

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΟΣΚΑ**

**ΕΙΡΗΝΗ Μ. ΣΤΕΦΑΝΑΚΗ**  
**ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ – ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**  
**ΗΡV ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ**  
**ΔΕΡΜΑΤΟΒΛΕΝΝΟΓΟΝΙΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Α. ΤΟΣΚΑ**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002**

Στην οικογένειά μου

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>I</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b>	<b>IV</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>VIII</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>X</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>XI</b>

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

#### **Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

1. Γενικά	1
2. Δομή του ιού	2
3. Οργάνωση του ιικού γονιδιώματος	4
4. Ταξινόμηση	4
5. Βιολογικές λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών	5
6. Ο κύκλος ζωής του ιού	7
7. Επιδημιολογία	8
8. Κλινικές εκδηλώσεις των HPV-μολύνσεων	9
8.1 Καλοήθειες βλάβες	9
8.2 HPV και καρκίνος	10
8.2.1 HPV και καρκίνος πρωκτογεννητικής περιοχής	10
8.2.2 HPV και καρκίνος του δέρματος	11
8.2.3 HPV και άλλες κακοήθειες	12
9. Οξυτενή κονδυλώματα	13
9.1 Γενικά	13
9.2 Επιδημιολογία	13
9.3 Κλινική εικόνα	14
9.4 Ιστολογική εικόνα	15
9.5 Θεραπεία	15

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

#### **ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ ΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ δ-ΑΜΙΝΟΛΕΒΟΥΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ**

##### **A. ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ ΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ**

1. Ιδιότητες του φωτός	19
1.1 Η κυματική φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	19
1.2 Η σωματιδιακή φύση του φωτός	19
2. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	20
3. Η αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη	21
4. Οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι	22
5. Οξεικό οξύ	24
<b>B. ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ δ-ΑΜΙΝΟΛΕΒΟΥΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ (ALA)</b>	
1. Γενικά για το φθορισμό	26
2. Φθορισμός και φωτοδιάγνωση	27

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

### **ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ δ-ΑΜΙΝΟΛΕΒΟΥΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ**

1. Φωτοδυναμική θεραπεία	31
2. Φωτοευαισθητοποιητές	32
3. δ-αμινολεβουλινικό οξύ	36
4. Συστήματα φωτισμού	38
5. Μηχανισμοί δράσης ΦΔΘ	40
5.1 Φωτο-οξειδωτικοί μηχανισμοί	40
5.2 Κυτταροτοξικότητα ΦΔΘ- Βλάβη υποκυττάρων στόχων	41
5.3 Αντιδράσεις φλεγμονής και ανοσολογική απόκριση	44
5.3.1 Οξείες αντιδράσεις φλεγμονής	44
5.3.2 Όψιμες αντιδράσεις φλεγμονής	45
5.3.3 Ανοσολογική απόκριση και ιστολογικές αλλαγές	45
6. Εφαρμογές τοπικής ΦΔΘ με ALA	46
7. ΦΔΘ και ιοί	47

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

### **ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ ΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ**

1. Ασθενείς	49
2. Χημική ουσία	49
3. Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης	50
4. Κλινικές μετρήσεις	54
5. Υλικό βιοψιών	54
6. Ιστολογική ταξινόμηση	55
7. Ανίχνευση του HPV και τυποποίηση με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση	55
7.1 Γενικά	55
7.2 Παράμετροι της PCR	56
7.3 Εκχύλιση DNA	57
7.4 Συνθήκες αντιδράσεων PCR	58
7.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων	59
7.6 Ηλεκτροφόρηση DNA	59
7.7 Χρώση νουκλεϊκών οξέων	60
7.8 Εταιρίες προέλευσης των υλικών	61
8. Αποτελέσματα	63
8.1 Ιστολογική εξέταση	63
8.2 Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV	63
8.3 Αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού	64

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

### **IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

1. Ασθενείς	70
2. Φωτοευαισθητοποιητής	70
3. Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης της κινητικής του φθορισμού	70
4. Κλινικές μετρήσεις	72
5. Αποτελέσματα	73
5.1 Ιστολογική εξέταση και ανίχνευση HPV DNA	73
5.2 Κινητική του φθορισμού	73

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></b>	
<b>ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>	
1. Ασθενείς	79
2. Φωτοευαισθητοποιητής	79
3. Σύστημα Φωτοδυναμικής Θεραπείας	79
4. Συνεδρίες Φωτοδυναμικής Θεραπείας	82
5. Αποτελέσματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας	83
5.1 Κλινική παρακολούθηση	83
5.2 Ποσοστά ίασης	84
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></b>	
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	
1. Εισαγωγή	87
2. Φωτοδιάγνωση με οξεικό οξύ	88
2.1 Ιστολογική εξέταση και ανίχνευση HPV	88
2.2 Αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού	89
3. In vivo μελέτη της κινητικής του φθορισμού και ΦΔΘ με ALA	91
3.1 Μελέτη της κινητικής του φθορισμού	91
3.2 ΦΔΘ με ALA	93
4. Συμπεράσματα	95
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	96

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

<b>Επώνυμο:</b>	Στεφανάκη
<b>Όνομα:</b>	Ειρήνη
<b>Όνοματεπώνυμο πατέρα:</b>	Στεφανάκης Μηνάς
<b>Όνοματεπώνυμο μητέρας:</b>	Νικολιδάκη-Στεφανάκη Δήμητρα
<b>Ημερομηνία γέννησης:</b>	9/5/1971
<b>Τόπος γέννησης:</b>	Αθήνα
<b>Διεύθυνση:</b>	Θεοδοσίου Διακόνου 16, Ηράκλειο Κρήτης
<b>Υπηκοότητα:</b>	Ελληνική

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

<b>1989:</b>	Αποφοίτηση από το 40 <sup>ο</sup> Λύκειο Αθηνών
<b>1989-1995:</b>	Φοίτηση στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Αποφοίτηση με βαθμό 8.17 (Λίαν Καλώς)

## ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

<b>8/1995 -11/1996:</b>	Ιατρός Υπόχρη Υπηρεσίας Υπαίθρου με απόσπαση στο Ακτινοθεραπευτικό Τμήμα του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου
-------------------------	--

**12/1996 -12/1997:**

Ειδικότητα στην Α' Παθολογική  
Κλινική του Βενιζέλειου  
Νοσοκομείου Ηρακλείου

**1/1998-1/2001:**

Απόκτηση Ειδικότητας  
Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας  
στο Περιφερειακό  
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο  
Ηρακλείου

**Παρούσα απασχόληση:**

Θέση Δερματολόγου-  
Αφροδισιολόγου στο Ίδρυμα  
Κοινωνικών Ασφαλίσεων

## **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ**

### **Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις:**

1. M. Koukourakis, **I. Stefanaki**, A. Giatromanolaki, C. Frangiadaki, A. Armenaki, V. Georgoulas, E. Koumandakis, A. Kranidis, E. Helidonis. Fractioned carboplatin radiosensitization. A phase I dose-escalation study. Am J Clin Oncol 1998, 21(6): 595-601.
2. **I. Stefanaki**, C. Balas, G. Themelis, E. Vazgiouraki, D. Dokianakis, D. Spandidos, A. Tosca. In vivo detection of Human Papilloma Virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: A novel and accurate approach to a trivial method. J Photochem Photobiol B: Biol 2001, 65(2-3): 115-121.
3. **I. Stefanaki**, S. Georgiou, G. Themelis, E. Vazgiouraki, A. Tosca. A model study correlating the assessment of in vivo fluorescence kinetics with photodynamic therapy efficacy in condylomata acuminata after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Submitted.

### **Ελληνικές δημοσιεύσεις:**

1. Ι. Μελισσάς, **Ε. Στεφανάκη**, Γ. Δατσέρης, Δ. Τσιφτσής. Περίπτωση κύστης από τον πόρο του Müller με εξαιρετικά ασυνήθη εντόπιση. Σεμινάρια Εσωτερικής Παθολογίας 1994, 1(4):283-286.
2. Ι. Μελισσάς, Μ. Χριστοδουλάκης, **Ε. Στεφανάκη**, Κ. Χατζηθεοφίλου, Α. Manell. Παράκαμψη του οισοφάγου με στόμαχο. Ιατρικά Χρονικά 1999, 22(9): 401-405.
3. **Ε. Στεφανάκη**. Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα δέρματος. Ιατρική 2000, 78(1): 35-43, 2000.

### **Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια:**

1. S. Politaki, **I. Stefanaki**, J. Chatzicolaou, G. Polychronaki, V Chologitas, C. Giannakopoulou. The effects on the newborn of alcohol, nicotine and drug abuse during pregnancy. 1<sup>st</sup> European Congress of Medical Students, Athens Greece 14-16 April 1995.
2. **I. Stefanaki**, N. Karpeta, M. Christodoulakis, I. Melissas. Surgical treatment of morbid obesity. 6<sup>th</sup> European Students Conference, Berlin 19-21 October 1995.
3. H. Varveris, C. Fragiadaki, M. Mazonakis, E. Christodoulakis, P. Mandolas, S. Kahris, **I. Stefanaki**, H. Varanakis, S. Sifakis, P. Prokopakis, D. Tsiftsis. Does postoperative radiotherapy increase morbidity and reduce survival in breast cancer carcinoma patients? Effects of local nodal irradiation on mediastinum and systemic immunity to cancer or the breast. HSBCR Second International Congress, Kos 25-28 October 1995.
4. H. Varveris, Z. Haralambakis, M. Koukourakis, M. Mazonakis, **I. Stefanaki**, G. Pissakas, S. Sifakis, A. Zolindaki, C. Relakis, G. Froudarakis, E. Koumantakis. A phase II trial of concurrent brachytherapy and chemotherapy with platinum compounds for the treatment of locally advanced carcinoma of the uterine cervix (Stage II, III, IVA). Radiology and Oncology '96, Birmingham 20-22 May 1996.
5. D. Ioannidou, M. Stefanidou, **I. Stefanaki**, M. Alexandrakis, J. Panayotidis, K. Krasagakis. Langerhans cell histiocytosis in an elderly patient complicated with Serratia marcescens infection. Clinical Dermatology 2000, Vienna 17-20 May 2000.
6. **I. Stefanaki**, C. Balas, G. Themelis, E. Vazgiouraki, A. Tosca. Photodiagnosis of condylomata acuminata by using acetic acid and 5-aminolevulinic acid. Clinical Dermatology 2000, Vienna 17-20 May 2000.



7. **I. Stefanaki**, C. Balas, G. Themelis, E. Vazgiouraki, D. Dokianakis, D. Spandidos, A. Tosca. In vivo detection and staging of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area by quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics. 6<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 4<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos Crete 18-20 October 2001.

#### **Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια:**

1. **Ε. Στεφανάκη**, Γ. Παπαδόπουλος, Δ. Μπρίμης, Μ. Στεφανίδου, Α. Τόσκα. Χρόνια κνίδωση. Η εμπειρία της Δερματολογικής κλινικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Κέρκυρα 14-18 Απριλίου 1999.

2. Δ. Ιωαννίδου, Μ. Στεφανίδου, **Ε. Στεφανάκη**, Α. Βολουδάκη, Ι. Παναγιωτίδης, Μ. Τσαρδή, Μ. Αλεξανδράκης. Ιστιοκυττάρωση Langerhans σε υπερήλικα σχετιζόμενη με αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο. 10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000.

3. Δ. Ιωαννίδου, Μ. Στεφανίδου, Ι. Παναγιωτίδης, Σ. Μαράκη, Κ. Καραμανωλάκη, **Ε. Στεφανάκη**, Μ. Αλεξανδράκης, Α. Τόσκα. Δερματική αλτερναρίωση σε ασθενή με οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία. 10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 9-12 Νοεμβρίου 2000.

#### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

1. Διδασκαλία μαθήματος Δερματολογίας στο ΤΕΕ Νοσηλευτών του Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Βενιζέλειο-Πανάκειο κατά το σχολικό έτος 1996-97.

2. Παράδοση διαλέξεων στα πλαίσια του μαθήματος των Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων του εαρινού εξαμήνου 2001 και 2002 του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

#### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά (Proficiency of University of Cambridge).

## Περίληψη

Τα οξυτενή κονδυλώματα αποτελούν τη συχνότερη ιογενή σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο. Ο αριθμός των ασθενών με κλινικά ορατή νόσο αποτελεί ένα μικρό μόνο ποσοστό των ατόμων με υποκλινική και λανθάνουσα μόλυνση από τον ιό του θηλώματος του ανθρώπου (Human Papilloma Virus-HPV), καθώς μεγάλο μέρος του σεξουαλικά ενεργού πληθυσμού είναι μολυσμένο από ένα ή περισσότερους HPV τύπους. Κατά συνέπεια, η φυσική εξέταση υποεκτιμά την έκταση της μόλυνσης από HPV, ενώ οι *in vitro* διαγνωστικές μέθοδοι είναι δαπανηρές και χρονοβόρες. Οι HPV16, 18 καθώς και άλλοι τύποι του ιού έχουν ανιχνευθεί σε μεγάλο ποσοστό στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του αιδοίου, του πέους και του πρωκτού. Παρότι τα οξυτενή κονδυλώματα αποτελούν μεγάλο επιδημιολογικό πρόβλημα, δεν υπάρχει έως σήμερα κοινά αποδεκτή θεραπεία εκλογής, καθώς οι συμβατικές θεραπείες έχουν μέτρια ποσοστά ανταπόκρισης και σχετικά υψηλά ποσοστά υποτροπών. Επιπλέον, όλες οι θεραπευτικές μέθοδοι στοχεύουν στην καταστροφή των ορατών βλαβών καθώς η εκρίζωση του ιού είναι αδύνατη.

Στην παρούσα έρευνα έγινε προσπάθεια *in vivo* ανίχνευσης και σταδιοποίησης της HPV μόλυνσης της περιγεννητικής και περιπρωκτικής περιοχής, μελετώντας τις χωρικές και χρονικές μεταβολές που προκαλεί το οξεικό οξύ στις ιδιότητες σκέδασης φωτός του προσβεβλημένου από HPV ιστού. Για την καταγραφή και εκτίμηση αυτών των μεταβολών χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτότυπο σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. Μελετήθηκαν δερματικές βλάβες ασθενών με κλινική εικόνα οξυτενών κονδυλωμάτων της περιγεννητικής και περιπρωκτικής χώρας. Η αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού ανέδειξε ποσοτικές παραμέτρους, που περιλαμβάνουν πληροφορίες τόσο για το μέγεθος όσο και για τη διάρκεια των επαγόμενων μεταβολών. Η εκτίμηση των βλαβών με ιστολογική εξέταση και την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), επιβεβαίωσε ότι η μέθοδος περιέχει ειδική διαγνωστική πληροφορία, καθώς κάνει δυνατή τη διάκριση μεταξύ υποκλινικών βλαβών, κλινικών κονδυλωμάτων και ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων που αναπτύσσονται σε έδαφος HPV μόλυνσης. Επίσης επιτρέπει την ακριβή εντόπιση και περιγραφή των ορίων των βλαβών.

Επίσης εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας οξυτενών κονδυλωμάτων με δ-αμινολεβουλιτικό οξύ (ALA). Προηγήθηκε μελέτη της κινητικής του φθορισμού της πρωτοπορφυρίνης IX (PpIX) μετά από επάλειψη των βλαβών με ALA, προκειμένου να επιλεγούν για φωτοδυναμική θεραπεία όσες

παρουσίασαν εκλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Επιπλέον υπολογίστηκε ο ιδανικός χρόνος έναρξης της ακτινοβολήσης κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας ώστε να εξατομικευτεί και να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος. Το ποσοστό ίασης των βλαβών μετά από παρακολούθηση ενός έτους ήταν 72,9%, αποδεικνύοντας ότι η φωτοδυναμική θεραπεία με ALA αποτελεί μία υποσχόμενη μέθοδο στην αντιμετώπιση των οξυτενών κονδυλωμάτων.

## Summary

Condylomata acuminata consist the most common sexually transmitted viral disease. A big percentage of the sexually active population is infected by one or more Human Papilloma Virus (HPV) types. However, the number of patients presenting with clinically overt lesions represent only the tip of the iceberg, since most genital tract HPV infections are subclinical or latent. Consequently, clinical examination underestimates the extent of HPV infection, whereas in vitro diagnostic methods are expensive and time consuming. HPV16, 18 and other HPV types have been detected frequently in carcinomas of the cervix, vulva, penis and anus. Although condylomata acuminata represent a great epidemiological problem, there is still no gold-standard therapy, since all treatment modalities have moderate response rates and relatively high recurrence rates. In addition, all therapeutic modalities aim to the destruction of clinically overt disease, since eradication of HPV is impossible.

The aim of this study was the in vivo detection and staging of HPV infection of anogenital area by quantitative assessment of the acetic acid-induced temporal and spatial alterations in the light-scattering properties of HPV-infected skin. For this reason an imaging system has been employed, which performs time-lapse imaging and enables the calculation and display of the kinetics of the provoked alterations in any point within the examined area. Lesions of anogenital area with clinical diagnosis of condylomata acuminata were studied. The evaluation of acetic acid-tissue interaction kinetics revealed quantitative parameters, containing information about the magnitude and duration of the provoked alterations. The histology evaluation and polymerase chain reaction performed, showed that the method contains specific diagnostic information, since it enables the differentiation between subclinical lesions, clinical condylomata acuminata and squamous cell carcinomas developing on condylomata. It also allows the exact localization of lesions and delineates their borders.

Photodynamic therapy efficacy in condylomata acuminata after topical application of  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) was also assessed. ALA-induced protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence kinetics were studied, in order to select for PDT suitable lesions that show selective accumulation of PpIX. The optimal time of illumination was determined, so as to improve PDT efficacy by individualizing the procedure. The overall cure rate was 72.9% 12 months after treatment, indicating that ALA-PDT is a potential effective treatment for condylomata acuminata.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στη Δερματολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (Διευθύντρια κ. Α. Τόσκα), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης (Διευθυντής κ. Δ. Σπαντίδος), το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης (Διευθυντής κ. Γ. Δελίδης) και το Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής και Απεικόνισης, Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Ηρακλείου (Διευθυντής κ. Κ. Φωτάκης).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής και ιδιαίτερα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας κ. Α. Τόσκα για το αμέριστο ενδιαφέρον της, τις επιστημονικές γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσε και τις πολύτιμες συμβουλές της. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Δ. Σπαντίδο και Καθηγητή κ. Γ. Δελίδη για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Σαμώνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Χαρίση, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κ. Κρασαγάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σ. Καραμπέκιο.

Θερμές ευχαριστίες στον Λέκτορα κ. Ι. Παναγιωτίδη, την κ. Δ. Δοκιανάκη και τον κ. Ν. Σουλιτζή για την ουσιαστική συνεισφορά τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες του ΙΤΕ, κ. Σ. Γεωργίου που ανέπτυξε το σύστημα φωτοδυναμικής θεραπείας, κ. Κ. Μπάλα που ανέπτυξε το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης, κ. Γ. Θεμελή και κ. Ε. Βαζγιουράκη για τη βοήθειά τους.

# **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

### **Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (Human Papilloma Virus- HPV)**

#### **1. Γενικά**

Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα ιών και ανήκουν -μαζί με τους Polyomaviruses- στην οικογένεια των Papovaviridae. Η μολυσματική φύση των HPV βλαβών αναδείχθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα. Οι πρώτες πειραματικές προσπάθειες συσχέτισης αυτών των μολύνσεων με την ανάπτυξη καρκίνου και η μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με άλλους καρκινογόνους παράγοντες έγιναν από τον Rous κατά το χρονικό διάστημα 1930-1950 (Rous P 1934, Rous P 1935, Rous P 1938, Rous P 1944). Τα σωματίδια του HPV οπτικοποιήθηκαν για πρώτη φορά με τη βοήθεια της ηλεκτρονιομικροσκοπίας το 1949 (Strauss MJ 1949), ενώ η δομή του γονιδιώματος του ιού άρχισε να μελετάται από τους Crawford και Crawford το 1963 (Crawford LV 1963).

Μία σημαντική ερευνητική προσέγγιση έγινε το 1959 από τον Olson (Olson C 1959), ο οποίος ανέφερε την επαγωγή όγκων της ουροδόχου κύστεως σε βοοειδή από ένα ιό θηλώματος που ανιχνεύθηκε σε θηλώματα δέρματος. Ο ίδιος ιός αποδείχθηκε επίσης ογκογόνος σε χάμστερ (Friedmann JC 1963, Boiron M 1964) και σε κύτταρα από ποντίκι και μοσχάρι σε κυτταροκαλλιέργειες (Black PH 1963, Thomas M 1963). Αποτέλεσαν μαζί με τον CRPV (cottontail rabbit papillomavirus) τα πρώτα μέλη της οικογένειας των Papillomaviruses για τα οποία αποδείχθηκε ότι μπορούσαν να προκαλέσουν κακοήθεις όγκους.

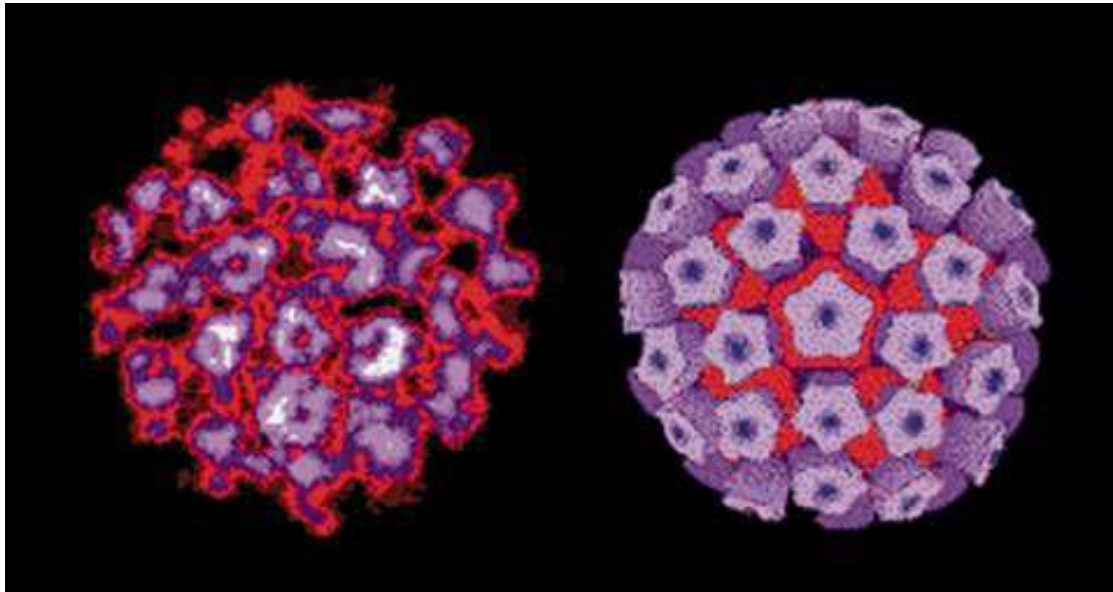
Μία άλλη σημαντική μελέτη ξεκίνησε το 1922, όταν οι Lewandowsky και Lutz ανέφεραν μια σπάνια κληρονομούμενη θηλωμάτωση σε ανθρώπους με ανάπτυξη καρκίνων του δέρματος σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές (Lewandowsky F, Lutz W 1922). Ονόμασαν αυτό το σύνδρομο μυρμηκιάδη επιδερμοδυσπλασία

(Epidermodysplasia verruciformis-EV). Το ιϊκό αίτιο των θηλωματωδών κηλίδων και πλακών που καλύπτουν το προσβεβλημένο δέρμα αυτών των ασθενών αποδείχθηκε αργότερα από τον Lutz (Lutz W 1946) και τη Jablonska (Jablonska 1957, Jablonska 1972), η οποία αντελήφθη ότι αυτό το σύνδρομο μπορούσε να αποτελέσει μοντέλο στις έρευνες για το ρόλο των Papillomaviruses στην καρκινογένεση. Ο Orth και η Jablonska απομόνωσαν το 1978 τον HPV5 από ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος ασθενών με μυρμηκιάδη επιδερμοδυσπλασία.

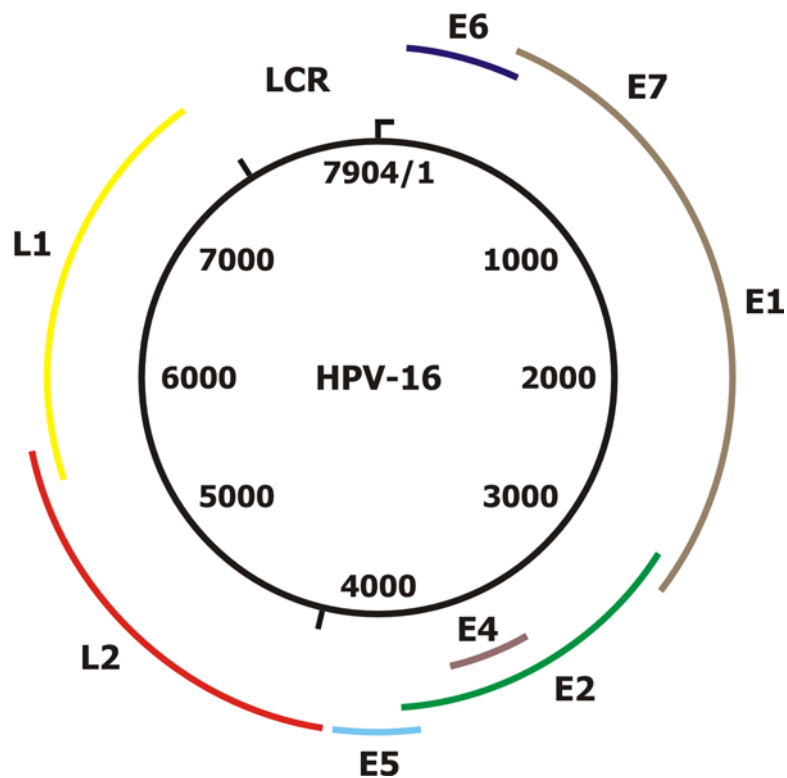
Οι πρώτες υποθέσεις ότι ο HPV ενέχεται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, διατυπώθηκαν το 1974-1976 (zur Hausen H 1974, zur Hausen H 1976). Το ίδιο χρονικό διάστημα άρχισε να αναδεικνύεται η ετερογένεια των ιών αυτής της ομάδας (Gissmann L 1976, Gissmann L 1977, Orth G 1977). Οι Meisels και Fortin πρότειναν τον HPV ως υπεύθυνο του ιστολογικού ευρήματος της κοιλοκυτταρικής ατυπίας (Meisels A 1976) στον τράχηλο της μήτρας, ενώ τα ευρήματά τους ενισχύθηκαν από την ανακάλυψη σωματιδίων του ιού μέσα σε κοιλοκύτταρα (Della Tore G 1978, Laverty CR 1978, Meisels A 1981). Η απομόνωση των τύπων HPV6 και 11 από βλάβες κονδυλωμάτων (Gissmann L 1980, Gissmann L 1982) και στη συνέχεια των HPV16 και 18 από βιοψίες καρκίνου τραχήλου της μήτρας (Dürst M 1983, Boshart M 1984) καθώς και από προκαρκινικές βλάβες (Ikenberg H 1983), οδήγησε σε ταχεία εξάπλωση της έρευνας για τους HPV και στις πρώτες επιδημιολογικές μελέτες. Παρά τις προσπάθειες πολλών ερευνητικών ομάδων, ο αιτιολογικός ρόλος συγκεκριμένων τύπων HPV στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έγινε αποδεκτός μετά από μία δεκαετία (Munoz N 1992, Bosch FX 1995, Matsukura T 1995).

## **2. Δομή του ιού**

Οι Papillomaviruses (PVs) είναι μη ελυτροφόροι ιοί με εικοσαεδρική συμμετρία και διάμετρο περίπου 55 nm (Σχήμα 1). Το γονιδίωμά τους είναι κλειστό κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA με μήκος 7500-8000 ζεύγη βάσεων (bp). Το καψίδιο αποτελείται από 72 πενταμερή καψομερίδια που σχηματίζονται από την πρωτεΐνη L1 (Pfister H 1994, Belnap DM 1996, Zhou J 1995). Το πολυπεπίδιο L1 αντιπροσωπεύει το 90% περίπου του συνολικού ποσού πρωτεΐνης του ιού και έχει μοριακό βάρος 54-58 kDa (Favre M 1975). Το καψίδιο του ιού περιέχει επίσης ένα δεύτερο πολυπεπίδιο, το L2, με μοριακό βάρος 68-76 kDa (Favre M 1975). Τέσσερα πολυπεπίδια χαμηλού μοριακού βάρους, που αντιστοιχούν στις κυτταρικές ιστόνες, συνδέονται με το DNA του ιού για να σχηματιστεί μία δομή παρόμοια με χρωματίνη (Favre M 1977).



**Σχήμα 1:** Γραφική απεικόνιση ηλεκτρονιοφωτογραφίας του σωματιδίου του HPV κατόπιν ψηφιακής επεξεργασίας.



**Σχήμα 2:** Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του HPV16



### **3. Οργάνωση του ιϊκού γονιδιώματος**

Ο προσδιορισμός της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας 10 ζωικών PVs και 85 HPV γενότυπων ανέδειξε ότι όλοι αυτοί οι ιοί παρουσιάζουν την ίδια γενετική οργάνωση (Wheeler CM 1996, Howley PM 1996). Η γενετική πληροφορία εντοπίζεται μόνο σε μία αλυσίδα DNA και αποτελείται από τουλάχιστον 8 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames-ORF) (Σχήμα 2). Το γονιδίωμα του ιού μπορεί να διακριθεί σε 3 περιοχές: α) την μακρά περιοχή ελέγχου (long control region-LCR) που αποτελεί το 7-11% του γονιδιώματος και δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη, β) την πρώιμη περιοχή (early region-E) που αντιστοιχεί στο 50% περίπου του γονιδιώματος και κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που ενέχονται στον κυτταρικό μετασχηματισμό (E5,E6,E7) ή στην αντιγραφή και μεταγραφή του γονιδιώματος του ιού (E1,E2) και γ) στην όψιμη περιοχή (late region-L) που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες L1, L2 του καψιδίου του ιού. Η περιοχή LCR των τύπων HPV που σχετίζονται με τη μυρμηκιδώδη επιδερμοδυσπλασία (EV) είναι μικρότερη (περίπου 350-500 bp) και έχει ειδικά χαρακτηριστικά (Fuchs PG 1996). Η σύγκριση των αλληλουχιών αποκάλυψε την ύπαρξη συντηρητικών περιοχών ανάμεσα στα γονιδιώματα των ιών, που εντοπίζονται κυρίως στο 3' άκρο των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORF) των πρωτεϊνών E1 και L1 (Wheeler CM 1996). Πολλές μελέτες χρησιμοποίησαν αυτές τις συντηρητικές περιοχές στο σχεδιασμό εκκινητών (primers) για την ανίχνευση αλληλουχιών HPV DNA σε δερματικές και γεννητικές βλάβες με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) (Shamanin V 1996, Berkhout RJ 1995, Manos MM 1989, De Roda Husman AM 1995, Kawashima M 1990).

### **4. Ταξινόμηση**

Οι HPV ταξινομούνται σε γενότυπους. Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό, οι γενότυποι πρέπει να περιλαμβάνουν λιγότερα από 90% πανομοιότυπα νουκλεοτίδια στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη L1 του καψιδίου (zur Hausen H 1996a). Οι HPV που έχουν τις ίδιες αλληλουχίες DNA σε ποσοστό 90-98% διακρίνονται σε υπότυπους, ενώ αυτοί που έχουν πανομοιότυπο DNA σε ποσοστό μεγαλύτερο από 98% θεωρούνται παραλλαγές (zur Hausen H 1996b, Deau MC 1993). Οι γενότυποι ορίζονται από έναν αριθμό και οι υπότυποι από ένα γράμμα, ακολουθώντας τη χρονολογική σειρά απομόνωσης. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί 85 γενότυποι HPV και το γονιδιώμά τους έχει περιγραφεί πλήρως, ενώ περισσότεροι από 120 πιθανοί καινούριοι τύποι έχουν μερικώς χαρακτηριστεί (de Villiers EM 1989a, de Villiers EM 1994, zur Hausen H 1989b).

Η ανάλυση των αλληλουχιών των γονιδίων της E6 και L1 πρωτεΐνης οδήγησε στην κατανομή των PVs σε πέντε φυλογενετικές υπερομάδες (supergroups) οι οποίες αντανakλούν ιστικό τροπισμό και παθογένεια (Bernard HU 1994, Chan SY 1995, van Ranst M 1992). Μία από τις μεγαλύτερες υπερομάδες αποτελείται από HPV γενότυπους που προσβάλλουν βλεννογόνους κυρίως της πρωκτογεννητικής περιοχής. Περισσότεροι από 40 χαρακτηρισμένοι HPV τύποι ανήκουν σε αυτή την ομάδα, με πιο γνωστό εκπρόσωπο τον HPV16. Μία άλλη υπερομάδα αντιπροσωπεύεται από ιούς που ανιχνεύονται σε βλάβες EV, με κύριο εκπρόσωπο τον HPV5. Αυτοί οι ιοί βρίσκονται επίσης σε βλάβες ανοσοκατασταλμένων ασθενών. Μία τρίτη υπερομάδα περιλαμβάνει λίγους γενότυπους που απαντώνται συνήθως σε δερματικές βλάβες, όπως ο HPV4. Η τέταρτη υπερομάδα είναι ετερογενής και αποτελείται από τύπους που σχετίζονται ασθενώς μεταξύ τους, όπως οι HPV1, HPV63 και HPV41.

Οι Papillomaviruses έχουν μεγάλη ειδικότητα ως προς τον ξενιστή τους. Μέχρι σήμερα κανένας γενότυπος HPV δεν έχει ανιχνευθεί σε ζώα. Αντίστοιχα, οι άνθρωποι δεν είναι ευαίσθητοι σε μολύνσεις από ζωικούς PVs (Shah KV 1996, Orth G 1985).

Ο προσδιορισμός συγκεκριμένων HPV γενότυπων ως υψηλού κινδύνου για κακοήθεια προέκυψε από τη συχνή παρουσία τους σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας και της πρωκτογεννητικής περιοχής (zur Hausen H 1986). Το πιο σημαντικό λειτουργικό χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τους υψηλού κινδύνου από τους χαμηλού κινδύνου HPV γενότυπους, είναι η ικανότητα των ογκοπρωτεϊνών των ιών να προκαλούν χρωμοσωμικές μεταβολές, οι οποίες υπερβαίνουν τους κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Λόγω αυτής της ιδιότητας, οι υψηλού κινδύνου HPV μπορούν να προκαλέσουν απευθείας εκτροπή σε κακοήθεια δρώντας ως πλήρη καρκινογόνα (zur Hausen H 1991). Αντίθετα, οι ιοί χαμηλού κινδύνου δεν κωδικοποιούν μεταλλαξιογόνες ογκοπρωτεΐνες και δεν αποτελούν πλήρη καρκινογόνα. Η σπάνια περίπτωση κακοήθους εξέλιξης τέτοιων λοιμώξεων εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με άλλους μεταλλαξιογόνους παράγοντες.

## **5. Βιολογικές λειτουργίες των ιϊκών πρωτεϊνών**

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E1 κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 600-650 αμινοξέων, η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του DNA του ιού. Η πρωτεΐνη E1 είναι μία DNA-εξαρτώμενη ATPάση και μία ATP-εξαρτώμενη ελικάση, που συνδέεται με μία αλληλουχία πλούσια σε AT μέσα στην περιοχή αντιγραφής (Chow LT 1994). Οι πρωτεΐνες E1 και E2 δημιουργούν ένα σύμπλεγμα, το οποίο ενισχύει και σταθεροποιεί τη σύνδεση της E1 στην περιοχή της αντιγραφής. Η E1

σχετίζεται με την κυτταρική DNA πολυμεράση  $\alpha$ , ένα συστατικό του μηχανισμού αντιγραφής του κυτταρικού DNA (Park P 1994).

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E2 κωδικοποιεί τουλάχιστον δύο ή και τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (Bouvard V 1994). Επηρεάζουν την έκφραση του γονιδιώματος του ιού και αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές σχηματίζοντας διμερή σε συγκεκριμένα σημεία σύνδεσης. Απαλοιφή (deletion) του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης E2 συναντάται συχνά σε καρκίνους τραχήλου της μήτρας και σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από αυτό τον καρκίνο (Schwarz E 1985). Φαίνεται όμως, ότι στη διαδικασία της καρκινογένεσης η διαταραχή της πρωτεΐνης E2 αποτελεί όψιμο γεγονός, καθώς οι περισσότερες προκακοήθειες βλάβες δεν παρουσιάζουν αυτή τη μεταβολή (Matsukura T 1989, Dürst M 1992).

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E4 περιλαμβάνεται εξ' ολοκλήρου στο κεντρικό τμήμα του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης E2, αλλά μεταφράζεται αλλού. Το μέγεθος των πρωτεϊνών E4 ποικίλλει από 90 έως 140 αμινοξέα για τους γεννητικούς HPV και από 200 έως 250 αμινοξέα για τους δερματικούς γενότυπους. Οι πρωτεΐνες E4 πρέπει να θεωρηθούν όψιμες (late), επειδή η έκφρασή τους συμπίπτει με την έναρξη της μαζικής αντιγραφής του ιϊκού DNA (Croissant O 1985). Η λειτουργία τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Το πιθανότερο είναι ότι αλληλεπιδρούν με τη φυσιολογική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, επάγοντας την παραγωγή και απελευθέρωση σωματιδίων του ιού (Doorbar J 1996, Rogel-Gaillard C 1993). Η πρωτεΐνη E4 του HPV16 φαίνεται ότι σχετίζεται με τα τονοϊνίδια, οδηγώντας σε διαταραχή των κυττοκερατινών (Doorbar J 1996, Roberts S 1993).

Η πρωτεΐνη E5 είναι μία υδρόφοβη πρωτεΐνη 75-100 αμινοξέων, που εντοπίζεται κυρίως στη συσκευή του Golgi αλλά και σε πρωτοπλασματικές μεμβράνες (Burkhardt A 1989). Ενώ η E5 του BPV1 (Bovine Papillomavirus 1) έχει ισχυρή μετασχηματιστική ικανότητα, η E5 των HPV εμφανίζει ασθενώς μόνο αυτή την ικανότητα (Schiller J 1986, Rabson MS 1986, Leptak C 1991, Leechanachai P 1992, Pim D 1992). Η E5 του HPV16 αλληλεπιδρά με μία υπομονάδα 16kDa της  $H^+$ -ATPάσης της μεμβράνης. Αυτό οδηγεί σε μεταβολή των pH-εξαρτώμενων αντιδράσεων, όπως αυτές που επηρεάζουν την ενδοκυττάρωση και την αποικοδόμηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (DiMaio D 1994, Banks L 1996). Επιπλέον η πρωτεΐνη E5 παρεμβαίνει στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων (gap junctions).

Οι E6 και E7 είναι μικρές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές πρωτεΐνες που ενέχονται στην αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (Farthing AJ 1994, Münger K 1995). Αυτό επιτρέπει την αύξηση του πληθυσμού των μολυσμένων κυττάρων και την αθρόα αντιγραφή του DNA του ιού σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, στα οποία η αντιγραφή του DNA σταματά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η πρωτεΐνη E6 αποτελείται από 150 αμινοξέα, περιέχει 4 δακτυλίους ψευδαργύρου και εντοπίζεται στον πυρήνα και σε εξωπυρηνικές μεμβράνες. Η πρωτεΐνη E6 των γεννητικών HPV, υψηλού κινδύνου για κακοήθεια, σχηματίζει σύμπλοκο με την κυτταρική πρωτεΐνη E6 AP (E6-associated protein) και την πρωτεΐνη p53, οδηγώντας στην ταχεία αποικοδόμηση της p53 (Münger K 1995). Η αποικοδόμηση της p53 προκαλεί συσσώρευση μεταλλάξεων και γονιδιακή αστάθεια. Η E6 των γεννητικών HPV χαμηλού κινδύνου για κακοήθεια έχει πολύ μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης με την p53 και η σύνδεσή τους δεν προκαλεί αποικοδόμηση της p53 (Howley PM 1996, Münger K 1995, Farthing AJ 1994). Η πρωτεΐνη E7 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη 100 αμινοξέων που δεσμεύει ψευδάργυρο. Η πρωτεΐνη E7 των γεννητικών HPV υψηλού κινδύνου συνεργάζεται με την E6 στην αθανатоποίηση κερατινοκυττάρων (Howley PM 1996, Münger K 1995). Η E7 των HPV16 και 18 συνδέεται με την πρωτεΐνη pRb (retinoblastoma protein), απελευθερώνοντας τον συνδεδεμένο στην pRb μεταγραφικό παράγοντα E2F. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των E2F-εξαρτώμενων γονιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση DNA (Howley PM 1996, Münger K 1995, Farthing AJ 1994). Η πρωτεΐνη E7 των χαμηλού κινδύνου HPV6 και 11 συνδέεται δέκα φορές ασθενέστερα με την pRb.

## **6. Ο κύκλος ζωής του ιού**

Οι HPV είναι αυστηρά επιθηλιότροποι και πολλαπλασιάζονται μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα (Orth G 1987, Shah KV 1996). Κανένας γενότυπος HPV δεν προσβάλλει ταυτόχρονα ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα προκαλώντας ινοθηλώματα, όπως κάνει μία ομάδα ζωικών PVs, π.χ. ο βόειος PV τύπου 1 (Campo S 1997, Howley PM 1996, Orth G 1994). Ορισμένοι HPV γενότυποι προσβάλλουν την επιδερμίδα, ενώ άλλοι μολύνουν βλεννογόνους (κυρίως πρωκτογεννητική περιοχή και στόμα και λιγότερο συχνά λάρυγγα, αναπνευστικό, οισοφάγο, ουροποιητικό σύστημα και επιπεφυκότες).

Είναι αποδεκτό ότι οι μολύνσεις από PV απαιτούν τραυματισμό ή αμυχή της επιφάνειας του επιθηλίου, προκειμένου να επιτραπεί η είσοδος του ιού στα

κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας (Orth G 1985, Shah KV 1996). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθάνουσα, υποκλινική ή κλινική μόλυνση. Κατά το πρώτο στάδιο του παραγωγικού κύκλου ζωής του PV, τα ιικά γονιδιώματα παραμένουν στις βαθύτερες επιθηλιακές στιβάδες με τη μορφή πολλών αντιγράφων (περίπου 20-50 γονιδιώματα) πυρηνικών επισωμάτων, τα οποία αντιγράφονται στην S φάση του κυτταρικού κύκλου μαζί με τα χρωμοσώματα του ξενιστή (Chow LT 1994, Park P 1994). Η πρώιμη περιοχή του γονιδιώματος του ιού μεταγράφεται συνήθως σε χαμηλά ή πολύ χαμηλά επίπεδα. Οι πρωτεΐνες E1 και E2 είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του DNA του ιού, ενώ η E6, E7 και πιθανόν η E5 προκαλούν ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των βασικών και παραβασικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη θηλωμάτωση και την επιθηλιακή υπερπλασία.

Το δεύτερο στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού συμβαίνει κατά τη διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, καθώς αυτά μεταναστεύουν προς την επιφάνεια. Διαδοχικά γίνεται η αντιγραφή του DNA του ιού, η έκφραση της μη δομικής πρωτεΐνης E4, η σύνθεση των πρωτεϊνών L1 και L2 του καψιδίου και η συναρμολόγηση των σωματιδίων του ιού.

Η αντιγραφή του ιού επιδρά στην τελική διαφοροποίηση των κυττάρων-ξενιστών, οδηγώντας σε κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα, το οποίο μπορεί να εκδηλώνεται με διάφορες μορφές, όπως η συσσώρευση κυτταροπλασματικών ή ενδοπυρηνικών εγκλείστων στις πελματιαίες μυρμηκιές, ή η περιπυρηνική εμφάνιση κενотоπίων που χαρακτηρίζει τα κοιλοκύτταρα των γεννητικών βλαβών.

## **7. Επιδημιολογία**

Οι HPV είναι πολύ σταθεροί ιοί, που απελευθερώνονται κατά την απόπτωση (shedding) των επιφανειακών κερατινοκυττάρων των μολυσμένων επιθηλίων. Η μετάδοση των δερματικών HPV γίνεται με άμεση επαφή με μολυσμένο ιστό του ίδιου ή διαφορετικού ατόμου, ή με έμμεση επαφή με μολυσμένα αντικείμενα ή επιφάνειες (π.χ. πισίνες) (Rowson KE 1967). Οι γεννητικοί HPV μεταδίδονται με τη σεξουαλική επαφή, όπως έχει διαπιστωθεί από επιδημιολογικές μελέτες και εξέταση των σεξουαλικών συντρόφων (IARC Working Group, 1995). Υποστηρίζεται ότι η μετάδοση από τη μητέρα στο βρέφος των HPV6 και 11 κατά τη διάρκεια του τοκετού, αποτελεί την αιτία των λαρυγγικών θηλωμάτων σε μικρά παιδιά. Έμμεση μετάδοση γεννητικών HPV μπορεί θεωρητικά να συμβεί κατά την εισπνοή μολυσμένων ατμών κατά τη θεραπεία βλαβών με λέιζερ ή με την επαφή με μολυσμένα εργαλεία (Shah KV 1996).

Οι επιδημιολογικές μελέτες συναντούν δυσκολίες λόγω του μεγάλου αριθμού των HPV τύπων, πολλοί από τους οποίους αναγνωρίστηκαν πρόσφατα, καθώς και λόγω προβλημάτων μεθοδολογίας κατά την λήψη ιστού για εξέταση, του μεγάλου κόστους των τεχνικών ανίχνευσης HPV DNA και της ανεπάρκειας ορολογικών εξετάσεων. Έχει υπολογιστεί ότι οι μυρμηκίες εμφανίζουν επίπτωση περίπου 10% σε παιδιά σχολικής ηλικίας και νέους ενήλικες (Rowson KE 1967). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι οι μολύνσεις από HPV είναι πολύ συχνές σε σεξουαλικά ενεργές νέες γυναίκες και οι περισσότερες από αυτές τις μολύνσεις είναι ασυμπτωματικές (Shah KV 1996, Schiffman MH 1995). HPV DNA ανιχνεύεται σε κυτταρολογικό υλικό τραχήλου της μήτρας στο ένα τρίτο φυσιολογικών γυναικών ηλικίας 15-25 ετών και δέκα φορές λιγότερο σε γυναίκες άνω των 50 ετών. Λίγες μόνο από αυτές τις γυναίκες θα αναπτύξουν CIN προχωρημένου σταδίου, την προδρομική φάση του διηθητικού καρκινώματος (Shah KV 1996, IARC Working Group, 1995, Schiffman MH 1995).

Είναι γνωστό ότι ασθενείς με μυρμηκιώδη επιδερμοδυσπλασία (EV) εμφανίζουν μολύνσεις με EV HPV τύπους. Χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης DNA EV HPV τύπων διαπιστώθηκε ότι βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό σε προκακοήθειες βλάβες, βασικοκυτταρικά καρκινώματα (BCC) και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (SCC) ασθενών με ή χωρίς ανοσοκαταστολή (De Jong-Tieben LM 1995, Pfister H 1997), γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχουν εκτεταμένες λανθάνουσες μολύνσεις με EV HPV τύπους.

## **8. Κλινικές εκδηλώσεις των HPV-μολύνσεων**

### **8.1 Καλοήθειες βλάβες**

Οι HPV προκαλούν ένα ευρύ φάσμα δερματικών, δερματοβλεννογονίων και βλεννογονίων βλαβών. Οι πιο συνηθισμένες είναι οι μυρμηκίες, οι διάφοροι τύποι των οποίων προκαλούνται από συγκεκριμένους γενότυπους HPV. Οι μυρμηκίες των πελμάτων π.χ. οφείλονται συνήθως στον HPV1 (Orth G 1977), ενώ οι κοινές μυρμηκίες στον HPV2 και 4 (Gissmann L 1977, Orth G, 1977). Φαίνεται ότι οι διάφοροι HPV γενότυποι προκαλούν ελαφρώς διαφορετική ιστολογική εικόνα και εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα να προκαλούν ανάπτυξη των βλαβών.

Οι μολύνσεις της πρωκτογεννητικής περιοχής με HPV (οξυτενή κονδυλώματα) αφορούν βλεννογόνους ή δερματοβλεννογόνιες περιοχές. Φαίνεται ότι οι HPV6 και 11, που προκαλούν την πλειοψηφία των οξυτενών κονδυλωμάτων, προτιμούν δερματοβλεννογόνιες περιοχές. Αυτοί οι τύποι βρίσκονται σπάνια στον τράχηλο της

μήτρας. Οι HPV16, 18 και σπανιότερα και άλλοι τύποι υψηλού κινδύνου, προκαλούν μποβενοειδή βλατίδωση στα έξω γεννητικά όργανα και ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες στον τράχηλο της μήτρας (Shiffman MH 1993).

Στοματικές βλάβες μπορεί να περιέχουν γεννητικούς τύπους HPV. Πολύ συχνά απομονώνονται οι HPV6 και 11 από λαρυγγικά θηλώματα (Gissmann L 1982). Στην στοματική θηλωμάτωση επίσης περιλαμβάνονται συχνά οι HPV6 και 11 ή διαφορετικοί γεννητικοί τύποι (de Villiers EM 1989a). Οι HPV13 (Pfister H 1983) και HPV32 (Beaudenon S 1987) έχουν ανιχνευθεί αποκλειστικά στο στοματικό βλεννογόνο, ενώ οι HPV72 και HPV73 σε στοματικές βλάβες ανοσοκατασταλμένων ασθενών (Völter C 1996).

Αν και όχι απόλυτα, φαίνεται ότι υπάρχει συγκεκριμένος βαθμός ειδικότητας των διαφόρων τύπων HPV με ειδικά διαφοροποιημένα ανθρώπινα κύτταρα, γεγονός που είτε επιτρέπει τη μόλυνση, είτε παρέχει τις καταλληλότερες συνθήκες για την ωρίμανση των σωματιδίων των ιών. Η προσαρμογή στους αντίστοιχους ιστούς μπορεί να εξηγεί εν μέρει την ανάπτυξη αυτής της εντυπωσιακής ετερογένειας κατά την πορεία της εξέλιξης μέσα στον ίδιο ξενιστή.

Είναι πιθανό ότι η μεγάλη πλειονότητα των μολύνσεων από HPV παραμένει χωρίς κλινικά συμπτώματα ή προκαλεί πολύ μικρές βλάβες, οι οποίες συνήθως περνούν απαρατήρητες. Τίποτα σχεδόν δεν είναι γνωστό για το πώς παραμένει το γονιδίωμα του ιού σε μη εμφανείς, υποκλινικές ή λανθάνουσες λοιμώξεις. Η παρουσία HPV DNA έχει αναφερθεί σε κλινικά υγιείς περιοχές του τραχήλου της μήτρας, του λάρυγγα και του δέρματος (Steinberg BM 1983, Shmanin V 1994).

## **8.2 HPV και καρκίνος**

### **8.2.1 HPV και καρκίνος πρωκτογεννητικής περιοχής**

Πολλοί HPV τύποι έχουν ανιχνευθεί σε βλάβες μποβενοειδούς βλατίδωσης και σε άλλες ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (Shamanin V 1996, Moy RL 1989). Η ανάπτυξη προκαρκινικών βλαβών εξαρτάται συνήθως, αλλά όχι αποκλειστικά, από τον τύπο του HPV που ενέχεται. Η ηλιακή έκθεση HPV-βλαβών ή η μόλυνση με HPV ηλιοεκτεθημένων περιοχών μπορεί να έχει συνκαρκινογόνο δράση, ακόμα και μετά από μόλυνση με HPV χαμηλού κινδύνου για κακοήθεια (Shamanin V 1996).

Οι HPV16, 18 καθώς και άλλοι τύποι έχουν βρεθεί σε περίπου 95% όλων των βιοψιών από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως, όταν στις μελέτες χρησιμοποιούνταν ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης των HPV (Bosch FX 1995, van den

Brule 1990, Das BC 1992). Ο HPV16 είναι ο τύπος που απομονώνεται συχνότερα και είναι υπεύθυνος για το 50-60% των θετικών δειγμάτων, ενώ η παρουσία του HPV18 κυμαίνεται στο 10-20%. Η απουσία άλλων αναγνωρισμένων παραγόντων κινδύνου ενισχύει τα πειραματικά δεδομένα (zur Hausen H 1991, Hurlin PJ 1991, Pecoraro G 1991) που υποστηρίζουν ότι οι HPV τύποι υψηλού κινδύνου για κακοήθεια μπορούν να δράσουν ως πλήρη καρκινογόνα. Η ανίχνευση και άλλων τύπων HPV σε βιοψίες από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας κάνει πιθανή τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Παραμένει ανοικτό το ερώτημα εάν το 5% των βιοψιών από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στο οποίο δεν βρίσκεται ο ιός, πράγματι δεν είναι μολυσμένο από HPV και ο καρκίνος προκλήθηκε από άλλα αίτια, ή εάν περιέχουν DNA τύπων που δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί.

Στον καρκίνο του αιδοίου έχουν αναφερθεί μικρότερα ποσοστά ανίχνευσης HPV σε σχέση με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (IARC Working Group, 1995). Έρευνες με ευαίσθητες τεχνικές έχουν βρει θετικά δείγματα σε ποσοστό 50% κατά μέσο όρο, με εύρος ποσοστών 30-86% (Bloss JD 1991, Nuono GC 1991a, Nuono GC 1991b, Felix JC 1993). Μελέτες που αφορούν τον καρκίνο του πέους ποικίλουν σε ποσοστά θετικών δειγμάτων μεταξύ 54% και 100%, με μέσο όρο ανεύρεσης του ιού 73% (Varma VA 1991, Sarkar FH 1992, Tornesello ML 1992, Suzuki H 1994). Ο τύπος που ανιχνεύεται συχνότερα είναι ο HPV16. Σε καρκίνους του πρωκτού οι περιορισμένες σε αριθμό έρευνες αναφέρουν υψηλό ποσοστό HPV-θετικών δειγμάτων, το οποίο υπερβαίνει το 70% κάτω από κατάλληλες πειραματικές συνθήκες (Palefsky JM 1991, Zaki SR 1992).

### **8.2.2 HPV και καρκίνος του δέρματος**

Οι πρώτες μελέτες που διερευνούσαν τη σχέση HPV και καρκίνου του δέρματος έγιναν σε ασθενείς με EV (Jablonska S 1994). Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα σε αυτούς τους ασθενείς συνήθως περιέχουν DNA του HPV5, μερικά φέρουν τον HPV8 και σπάνια άλλους τύπους (Orth G 1978). Καθώς η πλειονότητα των δερματικών καρκίνων σε ασθενείς με EV αναπτύσσεται σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές, είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση HPV και ηλιακής ακτινοβολίας αποτελεί το κύριο αίτιο της καρκινογένεσης, αν και η ακριβής φύση αυτής της αλληλεπίδρασης παραμένει αδιευκρίνιστη.

Με τη χρήση εκκινητών, οι οποίοι καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα HPV τύπων, ανιχνεύθηκαν EV HPV τύποι αλλά και ένας μεγάλος αριθμός πρόσφατα αναγνωρισμένων HPV στο 80% ακανθοκυτταρικών και βασικοκυτταρικών



καρκινωμάτων σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς (Shamanin V 1996, Berkhout RJ 1995). Το αντίστοιχο ποσοστό σε μη ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς είναι 30% (Shamanin V 1996). Και σε αυτές τις περιπτώσεις πιθανολογείται αλληλεπίδραση μεταξύ HPV και UV ακτινοβολίας, καθώς οι βλάβες αφορούν κυρίως ηλιοεκτεθημένα μέρη. Ίσως αυτοί οι HPV τύποι να προκαλούν χαμηλού κινδύνου μολύνσεις και να απαιτούνται επιπλέον μεταλλάξεις λόγω ηλιακής ακτινοβολίας για την κακοήθη εκτροπή των κυττάρων.

Δεν υπάρχουν εκτεταμένες αναφορές για HPV και μελάνωμα. Μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί ο HPV37 σε ένα περιστατικό μελανώματος, αλλά στην ίδια μελέτη δεν ανιχνεύθηκε ο ιός στα υπόλοιπα 35 μελανώματα που ελέγχθηκαν (Scheurlen W 1986).

### **8.2.3 HPV και άλλες κακοήθειες**

Μελέτες που αφορούν ανεύρεση HPV σε καρκίνο της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα με τη χρήση PCR, έχουν δώσει ποσοστά ανίχνευσης από 0 έως 100%, με μέσο όρο 10-20% (IARC Working Group, 1995). Οι τύποι που απομονώνονται συνήθως είναι οι HPV18, 6, 11 και 2. Ασθενείς με λαρυγγικά θηλώματα, οι οποίοι στη συνέχεια ανέπτυξαν καρκίνο του λάρυγγα ή του πνεύμονα, έφεραν τον HPV6 ή 11 και σε μία περίπτωση τον HPV16 (Byrne JC 1990, Bejui-Thivolet F 1990, Guillou L 1991, Doyle DJ 1994).

Σε ασθενείς με καρκίνο των ρινικών κόλπων έχει αναφερθεί η παρουσία των HPV16, 18 και 57 (IARC Working Group 1995, de Villiers EM 1989a).

Παρ' όλες τις προσπάθειες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα να διευκρινιστεί ο ρόλος των HPV στον καρκίνο του οισοφάγου, τα δεδομένα που υπάρχουν δεν καταλήγουν σε σαφή συμπεράσματα (IARC Working Group, 1995). Μία μελέτη με υβριδισμό κατά Southern (Southern blot) δεν ανέδειξε θετικά δείγματα, ενώ οι ίδιοι συγγραφείς χρησιμοποιώντας PCR αναφέρουν ποσοστό θετικών δειγμάτων 50% για γεννητικούς HPV τύπους (Chang F 1992). Καθώς υπήρξαν και άλλες έρευνες που αναφέρουν θετικά αποτελέσματα σε ποσοστά 7-24% (Toh Y 1992, Ogura H 1993, Togawa K 1993), είναι πιθανό ότι ένας αριθμός αυτών των νεοπλασιών περιέχει τον ιό.

## **9. Οξυτενή Κονδυλώματα**

### **9.1 Γενικά**

Υπάρχει πλήθος κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων που επιβεβαιώνουν τη μετάδοση με σεξουαλική επαφή περίπου 70 HPV τύπων, οι οποίοι προκαλούν οξυτενή κονδυλώματα. Οι HPV τύποι που ανιχνεύονται στο κατώτερο γεννητικό σύστημα είναι οι 6/11, οι οποίοι απαντώνται σε μεγαλύτερη συχνότητα, οι 16/18, αλλά και οι 31, 3, 35, 39, 42-45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 63, 66 και 68.

### **9.2 Επιδημιολογία**

Τα οξυτενή κονδυλώματα αποτελούν τη συχνότερη ιογενή σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο, με συχνότητα τριπλάσια εκείνης του έρπητα των γεννητικών οργάνων (MMWR 1989). Περίπου 24 εκατομμύρια άτομα στις ΗΠΑ εμφανίζουν τη νόσο και σε αυτούς προστίθεται κάθε χρόνο 1 εκατομμύριο πρωτοδιαγνωσμένων ασθενών. Παρόλο που προσβάλλονται όλες οι ηλικίες, ο μεγαλύτερος αριθμός ασθενών αποτελείται από νεαρούς ενήλικες.

Ο αριθμός των ασθενών με κλινικά ορατή νόσο αποτελεί ένα μικρό μόνο ποσοστό των ατόμων με υποκλινική και λανθάνουσα HPV μόλυνση, καθώς μεγάλο μέρος του σεξουαλικά ενεργού πληθυσμού είναι μολυσμένο από ένα ή περισσότερους HPV τύπους. Έχει βρεθεί ότι οι υποκλινικές μολύνσεις από HPV αντιπροσωπεύουν το 60-95% του συνόλου των HPV μολύνσεων του γεννητικού συστήματος (Brown DR 1990) και αποτελούν, όπως και οι κλινικά ορατές βλάβες, αποθέματα (reservoirs) μετάδοσης του ιού. Ο de Villiers ανέφερε ότι 10% από 9000 Γερμανίδες με φυσιολογικά επιχρίσματα Παπανικολάου βρέθηκαν θετικές για HPV16 όταν ελέγχθηκαν με *in situ* υβριδισμό (de Villiers EM 1987). Άλλοι συγγραφείς αναφέρουν παρόμοια ποσοστά ασυμπτωματικής HPV μόλυνσης. Ο Kjaer αναφέρει ποσοστό 13% στην Γροιλανδία και την Δανία (Kjaer SK 1990) και ο Toon ποσοστό 11.5% στην Αγγλία (Toon PG 1986). Στις ΗΠΑ ο Becker βρήκε θετικές 8% των φοιτητριών που επισκέφθηκαν κλινική του πανεπιστημίου και 25% των γυναικών που επισκέφθηκαν κλινική αφροδισίων νόσων (Becker TM 1987).

Η μετάδοση γίνεται κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής και οι συχνότερες περιοχές μόλυνσης είναι αυτές που εύκολα υπόκεινται σε μικροτραυματισμούς, δηλαδή η είσοδος του κόλπου, η βάλανος και η περιπρωκτική περιοχή. Σπάνια τα οξυτενή κονδυλώματα προέρχονται από αυτο- ή ετερο-ενοφθαλμισμό HPV DNA από μυρμηκίες ή από γεννητικές βλάβες κατά τη διάρκεια του τοκετού από τη μητέρα στο βρέφος. Χειρουργικά γάντια, εργαλεία βιοψιών ή κρυοπηξίας και ατμοί που

παράγονται κατά τη διαθερμοπηξία ή τη θεραπεία με λέιζερ CO<sub>2</sub> μπορεί να περιέχουν HPV DNA, χωρίς να έχει διευκρινιστεί αν μπορούν να τον μεταδώσουν.

### **9.3 Κλινική εικόνα**

Η μόλυνση της γεννητικής περιοχής από HPV αποτελεί ένα φάσμα που περιλαμβάνει κλινικά ορατές βλάβες στις οποίες η διάγνωση γίνεται με τη φυσική εξέταση, υποκλινικές βλάβες που γίνονται εμφανείς μετά την επάλειψη με οξικό οξύ και μπορεί να παρουσιάζουν παθολογικά κυτταρολογικά και ιστολογικά ευρήματα και λανθάνουσες μολύνσεις όπου η διάγνωση βασίζεται σε τεχνικές ανίχνευσης του DNA του ιού. Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 3 εβδομάδες έως 8 μήνες.

Τα οξυτενή κονδυλώματα παρουσιάζονται αρχικά σαν μικρές θηλωματώδεις εκπλαστήσεις, οι οποίες στη συνέχεια μεγαλώνουν και πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας πλάκες με ανθοκραμβοειδή επιφάνεια. Συνήθως οι βλάβες είναι πολυεστιακές, με χρώμα ρόδινο, κιτρινωπό ή γκριζωπό. Στα γυναικεία γεννητικά όργανα μπορεί να πάρουν μεγάλες διαστάσεις κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή όταν υπάρχουν άφθονες κολπικές εκκρίσεις λόγω λοιμώξεων άλλης αιτιολογίας. Ιδιαίτερα ευπαθείς είναι ασθενείς με μειωμένη κυτταρική ανοσία, π.χ. ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού, όσοι λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική αγωγή, HIV θετικοί ασθενείς κλπ. Οι βλάβες μπορεί να συνοδεύονται από αίσθημα κνησμού ή καύσου, συνήθως όμως είναι ασυμπτωματικές.

Η μόλυνση μπορεί να αφορά όλες τις γεννητικές περιοχές, καθώς και το περίνεο, την περιοχή του δακτυλίου και το περιβάλλον δέρμα. Το μεσαίο τρίτο του κόλπου συνήθως δεν προσβάλλεται, ενώ οι θόλοι και η είσοδος του κόλπου παρουσιάζουν συχνά εξωφυτικές βλάβες. Όσον αφορά τα έξω γεννητικά όργανα στις γυναίκες προσβάλλονται συνήθως τα μικρά και μεγάλα χείλη του αιδοίου και το περίνεο, ενώ στους άνδρες η βάλανος, το έσω πέταλο της ακροποσθίας, η ουρήθρα και το σώμα του πέους. Εξωγεννητικές εντοπίσεις είναι σπάνιες και εμφανίζονται στο στοματικό βλεννογόνο, τον λάρυγγα, την τραχεία και το ορθό.

Το γιγάντιο οξυτενές κονδύλωμα ή όγκος των Buschke-Löwenstein είναι ένας σπάνιος όγκος με μυρμηκιάδη επιφάνεια, που διηθεί το χόριο. Εντοπίζεται συνήθως στη βάλανο ανδρών και λιγότερο συχνά περιπρωκτικά ή στο αιδοίο. Κλινικά συμπεριφέρεται σαν βραδέως τοπικά αναπτυσσόμενο καρκίνωμα, αλλά ιστολογικά εμφανίζεται σχετικά καλόηθες και παρουσιάζει κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Θεωρείται σαν ένα ασυνήθιστα μεγάλο και επιθετικό κονδύλωμα, που οφείλεται στον HPV6 ή 11.

Η διαφορική διάγνωση των οξυτενών κονδυλωμάτων θα πρέπει να γίνεται από τη μολυσματική τέρμινθο, την υπερτροφία σμηγματογόνων αδένων, το χοριακό σπίλο, τη σμηγματορροϊκή υπερκεράτωση, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, τα πλατέα κονδυλώματα της δευτερόγονης σύφιλης, το γεννητικό έρπητα και τη βλαστική πέμφιγα.

#### **9.4 Ιστολογική εικόνα**

Η ιστολογική εξέταση των κονδυλωμάτων συνήθως αποκαλύπτει υπερκεράτωση, παρακεράτωση, ακάνθωση και επιμήκυνση των θηλαίων καταδύσεων. Τα κοιλοκύτταρα αποτελούν τον πιο χαρακτηριστικό μορφολογικό δείκτη HPV μόλυνσης. Πρόκειται για μεγάλα κερατινοκύτταρα με πυκνωτικό έκκεντρο πυρήνα που περιβάλλεται από κενοτοπιώδη κυτταροπλασματική άλω. Εμφανίζονται συχνότερα σε βλάβες βλεννογόνων και λιγότερο συχνά σε βλάβες που εντοπίζονται σε έντριχο δέρμα της γεννητικής περιοχής. Κονδυλώματα που παρουσιάζουν πυρηνική ατυπία με ανευπλοϊδισμό και ανώμαλες μιτώσεις, συνήθως περιέχουν HPV16 και 18.

#### **9.5 Θεραπεία**

Καθώς η εκρίζωση του ιού είναι αδύνατη, όλες οι θεραπείες στοχεύουν στην καταστροφή των ορατών βλαβών. Οι κλινικές μελέτες που αναφέρονται στη θεραπεία των HPV μολύνσεων συχνά δεν είναι σωστά σχεδιασμένες, καθιστώντας δυσχερή τη σύγκριση των θεραπευτικών μεθόδων και αποκλείοντας τη δυνατότητα μετα-ανάλυσης. Ο Πίνακας 1 παραθέτει συγκριτικά τα αποτελέσματα των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των εξωτερικών πρωκτογεννητικών κονδυλωμάτων σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Krebs HB 1989, Bashi SA 1985, Damstra RJ 1991, Simmons PD 1981, Stone KM 1990, Edwards A 1988, Gabriel G 1983, Jensen SL 1985, Baggish MS 1985, Duus BR 1985, Ferenczy A 1984, Hursthouse MW 1975, Vance JC 1986, Baggish MS 1982, Beutner KR 1989, Baker DA 1990, Gross G 1997, Beutner KR 1997, Beutner KR 1998, Beutner KR 1999).

##### A) Κρυοθεραπεία

Πρόκειται για κοινή μέθοδο θεραπείας, η οποία χρησιμοποιεί οξειδίο του αζώτου, διοξειδίο του άνθρακα και υγρό άζωτο. Το ποσοστό ανταπόκρισης είναι υψηλό, αλλά η διαδικασία είναι ελαφρώς επώδυνη και μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ουλής. Η βλάβη ψεκάζεται ή έρχεται σε επαφή με το κρυόδιο για περίπου 30sec μέχρι να σχηματιστεί γύρω της μία λευκή άλως 2-3mm. Η θεραπεία

επαναλαμβάνεται με μεσοδιαστήματα 2 εβδομάδων μέχρι να εξαφανιστεί η βλάβη. Η τεχνική κατά την οποία αφού αρχικά παγώσει η βλάβη αφήνεται να ζεσταθεί και στη συνέχεια παγώνει ξανά, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για υποτροπιάζουσες βλάβες. Η κρυοθεραπεία αποτελεί μάλλον την ασφαλέστερη θεραπεία HPV μολύνσεων κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης.

#### Β) Ποδοφυλλίνη και ποδοφυλλοτοξίνη

Η ποδοφυλλίνη χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 10-25% σε βάμμα βενζόλης και αναστέλλει τις μιτώσεις. Προορίζεται συνήθως για μικρές εξωτερικές βλάβες. Στις επιπλοκές περιλαμβάνονται διάβρωση, εξέλκωση και ουλοποίηση της βλάβης και ερεθισμός της γύρω περιοχής. Όταν χρησιμοποιείται σε βάλανο ή ακροποσθία μπορεί να προκαλέσει βαλανίτιδα και φίμωση. Συστηματικές παρενέργειες μπορεί να παρατηρηθούν όταν συμβεί συστηματική απορρόφηση λόγω εφαρμογής σε εκτεταμένες βλάβες, σε βλεννογόνους ή μετά από παρατεταμένη χρήση και περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο, πυρετό, σύγχυση, κώμα, λευκοπενία, ειλεό και νεφρική ανεπάρκεια. Αντενδείκνυται στην εγκυμοσύνη. Ένα συνηθισμένο θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνει την εφαρμογή του διαλύματος από εξειδικευμένο προσωπικό 1-2 φορές την εβδομάδα. Το διάλυμα παραμένει στη βλάβη για 1-4 ώρες στην πρώτη συνεδρία και στη συνέχεια ξεπλένεται, ενώ στις επόμενες συνεδρίες και εφόσον ο ασθενής το ανέχθηκε καλά ο χρόνος εφαρμογής αυξάνεται σε 4-6 ώρες. Εάν οι βλάβες δεν έχουν υποχωρήσει σε 4-8 εβδομάδες, θα πρέπει να εφαρμόζονται άλλες θεραπευτικές τεχνικές.

Η ποδοφυλλοτοξίνη είναι ασφαλέστερη στη χρήση της και μπορεί να εφαρμόζεται από τον ίδιο τον ασθενή. Το διάλυμα 0.5-1% σε αιθανόλη χρησιμοποιείται δύο φορές ημερησίως για τρεις συνεχόμενες μέρες και το σχήμα επαναλαμβάνεται ανά εβδομάδα για 4 εβδομάδες.

#### Γ) Τριχλωροξικό οξύ

Το ποσοστό υποτροπών με αυτή τη μέθοδο είναι υψηλό. Επίσης, είναι δύσκολο να ελεγχθεί το βάθος της καταστροφής που προκαλεί το οξύ και μεγάλο βάθος καταστροφής οδηγεί σε εξελκώσεις με βραδεία επούλωση και ουλοποίηση. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι το άλγος κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Κατά την εφαρμογή η βλάβη επαλείφεται με ένα λεπτό στρώμα διαλύματος χρησιμοποιώντας βαμβακοφόρο στυλεό, ενώ το γύρω δέρμα καλύπτεται με λιπαντικό, ώστε να προστατευθεί από το οξύ. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές την εβδομάδα για 4 εβδομάδες.

#### Δ) Λείζερ (Laser)

Η μέθοδος έχει καλά αποτελέσματα και αποτελεί μέθοδο εκλογής για εκτεταμένες βλάβες, καθώς μπορεί να ελεγχθεί με ακρίβεια, ιδίως όταν ο ασθενής βρίσκεται υπό γενική αναισθησία. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος είναι η πρόκληση θερμικής βλάβης στον υποκείμενο υγιή ιστό. Το άλγος, ο κνησμός και το οίδημα αποτελούν επίσης ανεπιθύμητες ενέργειες. Το προσωπικό θα πρέπει να χρησιμοποιεί μάσκα και να υπάρχει καλό σύστημα εξαερισμού, καθώς έχει ανιχνευθεί HPV DNA σε ατμούς από λείζερ. Επιπλέον πρόκειται για ακριβή τεχνική, η οποία δεν είναι διαθέσιμη σε όλα τα κέντρα.

#### Ε) Loop electrosurgical excisional procedure (LEEP) και ηλεκτροκαυτηρίαση

Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου αλλά και για κονδυλώματα που εντοπίζονται στον τράχηλο, το δέρμα και περιπρωκτικά. Οι κυριότερες επιπλοκές είναι η αιμορραγία και η μόλυνση. Ουλοποίηση μπορεί να συμβεί αν το βάθος καταστροφής φτάσει μέχρι το χόριο. Το ιδανικό βάθος εκτομής είναι το δερμο-επιδερμικό όριο. Ισχύουν τα ίδια μέτρα προφύλαξης όπως και με το λείζερ.

#### ΣΤ) 5-Φλουορουρακίλη (5-FU)

Πρόκειται για αντινεοπλασματικό φάρμακο που χρησιμοποιείται τοπικά στη θεραπεία δερματικών καρκίνων και HPV βλαβών. Δεν παρατηρείται συστηματική τοξικότητα κατά τη συνήθη χρήση του. Οι συχνότερες τοπικές παρενέργειες περιλαμβάνουν άλγος, διαβρώσεις και ερεθισμό στην περιοχή της βλάβης και υδαρείς κολπικές εκκρίσεις. Η χρήση του σε κολπικά κονδυλώματα έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί λόγω της βραδείας επούλωσης (6-8 εβδομάδες) και της ανάπτυξης σε μία ασθενή καρκινώματος από διαυγή κύτταρα. Όταν τα κονδυλώματα εντοπίζονται στο αιδοίο ή περιπρωκτικά, γίνεται επάλειψη ενός λεπτού στρώματος κρέμας 5-FU 5% 1-2 φορές την εβδομάδα για χρονικό διάστημα έως 10 εβδομάδες. Σε βλάβες που εντοπίζονται στο πέος, η κρέμα επαλείφεται 3 φορές την εβδομάδα για 3-4 εβδομάδες.

#### Ζ) α-Ιντερφερόνη

Η ενδοβλαβική έγχυση α-ιντερφερόνης έχει φτωχά αποτελέσματα και τα τελευταία χρόνια δεν χρησιμοποιείται ευρέως. Η τοπική επάλειψη δεν είναι αποτελεσματική.

#### Η) Imiquimod

Πρόκειται για ανοσοτροποποιητή με αντιική και αντικαρκινική δράση. Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει η τοπική εφαρμογή κρέμας Imiquimod 5% σε κονδυλώματα. Τοπικά μπορεί να προκαλέσει κνησμό, καύσο, άλγος, ερύθημα,

οίδημα, διήθηση, βλατιδώδες εξάνθημα, φυσαλίδες, διαβρώσεις, εξελκώσεις και υποχρωμία. Στις συστηματικές παρενέργειες περιλαμβάνονται κόπωση, κεφαλαλγία, πυρετός, κακουχία, ναυτία, διάρροια και αρθραλγία.

**Πίνακας 1. Ποσοστά ανταπόκρισης και υποτροπών των θεραπευτικών μεθόδων που εφαρμόζονται σε οξυτενή κονδυλώματα**

<b>Θεραπευτική μέθοδος</b>	<b>Ποσοστό ανταπόκρισης (%)</b>	<b>Ποσοστό υποτροπών (%)</b>
Κρυοθεραπεία	70-96	25-39
Ποδοφυλλίνη	38-79	21-65
Ποδοφυλλοτοξίνη	68-88	16-34
Τριχλωροξικό οξύ	64-81	36-38
Laser CO <sub>2</sub>	72-97	8-49
LEEP/ηλεκτροκαυτηρίαση	72-94	25-51
5-Φλουοροουρακίλη	68-81	8-13
α-Ιντερφερόνη	36-53	21-25
Imiquimod	50-53	17-56

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ ΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ δ-ΑΜΙΝΟΛΕΒΟΥΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

#### Α. Φωτοδιάγνωση με οξεικό οξύ

##### 1. Ιδιότητες του φωτός

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι μία μορφή ενέργειας, η οποία έχει ιδιότητες σωματιδίου και κύματος. Τα φαινόμενα της διάθλασης και ανάκλασης αποτελούν παραδείγματα των κυματικών ιδιοτήτων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, ενώ η εξήγηση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου από τον Einstein βασίζεται στη σωματιδιακή φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

##### 1.1 Η κυματική φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Το ηλεκτρομαγνητικό κύμα έχει μία ηλεκτρική και μία μαγνητική συνιστώσα, οι οποίες πάλλονται σε επίπεδα κάθετα μεταξύ τους, αλλά και κάθετα προς τη διεύθυνση διάδοσης της ακτινοβολίας. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος  $\lambda$  και τη συχνότητα  $\nu$ . Τα δύο αυτά αριθμητικά μεγέθη συνδέονται με την ταχύτητα του φωτός  $c$ , με τη σχέση:

$$\lambda\nu = c/n$$

όπου  $c$  η ταχύτητα του φωτός στο κενό ( $3 \times 10^{10}$  cm/sec) και  $n$  ο δείκτης διάθλασης του μέσου διάδοσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

##### 1.2 Η σωματιδιακή φύση του φωτός

Μία δέσμη φωτός μπορεί να θεωρηθεί σαν μία ροή φωτονίων. Η ενέργεια κάθε φωτονίου είναι ανάλογη με τη συχνότητα της ακτινοβολίας και δίνεται από τη σχέση:

$$E = h\nu = hc/n\lambda$$

Όπου  $E$  η ενέργεια του φωτονίου,  $\nu$  η συχνότητα του φωτονίου και  $h$  η σταθερά του Planck =  $6.624 \times 10^{-27}$  erg.sec.

Ένα φωτόνιο υψηλής συχνότητας (μικρού μήκους κύματος), έχει μεγαλύτερη ενέργεια από ένα φωτόνιο χαμηλής συχνότητας (μεγάλου μήκους κύματος).

Η ένταση μίας φωτεινής δέσμης είναι ανάλογη του αριθμού και ανεξάρτητη της ενέργειας των φωτονίων.

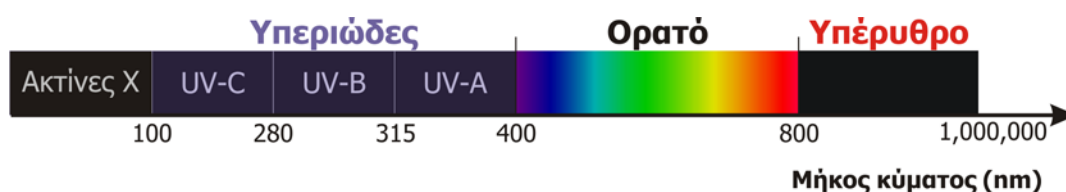


## 2. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ποικίλλει από τις υψηλής ενέργειας ακτίνες-γ μέχρι τα χαμηλής ενέργειας ραδιοκύματα (σχήμα 1).

Το ανθρώπινο μάτι είναι ευαίσθητο σε ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες με μήκη κύματος από 380 έως 780 nm. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αυτής της περιοχής μηκών κύματος ονομάζεται ορατή ακτινοβολία ή φως.

Η ορατή περιοχή του φάσματος διακρίνεται σε περιοχές κάθε μία από τις οποίες, εάν απομονωθεί, προκαλεί ένα διαφορετικού χρώματος ερεθισμό στο ανθρώπινο μάτι (Πίνακας 1).



**Σχήμα 1:** Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

**Πίνακας 1.**

Μήκος κύματος (nm)	Αντιλαμβανόμενος χρωματικός ερεθισμός
380-436	Ιώδης
436-495	Μπλε
495-566	Πράσινος
566-589	Κίτρινος
589-627	Πορτοκαλί
627-780	Κόκκινος

### 3. Η αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη

Για τις ανάγκες της μελέτης της αλληλεπίδρασης του φωτός με την ύλη, χρησιμοποιείται τμήμα ημιδιαφανούς υλικού.

Όταν το φως προσπίπτει στην επιφάνεια του υλικού, ένα μέρος αυτού ανακλάται και το υπόλοιπο διαχέεται στο υλικό. Εάν η επιφάνεια του υλικού είναι εξαιρετικά λεία, τότε παρατηρείται το φαινόμενο της κατοπτρικής ανάκλασης. Εάν η επιφάνεια είναι ανώμαλη παρατηρείται το φαινόμενο της διάχυτης ανάκλασης, το οποίο οφείλεται στη σκέδαση του φωτός στην επιφάνεια του υλικού.

Σε μία συνήθη επιφάνεια της ύλης το φως ανακλάται και με τους δύο τρόπους. Ωστόσο, όσο περισσότερο ανώμαλη είναι η επιφάνεια, τόσο μειώνεται η κατοπτρική ανάκλαση και αυξάνεται η διάχυτη ανάκλαση. Από το τμήμα του φωτός το οποίο διαχέεται στην ύλη ένα μέρος αυτού απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις και επανεκπέμπεται. Στην περίπτωση ημιδιαφανούς ύλης, ένα μέρος του διαχεόμενου φωτός είναι δυνατό να προκαλέσει εσωτερική ανάκλαση και να διέλθει του υλικού (σχήμα 2).

Όταν μία ακτίνα φωτός που διαδίδεται σε ένα μέσο συναντήσει τη διαχωριστική επιφάνεια ανάμεσα στο μέσο αυτό και ένα άλλο, ένα μέρος της διαθλάται μέσα στο δεύτερο μέσο, επειδή η ταχύτητα του φωτός είναι διαφορετική στα δύο μέσα. Η ταχύτητα του φωτός έχει τη μέγιστη τιμή της όταν το φως διαδίδεται στο κενό. Ο δείκτης διάθλασης ( $n$ ) ενός μέσου ορίζεται ως:

$$n=c/v$$

όπου  $c$ =η ταχύτητα του φωτός στο κενό και  $v$ =η ταχύτητα του φωτός στο μέσο.

Μία σημαντική ιδιότητα του δείκτη διάθλασης είναι ότι δεν είναι σταθερός αλλά αποτελεί συνάρτηση του μήκους κύματος του φωτός.

Τα φωτοβιολογικά αποτελέσματα εξαρτώνται από τη δόση και το μήκος κύματος του φωτός, καθώς ακτινοβολίες με διαφορετικό μήκος κύματος μέσα στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, φθάνουν σε διαφορετικό βάθος εντός του ιστού.

Κατά τη διέλευση του φωτός διαμέσου της επιδερμίδας ένα μέρος του ανακλάται από την επιφάνειά της, λόγω της διαφοράς του δείκτη διάθλασης της κερατίνης στιβάδας ( $n=1.55$ ) και του αέρα ( $n=1$ ), ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται ή απορροφάται από τις χρωμοφόρες της. Η κερατίνη στιβάδα και οι υπόλοιπες στιβάδες της επιδερμίδας δρουν ως οπτικός φραγμός κυρίως μέσω της απορρόφησης του φωτός και σε μικρότερο βαθμό μέσω της σκέδασης. Η απορρόφηση του φωτός σχετίζεται με τη συγκέντρωση των χρωμοφόρων (π.χ. μελανίνη, αιμοσφαιρίνη) και από το συντελεστή απορρόφησης, ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος. Στο

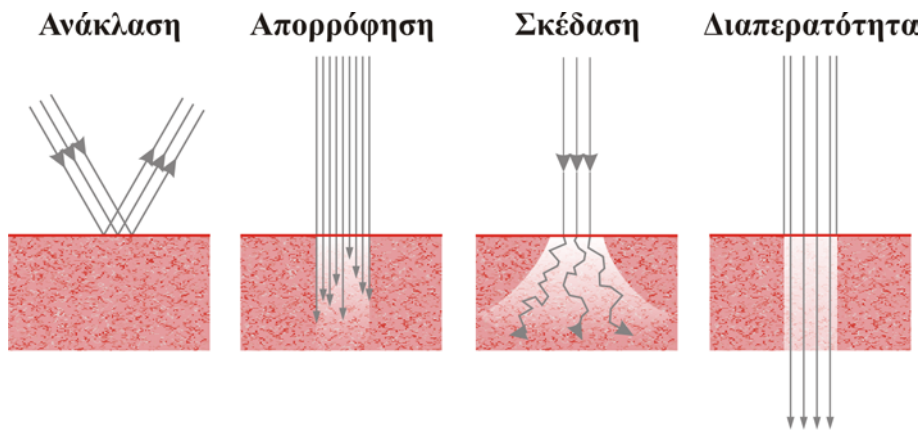
φαινόμενο της σκέδασης, η κατεύθυνση του προσπίπτοντος φωτονίου μεταβάλλεται καθώς διέρχεται μεταξύ δύο μέσων με διαφορετική ταχύτητα. Η σκέδαση προκύπτει από ανομοιογένειες στο δείκτη διάθλασης ενός μέσου, οι οποίες αντιστοιχούν σε δομικές ανομοιογένειες και ανάλογα με το σχήμα και το μέγεθός τους προκαλούν μεταβολές στη χωρική κατανομή της έντασης του φωτός.

Το όριο αέρα/κερατίνης στιβάδας και επιδερμίδας/θηλώδους χορίου είναι τα κύρια μέσα σκέδασης στο δέρμα. Οι κύριες χρωμοφόρες της επιδερμίδας είναι η μελανίνη, το ουροκανικό οξύ, τα νουκλεϊκά οξέα και τα αρωματικά αμινοξέα. Κατά τη διέλευση του φωτός από το χόριο, ένα τμήμα του απορροφάται από τους δύο τύπους της αιμοσφαιρίνης (οξυ- και δεοξυ-αιμοσφαιρίνη), τη β-καροτένη και τη χολερυθρίνη, ενώ το υπόλοιπο υφίσταται διαχεόμενη ανάκλαση από τις ίνες του κολλαγόνου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα μακροφάγα που περιέχουν μελανίνη και επανεκπέμπεται από την επιφάνεια του δέρματος, αφού διέλθει ξανά από τις χρωμοφόρες. Η συγκέντρωση και η κατανομή των χρωμοφόρων του δέρματος καθώς και των δομών που προκαλούν σκέδαση (κυτταρικές μεμβράνες, κερατίνη στιβάδα) διαφέρουν μεταξύ των ατόμων αλλά και μεταξύ υγιούς και παθολογικού ιστού. Στο σχήμα 3 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης του φωτός από τα διαφορετικά συστατικά του δέρματος.

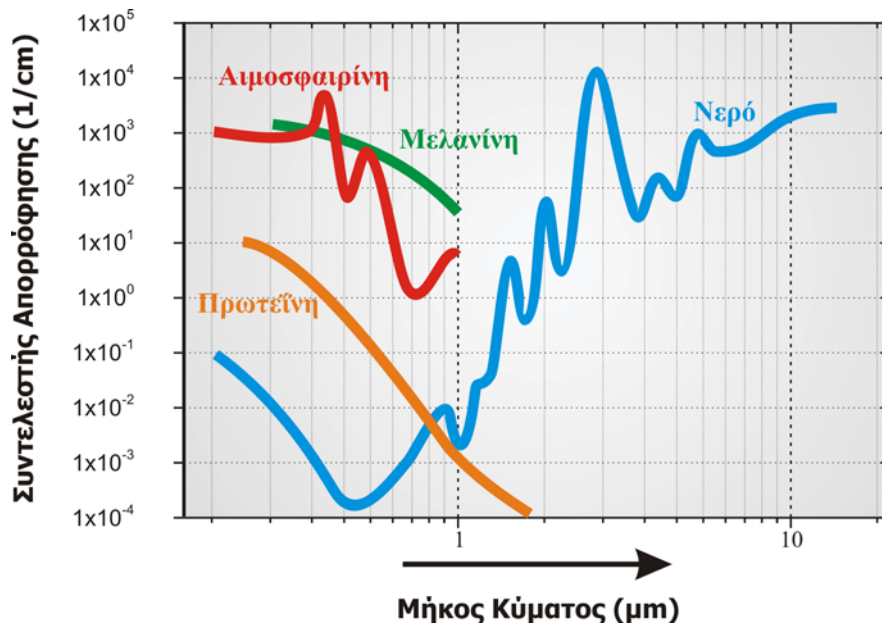
#### **4. Οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι**

Η κλινική διάγνωση βασίζεται στην οπτική αξιολόγηση των μορφολογικών και χρωματικών χαρακτηριστικών της ιστικής βλάβης. Επειδή το ανθρώπινο μάτι συχνά δεν επαρκεί, στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται *in vitro* διαγνωστικές τεχνικές. Συνήθως πρόκειται για επεμβατικές τεχνικές, ακριβές και χρονοβόρες, οι οποίες ενέχουν τον κίνδυνο δειγματοληπτικού σφάλματος καθώς αφορούν τμήμα της βλάβης.

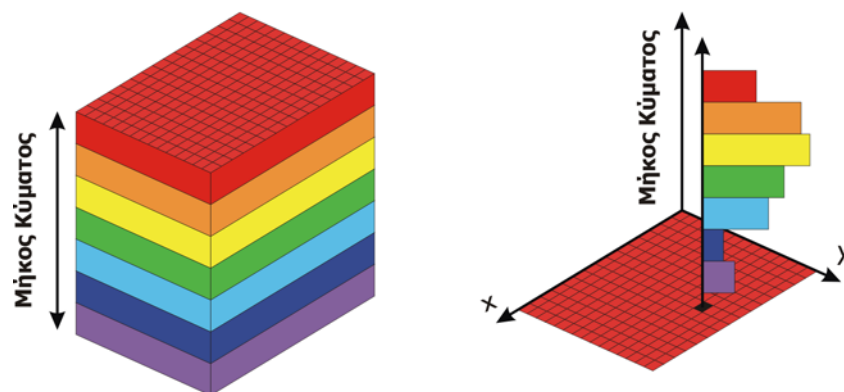
Οι οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι παρέχουν τη δυνατότητα μη επεμβατικής, *in vivo* ανάλυσης ιστικών βλαβών, βασιζόμενες στα χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, με ή χωρίς τη χρήση διαγνωστικών δεικτών. Οι παρατηρούμενες αλλαγές αυτών των χαρακτηριστικών συνδέονται με δομικές και/ή λειτουργικές μεταβολές των κυττάρων της βλάβης. Οι οπτικές φασματοσκοπικές τεχνικές διάγνωσης έχουν ως αρχή ότι το ιδιαίτερο οπτικό φάσμα κάθε ιστού παρέχει πληροφορίες για την δομική και λειτουργική του κατάσταση. Οι μέθοδοι αυτές (φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης, φασματοσκοπία φθορισμού και φασματοσκοπία Raman) δεν έχουν τη δυνατότητα χωρικής πληροφορίας, καθώς



**Σχήμα 2:** Αλληλεπίδραση φωτός-ύλης



**Σχήμα 3:** Απορρόφηση του φωτός από τους ανθρώπινους ιστούς



**Σχήμα 4:** Πολυφασματική Απεικόνιση

δίνουν σημειακές πληροφορίες και επομένως περιορίζονται στη μελέτη μόνο ομοιόμορφων υλικών. Επιπλέον, η αντιστοίχιση των φασματικών χαρακτηριστικών με το βιολογικό υπόστρωμα είναι δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας των ιστών.

Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης επιτρέπει τη σάρωση μεγάλων φασματικών περιοχών από το υπεριώδες ως το υπέρυθρο και παρέχει τη δυνατότητα επιλεκτικής απεικόνισης σε διάφορα μήκη κύματος εντός των περιοχών αυτών. Επιπλέον, επιτρέπει την ανακατασκευή του φάσματος που αντιστοιχεί σε κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας (σχήμα 4).

## **5. Οξεικό οξύ**

Η τοπική επάλειψη του τραχήλου της μήτρας με διάλυμα οξεικού οξέος μικρής συγκέντρωσης (3-5%) εφαρμόζεται εμπειρικά στην κλινική πράξη πολλές δεκαετίες προκειμένου να αναδειχθούν παθολογικές περιοχές, καθώς προκαλεί παροδικό άσπρισμα των περιοχών αυτών διάρκειας λίγων λεπτών. Ιστορικά, η αρχή έγινε από μία παρατήρηση του Hinselmann, ο οποίος αναζητούσε ένα βλεννολυτικό παρασκεύασμα για τον τράχηλο της μήτρας. Παρατήρησε ότι αραιό υδατικό διάλυμα οξεικού οξέος παράλληλα με τη βλεννολυτική δράση του, προκαλούσε παροδικές ορατές μεταβολές σε διάφορα επιθήλια (Hinselmann H 1925). Ειδικότερα, η ιδιότητά του να προκαλεί σημαντικές αλλαγές σε περιοχές βλεννογόνων με ατυπία, οδήγησε στην εφαρμογή του πριν τη λήψη βιοψίας από τον τράχηλο της μήτρας, προκειμένου να αναδείξει περιοχές με πιθανό καρκίνωμα.

Τα οξυτενή κονδυλώματα ασπρίζουν μετά από επάλειψη με διάλυμα οξεικού οξέος. Η μικρή διάρκεια αυτού του φαινομένου καθώς και το γεγονός ότι στερείται ανεπιθύμητων ενεργειών, έχει οδηγήσει στην κλινική εφαρμογή του, με σκοπό να περιγραφούν με σαφήνεια τα όρια των κλινικών βλαβών και να γίνουν ορατές τυχόν υποκλινικές εστίες μόλυνσης από τον HPV (Reid R 1984, Jonsson M 1997, Schultz RE 1990). Οι τελευταίες γίνονται ορατές ως λευκές, αδιαφανείς κηλίδες, οι οποίες πριν την επάλειψη με οξεικό οξύ μπορεί να εμφανίζουν ήπιο ερύθημα λόγω αυξημένης αγγείωσης (Barrasso R 1987). Ανωμαλίες στο χρώμα των HPV-βλαβών οφείλονται στην υπερπλασία και τη διαστολή των τριχοειδών αγγείων λόγω αύξησης του ρυθμού μεταβολισμού ή παραγωγής ενός αγγειογενετικού παράγοντα από το προσβεβλημένο επιθήλιο (Reid R 1984). Το μέγεθος των υποκλινικών βλαβών ποικίλει από 0.1 έως 10 mm και ο αριθμός τους από 1 έως 10, ενώ σπάνια είναι περισσότερες. Οι κηλίδες εντοπίζονται συνήθως στους βλεννογόνους (μεγάλα και μικρά χείλη του αιδοίου και είσοδος του κόλπου στις γυναίκες, ακροποσθία, βάλανος και σπανιότερα στο στόμιο

της ουρήθρας στους άνδρες). Μπορεί να εμφανίζονται μαζί με κλινικά ορατές βλάβες αλλά και σε περιοχές χωρίς κλινικά κονδυλώματα.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το οξεικό οξύ προκαλεί άσπρισμα των βλαβών από HPV δεν έχει διευκρινισθεί. Μία θεωρία προτείνει ότι το οξεικό οξύ διεισδύει ταχέως στους ιστούς και προκαλεί κυτταρικό οίδημα και πήξη των πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των νουκλεοπρωτεϊνών (Reid R 1984). Το επιθήλιο που έχει προσβληθεί από HPV χαρακτηρίζεται από κυτταροβρίθεια, δυσκεράτωση, παρακεράτωση, ανώμαλη κυτταρική διαφοροποίηση με αποδιάταξη του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος των κοιλοκυττάρων και παρουσία πολυπλοειδούς DNA. Ιστοί με αυξημένες ποσότητες νουκλεοπρωτεϊνών ανακλούν το φως. Τα αγγεία του χορίου δεν είναι πλέον εμφανή και το ανακλώμενο φως προσδίδει λευκό χρώμα στον ιστό. Σύμφωνα με μία δεύτερη θεωρία, τα προσβεβλημένα από HPV κύτταρα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες κυττοκερατίνης 10 και σε μικρότερο βαθμό κυττοκερατίνης 19 σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Maddox P 1994) και η παρουσία αυτών των κυττοκερατινών σχετίζεται με το άσπρισμα των ιστών μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ.

Παρόλα αυτά, η στατική και ποιοτική εκτίμηση της μεθόδου έχει χαμηλή ευαισθησία και υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (22-25%) (Jonsson M 1997, Buntin DM 1994, Schultz R 1988), επειδή πολλές καταστάσεις ανώμαλης κερατινοποίησης εμφανίζουν παρόμοια εικόνα μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ. Η ψωρίαση, η δερματίτιδα (τοξική από επαφή και αλλεργική), ο ομαλός και ο σκληροατροφικός λειχήνας μπορεί να αλληλεπιδρούν με το οξεικό οξύ. Στις περισσότερες περιπτώσεις η βαλανοποσθίτιδα, η ουρηθρίτιδα και η αιδοιοκολπίτιδα μιμούνται υποκλινικές βλάβες κονδυλωμάτων. Στις περιπτώσεις αυτές το άσπρισμα των βλαβών είναι περισσότερο διάχυτο, μη ομοιόμορφο και συνοδεύεται από ερύθημα. Έχει παρατηρηθεί ότι περιπτώσεις μόλυνσης με HPV μπορεί να εκδηλωθούν με την κλινική εικόνα βαλανοποσθίτιδας, και απαιτείται μικροβιολογική εξέταση για να γίνει διαφορική διάγνωση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων (Arumainayagam JT 1990). Επειδή, όμως, η μόλυνση από HPV μπορεί και να συνυπάρχει με μικροβιακή μόλυνση, σε αμφίβολες περιπτώσεις με παρουσία άσπρισματος μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ και ενώ απομονώνεται μικροβιακός παράγοντας, χορηγείται τοπική αντιμικροβιακή αγωγή και επανεκτιμάται ο ασθενής, ενώ λαμβάνονται βιοψίες από εμμένουσες λευκές περιοχές. Επίσης μυκητιάσεις, μολύνσεις από άλλους ιούς (Epstein-Barr), μικροτραυματισμοί (από μηχανικά, χημικά ή θερμικά αίτια) και θυλακίτιδα αλληλεπιδρούν συχνά με το οξεικό οξύ.

Οι μεταβολές στα οπτικά χαρακτηριστικά των ιστών που παρατηρούνται με γυμνό μάτι ή με τη χρήση μεγεθυντικού μέσου μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ, είναι παρόμοιες σε περιπτώσεις υποκλινικών ή αρχόμενων βλαβών, σε κλινικές βλάβες κονδυλωμάτων και σε περιστατικά δυσπλασιών (Schultz R 1990, Barasso R 1987). Έτσι, ακόμη και σε περιπτώσεις που το άσπρισμα οφείλεται σε μόλυνση από HPV, η απλή παρατήρηση του φαινομένου δεν μπορεί να δώσει πληροφορίες για την ιστολογική εικόνα των βλαβών και απαιτείται η λήψη βιοψίας για ιστολογική εξέταση, προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπεία. Πολλές φορές όμως η ιστολογική εξέταση της βλάβης δεν είναι διαγνωστική, είτε λόγω δειγματοληπτικού σφάλματος κατά τη διενέργεια της βιοψίας, είτε λόγω κοινών ιστολογικών ευρημάτων μεταξύ αυτών των ομάδων βλαβών. Π.χ. είναι δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ ενός κονδυλώματος με ήπια ακάνθωση και κύτταρα με περιπυρηνική άλω και μίας βλάβης που χαρακτηρίζεται από υπερκεράτωση, παρακεράτωση και κύτταρα με κυτταροπλασματική άλω. Επειδή η ακριβής ιστολογική ταξινόμηση είναι δύσκολη, ο παθολογοανατόμος μπορεί να σφάλει ή να υπερεκτιμά τα περιστατικά με κονδυλώματα ή δυσπλασίες, ώστε να μην μείνει ο ασθενής χωρίς θεραπεία.

Ο βαθμός και η έκταση του ασπρίσματος μίας βλάβης δεν είναι σταθερά κατά τη διάρκεια της παρατήρησης, αλλά αντίθετα μεταβάλλονται με το χρόνο, γεγονός που δυσχεραίνει την απλή οπτική τους αξιολόγηση από τον κλινικό γιατρό. Επιπλέον, η εκτίμηση του φαινομένου είναι υποκειμενική, ενώ επηρεάζεται ακόμη και από τις συνθήκες φωτισμού, οι οποίες συνήθως δεν είναι ίδιες όταν η διαδικασία επαναληφθεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Γίνεται, επομένως, σαφές ότι η επάλειψη με οξεικό οξύ μίας περιοχής με πιθανή μόλυνση από HPV, παρέχει διαγνωστική πληροφορία, η οποία δεν μπορεί να αξιολογηθεί σωστά με την απλή παρατήρηση του φαινομένου. Αντίθετα, απαιτείται η εφαρμογή μίας μεθόδου ποσοτικής εκτίμησης της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και απεικόνισης, προκειμένου να αξιοποιηθεί το σύνολο της διαγνωστικής πληροφορίας και να εφαρμοστεί το οξεικό οξύ ως αξιόπιστο μέσο φωτοδιάγνωσης των HPV-μολύνσεων.

## **B. Φωτοδιάγνωση με δ-αμινολεβουλιικό οξύ (ALA)**

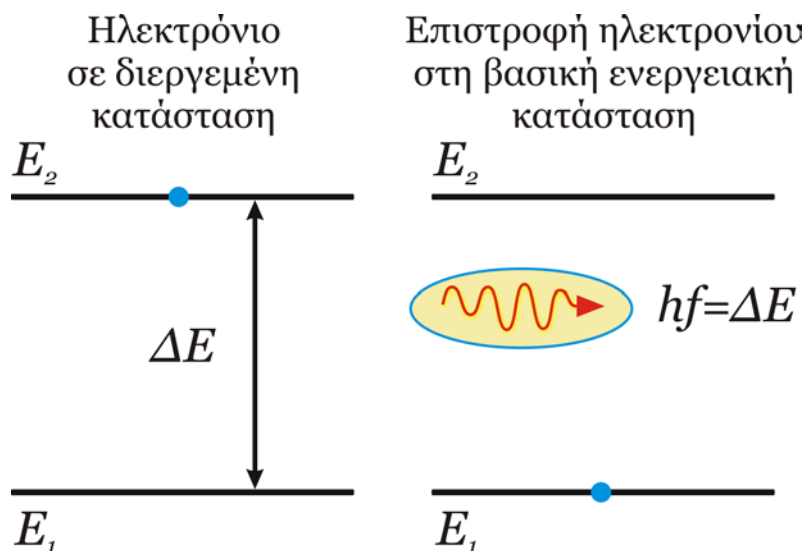
### **1. Γενικά για το φθορισμό**

Ο κβαντικός αριθμός  $s$  του spin (ιδιοστροφορμή) ενός ηλεκτρονίου μπορεί να πάρει μόνο δύο τιμές, δηλαδή  $+1/2$  και  $-1/2$ . Όταν το ολικό spin  $S$  των ηλεκτρονίων

ενός ατόμου είναι μηδέν (αντιπαράλληλα spin), τότε η ηλεκτρονική κατάσταση ονομάζεται απλή (singlet state), ενώ όταν το S είναι 1 (παράλληλα spin) ονομάζεται τριπλή (triplet state). Κβαντομηχανικά επιτρέπονται οι μεταπτώσεις singlet→singlet ή triplet→triplet. Οι μεταπτώσεις singlet→triplet ή το αντίστροφο είναι απαγορευμένες και έχουν μικρή ένταση.

Η διέγερση singlet→singlet μπορεί να γίνει με απορρόφηση φωτονίου που αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων. Η αντίθετη διεργασία αποτελεί αποδιέγερση εκπομπής με τη μορφή φωτονίου και καλείται φθορισμός (σχήμα 5). Η αποδιέγερση από την τριπλή κατάσταση γίνεται υπό ορισμένες συνθήκες και καλείται φωσφορισμός.

Η διεγερμένη τριπλή κατάσταση έχει χαμηλότερη ενέργεια από την αντίστοιχη απλή κατάσταση (όπως προβλέπεται από τον κανόνα του Hund) και χρόνο ζωής από  $10^{-4}$  sec έως λίγα sec, ενώ ο χρόνος ζωής της διεγερμένης απλής κατάστασης κυμαίνεται από  $10^{-6}$  έως  $10^{-8}$  sec.



**Σχήμα 5:** Εκπομπή φωτονίου στο φθορισμό

## 2. Φθορισμός και φωτοδιάγνωση

Έχει διαπιστωθεί ότι διάφορα συστατικά των ιστών, όπως η τρυπτοφάνη, το κολλαγόνο, η ελαστίνη, το NADH και οι πορφυρίνες φθορίζουν όταν διεγερθούν με φως ορισμένου μήκους κύματος. Το φαινόμενο αυτό καλείται αυτοφθορισμός και



παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη βιοχημική κατάσταση του ιστού. Η *in vivo* φωτοδιάγνωση με φθορισμό χρησιμοποιεί κυρίως εξωγενείς δείκτες (markers), οι οποίοι συσσωρεύονται εκλεκτικά στους παθολογικούς ιστούς και καλούνται φωτοευαίσθητοποιητές. Πρόκειται για φωτοευαίσθητες ουσίες ή πρόδρομες μορφές τους που μεταβολίζονται σε φωτοευαίσθητες ουσίες μέσα στα κύτταρα. Όταν οι ουσίες αυτές διεγερθούν από ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, την απορροφούν και στη συνέχεια τη μεταφέρουν σε γειτονικά βιολογικά μόρια προκαλώντας φωτοχημικές αντιδράσεις.

Η πρώτη ποσοτική μελέτη φθορισμού *in vivo* με φωτοευαίσθητοποιητές διενεργήθηκε το 1955-1960 από τους Winkelman και Rasmussen-Taxdal χρησιμοποιώντας φλουορομετρία και φασματοφωτομετρία πορφυρινών που είχαν εξαχθεί από ιστούς (Winkelman J 1960, Rasmussen-Taxdal DS 1955). Την ίδια χρονική περίοδο άρχισαν κλινικές δοκιμές του HpD (Hematoporphyrin derivative, φάσμα εκπομπής στα 630-700 nm, χρόνος ζωής φθορισμού 16 ns) σε ασθενείς με όγκους στον οισοφάγο (Lipson RL 1961a), τους βρόγχους (Lipson RL 1961a), το στόμα-φάρυγγα-λάρυγγα-τραχεία (Leonard JR 1971), την ουροδόχο κύστη (Kelly JF 1976), τον κόλπο και τον τράχηλο της μήτρας (Gray MJ 1967, Kyriazis GA 1973). Σε όλες αυτές τις μελέτες η εκτίμηση του κόκκινου φθορισμού που δίνει το HpD έγινε με το μάτι και διαπιστώθηκε ότι η πλειονότητα (Gray MJ 1967, Kyriazis GA 1973) ή και το σύνολο (Kelly JF 1976, Lipson RL 1961b, Leonard JR 1971) των καρκινικών βλαβών παρουσίαζαν φθορισμό, ενώ οι φυσιολογικοί ιστοί δεν φθόριζαν.

Τα επόμενα χρόνια χρησιμοποιήθηκαν για διαγνωστικούς σκοπούς νεώτεροι φωτοευαίσθητοποιητές. Οι φθαλοκυανίνες παρουσιάζουν εντονότερο σήμα φθορισμού και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από το HpD, με μικρότερη αλληλοεπικάλυψη με τον αυτοφθορισμό του ιστού (Spikes JD 1986). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα συσσώρευσης στους καρκινικούς ιστούς από το HpD (van Leengoed E 1990). Οι χλωρίνες (mono-aspartyl chlorin e<sub>6</sub>, di-aspartyl chlorin e<sub>6</sub>, meso-tetra hydroxyphenyl chlorine) και τα παράγωγα της βενζοπορφυρίνης παρουσιάζουν έντονο φθορισμό, αλλά παράλληλα έχουν και ισχυρή φωτοευαίσθητοποιητική ικανότητα, γεγονός το οποίο αποτελεί μειονέκτημα όταν χρησιμοποιούνται μόνο για διαγνωστικούς σκοπούς (Roberts WG 1988, Andersson-Engels S 1993, Alian W 1994). Επιπλέον, δεν παρέχουν σημαντικά καλύτερη εκλεκτική συγκέντρωση σε όγκους από το HpD. Αρκετές ροδαμίνες έχουν προταθεί για χρήση στη φωτοδιάγνωση, καθώς το θετικό τους φορτίο συμβάλλει στην έλξη τους από καρκινικά κύτταρα (Haghighat S 1992). Το μειονέκτημά τους

είναι ότι εκπέμπουν στην ορατή περιοχή του φάσματος, όπου ο αυτοφθορισμός των ιστών είναι έντονος.

Σημαντική ώθηση στη φωτοδιάγνωση έδωσε η εφαρμογή του δ-αμινολεβουλινικού οξέος (δ-aminolevulinic acid, ALA), ενός προδρόμου της αίμης. Το μόριο του ALA δεν είναι φωτοενεργό και μεταβολίζεται ταχέως στους ιστούς σε πρωτοπορφυρίνη IX (Protoporphyrin IX, PpIX) με μεγάλη ικανότητα εκλεκτικής συσσώρευσης στους καρκινικούς ιστούς. Η PpIX έχει παρόμοιες φωτοφυσικές ιδιότητες με το H<sub>2</sub>D. Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες μελέτες in vivo φωτοδιάγνωσης με ALA αφορούν ογκολογικές εφαρμογές με σκοπό την ανίχνευση πρώιμων καρκινικών βλαβών, τον προσδιορισμό των ορίων ενός όγκου και την πιθανή του εξάπλωση σε γειτονικούς ιστούς καθώς και τη βελτιστοποίηση της τοπικής θεραπείας συμπαγών όγκων. Συγκεκριμένα το ALA έχει χρησιμοποιηθεί στη φωτοδιάγνωση καρκίνου της στοματικής κοιλότητας (Leunig A 2001), ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας (Hillemanns P 2000), νεοπλασιών της ουροδόχου κύστεως (Marcus SL 1996, Riedl CR 1999), πρώιμου σταδίου του καρκίνου του πνεύμονα (Baumgartner R 1997), ακτινικών υπερκερατώσεων και βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων του δέρματος (Tosca AD 1996, Stefanidou M 2000).

Η απλούστερη διαδικασία προκειμένου να εξαχθεί διαγνωστική πληροφορία χρησιμοποιώντας τον φθορισμό, είναι να χρησιμοποιηθεί μόνο ένα μήκος κύματος εκπομπής και ένα μήκος κύματος διέγερσης. Τα ηλεκτρονικά συστήματα ανίχνευσης βελτιώνουν τη διαδικασία, καθώς επιτρέπουν την αντικειμενική μέτρηση και καταγραφή της έντασης του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, τα συστήματα αυτά μπορούν να αποθηκεύουν πολλά σήματα φθορισμού και στη συνέχεια να αφαιρούν τον αυτοφθορισμό του ιστού και/ή να υπολογίζουν το λόγο του φθορισμού που προκλήθηκε από τον φωτοευαισθητοποιητή προς τον αυτοφθορισμό του ιστού (Ankerst J 1984, Profio AE 1985). Εναλλακτικά, μπορεί να υπολογιστεί ο λόγος του φθορισμού που προκλήθηκε από τον φωτοευαισθητοποιητή προς το διάχυτα ανακλώμενο φως, αφού πρώτα εξαλειφθεί το κατοπτρικά ανακλώμενο φως (Lenz 1988, Profio 1984). Η χρήση κάμερας επιτρέπει την εύκολη αποθήκευση των μετρήσεων ολόκληρης της περιοχής (Profio AE 1983).

Γενικά, με τον περιορισμό σε ένα μόνο μήκος κύματος δεν αξιοποιούνται πλήρως οι δυνατότητες της φωτοδιάγνωσης με φθορισμό. Έτσι αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι ώστε να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός. Μία προσέγγιση είναι να ενσωματωθεί μία συσκευή σημειακής μέτρησης με φασματική ανάλυση σε ένα

όργανο απεικόνισης, ώστε κάθε ύποπτη περιοχή να μπορεί να μελετηθεί φασματοσκοπικά (Hirano T 1989). Μία άλλη τεχνική χρησιμοποιεί διαδοχικές ή παράλληλες απεικονίσεις σε πολλά μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης προκειμένου να αφαιρέσει τον αυτοφθορισμό (Profio AE 1985, Baumgartner R 1987, Palcic B 1991, van der Bergh H 1994).

Μία εναλλακτική τεχνική συνδυάζει πολλά μήκη κύματος εκπομπής με πολλά μήκη κύματος διέγερσης. Ο σκοπός της, συγκρινόμενη με τις προηγούμενες, είναι να αντισταθμίσει αποκλίσεις στα οπτικά χαρακτηριστικά των ιστών κατά τη διάρκεια των μετρήσεων (Malik Z 1996). Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης φθορισμού ιστών επιτρέπει την καταγραφή ολόκληρου του φάσματος εκπομπής του φθορισμού σε κάθε εικονοστοιχείο (pixel) της εικόνας. Με τη φασματική ανάλυση που παρέχει αυτό το σύστημα είναι δυνατή η μελέτη πολύ μικρών αλλαγών στην εκπομπή φθορισμού. Οι αλλαγές στην εκπομπή φθορισμού ενός φωτοευαίσθητοποιητή λόγω μεταβολών στο μικροπεριβάλλον των ιστών μπορούν να μελετηθούν με αυτό τον τρόπο, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στη φωτοδιάγνωση με φθορισμό.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ δ-ΑΜΙΝΟΛΕΒΟΥΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ (δ-aminolevulinic acid, ALA)

#### 1. Φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) αποτελεί μία υποσχόμενη θεραπευτική μέθοδο, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορες ογκολογικές, δερματολογικές, οφθαλμολογικές και καρδιαγγειακές παθήσεις. Η ΦΔΘ βασίζεται στη χρήση φωτοευαισθητοποιητών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από εκλεκτική συγκέντρωση και/ή κατακράτηση από τους παθολογικούς ιστούς. Όταν οι φωτοευαισθητοποιητές διεγερθούν από ορατό φως κατάλληλου μήκους κύματος, η παραγωγή κυτταροτοξικών μορίων, όπως το ενεργοποιημένο singlet οξυγόνο, οδηγεί σε μη αναστρέψιμη βλάβη των παθολογικών ιστών. Συγκρινόμενη με άλλες θεραπευτικές μεθόδους, όπως χειρουργική αφαίρεση, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία, η ΦΔΘ έχει το πλεονέκτημα της εκλεκτικής και αποτελεσματικής καταστροφής της πάσχουσας περιοχής χωρίς να βλάπτεται ο γύρω υγιής ιστός.

Η χρησιμότητα ουσιών με ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή για την αντιμετώπιση δερματολογικών νοσημάτων ήταν γνωστή κατά την αρχαιότητα στην Αίγυπτο, την Ελλάδα και την Ινδία, όπου χρησιμοποιούσαν το φως και φυτικά εκχυλίσματα που περιείχαν ψωραλένιο για να θεραπεύσουν την ψωρίαση και τη λεύκη (Fitzpatric TB 1959, Daniel MD 1991). Η πρώτη περιγραφή φωτοδιέγερσης ιστών έγινε το 1900 από τον Raab (Raab O 1900), ο οποίος παρατήρησε τον ταχύ θάνατο του πρωτόζωου *Paramecium caudatum* όταν εκτέθηκε σε φως μετά από χρώση με ακριδίνη. Ο όρος «φωτοδυναμική» επινοήθηκε από τον von Tarpeiner το 1904, για να περιγράψει τις χημικές αντιδράσεις που καταναλώνουν οξυγόνο και προκαλούνται από φωτοευαισθητοποίηση (von Tarpeiner H 1904). Ο von Tarpeiner και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν φως και διάλυμα εωσίνης για να θεραπεύσουν δερματικούς όγκους.

Η ικανότητα των πορφυρινών να συγκεντρώνονται εκλεκτικά σε όγκους μελετήθηκε από τους Policard (Policard A 1924), Auler και Banzer (Auler H, Banzer G

1942) και Figge, Weiland και Manganiello (Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO 1948). Αυτοί οι ερευνητές περιέγραψαν τον χαρακτηριστικό κόκκινο φθορισμό καρκινικών, εμβρυϊκών και τραυματικών ιστών μετά από εφαρμογή αιματοπορφυρίνης. Το 1960 ο Lipson (Lipson RL 1961) συνέθεσε ένα παράγωγο της αιματοπορφυρίνης, το HpD (Hematoporphyrin derivative, Photofrin® I), προκειμένου να ενισχύσει την εκλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή σε όγκους. Έκτοτε το HpD χρησιμοποιήθηκε τόσο στη φωτοδιάγνωση με φθορισμό όσο και στη ΦΔΘ. Τη δεκαετία του 1970 άρχισε να γίνεται κατανοητός ο κυτταροτοξικός μηχανισμός δράσης της ΦΔΘ (Dougherty TJ 1975, Dougherty TJ 1978, Diamond I 1972). Μελέτες του Dougherty σε 25 ασθενείς χρησιμοποιώντας HpD κατέληξαν σε πλήρη ή μερική νέκρωση 111 από τους 113 όγκους (Dougherty TJ 1975, Dougherty TJ 1978).

Τα επόμενα χρόνια η ΦΔΘ αναπτύχθηκε και αποτελεί ένα χρήσιμο πειραματικό εργαλείο στη θεραπεία όγκων που εντοπίζονται στους πνεύμονες, τον οισοφάγο, το παχύ έντερο, το περιτόναιο, τον υπεζωκότα, το ουροποιογεννητικό σύστημα, τον εγκέφαλο, το μάτι και το δέρμα. Εκτεταμένες κλινικές έρευνες οδήγησαν στην έγκριση της ΦΔΘ για τη θεραπεία συγκεκριμένων νεοπλασιών στον Καναδά, τη Γερμανία, τη Γαλλία, την Ιαπωνία, την Ολλανδία και τις ΗΠΑ. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι διάφορα άλλα νοσήματα εκτός από κακοήθειες, όπως η αθηροσκλήρωση, λοιμώδη νοσήματα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα μπορεί να αντιμετωπιστούν με τη ΦΔΘ (Saito T 1996, Ben-Hur E 1997, Ratkay LG 1998, Hendrich C 1997).

## **2. Φωτοευαισθητοποιητές**

Όταν ένα αρωματικό μόριο απορροφά φως συγκεκριμένης ενέργειας, τα ηλεκτρόνια του μπορεί να υποστούν ενεργειακή μετάβαση σε διεγερμένη απλή κατάσταση (singlet state). Ανάλογα με τη δομή του μορίου και το μικροπεριβάλλον του, το μόριο μπορεί να χάσει την επιπλέον ενέργεια και να επιστρέψει στη βασική ενεργειακή του κατάσταση, ή μπορεί να υποστεί μετάβαση στη διεγερμένη τριπλή κατάσταση (triplet state). Σε αυτό το στάδιο το μόριο μπορεί ξανά να επιστρέψει στη βασική ενεργειακή του κατάσταση, ή να μεταφέρει την ενέργεια εκπομπής στο μοριακό οξυγόνο (το οποίο βρίσκεται επίσης σε triplet state) οδηγώντας σε σχηματισμό ασταθούς singlet state οξυγόνου.

Ο χρόνος μετάπτωσης από την singlet state στην αρχική ενεργειακή κατάσταση είναι συνήθως της τάξης των ns. Το διάστημα αυτό είναι πολύ σύντομο και δεν επιτρέπει την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τα γύρω βιολογικά μόρια. Ο

αντίστοιχος χρόνος για την triplet state κυμαίνεται από  $\mu\text{s}$  σε  $\text{ms}$  και διασφαλίζει ικανή παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων μορίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ΦΔΘ. Επομένως, η ικανότητα ενός μορίου να προκαλεί αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και/ή να οδηγεί στο σχηματισμό singlet οξυγόνου εξαρτάται από την παραγωγική ικανού αριθμού triplet state μορίων.

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι συνήθως αρωματικά μόρια, επαρκή στο σχηματισμό διεγερμένων triplet states με μεγάλο χρόνο ζωής. Ένας μεγάλος αριθμός έχει δοκιμαστεί μέχρι σήμερα σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα ΦΔΘ, αλλά κανένας δεν έχει ιδανικές ιδιότητες. Αναγκαίες προϋποθέσεις για την επιτυχή εφαρμογή ενός φωτοευαισθητοποιητή στη ΦΔΘ είναι η χημική του καθαρότητα, η ειδικότητα για τα καρκινικά κύτταρα, η φυσική και χημική του σταθερότητα, το μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ της χορήγησής του και της μέγιστης συγκέντρωσής του στον όγκο, η ενεργοποίησή του σε μήκη κύματος με βέλτιστη διείσδυση στον ιστό, το υψηλό κβαντικό πεδίο για την παραγωγή singlet οξυγόνου και η ταχεία κάθαρσή του από τον οργανισμό (Fritsch C 1998).

Από αυτές τις προϋποθέσεις, η βασική ώστε να επιτευχθεί το μέγιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα, είναι η συγκέντρωση επαρκούς ποσότητας του φαρμάκου στον όγκο. Τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή προσλαμβάνονται από την πλειονότητα των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, αλλά παραμένουν για μεγαλύτερο διάστημα στα κακοήθη και τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (Lui H 1993). Οι μηχανισμοί που προκαλούν την εκλεκτική αυτή παραμονή του φαρμάκου στους όγκους για περισσότερο χρόνο, δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Ίσως το φαινόμενο να οφείλεται εν μέρει στον αυξημένο αριθμό και τη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων, στη μειωμένη ροή της λέμφου στους καρκινικούς ιστούς, στην παρουσία μακροφάγων που φαγοκυτταρώνουν τους φωτοευαισθητοποιητές, στη μεγάλη ποσότητα νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου (δεσμεύει πορφυρίνες) και στον ταχύ ρυθμό πολ/σμού των καρκινικών κυττάρων. Το χαμηλό pH του μεσοκυττάρου υγρού στους όγκους, λόγω αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος και υδρόλυσης του ATP (adenosine triphosphate), διευκολύνει την εκλεκτική κατανομή των φωτοευαισθητοποιητών, αυξάνοντας το λιπόφιλο χαρακτήρα τους και την πρόσληψή τους από τα κακοήθη κύτταρα (Bohmer RM 1985). Γενικά, ο δείκτης εκλεκτικότητας ενός φωτοευαισθητοποιητή για ΦΔΘ (ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του φαρμάκου στον ιστό στόχο/ συγκέντρωση του φαρμάκου στον υγιή ιστό) ενισχύεται όταν αυξάνεται ο βαθμός της υδροφοβικότητας του μορίου. Οι υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές μεταφέρονται κυρίως μέσω των πρωτεϊνών του ορού και

προκαλούν ισχαιμική βλάβη στα παθολογικά κύτταρα δρώντας στα αγγεία που τα τροφοδοτούν. Οι λιπόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές συνδέονται εκλεκτικά στις λιποπρωτεΐνες και συσσωρεύονται σε ενδοκυττάριους χώρους των παθολογικών κυττάρων οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στη ΦΔΘ και επιπλέον απαραίτητοι για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, με αποτέλεσμα να προκαλείται άμεσος κυτταρικός θάνατος μετά την ακτινοβολήση. Επιπλέον, τα παθολογικά κύτταρα έχουν περιορισμένη ικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών που προκαλεί η ΦΔΘ.

Το Photofrin<sup>®</sup> II (porfimer sodium), ένα κεκαθαρισμένο παράγωγο του HpD, είναι ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος φωτοευαισθητοποιητής και έχει λάβει έγκριση για τη θεραπεία επιφανειακών καρκίνων της ουροδόχου κύστεως στον Καναδά, αρχόμενων νεοπλασιών του πνεύμονα και προχωρημένων καρκίνων του οισοφάγου στην Ολλανδία και την Ιαπωνία. Παρόλα αυτά, τόσο το Photofrin<sup>®</sup> I όσο και το Photofrin<sup>®</sup> II, που χαρακτηρίζονται ως πρώτης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές, παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα. Κατ' αρχήν, αποτελούν σύνθετα μείγματα αρκετών πορφυρινών, ορισμένες από τις οποίες δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα και εμφανίζουν χαμηλό δείκτη εκλεκτικότητας για ΦΔΘ. Μελέτες που γίνονται με σκοπό να αυξηθεί η εκλεκτικότητά τους, στηρίζονται στις εγγενείς ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ καρκινικών και υγιών κυττάρων, π.χ. τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν σε μεγαλύτερο βαθμό συγκεκριμένα αντιγόνα και ογκοπρωτεΐνες και παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό υποδοχέων LDL (low-density lipoproteins). Η σύνδεση των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή με μονοκλωνικά αντισώματα που στρέφονται εναντίον αντιγόνων των καρκινικών κυττάρων ή με LDL μειώνει τα επίπεδα του φαρμάκου στους υγιείς ιστούς (Jori G 1992, Hasan T 1992, Mew D 1983).

Ένα ακόμη μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι απαιτείται η χορήγηση μεγάλων δόσεων των φαρμάκων προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική φωτοθεραπευτική απάντηση. Επιπλέον, εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης σε σχετικά μικρά μήκη κύματος (περιοχή Soret, 360-400 nm) και 4 μικρότερες ζώνες απορρόφησης ανάμεσα στα 500 και 635 nm (ζώνες Q). Όμως, σημαντική διεισδυτικότητα του φωτός στους ιστούς επιτυγχάνεται με μήκη κύματος 630-635 nm, που αντιστοιχούν στην ασθενέστερη ζώνη απορρόφησης αυτών των φωτοευαισθητοποιητών. Τέλος, παρουσιάζουν υψηλό δείκτη συσσώρευσης στο δέρμα, με αποτέλεσμα παρατεταμένη υπερευαισθησία του δέρματος στο φως, η οποία διαρκεί 6-8 εβδομάδες μετά τη ΦΔΘ. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα οι ασθενείς πρέπει να αποφεύγουν την έκθεση στον ήλιο.

Τα παραπάνω προβλήματα οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων μορίων, που καλούνται φωτοευαίσθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Οι κυριότερες κατηγορίες αυτών των φωτοευαίσθητοποιητών είναι οι εξής:

A) Παράγωγα πορφυρινών. Συνθετικές πορφυρίνες όπως το TPPS<sub>4</sub> (tetrasodium-meso-tetraphenylporphine-sulfonate) έχουν χρησιμοποιηθεί στη ΦΔΘ δερματικών όγκων (Santoro O 1990).

B) Χλωρίνες. Πρόκειται για υδρόφιλες πορφυρίνες με μέγιστη απορρόφηση στα 640-700 nm (Pass HI 1993). Στην ομάδα περιλαμβάνονται οι χλωρίνες mono-L-aspartyl e6, diaspartyl e6 (Spikes JD 1990), mTHPC (tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin), SnET2 (tin etiopurpurin) και το παράγωγο της βενζοπορφυρίνης BPD-MA (benzoporphyrin derivative monoacid ring A), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία βασικοκυτταρικών και ακανθοκυτταρικών καρκίνων του δέρματος (Fritsch C 1998, Kalka K 2000).

Γ) Φθαλοκυανίνες. Περιέχουν ένα διαμαγνητικό μεταλλικό ιόν, το οποίο εμφάνισε υψηλή φωτοδυναμική δραστηριότητα και λίγες φωτοτοξικές παρενέργειες στη θεραπεία ζωικών όγκων. Σχηματίζουν δισουλφιδικές ενώσεις με το αλουμίνιο, οι οποίες είναι χημικά σταθερές, διαλύονται αμέσως στο νερό και έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 675 nm (Canti G 1990). Το ALPcTS (chloroaluminum-tetrasulphthalocyanine) έχει δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες στη θεραπεία βασικοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος, σαρκώματος του Karosi και καρκίνου του πνεύμονα (Kalka K 2000).

Δ) Πορφυκίνες. Πρόκειται για συνθετικές πορφυρίνες και ισομερή πορφυρινών, με μέγιστη απορρόφηση στα 550-650 nm. Το ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-methoxyethyl-porphycene) είναι μία χημικά σταθερή ουσία με γρήγορη φαρμακοκινητική και καλύτερες φωτοδυναμικές ιδιότητες in vivo και in vitro από το Photofrin<sup>®</sup> II (Abels C 1997).

Ε) Άλλοι φωτοευαίσθητοποιητές. Η υπερικίνη εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στην UV (330 nm) και στο ορατό (550 και 588 nm) και έχει φωτοτοξική δράση in vivo και in vitro (Schempp CM 1999). Το Lu-Tex (lutetium texaphyrin) είναι υδατοδιαλυτό, εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 732 nm και προκαλεί μείωση όγκων σε ποντίκια (Kostenich G 1997). Η θειονίνη, οι κατιονικές χρωστικές φαινοθειαζινών (μπλε του μεθυλενίου, πράσινο του μεθυλενίου, Nile blue A, azure C) και η ροδαμίνη 123 μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη ΦΔΘ (Fowler GJ 1990, Castro DJ 1992).

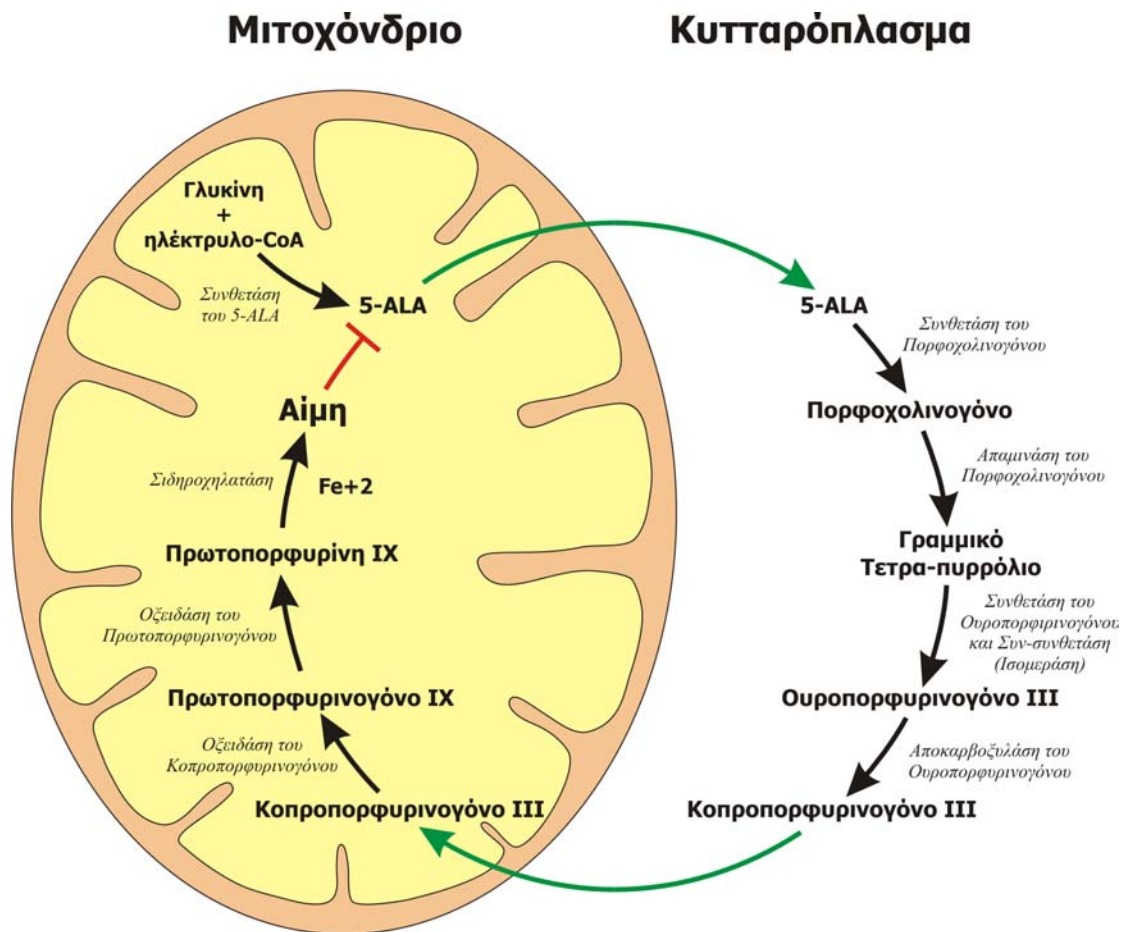


### **3. δ-αμινολεβουλινικό οξύ (δ-aminolevulinic acid, ALA)**

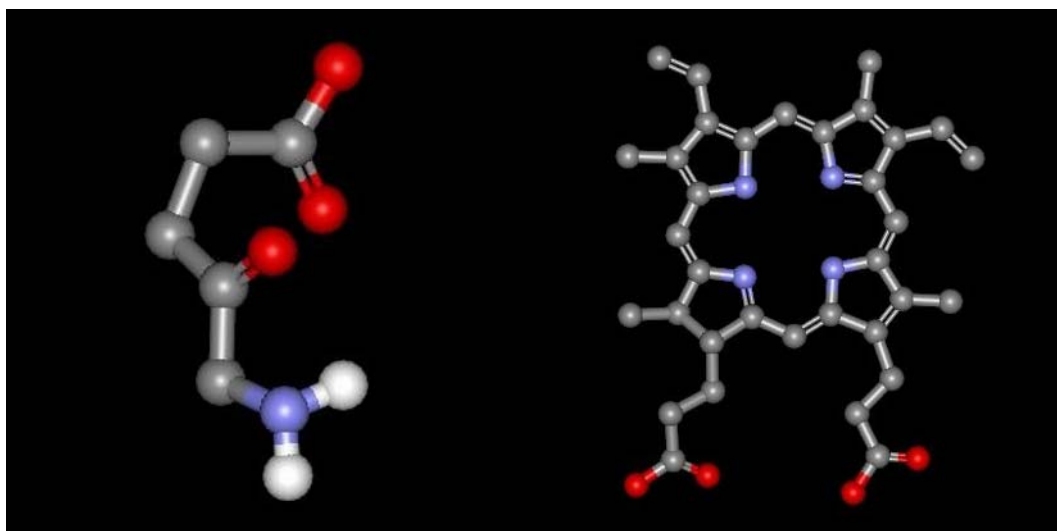
Σε αντίθεση με τις πορφυρίνες, οι οποίες λόγω του μεγάλου μεγέθους τους δεν μπορούν να διεισδύσουν στο δέρμα όταν χορηγηθούν τοπικά, το δ-αμινολεβουλινικό οξύ (δ-aminolevulinic acid, ALA) είναι μικρό μόριο και εισχωρεί εύκολα σε ανώμαλη κερατίνη στιβάδα (Kennedy JC 1992). Το ALA είναι το πρώτο ενδιάμεσο μόριο στη βιοσυνθετική οδό της αίμης και σχηματίζεται *in vivo* στα μιτοχόνδρια από την ένωση γλυκίνης και ηλεκτρυλο-CoA (succinyl-CoA) (σχήμα 1). Στη συνέχεια μετατρέπεται από ενδοκυττάρια ένζυμα στην φωτοενεργό πρωτοπορφυρίνη IX (protoporphyrin IX, PpIX) (σχήμα 2). Η PpIX είναι ο άμεσος πρόδρομος διαφόρων τύπων αίμης και χλωροφύλλης. Σε αντίθεση με τις πορφυρίνες η αίμη δεν φθορίζει.

Συνήθως η παραγωγή ALA ελέγχεται μέσω αρνητικού παλίνδρομου μηχανισμού από την παρουσία ελεύθερης αίμης, η οποία αναστέλλει το ένζυμο συνθετάση του ALA. Όταν επιπλέον ποσότητα ALA χορηγηθεί εξωγενώς τοπικά σε ανώμαλη επιδερμίδα, το ALA διεισδύει ταχέως στην επιδερμίδα και - παρακάμπτοντας τον αρνητικό παλίνδρομο μηχανισμό - μετατρέπεται μέσα στα μιτοχόνδρια σε PpIX. Στα φυσιολογικά κύτταρα η επιπλέον ποσότητα PpIX μετατρέπεται ταχέως σε αίμη από το ένζυμο σιδηροχηλατάση (ferrochelatase). Στα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύονται μεγάλες ποσότητες PpIX, καθώς η μετατροπή της PpIX σε αίμη συμβαίνει σχετικά βραδέως λόγω ελαττωματικής βιοσύνθεσης της αίμης (αυξημένη δραστηριότητα της απαμινάσης του πορφοχολινογόνου και μειωμένη δραστηριότητα της σιδηροχηλατάσης) (Kennedy JC 1992, Gibson SL 1998).

Ο φθορισμός που προκαλεί η PpIX μετά από χορήγηση ALA εμφανίζει εκλεκτικότητα για συγκεκριμένους ιστούς. Ενώ τα κύτταρα της επιδερμίδας και οι τριχοσηγηματογόνες μονάδες παρουσιάζουν φθορισμό μετά από χορήγηση ALA, μεσεγχυματικά κύτταρα όπως τα κύτταρα του χορίου και των αιμοφόρων αγγείων του δέρματος δεν φθορίζουν (Divaris DX 1990). Αν και όλα τα εμπύρνα κύτταρα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν αίμη, μερικοί τύποι κυττάρων, όπως τα καρκινικά, έχουν αυξημένη ικανότητα σύνθεσης και διαφορετικούς παλίνδρομους μηχανισμούς ελέγχου. Οι διαφορές στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της PpIX σε διαφορετικούς ιστούς μπορεί να ευθύνονται εν μέρει για τα ειδικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει η PpIX μετά από χορήγηση ALA. Ο Rebeiz πρότεινε ότι κύτταρα με ταχύ μεταβολισμό και ρυθμό πολ/σμού, όπως τα καρκινικά κύτταρα, παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα PpIX (Rebeiz N 1992). Η ακτινική υπερκεράτωση, η ψωρίαση, τα ανοικτά τραύματα, το βασικοκυτταρικό και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα που καλύπτονται από ανώμαλες στιβάδες κερατίνης, εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα στο ALA



**Σχήμα 1:** Βιοσυνθετική οδός της αίμης



**Σχήμα 2:** Μόριο ALA και PpIX

(Kennedy JC 1992). Αφενός η μικρή διαπερατότητα του φυσιολογικού δέρματος στο μόριο του ALA και αφετέρου η συσσώρευση και ο αυξημένος μεταβολισμός του ALA στα καρκινικά κύτταρα, εξηγούν την εκλεκτική καταστροφή που προκαλεί η ΦΔΘ με ALA καρκίνων του δέρματος, χωρίς να βλάπτεται ο γύρω υγιής ιστός.

Αρκετές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έδειξαν ότι η PpIX που συντίθεται μετά από χορήγηση ALA αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσα σε 24 ώρες, ανεξάρτητα του τρόπου χορήγησης (i.v., per os, ή τοπική επάλειψη) του ALA (Kennedy JC 1992). Η ταχεία κάθαρση μειώνει τον κίνδυνο παρατεταμένης φωτοευαισθησίας, ακόμη και αν η ΦΔΘ επαναλαμβάνεται καθημερινά. Επιπλέον, μετά από χορήγηση επαρκούς δόσης φωτός, η PpIX φωτοαποικοδομείται (photobleaching) πολύ γρήγορα, χωρίς να παραμένει ανιχνεύσιμος φθορισμός (Wessels JM 1992). Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη χορήγηση μεγάλων δόσεων φωτός στον ευαισθητοποιημένο ιστό χωρίς τον κίνδυνο σημαντικής φωτοτοξικής βλάβης στον περιβάλλοντα υγιή ιστό, ο οποίος περιέχει μικρές μόνο ποσότητες PpIX.

#### **4. Συστήματα φωτισμού**

Το βάθος διείσδυσης του φωτός στον ιστό εξαρτάται από τα οπτικά χαρακτηριστικά του ιστού (σκέδαση, απορρόφηση από ενδογενείς χρωμοφόρες) και από το μήκος κύματος των φωτονίων, το οποίο υπαγορεύεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή. Μήκη κύματος μικρότερα από τα 600 nm απορροφώνται κυρίως από την αιμοσφαιρίνη, ενώ μήκη κύματος μεγαλύτερα από 1200 nm απορροφούνται από το νερό. Ακτινοβολία μήκους κύματος 630 nm φθάνει έως τα 5 mm στους περισσότερους ιστούς, ενώ ακτινοβολία 700-800 nm φθάνει έως 1-2 cm. Φωτόνια με μήκος κύματος μεγαλύτερο από 850 nm δεν αποδίδουν αρκετή ενέργεια ώστε να προκαλέσουν επαρκή φωτοχημική απάντηση (Wolf P 1997).

Πολλά διαφορετικά συστήματα φωτισμού έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο σε πειραματικές όσο και σε κλινικές εφαρμογές της ΦΔΘ. Στη ΦΔΘ δερματολογικών νόσων με ALA χρησιμοποιούνται επιτυχώς λέιζερ αλλά και διατάξεις μη σύμφωνης ακτινοβολίας. Τα συστήματα λέιζερ είναι αρκετά διαδεδομένα στη δερματολογία. Η σύγκριση μεταξύ λέιζερ παλμού (όπως το μεταβλητού μήκους κύματος λέιζερ αργού, 350-700 nm) και λέιζερ συνεχούς εκπομπής (π.χ. λέιζερ χρυσού με εκπομπή στα 628 nm) δεν δείχνει διαφορές στα ποσοστά ίασης (Shikowitz MJ 1992, Cowled PA 1984). Το ND-YAG λέιζερ (neodymium:YAG laser) εκπέμπει στα 690-1100 nm και είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη ΦΔΘ με φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς, οι οποίοι εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στο κόκκινο/ εγγύς υπέρυθρο (Fisher AMR 1995).

Με αυτά τα συστήματα, η διείσδυση του φωτός στον ιστό φθάνει περίπου έως τα 10 mm. Επιπλέον, η μετάδοση των ακτίνων μπορεί να γίνεται μέσω συστήματος οπτικών ινών επιτρέποντας στο φως να φτάσει σε εσωτερικά όργανα. Οι τεχνικές αυτές, όμως, είναι ακριβές, απαιτούν ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό για τη συντήρησή τους και καταλαμβάνουν μεγάλο όγκο. Τα τελευταία διάστημα δοκιμάζονται διοδικά λέιζερ, τα οποία έχουν μικρότερο κόστος και μεταφέρονται εύκολα (Kalka K 2000).

Πολλές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν διατάξεις μη σύμφωνης ακτινοβολίας για τη ΦΔΘ με ALA δερματικών βλαβών μεγάλου μεγέθους (Fritsch C 1998). Επειδή στη ΦΔΘ δεν είναι απαραίτητο να παρέχεται σύμφωνη ακτινοβολία, τα συστήματα αυτά έχουν το πλεονέκτημα του μικρότερου κόστους και του ευκολότερου χειρισμού και μεταφοράς. Πολύ διαδεδομένη είναι η χρήση συσκευών προβολής διαφανειών με φίλτρα, τα οποία αποκλείουν μήκη κύματος μικρότερα από 600 nm όπου απορροφά η αιμοσφαιρίνη, ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση ερυθρήματος λόγω θερμότητας. Παρόλα αυτά χρησιμοποιείται και λευκό φως χωρίς φίλτρα, ενώ έχουν κατασκευαστεί και διατάξεις μη σύμφωνης ακτινοβολίας ειδικά για τη ΦΔΘ. Ο λαμπτήρας Waldmann (PDT 1200 lamp) είναι ένας λαμπτήρας αλογόνου, που εκπέμπει στα 600-800 nm με υψηλή ένταση, με αποτέλεσμα κάθε συνεδρία ΦΔΘ να έχει σύντομη διάρκεια (Szeimies RM 1994). Ένα εναλλακτικό σύστημα φωτισμού είναι ο λαμπτήρας ξένου (Xe), το μήκος κύματος του οποίου μπορεί να ρυθμιστεί μεταξύ 400 και 1200 nm (Whitehurst C 1995).

Η πηγή φωτός που χρησιμοποιείται στη ΦΔΘ πρέπει να έχει κατάλληλα φασματικά χαρακτηριστικά, τα οποία να συμπίπτουν με το φάσμα μέγιστης απορρόφησης του εφαρμοζόμενου φωτοευαίσθητοποιητή. Στην περίπτωση της ΦΔΘ με ALA, συστήματα μη σύμφωνης ακτινοβολίας που εκπέμπουν μεταξύ 635 και 670 nm μπορούν να βελτιώσουν τη δραστηριότητα της ΦΔΘ με το σχηματισμό φωτοπροϊόντων της PpIX τα οποία διεγείρονται στα 670 nm περίπου (Charlesworth P 1993).

Οι δόσεις ενέργειας φωτός στη ΦΔΘ εκφράζονται σε  $J/cm^2$ , τα οποία προκύπτουν από τον πολ/σμό της έντασης της ακτινοβολίας ( $W/cm^2$ ) x τον χρόνο ακτινοβολήσης (sec). Στις περισσότερες μελέτες ΦΔΘ με ALA η συνολική δόση φωτός ποικίλλει μεταξύ 10 και 250  $J/cm^2$  με ένταση ακτινοβολίας 50-150  $mW/cm^2$  για συστήματα λέιζερ και μεταξύ 30 και 540  $J/cm^2$  με ένταση ακτινοβολίας 50-300  $mW/cm^2$  για διατάξεις μη σύμφωνης ακτινοβολίας. Όταν η ένταση υπερβαίνει τα 150-200  $mW/cm^2$  προκαλείται θερμικό φαινόμενο, το οποίο δρα σε συνέργια με τη ΦΔΘ. Παρόλο ότι η υπερθερμία μπορεί να συμβάλλει στο φωτοδυναμικό αποτέλεσμα,

πρέπει να αποφεύγεται, γιατί επιδρά και στο γειτονικό υγιή ιστό μειώνοντας την εκλεκτικότητα της ΦΔΘ.

## 5. Μηχανισμοί δράσης ΦΔΘ

Η γνώση γύρω από τους βιομοριακούς μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας που προκαλεί η ΦΔΘ δεν είναι ακόμη πλήρης. Η καταστροφή του παθολογικού ιστού με τη ΦΔΘ οφείλεται στο συνδυασμό κυτταρικού θανάτου, φωτοευαισθητοποίησης του αγγειακού δικτύου που καταλήγει σε ιστική υποξία, φλεγμονής και ανοσολογικής απόκρισης. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός αυτών των μηχανισμών δράσης είναι απαραίτητος για τον μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου.

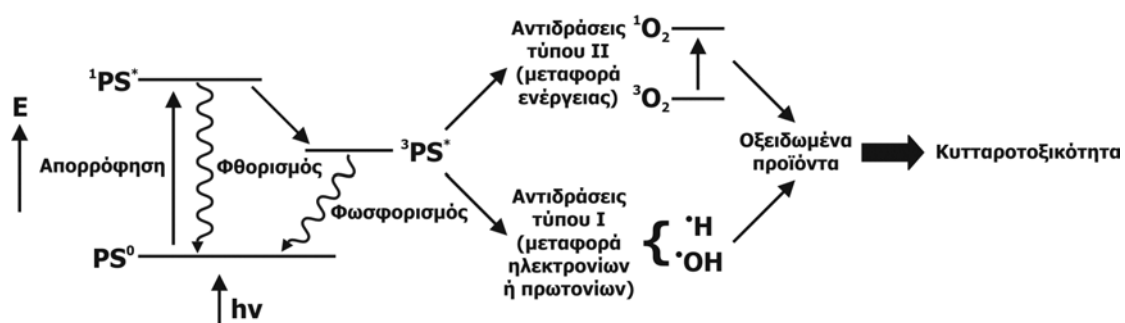
### 5.1 Φωτο-οξειδωτικοί μηχανισμοί

Η φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της διεγερμένης triplet state του φωτοευαισθητοποιητή και του υποστρώματος μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες (σχήμα 3). Στον μηχανισμό τύπου I, ο διεγερμένος από ακτινοβολία φωτοευαισθητοποιητής (triplet state) αλληλεπιδρά άμεσα με το υπόστρωμα και/ή τα διαλυτά μόρια, αποδίδοντας ελεύθερες ρίζες ή ιόντα ελευθέρων ριζών σε ένα άτομο υδρογόνου και/ή επάγοντας αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου. Η πλειονότητα αυτών των ριζών αντιδρούν ακαριαία με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν ένα σύνθετο μείγμα από ενδιάμεσα προϊόντα υψηλής δραστηριότητας, όπως  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  και  $\cdot\text{OH}$ , δηλαδή χημικά μόρια που οξειδώνουν μεγάλο αριθμό βιολογικών μορίων. Αν και το  $\cdot\text{O}_2^-$  έχει τη δυνατότητα να αντιδρά απευθείας με κρίσιμους βιολογικούς στόχους των κυττάρων, η κύρια δράση του οφείλεται στην ικανότητά του να παράγει τις πολύ τοξικές ρίζες υδροξυλίου. Το  $\cdot\text{OH}$  εμπλέκεται στην ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς αντιδρά με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα οδηγώντας στο σχηματισμό ριζών λιπιδίων ( $\text{L}\cdot$ ,  $\text{LO}\cdot$ ,  $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{LOOH}$ ). Γενικά, μοριακές δομές που οξειδώνονται ή ανάγονται άμεσα, διευκολύνουν αντιδράσεις τύπου I. Από τα 20 φυσικά αμινοξέα μόνο 5 (κυστεΐνη, ιστιδίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη και μεθειονίνη) είναι πολύ επιρρεπή σε οξείδωση μέσω μηχανισμού τύπου I. Επειδή η διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίου συμβαίνει σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα ( $t \leq 10$  ps), η στενή γειτνίαση ή η σύνδεση του φωτοευαισθητοποιητή σε ενδογενή μακρομόρια ενισχύει την πιθανότητα αντίδρασης τύπου I.

Στον μηχανισμό τύπου II, ο κυτταροτοξικός παράγοντας είναι το singlet οξυγόνο ( $^1\text{O}_2$ ), το οποίο προκύπτει από την αλληλεπίδραση του διεγερμένου σε triplet state φωτοευαισθητοποιητή με το μοριακό οξυγόνο σε μία αντίδραση μεταφοράς

ενέργειας, κατά την οποία ο φωτοευαισθητοποιητής επιστρέφει στη βασική ενεργειακή του κατάσταση. Η αλληλεπίδραση του  $^1\text{O}_2$  με ενδοκυττάριους στόχους οδηγεί τελικά σε βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης, των μιτοχονδρίων, των λυσοσωμάτων και του πυρήνα και προκαλεί ιστική νέκρωση. Λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του ( $t=250$  ns), το βιοχημικά ενεργό  $^1\text{O}_2$  διαχέεται σε απόσταση περίπου 45 nm. Επειδή η διάμετρος των ανθρώπινων κυττάρων ποικίλλει από 10 έως 100  $\mu\text{m}$ , η περιοχή της αρχικής παραγωγής  $^1\text{O}_2$  καθορίζει ποιες υποκυττάρια δομές μπορούν να προσβληθούν. Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές προσβάλλουν ταυτόχρονα πολλές υποκυττάρια δομές (Fisher AM 1995).

Ενώ ο μηχανισμός τύπου I ευνοείται κάτω από αναερόβιες συνθήκες, υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου οδηγούν σε μηχανισμό τύπου II, όπου το μέγιστο φωτοτοξικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με ενδοκυττάρια πίεση οξυγόνου στα 19 mmHg (Rosenthal I 1986). Ο μηχανισμός δράσης μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ από τον τύπο II στον τύπο I, λόγω αλλαγών που προκαλεί η ΦΔΘ στην οξυγόνωση του ιστού.



**Σχήμα 3:** Φωτο-οξειδωτικοί μηχανισμοί ΦΔΘ

## 5.2 Κυτταροτοξικότητα ΦΔΘ-Βλάβη υποκυττάρων στόχων

Η ΦΔΘ προκαλεί κυτταρικό θάνατο με απόπτωση ή με νέκρωση (Dellinger M 1996, Luo Y 1997). Το είδος του κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος του φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται (υποκυττάρια εντόπιση) και τη συγκέντρωσή του, το είδος του κυττάρου-στόχου που μπορεί να διαθέτει μεγάλες ή μικρές ποσότητες ενζύμων ή παραγόντων ενεργοποίησης της οδού της απόπτωσης και τη δόση της ακτινοβολίας (Dellinger M 1996, Kessel D 1998). Φωτοευαισθητοποιητές που συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια (π.χ. Photofrin) ή παράγονται σε αυτά (π.χ. PpIX μετά από χορήγηση ALA) είναι

πιθανό να προκαλούν απόπτωση, ενώ φωτοευαισθητοποιητές που συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη είναι πιθανότερο να επάγουν κυτταρική νέκρωση κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης. Υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές πιθανόν προσλαμβάνονται από το κύτταρο με ενδοκυττάρωση και κατ' επέκταση συσσωρεύονται στα λυσοσώματα ή τα ενδοσώματα. Η PrIX συσσωρεύεται *in vitro* σε κοκκώδη σωματίδια του κυτταροπλάσματος (πιθανότατα τα μιτοχόνδρια) 3 ώρες μετά από επώαση σε διάλυμα ALA συγκέντρωσης 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Krammer B 1996), ενώ 5 ώρες μετά το κυτταρόπλασμα και οι μεμβράνες χρωματίζονται εξ' ολοκλήρου με την εξαίρεση του πυρήνα.

Η βλάβη που προκαλεί η ΦΔΘ στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να παρατηρηθεί λίγα λεπτά μετά την έκθεση στο φως. Η βλάβη αυτού του είδους εκδηλώνεται ως σχηματισμός φυσαλίδων που προεξέχουν από τη κυτταρική μεμβράνη, αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, ελάττωση της ενεργητικής μεταφοράς αμινοξέων και υδατανθράκων, αύξηση της πρόσληψης μορίων του φωτοευαισθητοποιητή, παύση της κυτταρικής διαίρεσης και κυτταρική λύση. Οι διαταραχές που προκαλεί η ΦΔΘ στις υπόλοιπες μεμβράνες, οδηγούν σε αποικοδόμηση κυστιδίων που περιέχουν κυτταροπλασματικά ή λυσοσωματικά ένζυμα, κατάλυση της αναπνευστικής αλυσού λόγω βλάβης των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα μείωση του ενδοκυττάρου ATP και αναστολή της δραστηριότητας ενζύμων όπως η  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPάση και η  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPάση, αύξηση του ενδοκυττάρου  $\text{Ca}^{2+}$ , οίδημα, υπερέκφραση ή υποέκφραση των αντιγόνων επιφανείας και δημιουργία υπεροξειδίων λιπιδίων που μπορεί να οδηγήσει σε σύνδεση πρωτεϊνών μεταξύ τους ή με μόρια DNA και RNA. Βλάβες στο DNA έχουν περιγραφεί μετά από ΦΔΘ. Εντούτοις, η πλειοψηφία των φωτοευαισθητοποιητών δεν συσσωρεύεται στον πυρήνα και η ΦΔΘ έχει μικρή δυνατότητα πρόκλησης μεταλλάξεων ή καρκινογένεσης. Η απάντηση του κυττάρου στη φωτοευαισθητοποίηση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), οξυγενάση της αίμης και πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από τη γλυκόζη και ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταροτοξικού αποτελέσματος λόγω οξειδωτικού στρες (Gomer CJ 1991, Gomer CJ 1996). Επίσης επάγονται παροδικά τα γονίδια πρώιμης απάντησης (early response genes) *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* και *egr-1* (Luna MC 1994) .

Ο μηχανισμός της άμεσης καταστροφής των παθολογικών κυττάρων έχει πολλούς περιορισμούς *in vivo* λόγω ανομοιογενούς κατανομής του φωτοευαισθητοποιητή, μειωμένης συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή και μειωμένου κυτταρικού θανάτου σε σημεία της βλάβης που βρίσκονται σε απόσταση

από το αγγειακό δίκτυο και μείωσης της παροχής οξυγόνου κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ. Αυτό οφείλεται αφενός στη φωτοχημική κατανάλωση του οξυγόνου κατά τη διαδικασία της ΦΔΘ και αφετέρου στη δράση της ΦΔΘ στα αγγεία της περιοχής. Ο ρυθμός παραγωγής  $^1\text{O}_2$  και κατ' επέκταση η κατανάλωση του οξυγόνου του ιστού είναι αυξημένα όταν τόσο η ένταση της ακτινοβολίας, όσο και τα επίπεδα του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό είναι υψηλά (Nichols MG 1994). Η ένταση της ακτινοβολίας μπορεί να ρυθμιστεί προς τα κάτω, ώστε να επιβραδύνει την κατανάλωση οξυγόνου και να διευκολύνει τη διατήρηση της συγκέντρωσής του σε επαρκή επίπεδα στον ιστό κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Μία άλλη σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την κατανάλωση οξυγόνου είναι η φωτοαποικοδόμηση (photobleaching) του φωτοευαισθητοποιητή, αφού η μείωση της συγκέντρωσής του μειώνει το ρυθμό της φωτοχημικής κατανάλωσης του οξυγόνου.

Η ΦΔΘ μπορεί επίσης να προκαλέσει ταχεία απόπτωση *in vitro* (He XY 1994) και *in vivo* (Webber J 1996). Ο μηχανισμός της απόπτωσης μετά από ΦΔΘ έχει ερμηνευθεί σε πρόσφατες μελέτες που αναφέρουν συσχέτιση μεταξύ της φωτοτοξικής βλάβης των μιτοχονδρίων και της διαδικασίας της απόπτωσης, ενώ ταυτόχρονη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να καθυστερήσει την απόπτωση (Kessel D 1998). Είναι γνωστό ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μιτοχονδριακών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα μπορεί να ξεκινήσει μία αποπτωτική απάντηση. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η αυξημένη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων λόγω μετάπτωσης των πόρων, η οποία προκαλείται από την πρωτοπορφυρίνη και άλλους φωτοευαισθητοποιητές. Ο Marchetti (Marchetti P 1996) απέδειξε ότι η πρωτοπορφυρίνη συνδέεται στον υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, ο οποίος έχει την ικανότητα να προκαλεί μετάπτωση των πόρων των μιτοχονδρίων. Ίσως η ακτινοβόληση των φωτοευαισθητοποιητών που είναι συνδεδεμένοι σε αυτόν τον υποδοχέα να οδηγεί σε άνοιγμα των πόρων με επακόλουθο την απελευθέρωση παραγόντων που ξεκινούν την απόπτωση. Επιπλέον, η αύξηση του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί επίσης να δίνει το ερέθισμα για αύξηση της διαπερατότητας των μιτοχονδρίων, ή εναλλακτικά να ενεργοποιεί άμεσα τις  $\text{Ca}^{2+}$ -εξαρτώμενες ενδονουκλεάσες και με αυτό τον τρόπο να ξεκινά απόπτωση ανεξάρτητα από την οδό των μιτοχονδρίων (Krebs J 1998). Επομένως, η απόπτωση που προκαλεί η ΦΔΘ, δεν εξαρτάται από ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταγωγής σημάτων (signal transduction pathways) που ίσως λείπουν από ορισμένα νεοπλασματικά κύτταρα ανθεκτικά σε χημειοθεραπεία, ούτε από άλλους γενετικούς παράγοντες (π.χ. p53) ή από τη φάση του κυτταρικού κύκλου.



### 5.3 Αντιδράσεις φλεγμονής και ανοσολογική απόκριση

Οι αντιδράσεις φλεγμονής αποτελούν βασικό μηχανισμό καταστροφής του παθολογικού ιστού μετά από ΦΔΘ. Οι διαφορές στη φύση και την ένταση της φλεγμονής ανάμεσα στον φυσιολογικό και τον παθολογικό ιστό μπορεί να συμβάλλει στην ειδικότητα της ιστικής βλάβης που προκαλεί η ΦΔΘ.

#### 5.3.1 Οξείες αντιδράσεις φλεγμονής

Η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών προκαλεί απελευθέρωση φωσφολιπιδίων, τα οποία μετατρέπονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα από τις φωσφολιπάσες. Μεγάλης σημασίας είναι η απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Η κυκλοοξυγενάση καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε θρομβοξάνες ( $A_2$ , B) και προσταγλανδίνες ( $PGD_2$ ,  $PGE_2$ , 6-keto- $PGF_{1a}$ ), ενώ η 5-λιποξυγενάση το μετατρέπει σε λευκοτριένια ( $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$ ) και υδροξυ-οξέα (Samuelsson B 1983). Τα παράγωγα αυτά ξεκινούν την οξεία αντίδραση φλεγμονής. Οι προσταγλανδίνες προκαλούν κυρίως αγγειοδιαστολή των τελικών αρτηριολίων και βλάπτουν τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα που επενδύουν τον αυλό των αγγείων. Τα χάσματα που δημιουργούνται ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγούν σε τοπικό οίδημα λόγω αυξημένης εξαγγείωσης νερού, μακρομορίων και κυττάρων του αίματος (μαστοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μακροφάγα) στον παθολογικό ιστό (Fingar VH 1991). Οι θρομβοξάνες και τα λευκοτριένια βλάπτουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω αγγειοσυστολής των αρτηριολίων και των φλεβιδίων. Επιπλέον, οι θρομβοξάνες προάγουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων και οδηγούν στην έναρξη του σχηματισμού ενδαγγειακού θρόμβου. Η στάση της αιματικής ροής δημιουργεί τελικά περιοχές τοπικής υποξίας και κατ' επέκταση νέκρωσης. Σε απάντηση της ταχείας αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και συγκόλλησης στα βεβλαμμένα αγγεία απελευθερώνονται αγγειοδραστικές ουσίες όπως ισταμίνη, σεροτονίνη και βραδυκινίνη, που ενισχύουν την παθολογική δράση των εικοσανοειδών.

Η αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  μετά από ΦΔΘ καταλύει επίσης την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης  $A_2$ , προκαλεί την παραγωγή  $\cdot O_2^-$  από την πρωτεϊνική κινάση C και οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης γύρω από τον πυρήνα (Oleinick NL 1993). Σε συνεργασία με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και διαφόρων παραγόντων πήξης, όπως η κονβερτίνη (convertin) και οι παράγοντες Hageman και Christmas, ο σχηματισμός ενδοαγγειακών θρόμβων καταλύεται από το  $Ca^{2+}$  μέσω της μετατροπής της

προθρομβίνης σε θρομβίνη. Επιπλέον, η αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  διεγείρει την απελευθέρωση του παράγοντα von Willebrand, μίας γλυκοπρωτεΐνης που συντίθεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μεσολαβεί στη συγκόλληση αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα (Foster TH 1991). Τέλος, το  $Ca^{2+}$  έχει κεντρικό ρόλο στη συστολή των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων (σύστημα τροπονίνης-τροπομυοσίνης), οδηγώντας σε έκθεση της βασικής μεμβράνης του αγγειακού τοιχώματος. Συμπερασματικά, η αγγειακή βλάβη μετά από ΦΔΘ προκαλεί σημαντική υποξία/ανοξία στην περιοχή της βλάβης και συμβάλλει στον μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου.

### **5.3.2 Όψιμες αντιδράσεις φλεγμονής**

Η ΦΔΘ οδηγεί σε ενεργοποίηση της οδού του συμπληρώματος πιθανά μέσω υδρόλυσης των συστατικών C3 και C5 από τα λυσοσωματικά ένζυμα (Lim HW 1989). Το C3a και το C5a είναι ισχυρές αναφυλοτοξίνες που αντιδρούν με ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα, μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα ή επάγουν την απελευθέρωση ποικίλων μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως ισταμίνη. Το C3b δρα κυρίως ως οψωνίνη, ενισχύει τη φαγοκυττάρωση και σχηματίζει τριμοριακό σύμπλεγμα με το C4b και το C2a, που διασπά το C5 στο C5a και C5b. Τελικά, η κυτταρική μεμβράνη βλάπτεται από το σύμπλεγμα C5b-C6789.

### **5.3.3 Ανοσολογική απόκριση και ιστολογικές αλλαγές**

Ιστολογικά, η χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση ξεκινάει με τη διήθηση της βλάβης από ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες του συμπληρώματος και/ή από προϊόντα του ιστού που έχει υποστεί βλάβη (φιμπρονεκτίνη, ινική ή προϊόντα αποδόμησης του κολλαγόνου) και διέρχονται διαμέσου των χασμάτων στο ενδοθήλιο των τριχοειδών. Αμέσως μετά τη διήθηση από ουδετερόφιλα ακολουθεί διήθηση από μακροφάγα και πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, τα οποία δρουν συνεργητικά σε μία πολύπλοκη διαδικασία.

Τα ουδετερόφιλα φαγοκυττάρωνουν τα προϊόντα της αποδόμησης του ιστού και απελευθερώνουν λυσοσωματικά ένζυμα, τοξικές ρίζες οξυγόνου και μυελοϋπεροξειδάση που επιταχύνουν την ιστική νέκρωση. Μακροφάγα και T-κυτταροτοξικά κύτταρα μπορούν είτε να προσβάλλουν απευθείας τα παθολογικά κύτταρα, είτε να προαγάγουν κυτταρόλυση από αντισώματα ή κύτταρα φυσικούς φονείς. Διάφορα συστατικά του συμπληρώματος δίνουν το ερέθισμα σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μακροφάγα να απελευθερώσουν λυσοσωματικά

ένζυμα και κυττοκίνες, όπως IL-1β, IL-2, GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) και TNF-α (tumour necrosis factor-α) (Nathan CF 1987). Η IL-1β και ο TNF-α προκαλούν νέκρωση του ιστού και επιταχύνουν την παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης, ενώ η IL-2 διεγείρει τα Τ-κύτταρα. Ο GM-CSF επιδρά στον πολλαπλασιασμό των ουδετεροφίλων και μεσολαβεί στην απελευθέρωση υπεροξειδίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα που δρουν ως κύτταρα παρουσίασης αντιγόνων (antigen presenting cells-APC) επίσης φαγοκυτταρώνουν μεγάλο αριθμό παθολογικών κυττάρων που έχουν σκοτωθεί, ή έχουν υποστεί βλάβη από τη ΦΔΘ (Korbelik M 1996). Στη συνέχεια τα APC επεξεργάζονται τα ειδικά αντιγονικά πεπτίδια των παθολογικών αυτών κυττάρων και τα παρουσιάζουν στις μεμβράνες τους χρησιμοποιώντας τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility molecules-MHC) τάξης II. Τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4) αναγνωρίζουν τα ειδικά αντιγόνα, ενεργοποιούνται και με τη σειρά τους ευαισθητοποιούν Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8) στους ειδικούς αντιγονικούς επίτοπους. Η δημιουργία κλώνων CD4 και CD8 που αναγνωρίζουν ως στόχους τα παθολογικά κύτταρα ακολουθείται από την ταχεία ανάπτυξη και ενεργοποίησή τους, με αποτέλεσμα πλήρως ανεπτυγμένη κυτταρική ανοσία. Η δραστηριότητα των ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων δεν περιορίζεται στην αρχική περιοχή της ΦΔΘ, αλλά στην περίπτωση καρκινικών βλαβών περιλαμβάνει και μεταστατικές εστίες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι και τα Β-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells) επίσης ενεργοποιούνται και μπορεί να συνεισφέρουν στην ανοσολογική απόκριση μετά από ΦΔΘ, αλλά ο ρόλος τους δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

## **6. Εφαρμογές τοπικής ΦΔΘ με ALA**

Η προσβασιμότητα του δέρματος στην έκθεση σε φως και κατά συνέπεια η εύκολη εφαρμογή της ΦΔΘ, είχε σαν αποτέλεσμα τη συχνή εφαρμογή της στη Δερματολογία. Τα τελευταία δέκα χρόνια η τοπική ΦΔΘ με ALA έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες για τη θεραπεία βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων (BK) με καλά αποτελέσματα. Καλύτερη ανταπόκριση εμφανίζουν τα επιπολής BK με ποσοστά πλήρους ανταπόκρισης 79-100% (Wolf P 1993, Svanberg K 1994, Calzavara-Pinton PG 1995, Fijan S 1995, Kennedy JC 1990, Kennedy JC 1992), ενώ οι οζώδεις βλάβες παρουσιάζουν ποσοστά ίασης 10-50% (Wolf P 1993, Svanberg K 1994, Calzavara-Pinton PG 1995, Fijan S 1995). Σε όλες τις μελέτες οι επαναλαμβανόμενες συνεδρίες

ΦΔΘ είχαν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης, κυρίως στις περιπτώσεις οζωδών ΒΚ. Η ΦΔΘ μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στη θεραπεία πολλαπλών υποτροπιαζόντων ΒΚ σε ασθενείς με σύνδρομο βασικοκυτταρικού σπίλου (Karrer S 1995).

Τα επιπολής ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (ΑΚ) έχουν παρόμοια ποσοστά ανταπόκρισης με τα επιπολής ΒΚ (Calzavara-Pinton PG 1995, Kennedy JC 1990, Wolf P 1993), ενώ τα οζώδη ΑΚ ανταποκρίνονται μόνο σε ποσοστό 33% (Calzavara-Pinton PG 1995). Η τοπική ΦΔΘ με ALA έχει εφαρμοστεί επίσης επιτυχώς σε νόσο Bowen (ποσοστά πλήρους ανταπόκρισης 50-100%) (Cairnduff F 1994, Svanberg K 1994, Calzavara-Pinton PG 1995, Fijan S 1995) και ακτινικές υπερκερατώσεις (ποσοστά ίασης 81-100% σε βλάβες κεφαλής και χαμηλότερα σε βλάβες κορμού και άκρων) (Kennedy JC 1990, Wolf P 1993, Calzavara-Pinton PG 1995, Fijan S 1995). Η αποτελεσματικότητα του ALA στη ΦΔΘ οδήγησε τον Σεπτέμβριο του 1998 στην έγκρισή του από το FDA για τη θεραπεία ακτινικών υπερκερατώσεων. Επίσης, έχουν ανακοινωθεί περιπτώσεις ίασης δερματικών Τ-λεμφωμάτων μετά από τοπική ΦΔΘ με ALA (Ammann R 1995a).

Αν και η τοπική ΦΔΘ έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στην αντιμετώπιση δερματικών όγκων και προκαρκινικών βλαβών, η εφαρμογή της μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα δερματικά νοσήματα. Ο συνδυασμός ALA και UVA (Nelson JS 1995) ή ορατού φωτός (Boehncke WH 1994) σε ψωριασικές βλάβες είχε παρόμοιο θεραπευτικό αποτέλεσμα με την ανθραλίνη. Η συσσώρευση PpIX σε τριχοθυλάκια και σμηγματογόνους αδένες μετά από επάλειψη με ALA οδήγησε σε πειραματικές εφαρμογές της ΦΔΘ σε νοσήματα αυτών των εξαρτημάτων του δέρματος. Ο Grossman εφάρμοσε τη μέθοδο σε περιπτώσεις υπερτρίχωσης με ενθαρρυντικά αποτελέσματα όταν δόθηκαν 200 J/cm<sup>2</sup> (Grossman M 1995). Ο Meffert παρατήρησε μείωση της σμηγματόρροιας και των βλαβών της ακμής μετά από τοπική ΦΔΘ με ALA (Meffert H 1990).

## **7. ΦΔΘ και ιοί**

Η ευαισθησία των ιών στη ΦΔΘ περιγράφηκε αρχικά από τον Schultz τη δεκαετία του 1930 σε βακτηριοφάγους, αδενοϊούς και τον ιό της ευλογιάς. Οι πορφυρίνες έχουν αποδειχθεί ιοκτόνες *in vitro* και η ΦΔΘ με παράγωγα της βενζοπορφυρίνης έχει χρησιμοποιηθεί για την αποστείρωση αίματος και προϊόντων αίματος που πρόκειται να μεταγγιστούν και έχουν μολυνθεί από ιούς (Neyndorff 1990, North J 1992a, North J 1992b, North J 1993, Fisher AM 1995), ακόμη και από HIV (Grandadam M 1995). Απολύμανση παραγώγων αίματος από ιούς για

θεραπευτικούς σκοπούς έχει δοκιμαστεί επίσης με ΦΔΘ με μπλε του μεθυλενίου (Mohr H 1992, Tuite EM 1993). Απενεργοποίηση του ιού του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus-HSV) έχει επιτευχθεί *in vitro* (Lytle CD 1989) και *in vivo* (Smetana Z 1998) με φθαλοκυανίνες, ενώ η εφαρμογή ΦΔΘ με ALA μικραίνει τη διάρκεια εμφάνισης των φουσαλίδων και μειώνει τον τίτλο του HSV στις βλάβες (Smetana Z 1997).

Το HpD και το DHE (dihematorporphyrin ether) επιτυγχάνουν υποχώρηση των θηλωμάτων σε πειραματόζωα (Go PM 1990, Lofgren LA 1995, Shikowitz MJ 1986), ενώ το DHE προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των λαρυγγικών θηλωμάτων (Shikowitz MJ 1998, Abramson AL 1992, Shikowitz MJ 1992). Η τοπική ΦΔΘ με ALA έχει χρησιμοποιηθεί σε μολύνσεις από HPV. Οι περισσότερες μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με υποτροπιάζουσες μυρμηκίες (Stender IM 1999, Stender IM 1996, Stender IM 2000, Fabbrocini G 2001), μυρμηκιώδη επιδερμοδυσπλασία (Karrer S 1999) και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου της μήτρας σταδίου 1 και 2 (Wierrani F 1999) αναφέρουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Εξαιρεση αποτελεί η μελέτη του Ammann, στην οποία μόνο 1 από τους 6 ασθενείς με υποτροπιάζουσες μυρμηκίες ανταποκρίθηκε σε τοπική ΦΔΘ με ALA (Ammann R 1995b).

Κατά τη διάρκεια της ΦΔΘ μπορούν να προσβληθούν απευθείας διαφορετικοί στόχοι των ιών, όπως το έλυτρο και το νουκλεϊκό οξύ, με αποτέλεσμα απώλεια της μολυσματικότητας. Η ΦΔΘ ιών με μπλε του μεθυλενίου ή άλλους ετεροκυκλικούς φωτοευαισθητοποιητές οδηγεί σε αποικοδόμηση του DNA του ιού (Schnipper LE 1980, Specht KG 1994) με τη συμμετοχή μοριακού singlet οξυγόνου. Στη ΦΔΘ ιών με μεροκυανίνη 540, rose bengal ή παράγωγα της αιματοπορφυρίνης βλάπτονται οι δομές της επιφάνειας των ιών (Kadish LJ 1967, Lenard J 1993). Αυτή η βλάβη οδηγεί σε αναστολή των πρώιμων φάσεων του κύκλου ζωής του ιού, δηλαδή της προσκόλλησής του στο κύτταρο-ξενιστή και της διείσδυσής του μέσα σε αυτό.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

#### **ΦΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕ ΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ**

##### **1. Ασθενείς**

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν δερματικές βλάβες με κλινική εικόνα οξυτενών κονδυλωμάτων της περινεογεννητικής και περιπρωκτικής χώρας 15 ασθενών, οι οποίοι προσήλθαν στη Δερματολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Κρήτης (Stefanaki I 2001). Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν για τις συνθήκες της κλινικής μελέτης και δέχθηκαν να συμμετάσχουν σε αυτή.

Η ηλικία των ασθενών (14 άνδρες και 1 γυναίκα) κυμαινόταν από 19 έως 73 έτη, με μέσο όρο ηλικίας 34 έτη. Σε 10 ασθενείς οι βλάβες εντοπιζόνταν στην περιοχή του πέους, σε 3 άνδρες ασθενείς παρατηρούνταν περιπρωκτικά, σε 1 ασθενή στο όσχεο και στη γυναίκα εντοπιζόνταν στο αιδοίο (Πίνακας 1). Η χρονική διάρκεια των βλαβών ήταν 4 εβδομάδες έως 1 έτος, με μέση διάρκεια 5 μήνες. Τέσσερις ασθενείς είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε θεραπεία με κρυοπηξία ή ποδοφυλλίνη και παρουσίαζαν υποτροπιάζοντα κονδυλώματα. Κανένας από τους ασθενείς αυτούς δεν είχε λάβει αγωγή τους τελευταίους 3 μήνες.

Σε όλους τους ασθενείς διενεργήθηκε κλινικός και παρακλινικός έλεγχος για άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις απέβη αρνητικός.

##### **2. Χημική ουσία**

Χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα οξεικού οξέος (BDH) σε συγκέντρωση 5%.

**Πίνακας 1. Κλινικά στοιχεία ασθενών με οξυτενή κονδυλώματα πρωκτογεννητικής χώρας**

Φύλο	Ηλικία	Εντόπιση	Διάρκεια (σε μήνες)	Προηγηθείσα θεραπεία (υποτροπιάζουσα βλάβη)	Συνοδό αφροδίσιο νόσημα
1 A	27	Περπρωκτικά	8	—	—
2 Γ	19	Αιδοίο	2	—	—
3 A	73	Βάση πέους	12	—	—
4 A	21	Περιπρωκτικά	2	—	—
5 A	21	Πέος- είσοδος ουρήθρας	3	—	—
6 A	60	Βάλανος πέους	10	+	—
7 A	26	Περιπρωκτικά	8	+	—
8 A	27	Βάλανος πέους	5	+	—
9 A	56	Σώμα πέους	8	+	—
10 A	35	Σώμα πέους	1	—	—
11 A	27	Όσχεο	2	—	—
12 A	24	Σώμα πέους	5	—	—
13 A	30	Σώμα πέους	1	—	—
14 A	28	Σώμα πέους	5	—	—
15 A	36	Βάλανος πέους	3	—	—

A: Άνδρας

Γ: Γυναίκα

### 3. Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης

Η μόλυνση από HPV προκαλεί δομικές και/ή λειτουργικές αλλαγές στα κύτταρα. Η αλληλεπίδραση του οξεικού οξέος με τα διαφοροποιημένα αυτά στοιχεία οδηγεί σε προοδευτική και χρονικά αναστρέψιμη μεταβολή των ιδιοτήτων σκέδασης του φωτός του προσβεβλημένου ιστού. Το φαινόμενο αυτό γίνεται αντιληπτό ως παροδικό άσπρισμα των παθολογικών περιοχών μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ. Οι χωρικές και χρονικές μεταβολές που προκαλεί το οξεικό οξύ στις ιδιότητες σκέδασης του

προσβεβλημένου ιστού, παρέχουν τη δυνατότητα της ποσοτικής αξιολόγησης της κινητικής του φαινομένου. Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της διαγνωστικής μεθόδου, θα πρέπει αφενός να μεγιστοποιηθεί η διαφοροποίηση μεταξύ παθολογικού και φυσιολογικού ιστού και αφετέρου να εξαλειφθεί η επιφανειακή ανάκλαση, η οποία έχει παρόμοια φασματικά χαρακτηριστικά με τον ιστό που ασπρίζει (Balas CJ 2001).

Η ενίσχυση της διαφοροποίησης μεταξύ HPV-προσβεβλημένου και φυσιολογικού ιστού επιτυγχάνεται με την επιλογή κατάλληλης φασματικής περιοχής στην οποία καταγράφονται οι μεγαλύτερες διαφορές στα οπτικά τους χαρακτηριστικά. Όταν απεικονίζουμε σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 580nm, στην προσλαμβανόμενη απεικόνιση του ιστού λαμβάνουμε σημαντική οπισθοσκέδαση από το υποκείμενο δερματικό αγγειακό δίκτυο. Εάν αποκλείσουμε αυτή τη φασματική περιοχή, ο εν τω βάθει ιστός (δηλ. το χόριο και το υπόδερμα) παρουσιάζεται σκούρος στην προσλαμβανόμενη εικόνα, με αποτέλεσμα να διακρίνονται καλύτερα οι περιοχές που ασπρίζουν μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, έχει δειχθεί ότι τα  $550\pm 25\text{nm}$  αποτελούν τη βέλτιστη φασματική περιοχή απεικόνισης (Balas CJ 1999).

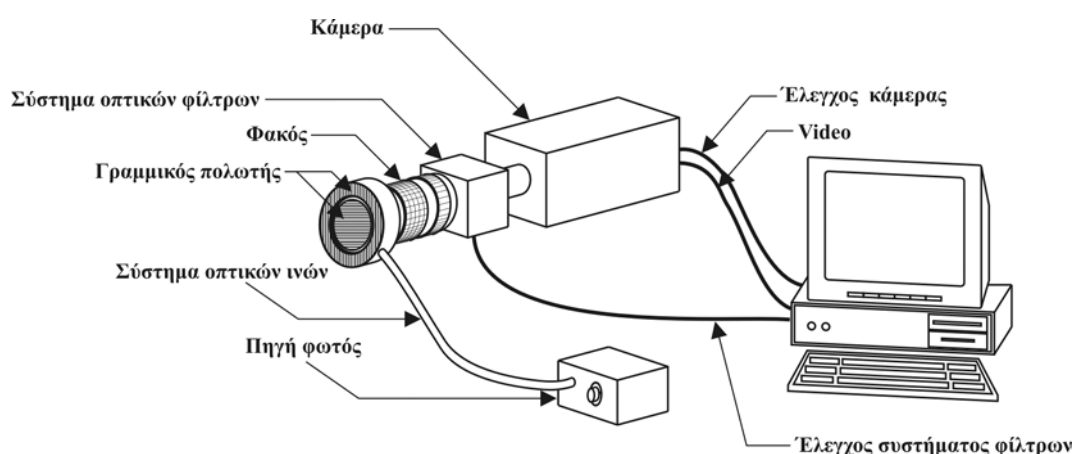
Η επιφανειακή ανάκλαση, η οποία εμποδίζει την οπτική εκτίμηση της κινητικής του ασπρίσματος, εξαλείφεται με τη χρήση δύο γραμμικών πολωτών, τοποθετώντας τους άξονες πόλωσής τους κάθετα μεταξύ τους. Ο πρώτος πολωτής είναι κυκλικός και συνδέεται στους φακούς της κάμερας, ενώ ο δεύτερος έχει σχήμα δακτυλίου και συνδέεται στο σύστημα οπτικών ινών που μεταφέρει το φως στον ιστό. Πιο συγκεκριμένα, εάν το προσπίπτον φως πολωθεί γραμμικά, τότε η συνιστώσα που ανακλάται από την επιφάνεια διατηρεί την πόλωση, ενώ η εκπεμπόμενη και οπισθοσκεδαζόμενη συνιστώσα αποκτά τυχαία πόλωση. Έτσι, τοποθετώντας τους άξονες εκπομπής των δύο πολωτών (imaging-illumination polarizers) κάθετα μεταξύ τους, το φως που ανακλάται από την επιφάνεια εξαλείφεται, ενώ λαμβάνεται η συνιστώσα του τυχαίως πολωμένου οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, η οποία πάλλεται προς την κατεύθυνση του άξονα εκπομπής του πολωτή, ο οποίος πολώνει το ανακλώμενο από τον ιστό φως που εισέρχεται στην κάμερα (imaging polarizer). Αυτό έχει σαν συνέπεια σημαντική ενίσχυση της οπτικής διαφοροποίησης μεταξύ των περιοχών που αλληλεπιδρούν με το οξεικό οξύ και εκείνων στους οποίους το οξεικό οξύ δεν προκαλεί καμία αλλαγή στα οπτικά τους χαρακτηριστικά.

Η ειδικότητα της κλινικής διάγνωσης αυξάνεται με την ποσοτική αξιολόγηση των χωρικών και χρονικών μεταβολών των ιδιοτήτων σκέδασης του φωτός του προσβεβλημένου ιστού. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικές απεικονίσεις της περιοχής



κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης οξείκου οξέος-ιστού και τον υπολογισμό στη συνέχεια της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (Intensity of Back-Scattered Light-IBSL) σε σχέση με το χρόνο, σε κάθε χωρικό σημείο της υπό εξέταση περιοχής.

Με βάση τις αρχές αυτές, το εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής και Απεικόνισης του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Ηρακλείου ανέπτυξε ένα πρωτότυπο Σύστημα Πολυφασματικής Απεικόνισης (Modular Imaging System) (Σχήμα 1). Το σύστημα περιλαμβάνει μία MegaPixel CMOS κάμερα. Η φασματική περιοχή απεικόνισης επιλέγεται μέσω ενός περιστρεφόμενου μηχανισμού φίλτρων, ο οποίος ελέγχεται από υπολογιστή, να επιτρέψει τη διέλευση φωτός με μήκος κύματος 550 nm και εύρος  $\pm 25$  nm. Το σήμα συλλέγεται από φακό zoom 18-108mm, εστιακής απόστασης  $f\#2.5$  με ηλεκτρονική ίριδα, με δυνατότητα ρύθμισης του οπτικού πεδίου και της μεγέθυνσης, ώστε να επιτυγχάνονται ιδανικές συνθήκες απεικόνισης. Ο φακός επιτρέπει μεταβολή στο πεδίο παρατήρησης από 12mm x 9mm μέχρι 71mm x 54mm. Το φως από την πηγή (λάμπα αλογόνου 250 W) μεταδίδεται στην επιφάνεια του ιστού μέσω ενός συστήματος μεταφοράς με οπτικές ίνες, το οποίο περιβάλλει την περιφέρεια των φακών. Ο γραμμικός πολωτής του προσπίπτοντος φωτός συνδέεται στον δακτύλιο οπτικών ινών, ενώ ο δεύτερος πολωτής τοποθετείται στον φακό zoom. Το οπτικό σήμα μεταφέρεται σε ένα υπολογιστή Pentium III (με 64 Mb RAM και κάρτα γραφικών 8 Mb video RAM) μέσω του πρωτοκόλλου μεταφοράς IEEE-1394 (fire wire), το οποίο υποστηρίζει ταχύτητες μεταφοράς δεδομένων έως 400Mb/s. Η παροχή ρεύματος και ο έλεγχος της κάμερας μέσω του υπολογιστή πραγματοποιούνται από το ίδιο πρωτόκολλο.



**Σχήμα 1:** Σύστημα Πολυφασματικής Απεικόνισης

Το λογισμικό που αναπτύχθηκε, γραμμένο σε γλώσσα C<sup>++</sup>, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της κάμερας και τη βαθμονόμηση των εικόνων που λαμβάνονται, καθώς και για την ανάλυση των εικόνων και των δεδομένων. Επιτρέπει επίσης την εμφάνιση των καμπυλών της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός (IBSL) σε σχέση με το χρόνο, από τις αποθηκευμένες εικόνες, για κάθε ένα εικονοστοιχείο (pixel) ή ομάδα εικονοστοιχείων μέσα στην υπό μελέτη περιοχή. Η επαναληψιμότητα στη μέτρηση της IBSL διασφαλίζεται με τη βοήθεια μίας διαδικασίας βαθμονόμησης, η οποία είναι ενσωματωμένη στο σύστημα και πραγματοποιείται πριν από κάθε μέτρηση. Η βαθμονόμηση για το μαύρο γίνεται με την ίριδα του φακού κλειστή. Για τη βαθμονόμηση στο λευκό, ένας ιδανικός λευκός ανακλαστήρας (Ba<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) τοποθετείται στην επιφάνεια και οι προσλαμβανόμενες εικόνες προβάλλονται στην οθόνη του υπολογιστή. Κατά την εκτέλεση του προγράμματος βαθμονόμησης, η ίριδα του φακού και ο χρόνος έκθεσης του οπτικού ανιχνευτή ρυθμίζονται αυτόματα, ώστε η μέση τιμή του γκριζου στην προβαλλόμενη εικόνα του δείγματος να γίνει 255, η οποία αντιστοιχεί στην τιμή που έχει στην κλίμακα του γκριζου ένα λευκό εικονοστοιχείο. Με αυτή τη ρύθμιση αξιοποιείται πλήρως η δυναμική περιοχή του συστήματος, ενώ παράλληλα αντισταθμίζονται πιθανές μεταβολές στην ένταση των εικόνων που οφείλονται σε πειραματικές συνθήκες, όπως μη σταθερός φωτισμός, διολίσθηση και ηλεκτρονικός θόρυβος. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας βαθμονόμησης, η εικόνα από τον ανακλαστήρα Ba<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη διόρθωση σκιάς των εικόνων του ιστού.

Το σύστημα επιτρέπει τη μελέτη των χωρικών και χρονικών μεταβολών που προκαλεί το οξεικό οξύ στις ιδιότητες σκέδασης φωτός του ιστού. Πριν την επάλειψη του ιστού με οξεικό οξύ, αποθηκεύεται μία εικόνα αναφοράς (που προέρχεται από το μέσο όρο τριών λαμβανόμενων εικόνων του ιστού), προκειμένου να μειωθεί οποιοδήποτε είδος θορύβου (μηχανικός ή περιβαλλοντικός). Μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ, η διαδικασία διαδοχικών απεικονίσεων επαναλαμβάνεται κάθε 1-3 min. Οι τιμές του γκριζου των εικονοστοιχείων κάθε αποθηκευμένης εικόνας αντιπροσωπεύουν την IBSL σε ένα δεδομένο χωρικό σημείο  $x, y$  της εικόνας, κατά τη χρονική στιγμή στην οποία έγινε η απεικόνιση. Κατ' αυτό τον τρόπο, όταν ολοκληρώνεται η διαδικασία των απεικονίσεων, οι καμπύλες της IBSL με το χρόνο μπορούν να υπολογιστούν αυτόματα από τα αποθηκευμένα δεδομένα και να προβληθούν για κάθε εικονοστοιχείο ή ομάδα εικονοστοιχείων της υπό μελέτη περιοχής.

#### **4. Κλινικές μετρήσεις**

Το σύστημα που περιγράφηκε, χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή και μελέτη των χωρικών και χρονικών μεταβολών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ, σε κάθε ασθενή και για επιλεγμένες περιοχές με βλάβες. Μετά την αποθήκευση της εικόνας αναφοράς, οι περιοχές αυτές καλύπτονταν με γάζα εμβαπτισμένη με οξεικό οξύ 5% και ξεκινούσε η διαδικασία των διαδοχικών απεικονίσεων. Απεικόνιση της επιλεγμένης προσβεβλημένης περιοχής γινόταν κάθε 1-3 min και κάθε φορά η γάζα απομακρυνόταν για περίπου 10 sec προκειμένου να αποκαλυφθεί η περιοχή. Παρατηρήθηκε ότι σε περιοχές που αντιστοιχούσαν σε βλάβες, οι τιμές της IBSL αυξάνονταν με το χρόνο φθάνοντας μία μέγιστη τιμή μετά από περίπου 30 min. Η μέγιστη αυτή τιμή διατηρούνταν για όσο χρόνο η γάζα ήταν σε επαφή με τον ιστό, γεγονός που αναπαριστάται ως plateau στις καμπύλες της IBSL με το χρόνο. Ακολούθως η γάζα απομακρυνόταν και η παρατήρηση και απεικόνιση της περιοχής συνεχιζόταν μέχρι ο προσβεβλημένος ιστός να ανακτήσει το αρχικό του χρώμα (σε περίπου 30 min). Κατά τη διάρκεια της παρατήρησης τρεις ασθενείς εμφάνισαν υποκλινικές βλάβες, δηλαδή περιοχές κλινικά υγιούς δέρματος κοντά σε κλινική βλάβη, οι οποίες παρουσίαζαν παροδικό άσπρισμα μετά από την επάλειψη με οξεικό οξύ. Όταν ολοκληρωνόταν η διαδικασία των απεικονίσεων, οι καμπύλες της IBSL με το χρόνο υπολογίζονταν αυτόματα από τις αποθηκευμένες εικόνες για κάθε ένα εικονοστοιχείο (pixel) ή ομάδα εικονοστοιχείων μέσα στην υπό εξέταση περιοχή. Επιπλέον, για κάθε εικονοστοιχείο προέκυπτε μία ποσοτική παράμετρος που αντιπροσώπευε το ολοκλήρωμα της αντίστοιχης καμπύλης της κινητικής της IBSL. Κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργούνταν μία νέα εικόνα, η οποία είχε ως τιμές εικονοστοιχείων τις τιμές των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν. Η εικόνα αυτή παρέχει τη δυνατότητα χαρτογράφησης του μεγέθους των μεταβολών που προκαλεί ο HPV, οι οποίες αναμένεται να συσχετίζονται με το βαθμό της μόλυνσης.

#### **5. Υλικό βιοψιών**

Μετά την αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού λαμβάνονταν βιοψίες, αφού προηγουμένως γινόταν τοπική αναισθησία με ξυλοκαΐνη 2% (Astra, Sweden). Από κάθε ασθενή λαμβανόταν ένα τεμάχιο, διαμέτρου περίπου 5-7 mm, από κλινική βλάβη. Μία επιπλέον βιοψία ελήφθη από τους τρεις ασθενείς που παρουσίασαν υποκλινικές βλάβες, από τα σημεία που ανέδειξε η παρατήρηση με το οξεικό οξύ. Κάθε τεμάχιο μονιμοποιούνταν σε φορμόλη 10% και τοποθετούνταν σε παραφίνη. Ακολουθούσε ιστολογική εξέταση όλων των ιστοτεμαχίων με χρώση

αιματοξυλίνης-εωσίνης σε τομές παραφίνης, για επιβεβαίωση της διάγνωσης και ιστολογική ταξινόμηση, ενώ γινόταν και ανίχνευση HPV DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).

## **6. Ιστολογική ταξινόμηση**

Η ιστολογική εξέταση κατέτασσε τις βλάβες σε 4 κατηγορίες σύμφωνα με τα εξής κριτήρια: 1) Τυπικά κονδυλώματα: υπερπλασία της επιδερμίδας, ακάνθωση, υπερκεράτωση, παρακεράτωση και κοιλοκύτταρα, 2) Ύποπτες: όλα τα παραπάνω εκτός από τη χαρακτηριστική για τα κονδυλώματα ποικιλία στο σχήμα και το χρώμα του πυρήνα, 3) Αρνητικές για κονδυλώματα: ήπια επιδερμική υπερπλασία και ακάνθωση, 4) Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (SCC).

## **7 Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction-PCR)**

### **7.1 Γενικά**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR) αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη εξέλιξη στην τεχνολογία του μοριακού υβριδισμού (Saiki RK 1988). Πρόκειται για μία *in vitro* τεχνική διπλασιασμού του DNA που αναπτύχθηκε το 1985 (Saiki RK 1985). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει σε σύντομο χρονικό διάστημα (2-3 ώρες) την εκλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA με εκθετικό τρόπο, κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής αντίδρασης.

Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης PCR είναι το DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα, η DNA πολυμεράση, τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), οι εκκινητές (primers) και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνθεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), χρησιμοποιώντας ως μήτρα την μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί, οπότε προσδένονται σε αυτές.

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση προερχόμενη από θερμόφιλα βακτήρια, μείγμα dNTPs και ζεύγος εκκινητών. Αρχικά επιτυγχάνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 92°C-95°C για 2-5 min. Ακολουθεί ένα στάδιο σε χαμηλότερη θερμοκρασία (40-70°C) κατά το οποίο οι εκκινητές υβριδίζονται με τη συμπληρωματική αλληλουχία

του αντίστοιχου κλώνου DNA και ένα τρίτο στάδιο στους 68°C-72°C για 30sec έως 2min, στο οποίο γίνεται προσθήκη από την DNA πολυμεράση δεσοξυριβονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλυσίδας. Επαναλαμβάνονται 25-40 κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει αποδιάταξη του DNA, υβριδισμό των εκκινητών και πολυμερισμό. Ακολούθως επιτελείται και ένα τελικό στάδιο πολυμερισμού για 5-10min στους 72°C, ώστε όλα τα νεοσυντιθέμενα μόρια να επεκταθούν πλήρως. Τελικά επιτυγχάνεται εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση:  $N = n(1+e)^c$ , όπου N= η τελική ποσότητα του προϊόντος, n= η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e= η απόδοση της αντίδρασης και c= ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis KB 1987).

Η τεχνική είναι τόσο ευαίσθητη ώστε απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού, στην οποία περιλαμβάνονται πολύ μικρές ποσότητες DNA, οι οποίες δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με άλλες τεχνικές υβριδισμού (McDonnell JM 1989). Θεωρητικά είναι δυνατή η ανίχνευση ενός και μόνο μορίου DNA, ενώ το αρχικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτείται για άλλες τεχνικές (όπως Southern και in situ υβριδισμός). Η εξαιρετική ευαισθησία της μεθόδου, η οποία αποτελεί και το μεγαλύτερο πλεονέκτημά της, ενέχει τον κίνδυνο ψευδώς θετικών αντιδράσεων. Μόλυνση από παρακείμενα σωληνάρια, μολυσμένοι εκκινητές ή μόλυνση από πλασμίδια DNA μέσα στο χώρο του εργαστηρίου μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ειδικά στην περίπτωση που μελετάμε γονιδίωμα ιού, υπάρχει κίνδυνος λανθασμένης ανίχνευσης ή τυποποίησης του ιού (Crum CP 1986). Αυτές οι ανεπιθύμητες επιπτώσεις μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την προσεκτική εφαρμογή της διαδικασίας και με τη χρήση κατάλληλων αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (Young LS 1989).

## **7.2 Παράμετροι της PCR**

### A) Εκκινητές και θερμοκρασία υβριδισμού τους

Η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω από την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε, είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των δύο εκκινητών, οι οποίοι εξασφαλίζουν και την ειδικότητα της αντίδρασης. Συνήθως οι εκκινητές κατασκευάζονται έτσι ώστε να έχουν πλήρη ομολογία με την αλληλουχία-στόχο. Το μήκος των εκκινητών είναι στις περισσότερες περιπτώσεις 20-30 βάσεις, ώστε να ελαττώνεται στατιστικά η πιθανότητα υβριδισμού τους με άλλες περιοχές του γονιδιώματος και να μην δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές. Σε ορισμένες

περιπτώσεις, όπως στην ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) που θέλουμε να εισαγάγουμε μία διαφορετική βάση για τη δημιουργία μίας τεχνητής θέσης περιορισμού, οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να μην παρουσιάζουν πλήρη ομολογία με την αλληλουχία- στόχο.

Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών  $T_m$  είναι πολύ σημαντικός ώστε να επιτυγχάνεται ικανοποιητική απόδοση και ευαισθησία του υβριδισμού. Η πιο απλή εξίσωση υπολογισμού των θερμοκρασιών είναι η εξής: (αριθμός των βάσεων A+T)  $\times$  2°C + (αριθμός των βάσεων C+G)  $\times$  4°C, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκκινητές με μήκος ως 20 βάσεις (Suggs SV 1981).

#### B) Συγκέντρωση ιόντων $Mg^{2+}$ και dNTPs, ρυθμιστικά διαλύματα

Η συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$  στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης κυμαίνεται από 0.5 ως 3mM. Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Μικρές συγκεντρώσεις ελαττώνουν την απόδοση της PCR αντίδρασης, ενώ μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνουν την ειδικότητά της. Η συγκέντρωση των dNTPs που απαιτούνται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού κυμαίνεται από 100 ως 200  $\mu$ M.

Στα πειράματα που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ρυθμιστικό διάλυμα (10X): 200 mM Tris-HCl, pH 8.4 με 500 mM KCl.

### **7.3 Εκχύλιση DNA**

Χρησιμοποιήθηκαν 6-7 τομές πάχους 10  $\mu$ m από κάθε ιστό μονιμοποιημένο με φορμαλδεΐδη και εγκλεισμένο σε παραφίνη. Οι τομές τοποθετούνταν σε σωλήνα erpendorf και η παραφίνη απομακρυνόταν με την προσθήκη 1 ml ξυλόλης. Ακολουθούσε προσθήκη 1 ml αιθανόλης για την απομάκρυνση της ξυλόλης και στη συνέχεια προσθήκη του ακόλουθου διαλύματος λύσης: 150 mM NaCl, 400 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM EDTA, 1% SDS και 10 $\mu$ g/ml πρωτεΐνάση K. Τα δείγματα επωάζονταν στους 60°C για 48 ώρες, ενώ γινόταν προσθήκη πρωτεΐνάσης K τρεις φορές ημερησίως. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών γινόταν με εκχύλιση των δειγμάτων με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Στην υδατική φάση προστίθονταν 20  $\mu$ l 5M NaCl και 1 ml απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Ακολουθούσε επανάκτηση του DNA με φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 15 min στους 4°C, πλύσιμο με ψυχρή αιθανόλη 70% και επαναδιάλυση σε 50  $\mu$ l δις-απεσταγμένου ύδατος.

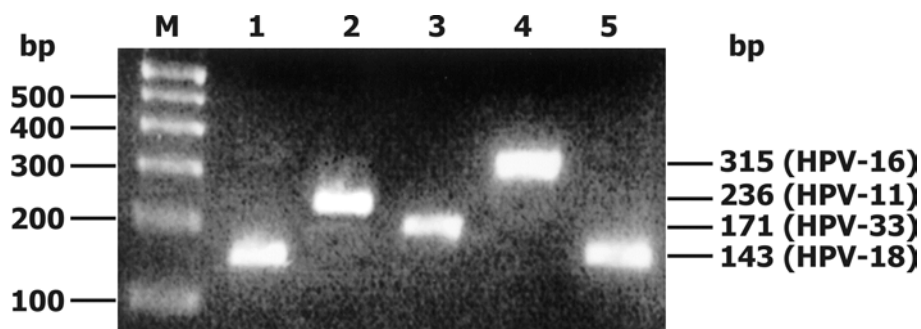
#### 7.4 Συνθήκες αντιδράσεων PCR

1 μl από το εκχειλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 200 μM από κάθε dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM από κάθε εκκινητή και 1.25 U Taq πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του DNA ως έλεγχος για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση (blanc samples). Το μείγμα προεπωάζεται για 1 min στους 95°C και ακολουθούν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

A) β-σφαιρίνη: Σε κάθε PCR αντίδραση για τον έλεγχο της ακεραιότητας του DNA και της επιτυχίας της αντίδρασης χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας η β-σφαιρίνη, η οποία έχει υψηλή και σταθερή έκφραση σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα δείγματα ελέγχονται με ενίσχυση μιας περιοχής 123 bp του γονιδίου της β-σφαιρίνης, κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: 94°C για 50 sec, 56°C για 40 sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας το χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο.

B) HPV: Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι "γενικοί" εκκινητές GP5 και GP6 (Snijders PJ 1990a, Snijders PJ 1990b), οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με μία συντηρητική περιοχή του L1 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) των τύπων 6, 11, 16, 18, 31 και 33 του HPV, ενώ με αρκετές διαφορές στην συμπληρωματικότητα των εκκινητών μπορούν να ενισχυθούν οι τύποι: 1a, 5 και 8 οι οποίοι όμως δεν απαντώνται σε βλάβες κονδυλωμάτων. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας τους "γενικούς" εκκινητές είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 52°C για 45 sec και 72°C για 45 sec, αυξάνοντας το χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος 139-145 bp ανάλογα με τον τύπο του ιού και αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η διάκριση των παραπάνω τύπων του HPV γίνεται στη συνέχεια με πέψη των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση RsaI (Snijders PJ 1990). Επίσης η ανίχνευση των τύπων 11, 16 18 και 33 του ιού γίνεται και με ένα "ταυτόχρονο" (multiplex) PCR, στο οποίο συνυπάρχουν "ειδικοί" εκκινητές για τον κάθε τύπο ιού, ενισχύοντας τμήματα DNA διαφορετικού μήκους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν πλήρη ομολογία με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του όψιμου γονιδίου E6 κάθε τύπου HPV (Arends MJ 1991). Οι συνθήκες ενίσχυσης χρησιμοποιώντας τους "ειδικούς" εκκινητές είναι οι εξής: 94°C για 1 min, 56°C για 50 sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας το χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Τα προϊόντα της PCR αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 1). Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας της αντίδρασης

χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες τα πλασμίδια που φέρουν το DNA των HPV11, 16, 18 και 33. Σε κάθε αντίδραση επιτελείται και ένα τελικό στάδιο πολυμερισμού στους 72°C για 7min.



**Εικόνα 1:** Τυποποίηση των ιών HPV με multiplex PCR. Η ηλεκτροφορητική στήλη Μ αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακού βάρους 100 bp. Οι στήλες 1 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον HPV18, η στήλη 2 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV11, η στήλη 3 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV33 και η στήλη 4 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV16.

### 7.5 Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Για την εύρεση του τύπου του HPV χρησιμοποιώντας τους “γενικούς” εκκινητές, μέρος των προϊόντων της PCR (30 μl από κάθε προϊόν) υφίσταται πέψη με 40 U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης RsaI, οπότε προκύπτουν τμήματα DNA διαφορετικού μήκους για τον κάθε τύπο (Πίνακας 3). Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% (Εικόνα 2).

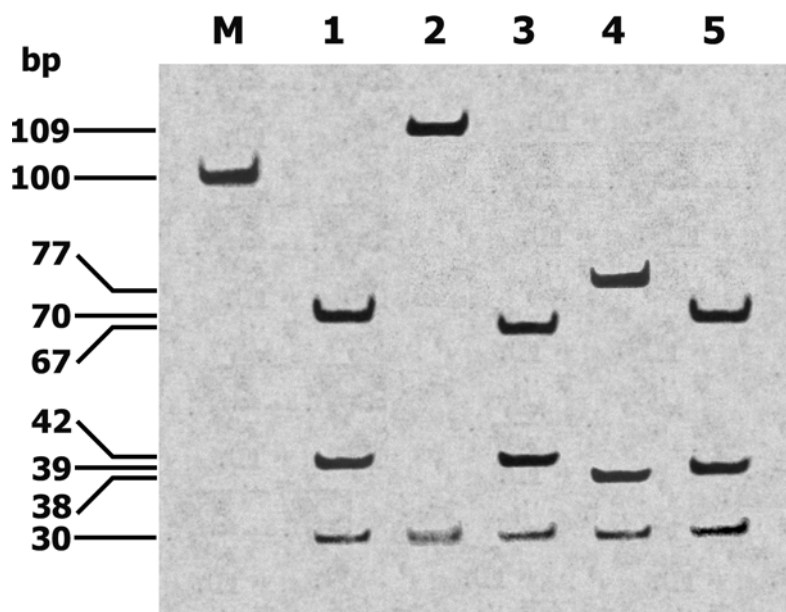
### 7.6 Ηλεκτροφόρηση DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου, ανάλογα με το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και τη διακριτική ικανότητα που προσδοκάται να επιτευχθεί. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (19:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου) επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους.

Και οι δύο τύποι πήκτωμάτων σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1X TBE ρυθμιστικό διάλυμα (0.09M Tris-HCl, 0.09M βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3).



Η πήξη επιτυγχάνεται για την αгарόζη με στερεοποίησή της με την πτώση θερμοκρασίας, ενώ για το ακρυλαμίδιο με την προσθήκη 50 μl τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνης (TEMED) και 160 μl υπερθειικού αμμωνίου 25% για κάθε 65 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου. Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.



**Εικόνα 2:** Τυποποίηση των ιών HPV με RFLP. Η ηλεκτροφορητική στήλη M αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακού βάρους 100 bp. Η στήλη 1 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV16, η στήλη 2 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV11, η στήλη 3 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV6, η στήλη 4 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV18 και η στήλη 5 αντιστοιχεί σε δείγμα που εμφανίζει τον HPV33.

## 7.7 Χρώση νουκλεϊκών οξέων

### A) Χρώση με βρωμιούχο εθίδιο

Κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο 10 mg/ml. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία.

## B) Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται αρχικά υπό ανάδευση για 10-15 min σε μονιμοποιητικό διάλυμα που περιέχει 10% απόλυτη αιθανόλη και 5% οξικό οξύ. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0.1% (w/v) για 15-20 min σε ημίφως, πλύσιμο με νερό και κατόπιν προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης που περιέχει 0.4 N NaOH και 0.15% (v/v) φορμαλδεΐδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 0.75% (w/v).

### **7.8 Εταιρίες προέλευσης των υλικών**

1,2-διυδροξυ-αιθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο- Sigma

Αγαρόζη- Gibco BRL

Αιθανόλη- Merck

Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ- Sigma

Ακρυλαμίδιο- Gibco BRL

Ανθρακικό νάτριο- Sigma

Βορικό οξύ- Sigma

Βρωμιούχο εθίδιο- Sigma

Γλυκερόλη- Gibco BRL

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια- Gibco BRL

Περιοριστικά ένζυμα- New England Biolabs/Gibco BRL

Ισοπροπανόλη- Merck

Κυανό της βρωμοφαινόλης- Sigma

Κυανό του ξυλενίου- Sigma

Νιτρικός άργυρος- Sigma

Οξικό οξύ- BDH

Πρωτεΐνάση K- Gibco BRL

SDS- Sigma

Ταq πολυμεράση- Gibco BRL

TEMED- Sigma

Trisma base- Sigma

Tris-HCL- Sigma

Triton-X-100-Sigma

Υδροξείδιο του νατρίου- Sigma

Υδροχλωρικό οξύ- BDH

Υπερθειικό αμμώνιο- Gibco BRL

Φαινόλη- Gibco BRL

Φορμαλδεΐδη- BDH

Φορμαμίδιο- Gibco BRL

Χλωριούχο κάλιο- Sigma

Χλωριούχο μαγνήσιο- Sigma

Χλωριούχο νάτριο- Sigma

Χλωροφόρμιο- Fluka

**Πίνακας 2. Εκκινητές, συνθήκες PCR και προϊόντα PCR για την ανίχνευση HPV.**

Τύπος HPV	Εκκινητές	Συνθήκες PCR	PCR προϊόν (bp)
<b>HPV γενικά</b>	5-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3 (GP5) 5-GAAAAATAAATTGTAAATCA-3 (GP6)	94°C για 50s (αποδιάταξη) 52°C για 45s (υβριδισμός) 72°C για 45s (πολυμερισμός)	139-145 bp ανάλογα με τον τύπο HPV
<b>HPV MULTIPLEX</b>			
HPV11	5-TGTGTGGCGAGACAACCTTTC CCTT-3 (HPV11S) 5-TGGTTATTTAGTTTTATGAA GCGTGCCTTTCCC-3 (HPV11A)		HPV11 236 bp
HPV16	5-CTGCAAGCAACAGTACTGCG ACG-3 (HPV16S) 5-CATACATCGACCGGTCCACC-3 (HPV16A)	94°C για 60s (αποδιάταξη) 56°C για 50s (υβριδισμός) 72°C για 50s (πολυμερισμός)	HPV16 315bp
HPV18	5-AAACTAACTAACAACCTGGTTAT ACA-3 (HPV18S) 5-ATGGCACTGGCCTCTATAGT-3 (HPV18A)		HPV18 143bp
HPV33	5-AACAGTTAAAAACCTTTAAA-3 (HPV33S) 5-AGTTTCTCTACGTCGGGAC CTC-3 (HPV33A)		HPV33 171bp

S: Sense primer

A: Antisense primer

**Πίνακας 3. Μεγέθη των προϊόντων της RFLP μετά από ενίσχυση του HPV με τους “γενικούς” εκκινητές.**

<b>Τύπος HPV</b>	<b>Συνολικό μήκος (bp)</b>	<b>Μήκος προϊόντων της RFLP</b>
HPV-6	139	67/42/30
HPV-11	139	109/30
HPV-16	142	70/42/30
HPV-18	145	77/38/30
HPV-31	142	112/30
HPV-33	139	70/39/30

## **8. Αποτελέσματα**

### **8.1 Ιστολογική εξέταση**

Από τις 15 βιοψίες που ελήφθησαν από κλινικές βλάβες, οι 9 (60%) είχαν ιστολογικά χαρακτηριστικά τυπικού κονδυλώματος, 4 (26.6%) ήταν ύποπτες, ενώ 2 (13.3%) ήταν συμβατές με διηθητικό SCC πέους αναπτυσσόμενο σε κονδυλώματα. Οι τρεις υποκλινικές βλάβες ταξινομήθηκαν ως αρνητικές για κονδυλώματα.

### **8.2 Ανίχνευση και τυποποίηση του HPV**

HPV DNA με την τεχνική της PCR βρέθηκε στο 88.9% των ιστοτεμαχίων. HPV DNA ανιχνεύθηκε στο 100% (9/9) των βλαβών με ιστολογική εικόνα τυπικών κονδυλωμάτων. Στις ύποπτες ιστολογικά βλάβες HPV DNA απομονώθηκε στο 75% (3/4), ενώ στις αρνητικές για κονδυλώματα βλάβες (υποκλινικές) ανιχνεύθηκε στο 66.6% (2/3). Και οι δύο βλάβες SCC ήταν θετικές για HPV DNA.

Η κατανομή των HPV τύπων στις διάφορες ιστολογικές κατηγορίες καταγράφεται στον Πίνακα 4. Από τα 16 δείγματα στα οποία βρέθηκε ο ιός, τα 10 (62.5%) είχαν μόλυνση από ένα τύπο, ενώ τα 6 (37.5%) είχαν ταυτόχρονη μόλυνση από δύο τύπους. Στα τυπικά κονδυλώματα, οι HPV τύποι που ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα ήταν οι 6 και 11. Στις ύποπτες βλάβες, οι HPV τύποι 6 και 11 απομονώθηκαν το ίδιο συχνά με τον HPV18, ενώ στις βλάβες οι οποίες ιστολογικά ήταν αρνητικές για κονδυλώματα οι HPV τύποι 6 και 18 βρέθηκαν εξίσου. Και στις δύο βιοψίες από SCC πέους ανιχνεύθηκε ο HPV16. Είναι ενδιαφέρον ότι οι «υψηλού κινδύνου για κακοήθεια» HPV τύποι 16 και 18 και ο «ενδιάμεσου κινδύνου» HPV33 απομονώθηκαν από το 66.6% των δειγμάτων.

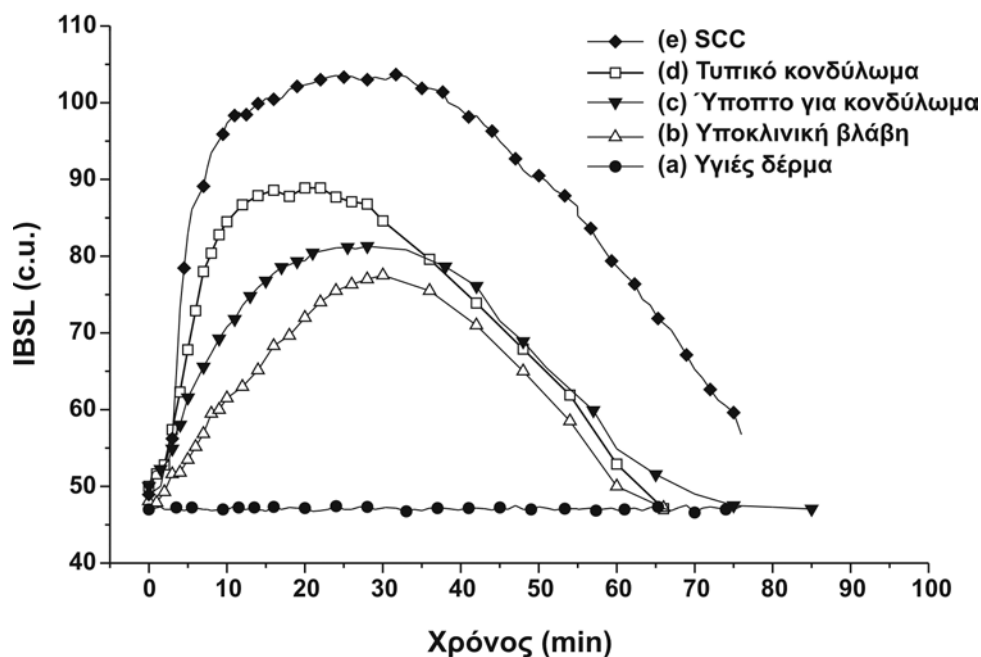
**Πίνακας 4. Τυποποίηση του HPV σε δείγματα από βλάβες πρωκτογεννητικής χώρας με ανάλυση PCR.**

Ιστολογία	Αριθμός βιοψιών	HPV (+)	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 33
Αρνητικά για κονδυλώματα	3	2	1	–	–	1	–
Ύποπτα	4	3*	1	1	–	2	–
Τυπικά κονδυλώματα	9	9*	4	3	–	6	1
SCC	2	2	–	–	2	–	–
Σύνολο (%)	18	16 (88.9%)	6 (33.3%)	4 (22.2%)	2 (11.1%)	9 (50.0%)	1 (5.5%)

\*Ταυτόχρονη λοίμωξη σε 5 δείγματα με ιστολογική εικόνα τυπικών κονδυλωμάτων (3 δείγματα με μόλυνση από τους τύπους 6 και 18, 1 με μόλυνση από τους τύπους 11 και 18, 1 από τους τύπους 11 και 33) και σε 1 δείγμα ιστολογικά ύποπτο (από τους τύπους 6 και 18).

### 8.3 Αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού

Οι καμπύλες της IBSL με το χρόνο που αντιστοιχούσαν σε κάθε βλάβη, ταξινομήθηκαν σύμφωνα την ιστολογική διάγνωση. Οι καμπύλες από κάθε ιστολογική κατηγορία εμφανίζουν ομοιότητα στο σχήμα τους σε σύγκριση με καμπύλες άλλων κατηγοριών. Το Σχήμα 2 παρουσιάζει χαρακτηριστικές καμπύλες της IBSL σε σχέση με το χρόνο που προέρχονται από φυσιολογικό δέρμα (a), υποκλινική βλάβη (b), βλάβη ύποπτη για κονδύλωμα (c), τυπικό κονδύλωμα (d) και SCC (e).



**Σχήμα 2:** Χαρακτηριστικές καμπύλες της IBSL σε σχέση με το χρόνο σε c.u. (calibrated units) που προέρχονται από φυσιολογικό δέρμα, υποκλινική βλάβη, βλάβη ύποπτη για κονδύλωμα, τυπικό κονδύλωμα και SCC πέους αναπτυσσόμενο σε κονδύλωμα.

Στο φυσιολογικό δέρμα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση της IBSL μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ. Αντίθετα, σε όλες τις παθολογικές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια της παρατήρησης σημειώνονται σημαντικές διαφοροποιήσεις, με κοινά χαρακτηριστικά την σχετικά γρήγορη αύξηση των τιμών της IBSL, η οποία ακολουθείται από βραδύτερη μείωση προσεγγίζοντας τις αρχικές της τιμές. Προτείνεται ότι το σχήμα αυτών των καμπυλών καταδεικνύει το βαθμό διαφοροποίησης του προσβεβλημένου ιστού.

Είναι προτιμότερο οι διαφοροποιήσεις στα χαρακτηριστικά των κινητικών να εκφράζονται με ποσοτικούς δείκτες που προκύπτουν από τις καμπύλες. Αυτό προϋποθέτει τον καθορισμό μίας παραμέτρου, η οποία εκφράζει πειραματική πληροφορία και ταυτόχρονα προέρχεται από τις σταθερές της κινητικής. Υιοθετήσαμε ως την πιο κατάλληλη παράμετρο, που περιλαμβάνει πληροφορία τόσο για το μέγεθος όσο και για τη διάρκεια των επαγόμενων μεταβολών, την περιοχή που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης  $IBSL(t)$  και της ευθείας γραμμής  $IBSL(t=0)$ , όπου  $IBSL(t=0)$  είναι η τιμή της IBSL πριν την επάλειψη με οξεικό οξύ. Αυτή η περιοχή

συσχετίζεται με τον ολικό αριθμό των επιπλέον οπισθοσκεδαζόμενων φωτονίων, μέσα στα χωρικά και φασματικά πλαίσια που καθορίζει η πειραματική διαδικασία, λόγω της διαφοροποίησης που προκαλεί το οξεικό οξύ στις ιδιότητες σκέδασης του ιστού.

Η παράμετρος αυτή ορίστηκε ως ATR (Acetowhite Tissue Response) και υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τον τύπο:

$$ATR = \int \Delta_{IBSL}(t) dt \quad (1)$$

$$\text{Όπου } \Delta_{IBSL}(t) = IBSL(t) - IBSL(t=0) \quad (2)$$

Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση της ATR σε κάθε βλάβη. Η Εικόνα 3 παρουσιάζει τη βάλανο ενός ασθενούς με τυπικό κονδύλωμα (I) και υποκλινική βλάβη (II). Η λήψη των έγχρωμων εικόνων (a), (b) έγινε σε ευρεία φασματική περιοχή (400-700nm, δηλαδή στο ορατό φως), πριν και μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ αντίστοιχα. Οι εικόνες (c), (d) ελήφθησαν στα  $550 \pm 25$  nm με εξάλειψη της επιφανειακής ανάκλασης, πριν και μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ αντίστοιχα. Αυτές οι εικόνες επιτρέπουν τη μεγιστοποίηση της οπτικής διαφοροποίησης μεταξύ υγιούς και παθολογικού ιστού. Η εικόνα (e) παρουσιάζει την ίδια περιοχή χαρτογραφημένη με ψευδοχρώματα.

Η απεικόνιση της χωρικής και χρονικής μεταβολής του ασπρίσματος που προκαλεί η εφαρμογή του οξεικού οξέος στην περιοχή της βλάβης με χρήση ψευδοχρωμάτων, είναι ένας άλλος τρόπος παρουσίασής της. Η βασική ιδέα προέρχεται από το γεγονός ότι κάθε εικόνα συνίσταται από ένα μεγάλο αριθμό επιμέρους εικονοστοιχείων (pixels) καθένα από τα οποία απεικονίζει αντίστοιχη περιοχή της βλάβης και η οποία πιθανότατα χαρακτηρίζεται από διαφορετική κινητική. Μία από τις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την κινητική κάποιας καμπύλης είναι το ATR. Η αναπαράσταση επομένως της βλάβης με ψευδόχρωμα που ανήκει σε μια χρωματική κλίμακα που εκτείνεται από το μαύρο μέχρι το άσπρο, σχετίζεται με την τιμή της παραμέτρου ATR. Δηλαδή σε κάθε εικονοστοιχείο αντιστοιχεί ένα και μόνο χρώμα από τον ήδη προκαθορισμένο χρωματικό κώδικα. Αντίστροφα, κάθε χρώμα υποδεικνύει συγκεκριμένη τιμή για το ATR. Αναφέρεται ενδεικτικά ότι τα εικονοστοιχεία με το μικρότερο ATR (δηλαδή σημεία που η IBSL παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη στη διάρκεια της μέτρησης) απεικονίζονται με μαύρο χρώμα (αντιστοιχεί στο 0) και εκείνα με μέγιστο ATR με άσπρο (αντιστοιχεί

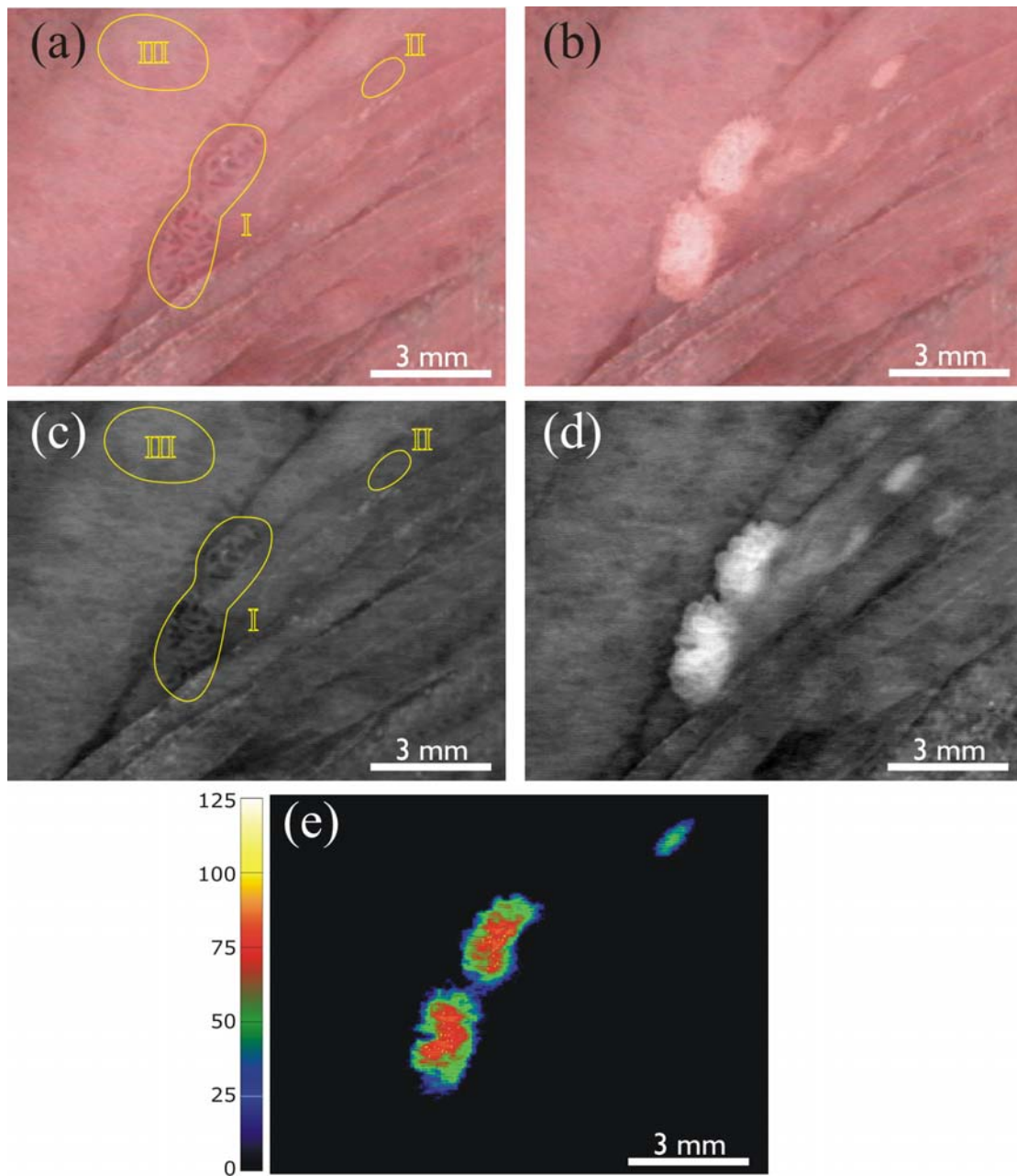
στο 125). Τα άλλα εικονοστοιχεία με ενδιάμεσες τιμές απεικονίζονται με τα υπόλοιπα χρώματα, μπλε, πράσινο, κόκκινο, κίτρινο, άσπρο με αυξανόμενη τιμή για το ATR.

Η απεικόνιση με ψευδοχρώματα επιτρέπει πιο ακριβή εντόπιση και περιγραφή των ορίων της βλάβης, καθώς παρέχει βελτιωμένη πληροφορία για το βαθμό των προκαλούμενων διαφοροποιήσεων σε κάθε εικονοστοιχείο της υπό εξέταση περιοχής. Η χωρική κατανομή αυτών των διαφοροποιήσεων, που χαρτογραφείται με διαφορετικά χρώματα, ίσως αντιπροσωπεύει διαφορετικό βαθμό HPV-μόλυνσης και στην περίπτωση του SCC που αναπτύσσεται σε κονδύλωμα (Εικόνα 4) αποκαλύπτει τις περιοχές με κακοήθεια.

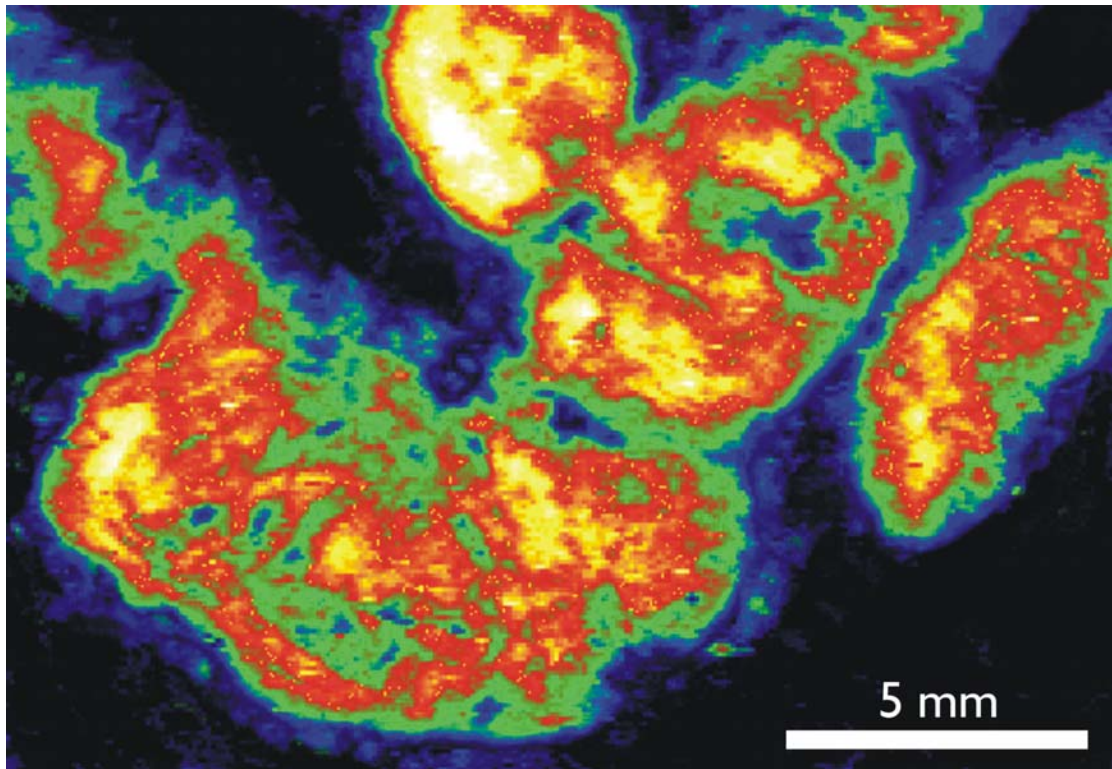
**Πίνακας 5.** Οι διαφορές στο βαθμό της HPV-μόλυνσης, όπως ορίζονται ιστολογικά, καταδεικνύονται σαφώς από την *in vivo* προσδιοριζόμενη ATR, η οποία προκύπτει από την κινητική της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού.

	ATR		Αριθμός βιοψιών
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	
Αρνητικά για κονδυλώματα	13.8	3.9	3
Υποπτες βλάβες	26.1	6.8	4
Τυπικά κονδυλώματα	33.5	7.8	9
SCC	99.9	23.2	2





**Εικόνα 3:** (a,b): Έγχρωμες εικόνες από τυπικό κονδύλωμα (I), υποκλινική βλάβη (II) και υγιές δέρμα (III). (c,d): Εικόνες του ίδιου ιστού στα  $550\pm 25$  nm με εξάλειψη της επιφανειακής ανάκλασης. Οι εικόνες a και c ελήφθησαν πριν την επάλειψη με οξεικό οξύ, ενώ οι εικόνες b και d μετά την επάλειψη με οξεικό οξύ. Η εικόνα e απεικονίζει τις παθολογικές περιοχές με ψευδοχρώματα.



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση με ψευδοχρώματα SCC πέους αναπτυσσόμενο σε κονδύλωμα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

#### 1. Ασθενείς

Μελετήθηκαν 14 ασθενείς με κλινική διάγνωση οξυτενών κονδυλωμάτων πέους, οι οποίοι προσήλθαν στη Δερματολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Κρήτης. Οι ασθενείς ήταν άνδρες ηλικίας 20 έως 60 ετών, με μέσο όρο ηλικίας 30 έτη. Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν για τις συνθήκες της κλινικής μελέτης και δέχθηκαν να συμμετάσχουν σε αυτή.

Οι ασθενείς με κλινική διάγνωση οξυτενών κονδυλωμάτων παρουσίαζαν τουλάχιστον 2 βλάβες. Η χρονική διάρκεια των βλαβών κυμαινόταν από 2 έως 10 μήνες με μέση διάρκεια 4.5 μήνες (Πίνακας 1). Επτά ασθενείς είχαν λάβει στο παρελθόν θεραπεία με κρυοπηξία ή ποδοφυλλίνη και εμφάνιζαν υποτροπιάζοντα κονδυλώματα. Καμία βλάβη δεν είχε υποβληθεί σε αγωγή τους τελευταίους 3 μήνες. Σε όλους τους ασθενείς διενεργήθηκε κλινικός και παρακλινικός έλεγχος για άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, ο οποίος σε όλες τις περιπτώσεις απέβη αρνητικός.

#### 2. Φωτοευαισθητοποιητής

Χρησιμοποιήθηκε δ-αμινολεβουλικό οξύ (ALA, Sigma Co., St. Louis) πυκνότητας 20% σε έκδοχο cold cream o/w.

#### 3. Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης της κινητικής του φθορισμού

Για τη μελέτη της κινητικής του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού. Η διέγερση του φωτοευαισθητοποιητή γινόταν με φως μήκους κύματος  $425 \pm 20$  nm που προερχόταν από λάμπα ξένου (Xe) 300 Watt, ενώ η ανίχνευση του παραγόμενου φθορισμού γινόταν στα  $650 \pm 30$  nm (περιοχή κόκκινου) με την επιλογή του αντίστοιχου οπτικού φίλτρου μπροστά από την κάμερα.

### **Πίνακας 1. Κλινικά στοιχεία ασθενών**

<b>Ασθενής</b>	<b>Ηλικία</b>	<b>Εντόπιση</b>	<b>Διάρκεια (σε μήνες)</b>	<b>Προηγηθείσα θεραπεία (υποτροπιάζουσα βλάβη)</b>
1	28	Σώμα πέους	5	—
2	26	Σώμα πέους	3	—
3	24	Βάλανος πέους	3	—
4	32	Ακροποσθία	10	+
5	29	Ακροποσθία	6	+
6	21	Σώμα πέους	3	+
7	20	Σώμα πέους	2	—
8	35	Βάλανος πέους	2	—
9	32	Ακροποσθία	3	—
10	27	Βάλανος πέους	5	+
11	28	Βάλανος πέους	4	+
12	25	Σώμα πέους	4	+
13	35	Βάλανος πέους	3	—
14	60	Βάλανος πέους	10	+

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσοτική εκτίμηση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού, όπως η μη γραμμική εκπομπή σε όλη την έκταση της φασματικής περιοχής του απεικονιστικού μονοχρωμάτορα και των φίλτρων διέγερσης που χρησιμοποιούνται, καθώς και η εξάρτηση της κβαντικής απόδοσης (quantum efficiency) της κάμερας από το μήκος κύματος που συλλέγει, πρέπει να εξαιρεθούν ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Αυτό επιτυγχάνεται με μία διαδικασία βαθμονόμησης, η οποία ελέγχεται από το λογισμικό και πραγματοποιείται αυτόματα πριν από κάθε κλινική μέτρηση. Η βαθμονόμηση περιλαμβάνει κατάλληλη ρύθμιση της έντασης του φωτός, του χρόνου έκθεσης (integration time) της κάμερας και της ίριδας του φακού σε κάθε περιοχή απεικόνισης. Κατά την ανίχνευση του φθορισμού, η βαθμονόμηση για το λευκό γίνεται χρησιμοποιώντας ένα σταθερό λευκό φθορίζον υλικό, ενώ η βαθμονόμηση για το μαύρο γίνεται με το διάφραγμα της κάμερας κλειστό. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία βαθμονόμησης, μπορούν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις της έντασης του φθορισμού σε κάθε σημείο της υπό εξέταση περιοχής.

#### 4. Κλινικές μετρήσεις

Πριν την επάλειψη με ALA λαμβάνονταν εικόνες του φθορισμού, προκειμένου να υπολογιστεί ο αυτοφθορισμός του δέρματος. Στη συνέχεια γινόταν επάλειψη του φωτοευαισθητοποιητή στις κλινικά ορατές βλάβες και σε περιοχή κλινικά υγιούς δέρματος σε απόσταση 2 cm. Ακολουθούσε κλειστή περίδεση της περιοχής ώστε να επιτευχθεί προστασία από φως, παραμονή του φαρμάκου στα σημεία που έγινε η επάλειψη και ενίσχυση της διείσδυσης του φαρμάκου. Οι μετρήσεις της κινητικής του φθορισμού γίνονταν σε σκοτεινό δωμάτιο και η υπό εξέταση περιοχή παρέμενε καλυμμένη το χρονικό διάστημα μεταξύ των απεικονίσεων του εκπεμπόμενου φθορισμού. Η ένταση του προσπίπτοντος φωτός ήταν περίπου  $0.5 \text{ mW/cm}^2$  και η διαδικασία της απεικόνισης ήταν πολύ σύντομη, προκειμένου να αποφευχθεί σημαντική φωτοαποικοδόμηση (photobleaching) του φωτοευαισθητοποιητή.

Σε όλους τους ασθενείς η ένταση του φθορισμού απεικονιζόταν κάθε 30 min για τις πρώτες 12 ώρες και στη συνέχεια σε αραιότερα διαστήματα μέχρι τις 24-26 ώρες. Σε ένα περιστατικό η μέτρηση διήρκεσε 53 ώρες, καθώς εξακολουθούσε να υπάρχει έντονο σήμα μετά τις πρώτες 24 ώρες. Η θέση της υπό εξέταση περιοχής σε σχέση με την κάμερα καθώς και οι συνθήκες διέγερσης και απεικόνισης παρέμεναν σταθερές σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Σε κάθε εικόνα υπολογίζονταν οι μέσες τιμές της έντασης του φθορισμού των εικονοστοιχείων (pixels) που αντιστοιχούσαν στις βλάβες, αφού πρώτα αφαιρούνταν οι μέσες τιμές του αυτοφθορισμού. Στο τέλος των μετρήσεων προέκυπταν από τις αποθηκευμένες εικόνες διαγράμματα των διορθωμένων για τον αυτοφθορισμό μέσων τιμών της έντασης του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο. Προκειμένου να αναδειχθεί με μεγαλύτερη σαφήνεια η χωρική και χρονική μεταβολή του φθορισμού της PpIX χρησιμοποιήθηκαν ψευδοχρώματα.

Μετά την ολοκλήρωση της in vivo μελέτης της κινητικής του φθορισμού λαμβάνονταν βιοψίες από κλινική βλάβη, περιβαλαβικό δέρμα και από περιοχές κλινικά υγιούς δέρματος που ανέπτυξαν φθορισμό κατά τη διάρκεια των μετρήσεων και πιθανολογούνταν ότι αντιστοιχούσαν σε υποκλινικές βλάβες. Κάθε δείγμα μονιμοποιούνταν σε διάλυμα φορμόλης 10% και τοποθετούνταν σε παραφίνη. Στη συνέχεια γινόταν ιστολογική εξέταση των δειγμάτων με χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης και ανίχνευση HPV DNA με PCR για επιβεβαίωση της διάγνωσης, με τις συνθήκες που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

## **5. Αποτελέσματα**

### **5.1 Ιστολογική εξέταση και ανίχνευση HPV DNA**

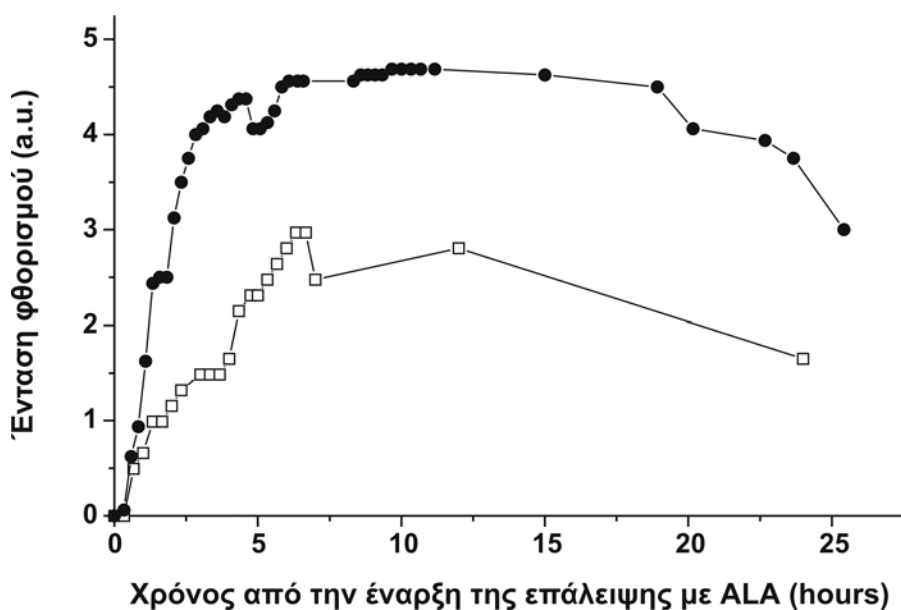
Από τις 14 βιοψίες που ελήφθησαν, οι 12 είχαν τα ιστολογικά χαρακτηριστικά τυπικών οξυτενών κονδυλωμάτων, 1 ήταν αρνητική για κονδύλωμα, ενώ 1 βιοψία ανέδειξε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα πέους αναπτυσσόμενο σε κονδύλωμα. Οι βιοψίες από περιοχές κλινικά υγιούς δέρματος που ανέπτυξαν φθορισμό, δεν εμφάνιζαν αξιόλογες ιστολογικές μεταβολές και σε καμία δεν βρέθηκαν κοιλοκύτταρα.

Με την τεχνική της PCR βρέθηκε HPV DNA στο 92.8% των δειγμάτων από κλινικές βλάβες (13/14). Το δείγμα στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε HPV είχε χαρακτηριστεί ιστολογικά ως αρνητικό για κονδύλωμα. HPV DNA βρέθηκε σε όλες τις βιοψίες που προέρχονταν από περιοχές κλινικά υγιούς δέρματος που ανέπτυξαν φθορισμό.

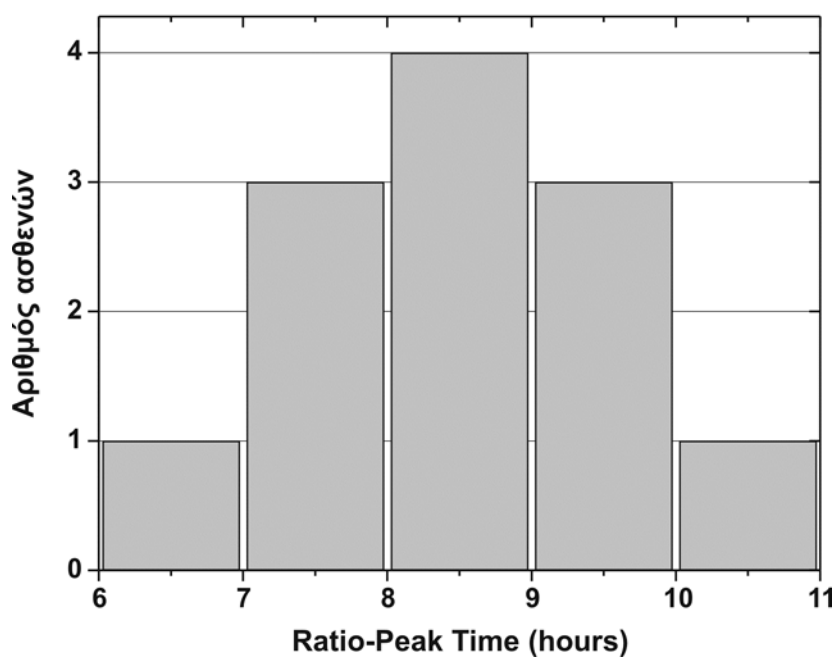
### **5.2 Κινητική του φθορισμού**

Οι κλινικές βλάβες όλων των ασθενών, με την εξαίρεση ενός, ανέπτυξαν φθορισμό μετά την επάλειψη με ALA, ο οποίος εξακολουθούσε να είναι ανιχνεύσιμος 24 ώρες μετά. Η βλάβη του ασθενούς που δεν ανέπτυξε φθορισμό ήταν αρνητική για κονδύλωμα κατά τον έλεγχο με ιστολογική εξέταση και PCR. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων δε διαπιστώθηκε σημαντική μεταβολή στο επίπεδο του αυτοφθορισμού του δέρματος. Οι καμπύλες της έντασης του φθορισμού από διαφορετικούς ασθενείς εμφανίζουν παρόμοιο σχήμα. Αρχικά φθάνουν μία μέγιστη τιμή και στη συνέχεια οι τιμές ελαττώνονται πλησιάζοντας την αρχική τιμή με βραδύτερο ρυθμό από τον ρυθμό ανόδου. Εντούτοις, ο χρόνος κατά τον οποίο παρατηρείται μέγιστη τιμή έντασης φθορισμού (peak time) καθώς και οι τιμές της έντασης διαφοροποιούνται μεταξύ των ασθενών (σχήμα 1).

Σαν αποτέλεσμα αυτών των διαφοροποιήσεων, εμφανίζεται μεταξύ των περιστατικών απόκλιση στο χρόνο, κατά τον οποίο παρατηρείται ο μέγιστος λόγος της μέσης τιμής έντασης φθορισμού της βλάβης/ την μέση τιμή έντασης φθορισμού του υγιούς δέρματος (Ratio-Reak Time). Ο υπολογισμός αυτού του χρόνου σε κάθε ασθενή είναι κρίσιμος, καθώς υποδεικνύει τον ιδανικό χρόνο έναρξης της ακτινοβόλησης κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ο χρόνος αυτός, σύμφωνα με τις μετρήσεις μας, κυμαίνεται από 6 έως 11 ώρες, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.



**Σχήμα 1:** Καμπύλες της έντασης του φθορισμού σε σχέση με το χρόνο από δύο διαφορετικούς ασθενείς. (*a.u.*: *arbitrary units*)



**Σχήμα 2:** Κατανομή του Ratio-Peak Time μεταξύ των ασθενών.

Μετά την επάλειψη με ALA, 3 ασθενείς εμφάνισαν περιοχές κλινικά υγιείς, οι οποίες ανέπτυξαν φθορισμό. Οι βιοψίες που ελήφθησαν ακολούθως από αυτά τα σημεία, παρουσίαζαν στην ιστολογική εξέταση ήπια υπερκεράτωση και ακάνθωση, χωρίς την παρουσία κοιλοκυττάρων, ενώ κατά την εξέταση με PCR ανιχνεύθηκε DNA του HPV και οι αντίστοιχες περιοχές θεωρήθηκαν υποκλινικές βλάβες. Τα οξυτενή κονδυλώματα 8 ασθενών εμφάνισαν μία άλω περιβλαβικού δέρματος ακτίνας περίπου 3mm, στην οποία αναπτύχθηκε φθορισμός κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Οι βιοψίες που προέρχονταν από αυτές τις περιοχές είχαν φυσιολογική ιστολογική εικόνα, ενώ η ανάλυση με PCR ανέδειξε τον ίδιο τύπο HPV με αυτόν της παρακείμενης κλινικής βλάβης και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίστηκαν ως λανθάνουσα μόλυνση. Τα ιστοτεμάχια που ελήφθησαν από το περιβλαβικό δέρμα των υπολοίπων ασθενών ήταν αρνητικά για κονδυλώματα τόσο κατά την ιστολογική εξέταση όσο και με την τεχνική της PCR (Πίνακας 2).

Το σχήμα 3 παρουσιάζει την κινητική του προερχόμενου από την PpIX φθορισμού από κλινική βλάβη, υποκλινική βλάβη, περιοχή με λανθάνουσα μόλυνση (περιβλαβικό δέρμα) και υγιές δέρμα ενός ασθενούς που η κλινική του βλάβη ήταν ιστολογικά τυπικό κονδυλώμα. Είναι ενδιαφέρον ότι οι κινητικές όλων των παραπάνω περιοχών, με εξαίρεση το υγιές δέρμα, εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους φθάνοντας τη μέγιστη τιμή στον ίδιο χρόνο, ενώ διαφέρουν κυρίως στην ένταση του φθορισμού. Το υγιές δέρμα δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή της έντασης του φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της μέτρησης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν και από τους υπόλοιπους 11 ασθενείς με ιστολογική διάγνωση τυπικών κονδυλωμάτων ή ύποπτων για κονδυλώματα βλαβών.

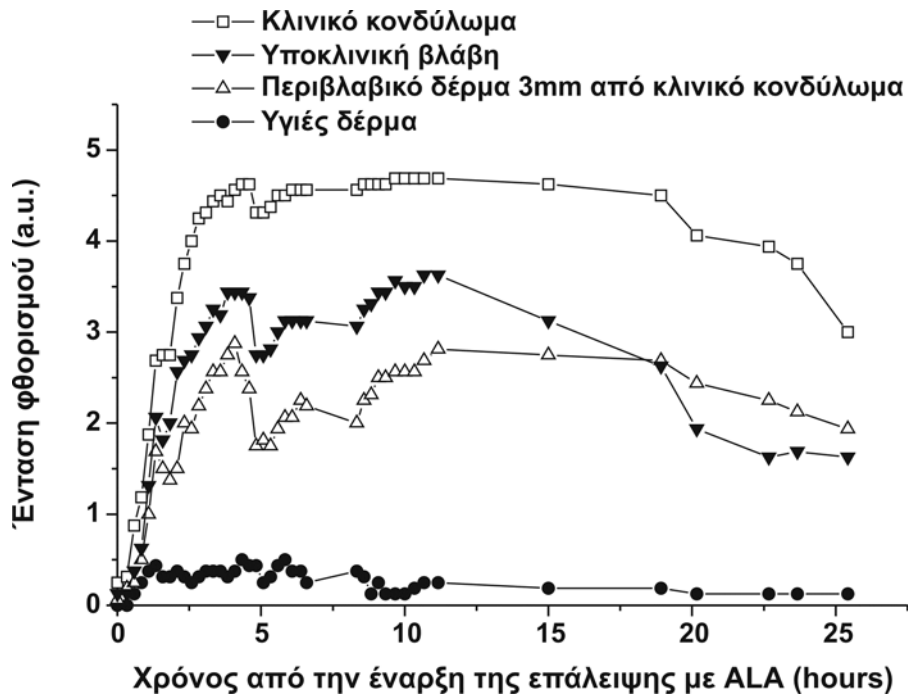
Η εικόνα 1 παρουσιάζει περιοχή της βάλανου του ίδιου ασθενούς με κλινική βλάβη οξυτενούς κονδυλώματος, περιβλαβικό δέρμα με λανθάνουσα HPV μόλυνση, υποκλινική βλάβη και υγιές δέρμα. Παρατηρείται ότι η έκταση του παραγόμενου από την PpIX φθορισμού αντιστοιχεί στην περιοχή που έγινε η επάλειψη με ALA και η μεγαλύτερη ένταση ανταποκρίνεται στα σημεία που βρίσκεται ο ιός. Κατά την απεικόνιση της ίδιας περιοχής με ψευδοχρώματα τα σημεία με μόλυνση από HPV διακρίνονται με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η κινητική του φθορισμού από το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα πέους (σχήμα 4). Η ένταση του φθορισμού της βλάβης έφτασε τη μέγιστη τιμή της 27.5 ώρες μετά την επάλειψη με ALA, ενώ στις 53 ώρες που ολοκληρώθηκε η μέτρηση, η ένταση του φθορισμού αντιστοιχούσε στο 79% της μέγιστης τιμής του.

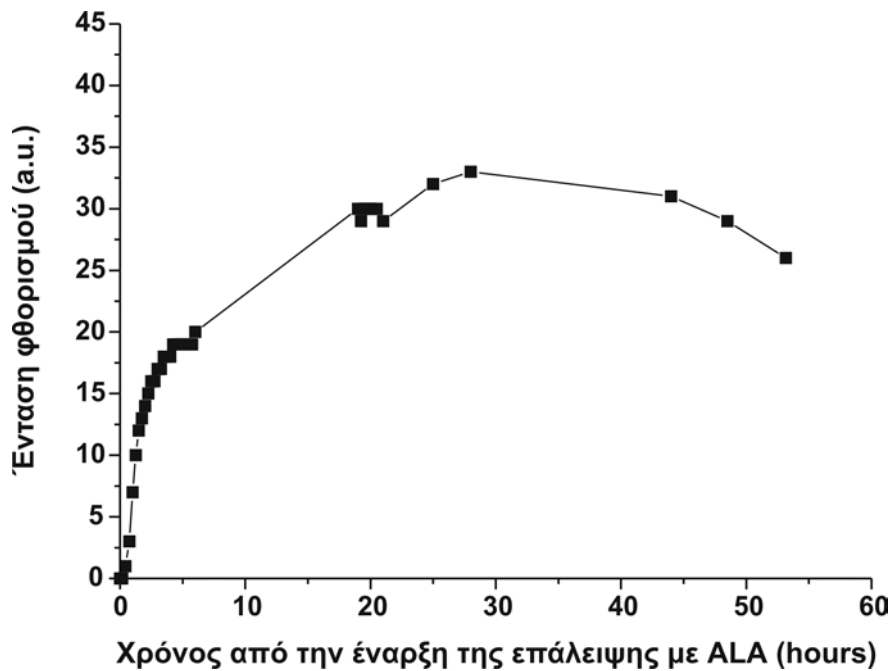


**Πίνακας 2. Αποτελέσματα από την ιστολογική εξέταση, το PCR και την ανάπτυξη φθορισμού στις υπό εξέταση περιοχές**

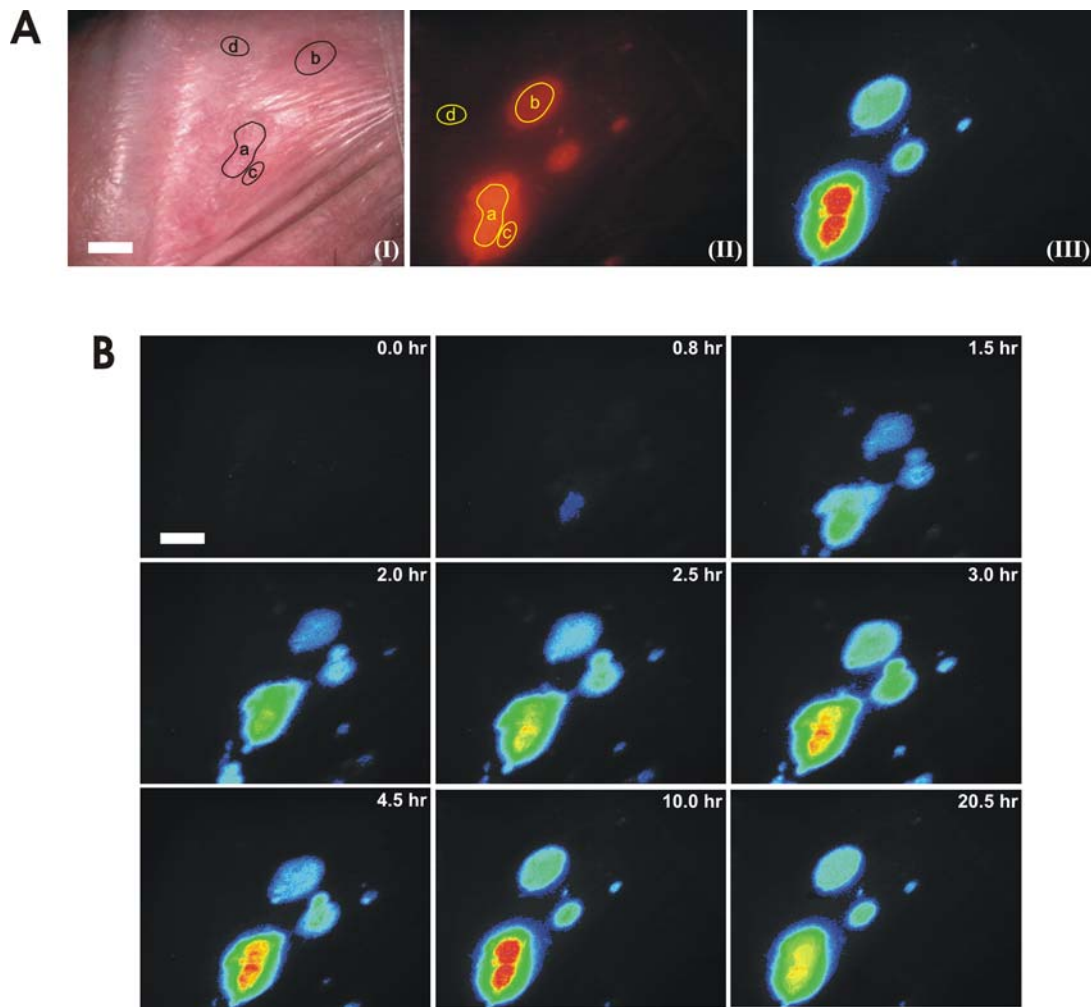
Ασθενής	Ιστολογικός χαρακτηρισμός κλινικής βλάβης	PCR			Ανάπτυξη φθορισμού		
		Κλινική Βλάβη	Περιβλαβικό Δέρμα	Υποκλινική Βλάβη	Κλιν. Βλάβη	Περιβλ. Δέρμα	Υποκλ. Βλάβη
1	Τυπικό κονδύλωμα	HPV6	HPV6		+	+	—
2	Τυπικό κονδύλωμα	HPV18	HPV18		+	+	—
3	Ύποπτο για κονδύλωμα	HPV6	—		+	—	—
4	Τυπικό κονδύλωμα	HPV6+18	HPV6+18	HPV6+18	+	+	+
5	Τυπικό κονδύλωμα	HPV31	HPV31	HPV31	+	+	+
6	Ύποπτο για κονδύλωμα	HPV11	—		+	—	—
7	Αρνητικό για κονδύλωμα	—	—		—	—	—
8	Ύποπτο για κονδύλωμα	HPV6	—		+	—	—
9	Τυπικό κονδύλωμα	HPV18	HPV18		+	+	—
10	Τυπικό κονδύλωμα	HPV18	HPV18	HPV18	+	+	+
11	Τυπικό κονδύλωμα	HPV11+18	HPV11+18		+	+	—
12	Τυπικό κονδύλωμα	HPV18	—		+	—	—
13	Ύποπτο για κονδύλωμα	HPV11	HPV11		+	+	—
14	SCC πέους	HPV16	—		+	—	—



**Σχήμα 3:** Κινητική της έντασης του φθορισμού από κλινικό κονδύλωμα, υποκλινική βλάβη, περιβλαβικό δέρμα 3 mm από κονδύλωμα και υγιές δέρμα του ίδιου ασθενούς. (a.u.: arbitrary units)



**Σχήμα 4:** Κινητική της έντασης του φθορισμού από SCC πέους. (a.u.: arbitrary units)



**Εικόνα 1:** **A,** (I): Εικόνα από τυπικό κονδύλωμα (a), υποκλινική βλάβη (b), περιβλαβικό δέρμα με λανθάνουσα μόλυνση (c) και υγιές δέρμα (d) που ελήφθη στα 400-700 nm πριν την επάλειψη ALA. (II): Εικόνα στα 650±30nm 10 ώρες μετά την επάλειψη ALA και (III): απεικόνιση με ψευδοχρώματα στις 10 ώρες, **B,** Εικόνες με ψευδοχρώματα στα 650±30 nm πριν και μετά από 0.8, 1.5, 2, 2.5, 3, 4.5, 10, 20.5 ώρες από την επάλειψη με ALA. Κλίμακα = 5mm.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

### ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

#### 1. Ασθενείς

Υποβλήθηκαν σε φωτοδυναμική θεραπεία οι 12 ασθενείς με οξυτενή κονδυλώματα, των οποίων οι βλάβες είχαν αναπτύξει φθορισμό.

#### 2. Φωτοευαισθητοποιητής

Χρησιμοποιήθηκε δ-αμινολεβουλικό οξύ (ALA, Sigma Co., St. Louis) πυκνότητας 20% σε έκδοχο cold cream o/w.

#### 3. Σύστημα Φωτοδυναμικής Θεραπείας

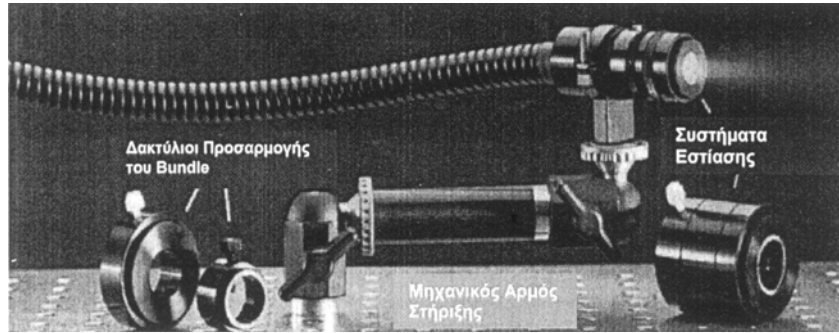
Για τη φωτοδυναμική θεραπεία έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο λέιζερ (lasers) όσο και μη σύμφωνες πηγές φωτός ευρέως φάσματος. Τα διάφορα είδη λέιζερ παρέχουν τη δυνατότητα της εκπομπής φωτός μεγάλης εντάσεως, αλλά χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλό αγοραστικό και λειτουργικό κόστος, πολυπλοκότητα στο χειρισμό και ειδικές συνθήκες λειτουργίας. Επιπλέον, η χρήση τους δεν ικανοποιεί ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η αποτελεσματική εφαρμογή φωτοδυναμικής αγωγής απαιτεί φως μέτριας έντασης και ευρέως φάσματος, καθώς α) οι διάφοροι φωτοευαισθητοποιητές που έχουν παρασκευασθεί και τα φωτοπαράγωγα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος και β) οι διάφοροι ιστοί διαφέρουν ως προς τα φασματικά χαρακτηριστικά τους. Αντίθετα, τα λέιζερ αποτελούν κατά βάση μονοχρωματικές πηγές υψηλής ισχύος, ενώ τα μεταβλητού μήκους κύματος λέιζερ χρωστικών (dye lasers) ή αερίων (gas lasers) χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλό κόστος αγοράς και λειτουργίας. Ένα άλλο μειονέκτημα των λέιζερ αποτελεί η σχετικά μικρή διάμετρος της δέσμης τους (~ 12-15 mm<sup>2</sup>), οπότε η ακτινοβολήση μεγάλων βλαβών απαιτεί είτε τη σταδιακή σάρωση της επιφάνειας, είτε την αύξηση της διαμέτρου της δέσμης με τη χρήση συστήματος φακών, κάτι που τεχνολογικά επιτυγχάνεται δύσκολα.

Για τους λόγους αυτούς, στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Ηρακλείου, αναπτύχθηκε διάταξη μη σύμφωνης

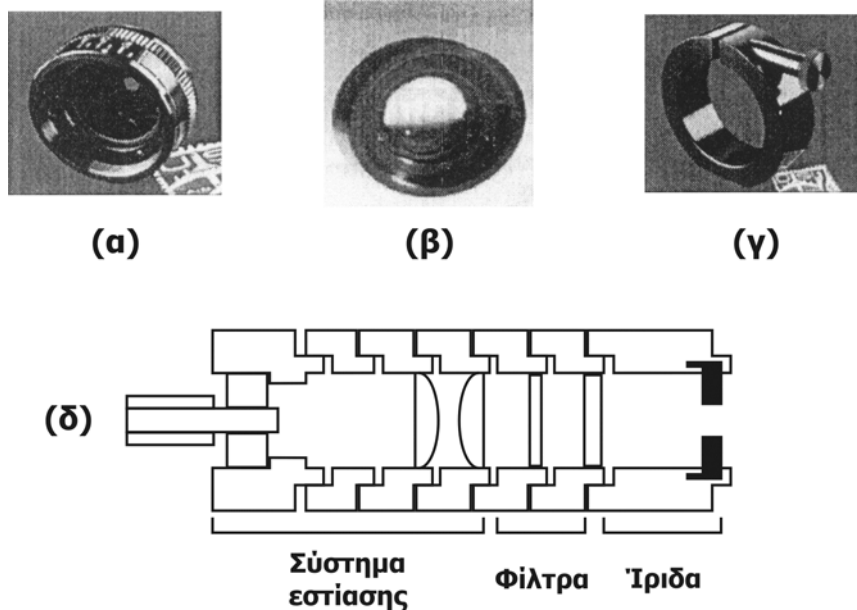
ακτινοβολίας ευρέως φάσματος, με δυνατότητα επιλογής της εκπομπής σε διάφορες φασματικές περιοχές. Συγκεκριμένα, επιλέγηκε λυχνία πυρακτώσεως αλογόνου 250 W, η οποία έχει συνεχές και ομαλό φάσμα εκπομπής και ικανοποιητική ένταση για τις απαιτήσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας στο συνολικό φάσμα της εκπομπής της στο ορατό, όπως επιβεβαιώθηκε κατόπιν εξέτασης με μονοχρωμάτορα Jobin-Yvon. Η φασματική περιοχή που απαιτείται στη φωτοδυναμική θεραπεία καθορίζεται από το φάσμα απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή και είναι η περιοχή του ορατού (κυρίως του ερυθρού, 620-780 nm). Ταυτόχρονα, σε αυτή τη φασματική περιοχή έχουμε μικρότερη σκέδαση του φωτός σε σχέση με χαμηλότερα μήκη κύματος. Με τη συγκεκριμένη ακτινοβολία επιτυγχάνεται διαπερατότητα έως 3 cm, γι' αυτό η τεχνική είναι αποτελεσματική κυρίως σε επιπολής ιστικές βλάβες, όπως είναι και τα οξυτενή κονδυλώματα.

Για τη μεταφορά της ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε κυματοδηγός με τη μορφή δεσμίδας οπτικών ινών (fiber optic bundle), με διάμετρο πυρήνα 12.5 mm, μήκος 60 cm και γωνία υποδοχής  $\sim 83^\circ$  (σχήμα 1). Το σύστημα μεταφοράς του φωτός επιτυγχάνει ομοιομορφία της δέσμης και προκαθορίσιμη και σταθερή ένταση φωτός. Το βέλτιστο πεδίο έντασης φωτός έχει προσδιοριστεί στα 30-100 mW/cm<sup>2</sup>, καθώς υψηλότερες τιμές οδηγούν σε θερμικό αποτέλεσμα. Για την αρχική εστίαση και τη συλλογή του φωτός χρησιμοποιήθηκε υπερβολικό κάτοπτρο, στη μία εστία του οποίου είναι τοποθετημένη η λυχνία ενώ στην άλλη εστιάζεται το φως και εισάγεται στον κυματοδηγό. Επειδή η επιφάνεια της δέσμης αυξάνεται με την απόσταση, η επανεστίαση της οπτικής δέσμης μετά την έξοδό της από το άλλο άκρο του κυματοδηγού γίνεται με κατάλληλο σύστημα εστίασης (focusing assembly), ενώ το μέγεθός της προσαρμόζεται στη δερματική περιοχή που πρόκειται να ακτινοβοληθεί (0.8-3 cm<sup>2</sup>) (σχήμα 2).

Στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ της λυχνίας και της εισόδου του κυματοδηγού, εισάγονται κατάλληλα φίλτρα από θερμοαπορροφητικό γυαλί για τη μείωση της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Τα φίλτρα διαθέτουν ειδική επίστρωση για να είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ψύχονται με συνεχή ροή αέρα. Με την ελαχιστοποίηση της εκπομπής στο υπέρυθρο (<0.1%) αποφεύγονται θερμικές βλάβες στην πάσχουσα δερματική περιοχή και γίνεται ανεκτή η ακτινοβολή από τον ασθενή.



**Σχήμα 1:** Σύστημα μεταφοράς της φωτεινής δέσμης. Διακρίνεται ο κυματοδηγός, τα συστήματα εστίασης, οι ειδικοί δακτύλιοι προσαρμογής και ο αρμός στήριξης, του οποίου το μήκος είναι μεταβλητό με προσθήκη ή αφαίρεση των επιπλέον κλειδώσεων και προεκτάσεων.



**Σχήμα 2:** (α) Ίριδα, (β) Φίλτρο, (γ) Δακτύλιος προσαρμογής για στήριξη στον αρμό, (δ) Σχεδιάγραμμα του συνολικού συστήματος ελέγχου των χαρακτηριστικών της δέσμης και τρόπος σύνδεσης των διαφόρων τμημάτων μεταξύ τους.

Με ένα ψηφιακό φωτομετρητή χειρός (MACAM PHOTOMETRICS R450 handheld radiometer), με ανιχνευτή ευαίσθητο και βαθμονομημένο για το ορατό, επιτυγχάνεται η ακριβής μέτρηση και on-line παρακολούθηση της έντασης ανά μονάδα επιφάνειας της φωτεινής δέσμης κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης.

Το σύστημα διαθέτει προγραμματιζόμενο χρονομετρητή με ακρίβεια καλύτερη από 1 sec για τον έλεγχο του χρόνου ακτινοβολήσης, ενώ παρέχεται πλήρης ευελιξία κίνησης στο χώρο με τη χρήση ενός μηχανικού αρμού (articulating mount) μεταβλητού μήκους.

#### **4. Συνεδρίες Φωτοδυναμικής Θεραπείας**

Μία εβδομάδα μετά τη μελέτη της κινητικής του φθορισμού ακολουθούσε τοπική φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) με ALA. Αρχικά γινόταν απεικόνιση της περιοχής, στη συνέχεια επάλειψη με ALA τόσο των βλαβών και του περιβλαβικού δέρματος σε ακτίνα 1 cm, όσο και υποκλινικών βλαβών που είχαν αναδειχθεί κατά τη διάρκεια της μελέτης της κινητικής του φθορισμού και ακολουθούσε κλειστή περιδέρση της περιοχής. Μετά από 6-11 ώρες απομακρυνόταν η περιδέρση και η εναπομένουσα κρέμα και η περιοχή εκτιθόταν σε ακτινοβολήση χωρίς τοπική αναισθησία. Ο ακριβής χρόνος της ακτινοβολήσης ήταν η χρονική στιγμή που είχε καταγραφεί ο μέγιστος λόγος της μέσης τιμής έντασης φθορισμού της βλάβης/ την μέση τιμή έντασης φθορισμού του υγιούς δέρματος σε κάθε ασθενή (Ratio–Peak Time).

Σε 10 οξυτενή κονδυλώματα δόθηκαν 70 J/cm<sup>2</sup> σε μία συνεδρία ΦΔΘ (χρόνος ακτινοβολήσης ανά βλάβη: 16.6 min), ενώ 27 οξυτενή κονδυλώματα έλαβαν 100 J/cm<sup>2</sup> σε μία συνεδρία (χρόνος ακτινοβολήσης ανά βλάβη: 23.8 min). Σε όλες τις βλάβες η ένταση της ακτινοβολίας ήταν 70 mW/cm<sup>2</sup>. Σε κάθε συνεδρία ήταν δυνατή η ακτινοβολήση πολλαπλών γεννητικών βλαβών. Μετά την ακτινοβολήση οι ασθενείς λάμβαναν μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (100 mg νιμεσουλίδης) μία φορά την ημέρα για δύο ημέρες. Οι βλάβες παρακολουθούνταν κλινικά και απεικονίζονταν καθημερινά κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά τη ΦΔΘ. Στο τέλος της εβδομάδας, όσα οξυτενή κονδυλώματα δεν παρουσίαζαν τουλάχιστον 50% μείωση του μεγέθους τους, υποβλήθηκαν σε άλλη μία συνεδρία ΦΔΘ των 100 J/cm<sup>2</sup> με ένταση 70 mW/cm<sup>2</sup>. Έτσι 10 βλάβες έλαβαν συνολική δόση προσπίπτουσας ακτινοβολίας 70 J/cm<sup>2</sup>, 13 βλάβες έλαβαν συνολική δόση προσπίπτουσας ακτινοβολίας 100 J/cm<sup>2</sup> ενώ σε 14 βλάβες δόθηκαν συνολικά 200 J/cm<sup>2</sup> (Πίνακας 1).

Η περίοδος της παρακολούθησης ήταν 12 μήνες και η ανταπόκριση στη ΦΔΘ εκτιμήθηκε σύμφωνα με το ποσοστό των βλαβών που παρουσίασαν ίαση.

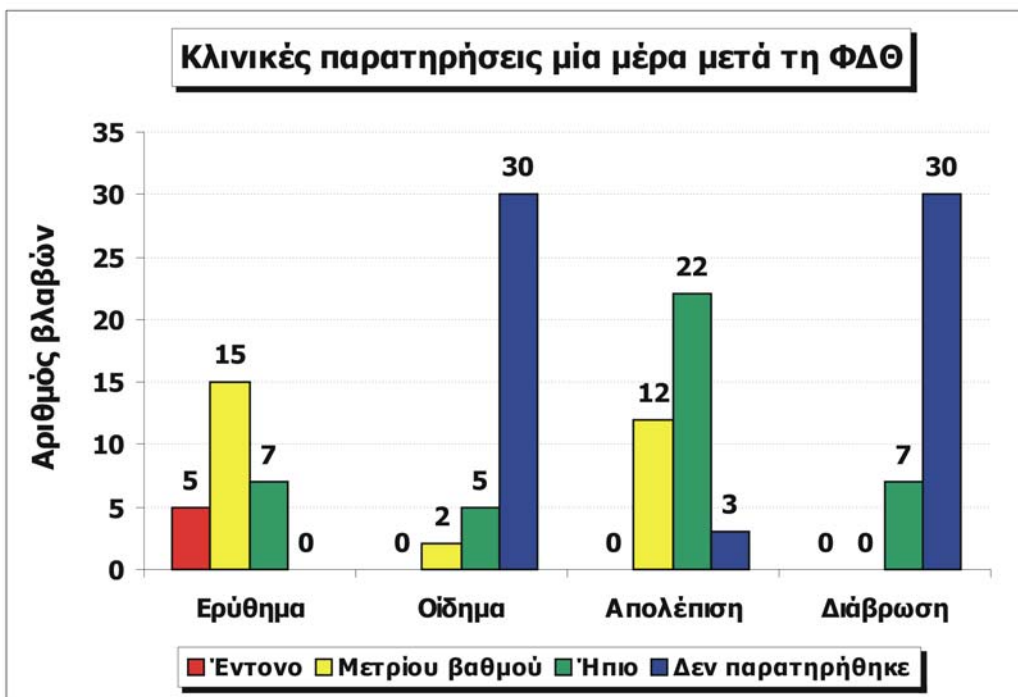
## 5. Αποτελέσματα Φωτοδυναμικής Θεραπείας

### 5.1 Κλινική παρακολούθηση

Στα πρώτα min κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης όλοι οι ασθενείς ανέφεραν αίσθημα καύσου ή άλγους, ήπιας έως μέτριας έντασης, το οποίο συνήθως υποχωρούσε καθώς συνεχιζόταν η συνεδρία. Όλοι οι ασθενείς ανέχτηκαν τη θεραπεία έως το τέλος του προκαθορισμένου χρόνου (16.6-23.8 min), χωρίς να διακοπεί η συνεδρία και έλαβαν το σύνολο της προγραμματισμένης δόσης.

Μία μέρα μετά την ΦΔΘ τα κονδυλώματα εμφάνιζαν γκριζο ή καφεοειδές χρώμα με στιγμοειδείς πετέχιες, πιθανώς λόγω εμβολής και ρήξης των μικρών αγγείων του δέρματος. Το περιβλαβικό δέρμα, το οποίο είχε επίσης καλυφθεί με κρέμα ALA και είχε ακτινοβοληθεί, παρουσίαζε ερύθημα και λεπτή απολέπιση λευκού χρώματος, ενώ σε 2 ασθενείς προκλήθηκαν μικρές διαβρώσεις. Στις περιπτώσεις που οι βλάβες εντοπιζόνταν κοντά στην ουρήθρα, παρατηρούνταν ήπιο έως μέτριου βαθμού οίδημα του ημιβλενογόνου (Σχήμα 3).

Τις επόμενες 3-5 μέρες οι αντιδράσεις της περιβλαβικής περιοχής υποχωρούσαν, ενώ το νεκρωτικό υλικό των οξυτενών κονδυλωμάτων απέπιπτε σταδιακά, χωρίς σχηματισμό ουλής ή δυσχρωμίας.



**Σχήμα 3**



## 5.2 Ποσοστά ίασης

Τριάντα επτά οξυτενή κονδυλώματα υποβλήθηκαν σε φωτοδυναμική θεραπεία με ALA. Δύο μήνες μετά τη θεραπεία 10 βλάβες υποτροπίασαν (27.1%). Από αυτές οι 5 είχαν λάβει συνολική δόση προσπίπτουσας ακτινοβολίας 70 J/cm<sup>2</sup> και είχαν αρχικά υποχωρήσει, ενώ οι υπόλοιπες 5 βλάβες είχαν λάβει συνολικά 200 J/cm<sup>2</sup>. Και στις 10 βλάβες είχε δοθεί στο παρελθόν θεραπεία με ποδοφυλλοτοξίνη ή κρυοθεραπεία και είχαν υποτροπιάσει.

Το ποσοστό ίασης στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης, η οποία ήταν 12 μήνες, ανέρχεται σε 72.9% (Πίνακας 1, Εικόνα 1). Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει τα ποσοστά ίασης και υποτροπής σε σχέση με τη συνολική δόση ακτινοβολίας που χορηγήθηκε.

**Πίνακας 1. Κλινική ανταπόκριση των οξυτενών κονδυλωμάτων στη ΦΔΘ, 12 μήνες μετά την θεραπεία**

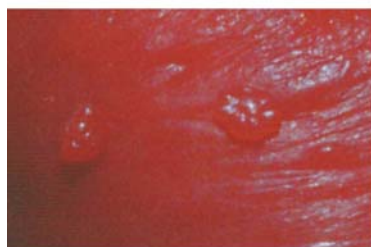
Ασθενής	Αριθμός βλαβών που έλαβαν ΦΔΘ	Δόση φωτός (J/cm <sup>2</sup> ) κατά την 1 <sup>η</sup> συνεδρία ΦΔΘ	Δόση φωτός (J/cm <sup>2</sup> ) κατά την 2 <sup>η</sup> συνεδρία ΦΔΘ	Ποσοστό ίασης
1	2	100	–	100%
2	3	100	100	100%
3	2	100	–	100%
4	5	70	–	Υποτροπή μετά από 2 μήνες
5	2	100	–	100%
6	3	100	–	100%
7	3	100	100	100%
8	4	100	–	100%
9	3	70	–	100%
10	3	100	100	100%
11	2	70	–	100%
12	5	100	100	Υποτροπή μετά από 2 μήνες

**Πίνακας 2.** Κλινική ανταπόκριση οξυτενών κονδυλωμάτων ως προς τη συνολική δόση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

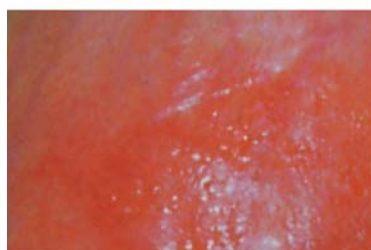
<b>Δόση φωτός (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Αριθμός συνεδριών</b>	<b>Ίαση (%)</b>	<b>Υποτροπή (%)</b>
70	1	50	50
100	1	100	0
200	2	64.3	35.7



**α**



**β**



**γ**



**δ**



**ε**

**Εικόνα 1:** (α) Κονδυλώματα πριν τη ΦΔΘ. (β) Ίδιες βλάβες 1 μέρα μετά τη ΦΔΘ. Παρατηρείται έντονο ερύθημα. (γ) 1 εβδομάδα μετά τη ΦΔΘ οι βλάβες βρίσκονται σε υποστροφή. (δ) 2 εβδομάδες μετά τη ΦΔΘ παρατηρείται περαιτέρω μείωση του μεγέθους των βλαβών και ήπιο ερύθημα. (ε) 3 μήνες μετά τη ΦΔΘ πλήρης ίαση, χωρίς μεταβλαβική υπέρχρωση ή ουλή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

#### 1. Εισαγωγή

Η επάλειψη HPV βλαβών του δέρματος και δερματοβλεννογονίων περιοχών με οξεικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί κατά την κλινική εξέταση, προκειμένου να βοηθήσει στη λήψη βιοψιών από περιοχές ύποπτες για δυσπλασία, να αναδείξει εστίες υποκλινικής HPV μόλυνσης και να καθορίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα όρια των βλαβών. Έως τώρα, δεν έχει τεκμηριωθεί αν αναδεικνύει περιοχές με βλάβη ή πιθανή βλάβη, ή αν ενέχονται άλλοι μηχανισμοί για τις μεταβολές των οπτικών χαρακτηριστικών της υπό εξέταση περιοχής. Η εκτίμηση της κλινικής αξίας της μεθόδου είναι δυσχερής λόγω των αντικρουόμενων συμπερασμάτων των μέχρι σήμερα μελετών, από τις οποίες προκύπτουν μεγάλες διαφορές στα ποσοστά ευαισθησίας (από 22% έως 85%) και υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (22-25%) (Jonsson M 1997, Buntin DM 1994, Schultz R 1988). Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε επανεκτίμηση της εφαρμογής της με εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες.

Η ΦΔΘ είναι μία ταχέως αναπτυσσόμενη ερευνητική μέθοδος, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη θεραπεία καρκινικών και φλεγμονωδών νόσων του δέρματος. Η τοπική εφαρμογή ALA θεωρείται πλεονεκτική έναντι της συστηματικής χορήγησης άλλων φωτοευαισθητοποιών ουσιών, καθώς προκαλεί μικρής διάρκειας φωτοευαισθησία. Η ΦΔΘ με ALA δρα στη μόλυνση από HPV μέσω καταστροφής των προσβεβλημένων κερατινοκυττάρων, αλλά έχει επίσης διαπιστωθεί ότι αδρανοποιεί σωματίδια μη ελυτροφόρων ιών χωρίς θάνατο του κυττάρου-ξενιστή (Gaspard S 1995). Προκειμένου να καθιερωθεί η εφαρμογή της πρέπει να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά της και να διερευνηθούν οι διάφορες παράμετροι που εμπλέκονται.

Βασικοί στόχοι αυτής της εργασίας ήταν αφενός η ποσοτική εκτίμηση των μεταβολών που προκαλεί το οξεικό οξύ στα οπτικά χαρακτηριστικά ιστών με μόλυνση από HPV, προκειμένου να βελτιωθεί η ακρίβεια της κλινικής διάγνωσης και αφετέρου η in vivo μελέτη του φωτοδυναμικού φαινομένου και η βελτιστοποίηση της ΦΔΘ με τον προσδιορισμό των καταλληλότερων παραμέτρων ακτινοβολήσης.

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο τμήματα. Κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού χρησιμοποιώντας ένα ειδικά ανεπτυγμένο Πολυφασματικό Σύστημα Απεικόνισης, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός in vivo των χωρικών και χρονικών μεταβολών που προκαλεί το οξεικό οξύ στις ιδιότητες σκέδασης φωτός του προσβεβλημένου από HPV ιστού. Επίσης, έγινε προσπάθεια συσχετισμού των οπτικών χαρακτηριστικών του υπό εξέταση ιστού με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του, προκειμένου να εισαγάγουμε νέα κριτήρια σταδιοποίησης και πρόγνωσης. Στο δεύτερο μέρος, η in vivo διερεύνηση της κινητικής του φθορισμού της PpIX μετά από τοπική εφαρμογή ALA παρείχε πληροφορίες για τη χωρική και χρονική κατανομή του φωτοευαίσθητοποιητή. Ακολούθησε ΦΔΘ των περιοχών που ανέπτυξαν φθορισμό με εξατομίκευση των παραμέτρων ακτινοβολήσης.

## **2. Φωτοδιάγνωση με οξεικό οξύ**

### **2.1 Ιστολογική εξέταση και ανίχνευση HPV**

Τα ποσοστά των διαφόρων ιστολογικών κατηγοριών στις οποίες ταξινομήθηκαν οι περιοχές που άσπρισαν με οξεικό οξύ (τυπικά κονδυλώματα 60%, ύποπτα 26.6%, νεοπλασίες 13.3%) συμφωνούν με ποσοστά που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (τυπικά κονδυλώματα 55.5-78%, ύποπτα 14-25.5%, νεοπλασίες 8-19%) (Schultz RE 1988, Petersen CS 1991).

Στην παρούσα μελέτη γινόταν λήψη μίας μόνο βιοψίας από κάθε ασθενή, που συνήθως εμφάνιζε πολλές βλάβες. Επειδή τα ιστολογικά ευρήματα της μόλυνσης από HPV συχνά είναι εστιακά, υφίσταται η πιθανότητα δειγματοληπτικού σφάλματος. Εντούτοις, ο ίδιος ιστός στον οποίο γινόταν ιστολογική εξέταση χρησιμοποιούταν και για την ανίχνευση HPV DNA, γεγονός που επιτρέπει την in vitro επιβεβαίωση της διάγνωσης με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η παρουσία κοιλοκυττάρων στο ιστολογικό παρασκεύασμα εκφράζει το κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα της παραγωγικής μόλυνσης από HPV και αποτελεί το μόνο παθολογικό παθολογοανατομικό σημείο βιολογικής δραστηριότητας του ιού. Αυτός ο δείκτης συσχετίζεται με την κλασική εικόνα οξυτενών κονδυλωμάτων. Η πλειονότητα των κυττάρων που παρουσιάζουν πυρηνική ατυπία και περιπυρηνική άλω περιέχουν ανιχνεύσιμη ποσότητα ιού, η οποία έχει υπολογιστεί σε 1000 αντίγραφα του ιού ανά κύτταρο (Nuono GJ 1989).

Είναι ενδιαφέρον ότι με την τεχνική της PCR ανιχνεύθηκε HPV DNA στο 75% των βλαβών που ήταν ιστολογικά ύποπτες για κονδυλώματα και στο 66% των

υποκλινικών βλαβών που εμφάνιζαν ελάχιστες ιστολογικές αλλοιώσεις (ιστολογική κατηγορία αρνητική για κονδύλωμα). Οι ύποπτες βλάβες και πιθανόν και οι υποκλινικές μπορεί να αποτελούν πρώιμες ή υποτροπιάζουσες περιοχές μόλυνσης. Η αντίδραση PCR είναι πολύ ευαίσθητη σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, καθώς ανιχνεύει ποσότητες DNA μικρότερες από  $10^{-4}$  pg, που αντιστοιχούν σε 10-20 αντίγραφα HPV DNA (Shibata DK 1988).

Η νεοπλασία του γεννητικού συστήματος και η αρχική μόλυνση από HPV μπορούν να θεωρηθούν ως τα δύο άκρα ενός φάσματος και οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σταδίων είναι περισσότερο ποσοτικές παρά ποιοτικές (Willett GD 1989). Στη μελέτη μας, τα δείγματα από το SCC πέους ήταν θετικά για τον HPV 16. Με την τεχνική της PCR, HPV DNA ανιχνεύεται στο 70% των SCC πέους και ο τύπος που συνήθως ανευρίσκεται, τόσο σε προκαρκινικές όσο και σε διηθητικές βλάβες, είναι ο HPV16 (Scinicariello F 1992, zur Hausen H 1996).

Στην παρούσα έρευνα βρήκαμε μεγαλύτερη συχνότητα μόλυνσης με HPV18 (57.1%) σε σχέση με τον HPV16 (7.1%). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας επιβεβαιώνουν αυτό το εύρημα (Dokianakis DN 1998). Μία πιθανή εξήγηση της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης του HPV18 στον Ελληνικό πληθυσμό μπορεί να είναι εθνικές αποκλίσεις των διαφόρων HPV τύπων. Όπως αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (von Krogh G 1988, Nuono GJ 1991), ταυτόχρονη μόλυνση με περισσότερους HPV τύπους δεν ήταν ασυνήθης (6/15).

## **2.2 Αξιολόγηση της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού**

Οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων στον εντοπισμό μόλυνσης από HPV δημιουργούν την ανάγκη ανάπτυξης πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών τεχνικών. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη αυξάνει την ακρίβεια της *in vivo* διάγνωσης αξιοποιώντας το διαγνωστικό περιεχόμενο της κινητικής της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού. Η μέθοδος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη διάγνωση και σταδιοποίηση δυσπλασιών και καρκινωμάτων του λάρυγγα και του τραχήλου της μήτρας (Balas CJ 1999, Balas CJ 2001). Αυτή είναι η πρώτη φορά που εφαρμόστηκε σε ένα εύκολα προσπελάσιμο όργανο, το δέρμα, χωρίς να απαιτείται η χρήση ενδοσκοπίου. Είναι επίσης η πρώτη φορά που γίνεται ποσοτική εκτίμηση της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-οξυτενών κονδυλωμάτων. Η μέθοδος δίνει τη δυνατότητα πρώιμης ανίχνευσης μεταβολών ή εξαλλαγής του δέρματος λόγω

μόλυνσης από HPV και επιτρέπει τη χαρτογράφηση της προσβεβλημένης περιοχής. Επιπλέον, είναι γρήγορη, μη επεμβατική και χωρίς παρενέργειες.

Οι *in vivo* και *in vitro* τεχνικές που εφαρμόστηκαν στην παρούσα έρευνα, δείχνουν ότι οι διαφορές στην κινητική της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού, συσχετίζονται με την ιστολογική ταξινόμηση των βλαβών και το βαθμό προσβολής από τον ιό (κλινικές και υποκλινικές βλάβες), προσφέροντας για πρώτη φορά κριτήρια *in vivo* σταδιοποίησης της μόλυνσης από HPV. Με τον τρόπο αυτό, η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτρέπει την αξιολόγηση των διαθέσιμων θεραπευτικών τεχνικών και ίσως συνεισφέρει στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών σχημάτων. Μέχρι σήμερα δε γνωρίζουμε με βεβαιότητα την κλινική πορεία, τη μεταδοτικότητα και τη βέλτιστη θεραπευτική αντιμετώπιση των υποκλινικών βλαβών που αναδεικνύει το οξεικό οξύ. Φαίνεται, όμως, λογικό να στοχεύουμε όχι μόνο στη θεραπεία των κλινικών βλαβών αλλά και στον περιορισμό των υποκλινικών εστιών μόλυνσης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος υποτροπής. Οι διαφορές που σημειώθηκαν στις καμπύλες της IBSL με το χρόνο και της παραμέτρου ATR που προκύπτει ακολούθως, κάνουν δυνατή την *in vivo* διάκριση μεταξύ καλοηθών και κακοηθών βλαβών. Αυτή η διάκριση μπορεί να επιβεβαιωθεί με *in vitro* εξέταση βιοψιών που λαμβάνονται από περιοχές του ιστού που παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μεταβολές στις ιδιότητες σκέδασης του φωτός. Η σωστή και ακριβής επιλογή της περιοχής από την οποία λαμβάνεται βιοψία είναι πολύ σημαντική, αφού οι εστίες της δυσπλασίας συνήθως δεν αφορούν το σύνολο της βλάβης. Μία λήψη από διαφορετικό σημείο θα υποεκτιμήσει το είδος και το βαθμό των ιστολογικών μεταβολών, με άμεσο αντίκτυπο στην επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί επίσης στην επανεξέταση των ασθενών με HPV-μόλυνση μετά από θεραπεία, καθώς είναι σε θέση να ανιχνεύει μικρές υποτροπιάζουσες βλάβες ή να επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να γίνουν γνωστοί οι μηχανισμοί που προκαλούν το φαινόμενο του ασπρίσματος HPV-βλαβών μετά από επάλειψη με οξεικό οξύ. Η γνώση αυτών των μηχανισμών μπορεί να βοηθήσει να επιτευχθεί μεγαλύτερη και γρηγορότερη ενίσχυση των διαφορών στα οπτικά χαρακτηριστικά μεταξύ υγιούς και παθολογικού ιστού, πιθανώς με τη χρήση και άλλων δεικτών (ασθενή οξέα ή βάσεις) ή με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εφαρμογής του οξεικού οξέος (χρόνος εφαρμογής, συγκέντρωση, ουσίες ή τεχνικές που επιτρέπουν την ταχύτερη διείσδυση του στο δέρμα κτλ.).

### **3. In vivo μελέτη της κινητικής του φθορισμού και ΦΔΘ με ALA**

#### **3.1 Μελέτη της κινητικής του φθορισμού**

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι τα οξυτενή κονδυλώματα παρουσιάζουν εκλεκτική συσσώρευση της PpIX μετά από τοπική επάλειψη με ALA (Fehr MK 1996, Ross EV 1997, Schneede PJ 2000 ), γεγονός που υποδηλώνει ότι η τοπική ΦΔΘ με ALA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία τους. Η in vivo μελέτη της κινητικής του φθορισμού αναδεικνύει τις βλάβες που εμφανίζουν εκλεκτική συσσώρευση της PpIX και επομένως είναι κατάλληλες για ΦΔΘ. Επίσης επιτρέπει τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου στον οποίο δίνεται η ακτινοβολία, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αλλά και ειδικότητα της νέκρωσης που προκαλεί η ΦΔΘ στον παθολογικό ιστό.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, που αναφέρουν εκλεκτική συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στις περιοχές με HPV-μόλυνση μετά από τοπική επάλειψη με ALA. Ο λόγος αυτής της εκλεκτικότητας παραμένει ασαφής, αλλά θα μπορούσε να αποδοθεί σε αυξημένη διείσδυση του ALA μέσω της ανώμαλης κερατίνης στιβάδας, ή στη μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα των προσβεβλημένων κερατινοκυττάρων, που οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό και συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στις περιοχές που βρίσκεται ο HPV. Επίσης, μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη πρόσληψη του ALA από τα παθολογικά κύτταρα λόγω μειωμένου pH στον ενδοκυττάριο χώρο. Έρευνες σε κυτταροκαλλιέργειες που επωάζονταν σε ALA, έδειξαν αυξημένη παραγωγή PpIX όταν αυξανόταν η πυκνότητα των κυττάρων με αποτέλεσμα μείωση του pH του καλλιεργητικού μέσου (Steinbach P 1995). Ανεξάρτητα από την αιτία, η in vivo μελέτη της κινητικής του φθορισμού της PpIX που παράγεται μετά από επάλειψη με ALA, μπορεί να αποτελέσει κριτήριο αποκλεισμού από τη ΦΔΘ βλαβών που δεν αναπτύσσουν φθορισμό.

Οι μετρήσεις που έγιναν, ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στην κινητική του φθορισμού της PpIX μεταξύ των ασθενών. Οι αποκλίσεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην κερατίνη στιβάδα που καλύπτει τις βλάβες, ή μπορεί να αντιπροσωπεύουν πραγματικές διαφορές στο ρυθμό σχηματισμού και φωτοαποικοδόμησης του φωτοευαισθητοποιητή.

Ο χρόνος κατά τον οποίο παρατηρείται ο μέγιστος λόγος της μέσης έντασης του φθορισμού του κονδυλώματος/ τη μέση ένταση του φθορισμού του υγιούς δέρματος μετά από επάλειψη με ALA (Ratio-Peak Time), ήταν μεγαλύτερος στη μελέτη μας (6-11 ώρες), συγκρινόμενος με τους αντίστοιχους χρόνους που αναφέρουν



προηγούμενες έρευνες, που κυμαίνονται μεταξύ 1 και 3 ωρών (Fehr MK 1996, Ross EV 1997). Εντούτοις, ο Fehr εξέτασε μόνο κονδυλώματα αιδοίου, και η επάλειψη του ALA (σε συγκεντρώσεις 2.5% ή 20%) γινόταν σε ολόκληρο το περίνεο. Διαπιστώθηκε εκλεκτικός φθορισμός των κονδυλωμάτων μετά από σύντομο χρονικό διάστημα, κυρίως στις βλάβες που εντοπιζόνταν σε άτριχο επιθήλιο. Η μελέτη του Ross περιελάμβανε, εκτός από 19 κονδυλώματα, 2 κονδυλώματα στη βουβωνική χώρα και το περίνεο και 4 περιπρωκτικά. Σε εκείνη τη μελέτη παρατηρήθηκε ταχεία συσσώρευση της PpIX στα περιπρωκτικά κονδυλώματα, όπου είναι αναμενόμενο ότι η ενυδατωμένη κερατίνη στιβάδα διευκολύνει τη διείσδυση του φαρμάκου, ενώ τα κονδυλώματα πέους εμφάνισαν καθυστερημένη συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή, γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα. Τα ευρήματά μας συμφωνούν επίσης με πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες, όπου διαπιστώθηκε σιγμοειδής αύξηση της PpIX με το χρόνο επώασης σε ALA, η οποία έφθανε στη μέγιστη τιμή της μετά από 6-10 ώρες επώασης (Steinbach P 1994, Krammer B 1996, Eléouet S 2000), ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του ALA.

Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι όλες οι περιοχές που είχαν μόλυνση από HPV και βρίσκονταν μέσα στην περιοχή επάλειψης με ALA εμφάνισαν φθορισμό. Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού που υπολογίστηκε από διαφορετικές περιοχές σε κάθε ασθενή, συσχετίζεται με το βαθμό της μόλυνσης από τον ιό, όπως αυτός προσδιορίστηκε από την ιστολογία και το PCR, υποστηρίζοντας την εκλεκτικότητα της σύνθεσης και της συσσώρευσης της PpIX σε παθολογικούς ιστούς. Η ποσοτική μέτρηση της έντασης του φθορισμού επιτρέπει επίσης την ακριβή εντόπιση της έκτασης της μόλυνσης. Η ανίχνευση λανθάνουσας μόλυνσης από HPV σε περιβλαβικό δέρμα με *in vivo* μελέτη του φθορισμού, επιβεβαιώθηκε με PCR και συμφωνεί με έρευνες που αναφέρουν παρουσία του ιού σε απόσταση 1 cm από τα κλινικά όρια κονδυλωμάτων (MacNab JCM 1986, Ferenczy A 1991, Ward KA 1994).

Είναι ενδιαφέρον ότι η μέγιστη ένταση φθορισμού του κλινικού κονδυλώματος, της υποκλινικής βλάβης και της λανθάνουσας μόλυνσης στον ίδιο ασθενή επιτυγχάνεται το ίδιο χρονικό διάστημα. Έτσι, ξεκινώντας την ακτινοβολήση της περιοχής τη χρονική στιγμή που καταγράφεται ο μέγιστος λόγος της μέσης έντασης του φθορισμού του κονδυλώματος/ τη μέση ένταση του φθορισμού του υγιούς δέρματος, είναι λογικό ότι η ΦΔΘ θα καταστρέψει ταυτόχρονα τις ορατές και τις μη-ορατές (υποκλινικές και λανθάνουσες) εστίες του HPV. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί ικανή μείωση του αριθμού των σωματίων του ιού και κατ' επέκταση μείωση του ποσοστού υποτροπής των οξυτενών κονδυλωμάτων.

### 3.2 ΦΔΘ με ALA

Τα οξυτενή κονδυλώματα είναι μία συχνή σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσος, με δυνατότητα κακοήθους εκτροπής. Αν και αποτελούν επιδημιολογικό πρόβλημα, δεν υπάρχει ακόμα ιδανική θεραπεία, αφού όλες οι θεραπευτικές μέθοδοι έχουν σχετικά υψηλά ποσοστά υποτροπών (8-65%). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε καινούρια ανάπτυξη βλαβών που προέρχονται από υποκλινική ή λανθάνουσα μόλυνση, ή σε επαναμόλυνση από το σεξουαλικό σύντροφο. Καθώς η εκρίζωση του ιού είναι αδύνατη, όλες οι τεχνικές έχουν στόχο την καταστροφή των ορατών βλαβών. Η ΦΔΘ με ALA επιτρέπει την ταυτόχρονη καταστροφή πολλών βλαβών, είναι μη επεμβατική μέθοδος με άριστο αισθητικό αποτέλεσμα και δεν είναι μεταλλαξιογόνος. Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων c-myc και bcl-2 που έχει παρατηρηθεί *in vitro* μετά την εφαρμογή της σε κυτταρικές σειρές φυσιολογικών και εξαλλαγμένων κυττάρων, ίσως συμμετέχει στην επαγωγή της απόπτωσης και είναι παροδική (Verwanger T 1998). Ένα άλλο πλεονέκτημά της είναι η ικανότητά της να καταστρέφει τα παθολογικά κύτταρα με ελάχιστη ή και καμία βλαπτική δράση στον γύρω υγιή ιστό. Η κομψότητα της μεθόδου και η έλλειψη ανεπιθύμητων ενεργειών κάνει ελκυστική την εφαρμογή της στο δέρμα, ένα όργανο άμεσα προσπελάσιμο τόσο στο ALA όσο και στο φως, με δυνατότητα παρακολούθησης της κλινικής έκβασης.

Αν και η δράση της ΦΔΘ στη μόλυνση από HPV οφείλεται κυρίως στην καταστροφή των προσβεβλημένων κερατινοκυττάρων, έχει διαπιστωθεί ότι αδρανοποιεί σωμάτια μη ελυτροφόρων ιών χωρίς να προκαλεί θάνατο των κυττάρων-ξενιστών (Gaspard S 1995). Έχει προταθεί ότι τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή συνδέονται στις γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας των ιών, οδηγώντας σε αναστολή των πρώιμων φάσεων της μολυσματικής διεργασίας (North J 1992).

Οι Frank και Bos εφάρμοσαν τοπική ΦΔΘ σε οξυτενή κονδυλώματα χρησιμοποιώντας 20% ALA (Frank RG, Bos JD 1996) και ακτινοβολία μήκους κύματος 630 nm (λείζερ αργού) δίνοντας συνολική δόση 100 J/cm<sup>2</sup> (με ένταση 75 ή 150 mW/cm<sup>2</sup>) και πέτυχαν μείωση κατά 75-100% στις βλάβες των 5 από τους 7 ασθενείς. Σε όλες τις βλάβες η ακτινοβόληση γινόταν δύο ώρες μετά την απομάκρυνση του ALA, το οποίο είχε παραμείνει στην περιοχή 14 ώρες κάτω από κλειστή περίδεση, χωρίς να προηγηθεί *in vivo* μέτρηση του φθορισμού.

Αυτή είναι η πρώτη φορά που έγινε μελέτη της χωρικής και χρονικής κατανομής του φθορισμού της PpIX πριν την εφαρμογή και αξιολόγηση τοπικής ΦΔΘ με ALA σε οξυτενή κονδυλώματα. Η εξατομίκευση της ΦΔΘ επιτεύχθηκε με την έναρξη της ακτινοβόλησης τη χρονική στιγμή που καταγράφεται ο μέγιστος λόγος της μέσης

έντασης του φθορισμού του κονδυλώματος/ τη μέση ένταση του φθορισμού του υγιούς δέρματος (Ratio-Peak Time).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες από τη ΦΔΘ κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης εκτός από αίσθημα καύσου ή άλγους, που ήταν ανεκτό από όλους τους ασθενείς. Ο ερεθισμός του περιβλαβικού ιστού (ερύθημα, οίδημα, απολέπιση και διαβρώσεις) υποχωρούσε 3-5 μέρες μετά τη θεραπεία. Πρόκειται, επομένως, για μία ασφαλή μέθοδο με καλά αισθητικά αποτελέσματα, καθώς δεν προκλήθηκε ουλή ή δυσχρωμία. Γενικά, οι θεραπείες με λέιζερ προκαλούν θερμική βλάβη στους ιστούς και υπάρχει ο κίνδυνος δημιουργίας υπέρχρωσης, ιδιαίτερα σε σκουρόχρωμα άτομα, η οποία εμφανίζεται συνήθως ένα μήνα μετά τη θεραπεία και επιμένει για αρκετούς μήνες. Αντίθετα, στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε διάταξη μη σύμφωνης ακτινοβολίας με κατάλληλα φίλτρα μείωσης της υπέρυθρης ακτινοβολίας, με σκοπό την αποφυγή πρόκλησης θερμικής βλάβης στην πάσχουσα περιοχή.

Το ποσοστό ίασης που επιτεύχθηκε (72.9%) και η εκλεκτική συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στις περιοχές με μόλυνση συνηγορούν υπέρ της δυνατότητας εφαρμογής της τοπικής ΦΔΘ με ALA στη θεραπεία οξυτενών κονδυλωμάτων. Η καλύτερη κλινική ανταπόκριση (100%) παρατηρήθηκε στις βλάβες που έλαβαν συνολικά 100 J/cm<sup>2</sup> σε 1 συνεδρία. Όλες οι βλάβες που υποτροπίασαν κατά την περίοδο παρακολούθησης, είχαν λάβει στο παρελθόν θεραπεία με κρυοπηξία ή ποδοφυλλοτοξίνη και είχαν υποτροπιάσει. Τα αποτελέσματά μας υπαγορεύουν την ανάγκη μελέτης της κινητικής του φθορισμού της PpIX πριν τη ΦΔΘ, προκειμένου να αξιοποιηθεί η διαγνωστική πληροφορία που παρέχουν οι ενδογενείς πορφυρίνες και να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της ΦΔΘ με εξατομίκευση της θεραπείας.

Εκτός από το χρόνο στον οποίο γίνεται ακτινοβόληση θα πρέπει να διερευνηθούν και άλλες παράμετροι της ΦΔΘ, που μπορούν να οδηγήσουν σε πολυάριθμα θεραπευτικά σχήματα, όπως η συγκέντρωση του φαρμάκου, η ένταση και η δόση του φωτός σε κάθε συνεδρία, η συνολική δόση φωτός, ο αριθμός των συνεδριών και η χρονική απόσταση μεταξύ τους. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην κινητική του επαγόμενου φθορισμού μεταξύ ασθενών και βλαβών καθιστούν απαραίτητη την ανάπτυξη οργάνων και μεθοδολογίας για παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή στον ιστό και του ρυθμού φωτοαποικοδόμησής του, των μεταβολών στην οξυγόνωση και την αιμάτωση του ιστού κατά τη διάρκεια της θεραπείας κτλ. Η σε βάθος διερεύνηση των μηχανισμών ιστικής καταστροφής λόγω ΦΔΘ μπορεί να αποκαλύψει τρόπους

περαιτέρω αξιοποίησης των διαφορών μεταξύ παθολογικού και φυσιολογικού ιστού με σκοπό την αύξηση της αποτελεσματικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου.

#### **4. Συμπεράσματα**

- Η ποσοτική εκτίμηση της αλληλεπίδρασης οξεικού οξέος-ιστού δίνει τη δυνατότητα πρώιμης ανίχνευσης μεταβολών ή εξαλλαγής του δέρματος λόγω μόλυνσης από HPV και επιτρέπει τη χαρτογράφηση της προσβεβλημένης περιοχής.
- Οι διαφορές που σημειώθηκαν στις καμπύλες της IBSL με το χρόνο και της παραμέτρου ATR συσχετίζονται με την ιστολογική ταξινόμηση των βλαβών και το βαθμό προσβολής από τον ιό (υποκλινικές βλάβες, ύποπτες για κονδυλώματα, κονδυλώματα και κακοήθεις βλάβες), προσφέροντας κριτήρια in vivo σταδιοποίησης της μόλυνσης από HPV. Με τον τρόπο αυτό, η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτρέπει την αξιολόγηση των διαθέσιμων θεραπευτικών τεχνικών και μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών σχημάτων.
- Η τοπική επάλειψη με ALA προκαλεί εκλεκτική συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στις περιοχές με HPV-μόλυνση.
- Η in vivo μελέτη της κινητικής του φθορισμού της PpIX που παράγεται μετά από επάλειψη με ALA, μπορεί να αποτελέσει κριτήριο αποκλεισμού από τη ΦΔΘ βλαβών που δεν αναπτύσσουν φθορισμό.
- Οι μετρήσεις που έγιναν, ανέδειξαν σημαντικές διαφορές στην κινητική του φθορισμού της PpIX μεταξύ των ασθενών, ενώ η μέγιστη ένταση φθορισμού του κλινικού κονδυλώματος, της υποκλινικής βλάβης και της λανθάνουσας μόλυνσης στον ίδιο ασθενή επιτυγχάνεται το ίδιο χρονικό διάστημα.
- Ξεκινώντας την ακτινοβόληση της περιοχής τη χρονική στιγμή που καταγράφεται ο μέγιστος λόγος της μέσης έντασης του φθορισμού του κονδυλώματος/ τη μέση ένταση του φθορισμού του υγιούς δέρματος (Ratio-Peak Time), εξατομικεύεται η ΦΔΘ, με στόχο την ικανή μείωση του αριθμού των σωματίων του ιού και κατ' επέκταση την αύξηση του ποσοστού ανταπόκρισης και τη μείωση του ποσοστού υποτροπής των οξυτενών κονδυλωμάτων.
- Το ποσοστό ίασης που επιτεύχθηκε (72.9%), η εκλεκτική συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή στις περιοχές με μόλυνση από HPV και η ασφάλεια της μεθόδου συνηγορούν υπέρ της δυνατότητας εφαρμογής της τοπικής ΦΔΘ με ALA στη θεραπεία οξυτενών κονδυλωμάτων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Abels C, Szeimies RM, Steinbach P, Richert C, Goetz AE. Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene. *J Photochem Photobiol B*. 1997;40:305-12.

Abramson AL, Shikowitz MJ, Mullooly VM, Steinberg BM, Amella CA, Rothstein HR. Clinical effects of photodynamic therapy on recurrent laryngeal papillomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;118:25-9.

Alian W, Andersson-Engels S, Svanberg K, Svanberg S. Laser-induced fluorescence studies of meso-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in malignant and normal tissues in rats. *Br J Cancer*. 1994;70:880-5.

Ammann R, Hunziker T. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J Am Acad Dermatol*. 1995a;33:541.

Ammann R, Hunziker T, Braathen LR. Topical photodynamic therapy in verrucae. A pilot study. *Dermatology*. 1995b;191:346-7.

Andersson-Engels S, Ankerst J, Johansson J, Svanberg K, Svanberg S. Laser-induced fluorescence in malignant and normal tissue of rats injected with benzoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*. 1993;57:978-83.

Ankerst J, Montán S, Svanberg K, Svanberg S. Laser-induced fluorescence studies of hematoporphyrin derivative (HpD) in normal and tumour tissue of rat. *Appl Spectrosc*. 1984;38:890-6.

Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH, Bird CC. HPV in full thickness cervical biopsies: high prevalence in CIN 2 and CIN 3 detected by a sensitive PCR method. *J Pathol*. 1991;165:301-9.

Arumainayagam JT, Sumathipala AH, Smallman LA, Shahmanesh M. Flat condylomata of the penis presenting as patchy balanoposthitis. *Genitourin Med*. 1990;66:251-3.

Auler H, Banzer G. Untersuchungen ueber die rolle der porphyrine bei geschwulstranken menschen und tieren. *Z Krebsforsch*. 1942;53:65-8.

Baggish MS. Improved laser techniques for the elimination of genital and extragenital warts. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;153:545-50.

Baggish MS. Treating viral venereal infections with the CO<sub>2</sub> laser. *J Reprod Med*. 1982;27:737-42.

Baker DA, Douglas JM Jr, Buntin DM, Micha JP, Beutner KR, Patsner B. Topical podofilox for the treatment of condylomata acuminata in women. *Obstet Gynecol*. 1990;76:656-9.

Balas C. A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001;48:96-104.

Balas CJ, Themelis GC, Prokopakis EP, Orfanoudaki I, Koumantakis E, Helidonis ES. In vivo detection and staging of the epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics. *J Photochem Photobiol B.* 1999;53:153-7.

Banks L, Matlashewski G. Biochemical and biological activities of the HPV E5 proteins. In: Lacey C, editor. *Papillomaviruses reviews: Current research on papillomaviruses.* Leeds: Leeds University Press. 1996;39-45.

Barrasso R, Coupez F, Ionesco M, de Brux J. Human papilloma viruses and cervical intraepithelial neoplasia: the role of colposcopy. *Gynecol Oncol.* 1987;27:197-207.

Bashi SA. Cryotherapy versus podophyllin in the treatment of genital warts. *Int J Dermatol.* 1985;24:535-6.

Baumgartner R, Fisslinger H, Jocham D, Lenz H, Ruprecht L, Stepp H, Unsold E. A fluorescence imaging device for endoscopic detection of early stage cancer-instrumental and experimental studies. *Photochem Photobiol.* 1987;46:759-63.

Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth C. Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B.* 1996;36:169-74.

Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, Lutzner M, Worsaae N, Pehau-Arnaudet G, Orth G. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 1987;88:130-5.

Becker TM, Stone KM, Alexander ER. Genital human papillomavirus infection. A growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1987;14:389-96.

Bejui-Thivolet F, Chardonnet Y, Patricot LM. Human papillomavirus type 11 DNA in papillary squamous cell lung carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990;417:457-61.

Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, Brown JC, Kreider JW, Christensen ND, Baker TS. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol.* 1996;259:249-63.

Ben-Hur E, Oetjen J, Horowitz B. Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light causes apoptosis in HIV-infected cells. *Photochem Photobiol.* 1997;65:456-60.

Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 1995;33:690-5.

Bernard HU, Chan SY, Delius H. Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:33-54.

Beutner KR, Conant MA, Friedman-Kien AE, Illeman M, Artman NN, Thisted RA, King DH. Patient-applied podofilox for treatment of genital warts. *Lancet*. 1989;1(8642):831-4.

Beutner KR, Ferenczy A. Therapeutic approaches to genital warts. *Am J Med*. 1997;102:28-37.

Beutner KR, Tying SK, Trofatter KF Jr, Douglas JM Jr, Spruance S, Owens ML, Fox TL, Hougham AJ, Schmitt KA. Imiquimod, a patient-applied immune-response modifier for treatment of external genital warts. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:789-94.

Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, Tying SK, Fife K, Trofatter K, Stone KM. Genital warts and their treatment. *Clin Infect Dis*. 1999;28(Suppl 1):S37-56.

Black PH, Hartley JW, Rowe WP, Huebner RJ. Transformation of bovine tissue culture cells by bovine papilloma virus. *Nature*. 1963;199:1016-8.

Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, Macri C, Walker J, Peake M, Berman ML. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. *Hum Pathol*. 1991;22:711-8.

Boehncke WH, Sterry W, Kaufmann R. Treatment of psoriasis by topical photodynamic therapy with polychromatic light. *Lancet* 1994;343:801.

Bohmer RM, Morstyn G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. *Cancer Res*. 1985;45:5328-34.

Boiron M, Levy JP, Thomas M, Friedmann JC, Bernard J. Some properties of bovine papilloma virus. *Nature*. 1964;201:423-4.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:796-802.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*. 1984;3:1151-7.

Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*. 1994;13:5451-9.

Brown DR, Fife KH. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Med Clin North Am*. 1990;74:1455-85.

Buntin DM. The 1993 sexually transmitted disease treatment guidelines. *Semin Dermatol*. 1994; 13:269-74.

Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology*. 1989;170:334-9.

Byrne JC, Tsao MS, Fraser RS, Howley PM. Human papillomavirus-11 DNA in a patient with chronic laryngotracheobronchial papillomatosis and metastatic squamous-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1987;317:873-8.

Cairnduff F, Stringer MR, Hudson EJ, Ash DV, Brown SB. Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br J Cancer*. 1994;69:605-8.

Calzavara-Pinton PG. Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1995;29:53-7.

Campo S. Vaccination against papillomaviruses in cattle. *Clin Dermatol*. 1997;15:275-83.

Canti G, Franco P, Marelli O, Cubeddu R, Taroni P, Ramponi R. Comparative study of the therapeutic effect of photoactivated hematoporphyrin derivative and aluminum disulfonated phthalocyanines on tumor bearing mice. *Cancer Lett*. 1990;53:123-7.

Castro DJ, Saxton RE, Fetterman HR, Castro DJ, Ward PH. Rhodamine-123 as a new chemosensitizing versus toxic agent on human squamous carcinoma cells and fibroblast cultures. *J Clin Laser Med Surg*. 1992;10:83-90.

Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol*. 1995;69:3074-83.

Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Wang L, Wang D, Syrjanen K. Human papillomavirus involvement in esophageal precancerous lesions and squamous cell carcinomas as evidenced by microscopy and different DNA techniques. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27:553-63.

Charlesworth P, Truscott TG. The use of 5-aminolevulinic acid (ALA) in photodynamic therapy (PDT). *J Photochem Photobiol B*. 1993;18:99-100.

Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology*. 1994;37:150-8.

Cowled PA, Grace JR, Forbes IJ. Comparison of the efficacy of pulsed and continuous-wave red laser light in induction of photocytotoxicity by haematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*. 1984;39:115-7.

Crawford LV, Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology*. 1963;21:258-63.

Croissant O, Breitbart F, Orth G. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. *Clin Dermatol*. 1985;3:43-55.



Crum CP, Nagai N, Levine RU, Silverstein S. In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. *Am J Pathol.* 1986;123:174-82.

Damstra RJ, van Vloten WA. Cryotherapy in the treatment of condylomata acuminata: a controlled study of 64 patients. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17:273-6.

Daniel MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* 1991;61:340-8.

Das BC, Sharma JK, Gopalkrishna V, Das DK, Singh V, Gissmann L, zur Hausen H, Luthra UK. A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992;36:239-45.

de Jong-Tieben LM, Berkhout RJ, Smits HL, Bouwes Bavinck JN, Vermeer BJ, vander Woude FJ, ter Schegget J. High frequency of detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in biopsies from malignant and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Invest Dermatol.* 1995;105:367-71.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76:1057-62.

de Villiers EM, Hirsch-Behnam A, von Knebel-Doerberitz C, Neumann C, zur Hausen H. Two newly identified human papillomavirus types (HPV 40 and 57) isolated from mucosal lesions. *Virology.* 1989a;171:248-53.

de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wahrendorf J, Papendick U, zur Hausen H. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet.* 1987;2(8561):703-6.

de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol.* 1989b;63:4898-903.

de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:1-12.

Deau MC, Favre M, Jablonska S, Rueda LA, Orth G. Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2918-26.

Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori.* 1978;64:549-53.

Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol.* 1996;64:182-7.

Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet.* 1972;2(7788):1175-7.

DiMaio D, Petti L, Hwang ES. The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Semin Virol.* 1994;5:369-79.

Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions, *Oncol Rep.* 1998;5:1195-8.

Doorbar J. The E4 proteins and their role in the viral life cycle. In : Lacey C, editor. *Papillomaviruses reviews: Current research on papillomaviruses.* Leeds: Leeds University Press. 1996;31-8.

Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst.* 1975;55:115-21.

Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978;38:2628-35.

Doyle DJ, Henderson LA, LeJeune FE Jr, Miller RH. Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;120:1273-6.

Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:3812-5.

Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology.* 1992;189:132-40.

Duus BR, Philipsen T, Christensen JD, Lundvall F, Sondergaard J. Refractory condylomata acuminata: a controlled clinical trial of carbon dioxide laser versus conventional surgical treatment. *Genitourin Med.* 1985;61:59-61.

Edwards A, Atma-Ram A, Thin RN. Podophyllotoxin 0.5% v podophyllin 20% to treat penile warts. *Genitourin Med.* 1988;64:263-5.

Eléouet S, Rousset N, Carré J, Bourré L, Vonarx V, Lajat Y, Beijersbergen van Henegouwen GMJ, Patrice T. In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters. *Photochem Photobiol.* 2000;71:447-54.

Fabbrocini G, Di Costanzo MP, Riccardo AM, Quarto M, Colasanti A, Roberti G, Monfrecola G. Photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid for the treatment of plantar warts. *J Photochem Photobiol B.* 2001;15:30-4.

Farthing AJ, Vousden KH. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Trends Microbiol.* 1994;2:170-4.

Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine and human papillomaviruses. *J Virol.* 1975;15:1239-47.

Favre M, Breitbart F, Croissant O, Orth G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol.* 1977;21:1205-9.

Fehr MK, Chapman CF, Krasieva T, Tromberg BJ, McCullough JL, Berns MW, Tadir Y. Selective photosensitizer distribution in vulvar condyloma acuminatum after topical application of 5-aminolevulinic acid. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:951-7.

Felix JC, Cote RJ, Kramer EE, Saigo P, Goldman GH. Carcinomas of Bartholin's gland. Histogenesis and the etiological role of human papillomavirus. *Am J Pathol.* 1993;142:925-33.

Ferenczy A. Laser therapy of genital condylomata acuminata. *Obstet Gynecol.* 1984;63:703-7.

Ferenczy A. Laser treatment of genital papillomavirus infections in the male patient. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1991;18:525-35.

Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1948;68:640-1.

Fijan S, Honigsmann H, Ortel B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol.* 1995;133:282-8.

Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, Doak KW. Relationship of vessel constriction, vessel leakage, and release of vasoactive substances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1991;53(Suppl): S101.

Fisher AM, Murphree AL, Gomer CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1995;17:2-31.

Fitzpatrick TB, Pathak MA. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. *J Invest Dermatol.* 1959;23:229-31.

Foster TH, Primavera MC, Marder VG, Hilf R, Sporn LA. Photosensitized release of von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Cancer Res.* 1991;51:3261-6.

Fowler GJ, Rees RC, Devonshire R. The photokilling of bladder carcinoma cells in vitro by phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol.* 1990;52:489-94.

Frank RG, Bos JD. Photodynamic therapy for condylomata acuminata with local application of 5-aminolevulinic acid. *Genitourin Med.* 1996;72:70-1.

Friedmann JC, Levy JP, Lasnaret J, Thomas M, Boiron M, Bernard J. Induction de fibromes sous-cutanés chez le hamster doré par inoculation d'extraits acellulaires de papillomes bovins. *Compt Rend Acad Sci.* 1963;257:2328-31.

Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1998;134:207-14.

Fuchs PG, Pfister H. Papillomaviruses in epidermodysplasia verruciformis. In: Lacey C, editor. Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. Leeds: Leeds University Press. 1996;253-61.

Gabriel G, Thin RN. Treatment of anogenital warts. Comparison of trichloroacetic acid and podophyllin versus podophyllin alone. *Br J Vener Dis.* 1983;59:124-6.

Gaspard S, Tempete C, Werner GH. Studies on photoinactivation by various phthalocyanines of a free or replicating non-enveloped virus. *J Photochem Photobiol B.* 1995;31:159-62.

Gibson SL, Cupriks DJ, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in delta-aminolaevulinic acid (delta-ALA)-induced photosensitization? *Br J Cancer.* 1998;77:235-43.

Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol.* 1982;44:393-400.

Gissmann L, zur Hausen H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976;73:1310-3.

Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology.* 1977;76:569-80.

Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer.* 1980;25:605-9.

Go PM, Reed RN, Straight RC, Waner M. Laser photodynamic therapy for papilloma viral lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116:1177-80.

Gomer CJ, Luna M, Ferrario A, Rucker N. Increased transcription and translation of heme oxygenase in Chinese hamster fibroblasts following photodynamic stress or Photofrin II incubation. *Photochem Photobiol.* 1991;53:275-9.

Gomer CJ, Ryter SW, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Fisher AM. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res.* 1996;15:2355-60.

Grandadam M, Ingrand D, Huraux JM, Aveline B, Delgado O, Vever-Bizet C, Brault D. Photodynamic inactivation of cell-free HIV strains by a red-absorbing chlorin-type photosensitizer. *J Photochem Photobiol B.* 1995;31:171-7.

Gray MJ, Lipson R, Maeck JV, Parker L, Romeyn D. Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1967;99:766-71.

Gross G, von Krogh G. Therapy of anogenital HPV-induced lesions. *Clin Dermatol* 1997;15:457-470.

Grossman M, Wimberly J, Dwyer P, Flotte T, Anderson RR. PDT for hirsutism. *Lasers Surg Med.* 1995;7(Suppl):S44.

Guillou L, Sahli R, Chaubert P, Monnier P, Cuttat JF, Costa J. Squamous cell carcinoma of the lung in a nonsmoking, nonirradiated patient with juvenile laryngotracheal papillomatosis. Evidence of human papillomavirus-11 DNA in both carcinoma and papillomas. *Am J Surg Pathol*. 1991;15:891-8.

Haghighat S, Castro DJ, Lufkin RB, Fetterman HR, Castro DJ, Soudant J, Ward PH, Saxton RE. Laser dyes for experimental phototherapy of human cancer: comparison of three rhodamines. *Laryngoscope*. 1992;102:81-7.

Hasan T. Photosensitizer delivery mediated by macromolecular carrier systems. In: Henderson BW, Dougherty TJ, editors. *Photodynamic therapy. Basic principles and clinical applications*. New York: Marcel-Dekker. 1992;187-200.

He XY, Sikes RA, Thomsen S, Chung LW, Jacques SL. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem Photobiol*. 1994;59:468-73.

Hendrich C, Siebert WE. Photodynamic therapy for rheumatoid arthritis? *Lasers Surg Med*. 1997;21:359-64.

Hillemanns P, Weingandt H, Baumgartner R, Diebold J, Xiang W, Stepp H. Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer*. 2000;88:2275-82.

Hinselmann H. Verbesserung der inspektion von vulva, vagina und portio. *Münchener Medizinische Wochenschrift*. 1925;77:1733.

Hirano T, Ishizuka M, Suzuki K, Ishida K, Suzuki S, Miyaki S, Honma A, Suzuki M, Aizawa K, Kato H, Hayata Y. Photodynamic cancer diagnostics and treatment system consisting of pulse lasers and an endoscopic spectro-image analyzer. *Lasers Life Sci*. 1989;3:1-18.

Howley PM. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996;2045-76.

Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:570-4.

Hursthouse MW. A controlled trial on the use of topical 5-fluorouracil on viral warts. *Br J Dermatol*. 1975;92:93-6.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol 64. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1995.

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, Grussendorf-Conen EI, zur Hausen H. Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int J Cancer*. 1983;32:563-5.

Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 1972;32:583-9.

Jablonska S, Majewski S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:157-75.

Jablonska S, Millewski B. Zur Kenntnis der Epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky-Lutz. Positive Ergebnisse der Auto- und Heteroinokulation. *Dermatologica.* 1957;115:1-22.

Jensen SL. Comparison of podophyllin application with simple surgical excision in clearance and recurrence of perianal condylomata acuminata. *Lancet.* 1985;2(8465):1146-8.

Jonsson M, Karlsson R, Evander M, Gustavsson A, Rylander E, Wadell G. Acetowhitening of the cervix and vulva as a predictor of subclinical human papillomavirus infection: sensitivity and specificity in a population-based study. *Obstet Gynecol.* 1997;90:744-7.

Jori G. Low density lipoproteins-liposome delivery systems for tumour photosensitizers in vivo. In: Henderson BW and Dougherty TJ, editors. *Photodynamic therapy. Basic principles and clinical applications.* New York: Marcel-Dekker. 1992;173-186.

Kadish LJ, Fisher DB, Pardee AB. Photodynamic inactivation of free and vegetative bacteriophage T4. *Biochim Biophys Acta.* 1967;138:57-65.

Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:389-413.

Karrer S, Szeimies RM, Abels C, Wlotzke U, Stolz W, Landthaler M. Epidermodysplasia verruciformis treated using topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 1999;140:935-8.

Kawashima M, Favre M, Obalek S, Jablonska S, Orth G. Premalignant lesions and cancers of the skin in the general population: evaluation of the role of human papillomaviruses. *J Invest Dermatol.* 1990;95:537-42.

Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1976;115:150-1.

Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B.* 1990;6:143-8.

Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1992;14:275-92.

Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B.* 1998;42:89-95.

Kjaer SK, Engholm G, Teisen C, Haugaard BJ, Lynge E, Christensen RB, Moller KA, Jensen H, Poll P, Vestergaard BF. Risk factors for cervical human papillomavirus and herpes simplex virus infections in Greenland and Denmark: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1990;131:669-82.

Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:329-34.

Kostenich G, Orenstein A, Roitman L, Malik Z, Ehrenberg B. In vivo photodynamic therapy with the new near-IR absorbing water soluble photosensitizer lutetium texaphyrin and a high intensity pulsed light delivery system. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39:36-42.

Krammer B, Uberriegler K. In-vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B.* 1996;36:121-6.

Krebs HB. Management of human papillomavirus-associated genital lesions in men. *Obstet Gynecol.* 1989;73:312-6.

Krebs J. The role of calcium in apoptosis. *Biometals.* 1998;11:375-82.

Kyriazis GA, Balin H, Lipson RL. Hematoporphyrin-derivative-fluorescence test colposcopy and colpophotography in the diagnosis of atypical metaplasia, dysplasia, and carcinoma in situ of the cervix uteri. *Am J Obstet Gynecol.* 1973;117:375-80.

Laverty CR, Russell P, Hills E, Booth N. The significance of noncondylomatous wart virus infection of the cervical transformation zone. A review with discussion of two illustrative cases. *Acta Cytol.* 1978;22:195-201.

Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene.* 1992;7:19-25.

Lenard J, Vanderloef R. Photoinactivation of influenza virus fusion and infectivity by rose bengal. *Photochem Photobiol.* 1993;58:527-31.

Lenz P. Endoscopic fluorescence detector. *Rev Sci Instrum.* 1988;59:930-3.

Leonard JR, Beck WL. Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms. *Laryngoscope.* 1971;81:365-72.

Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ 2nd, Dotto GP, DiMaio D. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1991;65:7078-83.

Leunig A, Mehlmann M, Betz C, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R. Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies. *J Photochem Photobiol B.* 2001;60:44-9.

Lewandowsky F, Lutz W. Ein Fall einer bisher nicht beschrieben : Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruci-formis). *Arch Dermatol Syph (Berlin).* 1922;141:193-203.

Lim HW. Role mediators of inflammation and cells in porphyrin-induced phototoxicity. *SPIE Conf Proc.* 1989;1065:28-33.

Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Haematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1961a;42:623-9.

Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumour detection. *J Natl Cancer Inst.* 1961b;26:1-11.

Lofgren LA, Ronn AM, Nouri M, Lee CJ, Yoo D, Steinberg BM. Efficacy of intravenous delta-aminolaevulinic acid photodynamic therapy on rabbit papillomas. *Br J Cancer.* 1995;72:857-64.

Luna MC, Wong S, Gomer CJ. Photodynamic therapy mediated induction of early response genes. *Cancer Res.* 1994;54:1374-80.

Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol.* 1997;66:479-83.

Lutz W. A propos de l' Epidermodysplasie verruciforme. *Dermatologica.* 1946;92:30-43.

Lytle CD, Carney PG, Felten RP, Bushar HF, Straight RC. Inactivation and mutagenesis of herpes virus by photodynamic treatment with therapeutic dyes. *Photochem Photobiol.* 1989;50:367-71.

MacNab JC, Walkinshaw SA, Cordiner JW, Clements JB. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N Engl J Med.* 1986;315:1052-8.

Maddox P, Szarewski A, Dyson J, Cuzick J. Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. *J Clin Pathol.* 1994;47:15-7.

Malik Z, Dishi M, Garini Y. Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *Photochem Photobiol.* 1996;63:608-14.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of the polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989;7:209-14.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996;157:4830-6.

Marcus SL, Sobel RS, Golub AL, Carroll RL, Lundahl S, Shulman DG. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and development status. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:59-66.



Matsukura T, Koi S, Sugase M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology*. 1989;172:63-72.

Matsukura T, Sugase M. Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer*. 1995;61:13-22.

McDonnell JM, Mayr AJ, Martin WJ. DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Engl J Med*. 1989;320:1442-6.

Meffert H, Gaunitz K, Gutewort T, Amlong UJ. Therapy of acne with visible light. Decreased irradiation time by using a blue-light high-energy lamp. *Dermatol Monatsschr*. 1990;176:597-603.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol*. 1976;20:505-9.

Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV, Turgeon H. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol*. 1981;25:7-16.

Mew D, Wat CK, Towers GH, Levy JC. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumours with tumour-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J Immunol*. 1983;130:1473-1477.

MMWR. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. 1989;38(Suppl 8):S1-43.

Mohr H, Lambrecht B, Knuever-Hopf J. Virus inactivated single-donor fresh plasma preparations. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1992;19:79-83.

Mohr H, Pohl U, Lambrecht B, Wieding JU, Schmitt H. Methylene blue/light treatment of virus inactivated human plasma: production and clinical experience. *Infusionsther Transfusionsmed*. 1993;20(Suppl 2):S19-24.

Moy RL, Eliezri YD, Nuovo GJ, Zitelli JA, Bennett RG, Silverstein S. Human papillomavirus type 16 DNA in periungual squamous cell carcinomas. *JAMA*. 1989;261:2669-73.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.

Munger K. The molecular biology of cervical cancer. *J Cell Biochem Suppl*. 1995;23:55-60.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, Gonzalez LC, Kaldor JM, Guerrero I, Lörincz A, Santamaria M, Alonso De Ruiz P, Aristizabal N, Shah K. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 1992;52:743-9.

- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987;79:319-26.
- Nelson JS, Jeffes EWB, Weinstein JL, McCullough JL. Topical 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of psoriasis and actinic keratoses. *Lasers Surg Med Suppl.* 1995;7:43.
- Neyndorff HC, Bartel DL, Tufaro F, Levy JG. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion.* 1990;30:485-90.
- Nichols MG, Foster TH. Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Phys Med Biol.* 1994;39:2161-81.
- North J, Freeman S, Overbaugh J, Levy J, Lansman R. Photodynamic inactivation of retrovirus by benzoporphyrin derivative: a feline leukemia virus model. *Transfusion.* 1992a;32:121-8.
- North J, Neyndorff H, King D, Levy JG. Viral inactivation in blood and red cell concentrates with benzoporphyrin derivative. *Blood Cells.* 1992b;18:129-39.
- North J, Neyndorff H, Levy JG. Photosensitizers as virucidal agents. *J Photochem Photobiol B.* 1993;17:99-108.
- Nuovo GJ. A comparison of slot blot, Southern blot and in situ hybridization analyses for human papillomavirus DNA in genital tract lesions. *Obstet Gynecol.* 1989;74:673-8.
- Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromley SE. Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. *Am J Pathol.* 1991a;138:53-8.
- Nuovo GJ, Delvenne P, MacConnell P, Chalas E, Neto C, Mann WJ. Correlation of histology and detection of human papillomavirus DNA in vulvar cancers. *Gynecol Oncol.* 1991b;43:275-80.
- O'Brien JM, Gaffney DK, Wang TP, Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of enveloped viruses in blood products: site and mechanism of phototoxicity. *Blood.* 1992;80:277-85.
- Ogura H, Watanabe S, Fukushima K, Masuda Y, Fujiwara T, Yabe Y. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the respiratory and upper digestive tracts. *Jpn J Clin Oncol.* 1993;23:221-5.
- Oleinick NL. Mechanisms of cell death in response to PDT-induced oxidative stress. *Photochem Photobiol.* 1993;57(Suppl): S59.
- Olson C, Pamukcu AM, Brobst DF, Kowalczyk T, Satter EJ, Price JM. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res.* 1959;19:779-82.
- Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977;24:108-20.
- Orth G, Favre M. Human papillomavirus: biochemical and biologic properties. *Clin Dermatol.* 1985;3:27-42.

Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelska M, Rzeska G. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:1537-41.

Orth G. Epidermodysplasia verruciformis. In: Howley PM, Salzman NP, editors. *The papillomaviruses*. Vol 2. New York: Plenum Press. 1987;199-243.

Orth G. Human papillomaviruses: general features. In: Webster RG, Granhoff A, editors. *Encyclopedia of virology*. Vol 2. London: Academic Press. 1994;1013-21.

Palcic B, Lam S, Hung J, MacAulay C. Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques. *Chest*. 1991;99:742-3.

Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK, Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*. 1991;51:1014-9.

Park P, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR, Mohr IJ. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:8700-4.

Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:443-56.

Pecoraro G, Lee M, Morgan D, Defendi V. Evolution of in vitro transformation and tumorigenesis of HPV16 and HPV18 immortalized primary cervical epithelial cells. *Am J Pathol*. 1991;138:1-8.

Petersen CS, Albrechtsen J, Larsen J, Sindrup J, Tikjob G, Ottevanger V, Karlsmark T, Fogh H, Mogensen AM, Wolff-Sneedorff A. Subclinical human papilloma virus infection in condylomata acuminata patients attending a VD clinic. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1991;71:252-5.

Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology*. 1994;37:143-9.

Pfister H, Hettich I, Runne U, Gissmann L, Chiff GN. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia and leukoplakia lesions. *J Virol*. 1983;47:363-6.

Pfister H, ter Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol*. 1997;15:335-47.

Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 1992;7:27-32.

Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées à la lumière de Wood. *CR Soc Biol*. 1924;91:1423-4.

Profio AE, Balchum OJ. Fluorescence diagnosis of cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1985;193:43-50.

Profio AE, Doiron DR, Balchum OJ, Huth GC. Fluorescence bronchoscopy for localization of carcinoma in situ. *Med Phys.* 1983;10:35-9.

Profio AE, Doiron DR, Sarnaik J. Fluorometer for endoscopic diagnosis of tumors. *Med Phys.* 1984;11:516-20.

Raab O. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infuroria. *Z Biol.* 1900;19:524-6.

Rabson MS, Yee C, Yang YC, Howley PM. Bovine papillomavirus type 1 3' early region transformation and plasmid maintenance functions. *J Virol.* 1986;60:626-34.

Rasmussen-Taxdal DS, Ward GE, Figge FH. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer.* 1955;8:78-81.

Ratkay LG, Chowdhary RK, Iamaroon A, Richter AM, Neyndorff HC, Keystone EC, Waterfield JD, Levy JG. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits by induction of apoptosis of inflammatory cells with local application of transdermal photodynamic therapy. *Arthritis Rheum.* 1998;41:525-34.

Reid R, Herschman BR, Crum CP, Fu YS, Braun L, Shah KV, Agronow SJ, Stanhope CR. Genital warts and cervical cancer. V. The tissue basis of colposcopic change. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;149:293-303.

Riedl CR, Plas E, Pfluger H. Fluorescence detection of bladder tumors with 5-amino-levulinic acid. *J Endourol.* 1999;13:755-9.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 1993;197:176-87.

Roberts WG, Shiao FY, Nelson JS, Smith KM, Berns MW. In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:330-6.

Rogel-Gaillard C, Pehau-Arnaudet G, Breitburd F, Orth G. Cytopathic effect in human papillomavirus type 1-induced inclusion warts: in vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J Invest Dermatol.* 1993;101:843-51.

Rosenthal I, Murali Krishna C, Riesz P, Ben-Hur E. The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines. *Radiat Res.* 1986;107:136-42.

Ross EV, Romero R, Kollias N, Crum C, Anderson RR. Selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for condylomata after topical application of 5-aminolaevulinic acid: implications for photodynamic treatment. *Br J Dermatol.* 1997;137:736-42.

Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papilloma. *J Exp Med.* 1935;62:523-48.

Rous P, Beard JW. Carcinomatous change in virus-induced papillomas of the skin of the rabbit. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1934;32:578-80.

Rous P, Friedewald WF. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit papillomas. *J Exp Med*. 1944;79:511-37.

Rowson KE, Mahy BW. Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev*. 1967;31:110-31.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-91.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology*. 1992;24:476-80.

Saito T, Hayashi J, Sato H, Kawabe H, Aizawa K. Scanning electron microscopic analysis of acute photodynamic therapy for atherosclerotic plaques of rabbit aorta by using a pheophorbide derivative. *J Clin Laser Med Surg*. 1996;14:1-6.

Samuelsson B. Leucotrienes: mediators of immediate hyper-sensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983;220:568-75.

Santoro O, Bandieramonte G, Melloni E, Marchesini R, Zunino F, Lepera P, De Palo G. Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinomas. *Cancer Res*. 1990;50:4501-3.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. *J Urol*. 1992;147:389-92.

Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Heine A, Schopf E, Simon JC. In vitro and in vivo activation of hypericin with the incoherent light source PDT 1200 SOA (520-750 nm) and with solar simulated radiation (290-2500 nm). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999;15:13-7.

Scheurlen W, Gissmann L, Gross G, zur Hausen H. Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from akeraoacanthoma and a malignant melanoma. *Int J Cancer*. 1986;37:505-10.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:958-64.

Schiffman MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1345-7.

Schneede P, Munch P, Wagner S, Meyer T, Stockfleth E, Hofstetter A. Fluorescence urethroscopy following instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure for detecting clinical and subclinical HPV lesions of the urethra. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000;15:121-5.

Schnipper LE, Lewin AA, Swartz M, Crumpacker CS. Mechanisms of photodynamic inactivation of herpes simplex viruses: comparison between methylene blue, light plus electricity, and hematoporphyrin plus light. *J Clin Invest.* 1980;65:432-8.

Schultz RE, Miller JW, MacDonald GR, Auman JR, Peterson NR, Ward BE, Crum CP. Clinical and molecular evaluation of acetowhite genital lesions in men. *J Urol.* 1990;143:920-3.

Schultz RE, Skelton HG. Value of acetic acid screening for flat condylomata in men. *J Urol.* 1988; 139:777-9.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 1985;314:111-4.

Scinicariello F, Rady P, Saltzstein D, Orihuela E, Tyring SK. Human papillomavirus 16 exhibits a similar integration pattern in primary squamous cell carcinoma of the penis and in its metastasis. *Cancer.* 1992;70:2143-8.

Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology.* Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996;2077-109.

Shamanin V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, zur Hausen H, de Villiers EM. Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res.* 1994;54:4610-3.

Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Haustein UF, Jung EG. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:802-11.

Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 1988;167:225-30.

Shikowitz MJ, Abramson AL, Freeman K, Steinberg BM, Nouri M. Efficacy of DHE photodynamic therapy for respiratory papillomatosis: immediate and long-term results. *Laryngoscope.* 1998;108:962-7.

Shikowitz MJ, Steinberg BM, Abramson AL. Hematoporphyrin derivative therapy of papillomas. Experimental study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;112:42-6.

Shikowitz MJ. Comparison of pulsed and continuous wave light in photodynamic therapy of papillomas: an experimental study. *Laryngoscope.* 1992;102:300-10.

Schiller J, Vousden K, Vass WC, Lowy DR. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol.* 1986;57:1-6.

Simmons PD, Langlet F, Thin RN. Cryotherapy versus electrocautery in the treatment of genital warts. *Br J Vener Dis.* 1981;57:273-4.

Smetana Z, Ben-Hur E, Mendelson E, Salzberg S, Wagner P, Malik Z. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. *J Photochem Photobiol B*. 1998;44:77-83.

Smetana Z, Malik Z, Orenstein A, Mendelson E, Ben-Hur E. Treatment of viral infections with 5-aminolevulinic acid and light. *Lasers Surg Med*. 1997;21:351-8.

Sniidjers PJ, Schulten EA, Mullink H, ten Kate RW, Jiwa M, van der Waal I, Meijer CJ, Walboomers JM. Detection of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA sequences in oral mucosa of HIV-infected patients by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 1990a;137:659-66.

Sniidjers PJ, van den Brule AJ, Schrijnmakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*. 1990b;71:173-81.

Specht KG. The role of DNA damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1994;59:506-14.

Spikes JD. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *J Photochem Photobiol B*. 1990;6:259-74.

Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol*. 1986;43:691-9.

Stefanaki IM, Tosca AD, Themelis GC, Vazgiouraki EM, Dokianakis DN, Panayiotidis JG, Spandidos DA, Balas CJ. In vivo detection of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: A novel and accurate approach to a trivial method. *J Photochem Photobiol B*. 2001;65:115-21.

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*. 2000;10:351-6.

Steinbach P, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. Abhängigkeiten der ALA-induzierten fluoreszenz von zelltyp und wachstumsform. *Lasermedizin*. 1994;10:103.

Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol*. 1995;62:887-95.

Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, Abramson AL. Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. *N Engl J Med*. 1983;308:1261-4.

Stender IM, Lock-Andersen J, Wulf HC. Recalcitrant hand and foot warts successfully treated with photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid: a pilot study. *Clin Exp Dermatol*. 1999;24:154-9.

Stender IM, Na R, Fogh H, Gluud C, Wulf HC. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid or placebo for recalcitrant foot and hand warts: randomised double-blind trial. *Lancet*. 2000;355:963-6.

Stender IM, Wulf HC. Treatment of recalcitrant verrucae by photodynamic therapy with topical application of delta-aminolaevulinic acid. *Clin Exp Dermatol*. 1996;21:390.

Stone KM, Becker TM, Hadgu A, Kraus SJ. Treatment of external genital warts: a randomised clinical trial comparing podophyllin, cryotherapy, and electrodesiccation. *Genitourin Med*. 1990;66:16-9.

Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. "Crystalline" virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;72:46-50.

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:6613-7.

Suzuki H, Sato N, Kodama T, Okano T, Isaka S, Shirasawa H, Simizu B, Shimazaki J. Detection of human papillomavirus DNA and state of p53 gene in Japanese penile cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1994;24:1-6.

Svanberg K, Andersson T, Killander D, Wang I, Stenram U, Andersson-Engels S, Berg R, Johansson J, Svanberg S. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical delta-aminolevulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br J Dermatol*. 1994;130:743-51.

Szeimies RM, Hein R, Baumler W, Heine A, Landthaler M. A possible new incoherent lamp for photodynamic treatment of superficial skin lesions. *Acta Derm Venereol*. 1994;74:117-9.

Thomas M, Levy JP, Tanzer J, Boiron M, Bernard J. Transformation in vitro de cellules de peau de veau embryonnaire sous l' action d' extraits acellulaires de papillomes bovins. *Compt Rend Acad Sci*. 1963;257:2155-8.

Togawa K, Jaskiewicz K, Takahashi H, Meltzer SJ, Rustgi AK. Human papillomavirus DNA sequences in esophagus squamous cell carcinoma. *Gastroenterology*. 1994;107:128-36.

Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, Mori R. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer*. 1992;70:2234-8.

Toon PG, Arrand JR, Wilson LP, Sharp DS. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;293:1261-4.

Tornesello ML, Buonaguro FM, Beth-Giraldo E, Kyalwazi SK, Giraldo G. Human papillomavirus (HPV) DNA in penile carcinomas and in two cell lines from high-incidence areas for genital cancers in Africa. *Int J Cancer*. 1992;51:587-92.



Tosca AD, Balas CJ, Stefanidou MP, Katsantonis JC, Georgiou SK, Tzardi MN. Photodynamic treatment of skin malignancies with aminolevulinic acid. Emphasis on anatomical observations and in vivo erythema visual assessment. *Dermatol Surg.* 1996;22:929-34.

Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B.* 1993;21:103-24.

van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2739-43.

van der Bergh H. Photodynamic and photodetection of early cancer in the upper aerodigestive tract, the tracheobronchial tree, the oesophagus and the urinary bladder. In: Amaldi U, Larsson B, editors. *Hard on therapy in Oncology.* Amsterdam: Elsevier. 577-621.

van Leengoed E, Versteeg J, van der Veen N, van den Berg-Blok A, Marijnissen H, Star W. Tissue-localizing properties of some photosensitizers studied by in vivo fluorescence imaging. *J Photochem Photobiol B.* 1990;6:111-9.

van Ranst M, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol.* 1992;73:2653-60.

Vance JC, Bart BJ, Hansen RC, Reichman RC, McEwen C, Hatch KD, Berman B, Tanner DJ. Intralesional recombinant alpha-2 interferon for the treatment of patients with condyloma acuminatum or verruca plantaris. *Arch Dermatol.* 1986;122:272-7.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, Clark C, Tickman R, Hewan-Lowe K, Chenggis ML, Swan DC. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hum Pathol.* 1991;22:908-13.

Verwanger T, Schnitzhofer G, Krammer B. Expression kinetics of the (proto) oncogenes c-myc and bcl-2 following photodynamic treatment of normal and transformed human fibroblasts with 5-aminolaevulinic acid-stimulated endogenous protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B.* 1998;45:131-5.

Volter C, He Y, Delius H, Roy-Burman A, Greenspan JS, Greenspan D, de Villiers EM. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer.* 1996;66:453-6.

von Krogh G, Syrjänen SM, Syrjänen KJ. Advantage of human papillomavirus typing in the clinical evaluation of genitoanal warts. *J Am Acad Dermatol.* 1988;18:495-503.

von Tappeiner H, Jodlbauer A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoan und enzyme. *Dtsch Arch Klin Med.* 1904;80:427-87.

Ward KA, Winter PC, Walsh M, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papillomavirus by the polymerase chain reaction in histologically normal penile skin adjacent to penile warts. *Sex Transm Dis.* 1994;21:83-8.

Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1996;35:209-11.

Wheeler CM. Human Papillomavirus type-specific prevalence. In: Myers GM, Halpern A, Baker C, McBride A, Doorbar J, Wheeler C, editors. *Human Papillomaviruses 1996. A compilation of analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mex: LA-UR. 1996;3007.

Whitehurst C, Byrne KT, Morton C, Moore JV. Performance of a nonlaser light source for photodynamic therapy. *Proc SPIE.* 1995;2371:482-8.

Wierrani F, Kubin A, Jindra R, Henry M, Gharehbaghi K, Grin W, Soltz-Szotz J, Alth G, Grunberger W. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of intraepithelial neoplasia and human papillomavirus of the uterine cervix-a new experimental approach. *Cancer Detect Prev.* 1999;23:351-5.

Willett GD, Kurman RJ, Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Lorincz AT. Correlation of the histologic appearance of intraepithelial neoplasia of the cervix with human papillomavirus types. *Int J Gynecol Pathol.* 1989;8:15-25.

Winkelman J, Rasmussen-Taxdal DS. Quantitative determination of porphyrin uptake by tumour tissue following parenteral administration. *Bull Johns Hosp.* 1960;107:228-33.

Wolf P, Rieger E, Kerl H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid. An alternative treatment modality for solar keratoses, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas? *J Am Acad Dermatol.* 1993;28:17-21.

Wolf P. Photodynamische therapie (PDT). *Hautarzt.* 1997;48:137-48.

Young LS, Bevan IS, Johnson MA, Blomfield PI, Bromidge T, Maitland NJ, Woodman CB. The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. *BMJ.* 1989;298:14-8.

Zaki SR, Judd R, Coffield LM, Greer P, Rolston F, Evatt BL. Human papillomavirus infection and anal carcinoma. Retrospective analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1992;140:1345-55.

Zhou J, Frazer IH. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. *Papillomavirus Rep.* 1995;6:59-64.

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13:650-6.

zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976;36:794.

zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.* 1991;184:9-13.

zur Hausen H. Genital papillomavirus infections. In: Rigby PWJ, Wilkie NM, editors. *Viruses and Cancer.* Cambridge and University Press. 1986;83-90.

zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996a;1288:F55-78.

zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996b;122:3-13.

zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Eur J Cancer.* 1999;35:1174-81.