 1991.

77. Li S, Zhang X, Xia X, et al. Intramuscular electroporation delivery of IFN-alpha gene therapy for inhibition of tumour growth located at distant site. Gene Ther 8:400-407, 2001.

78. Lingen MW, Chang KW, McMurray SJ, et al. Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factors is not associated with mutations in exons 5-9. Head Neck 22:328-335, 2000.

79. Liotta LA. Cancer invasion and metastasis. Sci Am 266:54-59, 1992.

80. Liotta L: Tumour invasion and metastasis. Role of the extracellular matrix. Cancer Res 46:1-7, 1986.

81. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, et al. Beta- and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinomas. Anticancer Res 19:3817-3826, 1999.

82. Lowe SW, Scmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 362:847-849, 1993.

83. Markus G. The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. A review of recent literature. Enzyme 40:158-172, 1988.

84. Matrisian LM, McDonnel S, Miller DB, Navre M, Seftor EA, Hendrix MJ. The role of the matrix metalloproteinase stromelysin in the progression of squamous cell carcinomas. Am J Med Sci 302:151-162, 1991.

85. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. Int J Cancer 55:580-585, 1993.

86. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. Cell 57:79-88, 1989.

87. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t (14; 18). Nature 349:254-256, 1991.

88. Muller D, Breathnach R, Engelmann A, Millon R, Bronner G, Flesch H, Dumont P, Eber M, Abecassis J. Expression of collafenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumors. Int J Cancer 48:550-556, 1991.

89. Muller D, Wolf C, Abecassis J, Millon R, Engelmann A, Bronner G, Rouyer N, Rio MC, Eber M, Methlin G, et al. Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Res 53:165-169, 1993.

90. Myers EN, Fagan JJ. Management of the neck in cancer of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol, 828-832, 1999.

91. Myers JN. Molecular pathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck; in Myers EN, Suen JY (eds): Cancer of the Head and Neck, ed 3. Philadelphia, Saunders, pp 5-16, 1996.

92. Myers JN, Elkins T, Roberts D, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: Increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. Otolaryngol Head Neck Surg 122:44-51, 2000.

93. Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, et al. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). J Oral Pathol Med 23:451-456, 1994.

94. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, et al. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 54:1152-1155, 1994.

95. Noguchi M, Kohama G, Hiratshuka H, Sekiguchi T. Clinical significance of laminin deposition and T-cell infiltration in oral cancer. Head Neck 15:125-132, 1993.

96. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194:23-28, 1976.

97. O-Charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, et al. Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. Cancer Res 60:1121-1128, 2000.

98. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homologue, BAX that accelerates programmed cell death. Cell 74:609-619, 1993.

99. Park JR, Hockenbery DM. Bbcl-2, a novel regulator of apoptosis Cell Biochem 60:12-17, 1996.

100. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, et al. Field cancerization of the oral cavity: Comparison of the spectrum of molecular alterations in cases presenting with both dysplastic and malignant lesions. Oral Oncol 33:332-337, 1997.

101. Petruzzelli GJ. Tumor angiogenesis. Head Neck 18:283-291, 1996.

102. Polette M, Clavel C, Muller D, Abecassis J, Binninger I, Birembaut P. Detection of mRNAs encoding collagenase I and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization. Invasion Metastasis 11:76-83, 1991.

103. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Voogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature 389:300-305, 1997.

104. Presta M, Rifkin DB. New aspects of blood vessel growth: Tumor and tissue-derived angiogenesis factors. Haemostasis 18:6-17, 1988.

105. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM-p53 circuit. Cell 95:5-8, 1998.

106. Ravi D, Ramadas K, Matthew BS, et al. De novo programmed cell death in oral cancer. Histopathology 34:241-249, 1999.

107. Rayband-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Tetu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. J Clin Oncol 15:1030-1038, 1997.

108. Reed JC. Cytochrome c. can't live with it-can't live without it. Cell 91:559-662, 1997.

109. Reed JC. Bcl-2 family proteins. regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. Semin Hematol 34:9-19, 1997.

110. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. Mol Cancinog 7:139-146, 1993.

111. Sakamoto N, Iwahana M, Tanaka NG, Osada Y. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDPGYIGSR-NH_2. Cancer Res 51:903-906, 1991.

112. Sakr WA, Zarbo RJ, Jacobs JR, et al. Distribution of basement membrane in squamous cell carcinoma of the head and neck. Hum Pathol 18: 1043-1050, 1987.

113. Salo A, Servomaa K, Kiuru A, et al. The bcl-2 gene status of human head and neck cancer cell lines. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 8:197-213, 1997.

114. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, et al. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. JAMA 262:3313-3315, 1989.

115. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366: 704-707, 1993.

116. Seto M, Jaeger U, Hockett RD, et al. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the bcl-2-lg fusion gene in lymphoma. EMBO J 7:123-131, 1988.

117. Shibata T, Kawano T, Nagayasu H, et al. Enhancing effects of epidermal growth factor on human squamous cell carcinoma motility and matrix degradation but not growth. Tumour Biol 17:168-175, 1996.

118. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: Clinical implications of multicentric origin. Cancer 6:963-968, 1953.

119. Smith BD, Smith GL, Carter D, et al: Prognostic significance of vascular endotheliar growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 18:2046-2052, 2000.

120. Somers KD, Schecter GL. Genetic alterations in head and neck cancer. Otolaryngol Clin North Am 25:1065-1071, 1992.

121. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122:627-632, 1996.

122. Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. Br J Surg 85:1460-1467, 1998.

123. Stetler-Stevenson WG, Asnavoorian S, Liotta LA. Tumour cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 9:541-573, 1993.

124. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCCI in squamous cell carcinoma of head and neck. Carcinogenesis 20:2125-2129, 1999.

125. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VMM, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: Biological and clinical implications. Clin Cancer Res 7:1523-1532, 2001.

126. Taitz A, Petruzzelli GJ, Lozano Y, Shankar R, Young MRI. Bi-directional stimulation of adherence to extracellular matrix components by human head and neck squamous carcinoma cells and endothelial cells. Cancer Lett 96:253-260, 1995.

127. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462, 1995.

128. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18)chromosome translocation. Science 226.1097-1099, 1984.

129. Tu Y, Xu FH, Liu J, et al. Upregulated expression of bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide. Blood 88:1805-1812, 1996.

130. Turkson J, Jove R: STAT proteins: Novel molecular targets for cancer drug discovery. Oncogene 19:6613-6626, 2000.

131. Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, et al. Role of HGF/e-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. Int J Cancer 93:489-496, 2001.

132. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.Nature 335:440, 1988.

133. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends Genet 9:138-141, 1993.

134. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. Cancer Res 54:1156-1158, 1994.

135. van Oijen MG, Leppers Vd, Straat FG, Tilanus MG, et al. The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract. Cancer 88:884-893, 2000.

136. van Waes C, Carey TE. Over expression of the A9 antigen/ α6-β4 integrin in head and neck cancer. Otolaryngol Clin North Am 25:1117-1139, 1992.

137. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. Science 258:1955-1957, 1992.

138. Visser R, Beek JMH, Havenith MG, et al. Immunocytochemical detection of basement membrane antigens in the histopathological evaluation of laryngeal dysplasis and neoplasia. Histopathology 10:171-180, 1986.

139. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, et al. Head and neck cancer. N Engl J Med 328:184-194, 1993.

140. Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, et al. Mutagen sensitivity to benzo(o)pyrene diol epoxide and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res 4:1773-1778, 1998.

141. Wetzels RHW, van der Velden L-A, Schaafsm HE, et al. Immunohistochemical localization of basement membrane type VII collagen and laminin in neoplasms of head and neck. Histopathology 21:359-464, 1992.

142. Whisler LC, Wood NB, Caldarelli DD, et al. Regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the larynx. Laryngoscope 108:630-638, 1998.

143. Wolf GT, Carey TE, Schmaltz SP, Mc Clatchey KD, Poore J, Glasser L, Hayashida DJ, Hsu S. Altered antigen expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Natl Cancer Inst 82:1566-1572, 1990.

144. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. Cancer 80 (suppl):1529-1537, 1997.

145. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, et al. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. Cancer 83:204-212, 1998.

146. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. BAD a heterodimeric partnerfor bcl-XL and bcl-2 displaces BAX and promotes cell death. Cell 80:285-291, 1995.

147. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 275:1129-1132, 1997.

148. Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, et al. Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. Cell Res 54: 4603-4606, 1994.

149. Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Murono S, Fukukawa M, Park CS, Seiki M. Increased expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. Cancer 79:139-144, 1997.

150. Yuan J. Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. J Cell Biochem 60:4-11, 1996.

151. Zhang LF, Hemminki K, Szyfter K, Szyfter W, Soderkvist P. p53 mutations in larynx cancer. Carcinogenesis 15:2949-2951, 1994.

152. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschag A, WangX. Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans ced4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 75:641-652, 1993.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΣΤΟΧΟΙ, ΣΚΟΠΟΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Το βασικό πρόβλημα, που υφίσταται κατά την απεικονιστική κλινική διάγνωση των κακοηθών και προκαρκινικών επιθηλιακών βλαβών, έγκειται κυρίως στο γεγονός, ότι οι μεταβολικές και δομικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου, δεν διαφέρουν σημαντικά και δεν παρουσιάζουν ιδιαιτερότητα στην χρωματική απεικόνιση σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς.

Προκειμένου να επιτευχθεί ακριβής διάγνωση, τμήματα ιστού λαμβάνονται για βιοψία και υποβάλλονται σε ιστολογική εξέταση. Παρά το ότι η μέθοδος αυτή αποτελεί την καθιερωμένη μέθοδο για την διάγνωση των ιστών, είναι ευρέως γνωστό ότι είναι ποιοτική και υποκειμενική, ενώ υπόκεινται σε αρκετούς περιορισμούς και μειονεκτήματα, όπως η επιλογή του δείγματος και τα λάθη στην ανάγνωση. Αυτοί οι περιορισμοί ενισχύουν την ανάγκη για την ανάπτυξη ενός νέου και πιο αποτελεσματικού διαγνωστικού συστήματος. Για το σκοπό αυτό, τελικά, έχουν προταθεί ένα πλήθος από φασματοσκοπικές μεθόδους, στην προσπάθεια να εντοπιστούν αλλαγές στην μοριακή βιοχημεία και την αρχιτεκτονική των ιστών, που να συνδέονται με την ανάπτυξη της νόσου. Εκτεταμένες μελέτες σε διάφορα όργανα έχουν δείξει, ότι οι ιστικές ανωμαλίες δυνατόν να εντοπίζονται σε διαφορετικές φασματικές περιοχές, επιτρέποντας την έγκαιρη ανίχνευση και τον ποιοτικό διαχωρισμό της περιοχής, χωρίς να απαιτείται αφαίρεση ιστού. Οι επιστήμες υγείας προωθούν σήμερα την ανάπτυξη οργάνων ανάλυσης του χωρικού φάσματος (spatially resolved spectral-acquisition instruments), από τη στιγμή που διαπιστώθηκε ότι οι ανθρώπινοι ιστοί είναι ετερογενείς. Το Ύπερ- και Πόλυ-φασματικό σύστημα απεικόνισης είναι ικανό να καταγράψει φωτεινή ένταση ως συνάρτηση του μήκους κύματος και της θέσης. Στην απεικόνιση, η πληροφορία περιλαμβάνει μια πλήρη εικόνα σε καθένα μήκος κύματος, από ένα ευρύ φάσμα. Στην φασματοσκοπία μπορεί να καταγραφεί ένα πλήρως αναλυόμενο φάσμα, σε κάθε εικονοστοιχείο (pixel). Επίσης, είναι δυνατό να επιτευχθεί ικανοποιητικός χρόνος ανάλυσης της φασματικής απεικόνισης, από τη στιγμή που η σάρωση γίνεται επιλεκτικά. Αρκετές μελέτες σήμερα, στρέφουν την προσοχή τους στο να καθορίσουν τα φασματικά χαρακτηριστικά των ιστικών περιοχών, γεγονός που πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων και μπορεί να θέσει τις βάσεις για την ανάπτυξη διαγνωστικών απεικονιστικών συστημάτων νέας γενιάς.

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης, στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και LASER του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), αναπτύχθηκε μία συγκεκριμένη συλλογιστική. Απώτερος σκοπός μας ήταν η προσαρμογή της ανάπτυξης του εν λόγω συστήματος, για την ανίχνευση των αλλοιώσεων των βλεννογόνων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Αλλοιώσεις που σχετίζονταν κυρίως με καρκινικές και προκαρκινικές βλάβες.

Το ζητούμενο ήταν όχι μόνον η κατασκευή και ανάπτυξη μιας δεδομένης συνδεσμολογίας, που θα αποτελούσε καθημερινό εργαλείο στον κλινικό ιατρό. Ήταν και η επίλυση δεκάδων ερωτημάτων που καθημερινά προέκυπταν, ερωτημάτων των οποίων η απάντηση-λύση, δεν ήταν απλώς και μόνον σχέση αιτίου-αποτελέσματος. Ερωτήματα που κυρίως εμφανίζονταν λόγω της αναγκαίας περιγραφής ενός συγκεκριμένου μηχανισμού. Η περιγραφή του μηχανισμού ενός φαινομένου είναι η διαδικασία εκείνη, που διαχωρίζει την έννοια της απλής παρατήρησης και περιγραφής αυτού, από την έννοια της κατανόησης. Η δε κατανόηση ενός μηχανισμού, όταν πρόκειται –όπως στην περίπτωσή μας- να συνδυαστεί με την κλινική εφαρμογή μίας καινοτόμου μεθόδου, που εμπεριέχει την ανάπτυξη νεοεισαχθέντων συστημάτων, έχει και πρόσθετες απαιτήσεις. Απαιτήσεις που συνδέονται κυρίως με την αξιοπιστία της προτεινόμενης μεθόδου. Η αξιοπιστία δε μιας

διαγνωστικής μεθόδου, ταυτίζεται με την ικανότητα επαναληψιμότητας των μετρήσεων, την καταγραφή της ευαισθησίας και της ειδικότητος, αλλά επίσης και με πιο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Στην περίπτωσή μας αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν να κάνουν με την περιγραφή και απεικόνιση καθαρά δυναμικών φαινομένων, μεταβολών δηλαδή που εξελίσσονται σε πολύ μικρό χρόνο ενώ ταυτόχρονα καταγράφονται σε αληθινό χρόνο. Έχουν επιπροσθέτως να κάνουν με απεικόνιση που δεν προυποθέτει επαφή με τον υπό εξέταση ιστό, απεικόνιση που σε πολλές φορές υποβοηθείται με την χρήση διαφόρων ουσιών-δεικτών (markers) ή ακόμα και με απεικόνιση σε διάφορα μήκη κύματος.

Έτσι, αρχικά μελετήσαμε τις δυνατότητες του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης στο πεδίο των διαταραχών αιμάτωσης του ρινικού βλεννογόνου. Για πρώτη φορά στην σύγχρονη βιβλιογραφία έγινε αντικειμενική καταγραφή του δυναμικού φαινομένου που σχετίζεται με την μεταβολή της αιμάτωσης του ρινικού βλεννογόνου. Εμείς πολύ απλά, χρησιμοποιήσαμε μία αγγειοσυσπαστική ουσία που χρησιμοποιείται σε καθημερινή βάση από χιλιάδες Ωτορινολαρυγγολόγους, την υδροχλωρική ξυλομεθαζολίνη. Σκοπός μας ήταν να δούμε αν μπορούμε μέσω μη επεμβατικής απεικόνισης να καταγράψουμε την μεταβολή της αιμάτωσης του βλεννογόνου που προκαλείται από την τοπική εφαρμογή της ουσίας. Διαλέξαμε τον ρινικό βλεννογόνο ως αρχικό μας πείραμα, λόγω της ευκολίας πρόσβασης, αλλά και γενικότερα λόγω της απλότητος του κλινικού μέρους του πειράματος, δεδομένου του γεγονότος, ότι ήταν γνωστό το μακροσκοπικό αποτέλεσμα, δηλαδή η αγγειοσυστολή-αγγειοσύσπαση του βλεννογόνου. Το ζητούμενο ήταν η περιγραφή του μηχανισμού αγγειοσύσπασης, μέσω της απεικόνισης, αλλά και η αξιολόγηση της αξιοπιστίας της μεθόδου σύμφωνα με τα κριτήρια που προαναφέρθησαν.

Η επιτυχία μας ήταν ταυτόχρονα και η διαβεβαίωση ότι η μέθοδος θα μπορούσε να δουλέψει και σε άλλους βλεννογόνους της τραχηλοπροσωπικής χώρας, που είναι πιο δύσκολα προσβάσιμοι, όπως αυτοί του στοματοφάρυγγα ή του λάρυγγα. Το μεγάλο ερώτημα ήταν όχι μόνον το αν η μέθοδος μας μπορούσε να εφαρμοστεί στην καταγραφή των μεταβολών αιμάτωσης του βλεννογόνου, αλλά για το αν θα μπορούσε να καταγράψει αξιόπιστα ένα τόσο δυναμικό φαινόμενο, σε πραγματικό χρόνο. Και αυτό το τελευταίο, θα μας επέτρεπε αργότερα να περιγράψουμε και να καταγράψουμε άλλα πιο σύνθετα και ταυτόχρονα πιο δυναμικά φαινόμενα, όπως αυτά που συνοδεύονται με την εφαρμογή του οξικού οξέος σε ύποπτες για κακοήθεια περιοχές του λάρυγγα.

Όμως, ή μη επεμβατική, αντικειμενική καταγραφή των μεταβολών αιμάτωσης ενός βλεννογόνου αποτελεί από μόνη της ένα σπουδαίο ερευνητικό εργαλείο. Θα μπορούσε για παράδειγμα, να συσχετισθεί με την διάγνωση διαφόρων παθήσεων, όπως η αλλεργική ή η αγγειοκινητική ρινίτιδα ή η χρόνια παραρρινικολπίτιδα. Σε άλλες κλινικές ειδικότητες θα μπορούσε, για παράδειγμα, να εφαρμοστεί στην μελέτη διαφόρων φλεγμονωδών νόσων του πεπτικού συστήματος ή στην μελέτη και ταυτοποίηση των αιμαγγειωμάτων ή των αρτηριοφλεβικών ανωμαλιών. Θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση της βιωσιμότητος των διαφόρων κρημνών ή στην μελέτη φαινομένων όπως το φαινόμενο Reynaud. Και σαφέστατα, θα μπορούσε, με σχετική μάλιστα ευκολία, να χρησιμοποιηθεί στην μελέτη της κινητικής και της επάρκειας ή ανεπάρκειας διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών, με ότι αυτό συνεπάγεται. Παράδειγμα τέτοιων φαρμάκων είναι τα ενδορρινικά στεροειδή και τα αντισταμινικά, που ενώ κυκλοφορούν σε εκατομμύρια κομμάτια παγκοσμίως, αξιολογούνται -κλινικά- στην διεθνή βιβλιογραφία μόνον ποιοτικά και όχι αντικειμενικά.

Στην προσπάθειά μας να εξασφαλίσουμε την αξιοπιστία του συστήματός μας στην καταγραφή πιο πολύπλοκων δυναμικών φαινομένων, επιλέξαμε ακολούθως την εφαρμογή του στην μελέτη ενός άλλου μοντέλου. Επιλέξαμε την μελέτη του Prick Puncture Test (δοκιμασία νηγμού δια βελόνης-PPT), που σχετίζεται με μια διαδικασία που εμπλέκει όχι

μόνον τοπικούς μηχανισμούς δράσης, αλλά και μηχανισμούς που εμπλέκουν την κεντρική δραστηριότητα του ανθρώπινου οργανισμού. Το PPT, αν και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο test για την εκτίμηση της αλλεργίας σε παγκόσμιο επίπεδο, στερείται αντικειμενικής καταγραφής, μια που το αποτέλεσμα της δράσης διάφορων αλλεργιογόνων στον καρπό του ασθενούς εκτιμάται μόνον με το ανθρώπινο μάτι. Επιπροσθέτως είναι επιστημονικά αξιον απορίας το ότι ένα τόσο δυναμικό φαινόμενο εκτιμάται μόνον στατικά, σε καποια στιγμή περίπου δεκαπέντε λεπτά μετά την εφαρμογή των αλλεργιογόνων. Πιο συγκεκριμένα εκτιμάται μόνον το μέγεθος του προκαλούμενου πομφού, αγνοώντας εν πολλοίς το σπουδαίο, κεντρικής αιτιολογίας συνοδου φαινομένου της ανάπτυξης του ερυθήματος.

Η επιτυχής καταγραφή αυτού του φαινομένου και η συσχέτισή του με την εν γένει ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς ήταν μια επιστημονική πρόκληση. Πιστεύουμε ότι με την εργασία που παρουσιάζουμε έχει ανοίξει ο δρόμος προς αυτήν την κατεύθυνση, ενώ ταυτόχρονα, πλήθος άλλων συνοδών ερωτημάτων μένουν προς διερεύνηση. Ερωτήματα όπως αυτό της χρήσης της πολυφασματικής απεικόνισης στην παρακολούθηση της εφαρμοσμένης χημειοθεραπείας, αλλά και της απάντησης του κάθε οργανισμού σε αυτή σε περιπτώσεις όχι μόνον κακοηθειών της τραχηλοπροσωπικής χώρας, αλλά και σε άλλες. Και στην περίπτωση της καταγραφής του PPT, η αξιολόγηση διάφορων φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι μια πρόκληση. Και μιλάμε βεβαίως για τα διάφορα αντιαλλεργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα. Πρωτίστως όμως είναι πολύ σημαντική η ίδια η ερμηνεία του PPT, που με την μέθοδό μας γίνεται πλέον απόλυτα αντικειμενική.

Ένας άλλος τομέας που κατόπιν στρέψαμε την προσοχή μας ήταν η επιλογή του τρόπου απεικονισης. Το εάν δηλαδή θα μπορούσαμε να απεικονίσουμε μία περιοχή, σε προεπιλεγμένες συνθήκες. Συνθήκες που θα καθορίζονταν από τα γνωστά εκ των προτέρων ιστικά χαρακτηριστικά του δήγματος. Ομιλούμε δηλαδή για την δυνατότητα επιλεκτικής απεικόνισης, σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, αρκετές φορές δε σε περιοχές έξω από το ορατό φάσμα. Το όλο εγχείρημα περιελάμβανε μία σειρά πειραμάτων, σχετικά με την προσπάθεια διαφανοσκόπησης της τυμπανικής μεμβράνης. Απάλειψη δηλαδή από την απεικόνιση, του σήματος εκείνου που σχετίζεται με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού της τυμπανικής μεμβράνης, ήδη προανιχνευθέντα, με συνοδό απεικόνιση του μέσου ωτός σε προεπιλεγμένο μήκος κύματος του μη ορατού φάσματος. Η σημασία του συγκεκριμένου πειράματος έγκειται στο γεγονός της αξιοποίησης της πολυφασματικής απεικόνισης, για καταγραφή φαινομένων σε μη ορατές με το ανθρώπινο μάτι περιοχές. Απεικόνιση που βασίζεται στην εκμετάλευση της γνώσης μιας δεδομένης ιστολογίας. Αυτός άλλωστε ήταν και ο λόγος της επιλογής του ιστού της τυμπανικής μεμβράνης. Κι εδώ βεβαίως ανέκηψαν πλήθος ερευνητικών πεδίων, που μένουν προς διερεύνηση, όπως για παράδειγμα η μελέτη όλης της παθολογίας του μέσου ωτός. Και το αυτό τελευταίο συνδέεται βεβαίως με τον αντικειμενικό ιστικό χαρακτηρισμό διαφόρων νοσολογικών οντοτήτων.

Με δεδομένη την γνώση από τα τρία μεγάλα κλινικά πειράματα που προαναφέρθησαν, αλλά και με οδηγό την συνεχή αναπτυξη του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης, έχοντας τεκμηριώσει την αξιοπιστία της μεθόδου στην καταγραφή δυναμικών φαινομένων, προχωρήσαμε στο τέταρτο στάδιο της παρούσας εργασίας: στην μη επεμβατική ανίχνευση και ταυτοποίηση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων στην περιοχή του λάρυγγα. Ύστερα από μια μακροχρόνια μελέτη των ιδιαίτερων ιστικών χαρακτηριστικών των διαφόρων παθολογικών και μη, καταστάσεων του λάρυγγα, προχωρήσαμε στην επιλογή του τρόπου απεικόνισης. Αυτή ενέπλεκε και την χρησιμοποίηση ενός γνωστού από άλλες εφαρμογές δείκτη, του οξικού οξέος. Η μεγάλη δυσκολία του εγχειρήματος ήταν ότι η απεικόνιση του δυναμικού φαινομένου της

εφαρμογής του οξικού οξέος σε ιστούς διαφόρου παθολογίας ήταν πολύ γρήγορη, σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα. Σκοπός μας βέβαια ήταν αυτή η απεικόνιση να γίνεται σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας στον κλινικό ιατρό, τον άμεσο διεγχειρητικό χαρακτηρισμό των παθολογικών ή μη ιστών, με ότι αυτό συνεπάγεται. Παράλληλα στοχεύσαμε στην in vivo μελέτη της δυναμικής της αλληλεπίδρασης ιστού και δραστικών ουσιών (διάλυμα οξικού οξέος) με στόχο την εισαγωγή νέων διαγνωστικών κριτηρίων και μεθόδων για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε βέβαια σε αλλοιώσεις του λάρυγγα και της στοματικής κοιλότητας. Εδώ, επιπροσθέτως υπήρξε και μια ιδιαίτερη δυσκολία. Αυτή της μοριακής και κυτταρικής εξήγησης του φαινομένου της αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος, με τον δυσπλαστικό ή τον καρκινικό ιστό.

Είναι βέβαια σαφής η συνεχής αναδρομή σε δεδομένες γνώσης της φυσικής της Οπτικής, των μηχανισμών αλληλεπίδρασης του φωτός με τον ιστό, αλλά και με την ίδια την παθολογία του καρκίνου σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Εκ παραλλήλου, η εκμαίευση σύγχρονης γνώσης και η υιοθέτηση της ήταν μια συνεχής διαδικασία. Σκοπός μας άλλωστε, όπως προαναφέρθηκε, δεν ήταν απλώς η περιγραφή ενός φυσικού φαινομένου με σχέση αιτίου-αποτελέσματος, αλλά η ενδελεχής όσο το δυνατόν κατανόηση των συσχετιζόμενων μηχανισμών σε μοριακό επίπεδο.

Οι μελέτες έγιναν σε σημαντικό αριθμό ασθενών και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά τόσο σε κλινικό επίπεδο, όσο και σε βασικό επίπεδο κατανόησης μηχανισμών. Ταυτόχρονα τέθηκαν καινούργια ερωτήματα οριοθετώντας νέα πεδία έρευνας, η μελέτη των οποίων αποτελεί το ερέθισμα για περαιτέρω εις βάθος και πλάτος δραστηριότητα. Κατά την πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων, η απογοήτευση δεν ήταν κάτι σπάνιο. Πολλές φορές για παράδειγμα βρεθήκαμε να προσπαθούμε να αναπτύξουμε μία συγκεκριμένη συνδεσμολογία μηχανημάτων και απεικονιστικών συστημάτων, που τελικά απέβαινε ανεπαρκής. Πολλές φορές βρεθήκαμε προδωμένοι από την ανάπτυξη ενός λογισμικού κομματιού. Κι άλλες φορές βρεθήκαμε δέσμιοι της τελειότητος, που προσπαθώντας να την φτάσουμε υποεκτιμούσαμε τα όσα είχαμε επιτύχει. Και για αυτό τον λόγο, χωρίς πλέον να υποεκτιμούμε τα όσα έχουμε πετύχει, θεωρούμε ότι για το μέλλον, το παρόν πόνημα θα είναι απλώς μια αξιοπρεπής αρχή.

Β. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΙΚΗΣ ΠΑΡΟΧΗΣ ΤΟΥ ΡΙΝΙΚΟΥ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΥ ΜΕΣΩ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΕΝΔΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΟΠΙΣΘΟΣΚΕΔΑΖΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

1. Βασικές αρχές
2. Ασθενείς και μεθοδολογία
3. Ερμηνεία μετρήσεων
4. Βιβλιογραφία

1. Βασικές αρχές

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, δεν υπάρχει κανένας μέχρι στιγμής αντικειμενικός τρόπος προσέγγισης στην in vivo μέτρηση ποσοτικών παραμέτρων, συσχετιζόμενες με τις δυναμικές μεταβολές της μικροαιματώσεως του ρινικού βλεννογόνου, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στην καθημερινή κλινική πράξη, αυτές οι μεταβολές εκτιμώνται μόνον ποιοτικά, με την υποκειμενική -κατά εξεταστή- οπτική αξιολόγηση των χρωματικών μεταβολών του ρινικού βλεννογόνου. Η προαναφερθείσα εμπειρική διαδικασία στερείται αντικειμενικής αξιοπιστίας, αφού εξ ορισμού δεν περιέχει κάποιον ποσοτικό παράγοντα μέτρησης κι αφετέρου δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως βάση δεδομένων, για την δυνητική επαναληψημότητα και σύγκριση με μία επόμενη μέτρηση.

Η ερευνητική ομάδα του κ. Μπάλα στο Ινστιτούτο Έρευνας και Τεχνολογίας σε συνεργασία με την Ωτορινολαρυγγολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης έχει αναπτύξει ένα νέο σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. Το σύστημα συνδυάζει την απεικόνιση με την απόλυτη μέτρηση του χρώματος, παρέχοντας αντικειμενική, σε δύο διαστάσεις μέτρηση χρώματος και χρωματικών διαφορών. Το σύστημα, με την βοήθεια άκαμπτου ρινικού ενδοσκοπίου χρησιμοποιήθηκε στην εκτίμηση των αλλαγών του χρώματος του ρινικού βλεννογόνου, ύστερα από την χορήγηση ενδορινικού σπρέυ υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης, που αποτελεί συμπαθητικομιμητικό παράγοντα με αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες. Η άμεση απεικόνιση, σε σχέση με τον χρόνο, καθώς κι ο υψηλός βαθμός αξιοπιστίας των διαφόρων μετρήσεων, επιδεικνύει την επάρκεια του υπό περιγραφή συστήματος στην αξιολόγηση της δυνητικά υπάρχουσας αγγειοκινητικής ιδιότητος διαφόρων φαρμακευτικών παραγόντων. Ταυτόχρονα, γίνεται εμφανής η χρησιμότητά του στην κλινική μελέτη ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα, αγγειοκινητική ρινίτιδα, καθώς και φλεγμονωδών παθήσεων των παραρρινίων κόλπων. Ο συνδυασμός των δυνατοτήτων του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης μπορεί να προσφέρει σημαντικά στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας διαφόρων ιστικών αλλοιώσεων, καθώς και στην αντικειμενική εκτίμηση της ανταπόκρισης των ιστών, στους διαφόρους χορηγούμενους φαρμακευτικούς παράγοντες. Περαιτέρω, η δυνατότητα αντικειμενικής καταγραφής ενός δυναμικού φαινομένου και η συσχέτηση-ερμηνεία των συναφών κλινικών εικόνων αποτελεί χρήσιμη γνώση και εργαλείο στην προσπάθεια μελάτης πιο περίπλοκων φαινομένων. Φαινομένων που δεν αφορούν απλώς προσπάθεια ερμηνείας μιας μακροσκοπικά γνωστής κλινικής αλληλεπίδρασης ουσίας με ιστικό παρέγχυμα, αλλά φαινομένων άγνωστης αλληλεπίδρασης και δυναμικής ως προς τον χρόνο εκδήλωσης.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντικειμενική εκτίμηση και έλεγχο της ιστικής αιματικής παροχής χρησιμοποιώντας μια ειδικά εξελιγμένη ενδοσκοπική μέθοδο χρωματομετρικής απεικόνισης, η οποία επιτρέπει την ποσοτική χρωματική προτυποποίηση του οπισθο-σκεδαζόμενου φωτός κατά τη διάρκεια της ενδοσκοπήσεως των ρινικών κοιλοτήτων. Οι μεταβολές του ιστικού όγκου αίματος στον ρινικό βλεννογόνο, που προκαλείται από το ρινικό υγρό εναιώρημα (σπρέυ) υδροχλωρικής ξυλομεταζολίνης, εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο αυτή. Βρέθηκε ότι η ποσοτική απεικόνιση παρέχει ευαίσθητα, αναπαραγώγιμα, και αξιόπιστα μέσα για τον έλεγχο και τη χαρτογράφηση της ιστικής παροχής αίματος, ενώ είναι εύκολη στην καθημερινή χρήση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο κορεσμός του χρώματος μειώνεται με το χρόνο, αποτελώντας έτσι την πιο ευαίσθητη χρωματική παράμετρο στη διαδικασία της αγγειοσύσπασης. Φαίνεται ότι οι αντικειμενικοί δείκτες για τον χαρακτηρισμό του οπτικού ιστού και την ανάλυσή του μπορεί να είναι πολλά υποσχόμενοι για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ιστικών μεταβολών, αλλά και για την αντικειμενική εκτίμηση της ανταπόκρισής αυτών σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα.

2. Ασθενείς και μεθοδολογία

Η χρήση διαφόρων τύπων χρωματόμετρων, σε διάφορα ιατρικά πεδία έχει αποτελέσει κατά το παρελθόν τον μόνον τρόπο για ποσοτική αξιολόγηση των μεταβολών των χρωματικών αλλοιώσεων στους διάφορους ιστούς. Αυτά τα συστήματα, παρόλο που είναι αρκετά χρήσιμα σε αρκετές εφαρμογές έχουν το μεγάλο μειονέκτημα ότι δεν παρέχουν χωρική χρωματική πληροφορία. Μια άλλη αδυναμία των είναι το γεγονός, ότι επειδή το διάφραγμα του τελικού τους στειλεού πρέπει να εφάπτεται της υπό εξέτασης ιστικής περιοχής προκειμένου να χαρακτηρισθεί αυτή χρωματικά, είναι φανερό ότι υπάρχει μία άμεση μεταβολή αυτών των χαρακτηριστικών. Το τελευταίο αυτό μειονέκτημα είναι σχεδόν απαγορευτικό για την οποιαδήποτε προσπάθεια χρωματικού χαρακτηρισμού οποιοδήποτε ιστού του ανθρωπίνου σώματος.

Υπάρχουν αρκετές παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την μεταβολή της παροχής αίματος στον ρινικό βλεννογόνο, όπως η αλλεργική ρινίτις, η αγγειοκινητική ρινίτις, καθώς και οι φλεγμονώδεις διαταραχές των παραρρινίων κόλπων. Η ρινική απόφραξη, που προκαλείται λόγω της αγγειοδιαστολής αποτελεί ένα κλινικό σημείο που πάντα είναι παρόν σε αυτές τις καταστάσεις. Η δε προσδοκώμενη ρινική αποσυμφόρηση επιτυγχάνεται με τη λήψη διαφόρων φαρμακοθεραπευτικών παραγόντων με δυνητικά αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες, που χαρακτηρίζονται από διαφορετική θεραπευτική αποτελεσματικότητα για κάθε άτομο, επειδή αυτή επηρεάζεται από διαφόρους ενδογενείς παράγοντες. Το αγγειοσυσπαστικό μοντέλο που εφαρμόζεται στο αντιβράχειο, αποτελεί την περισσότερο αποδεκτή μέθοδο για τον καθορισμό της βιολογικής επάρκειας διαφόρων φαρμακευτικών σχημάτων, που χρησιμοποιούνται σε ποικίλα ιατρικά πεδία. Δέον να τονισθεί, ότι ακόμα και η δυνητική αντιφλεγμονώδης ιδιότητα αρκετών παραγόντων, όπως των τοπικών κορτικοστεροειδών, επίσης συσχετίζεται με την αγγειοσυσπαστική τους ισχύ. Παρόλα αυτά, το αγγειοσυσπαστικό μοντέλο υστερεί σε ακρίβεια και ικανότητα επαναληψιμότητος των αποτελεσμάτων, επειδή η ένταση και η έκταση του προκαλούμενου ερυθήματος εκτιμώνται υποκειμενικά και ποιοτικά. Περαιτέρω, οι αντιλαμβανόμενες αλλαγές χρώματος επηρεάζονται κατά τυχαίο τρόπο από τα υποκειμενικά ανατομικά χαρακτηριστικά της επιδερμίδας η οποία δεν υπάρχει στην ρινική κοιλότητα. Για το λόγο αυτό, τα στοιχεία που αφορούν στο δέρμα δεν μπορούν ευθέως να αντιστοιχηθούν στο ρινικό βλεννογόνο. Έτσι η ποσοτική εκτίμηση της παροχής αίματος στον ρινικό βλεννογόνο είναι μεγάλης κλινικής σημασίας πλην όμως μη αντικειμενικά επιτευχθήσα.

Αρκετές μέθοδοι και εργαλεία έχουν χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική εκτίμηση της αιματικής παροχής στους ιστούς, ιδίως στη δερματολογία, όπως η φασματοφωτομετρία ανάκλασης, η χρωματομετρία, και η ταχυμετρία με laser Doppler. Παρά το ότι οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες, σε πολλές περιπτώσεις υπόκεινται σε ποικίλους περιορισμούς.

Μερικοί από αυτούς είναι:

(i) ότι παρέχουν σημειακές πληροφορίες, που είναι ανεπαρκείς για τον ποσοτικό καθορισμό της παροχής αίματος στους ιστούς, γιατί η τελευταία χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού ποικιλομορφία στο χώρο,

(ii) ότι η περιοχή του υπό εξέταση ιστού καθορίζεται από το οπτικό πεδίο του ανιχνευτή, το οποίο δεν είναι εύκολα και με ακρίβεια ελεγχόμενο,

(iii) ότι σε μερικές περιπτώσεις η διαδικασία μέτρησης απαιτεί επαφή μεταξύ του ιστού και του ανιχνευτή του οργάνου, όμως αυτή η επαφή προκαλεί τοπική ισχαιμία οδηγώντας σε λανθασμένες μετρήσεις,

και (iv) δεν είναι εύκολα προσαρμόσιμες σε ενδοσκόπια και γι' αυτό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καθημερινή βάση, για την εκτίμηση της αιματικής παροχής σειστούς εσωτερικών οργάνων του ανθρωπίνου σώματος.

Έχουμε αναπτύξει ένα σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης, που συνδυάζει τεχνικές απεικόνισης και ταυτόχρονης απόλυτης χρωματικής μέτρησης ιστικών αλλοιώσεων. Το σύστημα προσφέρει αντικειμενικά μετρήσιμη δισδιάστατη χρωματική πληροφορία, χωρίς τους προαναφερθέντες περιορισμούς που παρουσιάζονται με τα συμβατικά χρωματόμετρα. Το σύστημα αυτοβαθμονομείται σε όλες τις συνθήκες φωτισμού και είναι δυνατόν να προσαρμοσθεί σε οποιοδήποτε οπτικοαπεικονιστικό σύστημα, όπως μικροσκόπια ή ενδοσκόπια. Έτσι, δεν υπάρχουν περιορισμοί ανατομικής εντόπισης ή διαστάσεων του υπό εξέταση ιστού. Η παρεχόμενη ψηφιακή ενδοσκοπική απεικόνιση είναι δυνητικά βαθμονομούμενη και διορθωμένη σε πραγματικό χρόνο κατά την διάρκεια της εκτίμησης. Η ποσοτικοποίηση της χρωματικής πληροφορίας γίνεται για κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της υπό εξέταση περιοχής. Λόγω της ποικιλομορφίας του χρώματος των βιολογικών υλικών, η χρωματική ταυτοποίηση βασίζεται σε υπολογιστικά παραγόμενα χρωματικά οπτικά ιστογράμματα, με την χρήση στατιστικών παραμέτρων. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας αυτά τα ιστογράμματα σε συνδυασμό με ειδικούς οπτικούς αλγορίθμους, η εικόνα δυνατόν να διαμερισματοποιηθεί ανάλογα με κοινά χρωματικά ανά περιοχή χαρακτηριστικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λήψη μιας χρωματομορφής του ιστού και τον ακριβή οπτικό του χαρακτηρισμό.

Παρουσιάζεται ένα απεικονιστικό χρωματόμετρο προσαρμοσμένο σε ένα ενδοσκόπιο, το οποίο κάνει ικανή την ανέπαφη και με δυνατότητα αναπαραγωγής λήψη, τη μέτρηση και τη χαρτογράφηση των χρωματικών πληροφοριών για κάθε σημείο του χώρου εντός του οπτικού πεδίου του ενδοσκοπίου. Αυτό το σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των μεταβολών της αιματικής παροχής στο ρινικό βλεννογόνο μετά τη λήψη υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης (σε μορφή ενδορινικού σπρέϋ), που αποτελεί φαρμακευτικό παράγοντα με αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν αναπαραγώγιμες και αξιόπιστες μετρήσεις. Η δε αξιοπιστία της όλης μεθόδου χρησίμεψε ως βασική γνώση για μετέπειτα πειραματικές διατάξεις, σε λοιπούς βλεννογόνους της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

Η ενδοσκοπική απεικονιστική χρωματομετρία, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των μεταβολών της αιματικής παροχής του ρινικού βλεννογόνου (σχήμα 1), αποτελείται από τα παρακάτω συστατικά μέρη: (1) μια μικροσκοπική έγχρωμη βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης, που κατασκευάστηκε στο Ι.Τ.Ε (FORTH), με ηλεκτρονική ίριδα και υπολογιστή ρύθμισης και καθορισμού της ισορροπίας του λευκού χρώματος, (2) ένα άκαμπτο ενδοσκόπιο (0 βαθμών, 4 mm) ενσωματωμένο στην κάμερα, (3) μια πηγή φωτός με ξένου ισχύος 100 W, και (4) ένα βίντεο-ψηφιακό μετατροπέα με χρωματικό βάθος 24 bit, που βρίσκεται συνδεδεμένος με ένα προσωπικό υπολογιστή pentium με βίντεο RAM 32-megabyte και κάρτα γραφικών SVGA με επιταχυντή γραφικών. Η ενδοσκοπική απεικόνιση γίνεται ψηφιακά σε πραγματικό χρόνο και παρουσιάζεται στο χειριστήριο ενός υπολογιστή, όπου η λήψη και οι παράμετροι αυτής ελέγχονται από ειδικά εξελιγμένο λογισμικό. Το λογισμικό αυτό συλλέγεται κάτω από C + + και αποτελείται από δύο κύρια μέρη: ένα μέρος ειδικά για ρύθμιση και ένα δεύτερο μέρος για χρωματική ανάλυση. Η ρύθμιση είναι σημαντική γιατί οι κόκκινες, πράσινες και μπλε (RGB) πληροφορίες της ζωντανής ενδοσκοπικής ηλεκτρονικής απεικόνισης επηρεάζονται κατά τυχαίο τρόπο από διάφορους

παράγοντες, όπως το μη σταθερό φωτισμό και τις συνθήκες λήψης που προκύπτουν από τη μη σταθερή λειτουργική απόσταση του ενδοσκοπίου, την ηλεκτρονική συσσώρευση, την παρακμή της φωτεινής πηγής και ούτω κάθε εξής. Για να αντισταθμιστούν οι παραπάνω παράγοντες χρησιμοποιήσαμε εμπορικές ενδοσκοπικές κάμερες, για την παροχή δυνατοτήτων αυτόματου κλεισίματος και καθορισμού της ισορροπίας του λευκού χρώματος. Το αυτόματο κλείσιμο (auto shutter) είναι πολύ χρήσιμο για την αποφυγή των αποτελεσμάτων κορεσμού του οπτικού ανιχνευτή, καθώς και για την προσαρμοστικότητα σε όποιες συνθήκες υπέρ- ή υπό-φωτισμού. Έχει όμως το μειονέκτημα ότι ταυτόχρονα προσαρμόζεται σε κάθε παράμετρο ιστικής ανάκλασης, που αποτελεί πολύ σημαντική οπτική παράμετρο. Από την άλλη μεριά, η αυτόματη ρύθμιση του λευκού είναι ανακριβής, ιδιαίτερα όταν επιθεωρούνται μονοχρωματικές ιστικές περιοχές. Για το λόγο αυτό, η ποσοτική μορφοποίηση της χρωματικής πληροφορίας της ζωντανής εικόνας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αντικειμενικό χαρακτηρισμό και έλεγχο του ιστικού χρώματος, επειδή η διαδικασία της απεικόνισης δεν είναι αναπαραγώγιμη. Η προαπαίτηση για τις ακριβείς, αξιόπιστες και αναπαραγώγιμες χρωματικές μέτρησεις είναι ο συγκεκριμένος καθορισμός των συνθηκών φωτισμού και λήψης της εικόνας, καθώς και η συνοδός προσαρμοστικότητα για κάθε ποικιλότητα έντασης ή φασματικής μεταβολής της ιστικής ανάκλασης. Ταυτόχρονα, απαραίτητη είναι η άριστη λειτουργία του όλου συστήματος χωρίς δυσλειτουργίες σχετιζόμενες με τα διάφορα φασματικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση βλεννογόνου.

Για τον αναπαραγώγιμο χρωματικό χαρακτηρισμό το περιγραφέν σύστημα ρυθμίζεται πριν από την ιστική εξέταση, σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ενας μαύρος, ματ, πλαστικός σωλήνας με λεπτά τοιχώματα προσαρμόζεται κατ’ επέκταση στον άξονα του ρινικού ενδοσκοπίου, επεκτείνοντας το μήκος του κατά 5 mm. Αυτός ο σωλήνας τοποθετείται για να σταθεροποιήσει τη λειτουργική απόσταση, εμποδίζοντας το ενδοσκόπιο από την προσέγγιση στον ιστό σε απόσταση μεγαλύτερη από 5 mm. Ο ενδοσκόπος επιθεωρώντας ταυτόχρονα την κυκλική οπή του σωλήνα και τον ιστό που προσεγγίστηκε μπορεί να εξαφανίσει την πίεση από την επαφή η οποία μπορεί να προκαλέσει τοπική ισχιαιμία. Ενεργοποιώντας το τμήμα του κωδικού βαθμονόμησης (callibration), ο διακόπτης εξισορρόπησης του λευκού στην κάμερα μετατοπίζεται στη χρωματική θερμοκρασία (στο υπέρυθρο) της φωτεινής πηγής. Δύο απολύτως ασπρόμαυρες πλάκες τοποθετούνται διαδοχικά μπροστά από την κυκλική οπή του ενδοσκοπίιου. Για κάθε δείγμα οι τιμές του τρισδιάστατου χρωματικού χώρου RGB για μια περιοχή από 5×5 πίξελ (εικονοστοχεία) εμφανίζονται με μια μέθοδο υπολογισμού τους σε αληθινό χρόνο. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τιμές ως αναφορά η ηλεκτρονική ίριδα της κάμερας και τα επίπεδα της RGB της αποκτώμενης εικόνας ρυθμίζονται αυτομάτως, μέχρι που οι εμφανιζόμενες τιμές της έντασης RGB να φτάσουν το 0 για το μαύρο και το 255 για το άσπρο. Οταν τελειώσει η διαδικασία καλιμπραρίσματος γίνεται η λήψη με την διαδικασία που περιγράφθηκε παραπάνω και έτσι όλες οι ζωντανά εμφανιζόμενες απεικονίσεις καλιμπράρονται.

Σχήμα 1. Μικροσκοπική ανατομία ρινικού βλεννογόνου.

Η χρωματική ανάλυση παρουσιάζεται σε οποιοδήποτε από τα πίξελ της λαμβανόμενης βαθμονομημένης εικόνας της περιοχής ενδιαφέροντος, με τη χρήση της χροιάς, του κορεσμού, του διαστήματος χρωματικής φωτεινότητας (HSL). Σε αυτό το μοντέλο, το χρώμα εκπροσωπείται από (1) την απόχρωση (Hue), που ανταποκρίνεται στο κυρίαρχο μήκος κύματος του ερεθίσματος, (2) τον κορεσμό (Saturation), που ανταποκρίνεται στην καθαρότητα του κυρίαρχου μήκους κύματος (ή αντίστροφα στο πόσο πολύ λευκό είναι αναμειγμένο με το κυρίαρχο μήκος κύματος), και (3) τη φωτεινότητα (Lightness) ή την ένταση (Intensity), που ανταποκρίνεται στη σχετική φωτεινότητα ενός " λευκού" ερεθίσματος.

Τρέχοντας στον ηλεκτρονικό υπολογιστή το μέρος του λογισμικού ανάλυσης χρώματος, τα χρωματικά ιστογράμματα και οι σχετικές διάμεσες τιμές (medians) του HSL υπολογίζονται και παρουσιάζονται για ένα επιλεγμένο τμήμα ή για τη συνολική εικόνα. Αν η εικόνα περιέχει περιοχές με κοινά χρωματικά χαρακτηριστικά, παρατηρούνται στα ιστογράμματα ξεχωριστές κορυφές (peaks) που αντιστοιχούν σε κάθε περιοχή. Τοποθετώντας κατάλληλες αφετηρίες στα πέριξ των κορυφών που εμφανίζονται στα ιστογράμματα, αυτές οι απεικονιζόμενες περιοχές κρύβονται και είναι δυνατός ο υπολογισμός της γειτονικής τους περιοχής. Τα ιστογράμματα του HSL είναι κατάλληλα για τμηματοποίηση της χρωματικής εικόνας, επειδή ξεχωρίζουν τις πληροφορίες αναφορικά με το χρώμα (H, S) και τη φωτεινότητα (L) επιτρέποντας να δοθεί η επιθυμητή έμφαση σε οποιοδήποτε συστατικό είναι πιο χαρακτηριστικά ικανό προς ανάλυση. Ο διαχωρισμός αυτός είναι πολύ βασικός επειδή εξαφανίζει τη επιρροή των τυχαίων και συστηματικών χωρικών ποικιλοτήτων της φωτεινότητας της εικόνας του μετρήσιμου χρώματος. Τέτοιες ποικιλότητες μπορεί να ευνοούνται από την ίδια την φύση του βλεννογόνου, αλλά και από τις μετακινήσεις του ενδοσκοπίου κατά την λήψη των μετρήσεων.

Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε σε δέκα υγιείς εθελοντές, με αρνητικό ιστορικό αλλεργίας και χρονίων φλεγμονωδών διαταραχών της ρινός και των παραρρινίων κόλπων προκειμένου να εκτιμηθεί η δράση στον ρινικό βλεννογόνο του ενδορρινικά με την μορφή Spray (ρινικό εναιώρημα σε σπρέυ) χορηγούμενου διαλύματος υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης 0.1%. Η ουσία αυτή είναι ένας συμπαθητικομιμητικός παράγοντας με γνωστές κλινικά αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες. Τυγχάνει δε ευρείας χρήσης στην διενέργεια ρινικής αποσυμφόρησης

σε παθήσεις, όπως το κοινό κρυολόγημα, η αλλεργική ρινίτιδα, η αγγειοκινητική ρινίτιδα, καθώς και σε περιπτώσεις φλεγμονωδών παθήσεων των παραρρινίων κόλπων.

Σε κάθε εθελοντή ελήφθησαν πέντε βαθμονομημένες λήψεις της περιοχής του προσθίου 1/3 της κάτω ρινικής κόγχης, ανά δώδεκα λεπτά και σε διάστημα μίας ώρας. Για την ενδοσκόπηση χρησιμοποιήθηκε άκαμπτο ενδοσκόπιο (4mm, 0°).

Ακολούθως υπολογίζονται τα HSL ιστογράμματα και οι αντίστοιχες διάμεσες τιμές τους.

3. Ερμηνεία μετρήσεων

Η πολυφασματική απεικόνιση αποτελεί συνδυασμό απεικόνισης και φασματοσκοπίας, σε ένα φασματικό παράθυρο που εκτείνεται από το υπεριώδες έως το υπέρυθρο. Σε κάθε φασματική περιοχή είναι δυνατή η λήψη απεικόνισης, ενώ σε κάθε σημείο είναι δυνατή η καταγραφή πλήρους φάσματος. Τα τρία φασματικά παράθυρα που το σύστημα παρέχει απεικονίσεις είναι το υπεριώδες (300-400nm), το ορατό (380-750nm) και το υπέρυθρο (750nm-1.5μm). Το απεικονιστικό σύστημα που χρησιμοποιούμε αποτελείται από:

1. CCD ψυχόμενη camera UV enhanced.
2. Φωτισμό μέσω οπτικών ινών με γεωμετρία 45°, ώστε να αποφεύγονται οι ανακλάσεις.
3. Σύστημα φίλτρων με filter wheel που καθορίζουν το φασματικό παράθυρο απεικόνισης.
4. Ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό, μέσω του οποίου καθορίζονται οι λειτουργίες του συστήματος.

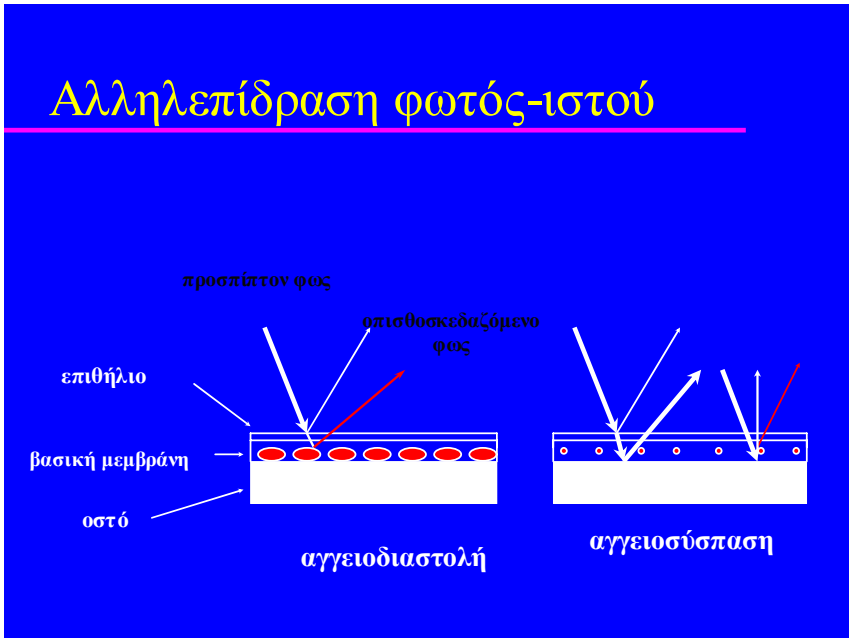
Η διαφοροποίηση των απεικονίσεων και κατά συνέπεια το είδος των λαμβανομένων πληροφοριών οφείλεται στις μεταβολές κατά την αλληλεπίδραση φωτός-ιστού των ακολούθων παραμέτρων:

1. Απορρόφησης της ακτινοβολίας.
2. Σκέδασης.
3. Βάθους διείσδυσης.

Οι χρωματικοί παράμετροι στον χώρο είναι τρεις:

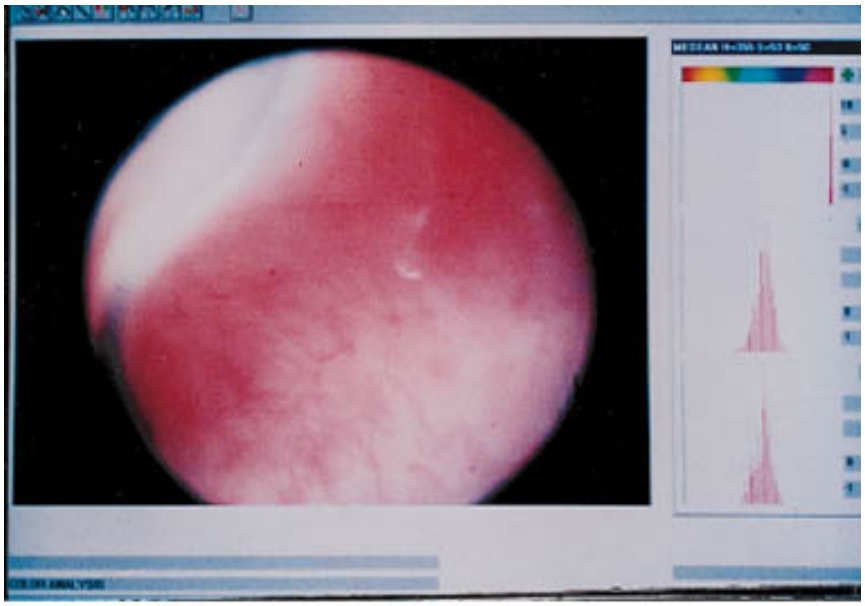
1. <u>Απόχρωση (Hue):</u> Εκφράζει το επικρατέστερο μήκος κύματος ενός χρώματος. Οι τιμές που λαμβάνει είναι από 0 έως 360. Στη χρωματική σφαίρα αναφέρονται σε μοίρες.
2. <u>Κορεσμός (Saturation):</u> Εκφράζει την καθαρότητα της απόχρωσης, δηλαδή την καθαρότητα σε σχέση με άλλες προσμείξεις (πχ άσπρο). Έτσι, δύο όμοια σχετικά με την απόχρωση χρωματικά ερεθίσματα, που σημαίνει ίδιο επικρατές μήκος κύματος, δυνατόν να έχουν διαφορετικού βαθμού πρόσμιξη άσπρου και συνεπώς διαφορετικό κορεσμό. Οι τιμές που λαμβάνει ο κορεσμός είναι από 0 έως 100.
3. <u>Ένταση (Intensity ή Lightness):</u> Εκφράζει την φωτεινότητα του χρώματος σε σχέση με το άσπρο. Οι τιμές που λαμβάνει η φωτεινότητα είναι από 0 έως 100.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, η απεικόνιση γίνεται στο ορατό παράθυρο του φάσματος. Κατά την πρόπτωση ακτινοβολίας σε έναν ιστό ένα μέρος ανακλάται και ένα διαθλάται (σχήμα 2). Η διαθλώμενη δέσμη απορροφάται, σκεδάζεται κι εξέρχεται δίνοντας την διάχυτη ανάκλαση, την οποία ανιχνεύουμε. Αυτή περιέχει όλη την πληροφορία από τον ιστό, ενώ η απευθείας ανάκλαση δεν περιέχει πληροφορίες και για αυτό τον λόγο είναι ανεπιθύμητη. Η σημασία της ποσοτικοποίησης των παραμέτρων των μακροσκοπικών χαρακτηριστικών του ρινικού βλεννογόνου οφείλεται στην δυνατότητα παρακολούθησης και καταγραφής δυναμικών φαινομένων αλλαγής του χρώματος, όπως στην περίπτωσή μας ύστερα από την χορήγηση της υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης.

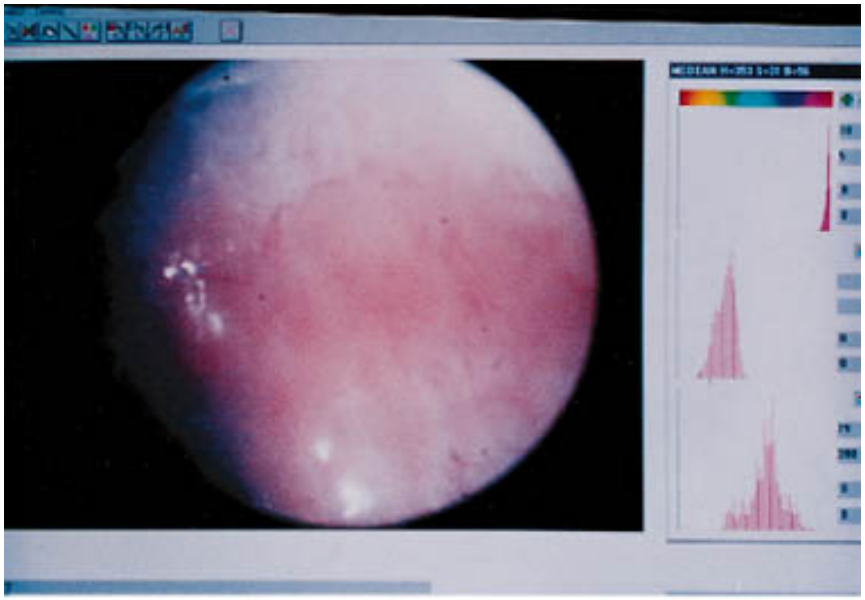


Σχήμα 2 . Διάγραμμα ρινικού βλεννογόνου, αλληλεπίδρασης και απορρόφησης συστατικών των υποκείμενων ιστών

Η παρουσίαση του συστήματος αξιολογήθηκε με τον χρωματικό χάρτη του Macbeth, που περιέχει χρωματικά τμήματα με γνωστές και σταντάρισμένες χρωματικές παραμέτρους. Η δυνατότητα αναπαραγωγής και η ακρίβειας των αποτελεσμάτων βρέθηκε να είναι 1.5% και 2.1% αντιστοίχως. Οι εικόνες 1 και 2 φανερώνουν δύο αντιπροσωπευτικές εικόνες του ρινικού βλεννογόνου του ιδίου ατόμου που πάρθηκαν κατά την αρχή και το πέρας του διαστήματος της αγγειοσυσπαστικής διαδικασίας, αντιστοίχως. Στα έγχρωμα ιστογράμματα που παρουσιάζονται, ο κάθετος άξονας εκφράζει αριθμό οικονοστοιχείων (pixels), ενώ ο οριζόντιος εκφράζει (από την κορυφή) μονάδες H (βαθμούς), S (%), L (%).

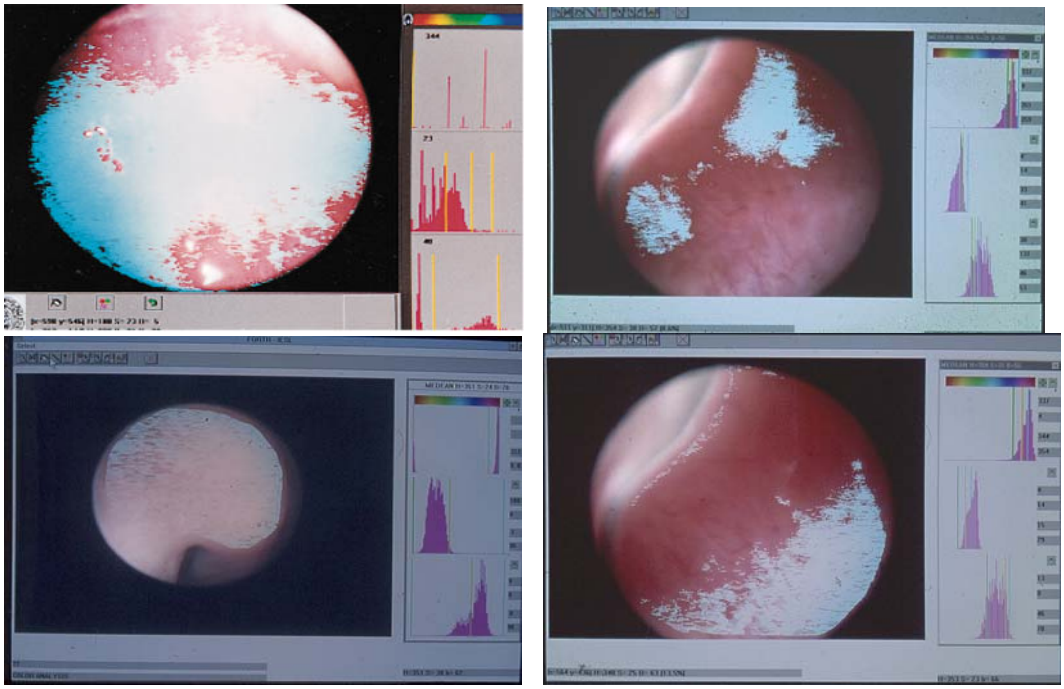


Εικόνα 1. Έναρξη αγγειοσυσπαστικής δράσης.

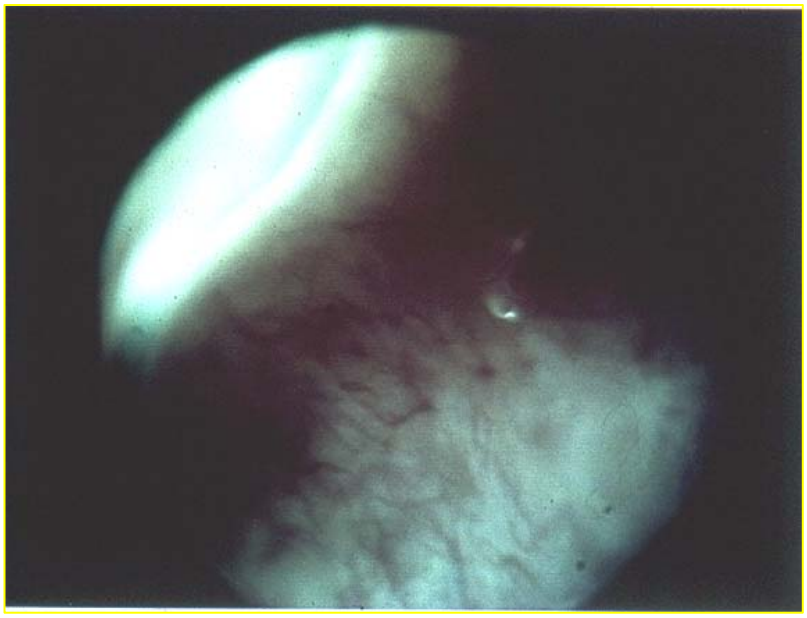


Εικόνα 2. Λήξη αγγειοσυσπαστικής δράσης.

Η εικόνα 3 δείχνει την αυτόματη τμηματοποίηση και χαρτογράφηση των περιοχών με υψηλή παροχή αίματος του προσθίου τμήματος της κάτω ρινικής κόγχης, ενώ η εικόνα 4 φανερώνει τη ενίσχυση σε αληθινό χρόνο της απεικόνισης των περιοχών με υψηλή παροχή αίματος.

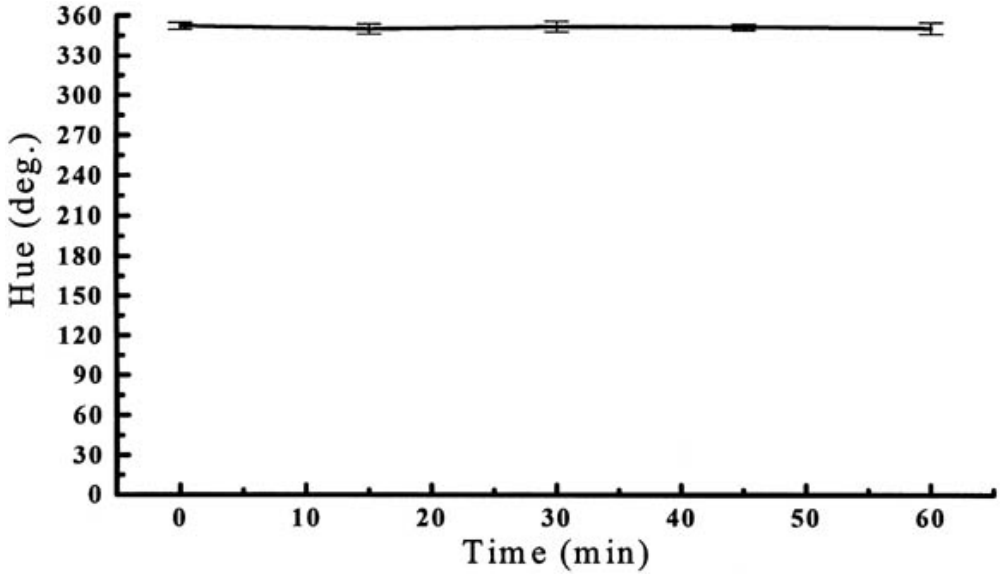


Εικόνα 3. Αυτόματη τμηματοποίηση και χαρτογράφηση των περιοχών με υψηλή παροχή αίματος του προσθίου τμήματος της κάτω ρινικής κόγχης.

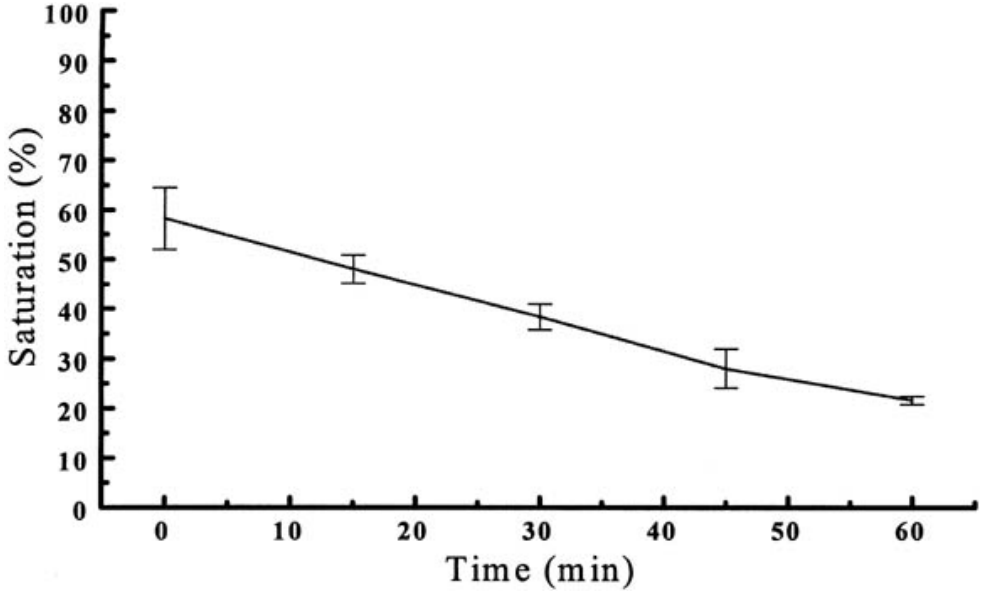


Εικόνα 4. Ενίσχυση σε αληθινό χρόνο της απεικόνισης των περιοχών με υψηλή παροχή αίματος.

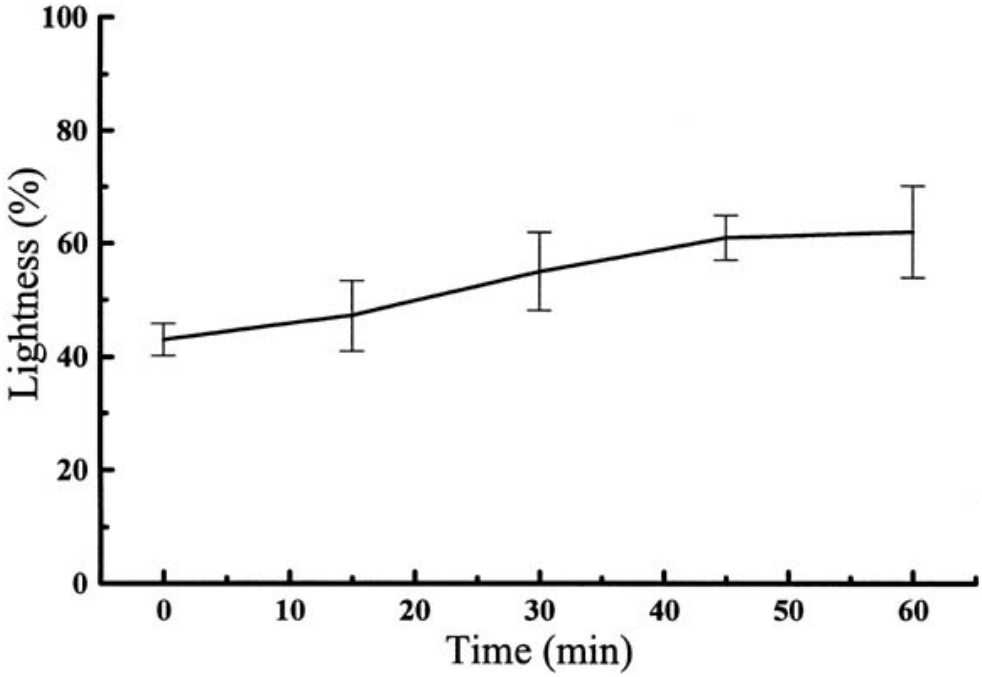
Τα σχήματα 3, 4 και 5 εμφανίζουν τις υπολογισμένες H, S, L παραμέτρους έναντι των καμπύλων του χρόνου, για τα 10 άτομα αντιστοίχως. Αυτές οι καμπύλες φανερώνουν τις παραγόμενες μεταβολές χρώματος κατά την εξέλιξη του διαστήματος της αγγειοσύσπασης.



Σχήμα 3. Η παράμετρος της απόχρωσης (Hue) του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο σε 10 άτομα.



Σχήμα 4. Η παράμετρος του κορεσμού (Saturation) του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο σε 10 άτομα.



Σχήμα 5. Η παράμετρος της έντασης ή φωτεινότητας του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (Intensity ή Lightness) ως προς τον χρόνο σε 10 άτομα.

Τα σχήματα 3, 4 και 5 παρουσιάζουν τις προκαλούμενες μεταβολές των τριών περιγραφέντων χρωματικών παραμέτρων κατά την διάρκεια των εξήντα λεπτών, που ελάμβαναν χώρα οι μετρήσεις. Ο κορεσμός (saturation) του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός είναι η πιο ευαίσθητη χρωματική παράμετρος κατά την διάρκεια της προκαλούμενης αγγειοσυστολής στον ρινικό βλεννογόνο, ενώ οι τιμές της απόχρωσης (hue) και της φωτεινότητας (lightness) παραμένουν σχεδόν σταθερές. Είναι φανερό ότι ο κορεσμός είναι η πιο ευαίσθητη χρωματική παράμετρος κατά την

αγγειοσύσπαση του ρινικού βλεννογόνου. Αυτό είναι ακόλουθο των ανατομικών μεταβολών που επισυμβαίνουν στον ρινικό βλεννογόνο κατά την χορήγηση υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης κι επηρεάζουν τόσο την σκέδαση, όσο και την απορρόφηση (σχήμα 2). Το αναπνευστικό τμήμα του ρινικού βλεννογόνου αποτελείται από ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό επιθήλιο και μια βασική μεμβράνη, πάνω στην οποία επικάθονται τα κύτταρα του επιθηλίου. Το επιθήλιο επικάθεται της βασικής μεμβράνης, η οποία με την σειρά της επικάθεται του περιοστέου ή του περιχονδρίου, όπου υπάρχει χόνδρος. Στην μέση και κάτω ρινική κόγχη η βασική μεμβράνη είναι πολύ αγγειοβριθής. Το επιθήλιο και η βασική μεμβράνη είναι σχεδόν τελείως διαπερατές, ενώ το περιόστεο και το περιχόνδριο επανανακλούν το περισσότερο του ορατού φωτός, που προσπίπτει. Την ίδια στιγμή το αίμα απορροφά όλα τα μήκη κύματος από 420 έως 520 nm. Συνεπώς, το σήμα του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός αποτελείται από το ανακλώμενο φως επιφανείας, καθώς και το μη απορροφήσιμο αλλά και το επανανακλώμενο φως. Αυτή είναι κι η εξήγηση για το χρώμα του ρινικού βλεννογόνου ανά πάσα στιγμή.

Όταν συμβαίνει αγγειοσυστολή, ο αριθμός των αιματικών στοιχείων που απορροφούν το φως στα προαναφερθέντα μήκη κύματος ελαττώνονται, ενώ ταυτόχρονα οι υποκείμενες ανατομικές δομές (περιόστεο, περιχόνδριο) ανακλούν περισσότερο λευκό φως. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα αγγεία συσπώνται -κατά την εφαρμογή της υδροχλωρικής ξυλομεθαζολίνης- ο αριθμός των απορροφητικών παραγόντων του αίματος μειώνεται στους ιστούς, αποκαλύπτοντας τους υποκείμενους παράγοντες σκεδασμού, κι έτσι το εκπεμπόμενο φως περιέχει πολύ περισσότερο λευκό φως. Συνεπώς και βάση του ορισμού της χρωματικής παραμέτρου του κορεσμού, αυτός μειώνεται, καθώς παράλληλα αυξάνει ελαφρώς η φωτεινότητα κατά τη διαδικασία της αγγειοσύσπασης. Η απόχρωση, την ίδια στιγμή, παραμένει σταθερή, μια που η τιμή της είναι ανεξάρτητη των προηγουμένων, αφού η αιμοσφαιρίνη αποτελεί την μόνη χρωμοφόρο ουσία στον ρινικό βλεννογόνο, που καθορίζει το επικρατές μήκος κύματος του χρώματός του.

Η περιγεγραμμένη ενδοσκοπική χρωματομετρία δεν υπόκειται στα λάθη και τους περιορισμούς που παρουσιάζονται στις συμβατικές τεχνικές ανάλυσης, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα για οπτικό χαρακτηρισμό των εσωτερικών ιστών του ανθρωπίνου σώματος, με ή χωρίς χρωματική ομοιομορφία, ανεξάρτητα από το μέγεθος ή το σχήμα τους. Η κλινική εφαρμογή που παρουσιάστηκε φανερώνει την αποτελεσματικότητα του περιγεγραμμένου συστήματος, για την in vivo αξιολόγηση της αγγειοσυσπαστικής δυνατότητας διαφόρων φαρμακοθεραπευτικών παραγόντων. Παράλληλα είναι εμφανής η δυνητική αξιοποίηση για την εκτίμηση ατόμων με αλλεργική ρινίτιδα, αγγειοκινητική ρινίτιδα και φλεγμονώδεις διαταραχές των παραρρινίων κόλπων, με την έννοια της αντικειμενικής εκτίμησης της δράσης διαφόρων φαρμακευτικών παραγόντων. Η προσαρμογή της απεικονιστικής φασματοσκοπίας και χρωματομετρίας στην ενδοσκόπηση αποτελεί μια σημαντική πρόοδο και μπορεί να αποτελέσει ένα μοναδικό χώρο έρευνας, αλλά και ένα σημαντικό κλινικό εργαλείο, παρέχοντας ευαίσθητους, αναπαραγώγιμους και αντικειμενικούς δείκτες αξιολόγησης της εφαρμοσμένης θεραπείας. Περαιτέρω, είναι επίσης εμφανής η εφαρμογή της στην εξέλιξη της νόσου σε ιστικό επίπεδο. Αυτή η νέα δυνατότητα αντικειμενικής εκτίμησης μπορεί να αυξήσει την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ιστικών βλαβών και δίνει τη δυνατότητα αντικειμενικής εκτίμησης της ανταπόκρισης σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα σε διάφορα ιατρικά πεδία.

4. Βιβλιογραφία

1. Andersen P, Milioni K, Maibach H. The cutaneous corticosteroid vasoconstriction assay: a reflectance spectroscopic and Laser-Doppler flowmetric study. Br J Dermatol 128:660-665, 1993.
2. Balas C. An imaging colorimeter for noncontact tissue color mapping. IEEE Trans Biomed Eng 44:468-474, 1997.
3. Campbell JP, Campbell CD, Waeren DW, Prazma TU, Pillsbury HC 3d. Comparison of the vasoconstrictive and anesthetic effects of intranasally applied cocaine vs. xylomethazoline/lidocaine solution. Otolaryngol Head Neck Surg 107:697-700, 1992.
4. Clanachan I, Devitt HG, Foreman MI, Kelly IP. The Human vasoconstrictor assay for topical steroids. J Pharmacol Methods 4:209-220, 1980.
5. Fisher L, Auberson S, Bretton C, Lacroix JS. Adrenergic and non-adrenergic vasoconstriction mechanisms in the human nasal mucosa. Rhinology 31:11-15, 1993.
6. Gates GA. Current therapy in otolaryngology head and neck surgery. 5th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Year Book Inc., 1994: 366-372.
7. Grudemo H, Juto JE. The impact of the measuring distance on laser-Doppler measurements of the microcirculation in human nasal mucosa. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 59:280-285, 1997.
8. Guin ID, Wallis MS, Walls R, Lehman PA, Franz TJ. Quantitative vasoconstrictor assay for topical corticosteroids: the puzzling case of fluocinolone acetonide. J Am Acad Dermatol 29:197-202, 1993.
9. Johnson DA, Hricik JC. The pharmacology of alpha-adrenergic decongestants. Pharmacotherapy 13:1105-1155, 1993.
10. Lang J. Clinical anatomy of the nose, nasal cavity and paranasal sinuses. New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 1989:47-55.Porter MJ, Marais J, Tolley N. Comparison of cocaine alone or with adrenaline on nasal mucosa blood flow. J Laryngol Otol 105:918-920, 1991.
11. Paparela MM, Shumrick DA. Otolaryngology. New York: W. B. Saunders Company, 1973:161.
12. Prokopakis EP, Balas CJ, Christodoulou PN, Gourtsoyiannis NC, Tosca AD, Helidonis ES. Assessment of nasal mucosa blood supply using quantitative endoscopic imaging of the back scattered light. Otolaryngology Head Neck Surgery 121:307-312, 1999.
13. Queille-Roussel C., Poncet M., Schaefer H. Quantification of skin color changes induced by topical corticosteroid preparations using the Minolta Croma Meter. Br J Dermatol 124:264-270, 1991.
14. Russ JC. Acquiring images. In: The image-processing handbook. 2nd ed. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1995:1-75.
15. Seidinari S, Di Nardo A, Mantovani L, Giannetti A. Parallel intraindividual evaluation of the vasoconstrictory action and the anti-allergic activity of topical corticosteroids. Exp Dermatol 6:78-82, 1997.
16. Shaffer SA, Kanade T. Color vision. In: SC Shapiro, editor. Encyclopedia of Artificial Intelligence. John Wiley & Sons New York, 1987:124-131.
17. Stoughton RB. The vasoconstrictor assay in bioequivalence testing: practical concerns and recent developments. Int J Dermatol 31:26-28, 1992.
18. Wyszecki G, Stiles WS. Colorimetry. In: Color science. Concepts and methods, quantitative data and formulae. 2nd ed. John Wiley & Sons New York. 1982:117- 248.

Γ. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΤΟΠΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

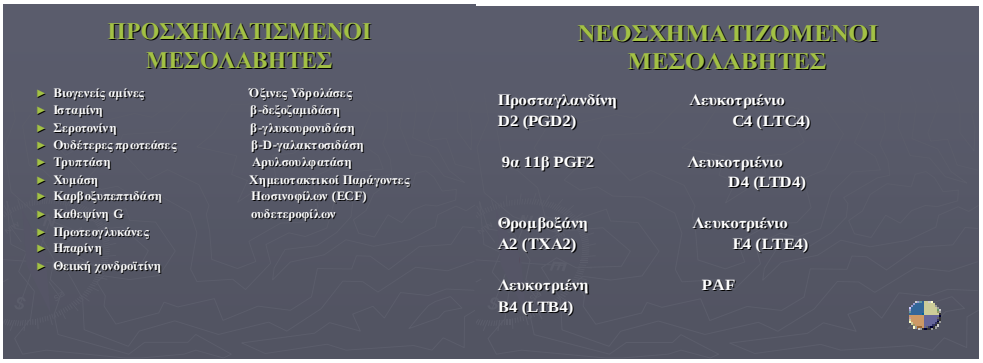
1. Η άμεση υπερευαισθησία
2. Η δυναμική καταγραφή της κινητικής της ανάπτυξης του ερυθήματος κατά την δοκιμασία του νηγμού δια βελόνης
2.1. Εισαγωγή
2.2. Ασθενείς και Μέθοδος
2.3. Αποτελέσματα
2.4. Συζήτηση
2.5. In vivo τεχνικές: δερματικά τεστ
2.6. Αξιολόγηση PPT
2.6.1. Καταγραφή και ποσοτική ερμηνεία του φαινομένου του σχηματισμού του πομφού και της ανάπτυξης του ερυθήματος
2.6.2. Επιλεκτική συμπεριφορά ασθενών με ανοσοκαταστολή και καρκίνο στο PPT
2.7. Εφαρμογές
3. Βιβλιογραφία

1. Η άμεση υπερευαισθησία

Η αλλεργική νόσος αποτελεί την πιο κοινή μορφή ανοσολογικών νοσημάτων. Ορίζεται ως μια ανοσολογικά μεσολαβούμενη αντίδραση σε ένα εξωγενές αντιγόνο (αλλεργιογόνο), η οποία προκαλεί ιστική φλεγμονή και δυσλειτουργία οργάνων. Κατά την IgE διαμεσολαβούμενη (άμεση) υπερευαισθησία (σχήμα 1), τα IgE αντισώματα καταλαμβάνουν υποδοχείς στα μαστοκύτταρα. Η καθήλωση των IgE αντισωμάτων στα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, μια διαδικασία γνωστή ως ευαισθητοποίηση, προετοιμάζει τα κύτταρα αυτά για την επακόλουθη ειδική για το κάθε αντιγόνο ενεργοποίηση. Μέσα σε λίγα λεπτά μετά την έκθεση στο αλλεργιογόνο ενεργοποιούνται και απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα αγγειοδραστικές ουσίες και μεσολαβητές φλεγμονής προκαλώντας αγγειοδιαστολή, σύσπαση σπλαχνικών μυών και διέγερση των βλεννοπαραγωγών αδενικών κυττάρων.

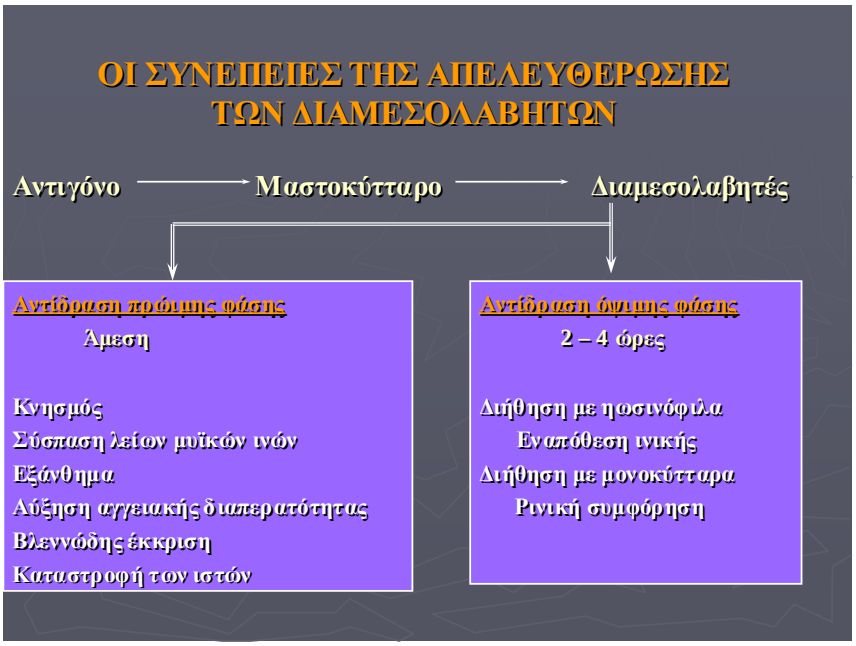
Σχήμα 1. Η αναφυλακτική αντίδραση τύπου Ι.

Παράλληλα με την εξωκυττάρωση, δυο άλλοι οδοί ξεκινούν για την παραγωγή βιοδραστικών προϊόντων όπως: λιπιδιακοί μεσολαβητές και κυτοκίνες (TNF, tumor necrosis factor), ιντερλευκίνες 6, 4, 5, GM και CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), αλλά και άλλοι (σχήμα 2).



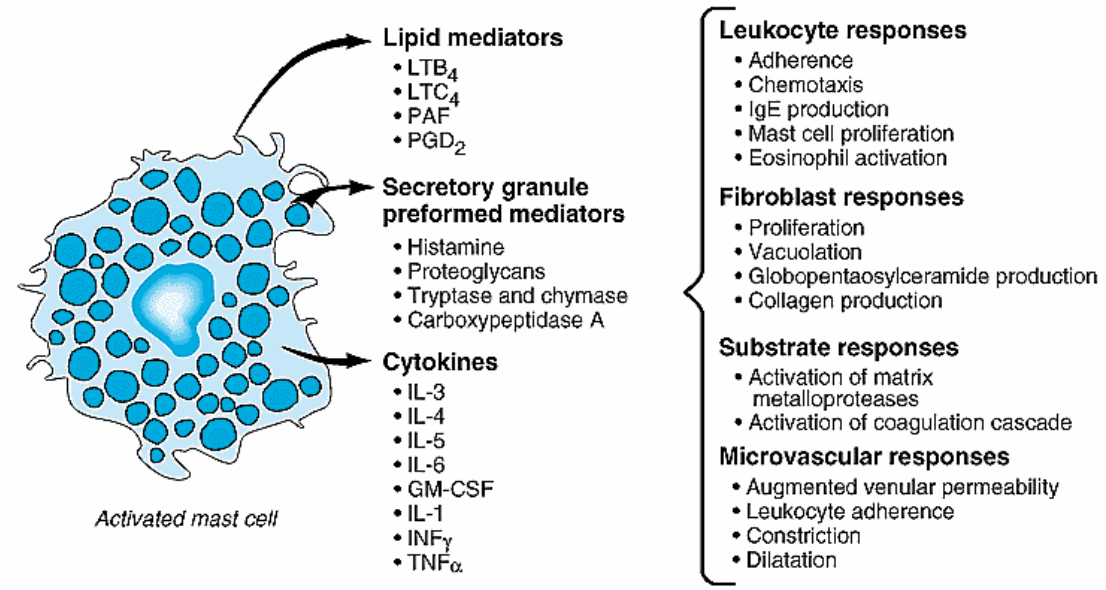
Σχήμα 2. Οι μεσολαβητές κατά την Αναφυλακτική αντίδραση τύπου Ι.

Στην άμεση φάση μιας τοπικής αντίδρασης εμφανίζεται κνησμός και υδαρής έκκριση από την μύτη, βρογχόσπασμος και έκκριση βλέννης από τους πνεύμονες, αλλά και μια δερματική αντίδραση που εκδηλώνεται με κνησμό, πομφό και ερύθημα. Άλλοι μεσολαβητές επάγουν μια βραδεία φλεγμονώδη αντίδραση, που εκδηλώνεται μερικές ώρες αργότερα (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Οι συνέπειες της απελευθέρωσης των διαμεσολαβητών κατά την αναφυλακτική αντίδραση τύπου Ι.

Η μειωμένη ρινική διαβατότητα, η διαταραχή της πνευμονικής λειτουργίας, το συνοδό ερύθημα και οίδημα στο δέρμα κατά την βραδεία φάση μετά από 6-8 ώρες συσχετίζονται, σύμφωνα με παθολογοανατομικά ευρήματα, με την διήθηση και ενεργοποίηση TH2 τύπου Τ κυττάρων, ηωσινοφίλων, ακόμη και βασεόφιλων και ουδετεροφίλων. Νέα δεδομένα αναφέρουν μια τρίτη φάση φλεγμονώδους αντίδρασης, με σεσημασμένη διήθηση από ηωσινόφιλα (VLPR-very-late-phase response), που κορυφώνεται την 8η ημέρα, ακολουθώντας τις δύο πρώτες (σχήμα 4).



Σχήμα 4. Οι τρεις κατηγορίες βιοδραστικών μεσολαβητών που παράγονται από μαστοκύτταρα ποντικών, με IgE εξαρτώμενη ενεργοποίηση, μπορούν να προκαλέσουν στα κύτταρα στόχους οξεία και παρατεταμένη φλεγμονώδη απάντηση.

Υπάρχουν δυο κλινικές υποκατηγορίες της IgE διαμεσολαβούμενης αλλεργίας: η ατοπία με την οποία κυρίως ασχολείται η εργασία αυτή, και η αναφυλαξία. Ο όρος ατοπία περιλαμβάνει μια ομάδα νόσων (αλλεργική ρινίτιδα, αλλεργικό άσθμα, ατοπική δερματίτιδα και αλλεργική γαστρεντεροπάθεια) που προσβάλλουν συγκεκριμένα άτομα με μια κληρονομική τάση να αναπτύσσουν IgE αντισώματα, σε πολλά κοινά οργανικά περιβαλλοντικά αντιγόνα. Η αντίδραση εντοπίζεται σε ένα επιρρεπές όργανο, αλλά πολλές φορές, περισσότερες από μια από αυτές τις νόσους μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα αλλεργικό άτομο. Συγχρόνως, υπάρχει μια ισχυρή κληρονομική τάση που περιλαμβάνει πολύπλοκους γενετικούς παράγοντες.

Η νόσος της άμεσης υπερευαισθησίας εκτιμάται κλινικά αποκομίζοντας αναπαραγόμενα δεδομένα με ένα ελεγχόμενο και εντοπισμένο τρόπο, μέσω των in vivo αναφυλακτικών αντιδράσεων, σε ύποπτες αντιγονικές ουσίες. Υπάρχουν επίσης ακριβής και ευαίσθητες in vitro δοκιμασίες (RAST, ELISA), ικανές να υπολογίσουν το ποσό και την αντιγονική ειδικότητα καθεμιάς ξεχωριστά ανοσοσφαιρίνης, ειδικά της IgE. Πρόσφατες όμως έρευνες αναφέρουν ότι ένα μεγάλο ποσοστό θετικών δερματικών αντιδράσεων σε κοινά εισπνεόμενα αντιγόνα δεν συνοδεύονται από θετικό RAST και πιθανότατα προκαλούνται από αντιγόνα που δεν εντοπίζονται στον ορό με καμιά από τις διαθέσιμες RAST διαδικασίες.

Αυτά τα στοιχεία ενισχύουν την σπουδαιότητα των in vivo δοκιμασιών στην διάγνωση της ατοπικής νόσου και την ανάγκη της ανάπτυξης μιας ακριβούς και αντικειμενικής μεθόδου για την ερμηνεία τους.

2. Η δυναμική καταγραφή της κινητικής της ανάπτυξης του ερυθήματος κατά την δοκιμασία του νηγμού δια βελόνης

2.1. Εισαγωγή

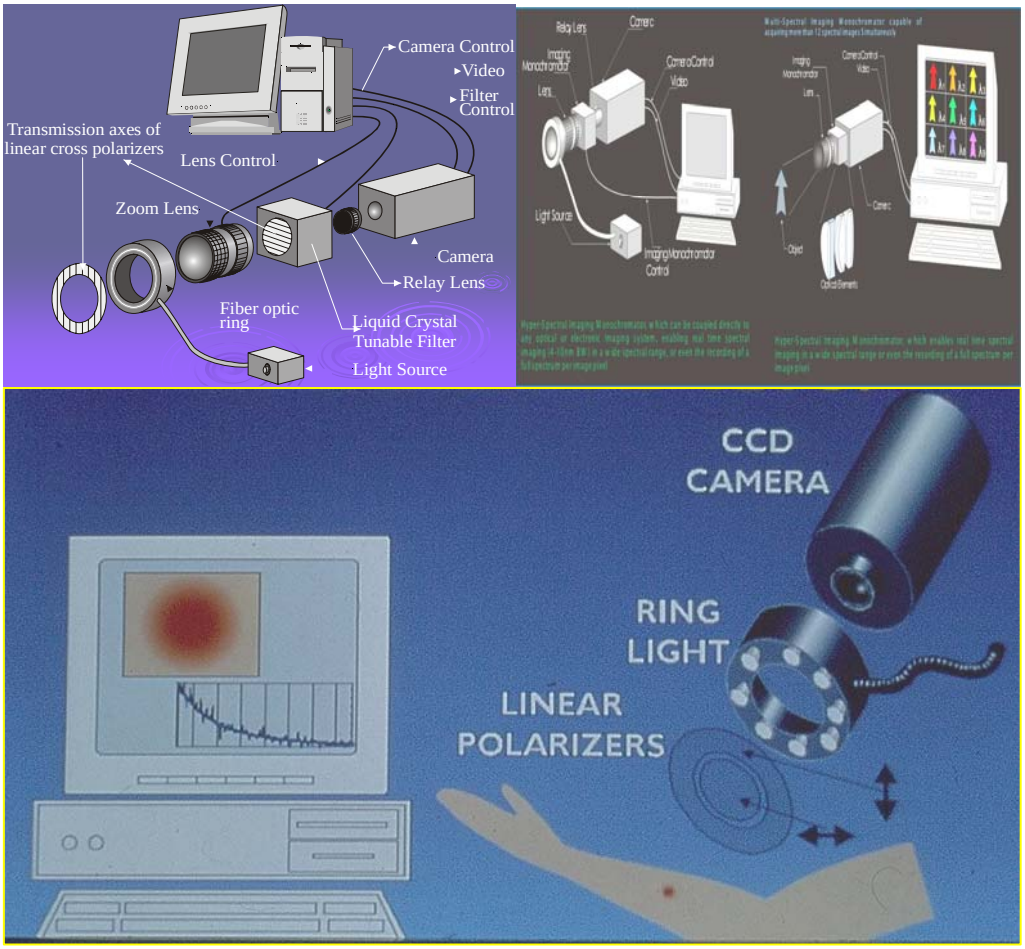
Διάφορα συστήματα ταξινόμησης έχουν επιστρατευθεί για να περιγράψουν τις αντιδράσεις του πομφού και του ερυθήματος καθώς και τυχόν σχετιζόμενων ψευδοποδίων. Αρκετές εναλλακτικές μέθοδοι υπολογισμού των αλλεργικών αντιδράσεων έχουν ήδη προταθεί από κάποιους συγγραφείς στην βάση της προσπάθειας να αποκλεισθεί το υποκειμενικό στοιχείο της ανθρώπινης παρατήρησης.

Στην συγκεκριμένη μελέτη προτείνουμε την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης για την ερμηνεία των δερματικών αλλεργικών αντιδράσεων, κατά τρόπο ακριβή, ποσοτικό, επαναλήψιμο και επομένως αντικειμενικό, καθορίζοντας ποσοτικά τον σχηματισμό του ερυθήματος ως προς τον χρόνο. Παρουσιάζουμε ένα σύστημα ικανό να επιτελέσει δυναμική πολυφασματική ποσοτική απεικόνιση, για τον καθορισμό της κινητικής του ερυθήματος. Το σύστημα αυτό αποτελείται από έναν οπτικό ανιχνευτή δυο διαστάσεων, που επιτρέπει την λήψη εικόνων υψηλής ευκρίνειας στο χώρο, μια συσκευή σύλληψης πλαισίου απεικόνισης, και έναν προσωπικό υπολογιστή. Το σύστημα ρυθμίζεται πριν την λήψη της εικόνας και η πληροφορία της εικόνας ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαστήματα χρώματος (σχήμα 5).

Αρκετές απεικονίσεις λαμβάνονται επιτυχώς πριν και μετά τον νυγμό του δέρματος και η κινητική του ερυθήματος υπολογίζεται σε κάθε σημείο του χώρου της εικόνας. Τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του ερυθήματος μελετήθηκαν σε 40 συνολικά εθελοντές, αλλεργικούς ή μη αλλεργικούς. Η ανάπτυξη του ερυθήματος μελετήθηκε ποσοτικά, όσον

αφορά τα χωρικά και τα δυναμικά ως προς τον χρόνο χαρακτηριστικά του, με το ειδικά εξελιγμένο σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης.

Η αναφυλακτική αντίδραση τύπου Ι εκτιμήθηκε κλινικά κατά τρόπο επαναλήψιμο, με την βοήθεια της πολυφασματικής απεικόνισης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη μεθοδολογία εκτίμησης του Prick Puncture Test (δοκιμασία νηγμού δια βελόνης) (σχήμα 6).



Σχήμα 5. Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης για την ποσοτική καταγραφή του ερυθήματος.

Δοκιμασία νηγμού δια βελόνης (Prick Puncture Test-PPT)

Πλεονεκτήματα	***Μειονεκτήματα***
Φθηνό	Απαιτείται διακοπή αντιισταμινικών
Πολλά διαθέσιμα αντιγόνα	Πιθανή αναφυλαξία σε σπάνιες περιπτώσεις
Γρήγορο	Ψευδώς θετικά αποτελέσματα επί δερματογραφισμού
Ακριβές	Ψευδώς θετικά αποτελέσματα επί φλεγμονής
Αυξημένη ευαισθησία	Δύσκολη ερμηνεία σε ηλικιωμένους

Σχήμα 6. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της δοκιμασίας νηγμού δια βελόνης.

Η παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η κινητική της ανάπτυξης του ερυθήματος, αρχικώς ύστερα από έγχυση ισταμίνης στον καρπό αλλεργικών ασθενών, μη αλλεργικών εθελοντών, καθώς και μιας ομάδας ανοσοκατασταλμένων εθελοντών. Στο δεύτερο στάδιο του πειράματος επιχειρήθηκε η για πρώτη φορά εκτίμηση της δράσης ενός φαρμακευτικού παράγοντα της ομάδας των αντιισταμινικών, σε μη αλλεργικούς ασθενείς.

2.2. Ασθενείς και Μέθοδος

Στο πρώτο στάδιο η μελέτη συμπεριέλαβε 13 άρρενες και 17 θήλεις από 18 έως 46 ετών (μέσος όρος 26 έτη). Από το σύνολο των 30 ατόμων, δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες:

- *Ομάδα 1*: Δέκα άτομα χωρίς ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό αλλεργίας, αλλά και με αρνητικές in vitro δοκιμασίες για αλλεργία.
- *Ομάδα 2*: Δέκα άτομα με γνωστό ιστορικό αλλεργίας τύπου Ι, αλλά και με θετικά in vitro δοκιμασίες. Αυτοί οι ασθενείς χρησιμοποιούσαν περιστασιακά διάφορα αντισταμινικά ή ενδορινικά στεροειδή, αλλά όχι τις τελευταίες 2 εβδομάδες πριν το πείραμα. Επίσης, κανείς από αυτούς δεν είχε υποβληθεί στο παρελθόν σε ανοσοθεραπεία.
- *Ομάδα 3*: Δέκα ασθενείς με γνωστό B cell λέμφωμα υπό χημειοθεραπεία, χωρίς γνωστό ιστορικό αλλεργίας, αλλά και χωρίς να έχουν υποβληθεί σε in vitro δοκιμασίες, μια που θεωρούντο άτομα με ανοσοανεπάρκεια.

Πριν από την έναρξη της μελέτης, οι εθελοντές υπεβλήθησαν σε πλήρη Ωτορινολαρυγγολογικό έλεγχο, πλήρη λήψη ιατρικού ιστορικού και αιματολογικό έλεγχο. Δέκα ημέρες πριν από το PPT, οι εθελοντές της ομάδας 1 και 2 υπεβλήθησαν σε in vitro δοκιμασίες για τα πιο συχνά αλλεργιογόνα της Κρήτης. Οι δοκιμασίες περιελάμβαναν Prist test και mRAST test. Όλες οι δοκιμασίες PPT έγιναν στις 5 το απόγευμα στην μεσότητα της άνω επιφάνειας του αριστερού αντιβραχίου. Η δοκιμασία PPT, σε όλα τα άτομα έγινε με 1% διάλυμα ισταμίνης και με χρήση ειδικά κατασκευασμένης βελόνης 1.25mm.

Στο δεύτερο στάδιο, η μελέτη περιελάμβανε δύο ομάδες ασθενών:

- *Ομάδα 1*: Τα δέκα άτομα της ομάδας 1 του πρώτου σταδίου.
- *Ομάδα 2*: Δέκα νέα άτομα με τα ίδια χαρακτηριστικά με την προηγούμενη ομάδα, δηλαδή χωρίς ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό αλλεργίας, αλλά και με αρνητικές in vitro δοκιμασίες για αλλεργία.

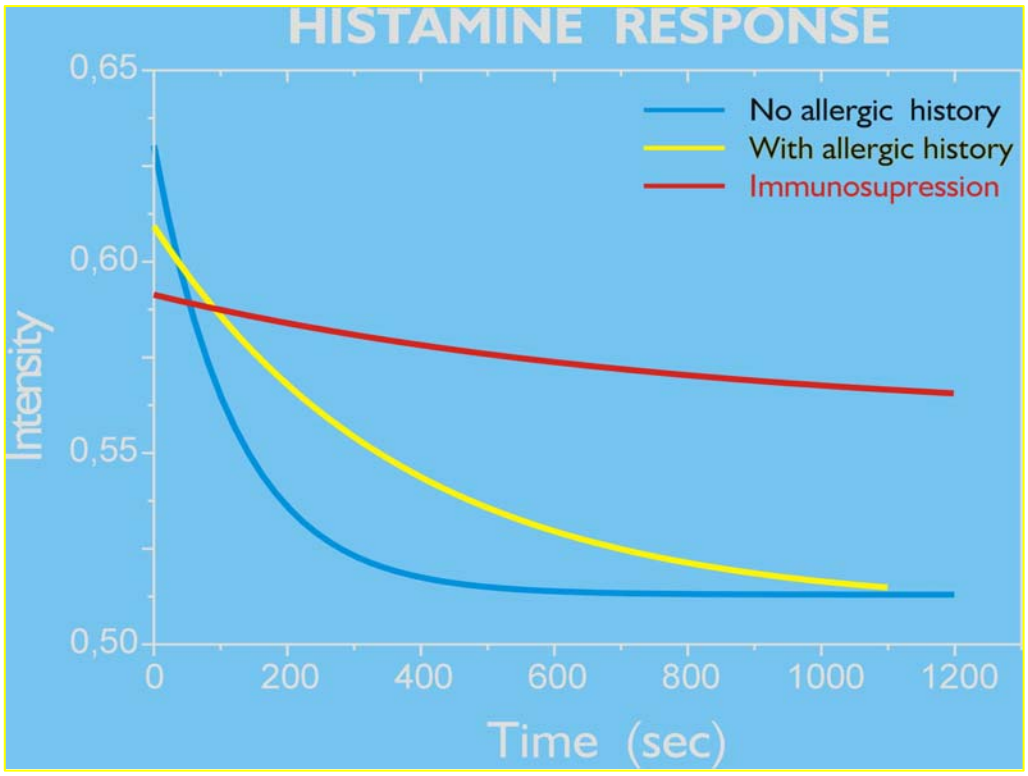
Στην ομάδα 1 χορηγήθηκαν για 2 ημέρες 10mgr σετιριζίνης, άπαξ ημερησίως. Στις 5 το απόγευμα της δεύτερης ημέρας, τα άτομα της ομάδας υπεβλήθησαν σε PPT με 1% διάλυμα ισταμίνης και με χρήση ειδικά κατασκευασμένης βελόνης 1.25mm. Στην ομάδα 2, που χρησιμοποιήθηκε ως control, δεν δόθηκε σετιριζίνη, αλλά απλώς έγινε PPT, υπό τις ίδιες συνθήκες με την ομάδα 1.

Η εκτίμηση του αποτελέσματος έγινε με την βοήθεια του ειδικά κατασκευασμένου συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης. Έγινε αντικειμενική καταγραφή των χωρικών και κινητικών χαρακτηριστικών της έντασης του σχηματιζόμενου ερυθήματος, αλλά και απεικόνιση του νεοσχηματιζόμενου πομφού. Η όλη καταγραφή ήταν συνεχής, σε μια διάρκεια είκοσι λεπτών, από την στιγμή του νηγμού. Επιτεύχθηκε ποσοτικός χαρακτηρισμός του ερυθήματος, χρησιμοποιώντας τον προαναφερθέντα σε άλλα κεφάλαια

τρόπο χρωματικού καθορισμού, εκμεταλλευόμενοι την διαγνωστική πληροφορία του επανασκεδαζόμενου φωτός.

2.3. Αποτελέσματα

Πρώτο στάδιο: Όπως φαίνεται και από το σχήμα, η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο ακολουθεί μια ξεχωριστή μορφή για κάθε ομάδα. Σε ένα βάθος χρόνου της τάξεως των είκοσι λεπτών (1200 δευτερόλεπτα), είναι φανερό, ότι η ένταση του νεοσχηματιζόμενου μετά από το PPT ερυθήματος λαμβάνει σχεδόν σταθερές τιμές στην ομάδα των ανοσοκατασταλμένων. Αντιθέτως, στα άτομα χωρίς αλλεργικό ιστορικό, οι τιμές της έντασης εμφανίζουν μια έντονη μεταβλητότητα στο πέρασμα του χρόνου, ενώ οι αλλεργικοί ασθενείς παρουσιάζουν μια ενδιάμεσου τύπου καμπύλη (σχήμα 7).

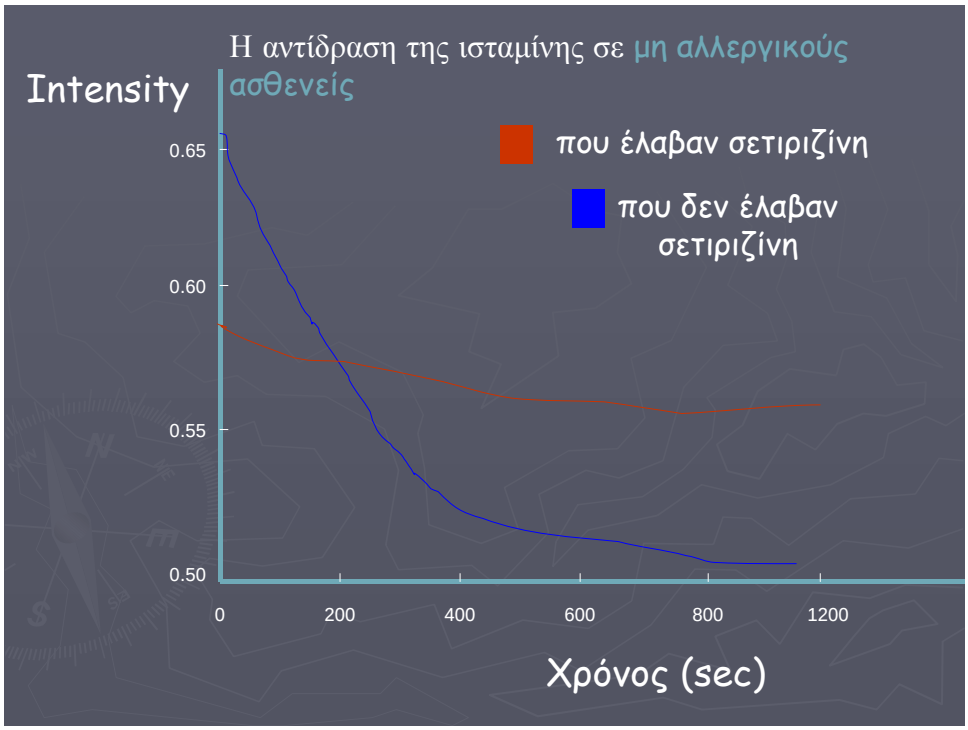


Σχήμα 7. Η αντίδραση της ισταμίνης σε μη αλλεργικούς, αλλεργικούς και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

Η αντίδραση της ισταμίνης κατά τη δοκιμασία PPT έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη παροδικού ερυθήματος. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα κινητικά χαρακτηριστικά του ερυθήματος σχετίζονται άμεσα, τόσο με την πιθανή αλλεργική κατάσταση του ατόμου, όσο και με το επίπεδο της ανοσολογικής του κατάστασης. Σε αυτήν την κατεύθυνση φαίνεται να συνεπικουρούν και τα δεδομένα των δικών μας μετρήσεων. Την ίδια ώρα που σε πραγματικό χρόνο γίνεται η καταγραφή του ερυθήματος, το μέγεθος του πομφού ελάμβανε διάφορα μεγέθη, εξατομικευμένα σε κάθε άτομο. Άλλωστε είναι κύριο χαρακτηριστικο της κλινικής εκτίμησης του PPT, ότι ο νεοσχηματιζόμενος πομφός της ισταμίνης βαθμολογείται με 3 σταυρούς, ενώ ο πομφός του

control ορού χρησιμεύει για την επικείμενη υποκειμενική εκτίμηση, του μεγέθους των πομφών των υπολοίπων υπό μέτρηση αλλεργιογόνων. Από αυτά είναι αυτονόητη η αξία της εκτίμησης της κινητικής του νεοσχηματιζόμενου ερυθήματος. Όπως και σε προηγούμενα κεφάλαια έχει αναπτυχθεί, οι ποσοτικές παράμετροι που συσχετίζονται με την κινητική της ανάπτυξης του ερυθήματος είναι πολύ πιο σημαντικά από την εκτίμηση του μεγέθους του πομφού, στην ερμηνεία της αλλεργικής αντίδρασης, λόγω του γεγονότος ότι το πρώτο εμπεριέχει μηχανισμούς κεντρικής δράσης, ενώ το δεύτερο αντιπροσωπεύει απλώς ένα τοπικό φαινόμενο.

Δεύτερο στάδιο: Ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο ποσοτικού και αντικειμενικού προσδιορισμού της κινητικής της ανάπτυξης του ερυθήματος, υπολογίστηκε η καμπύλη της σετιριζίνης σε βάθος χρόνου 1200 δευτερολέπτων από την στιγμή του νηγμού. Η καμπύλη της σετιριζίνης, σε σχέση με την control ομάδα εμφανίζει παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά της ομάδας 3 (ανοσοκατασταλμένοι) του πρώτου σταδίου (σχήμα 8).



Σχήμα 8. Η αντίδραση της ισταμίνης σε μη αλλεργικούς ασθενείς που έλαβαν και δεν έλαβαν σετιριζίνη.

2.4. Συζήτηση

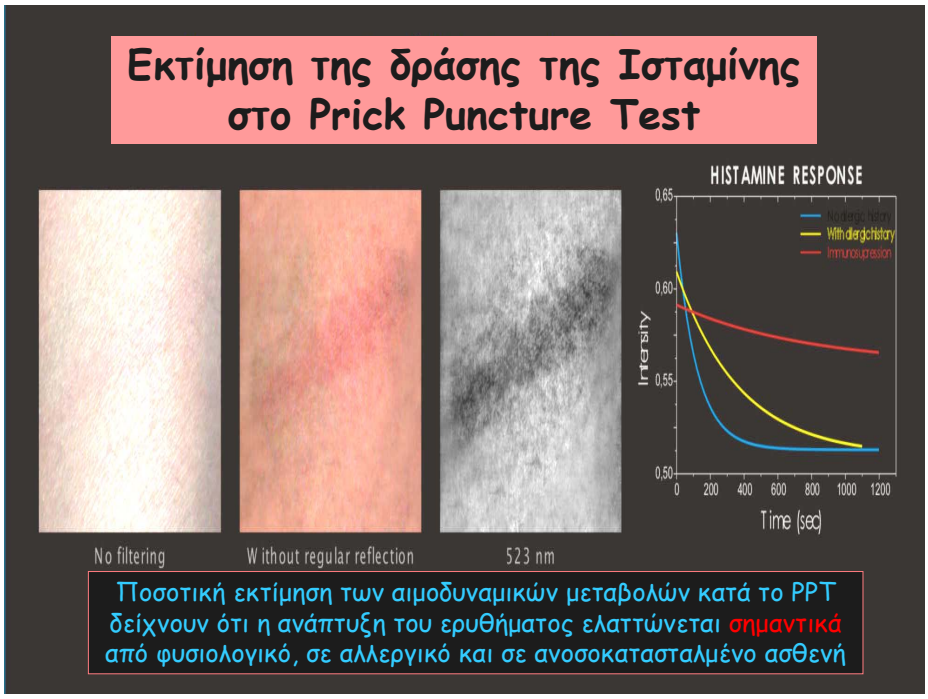
Το αναπτυσσόμενο σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιήσαμε επιτρέπει λοιπόν, τον ποσοτικό χαρακτηρισμό των χωρικών και κινητικών χαρακτηριστικών του σχηματισμού του ερυθήματος, σε διάφορες για τον οργανισμό κλινικές καταστάσεις. Κι όπως διάφορες καταστάσεις δίδουν συγκεκριμένη μορφή καμπύλης της έντασης του επανασκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο, με αντίστροφη λογική θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε κλινικά διάφορους ασθενείς, ανάλογα με την καμπύλη τους. Με παρόμοια λογική, θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε την δράση διαφόρων φαρμακευτικών παραγόντων, αλλά και να την συγκρίνουμε μεταξύ τους. Τέτοιο πεδίο θα μπορούσε να αποτελέσει για παράδειγμα η ομάδα των αντιισταμινικών. Έτσι, όπως φάνηκε από το πείραμά μας με την χορήγηση σετιριζίνης, τα αποτελέσματα σαφέστατα μπορεί να

είναι χρήσιμα για περαιτέρω έρευνες του φαρμάκου. Έρευνες καινοτόμες, που θα σχετίζονται με τις συστηματικές ιδιότητες του συγκεκριμένου φαρμάκου (και βεβαίως άλλων με παρόμοιες ιδιότητες).

Περαιτέρω, με το δύο σταδίων πείραμά μας αποδείξαμε ότι μπορούμε να δημιουργήσουμε μία βάση δεδομένων, που θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην εκτίμηση της ανοσολογικής κατάστασης εν γένει των διαφόρων ομάδων ανοσοκατασταλμένων ή καρκινοπαθών. Με τρόπο μάλιστα πολύ πιο οικονομικό από τις υφιστάμενες εργαστηριακές μεθόδους καθορισμού των.

Βεβαίως, θα πρέπει να τονισθεί η θεμελιώδης συνεισφορά της τεχνολογίας της πολυφασματικής απεικόνισης, που με ειδικό λογισμικό επιτρέπει την σύγχρονη αποθήκευση κι επεξεργασία εικόνων σε διάφορα μήκη κύματος. Η επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος βασίζεται στα φασματικά χαρακτηριστικά των κύριων ιστικών χρομοφόρων, όπως η μελανίνη ή η αιμοσφαιρίνη, ενώ το λογισμικό επιτρέπει τον ιδανικό φυσικό προσδιορισμό (physical modeling) των ποσοτικών εκείνων παραμέτρων που σχετίζονται και με την ιστική συγκέντρωση αυτών. Στην παρούσα ερευνητική δουλειά, η παράμετρος του σχηματισμού του ερυθήματος υπολογίζεται σε κάθε χωρικό σημείο της περιοχής ενδιαφέροντος. Όπως προαναφέρθηκε, η κινητική της ανάπτυξης του ερυθήματος είναι ύψιστης σημασίας. Και αυτό διότι αντανακλά -και στην συγκεκριμένη περίπτωση- την λειτουργία ενός κεντρικά δρώντα νευρονικού άξονα, καθώς και ένα εντοπισμένο αγγειακό αντανακλαστικό, κι όχι ένα απλό τοπικό φαινόμενο (όπως ο σχηματισμός του πομφού.

Επιστρατεύοντας το σύστημα αυτό επετεύχθη η ποσοτική καταγραφή των χωρικών και χρονικών χαρακτηριστικών του σχηματισμού του ερυθήματος κατά τρόπο επαναλήψιμο και αξιόπιστο. Η ποσοτικοποίηση των παραπάνω παραμέτρων παρέχει μια αντικειμενική μέθοδο μελέτης των αντιδράσεων του δέρματος στην ισταμίνη κατά το PPT τεστ καθώς και του νευρογενούς αξονικού αντανακλαστικού του σχηματισμού του ερυθήματος (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Εκτίμηση του PPT. Κλινική εικόνα σε αληθινό χρόνο στο monitor. Δυναμικές καμπύλες.

2.5. IN VIVO τεχνικές: δερματικά τεστ

Η διαδερμική μέθοδος και η επιδερμική μέθοδος του νηγμού (prick puncture test-PPT) είναι οι δύο συνηθέστερες μέθοδοι για τον έλεγχο των αντιγόνων. Η τελευταία προτιμάται λόγω της αναπαραγωγικότητας της, του χαμηλότερου κινδύνου συστηματικών αντιδράσεων, της μεγαλύτερης ειδικότητας της και της καλύτερης αποδοχής από τον ασθενή. Η μέθοδος του νηγμού είναι μια βασική δοκιμασία για την βιολογική προτυποποίηση των αλλεργιογόνων και στην εκτίμηση των μεταβολών της ευαισθησίας του δέρματος που οφείλονται στην θεραπεία της νόσου (σχήμα 10).

Σχήμα 10. Αναπαράσταση τεχνικής δερματικών δοκιμασιών.

Η συγκέντρωση της αλλεργιογόνου ουσίας που εκλύει την δημιουργία πομφού ίσο με αυτόν που προκαλείται από 1mg/ml ισταμίνης καθορίζει κατά γενική παραδοχή την ευαισθησία του δέρματος. Το σημείο εφαρμογής του τεστ (ράχη ή αντιβράχιο) καθαρίζεται και μια σταγόνα διαλύματος τοποθετείται στο δέρμα. Μια βελόνη η μια έτοιμη, ειδική για τον σκοπό αυτό συσκευή εισάγεται στο δέρμα διαμέσου του διαλύματος του αντιγόνου. Η διείσδυση είναι μόνο επιφανειακή και δεν θα πρέπει να προκληθεί αιμορραγία. Το αντιγόνο αφαιρείται 30 με 60 δευτερόλεπτα μετά τον νυγμό και γίνεται μέτρηση του ερυθήματος και του πομφού μετά από 15 λεπτά. Η ενδοδερμική δοκιμασία επιφυλάσσεται για ύποπτα αντιγόνα που όμως δεν δίνουν θετικά PPT test, δεχόμενοι έτσι ότι αυτή η τεχνική είναι περισσότερο ευαίσθητη αλλά λιγότερο ειδική. Κατά την δοκιμασία αυτή 20–50 μικρόλιτρα (0.02-0.05 ml) διαλύματος αντιγόνου ενίεται ενδομυϊκά και η περιοχή του πομφού και ερυθήματος υπολογίζεται 15 λεπτά αργότερα. Διάφορα συστήματα υπολογισμού έχουν επιστρατευθεί για να περιγράψουν τις αντιδράσεις πομφού και ερυθήματος, καθώς και τυχόν σχηματιζόμενα ψευδοπόδια. Και για τις δύο προαναφερθείσες τεχνικές, κατάλληλοι έλεγχοι απαιτούνται για να αποκλεισθεί η μη

αναφερόμενη λήψη αντιισταμινικών, να επιβεβαιωθεί η αντιδραστικότητα του δέρματος, και να αποκλεισθεί ο δερμογραφισμός. Η χρήση αδρανούς διαλύτη, ισταμίνης (0.01% ενδοδερμικά, 1% prick puncture), και κωδεΐνης (μιας μη ειδικής ουσίας που προκαλεί αποκοκκίωση) παρέχει θετικό και αρνητικό έλεγχο. Η ερμηνεία των δερματικών τεστ προϋποθέτει ότι η απάντηση στον διαλύτη είναι απούσα ή ελάχιστη (0 ως 2 mm) και η απάντηση στην ισταμίνη ή στην κωδείνη ή και στις δύο είναι παρούσα (8-10 mm ενδοδερμικά, 5-6 mm στο PPT). Επειδή συμβαίνουν κλινικά άσχετες θετικές, καθώς και ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις, είναι βασικό οι αντιδράσεις να ερμηνεύονται υπό το φως του κλινικού ιστορικού. Επιπροσθέτως τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι φρέσκα να έχουν αντιγονική δραστικότητα, ενώ τα τεστ να γίνονται με τον ορθό τρόπο. Εφόσον η διαδερμική χορήγηση συμπυκνωμένων αντιγόνων μπορεί να προκαλέσει πομφό και ερύθημα σε μεγάλο ποσοστό μη ευαίσθητων ατόμων, όσο ποιο αραιό είναι το διάλυμα που προκαλεί μια θετική αντίδραση, τόσο πιο πιθανό είναι το αντιγόνο να σχετίζεται κλινικά με την νόσο.

Μια άλλου τύπου δερματική δοκιμασία είναι η αντίδραση Prausnitz-Kustner. Αυτή χρησιμοποιείται σπάνια λόγω του κινδύνου πρόκλησης μόλυνσης. Κατά την δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται ορός από το άτομο του οποίου η ευαισθησία στο συγκεκριμένο IgE αντιγόνο πιθανολογείται. 0.05 με 0.10 ml από τον ορό του ασθενούς ενίεται ενδοδερμικά σε έναν μη αλλεργικό εθελοντή και το σημείο αυτό, καθώς και ένα σημείο ελέγχου δοκιμάζονται με αντιγόνο (0.02ml) 24 με 48 ώρες αργότερα. Το τεστ διαβάζεται σαν διαδερμικό τεστ. Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για ερευνητικούς σκοπούς και περιστασιακά για να εκτιμηθεί η υπερευαισθησία στα φάρμακα και τις τροφές αλλά έχει εγκαταλειφθεί. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί διέγερση του βρογχικού δένδρου ή ρινική για να καθορισθεί η αλλεργική αντιδραστικότητα. Αυτές οι τεχνικές όμως, γενικά υπολείπονται ευαισθησίας ή ακρίβειας, προκαλούν πιο συχνά συστηματικές αντιδράσεις, είναι ακριβές και μπορεί να συνοδεύονται από μη ειδική υπερευαισθησία, η οποία κάνει την ερμηνεία τους δύσκολη. Αυτές φυλάσσονται για ξεχωριστές περιπτώσεις. Μια και η δερματική αντίδραση σε ένα αντιγόνο παρουσιάζει μεγάλη σχέση με την αντιδραστικότητα του βρογχικού δένδρου τέτοια τεστ είναι γενικά πλεονάζοντα.

2.6. Αξιολόγηση PPT

2.6.1. Καταγραφή και ποσοτική ερμηνεία του φαινομένου του σχηματισμού του πομφού και της ανάπτυξης του ερυθήματος

Οι κύριες δερματικές αντιδράσεις σε διάφορα αντιγόνα περιλαμβάνουν τον σχηματισμό πομφού και την ανάπτυξη ερυθήματος. Αυτές οι δοκιμασίες δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας των αντιαλλεργικών φαρμάκων. Τα αντιισταμινικά συγκρίνονται στην βάση της ικανότητας τους να αναστέλλουν τον σχηματισμό του πομφού και του ερυθήματος στο δέρμα, από την επίδραση της ισταμίνης. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών εφαρμόζονται στον καθορισμό της γενικής αποτελεσματικότητας των διαφόρων αντιισταμινικών φαρμάκων.

Οι μηχανισμοί δημιουργίας αυτών των αντιδράσεων είναι ακόμα αμφιλεγόμενοι, μη ξεκάθαρα καθορισμένοι και πλήρως κατανοητοί. Πολλές ερευνητικές προσπάθειες και δοκιμασίες βρίσκονται σε εξέλιξη για τον καθορισμό επακριβών επιστημονικών κριτηρίων. Τα κυρίαρχα βέβαια ερωτήματα είναι το πώς σχηματίζεται ο πομφός και το ερύθημα, αλλά και το τι συνδέεται με την ανάπτυξή τους. Ταυτόχρονα είναι πολύ σημαντικό, η αντικειμενική καταγραφή και ποσοτική ερμηνεία του φαινομένου του σχηματισμού του πομφού και της ανάπτυξης του ερυθήματος.

Μερικά από τα ήδη γνωστά δεδομένα σχετικά με τον μηχανισμό δημιουργίας του πομφού και της ανάπτυξης του ερυθήματος, είναι:

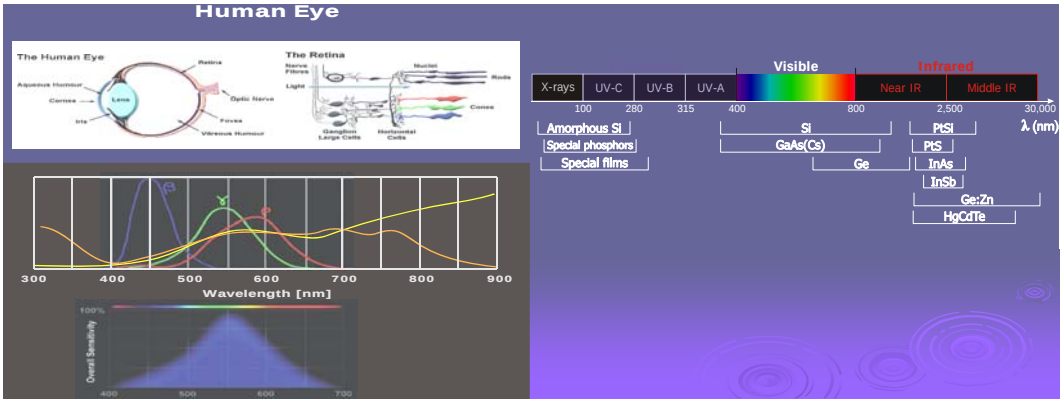
- Ο πομφός οφείλεται κυρίως στην άμεση δράση της ισταμίνης στα τοπικά αγγεία, ενώ ο σχηματισμός του ερυθήματος, που δημιουργείται στο σημείο ένεσης ισταμίνης, είναι ένα νευρογενές αντανακλαστικό που δεν αφορά την απελευθέρωση ισταμίνης στο άκρο της νευρικής απόληξης.
- Ο πομφός οφείλεται στην αύξηση της διαπερατότητας των τοιχωμάτων των μετατριχοειδικών φλεβιδίων και είναι ένα ανεξάρτητο φαινόμενο από τον σχηματισμό του ερυθήματος.
- Ο σχηματισμός του πομφού φαίνεται να συσχετίζεται με τον λογάριθμο του χρόνου παρά με τον ίδιο τον χρόνο. Ταυτόχρονα, η αύξηση του είναι τμηματική, όχι διαρκής κατά ακολουθία με την σταδιακή συμμετοχή των γειτνιαζόντων αγγειακών περιοχών.
- Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξάνεται στην περιοχή του πομφού, χωρίς όμως να παρατηρείται αύξηση στην περιοχή που περιβάλλει το ερύθημα. Το ερύθημα φτάνει την μέγιστη του έκταση σε 5 λεπτά, σε σύγκριση με τον πομφό που αποκτά το μέγιστο μέγεθος στα 20 λεπτά. Συνεπώς, η ευαισθησία της αντίδρασης του ερυθήματος είναι σαφέστατα μεγαλύτερη από ότι του σχηματισμού του πομφού σε χαμηλές δόσεις ισταμίνης.
- Η πορεία σχηματισμού του ερυθήματος από την επίδραση της ισταμίνης και η εξαφάνιση του μετρήθηκε και βρέθηκε να έχει χρόνο ημιζωής 5.4 λεπτά και 87 λεπτά αντίστοιχα. Ο χρόνος ημιζωής της αποδρομής του πομφού από διάλυμα NaCl 0,9 % και από τον ορό του αίματος συγκριτικά ήταν 18 και 28 λεπτά αντίστοιχα. Προτείνεται ότι η παραμονή των πομφών που προκαλούνται από την ισταμίνη οφείλεται σε αγγειοδραστικούς παράγοντες άλλους από την ισταμίνη.
- Η ισταμίνη προκαλεί μια ταχεία αύξηση στην αιματική ροή τόσο στην περιοχή σχηματισμού του ερυθήματος όσο και του πομφού, ενώ η αύξηση στην περιοχή του πομφού είναι σημαντικά μεγαλύτερη.
- Το άθροισμα του μήκους και πλάτους του ερυθήματος συσχετίζεται γραμμικά με τον λογάριθμο του αθροίσματος του μήκους και πλάτους του πομφού. Βάση αυτών των δεδομένων προτείνεται ένας πολύτιμος «δείκτης αντιδραστικότητας δέρματος». Ακόμα παραπέρα, η καμπύλη της απάντησης της δερματικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της δόσης αποδείχθηκε ευθεία γραμμή, τουλάχιστον στους μετρίου μεγέθους πομφούς.
- Η ερυθηματώδης αντίδραση διαμεσολαβείται μερικώς μέσω της νευρικής αντανακλαστικής δραστηριότητας, αφού φαίνεται να βελτιώνεται με την τοπική αναισθησία.
- Η επάλειψη του δέρματος με capsacaine πριν τον ερεθισμό του με νυγμό ισταμίνης αναστέλλει τον σχηματισμό του ερυθήματος.
- Η ένεση τοπικού αναισθητικού στο δέρμα περιορίζει την εξάπλωση του ερυθήματος αλλά δεν επηρεάζει την δημιουργία του πομφού.
- Υπάρχουν ενδείξεις ότι στο σχηματισμό του ερυθήματος λόγω της ισταμίνης εμπλέκονται τόσο οι Η1, όσο και οι Η2 υποδοχείς. Αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός του ερυθήματος που προκαλείται από την ισταμίνη είναι ένα έμμεσα διαμεσολαβούμενο νευραγγειακό φαινόμενο. Αυτό επετεύχθη επιδεικνύοντας ότι οι αγγειακές μεταβολές που συμβαίνουν στην περιοχή του ερυθήματος, δεν είναι συμβατές με την άμεση διέγερση των δερματικών αγγείων από την ισταμίνη και

επίσης δείχνοντας ότι το ερύθημα ελαττώνεται από τοπικούς αναισθητικούς παράγοντες.

- Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αγγειακό νευροαξονικό αντανακλαστικό οργανώνεται διαφορετικά στα διάφορα στρώματα του δέρματος.

Από τα ανωτέρω συμπεραίνεται, ότι: Οι ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι ερμηνείας των δερματικών αλλεργικών αντιδράσεων χρησιμοποιούν το συνυπολογισμό του μεγέθους τόσο του πομφού όσο και του ερυθήματος, η οποία όμως είναι μάλλον μια ανακριβής προσέγγιση, αφού υπάρχουν αρκετοί υποκειμενικοί παράγοντες που υπεισέρχονται και επηρεάζουν τα αποτελέσματα του PPT τεστ. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσαμε να σημειώσουμε μία σειρά από περιορισμούς στην συμβατική ερμηνεία του Prick Puncture Test:

- Η περιορισμένη δυνατότητα της ανθρώπινης όρασης και αντίληψης του φωτός (η οπτική παρατήρηση υποτιμά το μέγεθος του ερυθήματος) και η διαφορετική ερμηνεία των αντιδράσεων από διαφορετικούς εξεταστές (σχήμα 11).



Σχήμα 11. Το ανθρώπινο μάτι. Το ορατό φάσμα.

- Το μέγεθος του ερυθήματος είναι πιο σταθερό, ενώ το μέγεθος του πομφού εμφανίζει αξιοσημείωτες ποικίλες μεταβολές.
- Επίσης τα αποτελέσματα επηρεάζονται από τον όγκο και την δραστικότητα του ενιόμενου αλλεργιογόνου, τον βαθμό ευαισθητοποίησης των μαστοκυττάρων, καθώς και από την αντιδραστικότητα του δέρματος στους μεσολαβητές που απελευθερώνονται ως μέρος της τύπου Ι αλλεργικής αντίδρασης.
- Η ηλικία και η φυλή των ασθενών, η ώρα της εξέτασης, η πιθανή παρουσία αλλοιωμένων IgE και IgG λόγω προηγούμενης ανοσοθεραπείας, καθώς και η χορήγηση φαρμάκων μπορούν να οδηγήσουν σε μια παρερμηνεία των δοκιμασιών.
- Οι δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις υπόκεινται σε κιρκαδιανές μεταβολές. Σε ασθενείς με βαρύ νυχτερινό άσθμα έχουν παρατηρηθεί κιρκαδιανοί ρυθμοί στην δραστηριότητα των μαστοκυττάρων. Οι δε δερματικές αντιδράσεις στην ενδοδερμική χορήγηση ισταμίνης, στην οικιακή σκόνη και στα εκχυλίσματα γύρης ακολουθούν ένα προεξάρχον κιρκαδιανό πρότυπο, με άνοδο των αντιδράσεων το απόγευμα, κορύφωση

τους το βράδυ και με μια πρωινή έναρξη τους. Οι κιρκαδιανοί ρυθμοί της IgE σχετίζονται με εκείνους των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων όπως Β, Τ και Τ-κατασταλτικά κύτταρα. Η διερεύνηση των κιρκαδιανών μεταβολών στις αντιδράσεις του δέρματος οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα των δερματικών τεστ που λαμβάνονται το απόγευμα μπορεί να είναι διαφορετικά από αυτά που λαμβάνονται νωρίς το πρωί και έτσι μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική εκτίμηση της ευαισθησίας του ασθενούς.

- Τα φυσιολογικά επίπεδα της κορτιζόλης του ορού μπορούν να επηρεάσουν την IgE εξαρτώμενη δερματική φλεγμονή επιδρώντας στην έκφραση των κυτταρικών συμβάντων στα σημεία των όψιμων αντιδράσεων.

2.6.2. Επιλεκτική συμπεριφορά ασθενών με ανοσοκαταστολή και καρκίνο στο PPT

Ένα άλλο πολύ σημαντικό ερώτημα είναι το εάν εμφανίζουν οι ασθενείς με κακοήθεια ή με ανοσοανεπάρκεια, διαφορετικές δερματικές αντιδράσεις σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Η σπουδαιότητα του ερωτήματος έγκειται στο γεγονός, ότι εάν αυτό είναι αληθές, μια που φαίνεται προφανές από την ίδιο τον μηχανισμό εμφάνισης του πομφού ή του ερυθήματος, αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικότατο δεδομένο έρευνας στην αντιμετώπιση του καρκίνου της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Διότι ο καρκίνος, σαφέστατα συνδιάζεται –σε διάφορα στάδια της εμφάνισής του- με έκπτωση της ανοσολογικής απάντησης. Και εδώ επίσης τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα.

- Αρκετοί συγγραφείς αναφέρουν μια χαρακτηριστική διαφοροποίηση των δερματικών αντιδράσεων στους καρκινοπαθείς. Σε καρκινοπαθείς με πρωτοπαθή όγκο με ή χωρίς μεταστάσεις, η επίπτωση και το μέγεθος του πομφού και του ερυθήματος είναι αξιοσημείωτα ελαττωμένες σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε ασθενείς στους οποίους είχε αφαιρεθεί ο πρωτοπαθής όγκος από διάστημα μικρότερο των πέντε εβδομάδων. Σε αντιπαραβολή, όταν η αφαίρεση του όγκου χρονολογείται για περισσότερο από δύο μήνες, οι δερματικές αντιδράσεις επανήλθαν σχεδόν στις φυσιολογικές τους τιμές. Ενδιάμεσες τιμές ελήφθήσαν σε ασθενείς μόνο με μεταστάσεις. Αυτή η ελάττωση στις δερματικές απαντήσεις στην ισταμίνη στους καρκινοπαθείς δεν οφείλεται σε περιφερική νευροπάθεια, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα ηλεκτροφυσιολογικών μελετών που δεν διέφεραν στους ασθενείς με καρκίνο. Η παρουσία ενός όγκου μιμείται τα αποτελέσματα της συστηματικής χορήγησης ανταγωνιστών των Η1 υποδοχέων στις δερματικές αντιδράσεις.
- Σε καρκινοπαθείς με πρωτοπαθή όγκο με ή χωρίς μεταστάσεις ή μόνο με μεταστάσεις, σε σύγκριση με υγιείς ασθενείς, η ελάττωση των επιπέδων ισταμίνης οφείλεται σε ελάττωση του συνολικού αριθμού των βασεοφίλων. Στους ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο χωρίς μεταστάσεις, τα επίπεδα ισταμίνης και ο ολικός αριθμός των βασεοφίλων είναι φυσιολογικός μετά την εκτομή του όγκου.
- Συγκριτικά με υγιή άτομα, οι ασθενείς με καρκίνο έχουν σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα ισταμίνης στο αίμα. Επίσης τα επίπεδα ισταμίνης στο αίμα σε ασθενείς με παρόντα όγκο είναι σημαντικά χαμηλότερα από ότι σε ασθενείς με εκτομηθέντα πρωτοπαθή όγκο. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν στο συμπέρασμα, ότι τα προοδευτικά ελαττούμενα επίπεδα ισταμίνης στο αίμα μπορεί να αποτελούν ένα καλό μη ειδικό δείκτη της έναρξης και προόδου συμπαγών κακοηθών όγκων.

- Μια προοδευτική ελάττωση των επιπέδων ισταμίνης στο αίμα προηγείται της κλινικής υποτροπής ή εντόπισης της μετάστασης. Σε ασθενείς με μη γαστροεντερικούς όγκους, τα επίπεδα ισταμίνης αίματος μπορεί να είναι περισσότερο χρήσιμα από ότι το CEA σαν δείκτης προόδου της νόσου.
- Οι ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν σημαντικά ηπιότερες όψιμες αντιδράσεις από αυτές της ομάδας των μαρτύρων, ενώ οι ασθενείς με ουραιμία ή σαρκοείδωση παρουσιάζουν φυσιολογικές αντιδράσεις. Συμπεραίνεται, ότι οι λεμφοκυτταρικές ανωμαλίες που προκαλούν διαταραχές στις επιβραδυνόμενου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας δεν επηρεάζουν την άμεση ή την όψιμη δερματική αντίδραση. Ο έλεγχος της όψιμης αλλεργικής αντίδρασης θα μπορούσε να αποτελέσει ένα καινούριο εργαλείο στην αξιολόγηση της ανοσολογικής κατάστασης ασθενών με καρκίνο.
- Η ανοσολογική κατάσταση σχετίζεται σημαντικά με το στάδιο της κακοήθους νόσου. Ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο παρουσιάζουν χαμηλότερη ανοσολογική απόκριση.
- Οι δερματικές αντιδράσεις επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας που εκλύονται κατόπιν επίδρασης με μια ουσία πολυαντιγονικής σύστασης υπολογισμένες αριθμητικά μπορεί να αποτελέσουν ένα επιπλέον προγνωστικό παράγοντα στους ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο της ορθοπρωκτικής χώρας.
- Πιθανές ερμηνείες για την ελαττωμένη δερματική αντίδραση στην κωδεΐνη στους ασθενείς με AIDS περιλαμβάνουν μια ελάττωση στην συγκέντρωση των μαστοκυττάρων τοπικά ή στην ικανότητα τους προς απελευθέρωση αγγειοδραστικών ουσιών. Αυτό υποδηλώνει ότι η προέλευση των αντιδράσεων υπερευαισθησίας που παρατηρούνται στους ασθενείς με AIDS είναι αρκετά απίθανο να σχετίζεται με την κνίδωση και να αφορά τα μαστοκύτταρα.

2.7. Εφαρμογές

Οι πιθανές εφαρμογές της προαναφερθείσας μεθόδου εκτίμησης της κινητικής της ανάπτυξης του ερυθήματος κατά το PPT είναι πολλαπλές:

- Τα ποσοτικά δεδομένα που συλλέγονται μπορούν να επιτρέψουν μια αντικειμενική προσέγγιση στους φυσιολογικούς μηχανισμούς, που σχετίζονται με το φαινόμενο της άμεσου υπερευαισθησίας και να εξυπηρετήσουν στην προτυποποίηση της κλινικής διάγνωσης.
- Η ερμηνεία του σχηματισμού του ερυθήματος με ένα ακριβή και αντικειμενικό τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αντιαλλεργικών φαρμάκων, από του στόματος ή συστηματικώς χορηγούμενα, καθώς και για την συγκριτική μελέτη τους. Σε μια τέτοια μελέτη θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν και φαρμακευτικοί παράγοντες που σχετίζονται με την μεταβολή της αιματώσεως στους βλεννογόνους της τραχηλοπροσωπικής χώρας και δυνητική αντιφλεγμονώδη δράση, όπως η πιρακετάμη, η φλουτικαζόνη και η βουτεζονίδη.
- Παρουσιάζεται επίσης η προοπτική της ανάπτυξης κάποιου είδους προγνωστικού ή και διαγνωστικού δείκτη κακοηθών νοσημάτων, που μπορεί να συνεισφέρει στην διάγνωση, στην παρακολούθηση (follow up) των ασθενών ή ακόμη και ως διαγνωστική δοκιμασία (screening test) μεγάλων ομάδων πληθυσμού με προδιαθεσικούς παράγοντες ανάπτυξης κακοήθους νόσου.

- Επίσης η ανοσολογική κατάσταση ενός ασθενούς θα μπορούσε να καθορισθεί κλινικά με την μέθοδο αυτή.
- Η ίδια δε η αναπτυχθήσα τεχνογνωσία, που συνδιάστηκε με την καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του φαινομένου της μεταβολής της κινητικής ενός ερυθήματος, είναι προφανές ότι μπορεί να συνδράμει σημαντικά στην επιτυχή επίτευξη της οπτικής βιοψίας. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, αν σκεφτούμε ότι με τις μετρήσεις μας επιτεύχθει για πρώτη φορά η δυναμική ως προς τον χρόνο αντικειμενική καταγραφή ενός τόσο πολύπλοκου φαινομένου.

3. Βιβλιογραφία

1. Aaronson DW. Comparative efficacy of H_1-antihistamines. Ann Allergy 67: 541-7, 1991.
2. Baelde Y, Dupont P. Cetirizine in children with chronic allergic rhinitis. A multicentre double-blind study of two doses of cetirizine and placebo. Drug Invest 4(6): 466-72, 1992.
3. Bagnato GF; Gulli S; Denuzzo G; Di Cesare E Sansotta C; D'Ambrosio FP; Vermiglio G. Measurement of allergen-induced skin reactions by computerized dynamic telethermography (CDTT). J Investig Allergol Clin Immunol 7(4):238-41, 1997.
4. Balas C. An imaging colorimeter for noncontact tissue color mapping. IEEE Trans Biomed Eng. 44(6):468-74, 1997.
5. Balas CJ, Themelis GC, Prokopakis EP, Orfanudaki I, Koumantakis E, Helidonis ES. In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics. J Photochem Photobiol B. 53(1-3):153-7, 1999.
6. Barbee RA, Brown WG, Kaltenborn W, Halonen M. Allergen skin-test reactivity in a community population sample: correlation with age, histamine skin reactions and total serum immunoglobulin E. J Allergy Clin Immunol 68(1): 15-9, 1981.
7. Burtin C, Noirot C, Giroux C, Scheinmann P. Decreased skin response to intradermal histamine in cancer patients. Allergy Clin Immunol 78(1 Pt 1): 83-89, 1986.
8. Burtin C, Noirot C, Paupe J, Scheinmann P. Decreased blood histamine levels in patients with solid malignant tumours. Br J Cancer 47(3): 367-72, 1983.
9. Bousquet J, Lebel B. Antiallergic activity of H_1-receptor antagonists assessed by nasal challenge. J Allergy Clin Immunol 82: 881-7, 1988.
10. Carey C, Clark M, Lopez-Gil JA, Vere DW. The basis of the histamine assay in human skin: II. Wheal formation. ClinPharmacol 36(1): 39-43, 1993.
11. Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. Ann Allergy Asthma Immunol 83(5): 471-5, 1999.
12. Cook J, Shuster S. Histamine weal formation and absorption in man. Br J Pharmacol 69(4): 579-85, 1980.
13. Coligan JE. In: Current protocols in immunology, New York, 1994, John Wiley & Sons.
14. Czarnecki D; Mar A; Kulinskaya E. Cell-mediated immunity of patients who have had basal cell carcinomas. Acta Derm Venereol 76(1): 28-30, 1996.

15. Darsow U, Ring J, Scharein E, Bromm B. Correlations between histamine-induced wheal flare and itch. Arch Dermatol Res 288(8): 436-441, 1996.
16. Di Nardo A, Seidenari S. Echographic evaluation with image analysis of histamine-induced wheals. Skin Pharmacol 7(5):285-90, 1994.
17. Echenique EM, Amondarain AJ, Liron de Robles Sanz C. Prognostic significance of delayed cutaneous reactivity in 5-year survival in colorectal cancer: a prospective study. Rev Esp Enferm Dig 87(12):843-8, 1995.
18. Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H. Structure-activity relationships for some substance P-related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin. J Physiol 335:449-65, 1983.
19. Forster C, Greiner T, Nischik M, Schmelz M, Handwerker HO. Neurogenic flare responses are heterogeneous in superficial and deep layers of human skin. Neurosci Lett 6; 185(1): 33-36, 1995.
20. Galoppin L, Noirot C, Wastiaux JP, Scheinmann P, Paupe J, Burtin C. Comparison between number of basophiles, blood histamine, and histamine release in cancer and noncancer patients. J Allergy Clin Immunol 84(4 Pt 1): 501-6, 1989.
21. Grant JA, Danielson L, Rihoux JP, DeVos C. A double blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, ebastine, epinastine, fexofenadine, terfenadine, and loratadine versus placebo: suppression of histamine-induced wheal and flare response for 24 h in healthy male subjects. Allergy 54(7): 700-7, 1999.
22. Gaultier C, De Montis G, Reinberg A, Motohashi Y. Circadian rhythm of serum total immunoglobin E (IgE) in asthmatic children. Biomed Pharmacother 41(4): 186-8, 1987.
23. Herrscher RF, Kasper C, Sullivan TJ. Endogenous cortisol regulates immunoglobulin E-dependent late phase reactions. Ann Allergy Asthma Immunol 80(4):329-32, 1998.
24. Izumi H, Karita K. Investigation of mechanisms of the flare and wheal reactions in human skin by band method. Brain Res 449(1-2): 328-31, 1988.
25. Kurnick JT, Bhan AK, McCluskey RT. In: Analysis of cell mediated reactions. In Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, and editors: Diagnostic immunopathology, New York, Raven Press, 1995.
26. Lee RE, Smolensky MH, Leach CS, McGovern JP. Circadian rhythms in the cutaneous reactivity to histamine and selected antigens, including phase relationship to urinary cortisol excretion. Ann Allergy 38(4): 231-6, 1977.
27. Lopez LR; Noriega Y; Losno R. Immediate skin test reactivity to common aeroallergens in patients with respiratory allergies: a comparative analysis of allergen-induced skin reactions and their histamine controls. J Allergy Clin. Immunol. 81(6):1143-8, 1988.
28. Mann KV, Crowe JP, Tietze KJ. Non-sedating histamine H_1-receptor antagonists. Clin Pharm 8(5): 331-44, 1989.
29. Mc Graw and Hill. In: Harrison's principles of internal medicine 14th edition.
30. Monroe EW, Daly AF, Shalhoub RF. Appraisal of the validity of histamine-induced wheal and flare to predict the clinical efficacy of antihistamines. J Allergy Clin Immunol 99(2): S798-806, 1997.
31. Nischik M, Forster C. Analysis of skin erythema using true-color images. IEEE Trans Med Imaging 16(6): 711-716, 1997.
32. Nyren M, Ollmar S, Nicander I, Emtestam L. An electrical impedance technique for assessment of wheals. Allergy 51(12): 923-6, 1996.
33. Olin BR, editor. Drug facts and comparisons. St. Louis: Facts and Comparisons Inc, 1992: 188a.

34. Olsson P, Hammarlund A, Pipkorn U. Wheal-and-flare reactions induced by allergen and histamine: evaluation of blood flow with laser Doppler flowmetry. J Allergy Clin Immunol 82(2): 291-6, 1988.
35. Ownby DR. Computerized measurement of allergen-induced skin reactions. J Allergy Clin Immunol 69(6):536-8, 1982.
36. Petersen LJ, Church MK, Skov PS. Histamine is released in the wheal but not the flare following challenge of human skin in vivo: a microdialysis study. Clin Exp Allergy 27(3): 284-295, 1997.
37. Pipkorn U, Andersson M. Topical dermal anaesthesia inhibits the flare but not the weal response to allergen and histamine in the skin-prick test. Clin Allergy 17(4): 307-11, 1987.
38. Prokopakis EP, Balas CJ, Christodoulou PN, Gourtsoyiannis NC, Tosca AD, Helidonis ES Assessment of nasal mucosa blood supply by quantitative endoscopic imaging of the back-scattered light. Otolaryngol Head Neck Surg. 121(3):307-12, 1999.
39. Rose NR, de Macario EC, Fahey JL et al. In : Manual of clinical laboratory immunology, ed 4, Washington, DC, American Society of Microbiology, 1992.
40. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. N Engl J Med 333:431-440, 1995.
41. Sabolovic D, Dubravcic D, Culo F, Hadzic N. [Histamine levels in the blood in patients with malignant tumors]. Lijec Vjesn 111(6-7): 185-7, 1989.
42. Satoh T, Tahara E, Yamada T, Watanabe C, Itoh T, Terasawa K, Nagai H, Saiki I. Differential effect of antiallergic drugs on IgE mediated cutaneous reaction in passively sensitized mice. Pharmacology 60(2): 97-104, 2000.
43. Seery JP, Janes SM, Ind PW, Datta AK. Circadian rhythm of cutaneous hypersensitivity reactions in nocturnal asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 80(4): 329-32, 1998.
44. Serup J, Staberg B. Quantification of weal reactions with laser Doppler flowmetry. Comparative blood flow measurements of the oedematous centre and the perilesional flare of skin-prick histamine weals. Allergy 40(4):233-7, 1985.
45. Simonart T, Parent D, Heenen M, Farber CM, Van Vooren JP. Decreased skin reactivity to codeine in patients with the Acquired immunodeficiency syndrome. Clin Immunol Immunopathol 81(1): 12-5, 1996.
46. Simons FE, Simons KJ. Second-generation H_1-receptor antagonists. Ann Allergy 66: 5-15, 1991.
47. Skassa-Brociek W, Manderscheid JC, Michel FB, Bousquet J. Skin test reactivity to histamine from infancy to old age. J Allergy Clin Immunol 80(5): 711-6, 1987.
48. Stalenheim G, Hallgren R, Schmekel B. Early and late allergic skin reactions in T cell deficient patients. Allergol Immunopathol (Madr) 24(3): 106-11, 1996.
49. Stefanidou M, Tosca A, Themelis G, Vazgiouraki E, Balas C. In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins in basal cell carcinomas and actinic keratoses; implications for optimization of photodynamic therapy. Eur J Dermatol. 10(5):351-6, 2000.
50. Takiwaki H, Serup J. Variation in color and blood flow of the forearm skin during orthostatic maneuver. Skin Pharmacol 7(4): 226-230, 1994.
51. Tierney, Mc Fee, Papadakis Appleton and Lange. In: Current medical diagnosis and treatment 1998.

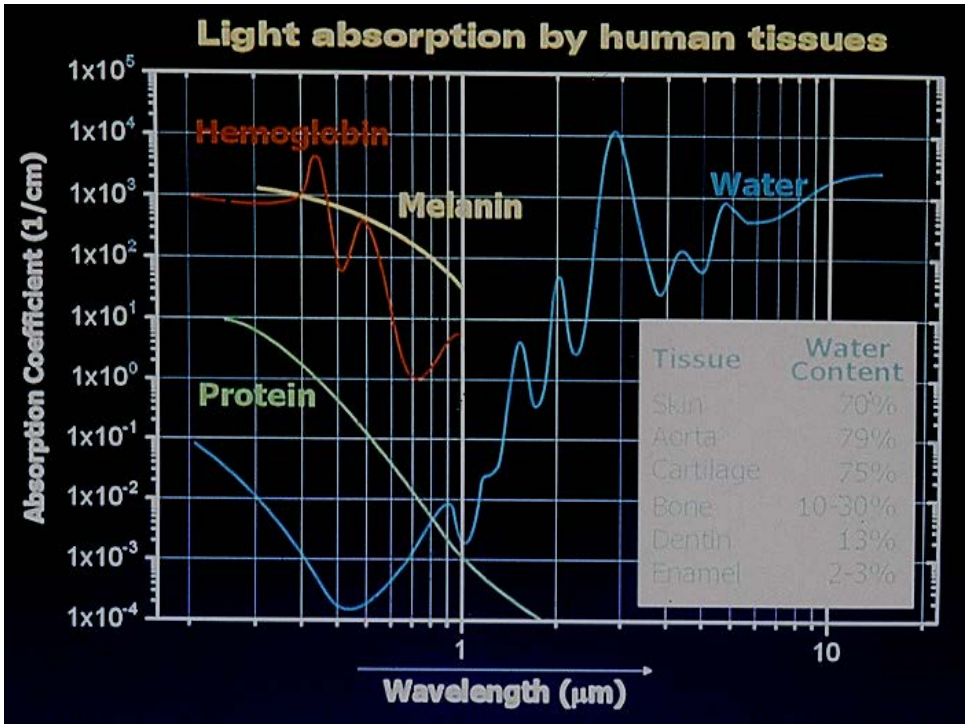
52. Triantafillidis JK, Papatheodorou K, Kogevinas M, Manoussakis K, Nicolakis D. Prognostic factors affecting the survival of operated patients with colorectal cancer: significance of delayed hypersensitivity skin reactions and nutritional status. Ital J Gastroenterol 27(8): 419-24, 1995.
53. Tupker RA; Coenraads PJ; Fidler V; De Jong MC; Van der Meer JB; De Monchy JG. Irritant susceptibility and wheal and flare reactions to bioactive agents in atopic dermatitis. II. Influence of season. Br J Dermatol 133(3): 365-70, 1995.
54. Uematsu T, Takiguchi Y, Mizuno A, Sogabe K, Nakashima M. Application of thermography to the evaluation of the histamine skin test in man. J Pharmacol Methods 18(2):103-10, 1987.
55. van der Zee JS, de Groot H, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Discrepancies between the skin test and IgE antibody assays: study of histamine release, complement activation in vitro, and occurrence of allergen-specific IgG. J Allergy Clin Immunol 82(2): 270-81, 1988.
56. Van Neste D. Skin response to histamine dry skin prick test: influence of duration of the skin prick on clinical parameters and on skin blood flow monitoring. J Dermatol Sci 1(6):435-9, 1990.
57. Vichyanond P, Nelson HS. Circadian variation of skin reactivity and allergy skin tests. J Allergy Clin Immunol 83(6): 1101-1106, 1989.
58. Voorhorst R; Van Krieken. Atopic skin test re-evaluated. III. The wheal: flare ratio, the log-dose response curve and the bioassay of allergen extracts. Han Allergy 34(2): 77-86, 1975.
59. Woodward DF. Studies on histamine-induced cutaneous flare in the guinea pig. Actions 13(1): 35-44, 1983.
60. Zuber J, Kruszewski J, Zmija J, Klosowicz S, Jung A. Use of thermographic methods for estimation of skin prick test results. II. Evaluation of skin prick test results with histamine solutions of different concentration using liquid crystal mixtures. Pneumonol Alergol Pol 64(3-4):123-31, 1996.

Δ. ΠΟΛΥΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΥΜΠΑΝΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ, ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΠΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΗΣ

1. Δομικά χαρακτηριστικά τυμπανικής μεμβράνης - Παθολογία μέσου ωτός
2. Μεθοδολογία και περιγραφή του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης
3. Πλεονεκτήματα του αναπτυχθέντος απεικονιστικού συστήματος
4. Εφαρμογές
5. Βιβλιογραφία

1. Δομικά χαρακτηριστικά τυμπανικής μεμβράνης - Παθολογία μέσου ωτός

Η παθολογία του μέσου ωτός περιλαμβάνει καταστάσεις, όπως διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις, με ή χωρίς υγρό, σχηματισμό χολοστεατωμάτων, καθώς και ύπαρξη αγγειακών όγκων. Η διαφανοσκόπηση της τυμπανικής μεμβράνης σε συγκεκριμένη περιοχή του υπερύθρου μπορεί να συνεισφέρει στην άμεση κλινική ή διεγχειρητική εκτίμηση της κοιλότητος του μέσου ωτός, χωρίς τα μειονεκτήματα και περιορισμούς των υπαρχουσών τεχνικών απεικόνισης. Με την βοήθεια συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης μελετήθηκαν αναλυτικά οι οπτικές ιδιότητες των συστατικών της ανθρώπινης τυμπανικής μεμβράνης, in vitro και in vivo, αφού προηγουμένως είχε επακριβώς μελετηθεί το μήκος κύματος της απορρόφησης των κυριοτέρων συστατικών των ανθρωπίνων ιστών (σχήμα 1). Ταυτόχρονα, διερευνήθηκαν κι επεξηγήθηκαν οι παράμετροι που συσχετίζονται με αυτές τις ιδιότητες.



Σχήμα 1. Η απορρόφηση του φωτός από τα πιο συνήθη συστατικά των ιστών του ανθρωπίνου σώματος.

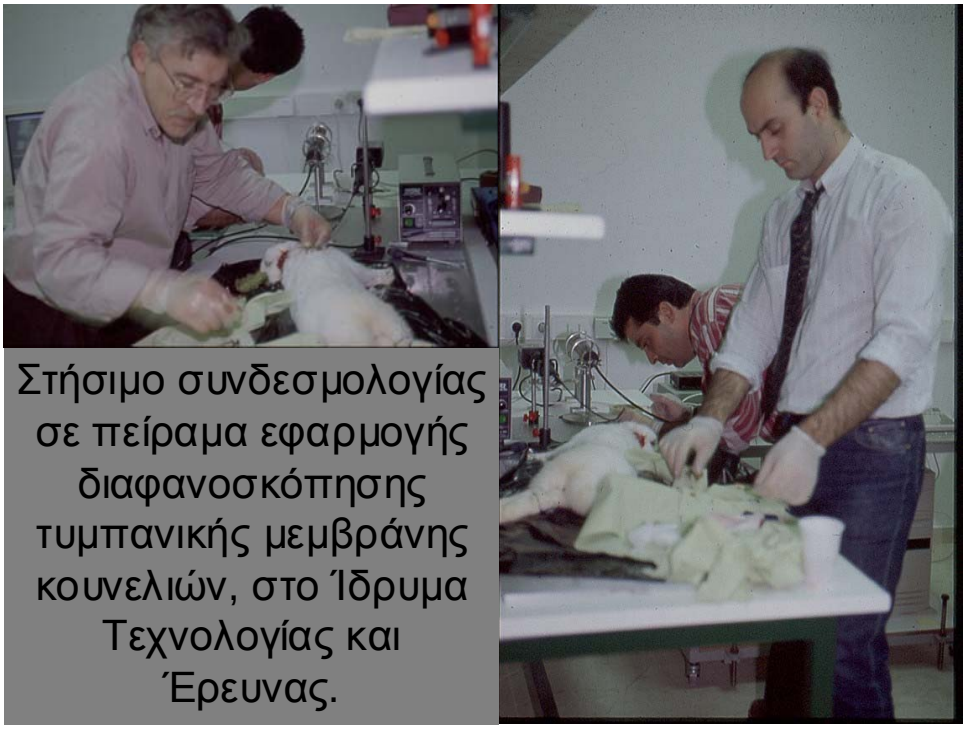
Η διαγνωστική προσέγγιση των παθολογικών καταστάσεων του μέσου ωτός περιλαμβάνει πέρα από την ολοκληρωμένη ωτορινολαρυγγολογική κλινική εκτίμηση με συνοδή λήψη καλού ιστορικού, έναν πλήρη απεικονιστικό έλεγχο. Τα τελευταία χρόνια και μετά την είσοδο της αξονικής αλλά και της μαγνητικής τομογραφίας, η ακρίβεια των προεγχειρητικών διαγνώσεων έχει αυξηθεί. Η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας σε τομές των 1-1.5 χιλιοστών είναι η απεικονιστική μέθοδος εκλογής για την κατανόηση των οστικών ανατομικών αλλοιώσεων της κοιλότητος και όχι μόνο, του μέσου ωτός. Ωστόσο, η προσλαμβανόμενη ακτινοβολία, όπως επίσης κι η αδυναμία της μεθόδου να αποκαλύψει δυναμικές και μηχανικές αλλοιώσεις, όπως για παράδειγμα την καθήλωση των ακουστικών οσταρίων, κάνουν την χρήση της μειονεκτική σε αρκετές περιπτώσεις. Με την σειρά της η μαγνητική τομογραφία με ή χωρίς σκιαστικό, παρόλο που είναι αρκετά ακριβής σε αλλοιώσεις των μαλακών ιστών αλλά και σε αγγειακούς όγκους, όχι μόνον σχεδόν πάντα έπεται της αξονικής τομογραφίας, αλλά χρειάζεται αρκετό χρόνο για να γίνει, ενώ το κόστος της είναι μεγάλο. Επίσης, τόσο η αξονική όσο και η μαγνητική τομογραφία προϋποθέτουν νοσοκομειακή υποδομή. Είναι λοιπόν φανερή η αναγκαιότητα ανάπτυξης συστήματος απεικόνισης του μέσου ωτός που με μειωμένο κόστος και σε περιβάλλον εξωτερικού ιατρείου, αλλά και χωρίς την λήψη ακτινοβολίας θα δύναται να συνεπικουρήσει στην κλινική διάγνωση, αλλά και να βοηθήσει στην εκτίμηση και καταγραφή των μεταβολών, που χρονικά συνδέονται με την εξέλιξη μιας πάθησης. Κατά αυτόν τον τρόπο και η θεραπευτική προσέγγιση, όσον αφορά το απεικονιστικό της υπόστρωμα δεν θα βασίζεται αποκλειστικά στην ύπαρξη ορισμένων φιλμς, αλλά θα αναζητά την χορηγία τους μόνον όταν αυτό κρίνεται σκόπιμο από τον κλινικό ιατρό.

2. Μεθοδολογία και περιγραφή του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης

Η μελέτη περιελάμβανε αρχικώς τον καθορισμό του συντελεστή απορρόφησης της φωτεινής δέσμης, από:

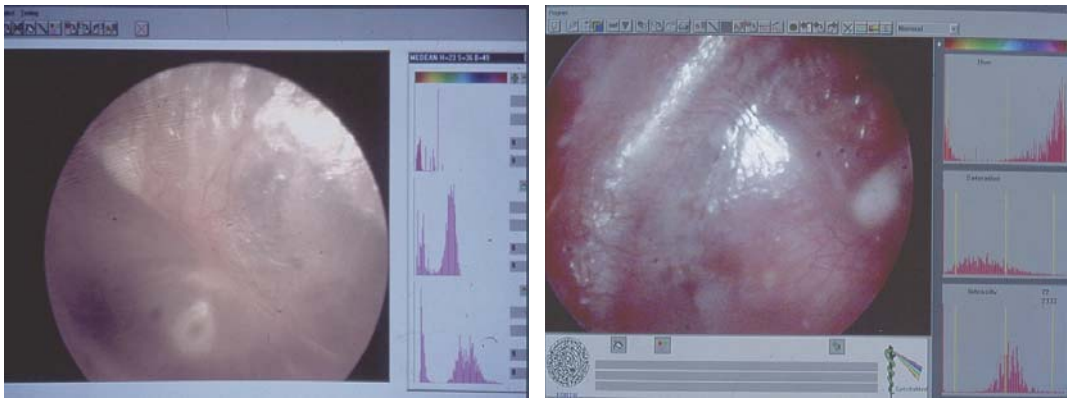
1. Τυμπανικές μεμβράνες πειραματόζωων (κουνέλια). Χρησιμοποιήθηκαν τυμπανικές μεμβράνες από επτά πειραματόζωα (εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα οι μεμβράνες μελετήθηκαν in vivo και ύστερα από την ενδοφλέβια χορήγηση pentothal. Βάση των αρχικών αυτών μετρήσεων, έγινε δυνατή η οργάνωση της συνδεσμολογίας αλλά και του ειδικού λογισμικού.
2. Τυμπανικές μεμβράνες νεκροτομικών παρασκευασμάτων (κροταφικά οστά). Χρησιμοποιήθηκαν τυμπανικές μεμβράνες από 22 ανθρώπινα κροταφικά οστά (εικόνα 2). Τα κροταφικά όστα είχαν διατηρηθεί σε φορμόλη και ήταν μέρος των 68 οστών ιδιοκτησίας του συγγραφέα της παρούσης διατριβής.
3. Τυμπανικές μεμβράνες σε ζώντες προεπιλεγμένους εθελοντές. Χρησιμοποιήθηκαν 25 εθελοντές, συνεργάτες του ΙΤΕ και ειδικευόμενοι της ΩΡΛ κλινικής του ΠΑΓΝΗ (σχήμα 2).

Αρχικώς επετεύχθη η χαρτογράφηση των διαφορών απορρόφησης στην επιφάνεια της Τ.Μ., καθώς κι η αναγνώριση των συντελεστών απορρόφησης των επί μέρους στοιχείων αυτής, όπως αγγεία, κολλαγόνο, κ.λ.π. Ακολούθησε ο καθορισμός των παραμέτρων της φωτεινής δέσμης για την δυνατόν υψηλότερη ευκρίνεια στον έλεγχο των ανατομικών στοιχείων του μέσου ωτός, δια μέσω της Τ.Μ. Επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της δυνατότητος προσαρμογής της συνδεσμολογίας της διαφανοσκόπησης σε απλά συμβατικά φορητά ενδοσκόπια-ωτοσκόπια, για εφαρμογή στην καθημέρα κλινική πράξη. Τέλος η μελέτη περιελάμβανε την εκτίμηση της δυνατότητος επέκτασης των εφαρμογών της διαφανοσκοπησης, στην εκτίμηση παθολογικών καταστάσεων άλλων οργάνων, οργανικών συστημάτων ή ιστών, όπως εκτίμηση δερματικής, βλεννογονικής, υποδόριας ή υποβλεννογόνιας παθολογίας, κ.ά.



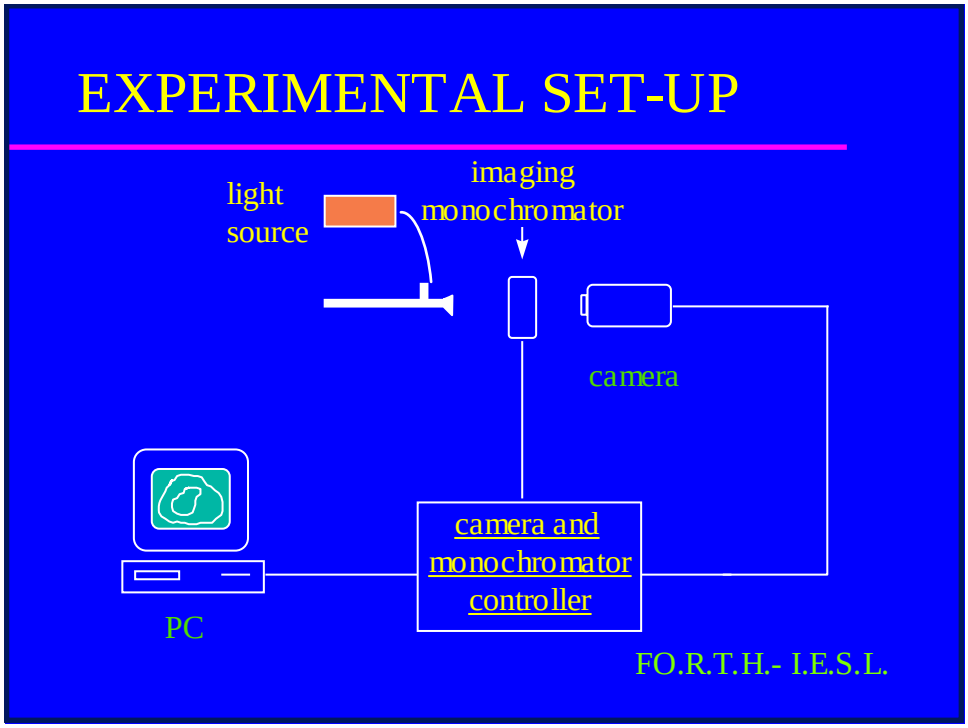
Εικόνα 1. Περιβάλλον εργασίας στο ΙΤΕ. Πείραμα με τυμπανικές μεμβράνες κουνελιών. (Παν. Χριστοδούλου, Κων. Μπάλας, Εμμ. Προκοπάκης)

Εικόνα 2. Αποσπασθείσα τυμπανική μεμβράνη από ανθρώπινο κροταφικό οστό.



Σχήμα 2. Η εμφάνιση των παραμέτρων της απόχρωσης, του κορεσμού και της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός σε ανθρώπινες τυμπανικές μεμβράνες, στο ορατό φάσμα. Οι ενδείξεις εμφανίζονται με μορφή ιστογράμματος στο δεξιό τμήμα της οθόνης του υπολογιστή και λαμβάνουν διάφορες τιμές ανάλογες της κατάστασης της μεμβράνης.

Έχουμε αναπτύξει ένα σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης, που συνδυάζει τεχνικές απεικόνισης και ταυτόχρονης απόλυτης χρωματικής μέτρησης ιστικών αλλοιώσεων. Το σύστημα προσφέρει αντικειμενικά μετρήσιμη δισδιάστατη χρωματική πληροφορία, χωρίς τους περιορισμούς των υπαρχόντων απεικονιστικών συστημάτων, όπως αυτοί που παρουσιάζονται στα συμβατικά χρωματόμετρα. Το σύστημα αυτοβαθμονομείται σε όλες τις συνθήκες φωτισμού και είναι δυνατόν να προσαρμοσθεί σε οποιοδήποτε οπτικοαπεικονιστικό σύστημα, όπως μικροσκόπια ή ενδοσκόπια. Έτσι, δεν υπάρχουν περιορισμοί ανατομικής εντόπισης ή διαστάσεων του υπό εξέταση ιστού. Η παρεχόμενη ψηφιακή ενδοσκοπική απεικόνιση είναι δυνητικά βαθμονομούμενη και διορθωμένη σε πραγματικό χρόνο κατά την διάρκεια της εκτίμησης. Η ποσοτικοποίηση της χρωματικής πληροφορίας γίνεται για κάθε οπτικό σημείο (pixel) της υπό εξέταση περιοχής. Λόγω της ποικιλομορφίας του χρώματος των βιολογικών υλικών, η χρωματική ταυτοποίηση βασίζεται σε υπολογιστικά παραγόμενα χρωματικά οπτικά ιστογράμματα, με την χρήση στατιστικών παραμέτρων. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας αυτά τα ιστογράμματα σε συνδυασμό με ειδικούς οπτικούς αλγορίθμους, η εικόνα δυνατόν να διαμερισματοποιηθεί ανάλογα με κοινά χρωματικά ανά περιοχή χαρακτηριστικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λήψη μιας χρωματομορφής του ιστού και τον ακριβή οπτικό του χαρακτηρισμό (σχήμα 2).



Σχήμα 3. Συνδεσμολογία απεικονιστικού συστήματος.

Η πολυφασματική απεικόνιση αποτελεί συνδυασμό απεικόνισης και φασματοσκοπίας, σε ένα φασματικό παράθυρο που εκτείνεται από το υπεριώδες έως το υπέρυθρο. Σε κάθε φασματική περιοχή είναι δυνατή η λήψη απεικόνισης, ενώ σε κάθε σημείο είναι δυνατή η καταγραφή πλήρους φάσματος. Τα τρία φασματικά παράθυρα που το σύστημα παρέχει απεικονίσεις είναι το υπεριώδες (300-400nm), το ορατό (380-750nm) και το υπέρυθρο (700nm-1.5μm).

Το απεικονιστικό σύστημα που χρησιμοποιούμε αποτελείται από (σχήμα 3):

1. CCD ψυχόμενη camera UV enhanced.
2. Φωτισμό μέσω οπτικών ινών με γεωμετρία 45°, ώστε να αποφεύγονται οι ανακλάσεις.
3. Σύστημα φίλτρων με filter wheel που καθορίζουν το φασματικό παράθυρο απεικόνισης.
4. Ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό, μέσω του οποίου καθορίζονται οι λειτουργίες του συστήματος.

Η διαφοροποίηση των απεικονίσεων και κατά συνέπεια το είδος των λαμβανομένων πληροφοριών οφείλεται στις μεταβολές κατά την αλληλεπίδραση φωτός-ιστού των ακολούθων παραμέτρων:

1. Απορρόφησης της ακτινοβολίας.
2. Σκέδασης.
3. Βάθους διείσδυσης.

<u>Οι χρωματικοί παράμετροι στον χώρο είναι τρεις:</u>

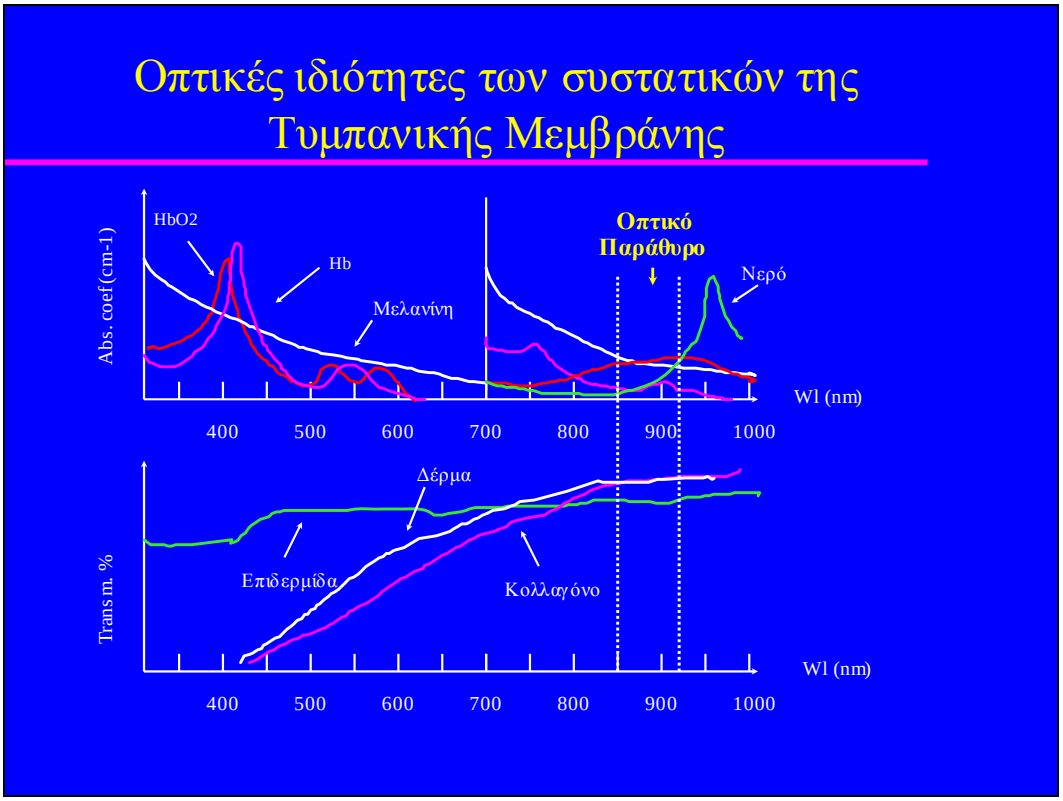
1. *Απόχρωση (Hue):* Εκφράζει το επικρατέστερο μήκος κύματος ενός χρώματος. Οι τιμές που λαμβάνει είναι από 0 έως 360. Στον χρωματικό κύκλο αναφέρονται σε μοίρες.
2. *Κορεσμός (Saturation):* Εκφράζει την καθαρότητα της απόχρωσης, δηλαδή την καθαρότητα σε σχέση με άλλες προσμείξεις (πχ άσπρο). Έτσι, δύο όμοια σχετικά με την απόχρωση χρωματικά ερεθίσματα, που σημαίνει ίδιο επικρατές μήκος κύματος, δυνατόν να έχουν διαφορετικού βαθμού πρόσμιξη άσπρου και συνεπώς διαφορετικό κορεσμό. Οι τιμές που λαμβάνει ο κορεσμός είναι από 0 έως 100.

3. *Ένταση (Intensity ή Lightness):* Εκφράζει την φωτεινότητα του χρώματος σε σχέση με το άσπρο. Οι τιμές που λαμβάνει η φωτεινότητα είναι από 0 έως 100.

3. Πλεονεκτήματα του αναπτυχθέντος απεικονιστικού συστήματος

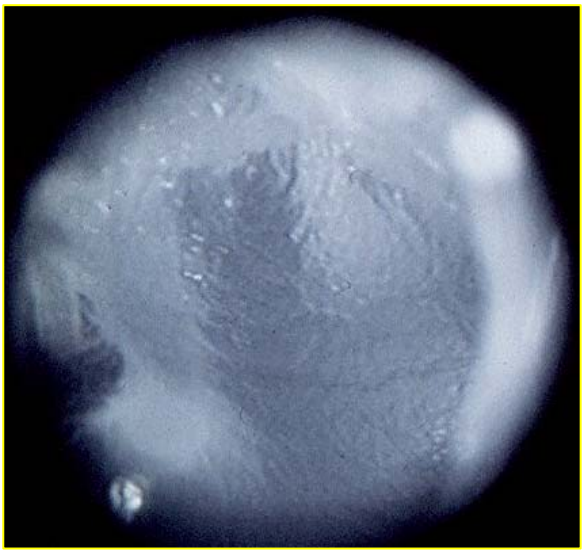
Με δεδομένη την σε βάθος παρατήρηση και συνδυάζοντας ψηφιακές και φασματοσκοπικές τεχνικές, γίνεται δυνατή η επιλεκτική απεικόνιση της κατανομής της αιμάτωσης. Το σύστημα επιτρέπει την αντικειμενική ποσοτική επαναλήψιμη μέτρηση και χαρτογράφηση των χρωματικών χαρακτηριστικών της περιοχής ενδιαφέροντος, ανεξάρτητα από τις συνθήκες φωτισμού, επιτρέποντας την ποσοτική μέτρηση και διάκριση άνω των 16 εκατομμυρίων χρωμάτων. Αυτό είναι χρήσιμο για την ποσοτική αξιολόγηση και παρακολούθηση των χρωματικών αλλοιώσεων, που επιφέρουν οι διάφορες παθήσεις, καθώς και για την τυποποίηση της κλινικής διάγνωσης. Οι δυνατότητες αυτές παρέχονται για πρώτη φορά διεθνώς και συνεπώς η αξιοποίησή τους κλινικά και ερευνητικά θα οδηγήσει στην εισαγωγή νέων διαγνωστικών κριτηρίων. Η διαγνωστική παρατήρηση διενεργείται επί της με μεγάλη πιστότητα ψηφιακά ανακατασκευασμένης εικόνας της περιοχής ενδιαφέροντος, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα της άμεσης ενημέρωσης του ασθενούς και της αξιολόγησης της πάθησης όχι μόνο από έναν, αλλά από ομάδα ιατρών. Με το τρόπο αυτό το σύστημα μπορεί να συνεισφέρει, εκτός των άλλων, και στην εκπαιδευτική διαδικασία. Τα χρωματικά χαρακτηριστικά της εικόνας αναπαράγονται με μεγάλη επαναληψιμότητα, επιτρέποντας την συγκριτική παρατήρησή της με επόμενες εικόνες, οι οποίες λαμβάνονται για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πάθησης και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του επιλεγέντος θεραπευτικού σχήματος. Το σύστημα επιτρέπει την ταυτόχρονη εισαγωγή, ψηφιοποίηση, επεξεργασία, αποθήκευση και συγκριτική αξιολόγηση εικόνων, από ενδοσκόπιση. Η ανάπτυξη του συστήματος βρίσκεται σε φάση υψηλής ολοκλήρωσης, μια και οι διαδικασίες βαθμονόμησης, φασματικής παρατήρησης και μέτρησης χρώματος είναι αυτοματοποιημένες. Συνεπώς δεν απαιτούνται ειδικές γνώσεις και ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιεί όλες ή μέρος των δυνατοτήτων που παρέχει το σύστημα.

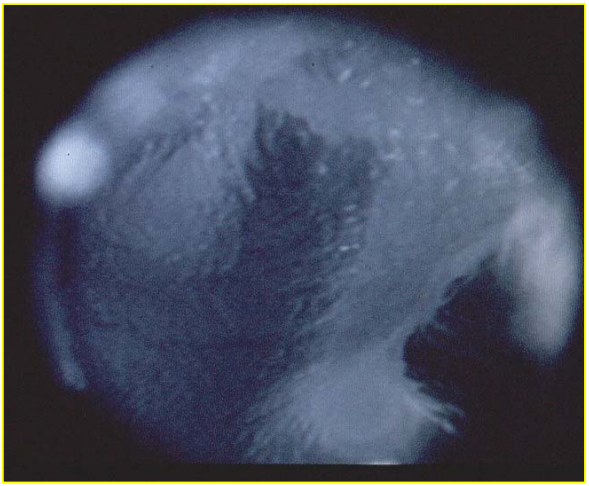
Κατά την απεικόνιση στο υπέρυθρο, που επί το πλείστον μας ενδιαφέρει στην συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται εκμετάλλευση των οπτικών ιδιοτήτων των συστατικών της τυμπανικής μεμβράνης. Η τυμπανική μεμβράνη αποτελείται από τρία στρώματα. Το πρώτο είναι συνέχεια του δέρματος του έξω ακουστικού πόρου. Το δεύτερο αποτελείται από δύο στιβάδες κολλαγόνων ινών, ενώ το τρίτο στρώμα αποτελεί την συνέχεια του βλεννογόνου του μέσου ωτός. Είναι δε σημαντικό να σημειωθεί ότι το πάχος του δεύτερου στρώματος αποτελεί πάνω από το 90% του όλου πάχους της τυμπανικής μεμβράνης και συνεπώς είναι σχεδόν αποκλειστικά υπεύθυνο για το αντιληπτό σήμα από τον ανθρώπινο οφθαλμό. Στην χαλαρά μοίρα της τυμπανικής μεμβράνης απουσιάζουν οι δύο στιβάδες του κολλαγόνου. Τόσο στο πρώτο, όσο και στο τρίτο στρώμα της τυμπανικής μεμβράνης υπάρχουν αρκετά αιμοφόρα αγγεία. Η μελέτη των μηκών κύματος απορρόφησης αλλά και διαπερατότητος των ανατομικών συστατικών της τυμπανικής μεμβράνης, επιτρέπει την επιλογή του καταλλήλου μήκους κύματος όπου αυτή γίνεται διαπερατή (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Οπτικές ιδιότητες της τυμπανικής μεμβράνης του ωτός, με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά των συστατικών της (κολλαγόνο, αιμοσφαιρίνη, νερό, μελανίνη). Ύπαρξη οπτικού παράθυρου στις περιοχές όπου υπάρχει ελάχιστη απορρόφηση και συνοδή μέγιστη διαπερατότητα του προσπίπτοντος φωτός.

Έτσι τα οστάρια αλλά και η κοιλότητα του μέσου ωτός είναι επισκοπίσημα στα μήκη κύματος από τα 870 έως τα 950 nm στην περιοχή του υπερύθρου φάσματος (εικόνα 4). Αυτήν την περιοχή καλούμε «οπτικό παράθυρο». Η συγκεκριμένη προεπιλογή μήκους κύματος εξαφανίζει το οπτικό σήμα της τυμπανικής μεμβράνης συντελώντας στην διαφανοσκόπησή της. Αναγνωρίζεται έτσι η συνδεσμολογία των οσταρίων αλλά και η ανατομία τους, ενώ είναι δυνατή η σύγχρονη εκτίμηση της κοιλότητας του μέσου ωτός σε αληθινό χρόνο, με μη επεμβατικό τρόπο.





Εικόνα 4. Διάφορες απεικονίσεις στο υπέρυθρο φάσμα, στην περιοχή του «οπτικού παράθυρου», δηλαδή από τα 870 έως τα 950 nm.

4. Εφαρμογές

Η διαφανοσκόπηση της τυμπανικής μεμβράνης (Τ.Μ.), με την βοήθεια της πολυφασματικής απεικόνισης είναι μία πειραματική προσπάθεια με ιδιαίτερη σημασία. Η σπουδαιότητα αυτού του τολμήματος έγκειται σε δύο διαφορετικές θεωρητικές προσεγγίσεις.

Η πρώτη είναι απόρροια των πλεονεκτημάτων που συνεπάγονται του γεγονότος ότι μπορούμε να επιτύχουμε μη επεμβατική απεικόνιση του μέσου ωτός, με μία καινοτόμο μέθοδο, τα πλεονεκτήματα της οποίας έχουν αναλυθεί σε άλλα χορία της παρούσης διατριβής. Η δεύτερη προσέγγιση έχει να κάνει με την ίδια την διαδικασία που προηγήθηκε του τελικού αποτελέσματος. Διαδικασία που εμπεριέχει τον συνδυασμό βασικών γνώσεων μικροσκοπικής ανατομικής ενός διακριτού ανθρώπινου οργάνου, όπως είναι η Τ.Μ., με τις αρχές της πολυφασματικής απεικόνισης. Διότι το τελικό αποτέλεσμα της απεικόνισης, προυποθέτει μια σαφή γνώση των φασματικών ιδιοτήτων των μικροσυστατικών της Τ.Μ., έτσι ώστε να υπάρξει η μέγιστη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων των αναπτυχθέντων συστημάτων πολυφασματικής απεικόνισης. Επιπλέον τούτου, οι συνεχείς δοκιμές προς την επίτευξη του τελικού σκοπού, συνέβαλαν στην εκ των έσω βελτίωση των επιμέρους μηχανημάτων, τεχνικών και υπολογιστικών αλγορίθμων. Η έκβαση του επιχειρήματος ήταν ένα πολύ ουσιαστικό βήμα, που μας έπεισε για την περαιτέρω εφαρμογή των αποκτηθέντων γνώσεων σε αυτό που ονομάζεται οπτική βιοψία, μια που για πρώτη φορά έγινε <u>συνειδητή προεπιλογή μήκους κύματος απεικόνισης βάση των συγκεκριμένων οπτικών ιδιοτήτων των συστατικών ενός ανθρώπινου ιστού.</u>

Η τελική απεικόνιση στο υπέρυθρο αν και ενδεχομένως δυσνόητες αρχικά, θα πρέπει συνειρμικά να φέρει στον εξεταστή εικόνες ανάλογες των απεικονίσεων που εκλαμβάνονται κατά την διενέργεια εξετάσεων, όπως το υπερηχογράφημα ή ίσως των αξονικών ή και των μαγνητικών τομογραφιών. Είναι εικόνες που απεικονίζουν το μέσω ους κατά τρόπο διαφορετικό από αυτό που ο κλινικός ιατρός βλέπει διεγχειρητικά ή στο περιβάλλον του εξωτερικού ιατρείου, μια που μιλάμε για απεικόνιση στο υπέρυθρο. Με την ίδια λογική λοιπόν, που οι υπερηχοτομογραφικές εικόνες της καρδιάς επεξηγούνται με κατάλληλο τρόπο από τον εξεταστή, βάση της απαραίτητης από αυτόν γνώση της δεδομένης ανατομίας των υπό εξέταση οργάνων, αλλά και της φυσικής της μεθόδου απεικόνισης, έτσι και οι εικόνες του μέσου ωτός με το υπέρυθρο, μέλλει να επεξηγηθούν και να ερμηνευτούν ανάλογα, μια που πρόκειται για αληθινή απεικόνιση χωρίς το οπτικό σήμα της Τ.Μ..

Ασφαλώς, η μελλοντική βελτίωση της παραγώμενης εικόνας, όπως για παράδειγμα η εφαρμογή της έγχρωμης υπέρυθρης απεικόνισης ή η βελτίωση της συνδεσμολογίας, θα αποτελέσουν στο εγγύς μέλλον πεδίο συνεχιζόμενης εργαστηριακής και εφαρμοσμένης κλινικής μελέτης. Η αποκτηθήσα όμως γνώση από αυτή την πρόδρομη σειρά πειραμάτων ήταν όπως προαναφέρθηκε ιδιαίτερα σημαντική για την συνέχεια: την διενέργεια του οπτικού χαρακτηρισμού προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

5. Βιβλιογραφία

1. Balas C. An imaging colorimeter for noncontact tissue color mapping. IEEE Trans Biomed Eng 44:468-474, 1997.
2. Shaffer SA, Kanade T. Color vision. In: SC Shapiro, editor. Encyclopedia of Artificial Intelligence. John Wiley & Sons New York, 1987:124-131.
3. Russ JC. Acquiring images. In: The image processing handbook. 2nd ed. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1995:1-75.
4. Wyszecki G, Stiles WS. Colorimetry. In: Color science. Concepts and methods, quantitative data and formulae. 2nd ed. John Wiley & Sons New York. 1982:117-248.

Ε. IN VIVO ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΗΣ ΤΡΑΧΗΛΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ

1. Οπτική βιοψία-οξικό οξύ
2. Αρχές φασματικής απεικόνισης
2.1. Αλληλεπίδραση φωτός-ιστού
2.2. Πολυφασματικό απεικονιστικό σύστημα
2.3. Ρυθμιζόμενα Φίλτρα Υγρών Κρυστάλλων
2.4. Διαδικασία βαθμονόμησης
2.5. Η μέτρηση του φασματικού κύβου
3. Διεγχειρητική χαρτογράφηση και διάγνωση
4. Πλεονεκτήματα του αναπτυχθέντος απεικονιστικού συστήματος
5. Κλινικές εφαρμογές
6. Συμπεράσματα
7. Βιβλιογραφία

1. Οπτική βιοψία-οξικό οξύ

Τα τελευταία χρόνια οι διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν αποτελέσει τη βάση για μια υψηλού επιπέδου ερευνητική δραστηριότητα κατευθυνόμενη προς την ανάπτυξη νέων μη επεμβατικών τεχνολογιών, για την διαγνωστική των ιστικών αλλοιώσεων, συχνά αποκαλούμενη ως «οπτική βιοψία». Η οπτική βιοψία είναι φαινομενικά ένας όρος οξύμωρος, αφού ο όρος «βιοψία» αναφέρεται στην αφαίρεση ιστικού τεμαχίου, ενώ ο όρος «οπτική» υπονοεί ότι δεν αφαιρείται ιστός. Ο στόχος της οπτικής βιοψίας είναι να εξαλειφθεί η ανάγκη για χειρουργική αφαίρεση ιστοτεμαχίων μέσω της συμβατικής βιοψίας, που συνοδεύεται ασφαλώς με χειρουργική πράξη. Ταυτόχρονα, επιχειρείται η παροχή μιας μορφής φασματοσκοπικής ανάλυσης του υπό εξέταση ιστού, που να καταχωρείται in vivo, σε βάση δεδομένων, με την βοήθεια ενός σχεδιασμένου συστήματος απεικόνισης. Αυτό συνεπάγεται την επίτευξη διάγνωσης που βασίζεται σε συγκεκριμένες οπτικές μετρήσεις. Ο σκοπός αυτών των απεικονιστικών συστημάτων είναι να παρέχουν in situ, μη επεμβατική, άμεση διαγνωστική ιστική ταυτοποίηση. Αυτό βεβαίως συνεπάγεται το μειωμένο κόστος της διαγνωστικής προσέγγισης, που συμβάλλει σε ολικό μειωμένο κόστος φροντίδας υγείας ανά περίπτωση, ως συνέπεια της δυνητικής απουσίας της ιστολογικής εξέτασης σε παθολογοανατομικό εργαστήριο. Σε πολλές δε περιπτώσεις, το κέρδος είναι ακόμα μεγαλύτερο ως συνέπεια της εξάλειψης της ανάγκης για προετοιμασία του χειρουργικού περιβάλλοντος, που απαιτείται για τη λήψη δειγμάτων βιοψίας. Περαιτέρω, η αμεσότητα της διαγνωστικής ενημέρωσης μπορεί να μειώσει το συναισθηματικό τραύμα, που υφίσταται ο ασθενής περιμένοντας την απάντηση.

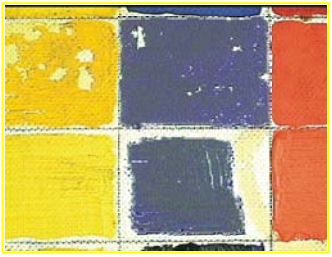
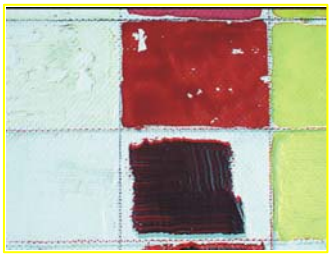
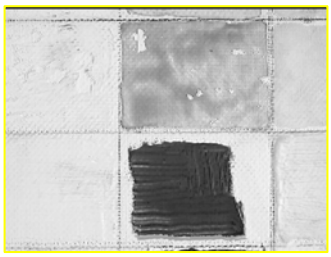
Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι τα διάφορα φασματοσκοπικά σημεία μπορεί να υποδηλώνουν βιοχημικές μεταβολές, που συχνά υποκρίπτουν μακροσκοπικές μορφολογικές αλλαγές, που όμως συνδυάζονται με διαφορετική ιστολογική εικόνα. Αλλά

το πιο σημαντικό από όλα είναι ότι η πληροφορία, που προσφέρεται από τη φασματοσκόπηση, είναι ποσοτική και επομένως μπορεί να φέρει έναν επιπρόσθετο βαθμό αντικειμενικότητας στη διαγνωστική διαδικασία της υπό μελέτη νοσολογικής οντότητας, εκεί όπου η παθολογοανατομική εκτίμηση είναι εκ φύσεως αμιγώς ποιοτική και για το λόγο αυτό οδηγεί αρκετές φορές προς μια προκατειλημμένη ερμηνεία.

Διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση ιστικών αλλοιώσεων. Όλες όμως μοιράζονται μια κοινή αρχή: το συγκεκριμένο οπτικό φάσμα ή το ιστικό δείγμα πρέπει περιέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιοχημική σύσταση και/ή τη δομή του ιστού. Μεταβολές σε αυτά τα χαρακτηριστικά ως αποτέλεσμα της νόσου οδηγούν σε μεταβολές στο οπτικό σήμα, με τρόπο που παρέχει τέλεια ευαισθησία και ειδικότητα, ένα γεγονός που επιτρέπει σε αυτές τις τεχνικές να χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση τόσο του καρκίνου, όσο και των προκαρκινικών-δυσπλαστικών βλαβών. Περαιτέρω, η φασματοσκοπική τεχνολογία μπορεί να παρέχει δυναμική ως προς το χρόνο απεικόνιση της εξέλιξης της νόσου, να περιγράφει μοριακά φαινόμενα που οδηγούν στη νόσο και συνεπώς να χρησιμοποιείται με σκοπό την παρακολούθηση των ασθενών κατά τη διάρκεια, αλλά και μετά τη θεραπεία, εκτιμόντας τελικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης το οποίο σχεδιάστηκε από το Τμήμα Ιατρικής Απεικόνισης, του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (Ι.Τ.Ε.), και χρησιμοποιείται για την κλινική έρευνα από το Τμήμα Ωτορινολαρυγγολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Κρήτης, ανταποκρίνεται σε όλες τις προαναφερθείσες αρχές, ξεπερνώντας όλες τις δυνατές παγίδες που ενδεχομένως συνοδεύουν τα μέχρι τώρα υπάρχοντα συστήματα απεικόνισης. Παρέχει πληροφορίες που αφορούν το χώρο και όχι απλώς σημεία, σε οπτικά φάσματα που εκτείνονται σε εύρος από το υπεριώδες ως το υπέρυθρο. Άμεση επαφή του οργάνου με τον υπό εξέταση ιστό δεν είναι αναγκαία και ολόκληρο το σύστημα μπορεί να ενσωματωθεί στα καθημερινώς χρησιμοποιούμενα κλινικά εργαλεία, όπως τα μικροσκόπια και τα ενδοσκόπια.

Οι σύγχρονες επισκοπικές και απεικονιστικές διαγνωστικές εφαρμογές στηρίζονται στην εξήγηση της πληροφορίας που αποκομίζουμε από αισθητήρες εικόνας. Τυπικά, αισθητήρες που προσαρτούνται σε οπτικά συστήματα (μικροσκόπιο, ενδοσκόπιο) έχουν σχεδιαστεί να εξομοιώνουν την ανθρώπινη όραση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό χρωματικής εικόνας στο οπτικό πεδίο, όμοια με αυτή που βλέπει το ανθρώπινο μάτι. Αυτό επιτυγχάνεται ανιχνεύοντας το φως σε τρία διαφορετικά φάσματα (κόκκινο, πράσινο, μπλε) μέσα στο ορατό φάσμα (380-750 nm). Ωστόσο, αυτός ο τρόπος ανίχνευσης του φωτός προκαλεί σημαντικούς περιορισμούς στην αναγνώριση και τον διαχωρισμό των ιστών, αν και ακόμη και όταν οι ιστοί έχουν τα ίδια ή παραπλήσια χρωματικά χαρακτηριστικά, η χημική τους σύνθεση είναι διαφορετική. Ένα ανάλογο παράδειγμα με υλικά παρόμοιας εμφάνισης παρουσιάζεται στην εικόνα 1.

α.  β.  γ. 

Εικόνα 1. Υλικά με παρόμοια εμφάνιση διαχωρίζονται ευκρινώς σε άλλα μήκη κύματος, λόγω διαφορετικής δομής. Η εμφάνιση διαφορετικών υλικών με παρόμοια χρωματική αντίληψη στο ορατό φάσμα (α), όπως φαίνονται με μηχανισμό ψευδοχρώματος στο υπέρυθρο (β) ή στο εγγύς υπέρυθρο (γ).

Πρόσθετες διαγνωστικές πληροφορίες μπορούν να αποκομιστούν αναπτύσσοντας νέες φασματικές και απεικονιστικές μεθόδους και συστήματα, ικανά να αποδώσουν βελτιωμένες διαγνωστικές πληροφορίες. Αυτά εντείνουν την δυνατότητα ανίχνευσης του ανθρώπινου οπτικού συστήματος τόσο σε επίπεδο ευαισθησίας όσο και σε επίπεδο ανάλυσης. Αυτό με τη σειρά του καθιστά δυνατή την ανίχνευση και το διαχωρισμό (φασματικά και χωρικά) διαφορετικών χαρακτηριστικών του ιδίου χρώματος, βασιζόμενο στις φασματικές διαφορές σε στενές φασματικές ζώνες μέσα και/ή έξω από το φάσμα του ορατού φωτός. Και τα δυο πεδία, απεικόνιση και φασματοσκοπία, συνεχίζουν να βελτιώνονται με τεχνολογικές καινοτομίες που επιτρέπουν γρήγορη συλλογή ανώτερης ποιότητας δεδομένων. Εξαιτίας αυτών των τεχνολογικών εξελίξεων, είναι πλέον δυνατόν να συνδυαστεί η απεικόνιση με την φασματοσκοπία σε ένα νέο επίπεδο, γνωστό ως φασματική απεικόνιση. Στην φασματική απεικόνιση, η φωτεινή ένταση καταγράφεται ως συνάρτηση του μήκους κύματος και της θέσεως. Το πλήθος των φασματικών περιοχών που είναι ικανό να παρέχει ένα σύστημα φασματικής απεικόνισης καθορίζει τον διαχωρισμό σε πολυφασματική (δεκάδες ζωνών) και υπερφασματική (εκατοντάδες ζωνών) απεικόνιση.

Η άμεση ανίχνευση και χαρτογράφηση των ιστικών ανωμαλιών αποτελούν την βάση της αποτελεσματικής και έγκαιρης αντιμετώπισης οποιασδήποτε παθολογικής διεργασίας. Στην καθημερινή κλινική πρακτική, υποκειμενικές και ποιοτικές εκτιμήσεις της υποκείμενης παθολογίας πραγματοποιούνται τόσο με την επισκοπική εξέταση, όσο και με πληθώρα διαθέσιμων απεικονιστικών μεθόδων.

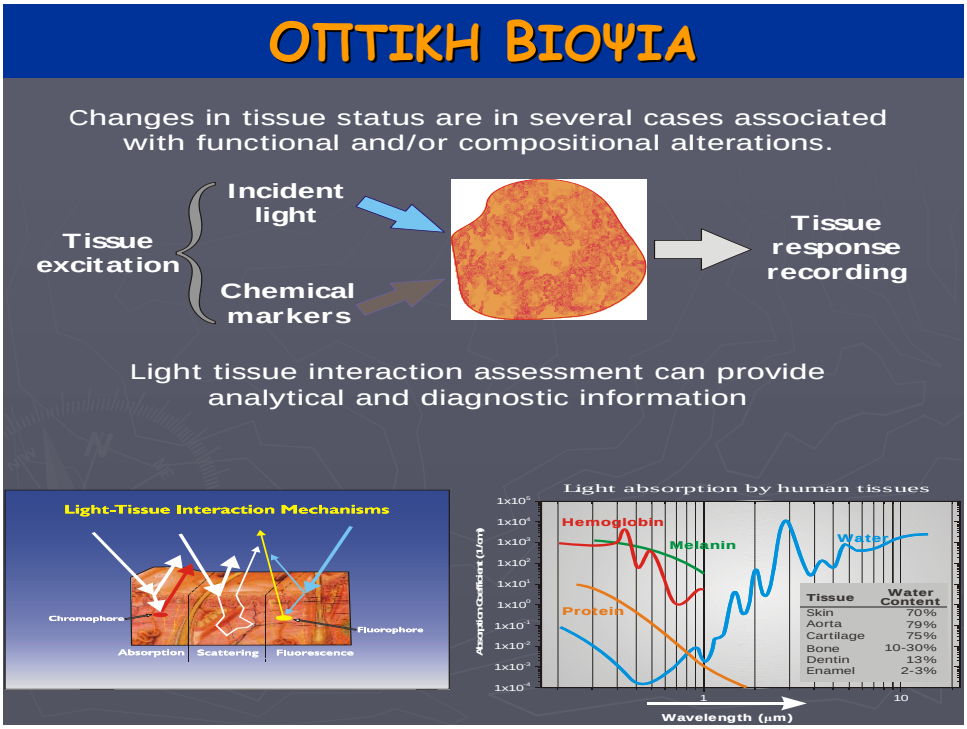
Όμως, οι προσβεβλημένες καρκινικές και προκαρκινικές περιοχές υπόκεινται αξιοσημείωτες δομικές και μεταβολικές αλλαγές κατά την εξέλιξη της νόσου, αναπτύσσοντας ειδικές αλλαγές στα οπτικά χαρακτηριστικά του ιστού. Οι αλλαγές αυτές, δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθούν μόνο με τις συνήθεις απεικονιστικές εξετάσεις.

Η ιστοπαθολογική εξέταση δειγμάτων βιοψίας αποτελεί μια πιο ακριβή μέθοδο για την αποτίμηση δομικών αλλαγών, οδηγώντας σε οριστική διάγνωση. Ωστόσο, παρότι θεωρείται καθιερωμένη μέθοδος και παρότι είναι γνωστή η ανομοιογένεια των παθολογικών ιστών, αυτή εξαρτάται εξολοκλήρου από τα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια που λαμβάνονται, τα οποία με τη σειρά τους βρίσκονται κάτω από τον υποκειμενικό έλεγχο του ιστοπαθολόγου. Έτσι, η ιστολογική διάγνωση βασίζεται στην υποκειμενική απεικονιστική ερμηνεία, απαιτεί πολύ χρόνο, κοστίζει, απαιτεί εντατική εργασία και δεν είναι ελεύθερη από λάθη που μπορεί να γίνουν κατά την ανάγνωση. Για να περιορίσουμε αυτά τά μειονεκτήματα, εφαρμόζουμε άμεσα διεγχειρητικά, επιπλέον απεικονιστικές τεχνικές, πριν τον καθορισμό της τελικής χειρουργικής θεραπείας.

Οι περιορισμοί των απεικονιστικών και ιστοπαθολογικών εξετάσεων ενισχύει την ανάγκη για την ανάπτυξη μιας καλύτερης, μη επεμβατικής διαγνωστικής μεθόδου, ικανής να ανιχνεύσει ιστικές ανωμαλίες στα αρχικά στάδια εκδήλωσης της νόσου. Θα έχει, επίσης

το πλεονέκτημα να μπορεί να αποτιμήσει την εξέλιξη της νόσου κατά τον επανέλεγχο, χωρίς να απαιτούνται πολλαπλές βιοψίες. Σήμερα, αρκετά κλινικά και ερευνητικά κέντρα έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην ανάπτυξη αυτού που ονομάζεται «οπτική βιοψία». Η οπτική βιοψία βασίζεται στο γεγονός, ότι οι αλλαγές της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ιστού κατά την εξέλιξη της νόσου, σε πολλές περιπτώσεις συνδέονται τόσο με λειτουργικές, όσο και με δομικές μεταβολές. Η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του φωτός με τον υπό εξέταση ιστό μπορεί να δώσει σπουδαία αναλυτική και διαγνωστική πληροφορία.

Περαιτέρω, θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι δυνατόν να διαχωριστεί ο φυσιολογικός από τον μη-φυσιολογικό ιστό χρησιμοποιώντας μεγάλο αριθμό παραγόντων σήμανσης (δείκτες) που εφαρμόζονται τοπικά ή χορηγούνται συστηματικά. Αυτοί οι παράγοντες σήμανσης ιστών αντιδρούν εκλεκτικά στις μεταβολικές και δομικές μεταβολές του ιστού, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διαφορετική ανακλαστικότητα και φθορισμό μεταξύ των φυσιολογικών και παθολογικών ιστών (σχήμα 1). Αρκετοί παράγοντες αύξησης της φωτεινής αντίθεσης αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης από μελετητές που ασχολούνται μ' αυτό το πεδίο. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται το οξικό οξύ, το μπλε της τολουίδης και οι φωτοαισθητήρες.



Σχήμα 1. Οι αλλαγές της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ιστού, σε πολλές περιπτώσεις συνδέεται τόσο με λειτουργικές, όσο και με δομικές μεταβολές. Η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του φωτός με τον υπό εξέταση ιστό μπορεί να δώσει σπουδαία αναλυτική και διαγνωστική πληροφορία.

Είναι γεγονός, ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του βαθμού και της έκτασης της σήμανσης του ιστού, ανάλογα του βαθμού κακοήθειας. Ωστόσο, στην κλινική πράξη, αυτή η διαφοροποίηση του διαχωρισμού δεν είναι χρήσιμη, από τη στιγμή που η στατική και ποιοτική αποτίμηση αυτών των δυναμικά μεταβαλλόμενων χαρακτηριστικών δεν είναι στο σύνολο τους αξιόπιστη. Για αυτό το λόγο, το διαγνωστικό πλεονέκτηματης χρήσης δεικτών είναι μόνο μερικώς εκμεταλλεύσιμο και κυρίως αποβλέπει στον καλύτερο

εντοπισμό των μη φυσιολογικών περιοχών, έτσι ώστε να πραγματοποιείται περισσότερο αποτελεσματική λήψη δειγμάτων προς βιοψία.

Προσανατολιστήκαμε στην χρήση δεικτών σε ύποπτες για καρκινικές ή προκαρκινικές αλλοιώσεις περιοχές της τραχηλοπροσωπικής χώρας, όπου με την βοήθεια της φασματικής απεικόνισης θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε οπτικά και μη επεμβατικά τον ιστό. Καταλήξαμε ότι το διάλυμα οξικού οξέος προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, σε σχέση με άλλους δείκτες. Στην ειδικότητα της Γυναικολογίας το οξικό οξύ έχει εμπειρικώς χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για περισσότερο από 75 χρόνια στην προσπάθεια εντόπισης παθολογικών περιοχών του ενδομητρίου και μέχρι τώρα δεν έχει παρατηρηθεί καμία επιπλοκή. Η τεχνική περιλαμβάνει την εναπόθεση διαλύματος 3 - 5% οξικού οξέος πάνω σε ύποπτες αλλοιώσεις, στο ενδομήτριο. Σε γενικές γραμμές, οι παθολογικές περιοχές «ασπρίζουν» ενώ ο φυσιολογικός ιστός δεν αλλάζει εικόνα. Πως όμως συμβαίνει αυτό; Εκ φύσεως, το επιθήλιο είναι διαφανές, επιτρέποντας έτσι το προσπίπτον φως να το διαπεράσει και να φτάσει στον υποκείμενο συνδετικό ιστό, ο οποίος με τη σειρά του απορροφά μέρος του φωτός και ανακλά πίσω κυρίως στο κόκκινο τμήμα του οπτικού φάσματος, έτσι ώστε ο τράχηλος να απεικονίζεται κόκκινος. Ύστερα από την εναπόθεση οξικού οξέος, οι σκεδαστικές οπτικές ιδιότητες του «ανώμαλου» επιθηλίου αλλάζουν, κατά τρόπο ώστε η σκέδαση να περιλαμβάνει ισόποσα όλα τα μήκη κύματος. Έτσι, το επιθήλιο γίνεται μη διαφανές, αφαιρώντας έτσι το σήμα από τον υποκείμενο συνδετικό ιστό. Συνεπώς, σε όλες τις περιπτώσεις τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας υπάρχει κάποιου βαθμού «άσπρισμα» εκτός κι εάν υπάρχει παρουσία κερατίνης. Η προηγηθήσα ερμηνεία είναι βέβαια εν πολλοίς μακροσκοπική και δεν υπεισέρχεται σε επαρκή μικρομοριακά δεδομένα εξήγησης του φαινομένου, αποτελεί δε μάλλον μία απλή θεωρητική προσέγγιση. Έτσι, παρόλο που η εφαρμογή οξικού οξέος είναι γνωστή για περισσότερο από επτά δεκαετίες, ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης του με τους επιθηλιακούς ιστούς δεν είναι γνωστός. Είναι δε σημαντικό να σημειωθεί, ότι έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες εξηγήσης του «ασπρίσματος» μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, ενώ έχουν δοθεί και διάφορες ερμηνείες.

Μία άλλη προσέγγιση εξήγησης του φαινομένου σχετίζεται με το ότι η εφαρμογή του οξικού οξέος προκαλεί ένα ήπιο οίδημα του ιστού, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί πήξη των κυτταρικών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η in vivo εφαρμογή του οξικού οξέος προκαλεί πήξη των νουκλεοπρωτεϊνών των κυττάρων με επακόλουθο το οίδημα αυτών. Έχει επίσης προταθεί ότι το «άσπρισμα» οφείλεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών μέσα στον πυρήνα των ανώμαλων κυττάρων. Ένα άλλο ερώτημα το οποίο πρέπει να απαντηθεί είναι η διαφορά της παρουσίας κυτοκερατινών μεταξύ των περιοχών που «ασπρίζουν» και αυτών που δεν «ασπρίζουν». Έχει βρεθεί για παράδειγμα, ότι η κυττοκερατίνη 10 είναι παρούσα περίπου στο 50% των περιοχών που «ασπρίζουν» και μόνο στο 3% των περιοχών που δεν «ασπρίζουν». Συνεπώς αυτό αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη ότι η παρουσία κυττοκερατίνης 10 είναι απαραίτητη για το «άσπρισμα» που παρατηρείται στις νεοπλαστικές αλλοιώσεις, τουλάχιστον στην περιοχή του ενδομητρίου. Η τεχνική της τοπικής εφαρμογής του οξικού οξέος αποτελεί λοιπόν, μία κλινική δοκιμασία της οποίας ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν έχει επακριβώς ερμηνευθεί.

Το γεγονός όμως το οποίο επιτρέπει την συλλογιστική της ευρείας χρήσης του οξικού οξέος και σε περιοχές άλλες απ' αυτές του τραχήλου της μήτρας είναι το ότι έχει προταθεί η συσχέτιση του βαθμού της έντασης του ασπρίσματος των ύποπτων περιοχών, σε σχέση με την ιστολογική διαφοροποίηση της βλάβης.

Όμως, η ανίχνευση και η διαφοροποίηση της νεοπλασίας μόνο με την οπτική παρατήρηση δια γυμνού οφθαλμού του «ασπρίσματος» του ιστού δεν είναι δυνατόν να είναι πάντα επιτυχής. Η διαδικασία «ασπρίσματος» είναι ένα δυναμικό, παροδικό και

αναστρέψιμο φαινόμενο, το οποίο είναι δύσκολο έως απίθανο να μπορεί να καταγραφεί με ακρίβεια, αποκλειστικά και μόνο με την απλή οπτική παρατήρηση. Μέχρι τώρα η διαγνωστική αξία της μεθόδου εξαρτάται απόλυτα από τη εμπειρία του εξεταστή, από την οπτική ικανότητα του, αλλά και από πλήθος άλλων παραγόντων που σχετίζονται με τις ιδιότητες του προσπίπτοντος στον ιστό φωτός, αλλά και από τις συνθήκες εξέτασης. Αυτό είναι περισσότερο εμφανές στα πρώιμα στάδια της νεοπλασίας, εκεί όπου το «άσπρισμα» του ιστού είναι ασθενέστερο και μπορεί εύκολα να μην γίνει αντιληπτό, όπως για παράδειγμα λόγω μίας μεγαλύτερης έντασης ανάκλαση της επιφάνειας της υπό εξέτασης περιοχής. Ακόμα, ο εξεταστής μπορεί να ξεγελαστεί από ορισμένες άτυπες επιθηλιακές αλλοιώσεις, όπως για παράδειγμα είναι οι διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, οι οποίες μπορεί επίσης να προκαλέσουν κάποιου βαθμού «ασπρίσματος», ύστερα από την τοπική εφαρμογή του οξικού οξέος. Παρόλο δε που αυτές οι καταστάσεις συνδέονται με διαφορετικού τύπου «ασπρίσματος» από αυτό των νεοπλασιών, δεν είναι δυνατόν αυτό να γίνει απόλυτα αντιληπτό απλώς και μόνο με την επισκόπηση δια γυμνού οφθαλμού.

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι από μόνη της, η απλή οπτική παρακολούθηση του φαινομένου του ασπρίσματος του ιστού δεν μπορεί να αποδώσει στον εξεταστή όλο το φάσμα των πληροφοριών που συνδέονται με τον μηχανισμό ασπρίσματος, ύστερα από την επίδραση οξικού οξέος πάνω σε ένα ύποπτο ιστό.

Είναι λογικό λοιπόν να περιμένουμε ότι η αποτελεσματική εκτίμηση των χαρακτηριστικών του ασπρίσματος (ευαισθησία–αντικειμενικότητα, προσωπικά χαρακτηριστικά), σε συνδυασμό με την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης οξικού οξέος – ιστού συνεπάγεται και την βελτίωση της διαγνωστικής πλέον προσέγγισης του τεστ οξικού οξέος. Είναι δε εμφανής, η σημαντική εφαρμογή που μπορεί να έχει αυτή η μέθοδος, στην εκτίμηση καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων στους βλεννογόνους της τραχηλοπροσωπικής χώρας ή ακόμα και σε άλλες βλεννογονικές επιφάνειες. Μοναδική ίσως προυπόθεση για την εφαρμογή, καταγραφή και ερμηνεία του φαινομένου του «ασπρίσματος» είναι η δυνατότητα επαρκούς απεικόνισης της υπό εξέταση περιοχής.

Η μελέτη μας αναπτύχθηκε ταυτόχρονα σε τρεις παράλληλους άξονες:

i. Τεχνολογική ανάπτυξη

Αφού ο αντικειμενικός σκοπός αυτής της μελέτης είναι η εισαγωγή καινούργιων διαγνωστικών οπτικών μεθόδων, καινούργια εργαλεία έπρεπε να αναπτυχθούν. Βασιζόμενοι στις νεότερες επιτεύξεις στο χώρο των Η/Υ και της βιομηχανίας οπτικών, καινοτόμες τεχνολογικές λύσεις εφαρμόστηκαν προκειμένου να ολοκληρωθεί η μελέτη. Αυτό φυσικά είχε αντίκτυπο και στην όλη θεώρηση της οπτικής βιοψίας γενικότερα. Ο τελικός σκοπός που είναι η ανάπτυξη καινοτόμων μηχανημάτων που να εξασφαλίζουν αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία στην διαγνωστική προσέγγιση των καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων ύστερα από εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος. Αυτό απαιτεί την ανάπτυξη μηχανημάτων που να παρέχουν αντικειμενική και ποσοτική πληροφορία καθώς επίσης χωρική και χρονική καταγραφή του όλου φαινομένου. Τα μηχανήματα θα πρέπει να πληρούν συγκεκριμένα κλινικά κριτήρια να είναι δηλαδή ευέλικτα, λειτουργικά, γρήγορα και εύκολα στην χρήση.

ii. Κλινικές μελέτες

Ο αντικειμενικός σκοπός των κλινικών μελετών είναι η εισαγωγή καινούργιων διαγνωστικών κριτηρίων στην ανίχνευση καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων, ύστερα από την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος. Συνεπώς η εισαγωγή καινοτόμων μηχανημάτων πρέπει να εξασφαλίζει σε μέγιστο βαθμό την εφαρμογή της νεοεισαγόμενης διαγνωστικής προσέγγισης. Περαιτέρω, η ανάλυση των κλινικών μελετών θα πρέπει στατιστικώς να συσχετίζει τα ειδικά χαρακτηριστικά του «ασπρίσματος» των παθολογικών

βλεννογόνων, με την υποκείμενη ιστολογία και συνεπώς να αυξάνει την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου συμβάλλοντας έτσι στην κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος με τον ιστό. Επίσης, οι εισαγόμενες καινοτόμες μέθοδοι θα πρέπει να είναι ασφαλώς επαναλήψιμες και ακριβείς.

iii. Θεωρητική μελέτη της μεθόδου

Η μελέτη του μηχανισμού αλληλεπίδρασης οξικού οξέος με ιστό είναι ουσιώδης για την εφαρμογή της διαγνωστικής μεθόδου που εισάγεται. Οι διάφοροι παράμετροι οι οποίοι συσχετίζονται με αυτό το άσπρισμα, όπως είναι ο βαθμός του μέγιστου ασπρίσματος, καθώς και η διάρκεια και η ταχύτητα με την οποία κάθε σημείο της ύποπτης αλλοίωσης φτάνει στον μέγιστο βαθμό, εξαρτώνται από πληθώρα μεταβολικών, δομικών και άλλων συστατικών χαρακτηριστικών του υπο εξέταση ιστού, τα οποία αλλοιώνονται κατά την διάρκεια ανάπτυξης κακοηθειών. Η συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων για τα χαρακτηριστικά των υπό εξέτασης ιστών αποτελεί γεγονός ύψιστης διαγνωστικής αξίας, που σαφώς συσχετίζεται με την αύξηση της ευαισθησίας και την ειδικότητα της προτεινόμενης μεθόδου. Περαιτέρω, η κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μπορεί δυνητικά να οδηγήσει στην περαιτέρω εξέλιξη της χρήσης της μεθόδου χρησιμοποιώντας άλλους, ενδεχομένως καλύτερους, πιο ευαίσθητους και πιο ειδικούς δείκτες. Αυτή η μελλοντική ανάπτυξη επιβάλλει την μελέτη της κινητικής και άλλων διαφόρων ουσιών στους βλεννογόνους της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

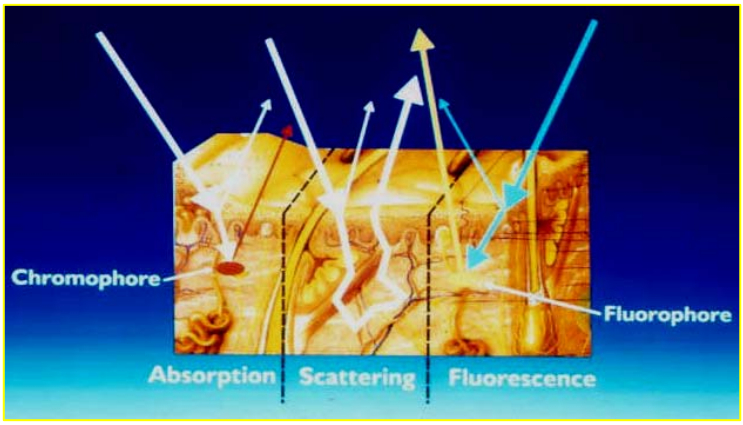
2. Αρχές φασματικής απεικόνισης

Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει το πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών τεχνικών, με σκοπό να επιτύχουν τον ποιοτικό και ποσοτικό διαχωρισμό της δυσπλασίας και της κακοήθειας από τον φυσιολογικό ιστό, χωρίς την αφαίρεση ιστού. Οι ιστοί περιέχουν αρκετά χρωμοφόρα και φθοροφόρα με διαγνωστική αξία, όπως η τρυπτοφάνη, η ελαστίνη, το κολλαγόνο, το νικοτινάμινο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NADH) και η φλαβίνη. Σε παθολογικές καταστάσεις οι σχετικές συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών μπορεί να διαφέρουν, έτσι ώστε διαδοχικά να παρουσιάζεται φασματική διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών ιστών. Αλλαγές στην σύνθεση του ιστού που συνδέονται με την παθολογία του μπορούν να καταγραφούν με μέτρηση σημάτων απορρόφησης, φθορισμού ή (ελαστικής ή μη ελαστικής) σκέδασης. Εκτεταμένες in-vitro και in-vivo μελέτες σε διάφορα οργανικά συστήματα έχουν επιτυχώς αποδείξει την δυνατότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού για τον διαχωρισμό μεταξύ φυσιολογικού και μη ιστού. Παρά το ότι έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις τα τελευταία χρόνια, η οπτική φασματοσκοπία δεν θεωρείται καθιερωμένη διαγνωστική μέθοδος. Η έρευνα σήμερα έχει στραφεί προς την ανάπτυξη μιας απεικονιστικής διαγνωστικής μεθόδου με βελτιωμένη ειδικότητα και ευαισθησία, που θα συνεισφέρει ουσιαστικά στην κλινική διαδικασία.

Σε αυτήν την κατεύθυνση πορεύτηκε η κοινή προσπάθειά μας, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας.

2.1. Αλληλεπίδραση φωτός-ιστού

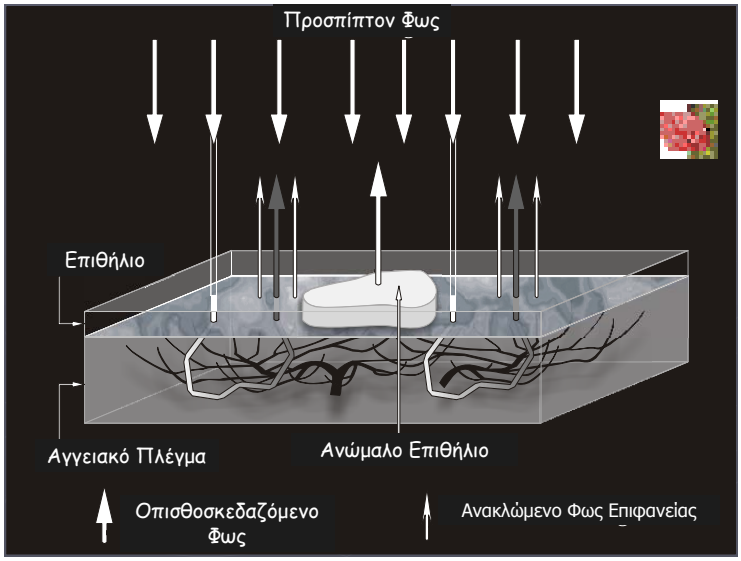
Οι οπτικές ιδιότητες των δύο επικαλυπτόμενων στρωμάτων του τραχηλικού ιστού, α) του επιθηλίου, και β) του συλλεκτικού ιστού (στρώμα), με το αγγειακό πλέγμα καθορίζουν την όλη μακροσκοπική εμφάνιση του ιστού, όταν σε αυτό το ιστικό δείγμα προσπίπτει φως (σχήμα 2).



Σχήμα 2. Διαδικασία απορρόφησης, σκέδασης, φθορισμού, κατά την αλληλεπίδραση φωτός-ιστού.

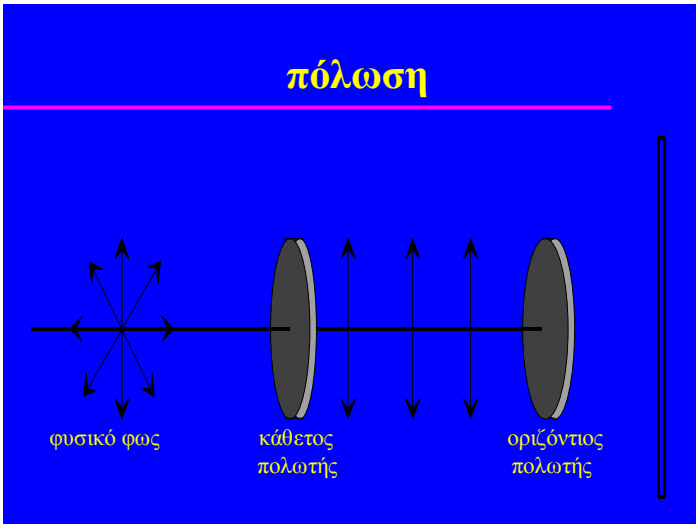
Ένα μέρος του φωτός που προσπίπτει στην συνοριακή επιφάνεια μεταξύ αέρα και βλέννας ή του επιθηλίου ανακλάται σε όλα τα μήκη κύματος, λόγω των μεγάλων διαφορών των δεικτών διάθλασης αυτών των μέσων. Το διερχόμενο φως, είτε απορροφάται, είτε σκεδάζεται από τα συστατικά του ιστού. Ένα μέρος των σκεδαζομένων φωτονίων επιστρέφει μαζί με το φως, λόγω ανάκλασης. Ανεξαρτήτως φυλής, φυσιολογικά και μη φυσιολογικά επιθήλια είναι σχεδόν διαφανή πριν την εφαρμογή του οξικού οξέος και οι οπτικές ιδιότητες του ιστού εξαρτώνται από τα φασματικά χαρακτηριστικά των μη απορροφημένων και οπισθοσκεδαζόμενων από το στρώμα του συνδετικού ιστού, φωτονίων. Η εφαρμογή του οξικού οξέος προκαλεί μία προοδευτική και αναστρέψιμη μεταβολή στις ιδιότητες σκέδασης του φωτός, από τα μη φυσιολογικά επιθήλια, ως αποτέλεσμα των υπαρχόντων δομικών και/η λειτουργικών αλλοιώσεων. Τα μη φυσιολογικά επιθήλια γίνονται προοδευτικά αδιαφανή και σκεδάζουν ισοπόσως όλα τα μήκη κύματος του προσπίπτοντος φωτός αλλάζοντας την ένταση και τα φασματικά χαρακτηριστικά των οπισθοσκεδαζόμενων φωτονίων από τον τράχηλο (σχήμα 3).

Αυτές οι μεταβολές παρέχουν ένα τρόπο για την ποσοτική εκτίμηση του φαινομένου. Το τελευταίο μπορεί να γίνει με την μέτρηση της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (Intensity of the Back Scattered Light-IBSL) ως συνάρτηση τόσο του χρόνου, όσο και του μήκους κύματος σε κάθε χωρικό σημείο μίας περιοχής ενδιαφέροντος. Για να καθοριστεί η φασματική περιοχή στην οποία καταγράφεται η μέγιστη διαφοροποίηση των ιδιοτήτων σκέδασης απαιτείται φασματική ανάλυση περιοχών του ιστού, που έχουν επηρεαστεί από το οξικό οξύ, αλλά και του μη επηρεασμένου επιθηλίου. Ο όρος μη επηρεασμένο επιθήλιο χρησιμοποιείται για να περιγράψει την έλλειψη λεύκανσης του ιστού, είτε επειδή ο δείκτης -δηλαδή το οξικό οξύ- δεν έχει εφαρμοστεί τοπικά είτε διότι ο ιστός δεν ανταποκρίνεται στον δείκτη.



Σχήμα 3. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης προσπίπτοντος φωτός με τον ιστό.

Η επιλογή αυτής της φασματικής περιοχής είναι ουσιαστική, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί τόσο η αντίθεση μεταξύ αυτών των περιοχών, όσον και ο λόγος σήματος χωρίς θόρυβο, στις καταγραφόμενες καμπύλες της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η μεγιστοποίηση αυτών των παραγόντων απαιτεί επίσης την αφαίρεση της κανονικής ανάκλασης (frenel reflection), αφού έχει όμοια φασματικά χαρακτηριστικά με αυτά του ασπρισμένου επιθηλίου, αλλά και επικαλύπτεται ισοπόσως με το οπτικό σήμα το οποίο προέρχεται τόσο από τις περιοχές του ιστού οι οποίες έχουν επηρεαστεί από το οξικό οξύ, όσο και από τις περιοχές του ιστού που δεν έχουν επηρεαστεί.



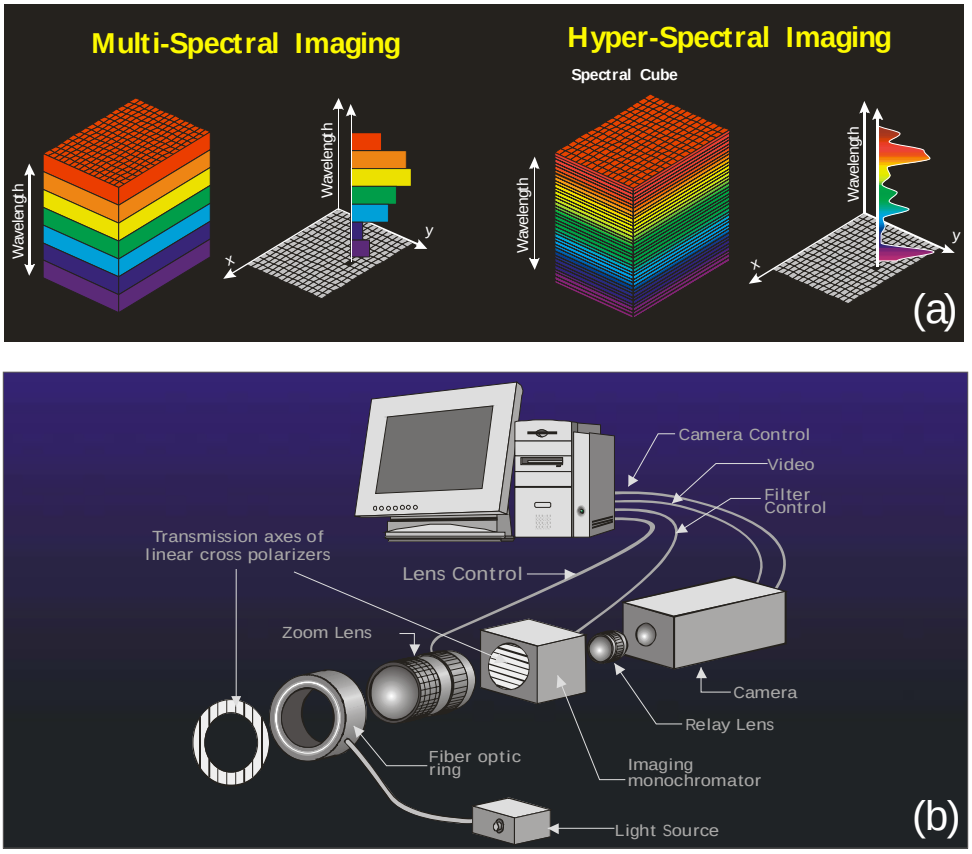
Σχήμα 4. Μηχανισμός πόλωσης.

Ο διαχωρισμός μεταξύ της συνιστώσας του φωτός η οποία έχει ανακλαστεί και της συνιστώσας η οποία έχει σκεδαστεί μπορεί να γίνει με την βοήθεια δύο γραμμικών πολωτών, ο ένας προσαρμοσμένος πάνω στον πομπό του φωτός και ο άλλος πάνω στον οπτικό ανιχνευτή (σχήμα 4). Είναι ευρέως γνωστό, ότι όταν το προσπίπτον φως πάνω στον ιστό είναι γραμμικά πολωμένο, τότε η κανονική ανάκλαση διατηρεί το επίπεδο πόλωσης.

Αντίθετα με την κανονική ανάκλαση, το πολλαπλάσιο του σκεδαζόμενου φωτός, το οποίο προέρχεται μέσα από τον ιστό, χάνει το αρχικό επίπεδο πόλωσης. Ευθυγραμμίζοντας τον άξονα πόλωσης των δύο παραπάνω πολωτών, έτσι ώστε το ένα επίπεδο πόλωσης να είναι κάθετα στο άλλο, η συνιστώσα της κανονικής ανάκλασης αφαιρείται, με αποτέλεσμα το καταγραφόμενο οπτικό σήμα να περιέχει πληροφορία μόνο από εν τω βάθει, μη επιφανειακά, χαρακτηριστικά του ιστού. Από τα προαναφερθέντα φαίνεται ότι για να μελετηθεί αυτό το φαινόμενο απαιτείται η καταγραφή και ανάλυση χωρικών φασματικών και χρονικών χαρακτηριστικών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με το ειδικά αναπτυχθέν σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης (multspectral imaging system), το οποίο περιγράφεται παρακάτω.

2.2. Πολυφασματικό απεικονιστικό σύστημα

Το σχηματικό διάγραμμα του αναπτυχθέντος συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης επιδεικνύεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5. (α) Η αρχή της πολυφασματικής απεικόνισης, και (β) συνδεσμολογία. Το πλήθος των φασματικών περιοχών που είναι ικανό να παρέχει ένα σύστημα φασματικής απεικόνισης καθορίζει τον διαχωρισμό της σε πολυφασματική (δεκάδες ζωνών) και υπερφασματική (εκατοντάδες ζωνών).

Μία ιδιοκατασκευασμένη μισής ίντσας συσκευής συζευγμένου φορτίου (CCD couple device) video camera με παράμετρο g ίσο με την μονάδα, συζεύγνυται με μία

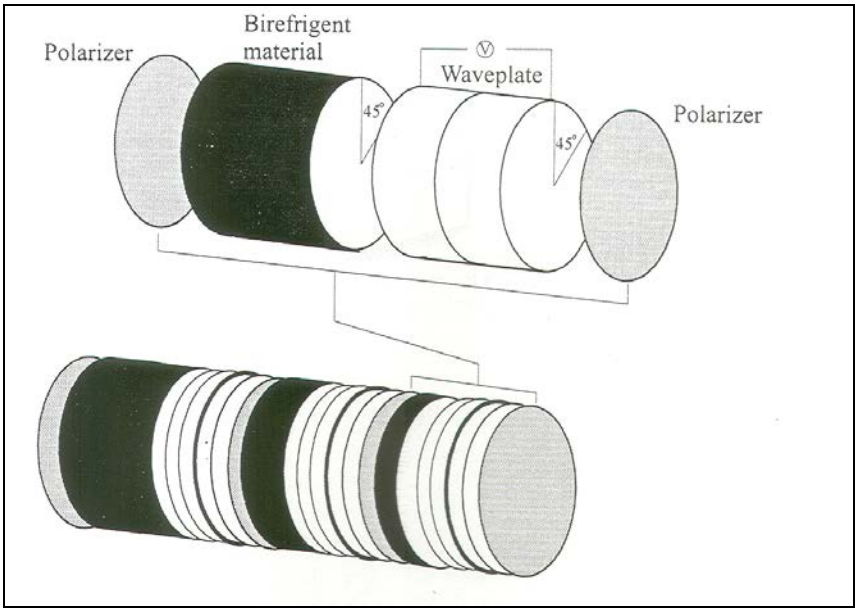
υπολογιστικά ελεγχόμενη συσκευή ρυθμιζόμενων υγρών κρυστάλλων (liquid crystal tunable filter) της εταιρίας (CRI, inc., Cambridge) μέσω ενός φακού μεταφοράς. Ένας φακός zoom 18-108 χιλιοστά, f 2,5 με ηλεκτρονική ίριδα προσαρμόζεται στην άλλη άκρη του ανωτέρου φίλτρου. Μία δακτυλοειδής δεσμίδα οπτικών ινών (ring fiberoptic bandle), η οποία περιβάλλει το μπροστινό μέρος του φακού εκπέμπει φως από μία λάμπα αλογόνου 250 Watt, πάνω στην επιφάνεια του ιστού. Το επίπεδο πόλωσης του προσπίπτοντος φωτός επιλέγεται μέσω ενός γραμμικού πολωτή, ο οποίος είναι προσαρμοσμένος με έναν μηχανισμό περιστροφής πάνω στην δεσμίδα των οπτικών ινών. Το video σήμα ψηφιοποιείται μέσω μίας κάρτας ψηφιοποίησης, η οποία έχει εγκατασταθεί σε έναν PC 200Mhz Pentium με 16 MB ramon μνήμη και κάρτα γραφικών SVGA, με επιταχυντή γραφικών 4MB video ram. Το λογισμικό ελέγχου του συστήματος δημιουργήθηκε με την γλώσσα προγραμματισμού c + και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του φίλτρου και της κάμερας, καθώς και για την ανάλυση των εικόνων των δεδομένων.

2.3. Ρυθμιζόμενα Φίλτρα Υγρών Κρυστάλλων

Το βασικό τμήμα, από το οποίο αποτελείται η φασματική απεικόνιση είναι ο μονοχρωμάτορας (monochromator), ο οποίος επιτρέπει την μεταβολή του μήκους κύματος. Αρκετοί φασματικοί μετατροπείς έχουν αναπτυχθεί, όπως το ακουστο-οπτικό μεταβαλλόμενο φίλτρο (AOTF) και το μεταβαλλόμενο φίλτρο υγρού κρυστάλλου (LCTF). Το AOTF έιναι συσκευή που αποτελείται από κρυσταλλικό υλικό (συνήθως διπλής διάθλασης) κομμένο κατά μήκος ενός ειδικού άξονα του κρυστάλλου. Ένας πιεζοηλεκτρικός μετατροπέας παρέχει μια ραδιοσυχνότητα και ένα ακουστικό κύμα δημιουργείται στον κρύσταλλο. Αυτό μεταβάλλει το δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου και παράγει ένα κινητό φράγμα, το οποίο εισάγει συνθήκες ρύθμισης του μήκους κύματος. Το (LCTF) είναι ένα φίλτρο διπλής διάθλασης, το οποίο χρησιμοποιεί την καθυστέρηση φάσης μεταξύ της τακτικής και έκτακτης ακτίνας (που περνάνε διαμέσου του κρυστάλλου) για να δημιουργήσουν ενισχυτική και καταστροφική συμβολή διαφορετικών μηκών κύματος, κάτι που εξαρτάται από το μέγεθος της εφαρμοζόμενης τάσης.

Τα Ρυθμιζόμενα Φίλτρα Υγρών Κρυστάλλων (LCTF) αποτελούνται από πολλά πακέτα σε σειρά, με κάθε πακέτο να περιέχει ένα διπλοθλαστικό υλικό τοποθετημένο ανάμεσα σε δύο γραμμικούς πολωτές (σχήμα 6). Οι άξονες διαπερατότητας των πολωτών βρίσκονται σε γωνία 45^0 σε σχέση με το διπλοθλαστικό υλικό, το οποίο αποτελείται από κρύσταλλο quartz και μεταβλητό “waveplate” υγρού κρυστάλλου, σε σειρά. Γραμμικά πολωμένο φως, το οποίο εξέρχεται από τον πολωτή εισόδου περνά από το διπλοθλαστικό υλικό, το οποίο χωρίζει τη δέσμη σε δύο ίσες συνιστώσες: την κύρια και την δευτερεύουσα. Το υλικό εισάγει μια διαφορά φάσης (καθυστέρηση) ανάμεσα στις δύο ορθογώνιες γραμμικές συνιστώσες, η οποία εξαρτάται πρώτον από τη διπλοθλαστικότητα του υλικού και δεύτερον από το μήκος κύματος του φωτός. Κατά την έξοδο του από το μέσο οι συνιστώσες επανασυνδέονται σε μία γραμμικά, ελειπτικά ή κυκλικά πολωμένη ακτίνα, με βάση τους παραπάνω παράγοντες. Μόνο οι συνιστώσες των κύριων και δευτερευουσών ακτινών που ταλαντώνονται στη διεύθυνση του άξονα διαπερατότητας του πολωτή εξόδου (αναλυτής) θα περάσουν και θα καταγραφούν από τον ανιχνευτή. Αν το προσπίπτον φως είναι πολυχρωματικό τότε συγκεκριμένα μήκη κύματος σχηματίζουν ένα επίπεδο πόλωσης το οποίο είναι γραμμικό και παράλληλο με τον άξονα διαπερατότητας του αναλυτή. Τα άλλα μήκη κύματος θα είναι γραμμικά ή ελειπτικά και κατά μήκος του άξονα απόσβεσης του αναλυτή. Κάθε πακέτο είναι οπτικά διαμορφωμένο να διαδίδει συγκεκριμένες φασματικές περιοχές με την κατάλληλη επιλογή του πάχους του κρυστάλλου quartz. Τοποθετώντας τα πακέτα σε σειρά, μόνον μία φασματική περιοχή

πληρεί τα κριτήρια διαπερατότητας. Με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού στο “waveplate” υγρού κρυστάλλου αλλάζει κι ο δείκτης διάθλασης του ενός άξονα, έτσι ώστε η μία συνιστώσα να καθυστερεί σε σχέση με την άλλη και να εισάγεται έτσι μια επιθυμητή διαφορά φάσης. Ως αποτέλεσμα, η φασματική περιοχή του φωτός που περνά μπορεί άμεσα να ρυθμιστεί. Η σχέση μεταξύ της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού και του μήκους κύματος του διερχόμενου φωτός παρέχει τον τρόπο ηλεκτρονικού ελέγχου των Ρυθμιζόμενων Φίλτρων Υγρών Κρυστάλλων. Τέτοιες διατάξεις μπορούν να συνενωθούν με ένα δισδιάστατο πίνακα ανίχνευσης, ώστε να παράγουν μια κάμερα, που επιτρέπει σύστημα ρυθμιζόμενου μήκους κύματος.



Σχήμα 6. Ρυθμιζόμενα Φίλτρα Υγρών Κρυστάλλων.

Και ο απεικονιστικός ανιχνευτής και ο μονοχρώματορας απαιτούν ειδικούς χειριστές για τον συγχρονισμό και την λειτουργία τους. Τα δεδομένα που λαμβάνουμε με τη φασματική απεικόνιση περιέχουν χωρική και σύνθετη πληροφορία, επιτρέποντας την εκτεταμένη μελέτη των αρχείων, ακόμα και δυναμικά, με μεγάλη αναλυτική δυνατότητα. Η φασματική πληροφορία μπορεί δυναμικά να βοηθήσει στην in-vivo αναγνώριση αλλοιώσεων των ιστών, η οποία βασίζεται ειδικά σε ιδιαίτερα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Από την άλλη μεριά, απεικόνιση σε φασματικά εύρη που ανταποκρίνονται με τη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των φασματικών χαρακτηριστικών του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, έχει ως αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της φωτεινής αντίθεσης. Αυτό δίνει τη δυνατότητα καλύτερου εντοπισμού της βλάβης και αυξάνει την ακρίβεια του καθορισμού των αρνητικών ορίων, γεγονός πολύ σημαντικό στον σχεδιασμό της θεραπείας και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.

2.4. Διαδικασία βαθμονόμησης

Η διαδικασία βαθμονόμησης είναι μια σημαντικότατη ενέργεια που προηγείται των μετρήσεων και σκοπό έχει στο να καταστάσει την συνδεσμολογία του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης αξιόπιστο για την τέλεση μετρήσεων. Η αξιοπιστία του συστήματος ισοδυναμεί με πλήρη κι επακριβή επαναληψιμότητα, καθώς και με αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. Ταυτόχρονα επιτρέπει την άμεση και αληθή σύγκριση των δεδομένων των μετρήσεων, ανά πάσα στιγμή.

Η ποσοτική εκτίμηση της ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός σε διάφορες φασματικές περιοχές επιτυγχάνεται με την κατάλληλη διαρρύθμιση του χρόνου ολοκλήρωσης φωτός της κάμερας και της ίριδας του φακού, σε κάθε απεικονιστική φασματική περιοχή και περιγράφεται ως εξής:

Ένας διαχυτής ανάκλασης θεϊκού βαρίου ($BaSO_4$), με ανάκλαση ίση με την μονάδα τοποθετείται στο πεδίο όρασης του φακού, ενώ ο πολωτής φωτισμού περιστρέφεται μέχρι το επίπεδο πόλωσης να γίνει κάθετο με αυτό του επιπέδου πόλωσης του ρυθμιζόμενου φίλτρου υγρών κρυστάλλων. Προεπιλέγονται δέκα διαδοχικές φασματικές περιοχές κατά μήκος του ορατού φάσματος, με εύρος 30 νανόμετρα. Όταν το φίλτρο ρυθμίζεται σε αυτές τις περιοχές επιδεικνύεται πάνω στο μόνιτορ του υπολογιστή η μέση τιμή της έντασης του γκρι για μία περιοχή μεγέθους 5χ5 εικονοστοιχείων (pixels) της εικόνας του διαχυτή σε πραγματικό χρόνο. Χρησιμοποιώντας αυτή την τιμή ως ανάδραση, η ίριδα του φακού καθώς και ο χρόνος ολοκλήρωσης φωτός της κάμερας CCD ρυθμίζονται μέσω της παράλληλης πόρτας, έως ότου η τιμή του γκρι του ανωτέρω εικονοστοιχείου να γίνει 255. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αυτόματα σε όλες τις απεικονιζόμενες φασματικές περιοχές. Τα αποκτηθέντα στοιχεία για τον χρόνο ολοκλήρωσης της κάμερας και της ίριδας του φακού σε κάθε φασματική περιοχή αποθηκεύονται και αυτά συνιστούν την πληροφορία και τη βάση δεδομένων (data set) της βαθμονόμησης του συστήματος.

2.5. Η μέτρηση του φασματικού κύβου

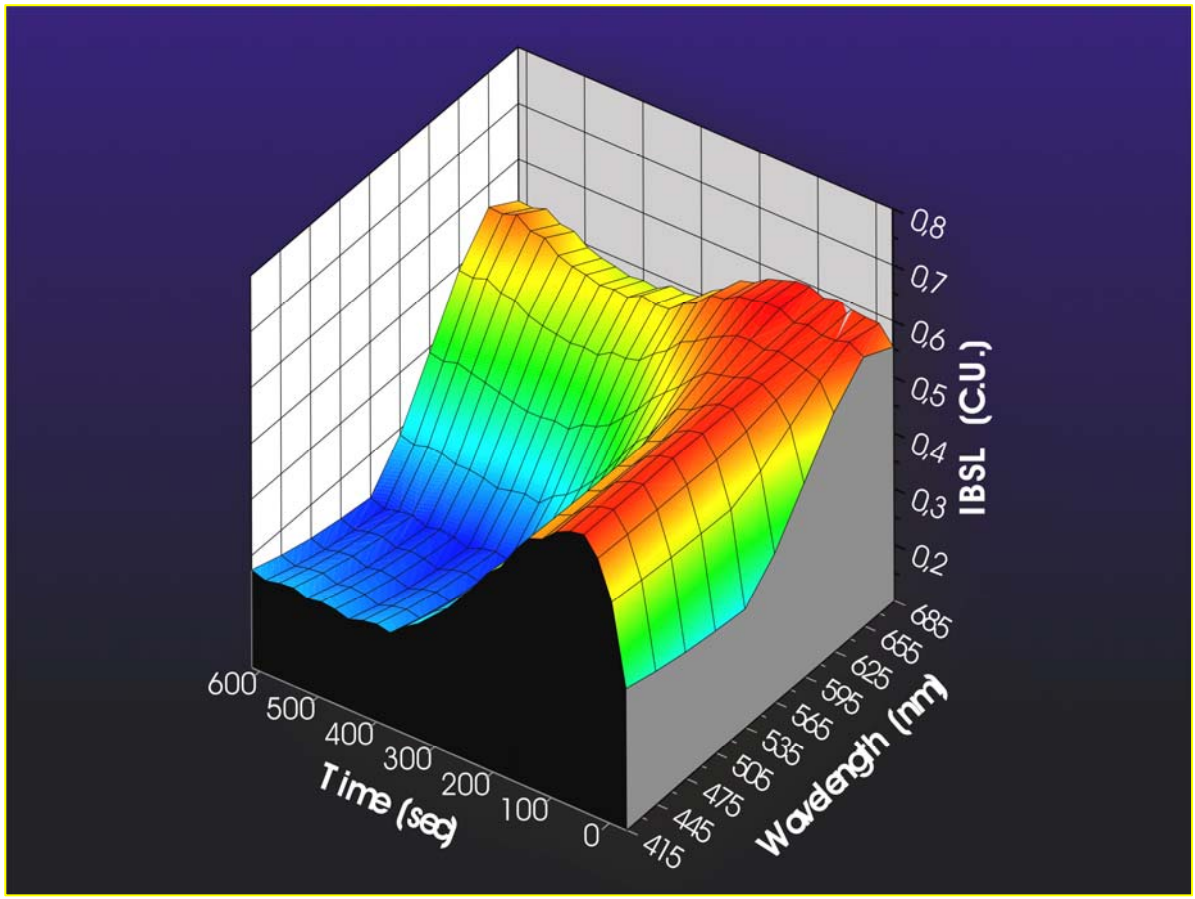
Όταν η ανωτέρα διαδικασία βαθμονόμησης έχει επιτυχώς ολοκληρωθεί, ο ασθενής τοποθετείται στην θέση εξέτασης. Κρατώντας σταθερό το φακό, το απεικονιστικό μέρος του συστήματος τοποθετείται σε κατάλληλη θέση, έτσι ώστε να απεικονίζεται μία καλά εστιασμένη εικόνα του υπό εξέταση ιστού. Εξαιτίας της χαμηλής διαπερατότητας των ρυθμιζόμενων φίλτρων υγρών κρυστάλλων, η ίριδα του φακού λειτουργεί σε πολύ μεγάλο άνοιγμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μικρό βάθος εστίασης (3 χιλιοστά). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, μία καλά εστιασμένη εικόνα επιτυγχάνεται μόνον όταν η συσκευή απεικόνισης λειτουργεί σε μία κατάλληλη απόσταση (250 χιλιοστών) και οι επιφάνειες του φακού zoom και του τράχηλου βρίσκονται σε παράλληλη διάταξη.

Από την στιγμή που η συσκευή απεικόνισης έχει σταθεροποιηθεί στην κατάλληλη θέση, διαδοχικές φασματικές εικόνες κατά μήκος του ορατού φάσματος λαμβάνονται και αποθηκεύονται, πριν από την εφαρμογή του οξικού οξέος. Αυτές οι εικόνες αποτελούν τις εικόνες αναφοράς. Τότε το διάλυμα 3% οξικού οξέος εφαρμόζεται στην επιφάνεια της υπό εξέταση περιοχής της τραχηλοπροσωπικής χώρας, με την βοήθεια μιας συσκευής εντοπισμένου ψεκασμού. Η συσκευή ψεκασμού έχει τροποποιηθεί, έτσι ώστε να εκχέει ένα σταθερό όγκο 2 ml κάθε φορά που γίνεται η κλινική μέτρηση, το οποίο έχει πειραματικά καθοριστεί ως η βέλτιστη ποσότητα η οποία σιγουρεύει την εφαρμογή του διαλύματος στην συνολική επιφάνεια του εξεταζόμενου ιστού, με ελάχιστο περίσσευμα.

Μετά την εφαρμογή του δείκτη, η προηγούμενη διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 10 δεύτερα και ένα συνολικό χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Σε κάθε απεικονιστικό κύκλο,

ο οποίος διαρκεί 10 δεύτερα, η διαδικασία λήψης εικόνων και αποθήκευσης εικόνων συγχρονίζεται με την ρύθμιση του φίλτρου, ενώ οι αλλαγές στον χρόνο έκθεσης της CCD, σε κάθε φασματική περιοχή ρυθμίζονται με βάση τα ανακαλούμενα δεδομένα βαθμονόμησης. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας λήψης των εικόνων, καμπύλες έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (IBSL) σε συνάρτηση με το χρόνο, υπολογίζονται αυτόματα από τα αποθηκευμένα δεδομένα (data) και επιδεικνύονται για κάθε φασματική περιοχή και για κάθε επιλεγμένο από τον χρήστη σημείο της εικόνας (σχήμα 7). Επιπλέον, επιλέγοντας ένα σημείο πάνω στις προβαλλόμενες καμπύλες IBSL σε συνάρτηση με τον χρόνο, η εικόνα η οποία αντιστοιχείται στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο ανακαλείται και επιδεικνύεται. Με βάση τα αποθηκευμένα δεδομένα, η χαρτογράφηση των περιοχών του ιστού οι οποίες έχουν ασπρίσει μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί. Το ειδικό λογισμικό είναι ικανό να πραγματοποιήσει αυτή την διαδικασία αυτόματα, συγκρίνοντας αυτές τις τιμές των εικονοστοιχείων με τις ίδιες χωρικές συντεταγμένες, μεταξύ των χρονικών εικόνων, για τη συγκεκριμένη ομάδα εικόνων. Όταν αυτή η απεικονιστική διαδικασία τελειώσει, η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός σε συνάρτηση με το χρόνο, σε κάθε φασματική περιοχή και χωρικό σημείο της εικόνας υπολογίζεται αυτόματα από τα αποθηκεμένα data. Στην συγκεκριμένη ληφθείσα ακολουθία των εικόνων του οποίου ο φασματικός κύβος εμφανίζεται στο σχήμα 7, η συνιστώσα της επιφανειακής ανάκλασης έχει αφαιρεθεί. Για τον συγκεκριμένο ασθενή με αλλοιώσεις στον λάρυγγα, η μέγιστη τιμή της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός λαμβάνεται 153 δεύτερα μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος. Αυτή η τιμή είναι σχεδόν ίδια κατά μήκος όλου του φάσματος, κάτι που δείχνει ότι όλα τα μήκη κύματος οπισθοσκεδάζονται σχεδόν το ίδιο και ότι το μέγιστο της λεύκανσης του ιστού έχει τότε επιτευχθεί.

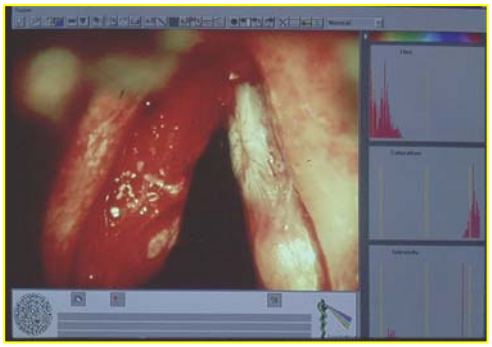
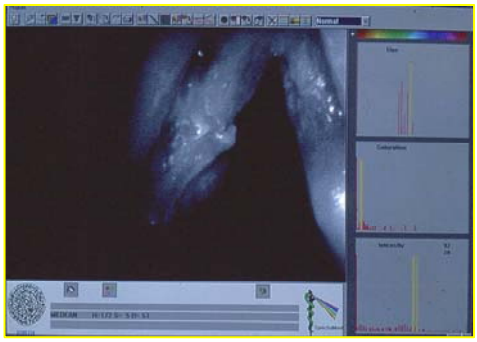
Μετά από αυτό το χρονικό σημείο, η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός προσεγγίζει την αρχική της τιμή σχεδόν εκθετικά. Είναι ξεκάθαρο ότι οι μέγιστες διαφορές μεταξύ του μέγιστου και του ελάχιστου της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, καταγράφονται σε μήκη κύματος μικρότερα από τα 560 νανόμετρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η απορρόφηση του φωτός από το αγγειακό πλέγμα είναι περισσότερο έντονη σε αυτή την φασματική περιοχή, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την μειωμένη συνεισφορά του στην ανάκλαση του ιστού. Το φως το οποίο ανακλάται από το αγγειακό πλέγμα αντιστοιχεί στον θόρυβο του υποστρώματος, η μείωση του οποίου βελτιώνει την ληφθείσα οπτική πληροφορία από την κινητική αλληλεπίδραση του οξικού οξέος με τον ιστό. Αφού η ευαισθησία του CCD και η διαπερατότητα του φίλτρου μειώνονται με το μήκος κύματος, είναι λογικό να επιλέξουμε την φασματική περιοχή 525± 15 νανόμετρα, ως μία βέλτιστη απεικονιστική φασματική περιοχή.



Σχήμα 7. Διάγραμμα της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, σε συνάρτηση με το χρόνο και το μήκος κύματος. Τα κινητικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος με τον λαρυγγικό ιστό είναι ιδιαιτέρως εμφανή σε μήκη κύματος μικρότερα των 540 nm.

3. Διεγχειρητική χαρτογράφηση και διάγνωση

Έχουμε αναπτύξει και εφαρμόσει μια νέα απεικονιστική μέθοδο για την διεγχειρητική διάγνωση και χαρτογράφηση των ιστικών περιοχών. Αυτή συνίσταται σε ένα καινοτόμο φασματικό απεικονιστικό σύστημα που προσαρμόζεται σε μικροσκόπιο και ενδοσκόπιο, ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση και χαρτογράφηση διαφόρων φυσιολογικών ή μη ιστικών περιοχών. Έτσι, αυτός ο ολοκληρωμένος ψηφιακός χάρτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα στο να καθοδηγήσει την δέσμη laser δια μέσω μικροσκοπίου, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ακριβής αφαίρεση ιστού από τις γνήσιες φωνητικές χορδές, με επαρκή και διακριτά όρια (εικόνα 2).

α.  β. 

γ.

Εικόνα 2. Διεγχειρητική χαρτογράφηση του υπό εξέταση ιστού του λάρυγγα, κατά την διάρκεια μικρολαρυγγοσκόπησης: γνήσιες φωνητικές χορδές στο υπέρυθρο (α), και στο ορατό φάσμα (β). Ο χειρουργός με την εκτυπωμένη σε αληθινό χρόνο εικόνα πολυφασματικής απεικόνισης (γ).

Οι σύγχρονες εφαρμογές περιλαμβάνουν δυσπλαστικές περιοχές ή περιοχές κακοήθειας των γνήσιων φωνητικών χορδών του λάρυγγα, αλλοιώσεις στην στοματική κοιλότητα, αλλά και γενικότερα σε όλο το εύρος των βλεννογόνων της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

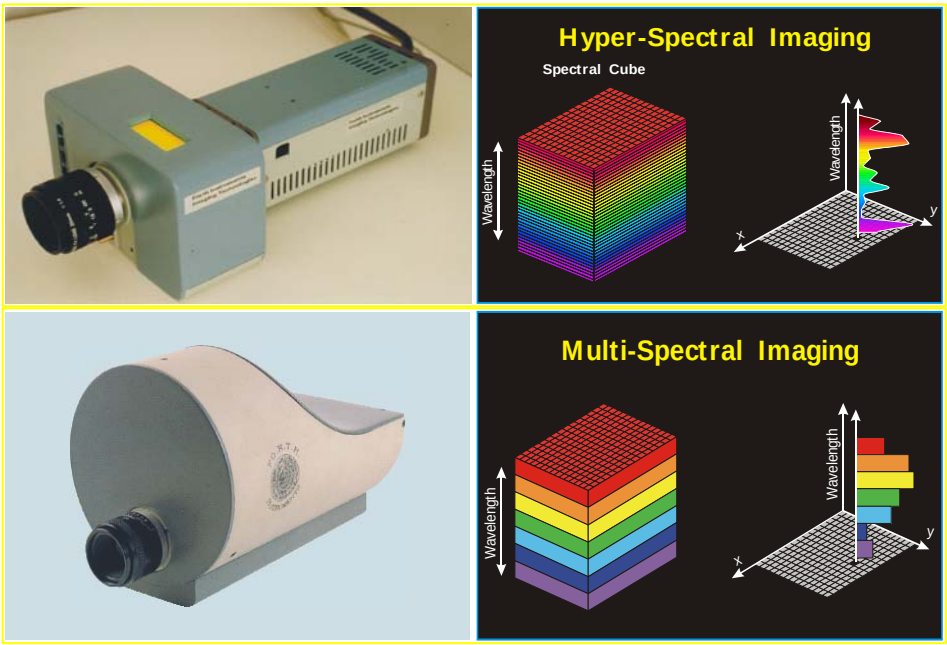
4. Πλεονεκτήματα του αναπτυχθέντος απεικονιστικού συστήματος

Τα κλασσικά οπτικά ενδοσκόπια και μικροσκόπια παρέχουν περιορισμένες δυνατότητες απεικόνισης και διαγνωστικής ανάλυσης ενδιαφερόντων χαρακτηριστικών των βλεννογόνων της τραχηλοπροσωπικής χώρας, όπως η νεοαγγείωση, η λευκοπλακία, η ερυθροπλακία κ.λ.π. λόγω της έντονης επιφανειακής ανάκλασης του βλεννογόνου, η οποία αποκρύπτει την υποκείμενη πληροφορία. Η διαγνωστική διαδικασία βασίζεται στην υποκειμενική εκτίμηση των ιστικών αλλοιώσεων, με ή χωρίς τη χρήση ουσιών ενίσχυσης της αντίθεσης φυσιολογικού-παθολογικού, ενώ οι δυνατότητες παρακολούθησης του ασθενούς ειναι πολύ περιορισμένες.

Το οπτικό μέρος του συστήματος επανασχεδιάστηκε στη βάση ενός Remote Controlled, Auto-Focused, Zoom, πολωτικού οπτικού απεικονιστικού συστήματος, το οποίο συνδιαζόμενο με υλικό και λογισμικό μηχανικής όρασης, παρέχει ουσιαστική ενίσχυση της διαγνωστικής πληροφορίας κατά την ενδοσκόπηση. Συγκεκριμένα:

i. Το πολωτικό οπτικό απεικονιστικό σύστημα φιλτράρει οπτικά την επιφανειακή ανάκλαση ενισχύοντας την σε βάθος εντός του ιστού παρατήρηση για την ανίχνευση της νεοαγγείωσης και των άλλων ιστικών χαρακτηριστικών.

ii. Με δεδομένη την σε βάθος παρατήρηση και συνδιάζοντας ψηφιακές και φασματοσκοπικές τεχνικές, γίνεται δυνατή η επιλεκτική απεικόνιση της κατανομής της αιμάτωσης παρέχοντας έτσι την δυνατότητα ανίχνευσης νεοαγγείωσεων, οι οποίες σε αρκετές περιπτώσεις είναι πρόδρομο σημείο εμφάνισης δυσπλασιών ή νεοπλασιών.
iii. Το σύστημα επιτρέπει την αντικειμενική ποσοτική επαναλήψιμη μέτρηση και χαρτογράφηση των χρωματικών χαρακτηριστικών της περιοχής ενδιαφέροντος, ανεξάρτητα από τις συνθήκες φωτισμού, επιτρέποντας την ποσοτική μέτρηση και διάκριση άνω των 16 εκατομμυρίων χρωμάτων. Αυτό είναι χρήσιμο για την ποσοτική αξιολόγηση και παρακολούθηση των χρωματικών αλλοιώσεων, που επιφέρουν οι διάφορες παθήσεις, καθώς και για την τυποποίηση της κλινικής διάγνωσης. Ειδικότερα, όσον αφορά την τραχηλοπροσωπική χώρα, αυτό χρησιμοποιείται στην ποσοτική μέτρηση της αλλαγής του χρώματος των χρησιμοποιούμενων χημικών διαγνωστικών δεικτών σε παθολογικές καταστάσεις. Οι δυνατότητες αυτές παρέχονται για πρώτη φορά διεθνώς και συνεπώς η αξιοποίησή τους κλινικά και ερευνητικά θα οδηγήσει στην εισαγωγή νέων διαγνωστικών κριτηρίων. Εκμεταλευόμενοι δε τις δυνατότητες, μέσω της υπερφασματικής απεικόνισης, καθορισμού των καταλλήλων μηκών κύματος για κάθε κλινική εφαρμογή, θα μπορούμε να προχωρήσουμε σε κατασκευή εξειδικευμένων -για κάθε κλινική εφαρμογή- μηχανημάτων πολυφασματικής απεικόνισης (σχήμα 8).



Σχήμα 8. Απεικόνιση συστημάτων πολυφασματικής και υπερφασματικής απεικόνισης.

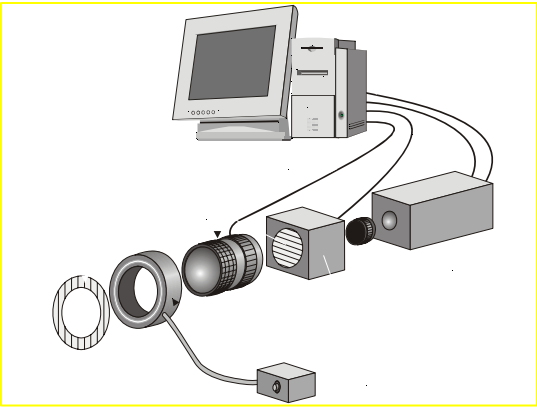
iv. Η διαγνωστική παρατήρηση διενεργείται επί της με μεγάλη πιστότητα ψηφιακά ανακατασκευασμένης εικόνας της περιοχής ενδιαφέροντος, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα της άμεσης ενημέρωσης του ασθενούς και της αξιολόγησης της πάθησης όχι μόνο από έναν, αλλά ακόμα κι από ομάδα ιατρών. Με το τρόπο αυτό το σύστημα μπορεί να συνεισφέρει, εκτός των άλλων και στην εκπαιδευτική διαδικασία.
v. Τα χρωματικά χαρακτηριστικά της εικόνας αναπαράγονται με μεγάλη επαναληψιμότητα, επιτρέποντας την συγκριτική παρατήρησή της με επόμενες εικόνες, οι

οποίες λαμβάνονται για την παρακολούθηση της εξέλιξης της πάθησης και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του προεπιλεγέντος θεραπευτικού σχήματος.
vi. Το σύστημα επιτρέπει την ταυτόχρονη εισαγωγή, ψηφιοποίηση, επεξεργασία, αποθήκευση και συγκριτική αξιολόγηση εικόνων, και εντάσσεται άμμεσα σε δύκτιο τηλε-ιατρικής.
vii. Η ανάπτυξη του συστήματος βρίσκεται σε φάση συνεχούς υψηλής ολοκλήρωσης, μια και οι διαδικασίες βαθμονόμησης, φασματικής παρατήρησης και μέτρησης χρώματος είναι αυτοματοποιημένες. Συνεπώς δεν απαιτούνται ειδικές γνώσεις και ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιεί όλες ή μέρος των δυνατοτήτων που παρέχει το σύστημα.

5. Κλινικές εφαρμογές

Με την βοήθεια της πολυφασματικής απεικόνισης πραγματοποιήθηκε in vivo ανίχνευση και χαρτογράφηση του βαθμού διαφοροποίησης δυσπλαστικών και κακοηθών επιθηλιακών αλλοιώσεων της τραχηλοπροσωπικής χώρας.

Προκαταρκτικές πολυφασματικές μετρήσεις έδειξαν ότι η απεικόνιση σε μία στενή φασματική περιοχή (550±15 νανόμετρα) είναι αρκετή για την παρακολούθηση του φαινομένου της λεύκανσης της υπό εξέτασης ιστικής περιοχής, ύστερα από τοπική εφαρμογή οξικού οξέος. Επομένως και βάση των προκαταρκτικών μετρήσεων, δημιουργήθηκε ένα απεικονιστικό σύστημα το οποίο είναι ικανό να πραγματοποιήσει απεικόνιση σε μία συγκεκριμένη φασματική περιοχή, για συστηματικές κλινικές δοκιμές. Αυτό το σύστημα, αν και είναι βασισμένο στο παραπάνω περιγραφόμενο πολυφασματικό απεικονιστικό σύστημα έχει σημαντικά πλεονεκτήματα. Το σχήμα 9 δείχνει μία διατομή της οπτικής κεφαλής του συστήματος. Η βασική διαφορά είναι η χρησιμοποίηση ενός φίλτρου συμβολής, αντί για μονοχρωμάτορα ρυθμιζόμενων φίλτρων υγρών κρυστάλλων.



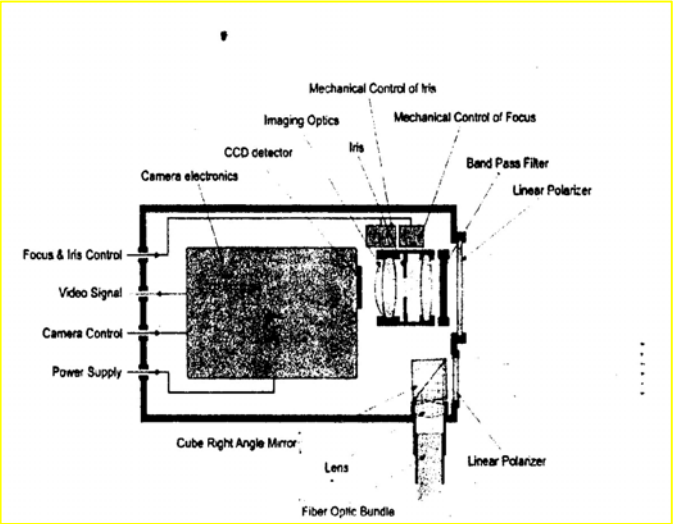
Σχήμα 9. Επιμήκης διατομή της οπτικής κεφαλής του συστήματος.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του βάρους και του όγκου της οπτικής κεφαλής και την σημαντική αύξηση της ευαισθησίας του συστήματος εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητος του φίλτρου συμβολής, σε σχέση με τα φίλτρα υγρών κρυστάλλων. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτή μία νέα περισσότερο συμπαγής οπτική κεφαλή.

Η οπτική κεφαλή περιλαμβάνει ένα χειροκίνητο μηχανισμό, ο οποίος δίνει την δυνατότητα επιλογής του φίλτρου συμβολής ή ενός standard ορατού φίλτρου. Αυτό επιτρέπει την λειτουργία του συστήματος, είτε σαν ένα φασματικό απεικονιστικό σύστημα

ή σαν μία συμβατική έγχρωμη κάμερα. Ο φακός zoom αντικαθίσταται από έναν ηλεκτρονικά ελεγχόμενο zoom φακό, έτσι ώστε το zoom, η εστίαση και το άνοιγμα της ίριδας να ελέγχονται ηλεκτρονικά. Μία δεσμίδα οπτικών ινών χρησιμοποιείται για να μεταφέρει φως από την λάμπα αλογόνου στην οπτική κεφαλή και από κει μέσω ενός φακού το φως εστιάζεται πάνω στον τράχηλο. Η απεικόνιση και ο φωτισμός του τράχηλου είναι σχεδόν ομοαξονικά με τον άξονα της οπτικής κεφαλής, έτσι ώστε να αποφεύγονται οι ανακλάσεις από την εσωτερική επιφάνεια της οπτικής κεφαλής, οι οποίες καταστρέφουν την πόλωση του φωτισμού.

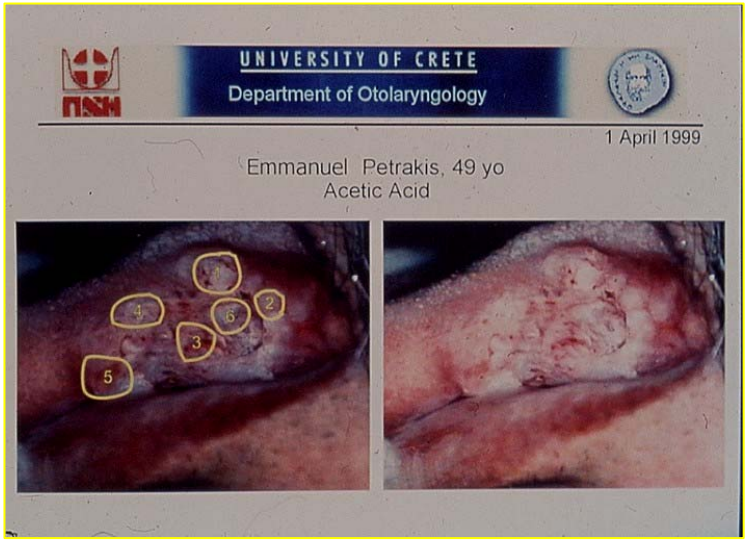
Η οπτική κεφαλή τοποθετείται σε έναν εύκαμπτο ευέλικτο αρμό ειδικά κατασκευασμένο για το συγκεκριμένο project (σχήμα 10). Ο αρμός είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε η οπτική κεφαλή να είναι ικανή να κινείται ελεύθερα προς όλες τις κατευθύνσεις παρέχοντας δύο βαθμούς ελευθερίας περιστροφής. Επιπλέον, ο αρμός είναι συνδεδεμένος με μία επίπεδη επιφάνεια, που φιλοξενεί τον Η/Υ, την οθόνη, την πηγή φωτός έτσι ώστε η συνολική διάταξη να μπορεί να λειτουργήσει ως ένας ανεξάρτητος σταθμός.



Σχήμα 10. Η οπτική κεφαλή τοποθετείται σε έναν ειδικά κατασκευασμένο εύκαμπτο ευέλικτο αρμό.

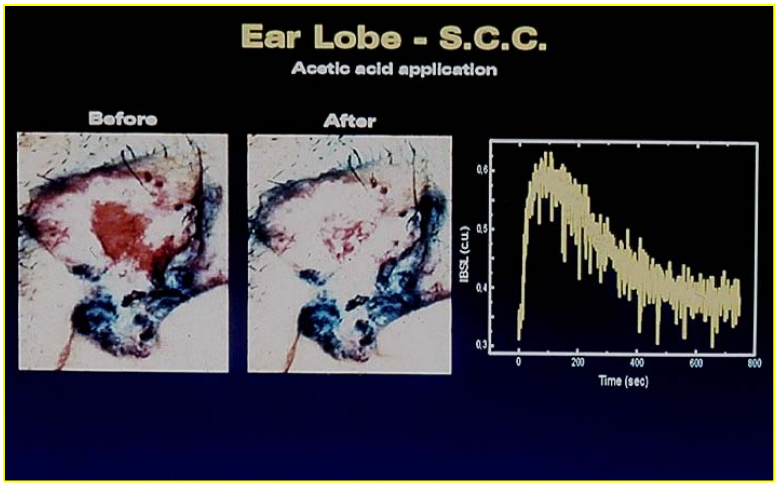
Εικόνα 3. Δυνατότητα διεγχειρητικής σύνδεσης της οπτικής κεφαλής με το χειρουργικό μικροσκόπιο.

Η ευελιξία των κινήσεων της οπτικής κεφαλής δίνει την δυνατότητα σύνδεσης της οπτικής κεφαλής με το μικροσκόπιο, έτσι ώστε η οπτική κεφαλή να μπορεί να ακολουθήσει τις κινήσεις του (εικόνα 3). Επομένως, το αποτέλεσμα των κινήσεων στην διαδικασία καταγραφής των εικόνων αποφεύγεται. Για αυτόν τον σκοπό, το ίδιο το μικροσκόπιο τροποποιήθηκε έτσι ώστε να μπορεί να συνδεθεί με την οπτική κεφαλή. Αυτή η οπτική κεφαλή προσαρμοσμένη σε ειδικά κατασκευασμένο μηχανικό αρμό έχει χρησιμοποιηθεί για τις in vivo μετρήσεις σε ιστούς της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Οι μετρήσεις ελήφθησαν από την γλώσσα, τον λοβίο του αυτιού και τον λάρυγγα. Και για μετρήσεις της γλώσσας (εικόνα 4) και του λοβίου του αυτιού (εικόνα 5), όπου η οπτική πρόσβαση είναι ευκολότερη χρησιμοποιήθηκε το ανωτέρω περιγραφόμενο σύστημα. Για μετρήσεις στον λάρυγγα όπου η οπτική πρόσβαση δεν είναι εύκολη, η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετική (σχήμα 11).



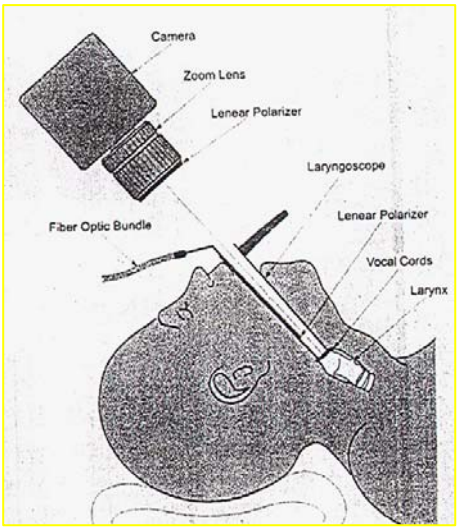
Εικόνα 4. Περιοχή κακοήθειας σώματος γλώσσας. Έχει γίνει εφαρμογή οξικού οξέος για την επιλεκτική σήμανση των ύποπτων περιοχών. Ο ιστός χαρτογραφείται και χαρακτηρίζεται οπτικά. Ακολουθώντας τα δεδομένα της πολυφασματικής ανάλυσης γίνεται προεπιλογή των προς αποστολή βιοψίας ιστοτεμαχίων, προκειμένου να επαληθευτούν τα δεδομένα της οπτικής βιοψίας.

Όλες οι μετρήσεις στον λάρυγγα ελήφθησαν ενδοεγχειρητικά, ενώ ο ασθενής βρίσκονταν κάτω από γενική αναισθησία, ενώ ένα συμβατικό λαρυγγοσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για να δώσει την επιθυμητή οπτική πρόσβαση στον λάρυγγα (σχήμα 11). Λόγω της έλλειψης προηγούμενης βιβλιογραφίας για πιθανή ανάπτυξη διεγχειρητικού ή μετεγχειρητικού οιδήματος της περιοχής του λάρυγγα, ύστερα από τοπική εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος, σε όλους τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε λαρυγγεκτομή, η τραχειοτομή προηγήθηκε των μετρήσεων και της αφαίρεσης του λάρυγγα.



Εικόνα 5. Καρκίνος εκ πλακώδους επιθηλίου λοβίου ωτός, πρίν και μετά την εφαρμογή οξικού οξέος. Χαρακτηριστική καμπύλη έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο.

Οι μετρήσεις του ασπρίσματος στον υπό εξέταση ιστό, διασταυρώθηκαν με μετεγχειρητικές ιστολογικές εξετάσεις των προεπιλεγμένων περιοχών, όπως αυτές προέκυψαν ύστερα από την διεγχειρητική χαρτογράφηση. Για τον φωτισμό του ιστού χρησιμοποιήθηκε μία εμπορικά διαθέσιμη δεσμίδα οπτικών ινών, ειδικά σχεδιασμένη για φωτισμό μέσω του λαρυγγοσκοπίου, ενώ ένας μικρός γραμμικός πολωτής προσαρμόσθηκε στην άκρη της δεσμίδας των οπτικών ινών.



Σχήμα 11. Διάταξη μετρήσεων στον λάρυγγα.

Στα πλαίσια της παρούσης ερευνητικής εργασίας, προσπάθησα με την ομάδα της Ωτορινολαρυγγολογικής Κλινικής του Πα.Γ.Ν.Η. σε συνεργασία με την ομάδα Ηλεκτρονικής δομής και Laser του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, να εισαγάγω μία καινοτόμο διαγνωστική προσέγγιση των αλλοιώσεων της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Πρόκειται για μη επεμβατική προσέγγιση, που ως αποτέλεσμα έχει την ανίχνευση και διαφοροποίηση επιθηλιακών δυσπλασιών και κακοηθειών της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Η μέθοδος βασίζεται στην in vivo ποσοτική εκτίμηση των φασματικών, χωρικών και

δυναμικών μεταβολών των ιδιοτήτων του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, που προέρχεται από επιθηλιακές δυσπλασίες και κακοήθειες του λάρυγγα, ύστερα από τοπική εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος 3%. Το διάλυμα οξικού οξέος εφαρμοζώμενο στον υπό εξέταση ιστό προκαλεί προοδευτικές και ταυτόχρονα αντιστρεπτές μεταβολές, των ιδιοτήτων σκέδασης του προσπίπτοντος φωτός, όπως αυτό διέρχεται και αλληλεπιδρά με μη φυσιολογικούς επιθηλιακούς ιστούς της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Αυτές οι μεταβολές των ιδιοτήτων της αλληλοεπίδρασης του προσπίπτοντος φωτός με το μη φυσιολογικό επιθήλιο, σχετίζονται με προκαλούμενες –λόγω της τοπικής εφαρμογής του οξικού οξέος- δομικές και λειτουργικές αλλοιώσεις. Είναι συνεπώς δέον να θεωρήσουμε, ότι η ποσοτική εκτίμηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος με τον υπό εξέταση ιστό, σχετίζεται με παροχή διαγνωστικής πληροφορίας. Πληροφορία που οπωσδήποτε σχετίζεται με την πρώιμη in vivo ανίχνευση και ποσοτική διαφοροποίηση της υπό εξέταση ιστικής βλάβης.

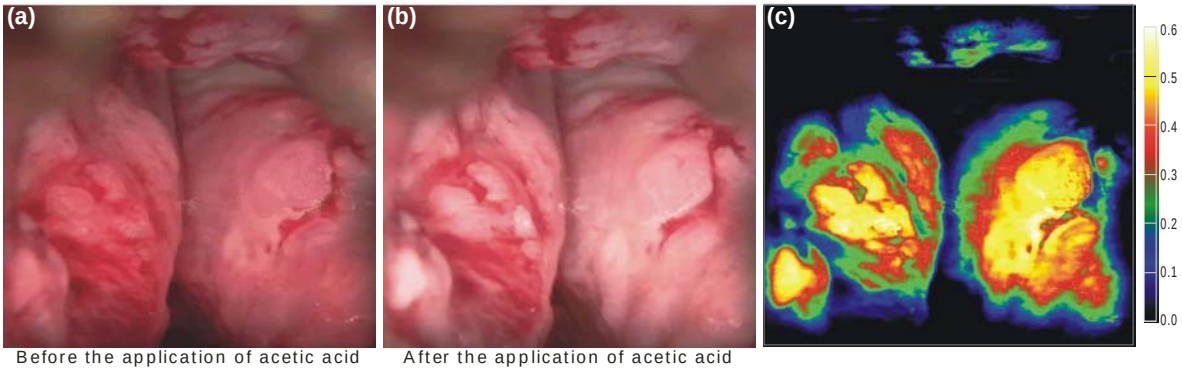
Η ιστική εμφάνιση καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τα φασματικά χαρακτηριστικά των μη απορροφήσιμων και οπισθοσκεδαζόμενων φωτονίων του υποκείμενου αγγειακού πλέγματος. Πριν από την εφαρμογή του οξικού οξέος, τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα μη φυσιολογικά επιθήλια είναι σχεδόν διαφανή. Μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, το μη φυσιολογικό επιθήλιο γίνεται αδιαφανές, σκεδάζοντας όλα τα προσπίπτοντα μήκη κύματος ομοιόμορφα. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται με προοδευτική μεταβολή της έντασης των φασματικών χαρακτηριστικών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, από τον υπό εξέταση λαρυγγικό ιστό. Αυτές οι μεταβολές αποτελούν την βάση για την ποσοτική μελέτη του φαινομένου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την μέτρηση της εντάσεως του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (IBSL: Intensity of the Back Scattered Light), ως μία λειτουργία που λαμβάνει υπόψιν τόσο τον χρόνο όσο και το μήκος κύματος, σε κάθε χωρικό σημείο της υπό εξέτασης περιοχής.

Η ταυτόχρονη φασματική ανάλυση τόσο των φυσιολογικών όσο και των μη φυσιολογικών ιστικών περιοχών είναι απαραίτητη, προκειμένου να αποφασίσουμε εκείνη την φασματική περιοχή, όπου οι μέγιστες διαφορές των χαρακτηριστικών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός από κάθε περιοχή, είναι δυνατον να καταγραφεί. Η επιλογή της κατάλληλης φασματικής περιοχής είναι μία διαδικασία θεμελιώδους σημασίας, προκειμένου να μεγιστοποιήσουμε την καταγραφόμενη ιστική αντίθεση μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού, καθώς και την αναλογία του καταγραφόμενου σήματος ως προς τον θόρυβο. Αυτό γίνεται με καταγραφή καμπυλών εντάσεως του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο.

Οι χωρικές και φασματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν in vivo με την βοήθεια απεικονιστικού συστήματος κατασκευασμένου στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (Forth Instruments). Το σύστημα βαθμονομείται πριν τις μετρήσεις και επιτρέπει την συγχρονισμένη εναλλαγή των φίλτρων, καθώς επίσης και την λήψη και αποθήκευση μεμονομένων εικόνων από την υπό εξέταση περιοχή. Στο σχήμα 7 παρουσιάζεται η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (Intensity of the Back Scattered Light-IBSL), σε βαθμονομημένες μονάδες, σε σχέση με το μήκος κύματος και τον χρόνο. Αυτή η καταγραφή έχει γίνει σε ασθενή με δυσπλαστική επιθηλιακή αλλοίωση του λάρυγγα. Οι συγγεκριμένες καμπύλες υπολογίστικαν σε ένα τυχαίο χωρικό σημείο, από το σύνολο των αποθηκευμένων εικόνων. Σε αυτόν τον ασθενή, η μέγιστη τιμή IBSL παρουσιάστηκε 153 δευτερόλεπτα μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος. Αυτή η τιμή ήταν σχεδόν σταθερή σε όλο το μήκος του φάσματος, ένδειξη ότι όλα τα μήκη του προσπίπτοντος στην υπό εξέταση περιοχή φωτός, οπισθοσκεδάζονταν ισόποσα. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την επίτευξη της μέγιστης μεταβολής, που συνεπάγεται η αλληλεπίδραση του οξικού οξέος με τον ιστό. Ακολούθως, η IBSL φαίνεται να προσεγγίζει τις αρχικές της τιμές με εκθετικό ρυθμό. Επίσης, στο συγκεκριμένο γράφημα είναι εμφανές, ότι οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ

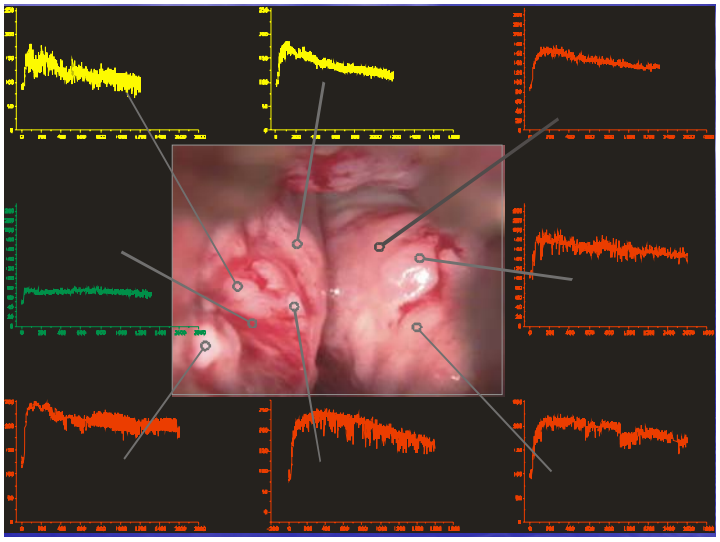
των μεγίστων και ελαχίστων τιμών της IBSL καταγράφονται σε μήκη κύματος μικρότερα των 540nm. Αυτό συμβαίνει, διότι η απορρόφηση του φωτός από το αγγειακό πλέγμα είναι πιο έκδηλη σε αυτό το εύρος μήκους κύματος, γεγονός που συνεπάγεται την ελάττωση της συνιστώσας του τιμής στην ανάκλαση του ιστού.

Το φως που ανακλάται από το αγγειακό πλέγμα αντικατοπτρίζει στην ουσία τον θόρυβο του υποστρώματος. Η ελάττωση αυτού του θορύβου έχει ως συνέπεια την βελτίωση της οπτικής πληροφορίας, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη εκτίμηση της κινητικής του φαινομένου της αλληλεπίδρασης οξικού οξέος με τον ιστό. Δεδομένου του ότι η ευαισθησία της CCD (Charged Coupled Device), αλλά και η διαπερατότητα του μονοχρωμάτωρα ελαττώνονται αναλόγως με το μήκος κύματος, είναι λογικό να επιλεγεί η περιοχή των 525 +/- 15 nm, ως η ιδανική φασματική περιοχή που δυνατόν να παράσχει την μέγιστη διαγνωστική πληροφορία, για την διάγνωση προκαρκινικών ή καρκινικών αλλοιώσεων στην περιοχή της τραχηλοπροσωπικής χώρας. Η εικόνα 6 παρουσιάζει την χαρτογράφηση μιας μη φυσιολογικής περιοχής του λάρυγγα. Διάφορα ψευδοχρώματα αντιπροσωπεύουν διαφορετικού βαθμού μεταβολές των χαρακτηριστικών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, από την υπό εξέταση περιοχή. Αυτές οι καταγεγραμένες μεταβολές αντιστοιχούν σε διαφορετικού βαθμού δυσπλαστικές αλλοιώσεις, μέσα στην ίδια μακροσκοπικά ιστική αλλοίωση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και διασταυρωθεί ιστολογικώς σε 15 ασθενείς, με διάφορες κακοήθεις ή δυσπλαστικές αλλοιώσεις του λάρυγγα.



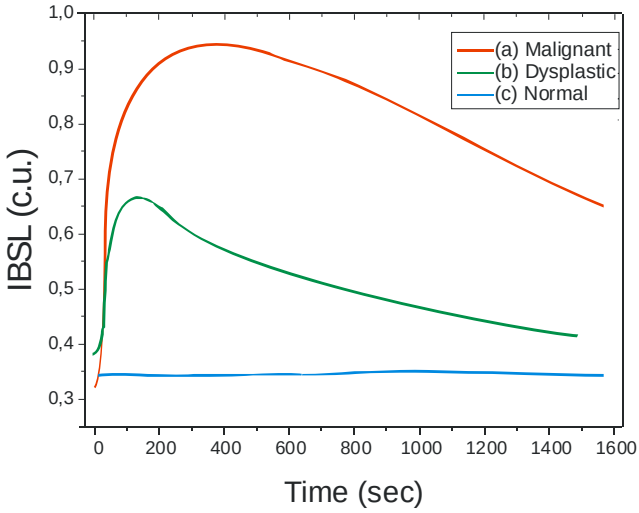
Εικόνα 6. Χαρτογράφηση περιοχής παθολογικού λαρυγγικού ιστού βασιζόμενη στην μέτρηση των χαρακτηριστικών της κινητικής της αλληλεπίδρασης του διαλύματος οξικού οξέος με τον ιστό. Πριν (a) και μετά (b) την εφαρμογή την εφαρμογή οξικού οξέος. Οι διαφορετικές τιμές χρώματος αντικατοπτρίζουν διαφορετικού βαθμού δυσπλασία ή κακοήθεια (c).

Από το δε διεγχειρητικό από μια περίπτωση σχήμα 12 είναι εμφανές ότι ο μη φυσιολογικά μακροσκοπικά ιστός, με τη βοήθεια της μεθόδου μας, χαρακτηρίζεται από χωρική ποικιλομορφία του βαθμού της κακοήθειας. Αυτό και μόνον φανερώνει τους περιορισμούς που έχει ο κλινικός ιατρός, όταν διεγχειρητικά πρόκειται να αποφασίσει την περιοχή εκείνη της ιστικής βλάβης, από την οποία θα θελήσει να λάβει ιστοτεμάχιο προς βιοψία.



Σχήμα 12. Χωρική ποικιλομορφία ύποπτης προς κακοήθεια περιοχής του λάρυγγα. Παρουσιάζονται περιοχές με διαφορετική κινητική, ύστερα από εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος 3%, που αντιπροσωπεύουν φυσιολογικό (πράσινο), δυσπλαστικό (κίτρινο) και καρκινικό (κόκκινο) ιστό. Το σήμα των συγκεκριμένων περιοχών, επιβεβαιώθηκε με συνοδή ιστολογική εξέταση.

Οι μεγάλες διαφορές της IBSL ως προς τον χρόνο, που καταγράφονται με την βοήθεια της συγκεκριμένης διάταξης, επιτρέπουν την αδιαμφισβήτητη διαφοροποίηση μεταξύ κακοηθών και μη κακοηθών περιοχών επιθηλιακών αλλοιώσεων, όπως επίσης και την διαφοροποίηση διαφορετικών βαθμών κακοήθειας (σχήμα 13).



Σχήμα 13. Καμπύλες της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός-IBSL (Calibrated Units) ως προς τον χρόνο, όπως αποτυπώθηκαν από κλινικές περιπτώσεις φυσιολογικού (c), δυσπλαστικού (b), και κακοηθών λαρυγγικών αλλοιώσεων (a).

Η πρώιμη in vivo ανίχνευση και ποσοτική διαφοροποίηση αυτών των ιστικών αλλοιώσεων είναι σημαντικής κλινικής σημασίας, αφού συνδυάζονται τόσο με την έγκαιρη

ανίχνευση ή προστασία από τον καρκίνο, αλλά επίσης και με την παρακολούθηση και ρύθμιση της όποιας θεραπευτικής αντιμετώπισης του ασθενούς. Η περιγραφόμενη κλινική εφαρμογή συνδυαζόμενη με την τεχνολογία των Laser μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία την μικροχειρουργική του λάρυγγα. Ο συνδυασμός αυτός επιτρέπει την επιπρόσθετη αξιοποίηση των χειρουργικών δυνατοτήτων και επιδεξιοτήτων του ιατρού, όχι μόνον παρέχοντας διεγχειρητική χαρτογράφηση και χαρακτηρισμό των ιστικών αλλοιώσεων, αλλά επίσης επιτρέποντάς του την ελάχιστη ιστική αφαίρεση σε υγιή, ελεύθερης νόσου χειρουργικά όρια.

6. Συμπεράσματα

Η τεχνολογία της φασματικής απεικόνισης αποδίδει πληροφορίες υψηλής φασματικής ανάλυσης, αποτελώντας ένα ισχυρό ερευνητικό εργαλείο. Επιτρέπει μη επεμβατική ανάλυση ιστών in situ στο φυσικό τους περιβάλλον. Αυτή η απεικονιστική τεχνολογία είναι ελεύθερη από οποιεσδήποτε επιβλαβείς επιδράσεις. Ο συνδυασμός των in-vitro και in-vivo πειραμάτων μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη και εισαγωγή νέων, πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών μεθόδων και κριτηρίων. Η τεχνολογία μπορεί εύκολα να εμπλακεί στις ήδη υπάρχουσες απεικονιστικές διατάξεις, όπως μικροσκόπια και ενδοσκόπια, με σημαντική βελτίωση των διαγνωστικών τους ικανοτήτων. Με την προσάρτηση του manipulator στο μικροσκόπιο, η δέσμη του Laser μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την φασματική χαρτογράφηση του όγκου και για την θεραπεία. Η θεραπεία με Laser σε συνδυασμό με φασματική απεικόνιση δίνει τη δυνατότητα αποφυγής της υπό- ή υπέρ- θεραπείας και τη διαβεβαίωση ότι η θεραπεία όλης της προσβεβλημένης περιοχής έχει βελτιστοποιηθεί.

Στην χειρουργική των λαρυγγικών περιοχών όπως την T_1 ή T_2, την γλωττιδική κακοήθεια και δυσπλασία μπορεί να αναγνωριστεί και χαρτογραφηθεί γρήγορα και με ασφάλεια. Η χαρτογραφημένη περιοχή αφαιρείται στη συνέχεια με δέσμη Laser CO_2. Στο τέλος της αποκοπής, επιπλέον χαρτογράφηση μπορεί να παρέχει έλεγχο των αρνητικών ορίων. Γι' αυτό ακριβής αποκοπή δίνει τη δυνατότητα καλύτερου λειτουργικού αποτελέσματος, αφού μόνο ο προσβεβλημένος ιστός αφαιρείται και ο φυσιολογικός ιστός να διαφυλάσσεται μεταξύ υγιών ορίων. Επιπρόσθετα, βασιζόμενοι σε αποτελέσματα ερευνών, το εξειδικευμένο σύστημα φασματικής απεικόνισης θα είναι προσαρμοσμένο στις ανάγκες των ειδικών ιατρικών ειδικοτήτων. Για παράδειγμα, αντικειμενική και μη επεμβατική αποτίμηση των μεταβολών της αιματικής παροχής στο ρινικό βλεννογόνο μπορεί να καταδείξει την διεγχειρητική ή προεγχειρητική επίδραση της θεραπείας με Laser των κάτω ρινικών κογχών.

Κατ' επέκταση στα όρια της γνώσης, η φασματική απεικόνιση δίνει τη δυνατότητα στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων και συστημάτων, οδηγώντας σε πιο αποτελεσματικά θεραπευτικά σχήματα.

7. Βιβλιογραφία

1. Alfano RR, Tang GC, Pradhan A, Lam W, Choy DSJ, Opher E. Fluorescence spectra from cancerous and normal breast and lung tissues. IEEE J Quant Electr 23:1806-1811, 1988.
2. Anderson Engels S, Klinteberg C, Svanberg K, Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. Phys Med Biol 42:815-824, 1997.
3. Balas C. An Imaging Colorimeter for Non-contact Tissue Mapping.IEEE T BioMed Engin44:468-474, 1997.
4. Balas C, Stefanidou M, Giannouli T, Georgiou S, Helidonis E, Tosca A. A modular diffuse reflection and fruorescence emission imaging colorimeter for the in vivo study of parameters related with the phototoxic effect in PDT. In: Berg K, Ehlenberg B, Malik Z, Moan J (eds) Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities III. Proceedings SPIE 3191, pp 50-57, 1997.
5. Balas C, Themelis G, Prokopakis E, Orfanudaki I, Koumantakis E, Helidonis E. In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics. J Photochem Photobiol B: Biol 53:153-157, 1999.
6. Balas CJ, Prokopakis EP, Helidonis ES. Spectral imaging for the in-vivo detection and mapping of tissue lesions. Implications in laser treatment planning. Chapter 25, In: Principles and Practice of Lasers in Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, pp 443-450, edited by V. Oswal and M. Remacle. 2002 Kugler Publications, The Hague, The Netherlands.
7. Bigio IL, Mourant J. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. Phys Med Biol 42:803-814, 1997.
8. Braichotte DR, Wagnieres GA, Bays R, Monnier P, Van den Bergh HE. Clinical pharmacokinetic studies of photofrin by fluorescence spectroscopy in the oral cavity, esophagus and the bronchi. Cancer 75(11):2768-2778, 1995.
9. Glassman WS, Liu CH, Tang GC, Lubiez S, Alfano RR. Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant and malignant tissues of the gynaecological tract, Lasers Life Sci 5:49-58, 1992.
10. Helidonis ES, Hajiioannou JK, Prokopakis EP. Application of multispectral imaging in Otolaryngology. Pro Otology Balcan Journal of Otology and Neurootology 2:61-64, 2001.
11. Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam N, Malpica A, Thomsen S, Utzinger U, Richards-Kortum RR. Near infrared Ramman spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. Photochem Photobiol 68(1):123-132, 1998.
12. Mashberg A, Barsa P. Screening for oral and oropharyngeal squamous carcinoma. CA Cancer J Clin 34(5):262-268, 1984.
13. Olson J, Jungquist R. Tunable multispectral imaging system technology for airborne applications. SPIE-Imaging Spectromet 2480:268-279, 1995.
14. Prokopakis E, Balas CJ, Christodoulou PN, Gourtsoyiannis NC, Tosca AD, Helidonis ES. Assessment of nasal mucosa blood supply using quantitative endoscoping imaging of the back-scattered light. Otolaryngol Head Neck Surg 121:307-312, 1999.
15. Prokopakis EP, Themelis G, Velegrakis GA, Christodoulou PN, Balas CJ, Helidonis ES. The role of hyper-spectral dynamic imagingfor the detection and grading of premalignant lesions and epithelial cancers, in head and neck region. Foglia Otorhinolaryngologica 6:77-82, 2000.

16. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan-Jansen A, Thomsen S, Staerkel G, Malpica A, Wright T, Atkison N, Richards-Kortum RR. Cervical precanser detection using a multivariate statistical algorithm based on laser-induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths. Photochem Photobiol 64(4):720-735, 1996.
17. Richards-Kortum R, Rava RP, Fitzmaurice M, Sivak M, Feld MS. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia. Photochem Photobiol 53:777-786, 1991.
18. Schoemacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioks NS, Deutsch TF. Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. Laser Surg Med 12:63-78, 1992.

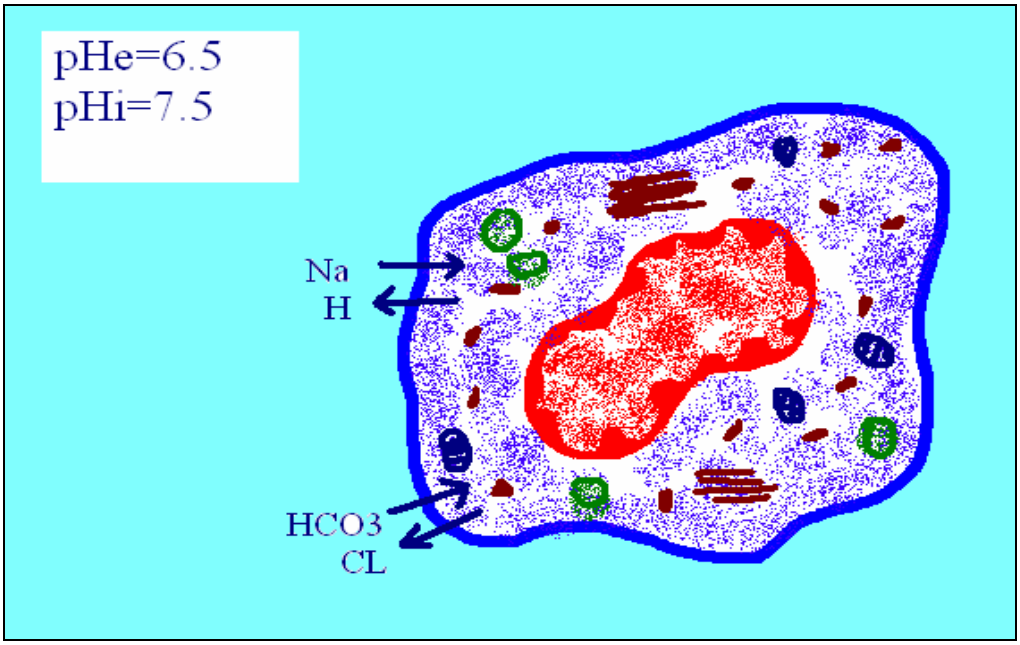
ΣΤ. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΚΑΙ ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. Τα κύτταρα του όγκου ζουν σε ένα όξινο μικροπεριβάλλον
2. Μεσοκυττάριος ουσία
3. Οι πρωτεΐνες
4. Αναστρέψιμη μετουσίωση πρωτεινών (λευκή χρώση)
5. Προτεινόμενος μηχανισμός λευκής χρώσης οξικού οξέος
6. Πειράματα
7. Βιβλιογραφία

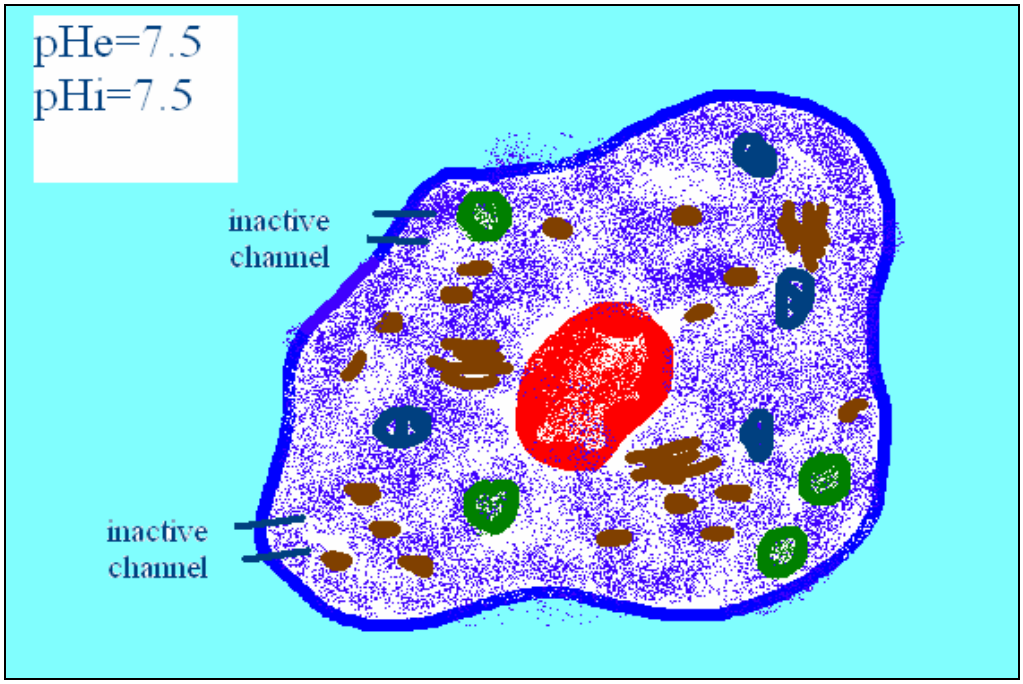
1. Τα κύτταρα του όγκου ζουν σε ένα όξινο μικροπεριβάλλον

Η χρήση διαφόρων δεικτών για την ανίχνευση διαφόρων ιστικών ανωμαλιών και την διάγνωση καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων έχει εφαρμοσθεί σε ποικίλες ανατομικές περιοχές με διάφορες μεθόδους εξέτασης. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι η πολυφασματική απεικόνιση με την χρήση ως δείκτη του διαλύματος οξικού οξέος. Ο συνδυασμός προσφέρεται επιτυχώς για τη διάγνωση των δυσπλαστικών και καρκινικών βλαβών τόσο του τραχήλου της μήτρας, όσο και σε διάφορες άλλες ανατομικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της τραχηλοπροσωπικής χώρας, ανοίγοντας το δρόμο και άλλων δεικτών ως εργαλεία διάγνωσης ενάντια στη δυσπλασία και τον καρκίνο.

Τα κύτταρα του όγκου ζουν σε ένα όξινο μικροπεριβάλλον. Αυτό κυρίως οφείλεται στην ανεπαρκή οξυγόνωση, που απορρέει από τη φτωχή αγγείωση των ιστών του όγκου, που αναγκάζει τα κύτταρα να τελούν αναερόβια γλυκόλυση. Στην πραγματικότητα, τα κύτταρα του όγκου τείνουν να χρησιμοποιούν την αναερόβια γλυκόλυση, η οποία καταλήγει στην συνάθροιση των οξικών προϊόντων όπως το γαλακτικό οξύ, ακόμα και σε αερόβιες συνθήκες. Ως pH ορίζουμε τον αρνητικό λογάριθμο της ενεργότητας της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου σε moles/lt (M). Όπως δείχνουν πολλαπλές μελέτες, το εξωκυττάριο pH (pHe) στους καρκινικούς όγκους είναι περίπου μισή μονάδα χαμηλότερο από εκείνο των φυσιολογικών ιστών, με τιμές που κυμαίνονται αντίστοιχα από 6.6 εως 7.0, την ώρα που στους φυσιολογικούς ιστούς κυμαίνεται από 7.1 εως 7.6 (σχήμα 1 και 2). Με άλλα λόγια τα κύτταρα του όγκου καταφέρνουν να διατηρούν ένα φυσιολογικό ενδοκυττάριο pH (pHi), πράγμα που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιβίωσή τους, παρά το όξινο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

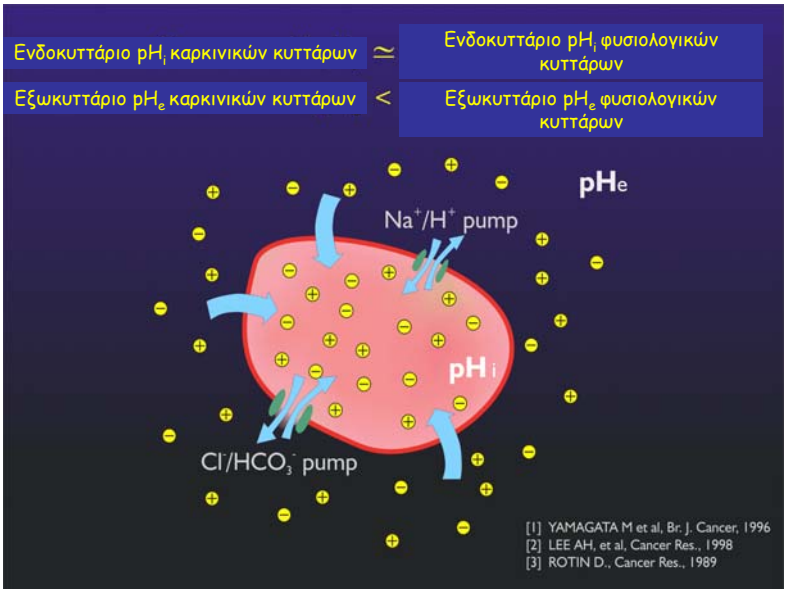


Σχήμα 1 . Περίπτωση καρκινικού κυττάρου.



Σχήμα 2 . Περίπτωση φυσιολογικού κυττάρου.

Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι ένας αριθμός από πρωτεϊνες σημαντικές για την ανάπτυξη του όγκου λαμβάνουν την συμπυκνωμένη πρωτογενή μορφή τους στο όξινο pHe. Για παράδειγμα, η συμπυκνωμένη αυτόχθονη διαμόρφωση τύπου β-έλικας της αμινοτελικής περιοχής SH3 του αυξητικού παράγοντα του δεσμευτικού υποδοχέα της πρωτείνης 2 κυριαρχεί σε pHe=4.8. Από την άλλη μεριά, η β-τρυπτάση των ανθρωπίνων μαστοκυτάρων μετατρέπεται σε τετραμερές κι επομένως ενεργοποιείται ακόμα και απουσία της απαραίτητης, σε κάθε άλλη περίπτωση, ηπαρίνης, όταν το pHe είναι χαμηλό, γεγονός πολύ σημαντικό για τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αν και οι τιμές του pH και στις δύο πλευρές της κυτταρικής μεμβράνης τείνουν διαρκώς να είναι οι ίδιες, είναι γνωστό ότι οι τιμές του ενδοκυττάριου pH (pHi) στα κύτταρα του όγκου είναι ίσες με εκείνες των φυσιολογικών κυττάρων (pHi ~ 7.5).



Σχήμα 3. Οι αντλίες της κυτταρικής μεμβράνης. Ένα καρκινικό κύτταρο, σε όξινο περιβάλλον έχει pHe πολύ χαμηλό (pHeVL). Ένα δυσπλαστικό κύτταρο, σε όξινο περιβάλλον έχει pHe χαμηλό (pHeL). Ένα φυσιολογικό κύτταρο, σε φυσιολογικές συνθήκες έχει pHe φυσιολογικό (pHeN).

Τα κύτταρα ρυθμίζουν τις τιμές του ενδοκυττάριου pH τους, μέσω της δράσης δύο βασικών ιοντο-ανταλλακτικών αντλιών, που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη (σχήμα 3). Αυτές είναι η αντλία ανταλλαγής Na^+/H^+ και η Na^+-εξαρτώμενη αντλία ανταλλαγής $Cl^-/HCO3^-$. Και οι δύο αυτές αντλίες είναι πρακτικώς ανενεργές σε φυσιολογικές τιμές pHi. Η Na^+-εξαρτώμενη αντλία ανταλλαγής $Cl^-/HCO3^-$ φαίνεται να είναι περισσότερο ενεργή σε τιμές pHi πλησιέστερες στα φυσιολογικά επίπεδα (~6.9), ενώ η αντλία ανταλλαγής Na^+/H^+ λαμβάνει τη μέγιστη δραστικότητά της σε χαμηλότερες τιμές pHi (~6.6).

- ***Αντλία ανταλλαγής Na^+/H^+:*** υπάρχει σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών και συναντάται σε τέσσερις ισομορφές. Ανταλλάσσει εξωκυττάριο Na^+ με ενδοκυττάριο H^+ σε αναλογία 1:1. Η λειτουργία της υποβοηθείται από την είσοδο ιόντων Na^+ προς το εσωτερικό του κυττάρου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία δημιουργείται από την αντλία ανταλλαγής Na^+/K^+. Η δράση της αναχαιτίζεται από την αμυλορίδη και τα ανάλογά της.

- ***Na^+-εξαρτώμενη αντλία ανταλαγής $Cl^-/HCO3^-$***: έχει εντοπισθεί σε μια ποικιλία κυττάρων των θηλαστικών. Μεταφέρει $HCO3^-$ στο εσωτερικό του κυττάρου σε ανταλλαγή με ενδοκυττάριο Cl^-, που εξάγεται αντίθετα με την κλίση συγκέντρωσής του. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός, ότι η κλίση συγκέντρωσης του εισερχόμενου Na^+ επιτρέπει την είσοδο του NaHCO3 σε ανταλλαγή με HCl. Η δράση της αναστέλλεται εκλεκτικά από τα παράγωγα στιλβενίου όπως το DIDS.

Ως ασθενές ορίζουμε ένα οξύ που δίνει ένα 10% ή λιγότερο προϊόν από ιόντα υδρογόνου, όταν διαλύεται στο νερό. Τα ασθενή οξέα στη μη-διϊσταμένη τους μορφή διαπερνούν ελεύθερα τη κυτταρική μεμβράνη. Το οξικο οξύ είναι ένα ασθενές οξύ (pKa= 4.74 ή Ka= 1.8× 10-5), το οποίο παραμένει κατά 99.8% ιονισμένο σε φυσιολογικές τιμές περιλαμβανομένων των τιμών pH (pH~7.5). Το 0.2% του μη ιονισμένου οξικού οξέος θα διαπεράσει τις μεμβράνες των κυττάρων του φυσιολογικού ιστού, κάνοντας το εσωτερικό του κυττάρου όξινο. Η ενδοκυττάρια διάσταση αυτού του 0.2% του οξικού οξέος θα προκαλέσει το πλεόνασμα των ιόντων H^+ με αποτέλεσμα τη μείωση του pHi. Η ενεργοποίηση των παραπάνω περιγεγραμμένων, φυσιολογικά μη ενεργών, ρυθμιστικών του pH αντλιών ιόντων θα επαναφέρει τις φυσιολογικές τιμές του pHi.

Αντιθέτως, οι τιμές του pHe που βρίσκονται στο περιβάλλον των ογκογόνων ιστών είναι σημαντικά χαμηλότερες, επιτρέποντας ένα μεγαλύτερο ποσοστό του οξικού οξέος να παραμείνει στη μη ιονισμένη μορφή, και επομένως να διαπεράσει την πλασματική μεμβράνη. Συνεπώς, μεγαλύτερη συγκέντρωση του μη ιονισμένου οξικού οξέος θα εμφανιστεί στο εσωτερικό του κυττάρου και η διάστασή του θα μειώσει το pHi σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Περαιτέρω, οι ήδη ενεργές, ρυθμιστικές του pHi, ιοντο-ανταλλακτικές αντλίες θα πρέπει να αντισταθμίσουν ένα επιπλέον φορτίο ενδοκυττάριου πλεονάσματος ιόντων H^+. Αυτό συνεπάγεται μια σχετική καθυστέρηση στην επαναφορά στις φυσιολογικές τιμές του pHi.

Σε άλλες περιπτώσεις ιστών, που εκτίθενται στο αποτέλεσμα της λευκάζουσας χρώσης από οξικό οξύ, όπως δυσπλασίες κ.α., οι τιμές του pHe είναι λιγότερο φανερά πιο χαμηλές από το φυσιολογικό και επομένως η έκταση των προηγουμένως περιγεγραμμένων φαινομένων μειώνεται κάπου στο ενδιάμεσο. Ως δυσπλασία ορίζεται το προκαρκινικό στάδιο από το οποίο περνά ο ιστός πριν δυνητικά να πάρει την καθαρά καρκινική του μορφή. Η εμφάνισή του περιγράφεται πολύ καλά στις βλεννογόνιες επιφάνειες των κοίλων οργάνων, περιλαμβανομένων, της γαστρεντερικής οδού, της στοματικής κοιλότητας, της ουροδόχου κύστης, του τραχήλου και των πνευμόνων.

2. Μεσοκυττάριος ουσία

Τα μακρομόρια που συνιστούν την μεσοκυττάρια ουσία, είναι: (α) της τάξης των γλυκοζαμινογλυκανών, δηλαδή πολυσακχαρίτες που σχηματίζουν συμπλέγματα με πρωτεΐνες που καλούνται πρωτεογλυκάνες, και (β) ινώδεις πρωτεΐνες δύο τάξεων. Αυτές είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη με κυρίως δομικό ρόλο, καθώς και η φιμπρονεκτίνη και η λαμινίνη με κυρίως συγκολλητικό ρόλο. Το κολλαγόνο όμως είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη της μεσοκυττάριας ουσίας. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πρωτείνες κολλαγόνου συναποτελούν μια οικογένεια ιδιαίτερα χαρακτηριστικών ινωδών πρωτεϊνών, που συναντώνται στους πολυκύτταρους οργανισμούς και εκκρίνονται από έναν αριθμό κυτταρικών τύπων, κυρίως όμως από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού. Ένα τυπικό μόριο κολλαγόνου είναι μια επιμήκης, άκαμπτη, ελικοειδής τριπλή αλυσίδα στην οποία τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου (α αλυσίδες) περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σχηματίζοντας μια υπερέλικα που μοιάζει με σχοινί.

Μετά από την απέκκρισή τους στον εξωκυττάριο χώρο, αυτά τα μόρια κολλαγόνου διευθετούνται στα ανάλογα πολυμερή, που ονομάζονται ινίδια κολλαγόνου. Τα ινίδια κολλαγόνου συχνά συναθροίζονται σε μεγαλύτερες δέσμες, που μοιάζουν με καλώδια και είναι ορατές με το μικροσκόπιο φωτός. Ένας τύπος κολλαγόνου, ο τύπος VII, σχηματίζει διμερή, που διευθετούνται σε εξειδικευμένες δομές που αποκαλούνται ινίδια πρόσφυσης και βοηθούν στην πρόσφυση της βασικής μεμβράνης των πολυστρωματικών επιθηλίων στο υποκείμενο στρώμα συνδετικού ιστού και επομένως είναι ιδιαιτέρως άφθονα στο δέρμα.

Κάτωθεν του στρώματος του πλακώδους επιθηλίου, βρίσκεται ένα δικτυωτό (σε αντίθεση με το ινιδώδες και σχετιζόμενο με ινίδια), τύπου VII κολλαγόνο. Όμως η πυκνότητα του κολλαγόνου στον μεσοκυττάριο χώρο των όγκων αναμένεται να είναι χαμηλή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι όγκοι δεν αναμένεται να περιέχουν αναλογικά πολλά κύτταρα συνδετικού ιστού. Από την άλλη μεριά, το υψηλό επίπεδο οργάνωσης, που συναντάται στους φυσιολογικούς ιστούς δεν μπορεί να επιτευχθεί εξαιτίας των χαμηλών τιμών του pHe στους καρκινικούς ιστούς, το οποίο ευθύνεται για την αποδιοργάνωση των δεσμών, που συνδέουν τις ίνες κολλαγόνου μεταξύ τους. Η δομική αποδιοργάνωση είναι επίσης το αποτέλεσμα της μειωμένης απέκκρισης των πρωτεϊνών προσκόλλησης. Τα ζωικά κύτταρα έχουν συνδέσμους μεταξύ του εξωκυττάριου δικτύου και του κυτταροσκελετού τους. Αυτές οι συνδέσεις είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται ιντεγκρίνες. Εκτός από το ρόλο τους ως γέφυρες μεταξύ των εξω- και ενδο-κυττάριων πολυπεπτιδικών αλυσιδών, οι ιντεγκρίνες παίζουν ρόλο και στην ενεργοποίηση των μονοπατιών μετάδοσης μηνυμάτων. Όμως τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν πολλές ιντεγκρίνες, ενώ από την άλλη μεριά έχουν ένα αποδιοργανωμένο κυτταροσκελετό, ο οποίος δεν θα μπορούσε να εμφανίσει κανένα λειτουργικό αποτέλεσμα ακόμα κι αν ήταν συνδεδεμένος με την μεσοκυττάρια ουσία.

3. Οι πρωτεϊνες

Οι πρωτεϊνες υιοθετούν τις πιο σταθερά αναδιπλωμένες μορφές τους. Αυτή είναι μια λειτουργία του τρόπου με τον οποίο τα μεμονωμένα υπολείμματα αμινοξέων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το νερό. Οι περισσότερες πρωτεϊνες μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες: ινώδεις και σφαιρικές. Οι ινώδεις πρωτεϊνες συνήθως εξυπηρετούν δομικούς ρόλους. Οι σφαιρικές πρωτεϊνες λειτουργούν ως ένζυμα και εμφανίζουν και άλλες ιδιότητες.

Οι τρεις κυριότερες ομάδες ινωδών πρωτεϊνών είναι οι α-κερατίνες, οι β-κερατίνες και το κολλαγόνο.

- Οι α-κερατίνες συντίθενται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες με δεξιόστροφη ελίκωση, στις οποίες όλα τα αμινο-πεπτίδια και οι καρβονυλικές ομάδες σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Όταν αυτές οι ελικοειδείς σπείρες αλληλεπιδρούν, σχηματίζουν αριστερόστροφα περιελιγμένες σπείρες, μια μορφή γνωστή ως «περιελιγμένη έλικα».
- Οι β-κερατίνες αποτελούνται από εκτεταμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στις οποίες τα γειτονικά πολυπεπτίδια είναι προσανατολισμένα είτε παράλληλα, είτε αντιπαράλληλα σχηματίζοντας επιφάνειες, που μοιάζουν με φύλλα χαρτιού και είναι γνωστές ως «β-φύλλα». Τα β-φύλλα, που σχηματίζονται από σειρά εκτεταμένων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, μπορεί να στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο.
- Τα ινίδια κολλαγόνου συντίθενται από εκτεταμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που περιελίσσονται αριστερόστροφα. Τρεις από αυτές τις αλυσίδες αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου και περιελίσσονται μαζί σχηματίζοντας μια δεξιόστροφη

αλυσίδα σαν καλώδιο. Τα ινίδια κολλαγόνου συντίθενται από μια ασταθή συμπαράταξη πολλών τέτοιων καλωδίων, που προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ των πλαϊνών πλευρών τους.

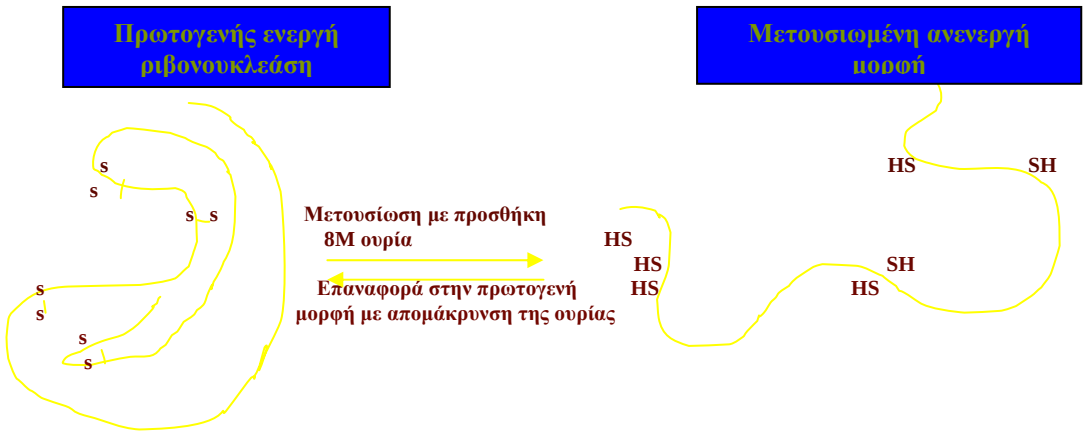
Οι ινώδεις πρωτεϊνες μπορούν να επιτύχουν εύκολα μια δυσδιάστατη διαμόρφωση, δεν παίρνουν όμως συχνά τρισδιάστατη διαμόρφωση. Αντιθέτως, πολλές σφαιρικές πρωτεϊνες μπορούν να κρυσταλλοποιηθούν, ώστε να αποκτήσουν τρισδιάστατη δομή. Θα μπορούσαμε να φανταστούμε τη δομή των σφαιρικών πρωτεϊνών σε τέσσερα επίπεδα. Βασικά, ολόκληρη η τρισδιάστατη διαμόρφωση των πρωτεϊνών καθορίζεται από την αμινοξική αλληλουχία τους ή αλλιώς από τη πρωτοταγή τους μορφή. Σε ένα υψηλότερο επίπεδο οργάνωσης, η ομαλώς επαναλαμβανόμενη γεωμετρική διαμόρφωση των ομάδων των υδρογονικών δεσμών του πολυπεπτιδικού σκελετού οδηγεί στο σχηματισμό των ομαλών δευτεροταγών δομών, που συγκρατούνται με υδρογονικούς δεσμούς. Τα δομικά στοιχεία των δευτεροταγών δομών περιλαμβάνουν περιοχές με τη μορφή α-έλικας, β-φύλλων και ζωνών. Ο συσχετισμός μεταξύ των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής με τη σειρά του, οδηγεί στο σχηματισμό δομικών περιοχών, οι ιδιότητες των οποίων καθορίζονται τόσο από τα χαρακτηριστικά της κύριας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, όσο και από τη φύση των πλευρικών αμινοξικών αλυσίδων. Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων σε κάθε περιοχή συναθροίζονται μαζί κατά τρόπο, που τείνει να προάγει τις ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες και τα περιβάλλοντα μόρια νερού. Περαιτέρω αλληλεπίδραση των περιοχών καταλήγει στο σχηματισμό της τριτοταγούς πρωτεϊνικής δομής, που είναι η γενικευμένη αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλύσου σε τρεις διαστάσεις. Τελικά οι υπομονάδες της τελείως αναδιπλωμένης πρωτεϊνικής δομής μπορούν να συναθροιστούν μαζί ώστε να σχηματίσουν τις τεταρτογενείς δομές.

- ***α-έλικα:*** πρόκειται για μια δεξιόστροφη έλικα. Η συγκέντρωση τέτοιων ελίκων πλάι-πλάι καταλήγει σε καθολικά αριστερόστροφες μορφές.
- ***Β-φύλλα:*** πρόκειται για μια δυσδιάστατη δομή, που αποτελείται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες που κείνται πλάι-πλάι με παράλληλη ή αντιπαράλληλη διευθέτηση.

4. Αναστρέψιμη μετουσίωση πρωτεινών (λευκή χρώση)

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του χαμηλού pHe σε κάποιες από τις πρωτεϊνες που βρίσκονται εκτός του κυττάρου, όπως περιγράφθηκε παραπάνω, η ακόλουθη αύξηση των τιμών του pHi, που προκύπτει από την ενδοκυττάρια διάσταση του οξικού οξέος, είναι ικανή να προκαλέσει αναστρέψιμη μετουσίωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Με τον όρο «αναστρέψιμη μετουσίωση» περιγράφουμε το φαινόμενο κατά το οποίο η τεταρτοταγής, τριτοταγής και μερικά η δευτεροταγής δομή μιας πρωτεϊνης αποδιοργανώνεται αναστρέψιμα, ενώ η πρωτοταγής δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας διατηρείται. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μετουσίωση μιας πρωτεϊνης αποτελεί διαδικασία, που συμβαίνει σε διάστημα από 1 έως 10 ms (1 sec το αργότερο) μετά την εφαρμογή του μετουσιωτικού παράγοντα, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την άμεση μακροσκοπικά εμφάνιση του φαινομένου. Από την άλλη μεριά, η στερεοχημική διαμόρφωση μιας πρωτεϊνης είναι πρωταρχικής σημασίας για τα χαρακτηριστικά των οπτικών της ιδιοτήτων. Γι αυτό το λόγο, οποιαδήποτε αλλαγή της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης θα καταλήξει στην αντίστοιχη αλλαγή του οπτικού προφίλ της πρωτεΐνης. Τέτοιου είδους μεταβολές ίσως τελικά να αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες του φαινομένου της λευκής χρώσης που επάγεται με την εφαρμογή του οξικού οξέος στους ιστούς.

Το παρακάτω επιγραμματικά περιγραφέν πείραμα αποδεικνύει ότι η πληροφορία για την αναδίπλωση σε μια βιολογικά ενεργή διαμόρφωση περιέχεται στην πρωτεϊνική αμινοξική αλληλουχία (σχήμα 4). Η παρουσίασή του σε αυτό το σημείο εξυπηρετεί την αναφορά μας, διότι επιπλέον αποδεικνύει τα αναστρέψιμα αποτελέσματα της δράσης ενός οξέος στη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.



Σχήμα 4. Κάθε αλλαγή της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης καταλήγει σε αντίστοιχη αλλαγή του οπτικού προφίλ της πρωτεΐνης.

5. Προτεινόμενος μηχανισμός λευκής χρώσης οξικού οξέος

Η αντίδραση διάστασης του οξικού οξέος είναι:

$$CH3COOH \rightleftharpoons CH3COO^- + H^+$$

1)ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

pH_e VL - $[H^+]$ ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΗ

pH_i N – $[H^+]$ ΧΑΜΗΛΗ

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Άρα $[CH_3COOH]$ Υψηλή → $CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ → Επομένως η $[H^+]$ αυξάνει, ενώ το pH_i πέφτει

2) ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

pH_e L - $[H^+]$ ΥΨΗΛΗ

pH_i N – $[H^+]$ ΧΑΜΗΛΗ

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Άρα $[CH_3COOH]$ Όχι τόσο υψηλή → $CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$

Επομένως η $[H^+]$ αυξάνει, ενώ το pH_i πέφτει
(Οχι τόσο σημαντικά)

↓

(όχι τόσο έκδηλα) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3) ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

pH_e N - $[H^+]$ ΧΑΜΗΛΗ

pH_i N – $[H^+]$ ΧΑΜΗΛΗ

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Άρα $[CH_3COOH]$ **πολύ χαμηλή** → $CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$

Όχι σημαντική πτώση του pHi

↓

ΚΑΝΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Ένα από τα μεγαλύτερα χαρακτηριστικά του φαινομένου της λευκής χρώσης μετά από εφαρμογή οξικού οξέος είναι η ακριβής ενδοκυττάρια εντόπιση και η μοριακή εξειδίκευση της εμφάνισής του. Στο σημείο αυτό προκύπτουν σημαντικότατα ερωτήματα, όπως το εάν πρόκειται για μετουσίωση ειδικών ειδών πρωτεϊνών κι αν ναι ποια είναι τα είδη αυτών. Ή μήπως είναι θέμα του συνολικού ποσού πρωτεϊνών εντός του κυττάρου; Περιορίζεται το φαινόμενο σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα, όπως ο πυρήνας ή όπως το κυτταρόπλασμα; Παίζουν άλλα μόρια, μαζί με ή χώρια από τις πρωτεΐνες, ρόλο στην εμφάνιση του φαινομένου; Είναι σημαντικές για την προώθηση του φαινομένου άλλες φυσιολογικές αλλαγές του κυττάρου, πέρα από την μετουσίωση, όπως η συρρίκνωση του κυττάρου ή η εξοίδησή του, που προκύπτουν από τη δράση του οξικού οξέος; Τα στοιχεία που προκύπτουν από διάφορες αναφορές είναι αρκετά αντιφατικά.

Σύμφωνα με κάποιες έρευνες το φαινόμενο της λευκής χρώσης του οξικού οξέος είναι πολύ εξειδικευμένο, εφόσον αφορά ένα ειδικό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, δηλαδή την κυττοκερατίνη 10. Παρόλαυτα, η εμφάνιση του αποτελέσματος της χρώσης αυτής σε μια ποικιλία παθολογικών ιστών, περιλαμβανομένων των καρκίνων, των δυσπλασιών και των χρόνιων φλεγμονών, που προέρχονται από διαφορετικά επιθήλια, εικάζει ότι ίσως να μην ισχύει κάτι τέτοιο. Μια πιο ελκυστική θεωρία έχει προταθεί από άλλες πηγές, σύμφωνα με τις οποίες το φαινόμενο είναι μερικώς ποιοτικό, αφορώντας ειδικά τα συστατικά του πυρήνα και μερικώς ποσοτικό εξαιτίας του γεγονότος ότι ο πυρήνας των δυσπλαστικών και καρκινικών κυττάρων είναι μεγαλύτερος και πυκνότερος από εκείνο των φυσιολογικών κυττάρων. Επιπλέον άλλοι παράγοντες, σύμφωνα με την ίδια θεωρία, φαίνεται ότι συνεισφέρουν στο τελικό αποτέλεσμα της λευκής χρώσης του οξικού οξέος. Όπως προτάθηκε από πολλούς ερευνητές, η εφαρμογή του οξικού οξέος ερεθίζει την κυτταρική αφυδάτωση και έτσι καταλήγει σε αύξηση της κυτταρικής και επομένως και της πρωτεϊνικής πυκνότητας. Από την άλλη μεριά υπάρχει ένας αξιοπρόσεχτος υπερ-πληθυσμός κυττάρων στους δυσπλαστικούς και καρκινικούς ιστούς, που οδηγούν σε αυξημένο αριθμό πυρήνων στον ίδιο όγκο ιστού, μια που η συνεχόμενη κυτταρική διαίρεση καταλήγει σε μείωση της ποσοστιαίας αναλογίας του κυτταροπλάσματος προς τον πυρήνα ανά κύτταρο. Η θεωρία της αφυδάτωσης σε συνδυασμό με τους υπερβολικά εποικισμένους από κύτταρα παθολογικούς ιστούς, δεδομένου ότι το φαινόμενο παρουσιάζεται στον πυρήνα, καταλήγει σε ένα αυξημένο αριθμό υπερ-αντιδραστικών πηγών ανά μονάδα περιοχής.

Περαιτέρω, η μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών προσκόλλησης στην κυτταρική μεμβράνη σε συνδυασμό με τη συνεχή κυτταρική διαίρεση προκαλεί ανώμαλη αρχιτεκτονική στον όγκο ή στη δυσπλαστική βλάβη, η οποία κάνει δυνατή την ταχεία διήθηση του οξικού οξέος στα βαθύτερα στρώματα. Αυτή η τελευταία παράμετρος ίσως να είναι υπεύθυνη για τη βαθμιαία αύξηση της έντασης του φαινομένου.

Λαμβάνοντας εκλεκτικά υπόψιν τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από τρέχουσες έρευνες, μπορούμε περαιτέρω να προτείνουμε άλλο ένα πιθανό παράγοντα που επηρεάζει το φαινόμενο της χρώσης με οξικό οξύ. Τα πιο χαρακτηριστικά μόρια που παρουσιάζονται αποκλειστικά στον πυρήνα (με εξαίρεση τον πυρήνα των μιτοχονδρίων) είναι οι διπλές έλικες του DNA. Αυτά τα μόρια λαμβάνουν στερεοχημικές διαμορφώσεις, που είναι οπτικά ενεργές. Περαιτέρω το DNA είναι παρόν στους πυρήνες των κυττάρων με τη μορφή του συμπλέγματος με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τις ιστόνες, σχηματίζοντας το λεγόμενο ινίδιο χρωματίνης. Το τελικό στάδιο διαμόρφωσης των ελίκων του DNA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις με τις ιστόνες. Οι ιστόνες μπορεί να αποσυνδεθούν από το DNA με τη δράση άλατος ή διαλυμένου οξέος στη χρωματίνη. Επιπροσθέτως, τα καρκινικά κύτταρα, εξαιτίας της συνεχούς διαίρεσής τους, κυρίως περιέχουν χρωματίνη στην σχετικά εκτεταμένη (ξεδιπλωμένη) διαμόρφωσή της, που επιτρέπει στο DNA να είναι ενεργό και αποκαλείται ευχρωματίνη, σε αντιδιαστολή με την περισσότερο συμπυκνωμένη

διαμόρφωσή της, που λέγεται ετεροχρωματίνη, και συναντάται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα φυσιολογικά, λιγότερο συχνά διαιρούμενα, επιθηλιακά κύτταρα. Προτείνουμε, ότι το ίδιο επίπεδο μείωσης του επιπέδου του pHi θα έχει περισσότερο μαζικό αποτέλεσμα στη χαλαρή διαμόρφωση της ευχρωματίνης από ότι στην συμπυκνωμένη ετεροχρωματίνη, κάνοντας τη χρώση του οξικού πιο εμφανή στους παθολογικούς ιστούς.

Όπως έχει επαρκώς αναλυθεί προηγουμένως, το φαινόμενο της χρώσης με οξικό οξύ είναι προσωρινό και αυτομάτως αναστρέψιμο. Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε στην παρούσα μελέτη, αυτό οφείλεται στη βαθμιαία επαναφορά του φυσιολογικού pHi, η οποία ακολουθεί την περαιτέρω ενεργοποίηση των ρυθμιστικών του pH ιοντοανταλλακτικών αντλιών, που περιγράφηκαν προηγουμένως. Σύμφωνα με το ίδιο μοντέλο, εφόσον η μείωση του pHi θα είναι μεγαλύτερη στα κύτταρα του παθολογικού ιστού, το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επαναφορά του pHi αναμένεται να είναι μακρύτερο. Περαιτέρω, οι ρυθμιστικές του pH, ιοντοανταλλακτικές αντλίες, που είναι ήδη ενεργές εξαιτίας του χαμηλού pHe, θα επιβαρυνθούν από το επιπλέον φορτίο κατιόντων H^+ και θα επιβραδυνθεί ο ρυθμός λειτουργίας τους.

6. Πειράματα

Η αξιοπιστία της θεωρίας που προτείνουμε επιβεβαιώνεται με μια σειρά από πειράματα, που συναποτελούν μέρος διατριβής συνεργάτη μας, που εν συντομία αναφέρονται παρακάτω:

Πείραμα 1 :

- ***Σκοπός:*** έλεγχος του αποτελέσματος της εφαρμογής του οξικού οξέος (3%) στις οπτικές ιδιότητες ενός αριθμού διαφορετικών κυτταρικών σειρών σε συνθήκες με ποικίλο pHe, με τη χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης.
- ***Υλικά και μέθοδοι:*** χρήση κυτταρικών σειρών από τρεις διαφορετικές ανατομικές περιοχές του σώματος. Αυτές είναι ο λάρυγγας, η στοματική κοιλότητα και ο τράχηλος. Από κάθε μια από αυτές τις περιοχές θα χρησιμοποιηθούν υγιείς, δυσπλαστικές και καρκινικές (όλων των πιθανών διαβαθμίσεων) κυτταρικές σειρές στις ακόλουθες συνθήκες και θα πραγματοποιηθεί αποκάλυψη των οπτικών τους ιδιοτήτων με τη χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης:

Α) Εφαρμογή του οξικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=8.5
Β) Εφαρμογή του οξικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=7.5
Γ) Εφαρμογή του οξικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=7.0
Δ) Εφαρμογή του οξικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5
Ε) Εφαρμογή του οξικού οξέος σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=5.5

Πείραμα 2 :

- ***Σκοπός:*** ο έλεγχος του αποτελέσματος της εφαρμογής ποικίλων συγκεντρώσεων οξικού οξέος στις οπτικές ιδιότητες των καρκινικών (όλων των πιθανών διαβαθμίσεων) κυτταρικών σειρών σε σταθερές όξινες συνθήκες pHe.
- ***Υλικά και μέθοδοι:*** χρήση των κυτταρικών σειρών από τον λάρυγγα, τη στοματική κοιλότητα και τον τράχηλο, στις παρακάτω συνθήκες και την αποκάλυψη των οπτικών ιδιοτήτων με τη χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης:

Α) Εφαρμογή οξικού οξέος (2%) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5
Β) Εφαρμογή οξικού οξέος (4%) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5
Γ) Εφαρμογή οξικού οξέος (5%) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5
Δ) Εφαρμογή οξικού οξέος (6%) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5

Πείραμα 3 :

- ***Σκοπός:*** έλεγχος του αποτελέσματος της επίδρασης άλλων ασθενών οξέων (σε ταυτόσημες συγκεντρώσεις, x%, ισότιμες με εκείνες που παρουσιάστηκαν στα προηγούμενα πειραματικά μοντέλα) στις οπτικές ιδιότητες των καρκινικών (όλων των διαβαθμίσεων) κυτταρικών σειρών σε σταθερές συνθήκες pHe.
- ***Υλικά και μέθοδοι:*** χρήση κυτταρικών σειρών από τον λάρυγγα, την στοματική κοιλότητα και τον τράχηλο στις ακόλουθες συνθήκες και αποκάλυψη των οπτικών ιδιοτήτων με τη πολυφασματική απεικόνιση:

Α) Εφαρμογή ισοβουτυρικού οξέος (x %) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5

Β) Εφαρμογή διμεθυλ-οξαζολιδινο-2,4-διονης (x %) σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συνθήκες pHe=6.5

Πείραμα 4 :

- ***Σκοπός:*** έλεγχος του αποτελέσματος των συνθηκών του όξινου pHi στις οπτικές ιδιότητες ενός σταθερού διαλύματος από ποικίλες κεκαθαρμένες πρωτεϊνες.
- ***Υλικά και μέθοδοι:*** προετοιμασία ενός σταθερού διαλύματος, που περιέχει έναν αριθμό από κοινές κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτείνες σε σταθερές συγκεντρώσεις. Χορήγηση των συγκεντρώσεων οξικού οξέος και αποκάλυψη των οπτικών ιδιοτήτων με τη χρήση πολυφασματοσκοπικής απεικόνισης :

Α) Χορήγηση 2% οξικού οξέος στο πρωτεϊνικό διάλυμα
Β) Χορήγηση 3% οξικού οξέος στο πρωτεϊνικό διάλυμα
Γ) Χορήγηση 4% οξικού οξέος στο πρωτεϊνικό διάλυμα
Δ) Χορήγηση 5% οξικού οξέος στο πρωτεϊνικό διάλυμα
Ε) Χορήγηση 6% οξικού οξέος στο πρωτεϊνικό διάλυμα

Πείραμα 5 :

- ***Σκοπός:*** έλεγχος του αποτελέσματος εφαρμογής συνθηκών όξινου pHi στις οπτικές ιδιότητες ενός σταθερού διαλύματος κεκαθαρμένης χρωματίνης.
- ***Υλικά και μέθοδοι:*** προετοιμασία ενός σταθερού διαλύματος, που να περιέχει σταθερή συγκέντρωση χρωματίνης. Χορήγηση συγκεντρώσεων οξικού οξέος και αποκάλυψη των οπτικών ιδιοτήτων με τη χρήση πολυφασματοσκοπικής απεικόνισης :

Α) Χορήγηση 2% οξικού οξέος σε διάλυμα χρωματίνης.
Β) Χορήγηση 3% οξικού οξέος σε διάλυμα χρωματίνης.
Γ) Χορήγηση 4% οξικού οξέος σε διάλυμα χρωματίνης.
Δ) Χορήγηση 5% οξικού οξέος σε διάλυμα χρωματίνης.
Ε) Χορήγηση 6% οξικού οξέος σε διάλυμα χρωματίνης.

Όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία και οι συγκεντρώσεις τους για τη διατήρηση των κυτταρικών σειρών παρέχονται από την εταιρία στην οποία παραγγέλλονται οι κυτταρικές σειρές. Οι πάτοι του δοχείου όπου διατηρούνται οι κυτταρικές σειρές χρωματίζονται, έτσι ώστε να είμαστε σε θέση να ελέγχουμε την αντανάκλαση στο φόντο. Ο έλεγχος του pHe γίνεται μέσω της διάθεσης δυνατών ηλεκτρολυτών, έτσι ώστε να επέλθουν σε πλήρη διάσταση εκτός του κυττάρου και να μην επιδράσουν αμέσως με το pHi.

7. Βιβλιογραφία

1. Agrawal A, et al. Fluorescence spectroscopy of the cervix: influence of acetic acid, cervical mucus, and vaginal medications. Lasers Surg Med 25:237-249, 1999.
2. Aharonovitz O, et al. Intracellular pHregulation by Na^+/H^+ exchange requires phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. J Cell Biol 150:213-224, 2000.
3. Aickin CC. Movement of acid equivalents across the mammalian smooth muscle cell membrane. CIBA Foundation Symposium 139:3-22, 1998.
4. Allen K, et al. Biosynthesis of endotubin: an apical early endosomal glycoprotein from developing rat intestinal epithelial cells.Biochem J 330:367-373, 1998.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishers, 1994.
6. Bacskai JB, et al. Imaging of amyloid-β deposits in brains of living mice permits direc observation of clearance of plaques with immunotherapy Nature Medicine 7:369-372, 2001.
7. Balas C. An Imaging Colorimeter for Non-contact Tissue Mapping.IEEE T BioMed Engin44:468-474, 1997.
8. Balas C, et al. In Vivo assessment of acetic acid-cervical tissue interaction using quantitative imagimg of back-scattered light: Its potential use for the in vivo cervical cancer detection grading and mapping. SPIE P Proceedings Vol.3568, pp.31-37, 1998.
9. Balas JC, et al. In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid tissue-interaction kinetics. J Photochem Photobiol 53:153-157, 1999.
10. Berggard T, et al. Ca^+- and H^+-dependent conformational changes of calbindin D. Biochemistry 39:6864-73, 2000.
11. Bierman AJ, et al. The Na^+/H^+ exchanger is constitutively activated in P19 embryonal carcinoma cells, but not in a differentiated derivative. Responsiveness to growth factors and other stimuli. J Biol Chem 262:9621-9628, 1987.
12. Bikhazi BA, et al. Two uncompetitive, activated, and transport sites of the Na^+/H^+ exchanger for pHY regulation in perfused rat kidney. Comparative Biochemistry and Physiology 123:417-422, 1999.
13. Bischof G, et al. Intracelluläre pH-Regulation in humanen SW-620-Kolokarzinomzellen.Wiener Klinische 102:369-375, 1990.
14. Bischof G, et al. Effects of extra-cellular pH on intracellular pH-regulation and growth in a human colon carcinoma cell-line. Biochimica et Biophysica 1282:131-139, 1996.
15. Bonanno JA, et al. Intracellular pH regulation in basal corneal epithelial cells measured in corneal explants: characterization of Na/H exchange. Exp Eye Res 49:129-142, 1989.
16. Boyer JM, et al. Regulation of Intracellular pH in Tumor Cell Lines: Influence of Micro-environmental Conditions. Cancer Research 52: 4441-4447, 1992.
17. Bousquet JA, et al. Circular dichroic investigation of the native and non-native conformational states of the growth factor receptor-binding protein 2 N-terminal src homology domain 3: effect of binding to aproline-rich peptide from guanine nucleotide exchange factor. Biochemistry 39:7722-35, 2000.
18. Bremer C, et al. In vivo molecular target assessment of matrix mellanoproteinase inhibition. Nature Medicine 7:743-748, 2001.

19. Burgio L, et al. Pigment identification in painted artworks: A dual analytical approach employing laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy. Applied Spectroscopy 54;463-469, 2000.
20. Campion MJ, et al. Subclinical penile human papillomavirus infection and dysplasia in consorts of women with cervical neoplasia. Genitourin Med 64:90-99, 1998.
21. Chang LY, et al.Telomerase activity and in situ telomerase RNA experession in oral carcinogenesis. J Oral Pathol Med 28:389-396, 1999.
22. Chien C, Chao C, et al. Effect of Acetic Acid on Telomerase Activity in Cervical Intraepithelial Neoplasia. Gynecology Oncology 71:99-103, 1998.
23. Chu LG, et al. The role of low intracellular or extracellular pH in sensitization to hyperthermia. Radiation Research 114:154-167, 1998.
24. Collier T, et al. Near Real Timer Confocal Microscopy of Amelanotic Tissue: Dynamics of Aceto-whitening Enable Nuclear Segmentation. Optics Express 6:40-48, 2000.
25. Cooper MG. Oncogenes. Jones and Bartlett Publishers, 1995.
26. Coppleson M, et al. Colposcopic differentiation of abnormalities arising in the transformation zone. Contemporary Colposcopy 20:83-110, 1993.
27. Corkum P, et al. Experimental attosecond science makes its debut.Physics World 13;23-24, 2000.
28. Counter MC, et al. Telomerase shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO Journal 11:1921-1929, 1992.
29. Czernobilsky B, et al. Intermediate filaments of normal and neoplastic tissues of the female genital tract with emphasis on problems of differential tumor diagnosis. Path Res Pract 179:31-37, 1984.
30. DeLaat SW, et al. Ionic signal transduction in growth factor action. Biochem Soc Symp50:205-220, 1985.
31. DeVita TV, et al. Principles and Practice of Oncology.Lippincott-Raven Publishers, 1997.
32. Dexeus S, et al. Colposcopy. WB Saunders Company, 1977.
33. Drezek AR, et al. Laser scanning confocal microscopy of cervical tissue before and after application of acetic acid. Am J Obstet Gynecol 182:1135-1139, 1999.
34. Duquette AR, et al. pH regulation and buffering power in gastric smooth muscle.Pflügers Arch-Eur J Physiol 442:459-466, 2001.
35. Fellenz PM, et al. Influence of extrcellular pH on intracellular pH and cell energy status: Relationship to hyperthermic sensitivity. Radiation Research 116:305-312, 1998.
36. Ficsor G, et al. Enhancing cervical cancer detection using nucleic acid hybridization and acetic acid tests. Nurse Pract 15:29-30, 1990.
37. Gerweck EL, et al. The simultaneous determination of intracellular pH and cell energy status.Radiation Research125:257-261, 1991.
38. Gerweck EL, et al. The pH partition theory predicts the accumulation and toxicity of doxorubicin in normal and low-pH-adapted cells. British Journal of Cancer 79:838-842, 1999.
39. Goons NP, et al. Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos.4 and 13. Experimental Cell Research 162:97-113, 1986.
40. Guidozzi F. Screening for Cervical Cancer. Obstetrical and Gynecological Survey 51:247-252, 1996.

41. Hamamoto TD, et al. The role of pH and osmolarity in evoking the acetic acid induced wiping response in a model of nociception in frogs. Brain Research 862:217-229, 2000.
42. Harley BC, et al. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.Nature 345:458-460, 1990.
43. Hawley-Nelson P, et al. HPV16 E6 and E7 proteins ccoperate to immortalize human foreskin keratinocytes. EMBO Journal 8:3905-3910, 1989.
44. Jackson JM, et al. Relations of weak-electrolyte transport and acid-base metabolism in rat small intestine in vitro. American Journal of Physiology 228:482-487, 1975.
45. Jansson B. Mathematical models in cell cycle kinetics.Mathematical models in biology and medicine:21-39.North holand publishing company, 1974.
46. Jonsson M, et al. Aceto-whitening of the cervix and vulva as a predictor of sub-clinical human papillomavirus infection: Sensitivity and specificity in population-based study. Obstetrics and Gynecology 9:744-747, 1997.
47. Karuri AR, et al. Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. Br J Cancer 68:1080-1087, 1993.
48. Kellokoski JK, et al. Cytokeratin pattern in normal and HPV infected oral mucosa in women with genital HPV infections. J Oral Pathol Med 20:26-31, 1990.
49. Kierkegaard O, et al. Association between colposcopic findings and histology in cervical lesions: The significance of the size of the lesion. Gynecology Oncology 57:66-71, 1995.
50. Kim WN, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science266:2011-2015, 1994.
51. King GG, et al. Identifiaction of Na^+/H^+ exchange on the apical side of surface colonocytes using BCECF. American Physiological Society 267:119-128, 1994.
52. Kokka N, et al. Naloxone enhancement of acetic acid induced writhing in rats. Life Sciences 21:975-980, 1977.
53. Köttgen M, et al. pH regulation in HT_{29} colon carcinoma cells. Pflügers Arch 428:179-185, 1994.
54. Kozin SV, et al. Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient. British Journal of Cancer 77:1580-1585, 1998.
55. Kudo R, et al. Morphology of Adenocarcinoma in situ and micro-invasive Adenocarcinoma of the uterine cervix: a cytologic and ultra-structural study. Acta Cytologica 35:109-116, 1991.
56. Kyo S, et al. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. Cancer Research 57:1863-1867, 1997.
57. L'Allemain G, et al. Role of a Na^+ -dependent Cl^-/HCO_3^- Exchange of intracellular pH in fibroblasts. The Journal of Biological Chemistry 260:4877-4883, 1985.
58. Lagana H, et al. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na^+/H^+ exchanger NHE1. J Cell Sci 113:3649-62, 2000.
59. Lee AH, Tannock IF. Heterogeneity of intracellular pH and mechanisms that regulate intracellular pH in populations of cultured cells. Cancer Res 58: 1901-1908, 1998.
60. Lynette D, et al. Evaluation of alternative methods of cervia\cal cancer screening for resource-poor settings. American Caner Society 89:826-833, 2000.
61. MacLeod RJ, et al. Activation of Na^+/H^+ Exchange is required for regulatory volume decrease after modest 'physiological' volume increases in jejunal villus epithelial cells. The Journal Of Biological Chemistry 271:23138-23145, 1996.

62. Maddox P, et al. Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. J Clin Pathol 47:15-17, 1994.
63. Megevand E, et al. Acetic acid visualization of the cervix: An alternative to cytologic screening. Obstet Gynecol 88:383-386, 1996.
64. Mello ML. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. Histochem J15:739-51, 1983.Moll R, et al. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31:11-24, 1982.
65. Moolenar WH, Tetoolen LG, DeLaat SW. The regulation of cytoplasmic pH n human fibroblasts. J Biol Chem 259:7563-69, 1984.
66. Moolenaar WH, et al. Rapid ionic events and the initiation of growth in serum-stimulated neuroblastoma cells. Cell 23:789-798, 1981.
67. Moolenaar WH, et al. Sodium/Proton exchange in mouse neuroblastoma cells. The Journal of Biological Chemistry 256:12883-12887, 1981.
68. Moolenaar WH, et al. Epidermal Growth factorinduces electrically silent Na^+ influx in human fibroblasts. The Journal of Biological Chemistry 257:8502-8506, 1982.
69. Moolenaar WH, et al. Na^+/H^+ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. Nature304:645-648, 1983.
70. Morin BG.The human telomerase terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell59:521-529, 1989.
71. Muh F, et al. Conformational relaxation following reduction of the photoactive bacteriopheophytin in reaction centers form Balstochloris viridis. Influence of mutations at position M208. Biochim Biophys Acta 1459:191-201, 2000.
72. Mutirangura A, et al. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and bening cervical lesions. Br J Cancer 78:933-939, 1989.
73. Newell K, et al. Effects of agents which inhibit the regulation of intracellular pH on murine solid tumors. Br J Cancer 66:311-317, 1992.
74. Nilius B, et al. Modulation of volume regulated anion channels by extra- and intracellular pH.Eur J Physiol 436:742-748, 1998.
75. Opas M. Measurement of intracellular pH and pCa with a confocal microscope. Trends in Cell Biology 7:75-80, 1997.
76. Pao CC, et al. Differential expression of telomerase activity in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions. Journal of Clinical Oncology 15:1932-1937, 1997.
77. Raghunand N, et al. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumor pH. British J of Cancer 80:1005-1011, 1999.
78. Ren S, et al. Regulation of human mast cell beta-tryptase: conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH. J Immunol 160:4561-9, 1998.
79. Rettinger J. Characteristics of Na^+/K^+ - ATPase mediated proton current in Na^+- and K^+-free extracellular solutions. Indications for kinetic similarities between H^+/K^+-ATPase and Na^+/K^+-ATPase. Biochimica et Biophysica Acta 1282:207-215, 1996.
80. Ritter M, et al. Effect of inhibitors of Na^+/H^+ -exchange and gastric H^+/K^+ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes. British Journal of Pharmacology 124:627-638, 1998.
81. Rotin D, et al. Requirement of the Na^+/H^+ exchanger for tumor growth. Cancer Res49:205-11, 1989.
82. Ruppersberg PJ. Intracellular regulation of inward rectifier K^+ channels. Eur J Physiol 441:1-11, 2000.
83. Sankaranarayanan R, et al. Visual inspection with aetic acid in the early detection of cervical cancer and precursors. Int J Cancer 80:161-163, 1999.

84. Sendov B. A mathematical model of cellular differentiation. Mathematical models in biology and medicine.North holand publishing company: 81-92, 1974.
85. Shier RM. The colposcopy unit. Obstetrics & Gynecology Clinics of N. America 40:47-67, 1993.
86. Siegumfeldt H, et al. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Applied and Environmental Microbiology 66:2330-2335, 2000.
87. Silverman SJr, et al. Toluidine blue staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 57:379-82, 1984.
88. Smedts F, et al. Changing patternsof keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. Amarican Jornal of Pathology 136:657-668,1990
89. Smithpeter C, et al. Near real time confocal microscopy of cultured amelanotic cells: Sources of signal, contrast agents and limits of contrast. Journal of Biomedical Optics 3:429-436, 1998.
90. Soper ED. Geniturinary Infections and Sexually Transmitted Diseases. Novak's Gynecology twelfth edition.Williams and Wilkins, 1996.
91. Spitzer M, et al. Cervical screening adjuncts: Recent advances. Am J Obstet Gynecol 179:544-556, 1998.
92. Stryer L. Biochemistry, Fourth edition. WH Freeman and Company, 1999.
93. Stubbs M, et al. Causes and consequences of acidic pH in tumors: A magnetic resonance study. Advan Enzyme Regul 39:13-30,1999
94. Stubbs M., et al. Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment. Molecular Medicine Today Vol.6, pp.15-19, 2000.
95. Tobey AN, et al. HCL-induced cell edema in primary cultured rabbit esophageal epithelium. Gastroenterology 112:847-854, 1997.
96. Τρακατέλλης Α. Βιοχημεία, Τόμος Α, Μέρος 1.Εκδοτικός οίκος αφών Κυριακίδη, 1990.
97. Tsuji A, et al. PH-dependent intestinal transport of monocarboxylic acids: Carrier-mediated and H^+-contransport mechanism versus pH-partition hypothesis. American Pharmaceutical Association 79:1123-1124, 1990.
98. Van Le L, et al. Acetic acid visualization of the cervix to detect cervical dysplasia. Obstet Gynecol 81:293-295, 1993.
99. Volker J, et al. Thermodynamic properties and conformationally constrained intramolecular DNA triplex. Biochemistry 36:756-67, 1997.
100. Wahl LM, et al. Intracellular pH regulation in a nonmalignant and a derived malignant human breast cell line. Journal of Cellular Physiology 183:373-380, 2000.
101. Walter A, et al. Weak acid permeability through lipid bilayer membranes. J Clin Physiol 79:917-932, 1981.
102. Weissleder R, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. Nature Medicine 6:351-354, 2000.
103. Wilscut J, et al. Ca^+ -induced fusion of phospholipd vesicles containing free fatty acids: Modulation by transmembrane pH gradients. American Chemical Society 31:2629-2636, 1992.
104. Yamagata M, Tannock IF. The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: in vitro and anti-tumor effects. Br J Cancer 73:1328-1334, 1996.
105. Yu V, et al. Effect of the alkyl chain length of monocarboxylic acid on the permeation through bilayer lipid membranes. Biochemica et Physica Acta 1281:245-251, 1996.

106. Yun CH., et al. Mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family: structure and function studies. Am J Physiol 269:1-11, 1995.
107. Zhou R, et al. Intracellular acidification of human melanoma xenografts by the respiratory inhibitor m-iodobenzylguanidine plus hyperglycemia: A ^{31}P magnetic spectroscopy study. Cancer Research 60:3532-3536, 2000.
108. Zubey LG, Parson WW, Vance ED. Principles of Biochemistry.Wm. C. Brown Publishers, 1995.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. ASSESSMENT OF NASAL MUCOSA BLOOD SUPPLY USING QUANTITATIVE ENDOSCOPING IMAGING OF THE BACK-SCATTERED LIGHT.
Prokopakis EP, Balas CJ, Christodoulou PN, Gourtsoyiannis NC, Tosca AD, Helidonis ES.
Otolaryngology Head Neck Surgery 121:307-312, 1999
2. IN VIVO DETECTION AND STAGING OF EPITHELIAL DYSPLASIAS AND MALIGNANCIES BASED ON THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF ACETIC ACID TISSUE INTERACTION KINETICS.
Balas CJ, Themelis G, ***Prokopakis EP***, Orfanoudaki E, Koumantakis E, Helidonis ES.
Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology 53:153-157, 1999
3. THE ROLE OF HYPER-SPECTRAL DYNAMIC IMAGING FOR THE DETECTION AND GRADING OF PREMALIGNANT LESIONS AND EPITHELIAL CANCERS, IN HEAD AND NECK REGION.
Prokopakis EP, Themelis G, Velegrakis GA, Christodoulou PN, Balas CJ, Helidonis ES.
Foglia Otorhinolaryngologica 6:77-82, 2000
4. APPLICATIONS OF MULTISPECTRAL IMAGING IN OTOLARYNGOLOGY.
Helidonis ES, Hajiioannou JK, ***Prokopakis EP***.
Pro Otology Balcan Journal of Otology and Neurootology 2:61-64, 2001

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ

1. «ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΩΤΟΡΙΝΟΛΑΡΥΓΓΟΛΟΓΙΑ»,
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΧΕΛΙΔΟΝΗ Καθηγητή Πανεπιστημίου Κρήτης,
Ιατρικές Εκδόσεις «Π. Πασχαλίδη», Αθήνα 2002
Γεώργιος Βελεγράκης Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Ιωάννης Μπιζάκης Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Παναγιώτης Χριστοδούλου Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Επιμέλεια και συγγραφή του κεφαλαίου:
Β. Σύγχρονη απεικόνιση στην Ωτορινολαρυγγολογία

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΑ

1. Spectral imaging for the in-vivo detection and mapping of tissue lesions. Implications in laser treatment planning.
Balas CJ, **Prokopakis EP**, Helidonis ES.
Chapter 25, *In: Principles and Practice of Lasers in Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, pp 443-450, edited by V. Oswal and M. Remacle. 2002 Kugler Publications, The Hague, The Netherlands.*

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Balas CJ, Christodoulou PN, **Prokopakis EP**, Helidonis ES.
Endoscopic Machine Vision System for Blood Supply Estimation of the Nasal Mucosa.
Laser Applications in Medicine and Dentistry, SPIE Vienna , Austria, September, 1996.
2. Balas CJ, **Prokopakis EP**, Christodoulou PN, Helidonis ES.
A Multi-Wavelength Imaging System for Ear Drum Infrared Diaphanoscopy.
16th World Congress of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Sydney, Australia, March 2-7, 1997.
3. Christodoulou PN, **Prokopakis EP**, Balas CJ, Helidonis ES.
Endoscopic Machine Vision Estimation of the Nasal Mucosa Hematosis.
16th World Congress of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Sydney, Australia, March 2-7, 1997.
4. Themelis G, **Prokopakis EP**, Velegrakis GA, Skoulakis CE, Helidonis ES.
Dynamic, two dimensional study of erythema development characteristics in prick-puncture test.
1st World Congress of Otolaryngologic Allergy, Endoscopy and Laser Surgery. Athens, June 24-27, 1998.
5. Prokopakis EP, Christodoulou PN, Bizakis JG, Papadakis CE, Balas CJ, Helidonis ES.
Quantitative endoscopic imaging of the back scattered light in assessing nasal mucosa blood flow.
1st World Congress of Otolaryngologic Allergy, Endoscopy and Laser Surgery. Athens, June 24-27, 1998.
6. Helidonis ES, **Prokopakis EP**, Skoulakis C, Themelis G, Balas CJ.
In vivo study of flare kinetics in skin puncture test using multiband imaging.
45th Congress of the Slovac Society for Otolaryngology, Head and Neck Surgery. Bratislava, Slovac Republic, October 7-10, 1998.
7. Balas CJ, Themelis G, **Prokopakis EP**, Velegrakis GA, Helidonis ES.
Acetic acid squamous cell carcinoma interaction study using multispectral imaging.
45th Congress of the Slovac Society for Otolaryngology, Head and Neck Surgery. Bratislava, Slovac Republic, October 7-10, 1998.
8. Helidonis ES, **Prokopakis EP**, Themelis GC, Velegrakis GA, Tosca AD, Balas CJ.
In vivo study of acetic acid-scc interaction using multispectral imaging.
The 2nd International Symposium in Israel on Head and Neck Surgery and Oncology, Jerusalem, Israel, November 1-5, 1998.
9. Balas C, Themelis G, **Prokopakis E**, Koumantakis E, Helidonis E**.**
Epithelial cancers and precancers detection and grading using Multi-spectral Dynamic Imaging.
VI International Conference in Medical Physics, Patras, Greece, September1-4, 1999.
10. Themelis G, **Prokopakis E**, Pagalos A, Papadakis B, Balas C, Helidonis E.
In vivo quantitative assessment of immunological and allergic status using multispectral imaging.
VI International Conference in Medical Physics, Patras, Greece, September1-4, 1999.
11. Prokopakis EP, Balas CJ, Themelis GC, Helidonis ES.
In vivo cancer detection and grading using multispectral imaging.
AAO-HNS Annual Meeting, New Orleans, Lousiana, September 26-29, 1999.
12. Prokopakis EP, Balas CJ, Karatzanis A, Themelis G, Helidonis ES.
Premalignant lesion and epithelial cancer detection and grading in head and neck region, using multispectral dynamic imaging.
50th Anniversary Extraordinary Congress of Spanish Society of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Madrid, Spain, October 24-27, 1999.
13. Prokopakis EP, Bizakis JG, Papadakis D, Velegrakis GA, Balas CJ, Helidonis ES.
In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies of the head and neck region, based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics.
Advances in Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2000, Santorini, Greece, May 4-6, 2000.

14. Prokopakis EP, Velegrakis GA , Balas CJ, Helidonis ES.
Premalignant lesion and epithelial cancer detection and grading in head and neck region, using hyper-spectral dynamic imaging.
4th European Congress of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Berlin, Germany, May 13-18, 2000.
15. Prokopakis EP, Themelis GC, Velegrakis GA, Christodoulou PN, Balas CJ, Helidonis ES.
The role of hyper-spectral dynamic imaging for the detection and grading of premalignant lesions and epithelial cancers, in head and neck region.
19th International Conference of Young Otolaryngologists, St. Petersburg, Russia, June 19-21, 2000. ***(1ο βραβείο)***
16. Hajiioannou J., **Prokopakis E.,** Velegrakis G., Balas C., Themelis G., Helidonis E.
The assessment of histamine induced skin reaction by objective measurement of the erythema formation, with the use of a Multispectral Imaging System.
2nd world Congress of Otorhinolaryngologic Allergy Endoscopy and Laser Surgery
11th Pan-Hellenic Congress of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery,
Athens, Greece, June 2001.
17. Prokopakis EP, Hajiioannou JK, Velegrakis GA, Balas C, Themelis G, Helidonis ES.
The assessment of histamine induced skin reaction by the objective measurement of erythema formation, with the use of a multispectral imaging system.
The XVIIth World Congress of The International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (IFOS). Cairo, Egypt, 28th Sept-3 Oct., 2002.
18. Prokopakis EP, Hajiioannou JK, Velegrakis GA, Balas C, Helidonis ES.
The assessment of histamine induced skin reaction by the objective measurement of erythema formation, with the use of a multispectral imaging system.
American Academy of Otolaryngologic Allergy annual meeting, Florida, USA, September 18-20, 2003.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Μπάλας Κ., **Προκοπάκης Ε.**, Χριστοδούλου Π., Χελιδόνης Ε. Ανάπτυξη συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης και χρησιμοποίησή του για την ανάλυση και διαφανοσκόπηση της τυμπανικής μεμβράνης. *Πανελλήνιο συνέδριο εφαρμογών Laser στην ιατρική. 28-30 Ιουνίου, 1996, Αθήνα.*
2. Προκοπάκης Ε., Γκανάς Χ., Βελεγράκης Γ., Μπιζάκης Ι., Παπαδάκης Χ, Μπάλας Κ., Χελιδόνης Ε. Ο ρόλος της πολυφασματικής απεικόνισης στη διενέργια οπτικής βιοψίας. *9ο Πανελλήνιο ΩΡΛ Συνέδριο – Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου. Ρόδος, 25-28 Οκτωβρίου 1997.*
3. Προκοπάκης Ε., Παπαδάκης Χ., Βελεγράκης Γ., Χριστοδούλου Π., Μπάλας Κ., Σκουλάκης Χ., Χελιδόνης Ε. Οι οπτικές ιδιότητες της τυμπανικής μεμβράνης και η αξιοποίησή τους στη μελέτη της διαφανοσκόπησής της. *9ο Πανελλήνιο ΩΡΛ Συνέδριο – Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου. Ρόδος, 25-28 Οκτωβρίου 1997.*
4. Προκοπάκης Ε., Μπάλας Κ., Σπυριδάκης Ν., Χριστοδούλου Π., Σκουλάκης Χ., Χελιδόνης Ε. Εφαρμογή συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης στη μελέτη αιματώσεως του ρινικού βλεννογόνου. *9ο Πανελλήνιο ΩΡΛ Συνέδριο – Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου. Ρόδος, 25-28 Οκτωβρίου 1997.*
5. Προκοπάκης Ε, Πάγκαλος Α, Σπυριδάκης Ν, Θεμελής Γ, Βελεγράκης Γ, Μπάλας Κ, Χριστοδούλου Π, Χελιδόνης Ε.: In vivo ποσοτική εκτίμηση της ανοσολογικής και αλλεργιολογικής κατάστασης με τη χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης. *10ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΩΡΛ-Χειρουργική Κεφαλής και Τραχήλου. Καλαμάτα, 6-10 Οκτωβρίου 1999.*

6. **Προκοπάκης Ε.**, Παπαδάκης Δ., Πάγκαλος Α., Νικολιδάκης Α., Βελεγράκης Γ., Χελιδόνης Ε. Τοπική εφαρμογή οξικού οξέος σε δυσπλαστικές και καρκινικές αλλοιώσεις λάρυγγα, με τη βοήθεια πολυφασματικής απεικόνισης. *10ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Ρέθυμνο, 9-12 Νοεμβρίου 2000.*
7. Χατζηιωάννου Ι,. **Προκοπάκης Ε.**, Βελεγράκης Γ., Μπάλας Κ., Θεμελής Γ., Χελιδόνης Ε. Η αξιολόγηση της προκληθήσας από ισταμίνη δερματικής αντίδρασης με την αντικειμενική μέτρηση του σχηματιζόμενου ερυθήματος χρησιμοποιώντας σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. *11° Πανελλήνιο Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας-Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου. Αθήνα, 20-23 Ιουνίου 2001.*
8. **Προκοπάκης Ε.**, Χατζηιωάννου Ι., Βελεγράκης Γ., Χελιδόνης Ε. Η αξιολόγηση της δράσης της σετιριζίνης κατά την δοκιμασία νηγμού χρησιμοποιώντας σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. *11° Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Χανιά 1-3 Νοεμβρίου 2002.*
9. Χατζηιωάννου Ι., **Προκοπάκης Ε.**, Λαχανάς Β., Καρατζάνης Α., Παπαδάκης Χ., Κυρμιζάκης Δ., Βελεγράκης Γ. Η αξιολόγηση της δράσης της σετιριζίνης κατά τη δοκιμασία νηγμού χρησιμοποιώντας σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. *12° Πανελλήνιο Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας-Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου. Θεσσαλονίκη, 9-12 Οκτωβρίου 2003.*

ΣΤΡΟΓΓΥΛΕΣ ΤΡΑΠΕΖΕΣ – ΟΜΙΛΙΕΣ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ

1. Ανοσοθεραπεία – σύγχρονες απόψεις. 5ο Σεμινάριο ΩΡΛ Αλλεργίας: Η τέχνη και η επιστήμη των δερματικών δοκιμασιών και της ανοσοθεραπείας στη διάγνωση και θεραπεία των ΩΡΛ αλλεργικών παθήσεων. Πάτρα, 3-4 Μαρτίου 2001.
2. Applications of multispectral imaging in Otolaryngology. Seminar on Otology and Neuro-Otology. 3-d Video seminar, Cadaver dissection, May 2001 Stara Zagora, Bulgaria.
3. The impact of Laser technology in the progress of Otolaryngology and beyond. ILLA / LTL '2003 International Conference and Symposium in Laser Technology and Lasers. Plovdiv, Bulgaria, September 27-October 1 2003.
4. In vivo και in vitro διάγνωση των αλλεργικών παθήσεων. Πρακτική εξάσκηση. Μεταπτυχιακό σεμινάριο Αλλεργίας, Ανοσολογίας, Ροχαλητού & Αποφρακτικής Υπνικής Άπνοιας στα παιδιά. Παλαιά Πεντέλη, 5-6 Ιουνίου 2004.
5. Lecture on; "Future development and direction of research in Otolaryngology". 5th European Congress of Otolaryngology-head and Neck Surgery. Rodos-Kos, Greece, 11-16 September, 2004.
6. Lecture on; "Multispectral imaging in Otolaryngology". 5th European Congress of Otolaryngology-head and Neck Surgery. Rodos-Kos, Greece, 11-16 September, 2004.

ΒΡΑΒΕΙΑ

1. Helidonis ES, **Prokopakis EP**, Themelis GC, Balas CJ.
Multispectral imaging. A novel diagnostic tool.
AAO-HNS Annual Meeting, New Orleans, Lousiana,USA, September 26-29, 1999. **(1ο βραβείο Scientific Exchibition)**

2. **Prokopakis EP**, Themelis GC, Velegrakis GA, Christodoulou PN, Balas CJ, Helidonis ES.
The role of hyper-spectral dynamic imaging for the detection and grading of premalignant lesions and epithelial cancers, in head and neck region.
19th International Conference of Young Otolaryngologists, St. Petersburg, Russia, June 19-21, 2000. **(1ο βραβείο)**