ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Ο.Ζώρας, Καθηγητής Χειρουργικής Ογκολογίας

ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΙΧΕΛΑΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η επίδραση της υπερθερμικής απομονωμένης διάχυσης μέλους στα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα και η συσχέτισή τους με την έκβαση της νόσου στον ασθενή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2021

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Ο.Ζώρας, Καθηγητής Χειρουργικής Ογκολογίας

ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ ΜΙΧΕΛΑΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η επίδραση της υπερθερμικής απομονωμένης διάχυσης μέλους στα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα και η συσχέτισή τους με την έκβαση της νόσου στον ασθενή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2021

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF SURGICAL ONCOLOGY

Head: O. Zoras, Professor of Surgical Oncology

DIMOSTHENIS MICHELAKIS

SURGEON

PhD Thesis

The effect of hyperthermic isolated limb perfusion on circulating melanoma cells and their correlation with the outcome of the disease in the patient

HERAKLION 2021

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής

Η επίδραση της υπερθερμικής απομονωμένης διάχυσης μέλους στα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα και η συσχέτισή τους με την έκβαση της νόσου στον ασθενή

Επιβλέπων Καθηγητής

Οδυσσέας Ζώρας

Καθηγητής Χειρουργικής Ογκολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης

Συνεπιβλέποντες Καθηγητές

Ιωάννης Σουγκλάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης

Χρήστος Ιωάννου

Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Καθηγητές Μέλη Επταμελούς Επιτροπής

Αλέξανδρος Στρατηγός

Καθηγητής Δερματολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών

Eelco de Bree

Καθηγητής Χειρουργικής-Χειρουργικής Ογκολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Ρωμανός

Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Ογκολογίας, Πανεπιστημίου Κρήτης

Κωνσταντίνος Λασιθιωτάκης

Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής, Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διαδακτορική διτριβή σχεδιάστηκε και ολοκληρώθηκε στην Κλινική Χειρουργικής Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Οδυσσέα Ζώρα, Καθηγητή Χειρουργικής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνήσει τον τρόπο που η περιοχική χημειοθεραπεία του μελανώματος επιδρά στα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα στην συστηματική κυκλοφορία του ασθενούς και αν η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων αυτών μπορεί να συσχετισθεί με την ανταπόκριση της νόσου στην θεραπεία και με την πορεία της συστηματικής νόσου στον ασθενή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Οδυσσέα Ζώρα, πρωτεργάτη και εμπνευστή αυτής της μελέτης, που με εμπιστεύθηκε για να διεκπεραιώσω αυτή την έρευνα και για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του στην μακρόχρονη και επίπονη διεξαγωγή της.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Σουγκλάκο που με μύησε στον κόσμο της μοριακής βιολογίας του καρκίνου και για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε μαζί με τον κ. Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, στην ανάλυση των δειγμάτων της μελέτης μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Ιωάννου για την πολύτιμη βοήθεια του, χωρίς την οποία η εκτέλεση των επεμβάσεων θα ήταν δύσκολη ή και κάποιες φορές αδύνατη.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Λασηθιωτάκη, Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, ενός από τους πρωτεργάτες στον σχεδιασμό και την εκτέλεση της μελέτης στα αρχικά της στάδια, για την καθοδήγηση και την βοήθεια του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στην δημοσίευση της δουλειάς μας.

Ευχαριστώ από καρδιάς όλους τους συνάδελφους που με βοήθησαν σε αυτό το δύσκολο ταξίδι γνώσης, καθώς και τους νοσηλευτές του χειρουργείου και της κλινικής Χειρουργικής Ογκολογίας χωρίς τους οποίους τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 10
SUMMARY 12
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....1
1.1 Επίπτωση.....1
1.2. Παράγοντες κινδύνου 3
1.3. Διάγνωση.....4
1.4. Παθολογοανατομία-Σταδιοποίηση-Πρόγνωση.....8
1.5. Πρόληψη.....11
1.6. Θεραπεία.....12
1.6.1. Χειρουργική θεραπεία.....12
1.6.2. Χημειοθεραπεία.....13
1.6.3. Φωτοδυναμική θεραπεία 13
1.6.4. Ανοσοθεραπεία.....13
1.6.5. Στοχευμένη θεραπεία 15
II. Ο ΔΡΟΜΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....16
2.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ .16
2.1.1 Η προέλευση του μελανοκυττάρου 16
2.1.2 Ο ρόλος του MITF.....18
2.1.3 Το χρώμα του δέρματος και η λειτουργία του μελανοκυττάρου 19
2.2. ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ Η ΠΡΟΟΔΟΣ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ 20
2.3. Η ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΣΤΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ 25
2.3.1 Μετάσταση: ένα σύνολο σύνθετων βιολογικών βημάτων 25
2.3.2. Η μετάσταση στο μελάνωμα δέρματος.....27
III. Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝΤΟΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΜΦΟΓΕΝΟΥΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ 31
3.1. IN-TRANSIT (ΚΑΘ'ΟΔΩΝ) ΚΑΙ ΔΟΡΥΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΕΙΣ.....31
3.2. HYPERTHERMIC ISOLATED LIMB PERFUSION (Υπερθερμική διάχυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε αγγειακά απομονωμένο μέλος)-HILP 32
3.2.1. Η τεχνική.....32
3.2.2. Μελφαλάνη 36
3.2.3 Υπερθερμία 36
3.2.4 Tumor Necrosis Factor a (TNFa).....37

3.2.5 Η τοξικότητα του HILP.....38
3.2.6 Η θέση του HILP στην σύγχρονη θεραπεία του μελανώματος 39
IV. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (Circulating Melanoma Cells-CMCs) 40
V. ΣΚΟΠΟΣ.....43
VI. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....45
4.1. Στατιστική ανάλυση.....48
VII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 48
7.1. Συσχέτιση των CMCs με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....50
7.2. Μεταβολές των CMCs μετά το HILP.....50
7.3. Συσχέτιση των CMCs με την ανταπόκριση στο HILP.....54
7.4. Συσχέτιση των CMCs με την ειδική για την νόσο επιβίωση 55
VIII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 56
IX. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 61
X. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....63

…there are no endings

only new beginnings…

Αφιερωμένο στην Όλγα, τον Νικόλα και τον Αντώνη,

για τις θυσίες που κάνουν καθημερινά προκειμένου

να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μελάνωμα είναι ο πιο θανατηφόρος καρκίνος του δέρματος και η επίπτωσή του αυξάνεται ραγδαίως ετησίως ανά τον κόσμο. Χαρακτηριστικά όπως το ανοιχτόχρωμο δέρμα και τα κόκκινα μαλλιά σχετίζονται με συχνότερη ανάπτυξη μελανώματος. Οι συνήθειες έκθεσης στον ήλιο επίσης αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος. Τέλος μεταλλάξεις γενετικών παραγόντων μπορούν να δώσουν αρχή τόσο σε οικογενές όσο και σε σποραδικό μελάνωμα. Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία ωστόσο, καθορίζεται ως ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος.

Η διάγνωση του μελανώματος ξεκινά με το ιστορικό του ασθενούς και την εξέταση του δέρματος. Όλες οι μελαγχρωματικές βλάβες πρέπει να ελέγχονται για ασυμμετρία, ακανόνιστα όρια, χρωματική ποικιλία, διάμετρο και την εξέλιξη τους στον χρόνο. Ο χρυσός κανόνας της διάγνωσης του μελανώματος είναι η χειρουργική βιοψία εκτομής.

Διακρίνουμε τέσσερις τύπους μελανώματος: το επιφανειακώς εξαπλούμενο, το οζώδες, το δίκην κακοήθους φακής και το φακοειδές μελάνωμα των άκρων. Κάθε ένας τύπος έχει ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Σημαντικά παθολογοανατομικά στοιχεία, τα οποία είναι κρίσιμα για την διαχείριση του ασθενούς και τις θεραπευτικές αποφάσεις είναι: το βάθος διήθησης κατά Breslow, η εξέλκωση του πρωτοπαθούς όγκου, το επίπεδο διήθησης κατά Clark, η μιτωτική δραστηριότητα ανά mm^2, η λεμφοκυτταρική διήθηση του όγκου, η λεμφαγγειακή διήθηση, η περινευριδιακή διήθηση και η υποστροφή. Σημαντική προγνωστική αξία έχει και η διήθηση ή μη των περιοχικών λεμφαδένων, καθώς και η ύπαρξη ή όχι καθ'οδών ή/και δορυφόρων μεταστάσεων. Καθοριστικό ρόλο για την πρόγνωση της νόσου έχει και η ύπαρξη ή όχι συστηματικών μεταστάσεων.

Σημαντική είναι η πρόληψη στο μελάνωμα. Στην εκδήλωση της νόσου μπορούν να εφαρμοστούν οι παρακάτω θεραπείες: Χειρουργική, χημειοθεραπεία, φωτοδυναμική θεραπεία, ανοσοθεραπεία, στοχευμένη θεραπεία και συνδυασμός αυτών.

Ο ΔΡΟΜΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Η μετανάστευσή τους στην επιδερμίδα, η ανάπτυξη τους, η επιβίωση και διαφοροποίησή τους ελέγχονται από τον μεταγραφικό παράγοντα σχετιζόμενο με την μικροφθαλμία (MITF) με πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια και με πολλά γονίδια στόχους. Οποιαδήποτε διαταραχή στα επίπεδα έκφρασης και στην ρύθμιση της λειτουργίας του MITF μπορεί να πυροδοτήσει ανάπτυξη του μελανώματος.

Η μετάσταση είναι μια σύνθετη πολυφασική διαδικασία. Το μελάνωμα λόγω της προέλευσης των κυττάρων από την νευρική ακρολοφία είναι ανθεκτικό στις αντίξοες συνθήκες κατά την διάρκεια της μετάστασης. Μεθίσταται χρησιμοποιώντας μηχανισμούς πλαστικότητας σχετικούς με τις εναλλαγές των κακοήθων ιδιοτήτων όπως πολλαπλασιασμός, διήθηση και ογκογένεση. Κύριος διαμεσολαβητής αυτών των εναλλαγών είναι ο MITF.

ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ

Το υποτροπιάζον μελάνωμα των άκρων υπό την μορφή των καθ'οδών ή/και δορυφόρων μεταστάσεων, αποτελεί μια θεραπευτική πρόκληση λόγω της μεγάλης αντίστασης που παρουσιάζει στα διάφορα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Η υπερθερμική

διάχυση χημειοθεραπευτικών και βιολογικών παραγόντων σε αγγειακά απομονωμένο μέλος (HILP) είναι μια αναγνωρισμένη μέθοδος περιοχικής χημειοθεραπείας με πολύ καλά αποτελέσματα. Η χρήση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNFα) οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων του όγκου προκαλώντας μεγάλη διείσδυση του χημειοθεραπευτικού (Μελφαλάνη) και αιμορραγική νέκρωση του όγκου.

ΣΚΟΠΟΣ

Οι σύγχρονες μελέτες συμπεριλαμβάνουν τα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα (CMCs) στους πιο εξειδικευμένους βιοδείκτες της νόσου. Λόγω του μηχανισμού δράσης του TNFα-Melphalan-HILP, υποθέσαμε ότι σημαντικός αριθμός μελανωματικών κυττάρων απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία του ασθενούς.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί η επίδραση του HILP στην συγκέντρωση των CMCs και να ερευνηθεί αν η μεταβολή των CMCs επιδρά στην ειδική για την νόσο επιβίωση, αν συσχετίζεται με την ανταπόκριση στην θεραπεία ή αν, τέλος επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 20 ασθενείς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε TM-HILP για υποτροπιάζον μη χειρουργήσιμο μελάνωμα των άκρων, σταδίου IIIB-IIID. Τα CMCs στο περιφερικό αίμα αναλύθηκαν σε πέντε χρονικές στιγμές από την προεγχειρητική ημέρα έως την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους βιοδείκτες: MITF, Tyrosinase mRNA, Melan-A και S100b μέσω ποσοτικής RT-PCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν βρέθηκαν CMCs ούτε διαπιστώθηκαν μεταβολές τους, σε κανένα ασθενή, σύμφωνα με τους βιοδείκτες Melan-A και Tyrosinase. Το test Friedman έδειξε σημαντικές μεταβολές περιεγχειρητικά για τον βιοδείκτη MITF ($p<0,001$) και για τον S100b ($p=0,001$). Τα test κατά ζεύγη έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές ($p<0,05$). Τα test κατά ζεύγη για τον βιοδείκτη S100b έδειξαν σημαντική διαφορά μεταξύ του διεγχειρητικού δείγματος και της έβδομης μετεγχειρητικής ημέρας ($p<0,0001$). Οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση στην θεραπεία με TM-HILP (n=12) είχαν υψηλότερες μέσες τιμές MITF και η διαφορά ήταν σημαντική μεταξύ του διεγχειρητικού δείγματος ($p=0,014$) και της πρώτης μετεγχειρητικής ημέρας ($p=0,046$). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών του MITF και του S100b με την τετραετή ειδική για την επιβίωση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επέμβαση του HILP προκαλεί αύξηση του αριθμού των CMCs στην συστηματική κυκλοφορία του ασθενούς, ειδικά την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF. Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των CMCs και της επιβίωσης. Οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση στο HILP είχαν υψηλότερες τιμές MITF άμεσα μετεγχειρητικά από τους ασθενείς με μη-πλήρη ανταπόκριση.

SUMMARY

INTRODUCTION

Melanoma is the deadliest skin cancer, and its incidence is increasing rapidly every year around the world. Characteristics such as light skin and red hair are associated with more frequent melanoma development. Sun exposure habits are also a risk factor for developing melanoma. Finally, mutations in genetic factors can trigger both familial and sporadic melanoma. Exposure to ultraviolet radiation, however, is identified as the most important risk factor for developing melanoma.

The diagnosis of melanoma begins with the patient's history and skin examination. All pigmented lesions should be checked for asymmetry, irregular borders, color variety, diameter, and evolution over time. The golden rule for diagnosing melanoma is surgical resection biopsy.

We distinguish four types of melanoma: superficial, nodular, lentigo maligna and lenticular melanoma of the extremities. Each type has separate characteristics. Crucial pathological elements that are important for patient management and treatment decisions are: Breslow infiltration depth, primary tumor ulceration, Clark infiltration level, mitotic activity per mm^2, tumor cell infiltration, lymphatic infiltration, perineural infiltration and regression. The infiltration or not of the regional lymph nodes, as well as the presence or absence of in-transit and/or satellite metastases, is also of significant prognostic value. The existence or not of systemic metastases has a decisive role for the prognosis of the disease.

Prevention of melanoma is important. The following treatments can be applied to the manifestation of the disease: Surgery, chemotherapy, photodynamic therapy, immunotherapy, targeted therapy, and a combination of these.

THE ROAD TO MELANOMA

Melanocytes are derived from cells of the neural crest. Their migration to the skin, their growth, survival, and differentiation are controlled by the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) with multiple signaling pathways and multiple target genes. Any disturbance in the expression levels and regulation of MITF function can trigger the development of melanoma.

Metastasis is a complex multiphase process. Melanoma due to the origin of the cells from the neural crest is resistant to adverse conditions during metastasis. It metastasizes using plasticity mechanisms related to the alternation of malignant properties such as proliferation, filtration and oncogenesis. The main mediator of these rotations is the MITF.

RECURRENT MELANOMA OF THE LIMBS

Recurrent limb melanoma in the form of in-transit and/or satellite metastases is a therapeutic challenge due to the high resistance it presents in the various treatment protocols. Hyperthermic diffusion of chemotherapeutic and biological agents into a vascularly isolated organ (HILP) is a recognized method of regional chemotherapy with particularly good results. The use of tumor necrosis factor alpha (TNFα) leads to increased vascular permeability of the tumor causing high penetration of the chemotherapeutic agent (Melphalan) and hemorrhagic tumor necrosis.

PURPOSE

Modern studies include circulating melanoma cells (CMCs) in the most specialized biomarkers of the disease. Due to the mechanism of action of TNFα-Melphalan-HILP, we assumed that a significant number of melanoma cells are released into the patient's systemic circulation.

The aim of this study was to evaluate the effect of HILP on CMCs concentration and to investigate whether alteration of CMCs affects disease-specific survival, if it is associated with response to treatment, or whether it ultimately affects disease progression.

METHODS

The study included 20 patients who underwent TM-HILP for recurrent unresectable limb melanoma, stage IIIB-IIID. Peripheral blood CMCs were analyzed at five time points from the preoperative day to the seventh postoperative day using the following biomarkers: MITF, Tyrosinase mRNA, Melan-A and S100b by quantitative RT-PCR.

RESULTS

No CMCs were found or altered in any patients according to the Melan-A and Tyrosinase biomarkers. The Friedman test showed significant perioperative changes for the MITF biomarker ($p<0.001$) and for the S100b ($p=0.001$). Paired tests showed a significant increase in MITF levels on the seventh postoperative day compared to other time points ($p<0.05$). Paired tests for the S100b biomarker showed a significant difference between the intraoperative sample and the seventh postoperative day ($p<0.0001$). Patients with complete response to TM-HILP therapy (n=12) had higher mean MITF values and the difference was significant between the intraoperative sample ($p=0.014$) and the first postoperative day ($p=0.046$). There was no correlation between the changes in the MITF and the S100b with the four-year disease specific survival.

CONCLUSIONS

HILP surgery causes an increase in the number of CMCs in the patient's systemic circulation, especially on the seventh postoperative day according to the MITF biomarker. There was no correlation between increased CMCs and survival. Patients with a complete response had higher MITF values immediately postoperatively than patients with a non-complete response.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μελάνωμα είναι ένας κακοήθης όγκος που προέρχεται από μελανοκύτταρα (ή μελανινοκύτταρα) του χοριοεπιδερμικού ορίου. Εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και στον οφθαλμό (στον επιπεφυκότα και στην ίριδα), στις μήνιγγες καθώς και, σε άλλους βλεννογόνους. Συνήθως οι βλάβες του μελανώματος παρουσιάζουν έντονη μελάγχρωση, αλλά υπάρχουν και αμελανωτικοί όγκοι [1].

1.1 Επίπτωση

Το μελάνωμα αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου σχετιζόμενη με καρκίνο του δέρματος. Μέχρι πρόσφατα, εθεωρείτο ένας σπάνιος καρκίνος. Η επίπτωσή του όμως, έχει αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες παγκοσμίως. Μόνο στις ΗΠΑ οι νέες περιπτώσεις μελανώματος για το 2020 έφτασαν τις 100350, αποτελώντας το 5,6% των νέων περιπτώσεων καρκίνου. Οι υπολογιζόμενοι θάνατοι από μελάνωμα είναι 6850 και αποτελούν το 1% των θανάτων από καρκίνο [2]

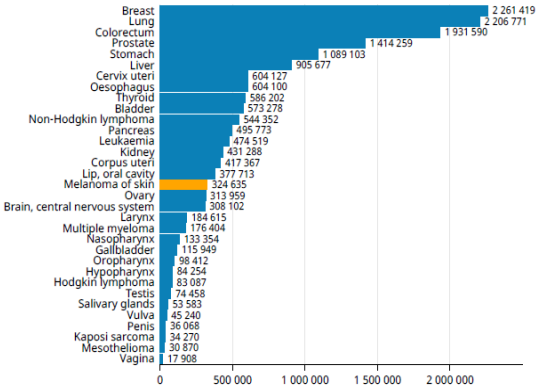
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπάρχει αύξηση των περιστατικών μελανώματος κατά 50% ετησίως, την τελευταία δεκαετία, ξεπερνώντας τα 287000 περιστατικα το 2018 [3]. Μέχρι το 2040 παγκοσμίως, σχεδόν μισό εκατομμύριο άνθρωποι θα διαγιγνώσκονται ετησίως με μελάνωμα, ενώ σχεδόν 106000 θα πεθαίνουν ετησίως από αυτό [4]. Σύμφωνα με το GLOBOCAN-CANCER TODAY [3], το 2020 τα νέα περιστατικά μελανώματος έφτασαν τις 324635 παγκοσμίως και οι θάνατοι τους 57043 ετησίως. Από αυτά τα περιστατικά τα 150627 αντιστοιχούν στην Ευρώπη, με 26360 θανατους αντίστοιχα (46,4% των περιστατικών και 46,2% των θανάτων) (Εικόνα 1)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

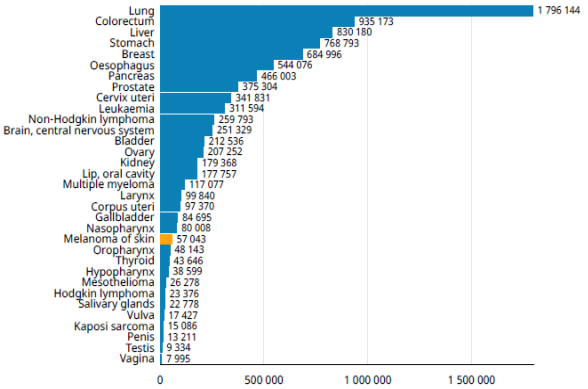
Melanoma of skin

Source: Globocan 2020

Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



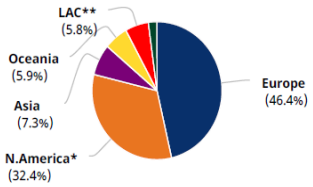
Number of deaths in 2020, both sexes, all ages



Cancer incidence and mortality statistics worldwide and by region

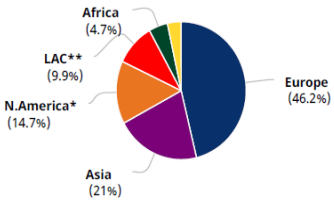
	Incidence						Mortality					
	Both sexes		Males		Females		Both sexes		Males		Females	
	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)
Eastern Africa	2 056	0.10	735	0.07	1 321	0.12	856	0.04	305	0.03	551	0.05
Middle Africa	1 099	0.19	593	0.23	506	0.15	469	0.08	255	0.10	214	0.07
Northern Africa	968	0.05	478	0.05	490	0.05	429	0.02	205	0.02	224	0.02
Southern Africa	1 885	0.36	968	0.45	917	0.29	517	0.10	288	0.13	229	0.08
Western Africa	955	0.06	337	0.04	618	0.07	408	0.02	140	0.02	268	0.03
Caribbean	414	0.07	232	0.09	182	0.06	179	0.03	105	0.04	74	0.02
Central America	2 452	0.15	1 199	0.16	1 253	0.13	959	0.05	564	0.07	395	0.04
South America	16 015	0.29	7 802	0.32	8 213	0.27	4 519	0.08	2 546	0.10	1 973	0.06
Northern America	105 172	1.76	61 675	2.06	43 497	1.50	8 412	0.12	5 443	0.16	2 969	0.08
Eastern Asia	10 427	0.04	5 414	0.05	5 013	0.04	5 436	0.02	2 917	0.02	2 519	0.02
South-Eastern Asia	3 275	0.05	1 742	0.06	1 533	0.05	1 616	0.03	848	0.03	768	0.02
South-Central Asia	6 232	0.04	3 312	0.04	2 920	0.03	3 579	0.02	2 004	0.02	1 575	0.02
Western Asia	3 819	0.17	1 922	0.18	1 897	0.16	1 355	0.05	807	0.07	548	0.04
Central and Eastern Europe	27 993	0.62	12 191	0.65	15 802	0.60	9 272	0.18	4 614	0.23	4 658	0.15
Western Europe	65 168	1.99	34 745	2.11	30 423	1.89	7 415	0.16	4 300	0.20	3 115	0.12
Southern Europe	23 915	0.93	12 436	0.99	11 479	0.88	4 926	0.15	2 977	0.20	1 949	0.10
Northern Europe	33 551	1.91	16 937	1.92	16 614	1.91	4 747	0.20	2 814	0.26	1 933	0.15
Australia and New Zealand	18 972	3.96	11 003	4.67	7 969	3.29	1 880	0.27	1 212	0.36	668	0.18
Melanesia	240	0.33	109	0.28	131	0.38	64	0.08	37	0.08	27	0.08
Polynesia	27	0.42	14	0.47	13	0.38	5	0.10	4	0.14	1	0.05
Micronesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Low HDI	3 728	0.09	1 538	0.08	2 190	0.09	1 647	0.04	686	0.04	961	0.04
Medium HDI	7 121	0.04	3 629	0.04	3 492	0.04	3 863	0.02	2 085	0.02	1 778	0.02
High HDI	35 597	0.10	17 517	0.10	18 080	0.09	13 167	0.04	7 255	0.04	5 912	0.03
Very high HDI	277 993	1.12	151 055	1.25	126 938	1.02	38 352	0.13	22 351	0.16	16 001	0.09
World	324 635	0.37	173 844	0.42	150 791	0.33	57 043	0.06	32 385	0.07	24 658	0.05

Incidence, both sexes



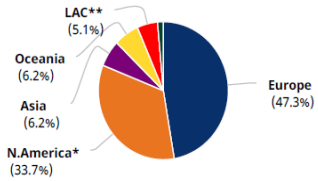
	Population	Number
	Europe	150 627
	*Northern America	105 172
	Asia	23 753
	Oceania	19 239
	**Latin America and the Caribbean	18 881
	Africa	6 963
	Total	324 635

Mortality, both sexes



	Population	Number
	Europe	26 360
	Asia	11 986
	*Northern America	8 412
	**Latin America and the Caribbean	5 657
	Africa	2 679
	Oceania	1 949
	Total	57 043

5-year prevalence, both sexes



	Population	Number
	Europe	517 196
	*Northern America	368 049
	Asia	68 197
	Oceania	68 070
	**Latin America and the Caribbean	55 663
	Africa	15 643
	Total	1 092 818

Εικόνα 1.Επίπτωση και νοσηρότητα του μελανώματος. GLOBOCAN 2020

Σύμφωνα με την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μελανώματος (ΕΕΜΜ) στην Ελλάδα η συχνότητα της νόσου βαίνει αυξανόμενη και υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο 3 -4 άτομα ανά 100000 κατοίκους εμφανίζουν μελάνωμα. Στην Κρήτη σύμφωνα με την ΕΕΜΜ η επίπτωση είναι μεγαλύτερη με 4-5 άτομα ανά 100000 κατοίκους ανά έτος. Η θνησιμότητα στην Ελλάδα το 2016 είχε υπολογιστεί στο 0,9 άτομα ανά 100000 κατοίκους ανά έτος [5].

1.2. Παράγοντες κινδύνου

Τα περισσότερα μελανώματα αναπτύσσονται σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα. Για το λόγο αυτό, χαρακτηριστικά όπως κόκκινα μαλλιά, μπλε μάτια, λευκό δέρμα επιρρεπές στα εγκαύματα και ανίκανο για μαύρισμα και οι φακίδες συσχετίζονται με αυξημένο ρίσκο για την ανάπτυξη μελανώματος. Είναι σπάνιο σε μη-λευκούς πληθυσμούς στους οποίους συναντάται στις προστατευμένες από τον ήλιο επιφάνειες όπως οι παλάμες, τα πέλματα και οι βλεννογόνοι. Ο πιο σταθερός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος είναι η παρουσία μεγάλου αριθμού καλοηθών και δυσπλαστικών σπίλων. Ασθενείς με σύνδρομο άτυπων σπίλων (>100 μελανοκυτταρικοί σπίλοι >2 mm σε διάμετρο και δύο ή περισσότεροι δυσπλαστικοί σπίλοι) είναι σε ιδιαίτερα υψηλό ρίσκο ανάπτυξης μελανώματος. Ενδείξεις ηλιακής βλάβης του δέρματος όπως ηλιακή ελάστωση, ηλιακή κεράτωση και ηλιακές φακίδες συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση μελανώματος. Η ηλιακή κεράτωση και τα μη-μελανωματικά καρκινώματα του δέρματος είναι παράγοντες κινδύνου σε ηλικιωμένους ασθενείς οι οποίοι μπορούν να αναπτύξουν μελάνωμα σε σημεία με χρόνια έκθεση στον ήλιο [6]. Ιστορικό προηγούμενου μελανώματος αυξάνει το ρίσκο σχεδόν δέκα φορές για την ανάπτυξη δεύτερου πρωτοπαθούς μελανώματος μέσα σε δύο χρόνια από την διάγνωση της πρώτης βλάβης. Ένα οικογενειακό ιστορικό μελανώματος αποτελεί επίσης σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος [7].

Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι ο επικρατέστερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου. Οι συνήθειες έκθεσης στον ήλιο όπως στις διακοπές και το ιστορικό ηλιακών εγκαυμάτων κατά την παιδική ηλικία αποτελούν κύριους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία Α αποτελεί το 98,7% της υπεριώδους (ultraviolet UV) ακτινοβολίας που φτάνει στην επιφάνεια της γης και μπορεί έμμεσα να προκαλέσει βλάβες στο DNA μέσω τουυ σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αυτός ο μηχανισμός προκαλεί το 90% των

μελανωμάτων του δέρματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία Β (UVB) προκαλεί άμεση βλάβη στο DNA και ηλιακό έγκαυμα μέσω σχηματισμού διμερών πυριμιδίνης [6]. Τα σολάριουμ και οι ηλιακές λάμπες που χρησιμοποιούνται για τεχνητό μαύρισμα εκπέμπουν UVA και αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ειδικά όταν γίνεται χρήση σε νεαρή ηλικία.

Σχεδόν το 5-10% των μελανωμάτων είναι κληρονομικά. Το 40% των κληρονομικών μελανωμάτων προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του αναστολέα 2Α της κυκλίνο-εξαρτώμενης κινάσης, CDKN2Ap16. Κληρονομικό μελάνωμα προκαλεί επίσης η μετάλλαξη του μεταγραφικού παράγοντα συσχετιζόμενου με την μικροφθαλμία (Microphthalmia Associated Transcription Factor -MITF) η MITFpE318K [8]. Η μελαγχρωματική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum) είναι ένα σπάνιο αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο κατά το οποίο υπάρχει βλάβη στα επιδιορθωτικά γονίδια του DNA για τις βλάβες που προκαλούνται από την UVA. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία στον ήλιο και ανάπτυξη βασικοκυτταρικών και ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων, καθώς και μελανωμάτων από την παιδική ηλικία. Η απώλεια λειτουργείας του υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (Melanocortin 1 receptor MC1R) συσχετίζεται με κοκκινόξανθα μαλλιά, φωτοευαίσθητο δέρμα και υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη μελανώματος. Διαταραχή του MC1R οδηγεί σε διαταραχές έκφρασης του MITF και ανάπτυξη μελανώματος [9][20].

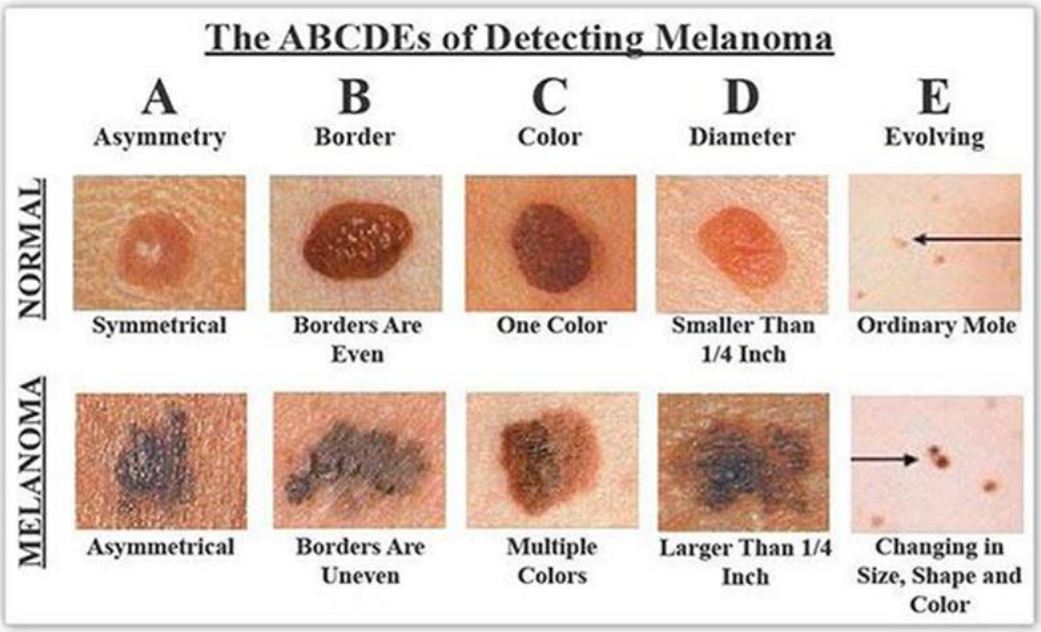
Οι άνδρες, οι χαμηλού εισοδήματος και Ευρωπαϊκής καταγωγής ασθενείς φαίνεται να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Το υψηλό ανάστημα και η παχυσαρκία επίσης συνδέονται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Το κάπνισμα καπνού επίσης συσχετίζεται θετικά με την ανάπτυξη μελανώματος. Τέλος, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στους ασθενείς με νόσο Parkinson [7].

1.3. Διάγνωση

Η κλινική εξέταση του ασθενούς έχει μεγάλη σημασία για την πρώιμη διάγνωση του μελανώματος και συνεπώς μείωση της νοσηρότητας και της θνητότητας, ειδικά όταν εφαρμόζεται σωστά στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας (Κέντρα Υγείας, ΤΟΜΥ, οικογενειακός ιατρός).

Το ιστορικό του ασθενούς είναι μεγάλης σημασίας για να αντλήσουμε πληροφορίες για τις συμπεριφορές έκθεσης του ασθενούς, να εκτιμηθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος ακόμα και να αποκαλυφθούν σημεία μεταστατικής νόσου. Έτσι πρέπει να συμπεριλαμβάνονται ερωτήσεις για το οικογενειακό ιστορικό, το ατομικό ιστορικό για την ύπαρξη άλλων κακοηθειών του δέρματος, την εργασία του και άλλες για τις συνήθειες έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ορίζεται ο φωτότυπος του δέρματος και λαμβάνεται ιστορικό για ηλιακά εγκαύματα. Το Πρόγραμμα Πληθυσμιακής Παρακολούθησης του Καρκίνου του Δέρματος της Αμερικανικής Ακαδημίας Δερματολογίας (American Academy of Dermatology, Skin Cancer Screening Program) προτείνει ότι πέντε παράγοντες αυξάνουν ανεξάρτητα, την πιθανότητα ανεύρεσης μελανώματος. Μνημοτεχνικά αναφέρονται ως HARMM: History of previous melanoma (Ιστορικό προηγούμενου μελανώματος), Age greater than 50 (Ηλικία μεγαλύτερη από 50), Regular Dermatologist absent (Απουσία τακτικού δερματολογικού ελέγχου), Mole changing (Σπίλος που αλλάζει), Male sex (Ανδρικό φύλλο) [7].

Το κυριότερο κλινικό σημείο του μελανώματος του δέρματος είναι μια μελαγχρωματική δερματική βλάβη η οποία αλλάζει εμφανώς μέσα σε μια περίοδο μηνών ή χρόνων. Σαν γενικός κανόνας χρησιμοποιούνται τα κριτήρια ABCDE: Asymmetry (ασυμμετρία), Border irregularity (ακανόνιστα όρια), Color variegation (χρωματική ποικιλία), Diameter (διάμετρος), Evolving (εξέλιξη μέσα στον χρόνο) (Εικόνα 2). Η αιμορραγία, ο κνησμός, η ευαισθησία και η εξέλκωση μπορούν να συσχετίζονται με το μελάνωμα του δέρματος [7].



Εικόνα 2. Διάγνωση του μελανώματος. Τα σημεία ABCDE. (https://www.canterburycomputers.co.nz/abcdes-detecting-melanoma)

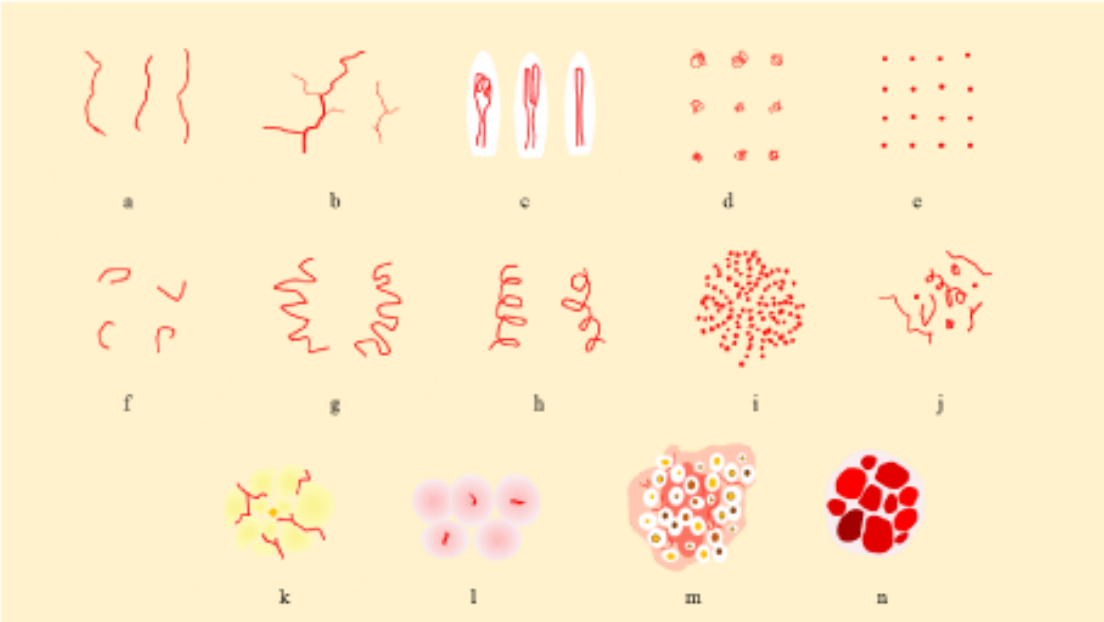
Πλήρης εξέταση του δέρματος ολόκληρου του σώματος είναι σημαντική για να οριστεί η ύπαρξη παραγόντων κινδύνου όπως το μοτίβο των σπίλων, ο τύπος των σπίλων, η ύπαρξη φακίδων. Εξονυχιστικός έλεγχος πρέπει να γίνεται σε όλες τις δερματικές επιφάνειες, στις μεσοδακτύλιες περιοχές, τις δερματικές πτυχές, τις παλάμες, τα πέλματα και το τριχωτό της κεφαλής. Προσεκτική εξέταση πρέπει να γίνεται στην γεννητική περιοχή, στις προσβάσιμες βλεννογονικές επιφάνειες και στους οφθαλμούς.

Βοήθεια στην διάγνωση και στην εκτίμηση εξέλιξης των βλαβών προσφέρει η κλινική φωτογράφηση. Σήμερα υπάρχουν πολλές εφαρμογές για τις φορητές συσκευές επικοινωνίας οι οποίες βοηθούν στην παρακολούθηση των μελαγχρωματικών βλαβών.

Η δερματοσκόπηση είναι μια μη-επεμβατική μέθοδος η οποία επιτρέπει την απεικόνιση του χρώματος, των δομών και των μοτίβων των δερματικών βλαβών τα οποία ο γυμνός οφθαλμός δεν μπορεί να διακρίνει. Υπάρχουν πλέον αρκετά προσαρτήματα δερματοσκόπησης για φορητές συσκευές (Εικόνα 3) που καθιστούν την

δερματοσκόπηση πολύ εύκολη, γρήγορη και προσβάσιμη παράχοντας πολύτιμες κλινικές πληροφορίες για την υποκείμενη βλάβη (Εικόνα 4).

Εικόνα 3. Δερματοσκόπηση με φορητή συσκευή (barco.com)



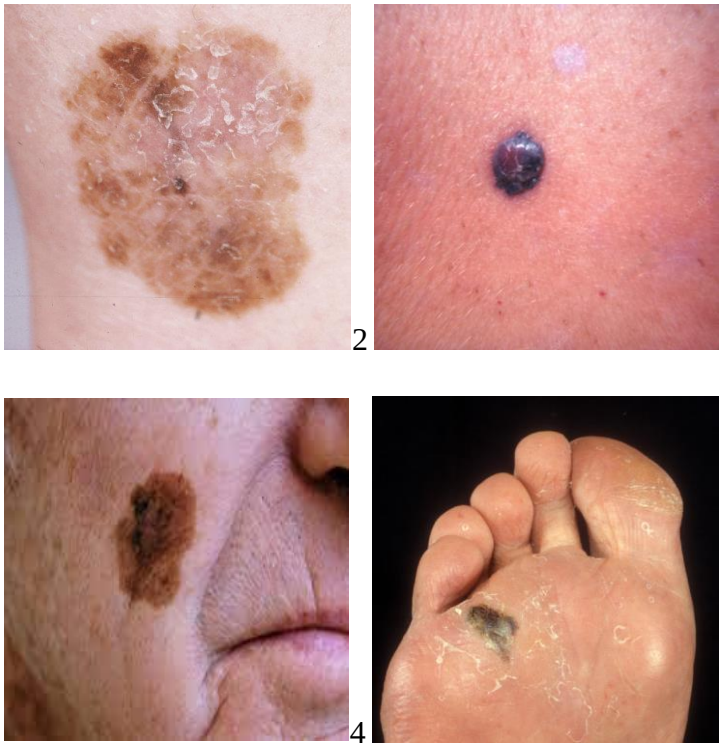
Εικόνα 4. Κοινά τοπικά δερμοσκοπικά χαρακτηριστικά. (**Austin J Dermatolog. 2017; 4(3): 1080).** *Τυπικά περιγράφονται οι χρωματισμοί των βλαβών και τα μοτίβα τόσο των δικτυωτών γραμμών όσο και των περιοχών που δεν παρουσιάζουν τέτοια δικτύωση. Έτσι τα μοτίβα μπορεί να είναι: σφαιρικό, πλακόστρωτο, ομοιογενές, αστέροειδές, παράλληλης αυλάκωσης, μη συγκεκριμένο.*

Ο χρυσός κανόνας για την διάγνωση του μελανώματος είναι η χειρουργική βιοψία εκτομής. Η βιοψία πρέπει να εκτελείται νωρίς σε κάθε βλάβη που κλινικά θέτει υποψία μελανώματος. Η ιστολογική εξέταση του εξερεθέντος ιστού θα δώσει ολοκληρωμένες πληροφορίες για τον τύπο του μελανώματος και να θέσει την βάση της σταδιοποίησης και της αρχικής διαχείρισης του ασθενούς. Αμέσως μετά την αρχική βιοψία, επί θετικού

για μελάνωμα αποτελέσματος, εκτελείται συμπληρωματική ευρεία εκτομή και βιοψία λεμφαδένα φρουρού με την οποία ξεκινά η σταδιοποίηση των λεμφαδένων [10]

1.4. Παθολογοανατομία-Σταδιοποίηση-Πρόγνωση

Η γρήγορη και ακριβής εκτίμηση του μελανώματος παραμένει μια σημαντική στρατηγική για την μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου. Τα περισσότερα μελανώματα αναπτύσσονται αρχικά περιοριζόμενα στην επιδερμίδα για αρκετά χρόνια, κατά την διάρκεια μιας οριζόντιας ή «ακτινωτής» φάσης ανάπτυξης κατά την οποία είναι ιάσιμα με επαρκή χειρουργική εκτομή. Αργότερα, με την συσσώρευση των γενετικών ανωμαλιών, τα μελανώματα επεκτείνονται πέρα της βασικής μεμβράνης της δερμίδας, σε μια κάθετη φάση ανάπτυξης, όπου αποκτούν μεταστατικό δυναμικό. Το μελάνωμα in situ είναι μια μορφή του οριζοντίως εξαπλούμενου μελανώματος. Το επιφανειακώς εξαπλούμενο μελάνωμα είναι ο πιο κοινός υπότυπος και αντιπροσωπεύει τα τρία-τέταρτα του συνολικού αριθμού μελανωμάτων, και μπορεί να αναπτυχθεί de novo (σε προηγουμένως υγιές δέρμα) ή σε σχέση με προϋπάρχων σπίλο στο ένα-τρίτο των περιπτώσεων. Τα οζώδη μελανώματα δεν εμφανίζουν οριζόντια φάση ανάπτυξης, αναπτύσσονται ταχέως και συσχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. Το μελάνωμα δίκης κακοήθους φακής χαρακτηρίζεται από μελανοκυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά μήκος της χόριο-επιδερμικής σύνδεσης στην οριζόντια φάση ανάπτυξης και σημεία σοβαρής ηλιακής βλάβης όπως επιδερμική ατροφία ή ηλιακή ελάστωση. Το φακοειδές μελάνωμα των άκρων είναι ο λιγότερο συχνός ιστολογικός τύπος αλλά είναι το πιο συχνό μελάνωμα που παρατηρείται στην Ασιατική και στις έγχρωμες φυλές. Παρατηρείται συνήθως στις παλάμες, στα πέλματα ή στις υπονύχιες περιοχές. Κάθε ένας από τους παραπάνω τύπους μελανώματος μπορεί να εμφανιστεί και ως αμελανωτικό μελάνωμα. Το δεσμοπλαστικό μελάνωμα είναι μια εκδοχή του μελανώματος σε κάθετη φάση ανάπτυξης και συνήθως παρατηρείται σε συσχέτιση με το μελάνωμα τύπου κακοήθους φακής [6][7] (Εικονα 5).



Εικόνα 5.1. Επιφανειακώς εξαπλούμενο, 2. Οζώδες, 3. Δίκην κακοήθους φακής, 4. Φακοειδές των άκρων

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες είναι ο S100, το αντιγόνο του μελανώματος που αναγνωρίζεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα (melanoma antigen regognised by T-cell -MART-1/Melan-A), το ανθρώπινο μαύρο του μελανώματος 45 (Human melanoma black 45 -HMB-45), ο MITF, MIB-1 (Ki-67 ή Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1 protein-δείκτης πολλαπλασιασμού) και η τυροσινάση [6].

Τα στοιχεία της παθολογοανατομικής αναφοράς είναι ουσιώδεις προγνωστικοί παράγοντες για το πρωτοπαθές μελάνωμα με επιπτώσεις στην διαχείριση του ασθενούς και στις θεραπευτικές αποφάσεις. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται: το βάθος διήθησης κατά Breslow, η εξέλκωση του πρωτοπαθούς όγκου, το επίπεδο διήθησης κατά Clark (I-V), η μιτωτική δραστηριότητα ανά τετραγωνικό χιλιοστόμετρο, η λεμφοκυτταρική διήθηση του όγκου, η λεμφαγγειακή διήθηση, ο νευροτροπισμός (περινευριδιακή διήθηση) και η υποστροφή. Σημαντικός προγνωστικός παράγοντας και ιδιαίτερης σημασίας για την σταδιοποίηση είναι η διήθηση ή μη του λεμφαδένα φρουρού, καθώς και η ύπαρξη ή όχι δορυφόρων ή καθ'οδών μεταστάσεων (μεταστάσεις λεμφαγγειακής διασποράς). Ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων της περιοχικής ομάδας λεμφαδένων έχει επίσης σημασία. Η ύπαρξη ή όχι απομακρυσμένων/συστηματικών μεταστάσεων έχει καθοριστικό ρόλο στην σταδιοποίηση και στην πρόγνωση των

ασθενών. Η γαλακτική δεϋδρογονάση του ορού αίματος (LDH) είναι ο μοναδικός βιοχημικός δείκτης που χρησιμοποιείται για ασθενείς σταδίου IV [10]. Έτσι η σταδιοποίηση του μελανώματος σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης TNM κατά AJCC 8η έκδοση (Εικόνα 6) διαμορφώνεται ως εξής: T (tumor) ορίζεται από το βάθος διήθησης του μελανώματος κατά Breslow και την ύπαρξη εξέλκωσης, N (nodes) ορίζεται από τον αριθμό διηθημένων περιοχικών λεμφαδένων και τις μεταστάσεις από λεμφαγγειακή διασπορά, και τέλος M (metastasis) ορίζεται από την ύπαρξη συστηματικών μεταστάσεων (πνεύμονας, ήπαρ, εγκέφαλος). Αυξημένη LDH σε ασθενείς σταδίου IV φανερώνει μεγάλο καρκινικό φορτίο [10][11].

Stage and Category	Stage Definition
T stage	
T1	Breslow ≤ 1 mm; ulceration not known
T1a	Breslow < 0.8 mm; ulceration absent
T1b	Breslow ≥ 0.8 mm
T2	Breslow 1.1-2.0 mm; ulceration not known
T2a	Breslow 1.1-2.0 mm; ulceration absent
T2b	Breslow 1.1-2.0 mm; ulceration present
T3	Breslow 2.1-4.0 mm; ulceration not known
T3a	Breslow 2.1-4.0 mm; ulceration absent
T3b	Breslow 2.1-4.0 mm; ulceration present
T4	Breslow > 4.0 mm; ulceration not known
T4a	Breslow > 4.0 mm; ulceration absent
T4b	Breslow > 4.0 mm; ulceration present
T0	Melanoma of unknown primary
TX	Breslow thickness not known
N stage	
N1a	1 node, clinically occult, no MSI
N1b	1 node, clinically detected, no MSI
N1c	0 nodes, MSI present
N2a	2-3 nodes, clinically occult, no MSI
N2b	2-3 nodes, clinically detected, no MSI
N2c	1 node, clinically occult or detected, MSI present
N3a	>3 nodes, clinically occult, no MSI
N3b	>3 nodes, clinically detected, no MSI
N3c	>1 nodes, clinically occult or detected, MSI present
Overall stage	
III	T1, T2, T3, T4, TX, and any N stage
IIIA	T1a-b, T2a and N1a, N2a
IIIB	T0 and N1b, N1c
	T1a-b, T2a and N1b, N1c, N2b
	T2b, T3a and N1a-c, N2a, N2b
IIIC	T0 and N2b, N2c, N3b, N3c
	T1a-b, T2a-b, T3a and N2c, N3a-c
	T3b, T4a, and any N stage
	T4b and N1a-c, N2a-c
IIID	T4b and N3a-c

Εικόνα 6. Σταδιοποίηση κατά TNM. MSI: Δορυφόρες ή/και καθ' οδών μεταστάσεις. Στο [11]

Εκτός από τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου που αναφέρθηκαν παραπάνω, σημασία για την πρόγνωση της νόσου έχουν ακόμα η ηλικία του ασθενούς,

η ανατομική θέση του πρωτοπαθούς όγκου, το ανδρικό φύλο και τα επίπεδα της βιταμίνης D.

1.5. Πρόληψη

Πρωτογενής και δευτερογενής πρόληψη του μελανώματος είναι κρίσιμης σημασίας για να μειωθεί η επίπτωση και η θνησιμότητα του μελανώματος. Η πρωτογενής πρόληψη επικεντρώνεται στην μείωση του κύριου παράγοντα κινδύνου-έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία A και B, η οποία είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των μελανωμάτων δέρματος στους πληθυσμούς με ανοιχτόχρωμο δέρμα. Η θεραπευτική πρόληψη η οποία ονομάζεται «χημειοπρόληψη», είναι τύπος πρωτογενούς πρόληψης η οποία αποτρέπει την ανάπτυξη μελανώματος στην αρχή, χρησιμοποιώντας ασφαλείς και ανεκτούς από του στόματος χορηγούμενους φαρμακευτικούς παράγοντες, ο ιδανικός εκ των οποίων να μένει ακόμα να ορισθεί. Η δευτερογενής πρόληψη προσπαθεί να επικεντρωθεί στις στρατηγικές πρώιμης ανίχνευσης του μελανώματος, στα πιο πρώιμα στάδια, ενισχύοντας την πιθανότητα ίασης. Προγράμματα παρακολούθησης του πληθυσμού μπορούν να ανιχνεύσουν το μελάνωμα νωρίτερα, αλλά μείωση της θνησιμότητας μέσω τέτοιων προγραμμάτων δεν έχει ακόμα παρατηρηθεί. Η τεχνολογική και μοριακή πρόοδος στην διάγνωση του μελανώματος μπορούν να βοηθήσουν στις προσπάθειες συστηματικής παρακολούθησης των πληθυσμών στο μέλλον.

Μέτρα πρωτογενούς πρόληψης αποτελούν η χρήση σκίασης και κατάλληλου ρουχισμού. Η χρήση αντιηλιακών κρεμών και λοσιόν επίσης μειώνει την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και συνεπώς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Ειδικά προγράμματα με στόχο να αλλάξουν συμπεριφορές έκθεσης στον ήλιο από μικρές ομάδες όπως σχολεία έως μεγάλους αστικούς πληθυσμούς. Η αλλαγή των συμπεριφορών έκθεσης στον ήλιο είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία δέχεται επιρροές από την μόδα, τις κοινωνικές νόρμες και τις πολιτισμικές συνήθειες που μπορεί να προωθούν την έκθεση στον ήλιο και το μαύρισμα. Το πιο γνωστό και καλά μελετημένο πρόγραμμα βασισμένο σε πληθυσμό, είναι το SunSmart που αναπτύχθηκε το 1988 στην Βικτώρια της Αυστραλίας. Το πρόγραμμα ξεκίνησε με το σύνθημα: «φόρεσε μπλούζα, βάλε αντιηλιακό, φόρα καπέλο» (Slip! on a shirt, Slop! on sunscreen, Slap! on a hat). Το πρόγραμμα κατάφερε να προάγει την γενική γνώση, να αλλάξει τις συμπεριφορές και τις αντίστοιχες κοινωνικο-πολιτισμικές νόρμες που αφορούσαν την προστασία από τον ήλιο.

Η δευτερογενής πρόληψη έχει να κάνει με τα μαζικά προγράμματα παρακολούθησης του πληθυσμού. Δυστυχώς δεν υπάρχουν πολλά οργανωμένα προγράμματα πληθυσμιακής παρακολούθησης. Έτσι η δευτερογενής πρόληψη περιορίζεται σε εκπαιδευτικές εκστρατείες για προαγωγή τηε πρώιμης ανίχνευσης, στο ευκαιριακό "screening" στην καθημερινή ιατρική πράξη και στην αυτοεξέταση του δέρματος από τους ασθενείς [4][5][6][7].

1.6. Θεραπεία

1.6.1. Χειρουργική θεραπεία

Ευρεία συμπληρωματική εκτομή είναι η τελική θεραπεία για το πρωτοπαθές μελάνωμα. Αυτή περιλαμβάνει την χειρουργική εκτομή του σημείου της βιοψίας (ουλή) en bloc με το περιβάλλον υγιές δέρμα και υποδόριο ιστό μέχρι την υποκείμενη μυϊκή περιτονία. Το σκεπτικό για την ευρεία εκτομή είναι η αφαίρεση όλων των υπολειπόμενων μικροσκοπικών δορυφόρων βλαβών και κακοήθων κυττάρων προκειμένου να επιτευχθεί τοπικός έλεγχος διαρκείας της νόσου και να θεραπευτεί ο ασθενής χωρίς μεταστάσεις. Το πλάτος των ορίων εκτομής του μελανώματος είναι ανάλογα του πάχους του μελανώματος [6]. Για μελάνωμα in situ συνιστώνται όρια 0,5-1cm . Για όγκους πάχους >1mm τα όρια ενός εκατοστού θεωρούνται επαρκή, για όγκους πάχους 1,01-2,00mm τα όρια εκτομής πρέπει να είναι 1-2cm για να εξυπηρετούν ανατομικούς και λειτουργικούς παράγοντες. Όγκοι πάχους >2,00mm εκτέμνονται με χειρουργικά όρια 2cm. Η χαρτογράφηση του λεμφικού δικτύου και η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού αποτελούν χρυσό κανόνα για την ολοκληρωμένη χειρουργική θεραπεία ασθενούς με μελάνωμα με μη ψηλαφητούς περιοχικούς λεμφαδένες αλλά με αυξημένο κίνδυνο για μετάσταση σε αυτούς. Σε αυτούς τους ασθενείς περιλαμβάνονται η πλειονότητα των ασθενών με όγκους ≥1,00mm και αυτοί με πιο λεπτούς όγκους αλλά με ύπαρξη δευτερευόντων αρνητικών χαρακτηριστικών (εξέλκωση, μιτωτική δραστηριότητα≥1/mm^2, επίπεδο Clark IV, λεμφαγγειακή διήθηση). Η ολοκλήρωση της λεμφαδενεκτομής μετά από θετικό λεμφαδένα φρουρό είναι μια πρακτική που ακολουθείται σε πολλά κέντρα αντιμετώπισης μελανώματος [6]. Στην μελέτη MSLT-II η άμεση λεμφαδενεκτομή μετά από θετική βιοψία λεμφαδένα φρουρού δεν αύξησε τα ποσοστά επιβίωσης στους ασθενείς με μελάνωμα και ως εκ τούτου προτάθηκε η προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών ως εναλλακτική επιλογή [12]. Η άλλη μελέτη που υποστηρίζει την προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών μετά από θετική για διήθηση βιοψία λεμφαδένα

φρουρού είναι η DeCOG-SLT, πρωιμότερη της MSLT-II αλλά με παρόμοια συμπεράσματα [13].

1.6.2. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία ήταν η πρωιμότερη θεραπευτική επιλογή για το προχωρημένο μελάνωμα δέρματος. Παρόλο που παρατηρούνται βελτιωμένες κλινικές ανταποκρίσεις, δεν υπήρξε βελτίωση στην ολική επιβίωση. Η Dacarbazine που ανήκει στους αλκυλιούντες παράγοντες και η Temozolomide ένα από του στόματος χορηγούμενο προφάρμακο του ενεργού μεταβολίτη της Dacarbazine, επίσης έχει χρησιμοποιηθεί στο μελάνωμα χωρίς επίσης βελτίωση στην ολική επιβίωση των ασθενών. Η ηλεκτροχημειοθεραπεία είναι μια τεχνική που συνδυάζει την χρήση κυτταροτοξικών φαρμάκων, της Bleomycin και της Cisplatin, με υψηλής έντασης ηλεκτρικούς παλμούς το οποίο επιτρέπει την παράδοση του φαρμάκου εντός του κυττάρου. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση δερματικών και υποδερματικών βλαβών.

1.6.3. Φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια υποσχόμενη μέθοδος παρηγορικής θεραπείας για ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III/IV. Είναι μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος η οποία απαιτεί μια ουσία φωτοευαισθητοποίησης, η οποία απορροφάται καλύτερα σε μεταβολικά ενεργούς ιστούς και φως συγκεκριμένου μήκους κύματος για να ενεργοποιηθεί η ουσία. Και τα δύο στοιχεία είναι μη-τοξικά, αλλά δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου όταν έρθουν σε επαφή με το οξυγόνο μέσω μιας φωτοχημικής αντίδρασης. Αυτό προκαλεί μη αντιστρεπτή βλάβη στα καρκινικά κύτταρα και στα αγγεία του όγκου προκαλώντας αντικαρκινικές, ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

1.6.4. Ανοσοθεραπεία

Είναι γνωστό σε πολλά είδη καρκίνου ότι οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του όγκου και του ανοσοποιητικού συστήματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταστατική διασπορά σε απομακρυσμένες τοποθεσίες. Τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (Tumor infiltrating lymphocytes TILs) θεωρούνται σε πολλές μελέτες ένας ανεξάρτητος δείκτης λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τα TILs μπορούν να διαμεσολαβήσουν ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή έναντι του καρκίνου και έχουν συσχετιστεί με θετικά αποτελέσματα και βελτιωμένη επιβίωση σε ασθενείς με μελάνωμα. Βασιζόμενη σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις η ανοσοθεραπεία φαίνεται μια

πολλά υποσχόμενη θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένη μεταστατική νόσο. Η ιντερφερόνη α-2b (IFN a-2b) ήταν το πρώτο σκεύασμα που εγκρίθηκε για θεραπεία μελανώματος σταδίου IIB/III το 1995. Παρόλα αυτά, μόνο μία μειοψηφία ασθενών έδειξαν σημεία ανταπόκρισης στην και η εξέλκωση του αρχικού όγκου είναι ο πιο σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας για την ευαισθησία του όγκου στην ιντερφερόνη. Παρόλο που νεότερα φάρμακα έχουν εμφανιστεί η ιντερφερόνη εξακολουθεί να έχει ρόλο στα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) είναι μια άλλη κυττοκίνη που έχει δράση πάνω στα Τ-λεμφοκύτταρα και εγκρίθηκε για θεραπεία του μελανώματος το 1998. Έχει παρουσιάσει καλές ανταποκρίσεις αλλά και σημαντικές παρενέργειες που μπορεί να φτάσουν μέχρι πολυοργανική ανεπάρκεια. Για το λόγο αυτό χρειάζεται σωστή επιλογή ασθενών και δόσης φαρμάκου. Αναστολείς των Τ-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Regulatory T-cells inhibition), οδηγούν σε αυξημένη αντικαρκινική ανοσία. Το Ipilimumab, ένας αναστολέας του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (Cytotoxic T lymphocyte-assosiated antigen 4 (CTLA-4) blockade), ο οποίος εγκρίθηκε το 2011 έφερε επανάσταση στην ανοσοθεραπεία του μελανώματος. Πρόκειται για ένα αντίσωμα το οποίο εξουδετερώνει τον CTLA-4 υποδοχέα επιτρέποντας την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, που οδηγεί σε παραγωγή κυττοκινών και διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις περιλαμβάνουν κάθε είδους φλεγμονές (κολίτιδα, δερματίτιδα, ηπατίτιδα, νευρίτιδα, ενδοκρινοπάθειες) οι οποίες είναι πιο έντονες σε μεγαλύτερες δόσεις. Οι αναστολείς της πρωτεΐνης 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και του προσδέτη της (Programmed cell death protein I (PD-I)/ PD-I ligand (PD-L1) blockade), είναι τα φάρμακα επόμενης γενιάς ανοσοθεραπείας που εγκρίθηκαν το 2015. Τα Nivolumab και Pembrolizumab είναι τα πρώτα μονοκλωνικά αντισώματα αντιπροσωπευτικά αυτής της κατηγορίας φαρμάκων με καλές ανταποκρίσεις και βελτίωση της επιβίωσης.

Άλλες ανοσοθεραπείες είναι οι ογκολυτικοί ιοί, το εμβόλιο με gp100 Peptide (μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στο μελάνωμα και αναγνωρίζεται από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα), τους αγωνιστές του Toll-like receptor (TLR) που ενισχύουν την ανοσολογική αντίδραση αυξάνοντας την παραγωγή IFN και IL-2 και τέλος η θεραπεία με μεταφορά ειδικών-του-μελανώματος Τ λεμφοκυττάρων.

Η βιοχημειοθεραπεία αποτελεί συνδυασμό της χημειοθεραπείας και της ανοσοθεραπείας. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σχήμα είναι ο συνδυασμός dacarbazine, cisplatin και vinblastine με IL-2 και IFN a-2b.

1.6.5. Στοχευμένη θεραπεία

Το 70% των ασθενών με μελάνωμα υποκρύπτουν μεταλλάξεις σε γονίδια κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών. Αυτές οι καρκινογόνες μεταλλάξεις μπορεί να συσχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελανώματος και έναν κακοήθη φαινότυπο. Η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιεί αναστολείς μικρών μορίων ή αντισώματα τα οποία επηρεάζουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, γεγονός σημαντικό για την πρόοδο της νόσου.

Το 50% των μελανωμάτων που δεν έχουν σχέση με έκθεση στον ήλιο υποκρύπτουν μετάλλαξη στην BRAF -μια κινάση σερίνης-θρεονίνης, από το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεϊνης-κινάσης ενεργοποιημένου μιτογόνου (Mitogen-activated protein kinase MAPK). Μεταλλάξεις στην BRAF σχετίζονται με αυξημένη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η πιο συχνή μετάλλαξη της BRAF συμβαίνει στο αμινοξύ 600 όπου η φυσιολογική βαλίνη αντικαθίσταται με γλουταμικό οξύ ($BRAF^{V600E}$ πιο συνηθισμένη) ή με λυσίνη ($BRAF^{V600K}$ πιο σπάνια). Τα Vemurafenib και Dabrafenib τα οποία εγκρίθηκαν το 2011 και το 2013 αντίστοιχα, είναι οι πρώτοι εκπρόσωποι της κατηγορίας με καλές ανταποκρίσεις και βελτίωση της επιβίωσης.

Η στόχευση των τελεστών της σηματοδότησης των κύριων ογκογονιδίων είναι μια καλή στρατηγική. Η MEK- μια κινάση σερίνης-τυροσίνης-θρεονίνης είναι μεταγενέστερος στόχος στο μονοπάτι Ras-Raf-MEK-ERK, και σε αντίθεση με τους αναστολείς BRAF, οι αναστολείς MEK δείχνουν δραστικοί σε NRAS-μεταλλαγμένο μελάνωμα. Το Trametinib εγκρίθηκε το 2013 και παρουσιάζει ανασταλτική δράση για τις MEK 1/2.

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-KIT είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης και παρουσιάζει μεταλλάξεις στο 39% των βλεννογονικών μελανωμάτων, στο 36% των φακοειδών μελανωμάτων των άκρων και στο 28% των μελανωμάτων που εμφανίζονται επί εδάφους ηλιακής βλάβης, ενώ μεταλλάξεις του δεν παρατηρούνται ποτέ σε μελανώματα χωρίς χρόνια ηλιακή βλάβη. Οι μεταλλάξεις του cKIT οδηγούν σε αυξημένη δράση των μονοπατιών MAPK και PI3K/AKT. Επί

παρουσίας μεταλλάξεων cKIT το Imatinib ένας αναστολέας cKIT παρουσιάζει ιδιαίτερη δράση στους ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα.

Το μελάνωμα που εκφράζει υψηλά επίπεδα VEGF (Vascular endothelial growth factor) έχουν κακή πρόγνωση, ανοσοκαταστολή και αύξηση της καρκινικής νεοαγγείωσης. Το Bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που εξουδετερώνει τον VEGF και αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου.

Ο μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης (mechanistic target of rapamycin (mTOR)) είναι μία κινάση η οποία σχετίζεται με την οικογένεια κινασών PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). Παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο του όγκου και η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT-mTOR στο μελάνωμα έχει περιγραφεί σε συσχέτιση με BRAF μεταλλάξεις και φτωχή πρόγνωση. Οι αναστολείς mTOR Everolimus και Temsirolimus δοκιμάζονται σε θεραπευτικά πρωτόκολλα έναντι του μελανώματος.

Στο οικογενές μελάνωμα ο ρόλος των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών είναι εξακριβωμένος. Μια νέα γενιά εκλεκτικών CDK4/6 αναστολέων που περιλαμβάνει τα Ribociclib, Abemaciclib και Palbociclib έχουν πετύχει καλύτερη στόχευση του όγκου με καλύτερες ανταποκρίσεις και λιγότερες παρενέργειες [14].

ΙΙ. Ο ΔΡΟΜΟΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

2.1. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΟΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ

2.1.1. Η προέλευση του μελανοκυττάρου

Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα που παράγουν χρωστική, τα οποία αν ευρίσκονται στο περίβλημα, στον έσω ου και στα μάτια των σπονδυλωτών οργανισμών. Προερχόμενα εξ ολοκλήρου από πολυδύναμα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας , τα μελανοκύτταρα υποβάλλονται σε σύνθετες διαδικασίες ανάπτυξης οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν σε μερικά στάδια αναλόγως την τοποθεσία:

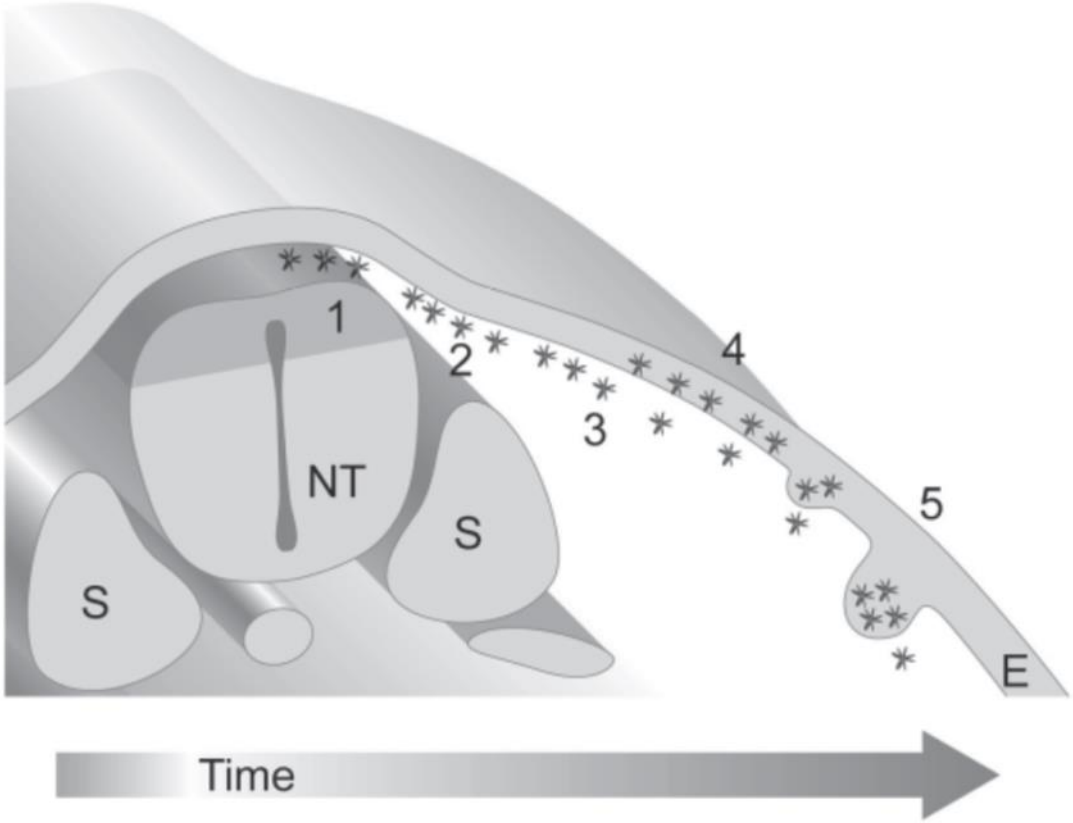
1) Ο πληθυσμός της νευρικής ακρολοφίας προέρχεται από τις οπίσθιες παρυφές του νευρικού σωλήνα και υφίσταται επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση στην περιοχή μετανάστευσης.

2) Ένα υποσύνολο των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας καθορίζονται ως πρόδρομοι μελανοβλάστες και μεταναστεύουν ραχιαίο-πλευρικά κάτω από το εκτόδερμα (πρώιμη μετανάστευση).

3) Οι μελανοβλάστες μεταναστεύουν διαμέσου του χορίου στην επιδερμίδα (μέση μετανάστευση).

4) Οι μελανοβλάστες μεταναστεύουν στην επιδερμίδα και ενσωματώνινται στους αναπτυσσόμενους θύλακες των τριχών (καθυστερημένη μετανάστευση).

5) Οι μελανοβλάστες αυξάνονται αριθμητικά στην επιδερμίδα και στους θύλακες των τριχών και μετατρέπονται σε κάποια χρονική στιγμή σε μελανοκύτταρα τα οποία παράγουν μελανίνη [15] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Η ανάπτυξη των μελανοκυττάρων από την νευρική ακρολοφία έως το δέρμα. NT: νευρική ακρολοφία, S: Σωμίτης, E: Εκτόδερμα. Στο [15]

Διαφορετικές τάξεις πρωτεϊνών, μεταγραφικών παραγόντων, εξωκυττάριων προσδετών, διαμεμβρανικών υποδοχέων και ενδοκυττάριων σηματοδοτικών μορίων ρυθμίζουν τις παραπάνω διαδικασίες. Στο πρώτο στάδιο σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζου το μονοπάτι Wingless/INT-related (Wnt) 1 και 3, και οι μεταγραφικοί παράγοντες Paired box transcription factor (Pax3) και Forkhead box D3 (Foxd3). Στην περιοχή μετανάστευσης σημαντικό ρόλο παίζουν το μονοπάτι KIT/MEPK και ο MITF

μεταγραφικός παράγοντας. Ο προσδιορισμός και ο πολλαπλασιασμός των μελανοβλαστών ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες SRY-related HMG-box 9 (SOX 9), SOX 10, Foxd3 και MITF. Το μονοπάτι Wnt, η β-catenin, οι καντχερίνες (cadherins) και η προσκόλληση στις πρωτεΐνες του εξωκυττάριου στρώματος (extracellular matrix) έχουν μεγάλη σημασία για τις διαδικασίες μετανάστευσης και του συγχρονισμού των φάσεων από την νευρική ακρολοφία μέχρι την επιδερμίδα. Ο MITF έχει προταθεί ως κύριος ρυθμιστής της μοίρας των μελανοβλαστών. Ο υποκινητής του MITF ρυθμίζεται από τους SOX 10, Pax3, CREB (cAMP response element binding protein) και τον Lef1 (Lymphoid enchaser-binding factor 1) ο οποίος ενεργοποιείται από το μονοπάτι WNT/β-catenin [9].

2.1.2. Ο ρόλος του MITF

Ταξιδεύοντας προς τον τελικό τους προορισμό οι μελανοβλάστες σταδιακά εκφράζουν επιπλέον μελανογενή γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία ελέγχονται από τον μεταγραφικό παράγοντα σχετιζόμενο με την μικροφθαλμία (Microphthalmia-associated Transcription Factor) -MITF. Η αλληλουχία έκφρασης αυτών των γονιδίων κορυφώνεται με την εμφάνιση της τυροσινάσης, σχεδόν 4-5 ημέρες μετά την πρώτη έκφραση του MITF. Η εμφάνιση της τυροσινάσης σηματοδοτεί την έναρξη της διαφοροποίησης σε ώριμα μελανινοθετικά μελανοκύτταρα τα οποία τελικά εγκαθίστανται στο δέρμα, στους θύλακες των τριχών και στους βλεννογόνους [15].

Ο MITF, πέρα από την ρύθμιση της εμβρυολογικής ανάπτυξης των μελανοβλαστών και της εξέλιξης τους σε μελανοκύττρα, ρυθμίζει επίσης την βιοσύνθεση μελανίνης, τον προσδιορισμό της γενεαλογίας του κυττάρου (επιβίωση και πολλαπλασιασμό) και την αναπλήρωση των μελανοκυττάρων στους θύλακες των τριχών των ενηλίκων. Η σωστή δομή και λειτουργία του MITF είναι ζήτημα ζωής και θανάτου για το μελανοκύτταρο. Για να εκτελεί σωστά τις πολλαπλές λειτουργίες του, ο MITF πρέπει να είναι αυστηρά ρυθμιζόμενος. Διαταραχή των επιπέδων έκφρασης του MITF προκαλεί νόσο (μελάνωμα) με ποικίλες φαινοτυπικές εκφράσεις [16][17]. Το γονίδιο του MITF κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει μοτίβα βασικού τύπου έλικας-βρόγχου-έλικας και «φερμουάρ» λευκίνης (basic -helix-loop-helix leucine zipper bHLH-LZ type), ο οποίος ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των bHLH παραγόντων, η οποία περιλαμβάνει επίσης τα myc ογκογονίδια. Ο MITF εκφράζεται στα μελανοκύτταρα, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, στα μαστικά κύτταρα, στους οστεοκλάστες και στο μελάνωμα. Υπάρχουν πολλές ισομορφές του MITF, από τις

οποίες η M-MITF ισομορφή απαντά αποκλειστικά στα μελανοκύτταρα και στο μελάνωμα. Στο εξής όταν αναφερόμαστε στον MITF θα εννοούμε την M-ισομορφή του [18].

2.1.3. Το χρώμα του δέρματος και η λειτουργία του μελανοκυττάρου

Τα ώριμα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα τα οποία εξειδικεύονται στη σύνθεση μελανίνης, της χρωστικής η οποία προσδίδει στο δέρμα και στα μαλλιά το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Στον άνθρωπο η πλειοψηφία των μελανοκυττάρων εδρεύει στην επιδερμίδα και στους θύλακες των τριχών.

Ο χρωματισμός του δέρματος είναι το αποτέλεσμα της σύνθεσης μελανίνης από τα επιδερμικά μελανοκύτταρα μετά από διέγερση με UVR και της κατανομής της μελανίνης στα περιβάλλοντα κερατινοκύτταρα. Κάθε μελανοκύτταρο αλληλοεπιδρά με περίπου 30-40 κερατινοκύτταρα μέσω δεντριτών (δυναμικές δομές που προσομοιάζουν με προσεκβολές και περιέχουν μικροσωληνίσκους) σχηματίζοντας έτσι μια επιδερμική μονάδα. Η μελανίνη περιέχεται σε σωμάτια τα οποία ονομάζονται μελανοσώματα και μεταφέρεται μέσω των δεντριτών στα κερατινοκύτταρα.

Η μεγάλη ποικιλομορφία του χρώματος του δέρματος στον άνθρωπο προκαλείται από την εκτεταμένη διακύμανση στην ιδιοσυγκρασιακή μελάχρωση η οποία εξαρτάται από τρεις κυρίως παράγοντες: τον ρυθμό σύνθεσης μελανίνης από τα μελανοκύτταρα, την αναλογία ευμελανίνης (καφέ-μαύρη χρωστική) και φεομελανίνης (ερυθροκίτρινη χρωστική) που συντίθεται από τα μελανοκύτταρα και το μέγεθος και τον αριθμό των μελανοσωματών και τον ρυθμό μεταφοράς τους στα κερατινοκύτταρα. Η περιεχόμενη μελανίνη στους διάφορους μελαγχρωματικούς φαινότυπους είναι απευθείας ανάλογη της δραστηριότητας της τυροσινάσης και των πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την τυροσινάση (TYR, TYRP1, TYRP2) η δράση των οποίων ρυθμίζεται από τον MITF.

Η αυξημένη παραγωγή μελανίνης θεωρείται μέρος της απάντησης στο stress από την έκθεση στην UVR και προκαλείται από την βλάβη του DNA. Η μελανίνη και ιδιαίτερα η ευμελανίνη, θεωρείται αποτελεσματική στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου που παράγονται κατά την φλεγμονή από την έκθεση σε UVR. Επίσης η ευμελανίνη προστατεύει το δέρμα από την πρόσκρουση της UVR και την διείσδυση σε βαθύτερα επιδερμικά στρώματα. Τα γεγονότα αυτά φανερώνουν την αντιστρόφως

ανάλογη σχέση μεταξύ της ύπαρξης χρωματισμού στο δέρμα και της εμφάνισης καρκίνου του δέρματος, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος [15].

Δεδομένης της σημασίας του μελανοκυττάρου στην φωτοπροστασία ενάντια στον επαγώμενο από την έκθεση στην UVR δερματικό καρκίνο, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί η επιβίωσή του στην επιδερμίδα. Στο φυσιολογικό δέρμα, τα μελανοκύτταρα διατηρούνται για πολλά χρόνια της ζωής του ατόμου. Αυτή η μακροζωία οφείλεται στην αντίσταση του μελανοκυττάρου στην απόπτωση, που με την σειρά της οφείλεται στην υψηλή έκφραση του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl2 (B-cell lymphoma 2). Το μονοπάτι της Inositol-3,4,5-triphosphate (PI3)/AKT φωσφορυλιώνει τον CREB, οποίος ενεργοποιεί τον MITF οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασης του Bcl2 και αυξημένη επιβίωση.

Η υπεριώδης ακτινοβολία διεγείρει την μελάγχρωση του δέρματος κάτι που ονομάζεται μαύρισμα. Αυτές οι αλλαγές στο δέρμα είναι ορατές και ταξινομούνται σε δύο τύπους: άμεσο μαυρισμα, που παρατηρείται μέσα σε λεπτά από την έκθεση σε UVR και καθυστερημένο μαύρισμα το οποίο εμφανίζεται σε μερικές ημέρες. Ο MITF θεωρείται κύριος ρυθμιστής της αντίδρασης του μαυρίσματος γιατί ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων TYR, TYRP1, TYRP2 (TYRP2 ή Dopachrome tautomerase), όπως έχουμε ήδη αναφέρει αλλά και των gp100 (glycoprotein 100 ή Melanocyte protein PMEL (premelanosome protein)) και MART-1/Melan-A (Protein melan-A / melanoma antigen recognized by T cells 1). Τα ιδιοσυγκασιακά επίπεδα έκφρασης του MITF είναι υψηλά σε έγχρωμα άτομα ακόμα και στο μη εκτεθειμένο σε UVR δέρμα. Στα άτομα Ασιατικής και Καυκάσιας φυλής, η έκφραση του MITF μετά από μία ημέρα έκθεσης σε UVR είναι 50% υψηλότερη από τους έγχρωμους και παραμένει σε υψηλά επίπεδα έκφρασης μέχρι και 7 ημέρες μετά την έκθεση. Τα κύτταρα της επιδερμίδας τα οποία έχουν υποστεί βλάβη μετά από έκθεση σε UVR συχνά υποβάλλονται σε απόπτωση προκειμένου να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός κυττάρων με επιβλαβές DNA [15].

2.2. ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ Η ΠΡΟΟΔΟΣ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Μέχρι σήμερα για κανένα συμπαγή καρκίνο δεν έχουν αναγνωριστεί τα ελάχιστα γενετικά γεγονότα, τα οποία είναι απαραίτητα για την εμφάνισή του. Το μελάνωμα του

δέρματος ίσως να είναι ο πρώτος καρκίνος για τον οποίο αυτό να έχει «επιλυθεί». Σύμφωνα με τις έρευνες και τα θεωρητικά μοντέλα, ανάμεσα στους καρκίνους που επιλύθηκαν, εκτιμάται ότι για την ανάπτυξη του μελανώματος απαιτούνται τα λιγότερα γεγονότα από τους υπόλοιπούς καρκίνους. Ο Clark και οι συνεργάτες του [19] πρότειναν ένα μοντέλο ανάπτυξης του μελανώματος όπου κάθε φάση μπορεί να υφίσταται κλινικά από μόνη της και να προέρχεται από υγιές δέρμα, χωρίς απαραίτητα να προϋπήρχαν οι προηγούμενες.

Ο πρώτος τύπος βλάβης είναι ο καλοήθης σπίλος. Ο επόμενος τύπος βλάβης είναι ο άτυπος ή δυσπλαστικός σπίλος. Αυτός ορίζεται ως ο σπίλος που φέρει ένα χαρακτηριστικό πιο τυπικό για μελάνωμα (μεγάλο μέγεθος, ακανόνιστο σχήμα, δυσχρωμία). Ο επόμενος τύπος βλάβης είναι το μελάνωμα σε οριζόντια φάση ανάπτυξης. Αυτή η βλάβη αναπτύσσεται σταδιακά μόνο όμως «ακτινωτά» σχηματίζοντας μια επίπεδη πλάκα μέσα στην επιδερμίδα ή μικρές χοριακές εστίες πλησίον της επιδερμίδας. Τέλος, ένα μελάνωμα σε κάθετη φάση ανάπτυξης σχηματίζει μεγάλα οζίδια στο χόριο, το οποίο είναι κύριο χαρακτηριστικό προγνωστικό του μεταστατικού δυναμικού της νόσου.

Θεωρείται πως ο καλοήθης σπίλος είναι ένας κλώνος μελανοκυττάρων ο οποίος υφίσταται μια μετάλλαξη η οποία υπερνικά τον μηχανισμό που φυσιολογικά περιορίζει την πυκνότητα του τοπικού πληθυσμού φυσιολογικών επιδερμικών μελανοκυττάρων, επιτρέποντας στον κλώνο να αυξηθεί και να σχηματίσει μια αποικία από πυκνοστοιβαγμένα μελανοκύτταρα. Η πιο συχνές μεταλλάξεις είναι αυτές που ενεργοποιούν τα BRAF και NRAS. Το 90% των καλοηθών σπίλων φέρουν μία από αυτές τις μεταλλάξεις, συνήθως BRAF. Οι δύο μεταλλάξεις είναι λειτουργικά παρόμοιες και ενεργοποιούν το MAPK ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση μέσω ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης του MITF.

Χαρακτηριστικό των καλοηθών σπίλων είναι ότι βρίσκονται σε μια χρόνια M0 φάση γηρασμού. Το γενετικό γεγονός χαρακτηριστικό για τους δυσπλαστικούς σπίλους είναι ένα έλλειμμα στο μονοπάτι p16/pRB (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)/ retinoblastoma protein). Η αθανατοποίηση των κυττάρων και η διατήρηση των τελομερών είναι το επόμενο γενετικό γεγονός χαρακτηριστικό για το μελάνωμα σε οριζόντια φάση ανάπτυξης. Η ανάπτυξή του μόνο στην επιφάνεια ή μέσα στην

επιδερμίδα φανερώνει εξάρτηση από τους αυξητικούς παράγοντες των κερατινοκυτταρων (Alpha-melanocyte-stimulating hormone, a-MSH, adrenocorticotrophic hormone, (ACTH), basic fibroblast growth factor, (bFGF), nerve growth factor, (NGF), endothelins, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, (GMCSF), steel factor, leukemia inhibitory factor, (LIF), hepatocyte growth factor, (HGF)). Στο μελάνωμα σε κάθετη φάση ανάπτυξης αυτή διαδραστικότητα χάνεται. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι τα μελανωματικά κύτταρα μπορούν να αναπτύσσονται χωρίς την υποστήριξη άλλων κυττάρων, ενώ συγχρόνως παρουσιάζουν μεταλλάξεις που αναστέλλουν εντελώς την απόπτωση [15].

Όπως είδαμε και στην παθολογοανατομική κατάταξη, ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξης και την κατανομή των κυττάρων στις βλάβες το μελάνωμα ταξινομείται σε τέσσερις διακριτούς βιολογικά και ιστολογικά υπότυπους: το επιφανειακά εξαπλούμενο μελάνωμα (Superficial Spreading Melanoma-SSM), το μελάνωμα δίκην κακοήθους φακής (Lentigo Maligna Melanoma-LMM), το οζώδες μελάνωμα (Nodular Melanoma-NM) και το φακοειδές μελάνωμα των άκρων (Acral Lentiginous Melanoma-ALM). Τα μοτίβα ανάπτυξης είναι ως εξής: στο SSM έχουμε οριζόντια ανάπτυξη με πακετοειδές μοτίβο με μοναχικά και ένθετα μελανοκύτταρα διάσπαρτα μέσα στην επιδερμίδα. Στα LMM και ALM, μονήρη μελανοκύτταρα παρατάσσονται κατά μήκος της χοριοεπιδερμικής συμβολής. Το NM είναι διηθητικό μελάνωμα. Ανατομικά το SSM και το NM εμφανίζονται κυρίως στον κορμό και στα άκρα, το LMM στο πρόσωπο και το ALM στις παλάμες, τα πέλματα και τις υπονύχιες περιοχές.

Η έκθεση των μελανοκυττάρων στην UVR προκαλεί την τελική διαφοροποίησή τους και την παραγωγή μελανίνης. Η αρχική αντίδραση του δέρματος στην έκθεση σε UVR αρχίζει με τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα τα οποία παράγουν ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων άλφα (aMSH), η οποία προσδένεται στον υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (MC1R) και μέσω CREB οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του MITF, αντιστοίχως των TYR, TYRP1,TYRP2, που τελικά θα οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής μελανίνης και «τελική» διαφοροποίηση. Σε ασθενείς με μετάλλαξη MITFpE318K υπάρχει διαταραχή του μονοπατιού MC1R/cAMP/MITF με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οικογενούς ή σποραδικού μελανώματος [20].

Στην βιολογία του μελανοκυττάρου το μονοπάτι RAF/MEK/ERK παίζει βασικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, και είναι ο βασικός

ρυθμιστής του MITF. Μέσω φωσφορυλίωσης αυξάνεται η μεταγραφική δραστηριότητα του MITF δύο ή τρεις φορές, συγχρόνως όμως ενεργοποιείται η ουμπικιτίνωση του MITF το οποίο επάγει την διάσπαση της φωσφορυλιωμένης μορφής μέσα σε δυο-τρεις ώρες. Διέγερση του ERK μονοπατιού από το KIT επίσης αυξάνει την έκφραση του MITF αλλά για πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Παραδόξως η παρατεταμένη διέγερση του ERK μονοπατιού τελικά οδηγεί σε πλήρη διάσπαση του MITF. Πτώση των επιπέδων έκφρασης του MITF κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο αυξάνει την διηθητικότητα και την μεταστατικότητα στο μελάνωμα. Η διαταραχή του ρυθμού φωσφορυλίωσης/διάσπασης του MITF θεωρείται το αρχικό γεγονός της μεταλλαγής του κυττάρου.

Μια άλλη συνέπεια της ισχυρής συστηματικής ενεργοποίησης του ERK μονοπατιού στα μελαγχρωματικά κύτταρα είναι η αύξηση της έκφρασης του POU-domain μεταγραφικού παράγοντα Brn2. Η έκφρασή του είναι υψηλή στους μελανοβλάστες, αλλά όχι στα φυσιολογικά μελανοκύτταρα, γεγονός που υποδεικνύει τον ρόλο του στην διαφοροποίηση. Παρατεταμένη διέγερση που προκαλεί η μετάλλαξη BRAF, η μείωση της έκφρασης του MITF και αύξηση της έκφρασης του BRN2 οδηγούν σε μεταλλαγή του μελανοκυττάρου και έναρξη του μελανωματικού κλώνου [9].

Οι κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src είναι γνωστές για το δυναμικό μεταλλαγής που διαθέτουν και εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση με διαφορετικά μονοπάτια. Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF) που παράγεται από τα κερατινοκύτταρα είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες της οικογένειας έχοντας ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, την μεταλλαγή και το ογκογενετικό δυναμικό των μελανοκυττάρων. Μια άλλη κινάση Src η FYN έχει σημαντικό ρόλο με επίδραση στον κυτταροσκελετό και συνεπώς στην κυτταρική κίνηση και την μετάσταση.

Η κινάση PI3 εμπλέκεται στην ρύθμιση της κινητικότητας, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων καθώς και στις διαδικασίες ενδοκυτταρικής μεταφοράς πρωτεϊνών. Η ενεργή PI3-κινάση παράγει το μεμβρανικό λιπίδιο PIP3 το οποίο προάγει περαιτέρω σηματοδότηση με της πωτεϊνικής κινάσης B (PKB) ή AKT. Η φωσφατάση PTEN προκαλεί απενεργοποίηση της PI3-σημαροδότησης μέσω αποφωσφορυλίωσης. Μεταλλάξεις του PTEN ανευρίσκονται σε 5-20% των μελανωμάτων με αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση της AKT. Η PI3-κινάση έχει

κεντρικό ρόλο στην μεταφορά της TYRP-1 στο μελανόσωμα, στην καταστολή της E-cadherin, που είναι βασικό βήμα για απόδραση του ελέγχου ανάπτυξης από τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα και τέλος παίζει ρόλο στην διαμεσολαβούμενη από την integrin-β1 μετανάστευση και την N-cadherin διαμεσολαβούμενη προσκόλληση (φάσεις της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης). Η PI3-κινάση προκαλεί καταστολή της έκφρασης του MITF.

Είναι φανερό ότι μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από τα περιγραφόμενα μονοπάτια οδηγεί σε διαταραχή ρύθμισης του MITF και των διαδικασιών που αυτός ελέγχει, γεγονός που θεωρείται βασικό στην μεταλλαγή του μελανοκυττάρου και την ογκογενετική αρχή του μελανώματος [15]. Η ενίσχυση του γονιδίου του MITF ανευρίσκεται στο 20% των μελανωμάτων, με μεγαλύτερη επίπτωση μεταξύ των δειγμάτων μεταστατικού μελανώματος. Αυτή η ανωμαλία συσχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση στους ασθενείς [21]. Μεταγραφικοί ενεργοποιητές του MITF είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SOX10, ο μεταγραφικός παράγοντας CREB και μέσω του μονοπατιού Wnt ο μεταγραφικός παράγοντας LEF1 και η β-catenin. Μεταγραφικοί καταστολείς του MITF είναι ο μεταγραφικός παράγοντας GLI2 (glioma-associated oncogene family member 2) και ο BRN2. Στο μελάνωμα η ετερογενής έκφραση των BRN2 και MITF είναι ο κρίσιμος μηχανισμός εναλλαγής μεταξύ διηθητικού και πολλαπλασιαστικού φαινότυπου. Ο MITF μπορεί να έχει τόσο ογκογόνες όσο και ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και η σχέση BRN2/MITF είναι αντιστρόφως ανάλογη και αλληλοεξαρτώμενη. Αυξημένη έκφραση του BRN2 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του MITF και διηθητικό χαρακτήρα της νόσου [22][23]. Καταστολή του MITF προκαλούν ο HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) και ο NK-kB παράγοντες χαρακτηριστικοί της νέκρωσης και της φλεγμονής αντίστοιχα [9][21].

Οι μεταγραφικοί στόχοι του MITF συσχετίζονται με τον κυτταρικό γηρασμό, την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την διήθηση, και την διαφοροποίηση μέσω της άμεσης ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Ο MITF συνδέεται άμεσα στον υποκινητή του γονιδίου CDKN2A το οποίο κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p16, p21 και CyclinD1 ελέγχοντας τον γηρασμό των κυττάρων. Το αντιαποπτωτικό γονίδιο BCL2 είναι γονίδιο στόχος για τον MITF και ενεργοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο. Αύξηση του MITF οδηγεί σε αυξηση του BCL2 και αναστολή της απόπτωσης. Το πρωτοογκογονίδιο c-MET το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα για

τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGFR) υπερεκφράζεται στο μελάνωμα και συσχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό της νόσου. Η μεταγραφή του c-MET ρυθμίζεται άμεσα από τον MITF. Η μεταγραφή του παράγοντα SNAI2, κύριου ρυθμιστή της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης ενεργοποιείται άμεσα από τον MITF. Από την άλλη πλευρά, ο MITF συνδέεται άμεσα με τον υποκινητή του γονιδίου DIAPH1 (diaphanous homolog 1), ενεργοποιεί την μεταγραφή του, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της διήθησης στο μελάνωμα ενεργοποιώντας τον πολυμερισμό της ακτίνης [24]

Ο MITF έχει επίσης ρόλο στην έκφραση των κυττοκινών υπεύθυνων για τον έλεγχο της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων. Αύξηση της έκφρασης του MITF οδηγεί σε μειωμένη προσέλκυση/μετανάστευση των ανοσολογικών κυττάρων (CD14+ μονοκύτταρα). Αντιθέτως μείωση της έκφρασης του MITF οδηγεί σε αυξημένη προσέλκυση/μετανάστευση ανοσολογικών κυττάρων [25].

Υψηλή έκφραση του MITF στο εξειδικευμένο δίκτυο γονιδίων για το μελάνωμα, υποδεικνύει φτωχή πρόγνωση για την νόσο [26]. Είναι ξεκάθαρο ότι ο MITF παίζει κύριο ρόλο υπέρ της επιβίωσης του μελανωματικού κυττάρου μέσα από διάφορους μηχανισμούς γενετικής προσαρμογής και φαινοτυπικής πλαστικότητας [27].

2.3. Η ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΣΤΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

2.3.1. Μετάσταση: ένα σύνολο σύνθετων βιολογικών βημάτων

Η πρωτοπαθής βλάβη ενός καρκίνου όσο κακής και διηθητικής φύσεως και αν είναι, μπορεί να προκαλέσει μόνο ένα 10% περίπου των θανάτων από αυτόν τον καρκίνο. Το υπόλοιπο 90% σχεδόν των θανάτων οφείλεται στις καρκινωματώδεις εμφυτεύσεις-μεταστάσεις-που ανακύπτουν σε σημεία και όργανα διαφορετικά του πρωτοπαθούς όγκου.

Η διαδικασία της μετάστασης συμπεριλαμβάνει αλληλουχίες σύνθετων βημάτων, μια διεργασία που αποκαλείται ο καταρράκτης διήθησης-μετάστασης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια πρώιμη εντοπισμένη φάση και μια όψιμη φάση διασποράς σε απομακρυσμένες τοποθεσίες.

Ο καταρράκτης διήθησης-μετάστασης αποδίδεται σε επτά διακριτά βήματα: Το αρχικό βήμα της τοπικής διηθητικότητας επιτρέπει στα κύτταρα του καρκίνου in situ να διασπάσουν την βασική μεμβράνη. Αμέσως μετά, μπορούν να μεταφερθούν ενδαγγειακά είτε σε λεμφαγγείο είτε σε μικρό αιμοφόρο αγγείο. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μεταφερθούν μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας σε απομακρυσμένες ανατομικές τοποθεσίες, όπου μπορούν να παγιδευτούν, ακολούθως να εξέλθουν των αγγείων και να διαμορφώσουν αδρανείς μικρομεταστάσεις. Μερικές από τις μικρομεταστάσεις μπορεί να αποκτήσουν ικανότητα αποικισμού του ιστού στον οποίο έχουν καταλήξει, επιτρέποντας τον σχηματισμό μακροσκοπικών μεταστάσεων. Το τελευταίο βήμα-ο αποικισμός-φαίνεται να είναι το πιο ανεπαρκές από όλα. Η μικρή πιθανότητα να ολοκληρωθούν επιτυχώς όλα τα βήματα αυτού του καταρράκτη εξηγεί την μικρή πιθανότητα ένα μονήρες κύτταρο που αφήνει τον πρωτοπαθή όγκο να επιτύχει ως δημιουργός μιας απομακρυσμένης μακροσκοπικής μετάστασης [28].

Η διάσπαση της βασικής μεμβράνης είναι το ένα και μοναδικό απαραίτητο γεγονός για να χαρακτηρισθεί μια νεοπλασία ως κακοήθης. Από την στιγμή που θα βρεθούν στο ανατομικό διαμέρισμα του στρώματος, τα καρκινικά κύττρα μπορούν να εισέλθουν στην μίκρο- και μακροκυκλοφορία. Η τοπική διήθηση εξαρτάται απόλυτα από την έκκριση ενζύμων-πρωτεασών οι οποίες αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix ECM) δημιουργώντας έτσι χώρο για να προχωρήσουν τα καρκινικά κύτταρα. Πολλά καρκινώματα εκκρίνουν δικές τους πρωτεάσες όπως οι μεταλλοπρωτεάσες 2 και 9 (MMP-2 και MMP-9).

Στην διαδικασία της ενδαγγειακής εισόδου μια τριάδα κυττάρων συνεργάζονται έτσι ώστε να είναι επιτυχής: τα καρκινικά, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η όλη διαδικασία διεγείρεται από τον επιδερμικό αυξητικο παράγοντα (Epidermal Growth Factor-EGF) και τα αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η απώλεια στήριξης από μόνη της μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο που ονομάζεται ανοικής. Αυτό όμως δεν συμβαίνει γιατί το στρώμα προμηθεύει με διάφορους παράγοντες επιβίωσης τα καρκινικά κύτταρα. Το αίμα επίσης αποτελεί εχθρικό περιβάλλον για τα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα προσελκύουν και προσκολλώνται στα αιμοπετάλια προκειμένου να επιβιώσουν των υδροδυναμικών δυνάμεων εντός των αγγείων. Σε αυτό οφείλεται και η θρομβοφιλία της καρκινικής νόσου. Στην συνέχεια τα καρκινικά

κύτταρα στρατολογούν μακροφάγα για να δραπετεύσουν από την κυκλοφορία και να εισέλθουν στο ιστικό παρέγχυμα.

Προκειμένου να αποκτήσουν κινητικότητα και διηθητικότητα τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να απορρίψουν πολλά από τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά, να αποσπαστούν από τα επιθηλιακά τους υποστρώματα και να υποστούν μια δραστική μεταλλαγή: την επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition-EMT). Κατά την μετάβαση αυτή τα επιθηλιακά κύτταρα απορρίπτουν την χαρακτηριστική τους μορφολογία και υιοθετούν το μεταγραφικό πρόγραμμα των μεσεγχυματικών κυττάρων. Να υπενθυμίσουμε ότι αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζει επίσης την μετανάστευση των αρχέγονων μελανοκυττάρων από την νευρική ακρολοφία προς την επιδερμίδα. Έτσι τα κύτταρα έχουν σχήμα ινοβλάστη, χαρακτηριστική κινητικότητα, διηθητικότητα, αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση, έκφραση μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι προάγουν την EMT (όπως ο Slug (SNAI2) στα μελανοκύτταρα αλλά και στο μελάνωμα), μεσεγχυματικές πρωτεΐνες προσκόλλησης (N-cadherin), έκκριση πρωτεασών (MMP-2, MMP-9), έκφραση vimentin, έκκριση ινονεκτίνης, έκφραση υποδοχέα PDGF (Platelet Derived Growth Factor), έκφραση ιντεγκρίνης και χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων. Το μελάνωμα είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα καρκίνου με έντονη και παρατεταμένη EMT με αυξημένη διηθητικότητα και μεταστατικο δυναμικό. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ολοκληρώσουν τα βήματα της διήθησης/μετάστασης επιτυχώς επιστρέφουν στον επιθηλιακό φαινότυπο μέσω μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετάβασης προκειμένου να προχωρήσουν στην διαδικασία αποικισμού [28].

2.3.2. Η μετάσταση στο μελάνωμα δέρματος

Το μελάνωμα μπορεί να δώσει μεταστάσεις σχεδόν σε όλα τα όργανα του σώματος. Οι λεμφαδένες και οι πνεύμονες είναι τα συχνότερα σημεία που εμπλέκονται. Το αναπάντητο ερώτημα είναι αν το μελάνωμα είναι πολυδύναμο και μεθίσταται σε πολλαπλά σημεία ή αν πολλαπλοί κλώνοι είναι παρόντες από τον αρχικό σημείο, με τον κάθε κλώνο να κατευθύνεται σε προσδιορισμένο όργανο όπως στην υπόθεση «του σπόρου και του εύφορου χώματος» όπως προτάθηκε από τον Paget [29].

Σύμφωνα με τον Morton και τους συνεργάτες του [30] το μελάνωμα μεθίσταται με δύο πιθανά μονοπάτια από τον πρωτοπαθή όγκο. Σύμφωνα με την υπόθεση του «εκκολαπτηρίου», ο πρωτοπαθής όγκος στοχεύει τους λεμφαδένες φρουρούς (τους πρώτους λεμφαδένες που προσλαμβάνουν λέμφο από τον όγκο) στην περιοχική ομάδα λεμφαδένων, όπου τα μεταστατικά κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν και να αυξηθούν αργά παραμένοντας σε αδράνεια πριν εξαπλωθούν σε απομακρυσμένα σημεία. Σύμφωνα με την υπόθεση του «δείκτη», το πρωτοπαθές μελάνωμα μεθίσταται συγχρόνως λεμφογενώς και αιματογενώς, έτσι ώστε ο λεμφεδένας φρουρός γίνεται δείκτης της πιθανότητας ύπαρξης συστηματικής νόσου χωρίς να είναι η μοναδική πηγή απομακρυσμένων μεταστάσεων.

Η σύγχρονη θεώρηση του καρκίνου παραθέτει ότι το καρκινικό κύτταρο αλληλεπιδρά με το περιβάλλον στρώμα και με συστημικούς παράγοντες, τα οποία παραδόξως μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου και την επιβίωσή του. Ομοίως, κατά την μετανάστευσή τους, οι μελανοβλάστες και τα μελανοκύτταρα επηρεάζονται από παράγοντες στην κυκλοφορία του αίματος και αφού αποικίσουν την επιδερμίδα εξαρτούνται από εξωγενής παράγοντες για τον πολλαπλασιασμό τους και την διαφοροποίησή τους [31]. Η διηθητική συμπεριφορά των μελανωματικών κυττάρων φαίνεται να είναι «απομεινάρι» της προέλευσής τους από την νευρική ακρολοφία. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό που ξεχωρίζει το μελάνωμα από τους άλλους καρκίνους του δέρματος [32].

Περιέργως, η διαδικασία της διήθησης και της μετάστασης δεν παράγει πάντα μακροσκοπικούς όγκους, ούτε ακολουθεί ένα συνεχές μονοπάτι ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Πιο πιθανό είναι, τα διασκορπισμένα καρκινικά κύτταρα να παραμένουν σε μια ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης ή εναλλαγή φάσεων ανάπτυξης και αδράνειας. Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μελανώματος όπου μακροσκοπικές μεταστάσεις αναπτύσσονται χρόνια μετά την αρχική αντιμετώπιση του πρωτοπαθούς όγκου (είτε χειρουργικά, είτε φαρμακευτικα) [31].

Πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν τους μηχανισμούς πλαστικότητας του μελανώματος σχετικούς με τις εναλλαγές των κακοηθών ιδιοτήτων όπως πολλαπλασιασμός, διήθηση, ογκογένεση. Ο MITF, ο κύριος ρυθμιστής του μελανοκυττάρου, φαίνεται να είναι ο διαμεσολαβητής κλειδί της εναλλαγής μεταξύ του

αργώς αναπτυσσόμενου διηθητικού φαινότυπου και του πολλαπλασιαστικού φαινότυπου.

Στην σύγχρονη μελέτη του καρκίνου έχουν επικρατήσει δύο μοντέλα διάδοσης του καρκίνου:

Το μοντέλο κλωνικής (στοχαστικής) εξέλιξης, το οποίο είναι το βασικό μοντέλο για την περιγραφή της νεοπλασματικής μεταλλαγής και προόδου του καρκίνου (επίσης αναφέρεται ως Δαρβινικό μοντέλο). Σε αυτό το μοντέλο, κλώνοι του καρκίνου προέρχονται από ένα μονήρες κύτταρο το οποίο έχει υποστεί γενετικές ή επιγενετικές βλάβες, οι οποίες του προσδίδουν πλεονεκτικές ικανότητες ανάπτυξης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα και επίσης η πλειονότητα των κυττάρων έχουν ογκογόνες ικανότητες και μπορούν να προάγουν την επιβίωση του όγκου. Επαναληπτικοί κύκλοι πολλαπλασιασμού, οδηγούν σε μεγαλύτερη γενετική ή επιγενετική αστάθεια, προσδίδοντας στον καρκίνο νέα χαρακτηριστικά. Αυτό το μοντέλο θεωρεί ότι οι όγκοι μπορούν να εξελιχθούν σε ένα ετερογενές σύνολο από υπό-κλώνους ως αποτέλεσμα των ενδοογκικών γενετικών και επιγενετικών παραλλαγών, της διαφοροποίησης και των παραγόντων του τοπικού μικροπεριβάλλοντος.

Το δεύτερο μοντέλο που κερδίζει έδαφος την τελευταία δεκαετία είναι εκείνο του ανταγωνισμού καρκινικού και βλαστικού κυττάρου (competing cancer stem-cell model -CSC model). Αυτό το μοντέλο περιγράφει την διάδοση των κυττάρων που έχουν ήδη καρκινικές ιδιότητες. Υποστηρίζει ότι οι μηχανισμοί προόδου του όγκου βασίζονται σε προκαθορισμένους, ιεραρχικούς και σταθερής οργάνωσης μηχανισμούς αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης. Ο υποπληθυσμός CSC (επίσης αναφέρονται και ως κύτταρα έναρξης του όγκου-tumor initiating cells) είναι προικισμένος με την ικανότητα της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης με ένα οργανωμένο ιεραρχικό τρόπο παράγωντας ολόκληρο τον μη-ογκογόνο ετερογενή πληθυσμό απόγονων κυττάρων. αυτό το μοντέλο δηλαδή προτείνει ότι οι όγκοι έχουν τουλάχιστον δυο διακριτούς πληθυσμούς κυττάρων: έναν μικρότερο ογκογόνο CSC πληθυσμό και έναν μεγαλύτερο μη-ογκογόνο πληθυσμό από θυγατρικά κύτταρα με περιορισμένη διάρκεια ζωής.

Πρόσφατες παρατηρήσεις πάνω στην αναστρέψιμη πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων οδήγησαν στην πρόταση ότι οι παρατηρούμενοι καρκινικοί φαινότυποι μπορεί να είναι στην πραγματικότητα ένα «στιγμιότυπο» της δυναμικής τους

κατάστασης. Έτσι παρουσιάστηκε ένα μοντέλο φαινοτυπικής αστάθειας (επίσης μοντέλο αλληλομετατροπής) το οποίο βασίστηκε στις παρατηρήσεις φαινοτυπικής αστάθειας στις έρευνες για το μελάνωμα. Το μοντέλο φαινοτυπικής πλαστικότητας προτείνει ότι η ετερογένεια του όγκου οφείλεται σε αναστρέψιμες αλλαγές μέσα στην γενεαλογία ογκογόνων υπο-κλώνων. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι η πλαστικότητα του καρκίνου είναι συνάρτηση ενός αριθμού συναφών παραγόντων όπως η ιστική προέλευση, τα μονοπάτια ανάπτυξης του όγκου, το στάδιο κακοήθειας, το μικροπεριβάλλον και η δράση των θεραπειών [31].

Ο μεταγραφικός παράγοντας σχετιζόμενος με την μικροφθαλμία-MITF, έχει αναχθεί σε παράγοντα κλειδί όσο αφορά στην φαινοτυπική αστάθεια του μελανώματος. Μία από τις πρώτες προσπάθειες να συνδεθούν τα επίπεδα έκφρασης του MITF με τον παρατηρούμενο φαινότυπο είναι το μοντέλο «ρεοστάτη» (επίσης επονομαζόμενο «δυναμικό επιγενετικό μοντέλο»). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο υψηλά επίπεδα έκφρασης του MITF προάγουν ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων με αποκορύφωμα την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Μεσαία επίπεδα έκφρασης του MITF οδηγούν από την αδράνεια στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μελανώματος, ενώ ακόμα περαιτέρω μείωση της έκφρασης του MITF οδηγεί ξανά σε στάση του κυτταρικού κύκλου και προαγωγή της διήθησης και της μετάστασης. Τέλος, η μόνιμη μείωση της έκφρασης του MITF οδηγεί σε γηρασμό και θάνατο [17].

Ο MITF είναι ο κυριότερος ρυθμιστής της ισορροπίας μεταξύ διαφοροποίησης (γονιδιακή έκφραση ειδική για τα μελανοκύτταρα) και από-διαφοροποίησης (γονιδιακή έκφραση ειδική για τα κύτταρα νευρικής ακρολοφίας). Η φυσιολογική έκφραση του MITF καταστέλλει την διήθηση. Ο MITF ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου συνόλου γονιδίων που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης, και συνεπώς την μετανάστευση και την διήθηση. Οι έρευνες δείχνουν ότι η έκφραση του MITF μειώνεται κατά την πρόοδο του μελανώματος σε μεταστατική νόσο, αυξάνοντας την διηθητικότητα και την μεταστατικότα [33]. Το μικροπεριβάλλον και οι παράγοντές του επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης και την λειτουργία του MITF. Οι εναλλαγές του φαινότυπου που προάγουν οι παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος μέσω επιγενετικών αλλαγών οδηγούν σε ένα ετερογενή όγκο αποτελούμενο από MITF-θετικούς και MITF-αρνητικούς πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί αυτοί με τους διαφορετικούς

φαινότυπους, φαίνεται να επικοινωνούν και συλλογικά να ενεργούν για μια επιτυχημένη πρόοδο νόσου [34][87].

ΙΙΙ. Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝΤΟΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΜΦΟΓΕΝΟΥΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ

3.1. IN-TRANSIT (ΚΑΘ'ΟΔΩΝ) ΚΑΙ ΔΟΡΥΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΕΙΣ

Όταν το μελάνωμα υποτροπιάζει μετά από οριστική χειρουργική θεραπεία του πρωτοπαθούς όγκου αυτό συνήθως συμβαίνει πρώτα τοπικά ή περιοχικά. Ο όρος τοπικοπεριοχική υποτροπή περιλαμβάνει την αληθή τοπική υποτροπή και τις δορυφόρες μεταστάσεις (μέσα ή κοντά αρχική τοποθεσία εκτομής του μελανώματος), την καθ'οδών υποτροπή (in-transit-ανάμεσα στην τοποθεσία της πρωτοπαθούς εστίας και της πλησιέστερης περιοχικής λεμφαδενικής ομάδας) και τις μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες. Στην βιβλιογραφία, οι ορισμοί της τοπικής υποτροπής και της καθ'οδών υποτροπής ποικίλουν αρκετά, με όρια από <2 cm έως <5cm από την αρχική βλάβη για την τοπική υποτροπή και >2 cm έως>5cm από την αρχική βλάβη για την καθ'οδών υποτροπή. Σύμφωνα με το AJCC σύστημα σταδιοποίησης βλάβες οι οποίες βρίσκονται σε απόσταση>2cm χαρακτηρίζονται ως καθ'οδών μεταστάσεις. Στην 8η έκδοση του AJCC για την σταδιοποίηση του μελανώματος, εισήχθη ο όρος «ενδολεμφική μετάσταση» για την συνδυασμένη ομάδα τοπικών και καθ'οδών βλαβών. Δορυφόρες μεταστάσεις θεωρούνται οι βλάβες εντός δύο εκατοστών από το σημείο του αρχικού μελανώματος [7].

Οι τοπικές και οι καθ'οδών μεταστάσεις του μελανώματος αποτελούν κλινική εκδήλωση της παγίδευσης καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία του χορίου και της υποδερμίδας μεταξύ της τοποθεσίας της αρχικής βλάβης και της περιοχικής ομάδας λεμφαδένων. Έχουν προταθεί και άλλες θεωρίες. Αυτές περιλαμβάνουν την διασκόρπιση των καρκινικών κυτάρων διαμέσου των ιστικών υγρών, διασπορά των καρκινικών κυττάρων γύρω από την επιφάνεια του αυλού των λεμφαγγείων και των αιμοφόρων αγγείων σε περικυτταρική τοποθεσία (αγγειοτροπισμός) και ενοφθαλμισμός καρκινικών κυττάρων μετά από διασπορά μέσω του αίματος [7]

Όταν είναι παρούσες, οι καθ'οδών μεταστάσεις είναι πολλαπλές, εξελίσσονται με τον χρόνο και συχνά είναι προάγγελος της επακόλουθης συστηματικής νόσου. Εντούτοις, μπορεί απλώς να είναι μια απλή ενόχληση για τον ασθενή χωρίς σημαντικό αντίκτυπο στις καθημερινές δραστηριότητες ή στην επιβίωση.

Μέχρι 10% των ασθενών με μελάνωμα δέρματος θα αναπτύξει υποτροπιάζουσα τοπικοπεριοχική νόσο. Το πάχος του μελανώματος και η εξέλκωση είναι επιβαρυντικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση υποτροπής

Στην πιο πρόσφατη σταδιοποίηση AJCC, η τοπική υποτροπή/δορυφόρες μεταστάσεις (satellitosis), οι καθ'οδών μεταστάσεις (in-transit) και η λεμφαδενική υποτροπή, έχουν κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και προγνωστική αξία και γι'αυτό κατατάσσονται ως N1c (χωρίς διηθημένο λεμφαδένα), N2c (με ένα διηθημένο λεμφαδένα) και N3c (≥2 διηθημένους λεμφαδένες) [10].

3.2. HYPERTHERMIC ISOLATED LIMB PERFUSION (Υπερθερμική διάχυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε αγγειακά απομονωμένο μέλος)- HILP

3.2.1. Η τεχνική

Η υποτροπιάζουσα τοπικοπεριοχική νόσος του μελανώματος, όπως κάθε άλλη μορφή της νόσου, αποτελεί μια θεραπευτική πρόκληση αφού είναι ανθεκτική τόσο στην χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία. Εν απουσία αποτελεσματικών θεραπειών, η διάχυση χημειοθεραπευτικών ή βιολογικών παραγόντων σε απομονωμένο αγγειακά μέλος (ILP), εξελίχθηκε ως ένας τρόπος διαχείρισης του προχωρημένου τοπικοπεριοχικού μελανώματος. Οι ασθενείς με τοπική υποτροπή μελανώματος σε ένα μέλος με ή χωρίς διήθηση των περιοχικών λεμφαδένων, είναι η ομάδα ασθενών για τους οποίους το ILP είναι κατάλληλο.

Το ILP αρχικά περιεγράφηκε από τους Creech και Krementz την δεκαετία του 1950 για ασθενείς με ανεγχείρητα σαρκώματα ή καθ'οδών μεταστάσεις μελανώματος [35]. Κατά την διάρκεια των επόμενων τεσσάρων δεκαετιών, επιπλέον εμπειρία με το ILP ανακοινώθηκε από περιορισμένο αριθμό κέντρων χωρίς να καταλήξουν στα κριτήρια επιλογής των ασθενών, στις βέλτιστες θεραπευτικές παραμέτρους και στους

θεραπευτικούς στόχους [36]. Επιπλέον η πληθώρα των δημοσιεύσεων κατά αυτή την χρονική περίοδο ήταν αναφορές από ένα κέντρο όπου δεν υπήρχε κατάλληλος πληθυσμός ελέγχου για να καθοριστεί τελικά το κέρδος από το ILP ή για ποιον ήταν κατάλληλη η μέθοδος. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και ως επικουρική θεραπεία σε ασθενείς με διαφορετικό ρίσκο υποτροπής συμπεριλαμβανομένων και των ασθενών των οποίων είτε οι αρχικές βλάβες είτε οι υποτροπές είχαν εκταμεί. Οι στόχοι μετά από θεραπευτικό ILP συμπεριλάμβαναν τα ποσοστά ανταπόκρισης, την διάρκεια ανταπόκρισης και την επιβίωση.

Η σύγχρονη εποχή του ILP στην πραγματικότητα ξεκίνησε το 1992 με την ανακοίνωση του Lienard και των συνεργατών του [37] για χρήση του βιολογικού παράγοντα TNFα (tumor necrosis factor alpha) με μελφαλάνη σε ασθενείς με καθ'οδών μεταστάσεις μελανώματος ή ανεγχείρητο σάρκωμα μέλους. Λόγω της πιθανής βαριάς συστηματικής τοξικότητας και την ανησυχία για τις τοπικές παρενέργειες κατά την χρήση TNFα στο ILP, αρχίζουν να διαμορφώνονται και να υιοθετούνται συγκεκριμένα πρωτόκολλα θεραπείας και έλεγχος παραμέτρων της επέμβασης, όπως η συστηματική συνεχόμενη παρακολούθηση της διαφυγής [7]. Η αρχική δόση του TNFα είχε ορισθεί εμπειρικά και υπογραμμίζει το γεγονός ότι ελάχιστες μελέτες συνεισέφεραν στον ορισμό των κατάλληλων φαρμάκων, δόσεων και την εφαρμογή του ILP την κατάλληλη χρονική στιγμή.

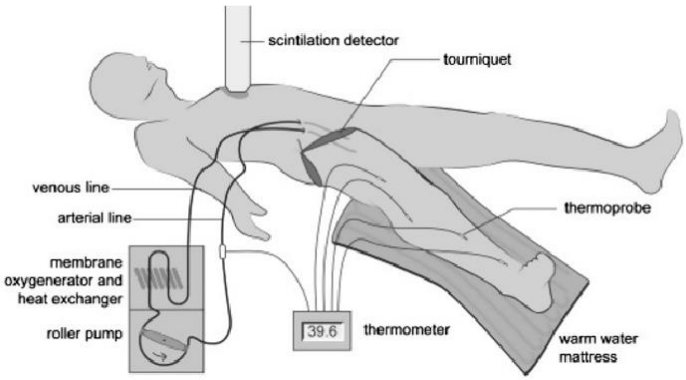
Επειδή η μελφαλάνη είχε εφαρμοστεί με επιτυχία, και άλλοι παράγοντες προστέθηκαν στην μελφαλάνη ή στην θέση της μελφαλάνης. Σαν μοναδικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας η ιδανική δόση, η διάρκεια εφαρμογής και ο στόχος θερμοκρασίας ιστού ήταν διαφορετικά ανάμεσα σε διάφορα κέντρα. Η αρχική δόση της μελφαλάνης βασισμένη στο βάρος σώματος ήταν από 1 έως 1,5 mg/kg για τα κάτω άκρα και πιο μικρή δόση για τα άνω άκρα.

Το ILP είναι μια εξειδικευμένη χειρουργική τεχνική η οποία εφαρμόζεται υπό γενική αναισθησία. Μέσω του ILP επιτυγχάνουμε δύο κύρια φαρμακοκινητικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την συστηματική αντινεοπλασματική θεραπεία: α) υψηλή συγκέντρωση φαρμάκων στην περιοχή του όγκου, β) χαμηλή συστηματική τοξικότητα. Η επέμβαση διενεργείται σε τρεις φάσεις: 1) Χειρουργική Παρασκευή (λεμφαδενεκτομή και προετοιμασία των αγγείων), 2) Φάση της διάχυσης, 3) Φάση της αποκατάστασης [38][39].

Η επέμβαση ξεκινάει με την χειρουργική παρασκευή. Η πιο συχνή αγγειακή προσπέλαση για τα κάτω άκρα είναι τα λαγόνια αγγεία ενώ για τα άνω άκρα τα μασχαλιαία αγγεία. Για βλάβες στα κάτω άκρα, μπορούν να επιλεχθούν και περιφερικότερες προσπελάσεις(μηριαία αγγεία, ιγνυακά αγγεία). Για την απομόνωση των λαγονίων αγγείων προτιμάται οπισθοπεριτοναϊκή προσπέλαση με τομή στον σύστοιχο λαγόνιο βόθρο, ενώ σε δύσκολές περιπτώσεις χρειάζεται επέκταση της τομής μηριαία και διατομή του βουβωνικού συνδέσμου. Σε αυτή την φάση εκτελείται λεμφαδενεκτομή εάν δεν έχει προηγηθεί σε άλλο χειρουργείο, των περιοχικών μηροβουβωνικών και λαγόνιων λεμφαδένων έως τον διχασμό των κοινών λαγόνιων αγγείων. Ολόκληρη η παράλληλη κυκλοφορία της περιοχής ελέγχεται έτσι ώστε να αποφευχθεί η διαφυγή του διαλύματος διάχυσης στην συστηματική κυκλοφορία. Αφού αποσκελετωθούν τα κύρια αγγεία, ένα καρφί Steinmann καρφώνεται στο λαγόνιο οστό ή όπως εκτελείται στην κλινική μας, ένα άγγιστρο Omni-tract στερεώνεται στο χειρουργικό τραπέζι, οι καθετήρες εισέρχονται στα αγγεία με την κορυφή τους να φτάνει μόλις κάτω από τον βουβωνικό σύνδεσμο και ένας αιμοστατικός επίδεσμος Esmarch τυλίγεται σφιχτά γύρω από την ρίζα του μέλους και καθηλώνεται στερεά στο καρφί ή στο άγγιστρο [40]. Έτσι αποφεύγεται η διαφυγή διαμέσου των αγγείων του δέρματος. Στην συνέχεια οι καθετήρες συνδέονται σε σύστημα εξωσωματικής κυκλοφορίας και η φάση διάχυσης ξεκινά.

Για την φάση διάχυσης απαιτείται ένα κλειστό κύκλωμα, το οποιο αποτελείται από μια αντλία, μια μονάδα θέρμανσης/ψύξης, έναν οξυγονωτή και μια δεξαμενή όπου περιέχεται το διάλυμα διάχυσης (Εικόνα 8). Πριν συνδεθούν τα αγγεία στο σύστημα εξωσωματικής κυκλοφορίας γίνεται ηπαρινισμός του ασθενούς (300 IU ηπαρίνης/kg). Για να εξασφαλιστεί η αγωγιμότητα των αγγείων κατά την παραμονή σε σύνδεση στο σύστημα εξωσωματικής κυκλοφορίας, στο διαλυμα διάχυσης περιέχονται 2500-5000 IU ηπαρίνης. Αφού εγκαταστασθεί μια ικανοποιητική ροή για τον όγκο του μέλους, μεταξύ μέλους και αντλίας (από 40 έως 70 ml/L όγκου του μέλους), ξεκινάει ο έλεγχος διαφυγής του διαλύματος προς την συστηματική κυκλοφορία. Ειδικά στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται TNFα το στάδιο αυτό είναι υποχρεωτικό και ζωτικής σημασίας. Ο έλεγχος διαφυγής γίνεται με την χρήση ραδιοσεσημασμένης με Τεχνήτιο -99 αλβουμίνης ή ραδιοσεσημασμένων με Τεχνήτιο -99 ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μια αρχική δόση 1MBq από TC-99m σεσημασμένης ουσίας ή κυττάρων χορηγείται στην συστηματική κυκλοφορία και μια αρχική μέτρηση καταγράφεται. Στην συνέχεια

χορηγείται δόση 10 MBq από Tc-99m σεσημασμένης ουσίας ή κυττάρων στην δεξαμενή του διαλύματος και αρχίζει επίσημα η καταγραφή της διαφυγής. Διπλασιασμός της αρχικής τιμής καταγραφής αντιστοιχεί σε 10% διαφυγή της ραδιενεργής ουσίας από την δεξαμενή προς την συστηματική κυκλοφορία. Διαφυγές μεγαλύτερες από 10% είναι ένδειξη διακοπής της διαδικασίας διάχυσης. Η καταγραφή της διαφυγής γίνεται με γ-NaI(TI) σπινθιριστή παράλληλης δέσμης στο επίπεδο της καρδιάς του ασθενούς [41] (Εικόνα 8). Κατά τη φάση της διάχυσης γίνεται συνεχής παρακολούθηση της στάθμης της δεξαμενής του διαλύματος (αύξηση της στάθμης



1

2

3

4

Εικόνα 8. 1. Σχηματική αναπαράσταση της επέμβασης, 2. Η συσκευή εξωσωματικής κυκλοφορίας, 3. Ο ευθύγραμμος σπινθιριστής ελέγχου διαφυγής, 4. Διεγχειρητική φωτογραφία με τον αιμοστατικό επίδεσμο Esmarch στερεωμένο στο άγγιστρο Omni-tract

σημαίνει εισροή από την συστηματική κυκλοφορία προς το μέλος, ενώ μείωση της στάθμης σημαίνει διαφυγή του διαλύματος προς την συστηματική κυκλοφορία).

Σημαντικός παράγοντας είναι η συστηματική αρτηριακή πίεση η οποία πρέπει να είναι 15 mmHg υψηλότερη από την πίεση του κλειστού συστήματος εξωσωματικής κυκλοφορίας. Αναλόγως πρέπει να ρυθμίζεται και η ροή στο κύκλωμα (σε περίπτωση διαφυγής ο ρυθμός ροής μειώνεται). Αφού εξακριβωθεί ότι δεν υπάρχει διαφυγή χορηγούνται οι χημειοθεραπευτικοί ή/και οι βιολογικοί παράγοντες. Κατά την διάρκεια της διάχυσης εφαρμόζεται ήπια υπερθερμία από 38,5^{o} C έως 40° C. Αυτή διατηρείται τόσο μέσω της θέρμανσης του διαλύματος από το σύστημα εξωσωματικής κυκλοφορίας, όσο και από το περιτύλιγμα του μέλους με κουβέρτες θερμού αέρα ή θερμού νερού. Η φάση της διάχυσης διαρκεί από 60 έως 90 λεπτά.

Η φάση αποκατάστασης ξεκινάει με το ξέπλυμα του μέλους με πέντε λίτρα κρυσταλλοειδών ή/και κολλοειδών διαλυμάτων. Οι καθετήρες αφαιρούνται από τα αγγεία και η συνέχεια των αγγείων αποκαθίσταται με συρραφή. Εάν έχουν αποκαλυφθεί τα μηριαία αγγεία αυτά καλύπτονται με μετάθεση του ραπτικού μυός. Συνήθως τοποθετούνται παροχετεύσεις κλειστού τύπου-κενού.

3.2.2. Μελφαλάνη

Η μελφαλάνη ανήκει στου αλκυλιούντες παράγοντες οι οποίοι έχουν σαν στόχο τον πυρήνα του καρκινικού κυττάρου και το DNA. Όταν χορηγείται συστηματικά, η μελφαλάνη, δεν έχει καμία δράση έναντι του μελανώματος. Επειδή όμως είναι ένωση φαινυλαλανίνης, φυσική πρόδρομη ουσία της βιοσύνθεσης της μελανίνης, τα κύτταρα μελανοκυτταρικής προέλευσης την προσλαμβάνουν με υψηλό ρυθμό. Η δόση μελφαλάνης υπολογίζεται βάσει τον όγκο του μέλους. Έτσι για το κάτω άκρο έχει διαμορφωθεί η δόση 10mg/L όγκου μέλους, ενώ για το άνω άκρο είναι 13mg/L όγκου μέλους [7].

3.2.3. Υπερθερμία

Στην αρχική ανακοίνωση του ILP, το 1957, ο Creech χρησιμοποίησε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αλλά όχι υπερθερμία. Οι περισσότεροι ερευνητές με την πρόοδο της τεχνολογίας και την βελτίωση των «εξωσωματικών κυκλοφορητών» ενσωμάτωσαν κάποιο βαθμό υπερθερμίας στο πρωτόκολλο θεραπείας. Οι έρευνες έδειξαν ότι θερμοκρασία ιστού έως 42° C προκαλούσε βαριά τοξικότητα με άλγος,

οίδημα, φλύκταινες και λειτουργική αδυναμία του μέλους στο 70% των ασθενών. Αντιθέτως θερμοκρασίες ιστού έως 40° C είχαν ελάχιστη τοξικότητα και αύξαναν την αντόποκριση στην θεραπεία με ILP μελφαλάνης από 35% στο 80%. Τα περισσότερα κέντρα που εκτελούν ILP έχουν στόχο θερμοκρασίας ιστού από 38,5° C έως 40° C [7].

3.2.4. Tumor Necrosis Factor a (TNFa)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (Tumor Necrosis Factor alpha-TNFα) είναι μια πολυλειτουργική κυττοκίνη η οποία εμπλέκεται στην απόπτωση, στην κυτταρική επιβίωση, στην φλεγμονή και στην ανοσία ενεργώντας μέσω δύο υποδοχέων: TNF-R1 και TNF-R2. Αν και η χημική έλξη του TNF για τον TNF-R2 είναι πέντε φορές μεγαλύτερη απ' ότι για τον TNF-R1, οι περισσότερες βιολογικές ενέργειες του TNF εκτελούνται μέσω του TNF-R1. Δύο μονοπάτια είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν μετά την σύνδεση TNF-υποδοχέα: α) ένα αποπτωτικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών και κυτταρικό θάνατο και β) ένα μονοπάτι πολλαπλασιασμού και επιβίωσης που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB. Η ενεργοποίηση του TNF-R1 είναι σημαντική για το αποπτωτικό μονοπάτι.

Η δράση του TNFα στους συμπαγείς όγκους προκαλεί αιμορραγική νέκρωση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα αγγεία των όγκων εκφράζουν σε υψηλές συγκεντρώσεις TNF-R1 στις μεμβράνες τους, γεγονός συνυφασμένο με την αυξημένη αγγειογένεση στους όγκους. Αυτό καθιστά τους όγκους, ειδικούς στόχους για θεραπεία με TNF. Όταν εφαρμόζεται TNFα μέσω ILP, λόγω της υψηλής συγκέντρωσής του, καταλαμβάνει όλους τους TNF-R1 υποδοχείς του όγκου. Το υγιές ενδοθήλιο επίσης προσδένει TNF αλλά λόγω της μικρής συγκέντρωσης των υποδοχέων δεν υπάρχει τοξικότητα (στα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα η μεγαλύτερη συγκέντρωση TNF-R1 είναι αποθηκευμένη στο σύστημα Golgi). Η σύνδεση TNFα-TNF-R1 προκαλεί μια υπερδιαπερατότητα στα αγγεία του όγκου και μαζική εξαγγείωση των έμμορφων συστατικών του αίματος. Αυτό καταλήγει σε μαζική αιμορραγική νέκρωση του όγκου. Συγχρόνως η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων του όγκου επιτρέπει στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα του ILP να εισέλθουν στον όγκο και να κατανεμηθούν σε όλη την έκτασή του, στοχεύοντας τα κύτταρα του. Η αιμορραγική νέκρωση και η νέκρωση των κυττάρων οδηγούν στην «διάλυση» του όγκου [42][43].

Στην Ευρώπη η χρήση του TNFα στο HILP έτυχε ευρείας αποδοχής [42], σε αντίθεση με τις ΗΠΑ όπου παρόλο που μόνο μία και μάλλον μεροληπτική μελέτη συνέκρινε το Melphalan-HILP με το TNFα/Melphalan-HILP και η οποία δεν βρήκε όφελος από την χρήση του TNFα [44], ο βιολογικός παράγοντας δεν έλαβε ποτέ έγκριση για χρήση από τον FDA.

Το ILP με μελφαλάνη και TNFα υπό ήπια υπερθερμία αποδείχθηκε ισχυρό θεραπευτικό εργαλείο για το υποτροπιάζον μελάνωμα. Η ανταπόκριση μπορεί να φτάσει το 89% με την πλήρη ανταπόκριση να φτάνει στο 61%και η μερική ανταπόκριση στο 28%. Η μεγαλύτερη ανταπόκριση αναδείχθηκε με δόση TNFα στα 2mg [43][45]. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς διατηρούσαν το μέλος τους. Η μέση πενταετής ολική επιβίωση για τους ασθενείς με μελάνωμα μετά από HILP είναι 36,5% ενώ το μέσω διάστημα ολικής επιβίωσης είναι 36,70 μήνες [46].

3.2.5. Η τοξικότητα του HILP

Η τοξικότητα του HILP μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: την περιοχική και την συστηματική. Η περιοχική οφείλεται στην απευθείας δράση του TNFα, της υπερθερμίας και των χημειοθεραπευτικών στο μέλος. Από την άλλη, η συστηματική τοξικότητα οφείλεται στην φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλεί η επέμβαση στον οργανισμό καθώς και μικροδιαφυγές υπολειμμάτων των ουσιών στην συστηματική κυκλοφορία.

Η περιοχική τοξικότητα ταξινομείται σύμφωνα με την κλίμακα Wieberdink σε πέντε βαθμίδες [47]: Πρώτου βαθμού τοξικότητα: χωρίς υποκειμενικά ή αντικειμενικά στοιχεία αντίδρασης. Δευτέρου βαθμού: ήπιο ερύθημα και οίδημα. Τρίτου βαθμού: έντονο ερύθημα ή/και οίδημα και εμφάνιση φλυκταινών. Ήπια διαταραχή στην κινητικότητα του άκρου. Τετάρτου βαθμού: εκτεταμένη επιδερμόλυση ή/και φανερές βλάβες των εν τω βάθει ιστών οι οποίες προκαλούν μεγάλου βαθμού λειτουργικές διαταραχές. Επαπειλούμενο σύνδρομο διαμερίσματος. Πέμπτου βαθμού: τοξικότητα η οποία μπορεί να απαιτήσει ακρωτηριασμό. Η τοξικότητα είναι εντονότερη στις γυναίκες, σε ηλικίες >75 ετών, σε θερμοκρασίες ιστού >41° C και στην λαγόνια προσπέλαση.

Η συστηματική τοξικότητα μετά από HILP οφείλεται σε μικροδιαφυγές TNFα και μελφαλάνης στην συστηματική κυκλοφορία τόσο κατά την διάρκεια (διαφυγή <10%)

αλλά και μετά την φάση της εκπλυσης του μέλους και αποκατάστασης της κυκλοφορίας. Οι εκδηλώσεις τοξικότητας μπορεί να είναι: σύνδρομο προσομοιάζον σηπτική καταπληξία, λευκοπενία, θρομβοκυττοπενία, αντιδράσεις υπερευαισθησίας με ερύθημα, μεταβολές επιπέδου συνείδησης και κεφαλαλγία, καρδιακές αρρυθμίες και καρδιακή ανεπάρκεια, φλεβική θρόμβωση, αποφρακτική αρτηριακή νόσο, οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων και πνευμονικό οίδημα, ναυτία, έμετος και διάρροια, ηπατοτοξικότητα, πρωτεϊνουρία και οξεία νεφρική ανεπάρκεια, πυρετός με ρίγος. Όλες οι παραπάνω εκδηλώσεις τοξικότητας μπορούν να εμφανιστούν από το πρώτο εικοσιτετράωρο έως και την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα. Λόγω όλων των παραπάνω εκδηλώσεων, παρόλο που είναι αναστρέψιμες, απαιτείται νοσηλεία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας άμεσα μετεγχειρητικά [48].

3.2.6. Η θέση του HILP στην σύγχρονη θεραπεία του μελανώματος

Το HILP είναι μια εξαιρετικά σύνθετη επέμβαση η οποία πρέπει να διενεργείται σε εξειδικευμένα κέντρα από πολυδύναμες ομάδες ιατρών. Ως τοπικοπεριοχική θεραπεία το HILP είναι σημαντικό ως χειρουργική διάσωσης του μέλους ασθενών με υποτροπιάζον μελάνωμα [49].

Όπως για κάθε σύνθετη παρηγορική θεραπεία της οποίας οι ενδείξεις είναι περιορισμένες, σε συνδυασμό με τους ηθικούς περιορισμούς της εναλλακτικής (δηλ. ακρωτηριασμός), υπάρχει έλλειψη καλά σχεδιασμένων προοπτικών μελετών για το HILP. Οι μεμονωμένες όμως ανακοινώσεις που προέκυψαν την τελευταία εικοσαετία ανέδειξαν την αξία του ως θεραπευτικό πρωτόκολλο. Η διαχείριση του μελανώματος σε προχωρημένο στάδιο έχει αλλάξει δραματικά με την εισαγωγή της ανοσοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας. Οι ασθενείς όμως με ογκώδεις και πολυάριθμες καθ'οδών μεταστάσεις διαμορφώνουν μια πολύ διακριτή υποομάδα ασθενών με μελάνωμα. Συνήθως η ασθένεια σταδιοποιείται ως σταδίου III και η περιοχική προσέγγιση είναι επιβεβλημένη. Τα εντυπωσιακά αποτελέσματα του HILP όμως, καταγράφηκαν την εποχή που δεν υπήρχαν αποτελεσματικές θεραπείες. Η ερώτηση που προκύπτει λοιπόν είναι αν το HILP θα θεωρηθεί ξεπερασμένο στο προσεχές μέλλον ή θα διατηρήσει μια θέση στην αντιμετώπιση του μελανώματος με αυστηρές ενδείξεις.

Στην διαδικασία επιλογής ασθενών κατάλληλων για HILP υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί ή ασάφειες. Έτσι, ο όρος εξαιρεσιμότητα των βλαβών δεν έχει οριστεί

επακριβώς και η έννοια διαφέρει ευρέως μεταξύ των ειδικών του μελανώματος. Η χειρουργική από μόνης της αναλόγως τον όγκο, τον αριθμό και την τοποθεσία των βλαβών, θα μπορούσε να διαχειριστεί την περιοχική νόσο. Ένας άλλος βασικός περιορισμός είναι ότι παρόλο που το HILP είναι αναγνωρισμένα αποτελεσματικό (μετά από πλήρη ανταπόκριση μπορεί να επεκταθεί μέχρι και δύο έτη η περίοδος ελεύθερη νόσου και τριετή επιβίωση στο 40% [45]), επειδή είναι σύνθετο και κοστοβόρο, δεν είναι διαθέσιμο σε όλα τα νοσηλευτικά ιδρύματα [50]. Έτσι για την Ελλάδα η κλινική Χειρουργικής Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου είναι το μοναδικό δημόσιο θεραπευτικό ίδρυμα που προσφέρει την δυνατότητα εκτέλεσης αυτής της επέμβασης.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network έκδοση 2.2019 για το μελάνωμα, για ασθενείς σταδίου III με κλινικές ή μικροσκοπικές καθ'οδών ή δορυφόρες μεταστάσεις μετά την αρχική θεραπεία, το ILP με μελφαλάνη αναφέρεται στις προτιμώμενες θεραπείες [51].

IV. ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (Circulating Melanoma Cells-CMCs)

Όπως αναλύσαμε νωρίτερα, η μετάσταση είναι μια σύνθετη, πολυεπίπεδη διεργασία η οποία απαιτεί την απόκτηση διαφορετικών ιδιοτήτων από τα καρκινικά κύτταρα σε ακριβείς χρονικές στιγμές. Τα μεταστατικά κύτταρα πρέπει να κινητοποιηθούν από τον αρχικό όγκο, να διηθήσουν τους γύρω ιστούς, να εισέλθουν, να επιβιώσουν και να εξέλθουν της κυκλοφορίας του αίματος, να αποικήσουν απομακρυσμένους ιστούς και τελικά να δώσουν αρχή σε μια απομακρυσμένη μετάσταση. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells-CTCs) αποτελούν ένα ενδιάμεσο στάδιο της μετάστασης. Τα κύτταρα που καταφέρνουν να επιβιώσουν, εξέρχονται από την κυκλοφορία και μπορούν να ξεκινήσουν να πολλαπλασιάζονται και να αποικούν. Τις περισσότερες φορές όμως, τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται μέσα στο παρέγχυμα των οργάνων και παραμένουν εκεί σε μια αδρανή κατάσταση αλλά διατηρώντας το μεταστατικό τους δυναμικό [52].

Το μελάνωμα είναι ο πρώτος συμπαγής όγκος για τον οποίο ανιχνεύθηκαν κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα με βασισμένη σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction-PCR) ενίσχυση του γονιδίου της

τυροσινάσης-ειδικού για τα μελανοκύτταρα [53]. Τα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα (Circulating Melanoma Cells-CMCs) είναι καρκινικά μελανοκύτταρα που αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και κυκλοφορούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, διαμορφώνοντας την βάση για την μεταστατική νόσο. Παρόλο που 10^6 κύτταρα ανά γραμμάριο ιστού μπορούν να υποστούν αποφολίδωση καθημερινά από τον πρωτοπαθή όγκο στην συστηματική κυκλοφορία, μόνο ένα έως τρία κύτταρα στην καλύτερη περίπτωση επιζούν στο αίμα. Τα μελανωματικά κύτταρα όμως, είναι πιο ανθεκτικά στην απόπτωση λόγω της απορρύθμισης του μονοπατιού PI3K/AKT/MITF/BCL2 [54] όπως αναφέραμε νωρίτερα [2.1.3].

Η ύπαρξη των CMCs στην συστηματική κυκλοφορία έθεσε τις βάσεις για την έναρξη πολλαπλών μελετών οι οποίες αφορούσαν την συσχέτιση των CMCs με την σταδιοποίηση, την πρόβλεψη της μετάστασης, την αποτελεσματικότητα των θεραπειών, την ολική επιβίωση και την επιβίωση χωρίς νόσο. Ένας άλλος μεγάλος όγκος μελετών αφιερώθηκε στην αναγνώριση δεικτών με επαρκή ευαισθησία και ειδικότητα, για να προβλεφθεί η πρόοδος στο μελάνωμα. Δείκτες οι οποίοι αναγνωρίσθηκαν στις πρωτοπαθείς βλάβες, χρησιμοποιήθηκαν και για την ανίχνευση των κυκλοφορούντων κυττάρων. Τέτοιοι είναι οι MAGE-3, MART-1/Melan-A, Tyrosinase, gp100, S100b, MITF, ABCB5, PAX3 και άλλοι. Ο κάθε δείκτης είναι χαρακτηριστικός του σταδίου διαφοροποίησης του κυττάρου καθώς και του τμήματος του κυττάρου από το οποίο προέρχεται. Το αντιγόνο Melan-A και το πρωτεϊνικό προϊόν του PAX3 είναι χαρακτηριστικοί δείκτες των μελανοκυττάρων. Η γλυκοπρωτεΐνη gp100 είναι δομική των μελανοσωμάτων, αλλά στην εξέλιξη του μελανώματος θεωρείται αντιγόνο του όγκου, όπως και η πρωτεΐνη MAGE-3. Η S100b είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη χαρακτηριστική για τα κύτταρα που προέρχονται από την νευρική ακρολοφία. Η τυροσινάση είναι ένζυμο το οποίο ρυθμίζει την παραγωγή μελανίνης και το γονίδιό της ελέγχεται από τον MITF. Ο MITF είναι δείκτης που μπορεί να χαρακτηρίζει τους μελανοβλάστες, τα μελανοκύτταρα αλλά και τα μελανωματικά κύτταρα [55]. Ο MITF χρήζει ιδιαίτερης μνείας λόγω του κεντρικού του ρόλου στο μελάνωμα. Η ανίχνευση του MITF είναι υψηλότερη στα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου κατά AJCC. Επίσης ανίχνευση του MITF μετά από θεραπεία συσχετίζεται με μειωμένη ολική επιβίωση [56][57]

Παρά την μεγάλη ετερογένεια των CMCs οι μέθοδοι για την σύλληψη και τον εμπλουτισμό τους βασίστηκαν κυρίως στην έκφραση ενός ή δύο γνωστών δεικτών. Πολλές είναι οι τεχνικές απομόνωσης και εμπλουτισμού που έχουν αναπτυχθεί. Το σύστημα Cell Search ™ (Veridex LCC) περιλαμβάνει ανοσομαγνητική σύλληψη των CMCs ακολουθούμενη από ειδικές χρώσεις για την ανίχνευση των κυττάρων. Για το μελάνωμα αναπτύχθηκε ειδικό κιτ, για την ανίχνευση κυττάρων που εκφράζουν μόρια συγκόλλησης μελανώματος (MCAM). Η ειδικότητα της ανοσομαγνητικής απομόνωσης εξαρτάται από την ειδικότητα των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται και από την αποτελεσματικότητα της τεχνικής in vitro, επιτρέποντας σεσημασμένα κύτταρα στόχοι να εξαχθούν βάσει των μαγνητικών τους ιδιοτήτων. Ένα άλλο σύστημα ανοσομαγνητικού διαχωρισμού είναι ο διαχωριστής DynaMag ™ (Invitrogen, Oslo, Norway). Άλλη τεχνολογία είναι το τσιπ-ψαροκόκκαλο (Heringbone-chip) το οποίο χρησιμοποιεί μικροδίνες οι οποίες δημιουργούνται από τις αυλακώσεις του τσιπ για να κατευθύνει τα κύτταρα μέσα σε κανάλια με συνδυασμό αντισωμάτων τα οποία στοχεύουν ειδικά για το μελάνωμα αντιγόνα. Άλλες τεχνικές χρησιμοποιούν την αρνητική επιλογή κατά την οποία συλλαμβάνονται τα λευκοκύτταρα με ένα anti-CD45 αντίσωμα, ακολουθούμενη από εξάντληση των λευκοκυττάρων μέσω μαγνητικού διαχωρισμού. Για να επιτύχουμε ακόμα καλύτερη σύλληψη CMCs, χρησιμοποιούμε πολυανθρακικά φίλτρα μέσω του συστήματος ITET® με τα οποία διαχωρίζουμε τα κύτταρα του αίματος (2-12 μm) από τα πολύ μεγαλύτερα μελανωματικά κύτταρα (10-20 μm). Μια άλλη κοινώς χρησιμοποιούμενη τεχνική διαχωρισμού η οποία βασίζεται στα φυσικά χαρακτηριστικά των CMCs είναι η χρήση διαβάθμισης πυκνότητας υγρού (liquid density gradient-συνήθως 1077/ml) για να απομονωθούν οι μονοπύρηνοι πληθυσμοί από το περιφερικό αίμα. Η φυγοκέντρηση γίνεται με διαβαθμίσεις υγρού της Ficoll-Paque ™ ή Lymphoprep ™ [58].

Μόλις τα CMCs εμπλουτισθούν με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, ανιχνεύονται με μεθόδους που αξιολογούν την μορφολογία τους ή/και την έκφραση πρωτεϊνών μέσω ανοσοϊστοχημείας ή κυτταρομετρίας ροής. Σε αυτές τις τεχνικές μια μίξη αντισωμάτων έναντι επιφανειακών ή ενδοπλασματικών δεικτών σχετιζόμενων με το μελάνωμα, χρησιμοποιούνται για να αναγνωρισθούν τα κύτταρα. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται μοριακές προσεγγίσεις οι οποίες ανιχνεύουν RNA ή DNA από εμπλουτισμένα CMCs μέσω ποσοτικής πραγματικού χρόνου PCR (quantitative Real Time-PCR) ή μέσω PCR ψηφιακού σταγονιδίου (droplet digital PCR-ddPCR) [59].

Οι περισσότερες δοκιμασίες πολλαπλών δεικτών χρησιμοποιούν qRT-PCR. Η μέθοδος ποσοτικοποιεί τον αριθμό των αντιγράφων mRNA σε ένα δείγμα μέσω της χρήσης ανιχνευτών DNA που παράγουν μετρήσιμο φθορίζον σήμα το οποίο ποσοτικοποιείται μετά από κάθε κύκλο συγκρινόμενο με τιμές ελέγχου. Η qRT-PCR είναι γενικώς πιο ευαίσθητη από άλλα PCR-πρωτόκολλα με οριακή τιμή ανίχνευσης ενός (1) CMC σε 10^7-10^8 μονοπύρηνα κύτταρα. Επιπλέον η qRT-PCR είναι εύκολα εκτελέσιμη, επαναλήψιμη, μειώνει την μόλυνση του προϊόντος εκ μεταφοράς και επιτρέπει την γρήγορη εκτίμηση της ποιότητας του δείγματος που αναλύεται. Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν περισσότερους των δύο δεικτών θεωρούνται πιο ακριβείς και πιο ευαίσθητοι. Ασθενείς σταδίου III με CMCs που εκφράζουν περισσότερους από έναν RT-PCR δείκτες μελανώματος θετικούς έχουν χειρότερη ολική επιβίωση (OS p=0,0012) και επιβίωση χωρίς νόσο (DFS p=0,006) [60].

Η ανίχνευση των CMCs είναι ένα προγνωστικό εργαλείο. Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανεύρεσης CMCs και ολικής επιβίωσης [61][62][63][64]. Επίσης μελέτες έδειξαν σχέση μεταξύ επιμήκυνσης της επιβίωσης και μειωμένου αριθμού CMCs κατά την διάρκεια συστηματικής θεραπείας [65][66]. Τα CMCs μπορούν να ανιχνευθούν σε όλα τα στάδια του μελανώματος, ενώ αύξηση των CMCs μπορεί να υποδηλώνει πρόοδο νόσου [67]. Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι ανεύρεση αυξημένων CMCs την μετεγχειρητική περίοδο συσχετίζονται με νόσο αυξημένου μεταστατικού δυναμικού ή τοπικά υποτροπιάζουσα νόσο [68]. Πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα CMCs προάγουν την μετάσταση μέσω πρόκλησης χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης και ενίσχυση των γονιδίων ουσιών που παράγονται από τα ουδετερόφιλα, ενισχύοντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου [69].

V. ΣΚΟΠΟΣ

Το HILP είναι μια αναγνωρισμένη μέθοδος περιοχικής χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος μελανώματος των άκρων. Είναι μια σπάνια επέμβαση τόσο λόγω των περιορισμένων ενδείξεων, όσο και λόγω του μικρού αριθμού των κέντρων που την εφαρμόζουν παγκοσμίως. Μετά την έκρηξη ανακοινώσεων ερευνών με την εισαγωγή του TNFa την δεκαετία του 1990 και την συστηματική χρήση του την δεκαετία του 2000, σε συσδυασμό με την είσοδο της ανοσοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας για το μελάνωμα από το 2006, η έρευνα γύρω από το HILP σίγησε. Παρόλα αυτά, είναι μια μέθοδος που εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε

ανθεκτικές περιπτώσεις μελανώματος. Μέχρι τώρα, πέρα από τις έρευνες για τις ανταποκρίσεις στην θεραπεία, την ολική επιβίωση και την τοξικότητα, δεν έχουν τεθεί άλλα ερωτήματα σε σχέση με το HILP. Από την άλλη όπως είδαμε η σύγχρονη έρευνα στρέφεται ολοένα και περισσότερο στην μελέτη των κυκλοφορούντων μελανωματικών κυττάρων. Η ανάλυση των CMCs αναδύεται ως δυνητικά πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της αντιμετώπισης του μελανώματος και την κατανόηση της βιολογίας του όγκου από μια απλή εξέταση αίματος. Από κλινική άποψη, μετά από μία θεραπεία, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ο αντίκτυπος της θεραπείας στην ασθένεια, η παρουσία υπολειμματικής νόσου, η εμφάνιση καρκινικών κυττάρων που είναι ανθεκτικά στη θεραπεία, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων που μπορούν να ξεφύγουν από τους μηχανισμούς, οι οποίοι με τη σειρά τους θα οδηγήσουν σε τροποποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης. Η θεραπευτική αντίσταση μπορεί να προκύψει από επιλεκτική ή/και προσαρμοστική πίεση που ενθαρρύνει τον πολλαπλασιασμό του ανθεκτικού κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος μπορεί να είναι φαινοτυπικά διακριτός από τον προγονικό πληθυσμό, όσο αφορά στην έκφραση βιοδεικτών.

Η τελική διαδικασία της «λύσης» του όγκου του μελανώματος, ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του TNFα και της μελφαλάνης μέσω του HILP, οδηγεί σε υποστροφή του όγκου. Υποθέτουμε ότι συγχρόνως με αυτή τη διαδικασία, μελανωματικά κύτταρα απελευθερώνονται στην συστηματική κυκλοφορία. Εύλογο είναι λοιπόν, να περιμένουμε ότι ένας αριθμός μελανωματικών κυττάρων θα διασκορπιστούν στο περιφερικό αίμα του ασθενούς με άγνωστες συνέπειες.

Η επίδραση του HILP στα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα δεν έχει ερευνηθεί ποτέ πριν. Στην παρούσα διατριβή διερευνούμε την μεταβολή της συγκέντρωσης των CMCs στο πλαίσιο των οξέων φυσιολογικών αλλαγών που προκαλεί το HILP.

Απώτερος σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διερευνηθούν τα ογκολογικά αποτελέσματα σε συσχέτιση με τις μεταβολές της συγκέντρωσης των CMCs που μπορεί να προκαλεί το HILP. Πιο συγκεκριμένα θα απαντηθεί το ερώτημα αν όντως το HILP ως παρέμβαση προκαλεί μεταβολή στην συγκέντρωση των CMCs, θα διερευνηθεί η επίδραση στην ειδική για την νόσο επιβίωση, θα διερευνηθεί η συσχέτιση της μεταβολής της συγκέντρωσης με την ανταπόκριση της νόσου στην θεραπεία και

τέλος αν η μεταβολή της συγκέντρωσης των CMCs από το HILP, επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου.

VI. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, η παρουσίαση της νόσου κατά την εισαγωγή στην κλινική, προηγούμενες θεραπείες και το αποτέλεσμά τους καταγράφηκαν σε βάση δεδομένων της Κλινικής Χειρουργικής Ογκολογίας. Η ανταπόκριση στην θεραπεία αξιολογήθηκε δύο μήνες μετά την χειρουργική επέμβαση σύμφωνα με τα κριτήρια ανταπόκρισης συμπαγών όγκων (RECIST) [85]. Δεν ελήφθησαν βιοψίες από τις βλάβες των άκρων συστηματικά, για να εκτιμηθεί η ανταπόκρισης στην θεραπεία. Η παρακολούθηση των ασθενών γινόταν κάθε 3-6 μήνες από τους χειρουργούς ογκολόγους και τους παθολόγους ογκολόγους. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την επίσημη άδεια της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Όλοι οι ασθενείς οι οποίοι συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης μετά από λεπτομερή γραπτή και προφορική ενημέρωση τόσο για την επέμβαση όσο και για την έρευνα.

Η τεχνική του TNFα/Melphalan-HILP έχει προηγουμένως περιγραφεί λεπτομερώς. Τεχνικές λεπτομέρειες της δικής μας εφαρμογής έχουν ως εξής: Ο ρυθμός ροής του διαλύματος διάχυσης ήταν προσαρμοσμένος στα 35-40 ml/L όγκου μέλους/λεπτό. Το διάλυμα διάχυσης αποτελούνταν από 250 ml Ringer's Lactate, με δύο μονάδες ολικού αίματος και 0,5 ml ηπαρίνης 5000IU/ml. Η όλη διαδικασία εκτελούνταν υπό ήπια υπερθερμία (38,5-40° C). Ακολούθως, μια δόση 2 mg του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου TNFα (TNFα-1α) (Tasonermin, Beromun®, Boehringer-Ingelheim) χορηγούνται στο διάλυμα διάχυσης μέσω του συστήματος εξωσωματικής κυκλοφορίας για 30 λεπτά, ακολουθούμενη από 10mg/L όγκου μέλους Μελφαλάνης για 60 λεπτά. Προτού την χορήγηση του TNFα και της Μελφαλάνης συνεχόμενη διεγχειρητική εξωτερική παρακολούθηση της διαφυγής διενεργούνταν σε όλους τους ασθενείς με ευθύγραμμο σπινθηριστή και σεσημασμένα με Τεχνήτιο 99m ερυθρά αιμοσφαίρια του ασθενούς.

Δείγματα όγκου 20ml περιφερικού φλεβικού αίματος ελήφθησαν από τους ασθενείς σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές για την ανάλυση της συγκέντρωσης των CMCs. Οι χρονικές στιγμές ήταν πέντε: Την ημέρα πριν από το χειρουργείο (Προεγχειρητικό

δειγμα-Preop), κατά την διάρκεια του χειρουργείου μόλις πριν τον καθετηριασμό των αγγείων (Διεγχειρητικό1-Intraop1), 20 λεπτά μετά την αποκατάσταση των αγγείων και την επιστροφή του μέλους στην συστηματική κυκλοφορία (Διεγχειρητικό2-Intraop2), την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop 1) και την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (Postop7). Το προεγχειρητικό δείγμα (Preop) αντιπροσωπεύει τις βασικές τιμές βάσει των οποίων μετρήθηκε οποιαδήποτε μεταβολή των CMCs. Το διεγχειρητικό δείγμα 1 (Intraop1) αντιπροσωπεύει την επίδραση των χειρουργικών χειρισμών (λεμφαδενικός καθαρισμός, προετοιμασία των αγγείων για καθετηριασμό) πάνω στα CMCs. Το διεγχειρητικό δείγμα 2 (Intraop2) αντιπροσωπεύει το πρώιμο αποτέλεσμα του HILP πάνω στον όγκο στα 20 λεπτά μετά την ολοκλήρωση της εφαρμογής του. Το πρώτο μετεγχειρητικό δείγμα (Postop1) αντιπροσωπεύει την δράση του HILP στις 24 ώρες και το τελευταίο δείγμα της έβδομης μετεγχειρητικής ημέρας (Postop7) αντιπροσωπεύει την καθυστερημένη επίδραση του HILP στα CMCs την χρονική στιγμή της μέγιστης συστηματικής τοξικότητας του TNFα [43].

Ενίσχυση βασιζόμενη σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός τουλάχιστον mRNA δείκτη σε δείγμα περιφερικού αίματος θεωρήθηκε ως θετικό σήμα παρουσίας CMCs [71]. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των CMCs ήταν: ο MITF, η Tyrosinase, το MART-1/Melan-A και η S100b [56][57][72][73]. Η έκφραση των βιοδεικτών και η ποσοτική μεταβολή τους, χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια για να εκτιμηθεί το αν η διαδικασία του HILP επηρεάζει τον αριθμό των CMCs στα δείγματα περιφερικού αίματος, καθώς και οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών του αριθμού των CMCs και της πορείας της συστηματικής νόσου.

Μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononucleal Cells-PBMC) απομονώθηκαν μέσω φυγοκέντρησης διαβαθμισμένης πυκνότητας, και διεξήχθη εκχύλιση RNA [58]. Η συγκέντρωση του RNA μετρήθηκε με την χρήση NanoDrop ND-100 v3.3 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE, USA). Η ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς, εκτελέσθηκε για να επιβεβαιωθεί η ακεραιότητα του RNA. Δείγματα RNA τα οποία είχαν προπαρασκευαστεί από μελανωματικά κύτταρα A375, από κύτταρα κολορθικού καρκίνου ARH-77 και σειρές λευχαιμικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι. Το SuperScript III Platinum Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστεί το συμπληρωματικό DNA

(complementary DNA-cDNA) από 5 μg ολικού RNA, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η αντίδραση qRT-PCR για την β-ακτίνη και για τους βιοδείκτες MITF, S100b, Melan-A, Tyrosinase διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας 2,5 μL πρότυπου cDNA, 6,25 μL του TaqMan Universal MasterMix (Applied Biosystems), 1,25 μL από το ειδικό αναγνωστικό για κάθε γονίδιο (3 μmol/L) (Εικόνα 9), 0,5 μL ανιχνευτή

Gene	Primer/Probe	Sequence
β-Actin	Probe	5'-6FAM-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-BBQ
	Forward	5'-GGCACCCAGCACAATGAAG
	Reverse	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT
MelanA	Probe	5'-6FAM-TGAAGAGGCCGCTGGGATCGG-BBQ
	Forward	5'-ACCCTACAAGATGCCAAGAGAAGA
	Reverse	5'ATACCAACAGCCGATGAGCAGTA
MITF	Probe	5'-6FAM-CGAGCGTCCTGTATGCAGATGGATGAT-BBQ
	Forward	5'-CCCAGGCATGAACACACATTC
	Reverse	5'-TCCCGAGACAGGCAACGTA
Tyrosinase	Probe	5'-6FAM-TTGGCAGATTGTCTGTAGCCGATTGGA-BBQ
	Forward	5'-GAGGTCAGCACCCCACAAAT
	Reverse	5'-TTTCCAGGATTACGCCGTAAAG
S100b	Probe	5'-6FAM-TTCTTAGAGGAAATCAAAGAGCAGGAGGTTGT-BBQ
	Forward	5'-TTCTGGAAGGGAGGGAGACA
	Reverse	5'-TTCGCCGTCTCCATCATTG

Εικόνα 9. Ειδικά αναγνωστικά για τον κάθε βιοδείκτη

υδρόλυσης (2,5 μmol/L) για κάθε γονίδιο και αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο και επεξεργασμένο με διεθυλπυροκαρβονικό οξύ νερό (DEPC water) μέχρι τελικό όγκο 12,5 μL/αντίδραση. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων εκτελέσθηκε χρησιμοποιώντας το ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). Όλα τα πειράματα εκτελέσθηκαν εις τριπλούν. Αποδεκτές έγιναν μόνο τριπλέτες με σταθερή απόκλιση του κύκλου ποσοτικοποίησης (quantification cycle-Cq) με τιμή μικρότερη από 0,25.

Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε σε μια εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης η οποία προήλθε χρησιμοποιώντας εξωτερικά σταθερά cDNAs. Το ολικό RNA προετοιμάστηκε από 10^6 A375 μελανωματικά κύτταρα. Η σύνθεση από συνεχόμενες διαλύσεις αυτού του RNA αναλύθηκε σε κάθε κύκλο. Η καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργήθηκε μεταφέροντας σε διάγραμμα τον αριθμό των A375 κυττάρων ανταποκρινόμενων σε κάθε εξωτερικό cDNA έναντι των τιμών του κύκλου ποσοτικοποίησης (Cq). Ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν MITF, S100b, Melan-A και Tyrosinase για όλα τα δείγματα εκφράστηκε ως ισοδύναμο κυττάρου A375/5 μg ολικού RNA σύμφωνα με την σταθερή εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης. Εκτός

αυτού, για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που θα μπορούσαν να ανακτηθούν, προσθέσαμε έναν μειούμενο αριθμό A375 κυττάρων (από 10^3 έως 1) σε 10^6 αρνητικά PBMCs σε 5 διαφορετικά πειράματα. Το λογισμικό SDS 2.3 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων [74]. Σύμφωνα με την σταθερή εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης, οι μονάδες μέτρησης αναφέρονται ισοδύναμα A375 μελανωματικών κυττάρων/5μg ολικού RNA.

4.1. Στατιστική ανάλυση

Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθεί η κατανομή των μεταβλητών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Παραμετρικά τεστ (επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ANOVA) χρησιμοποιήθηκαν για τις μεταβλητές με φυσιολογική κατανομή. Μη-παραμετρικά τεστ (Friedman's) χρησιμοποιήθηκαν για μεταβλητές που δεν ακολουθούν μια φυσιολογική κατανομή. Η ανάλυση πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης (multivariate logistic regression analysis) χρησιμοποιήθηκε για να προσαρμοστούν οι επιδράσεις των πολλαπλών μεταβλητών. Ο χρόνος επιβίωσης αναλύθηκε με την καμπύλη Kaplan-Meier και την δοκιμή κατάταξης (log-rank test). Η επίδραση των συνεχών μεταβλητών και των πολλαπλών μεταβλητών στον χρόνο επιβίωσης αναλύθηκε με την δοκιμή παλινδρόμησης Cox (Cox-regression analysis). Το τεστ Spearman χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ συνεχών μεταβλητών. Οι τιμές p μικρότερες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το IBM SPSS Statistics για Windows έκδοση 26 (IBM Corp. Armonk, NY, USA).

VII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Είκοσι ασθενείς, 16 γυναίκες και τέσσερις άνδρες, με μελάνωμα κάτω άκρου, σταδίου IIIB έως IIID, υποβλήθηκαν σε TM-HILP με ένδειξη υποτροπιάζουσες μη χειρουργήσιμες δορυφόρες ή/και καθ'οδών μεταστάσεις (Πίνακας 1). Η μέση ηλικία ήταν 67 έτη (εύρος 25-78). Όλοι οι ασθενείς είχαν ιστολογική επιβεβαίωση της διάγνωσης. Όλοι οι ασθενείς είχαν αρχικά αντιμετωπιστεί σε άλλα κέντρα και παραπέμφθηκαν σε εμάς μετά από υποτροπή της νόσου ή επί αποτυχίας να ελεγχθεί η υποτροπή είτε με συστηματική φαρμακευτική θεραπεία είτε χειρουργικά.

	N (%)
Ηλικία (έτη)(μέση, IQR)	67 (19)
Φύλο (Γυναίκες)	16 (80%)
Αριθμός βλαβών	
<10	8 (40%)
≥10	12(60%)
Ιστολογικά θετικός LND	7 (35%)
AJCC στάδιο[α]	
IIIB	12 (60%)
IIIC	7 (35%)
IIID	1 (5%)
Προηγούμενη θεραπεία	
Καμία	10 (50%)
Χημειοθεραπεία	5 (25%)
IFN	3 (15%)
Άλλη[β]	2 (10%)
Ανταπόκριση στο HILP	
CR	12 (60%)
PR	5 (25%)
SD	3 (15%)
Κατάσταση στα 4 έτη μετά το HILP	
Ζωντανός ελεύθερος νόσου	2 (10%)
Ζωντανός με νόσο	3[γ](15%)
Θανών από την νόσο	12 (60%)

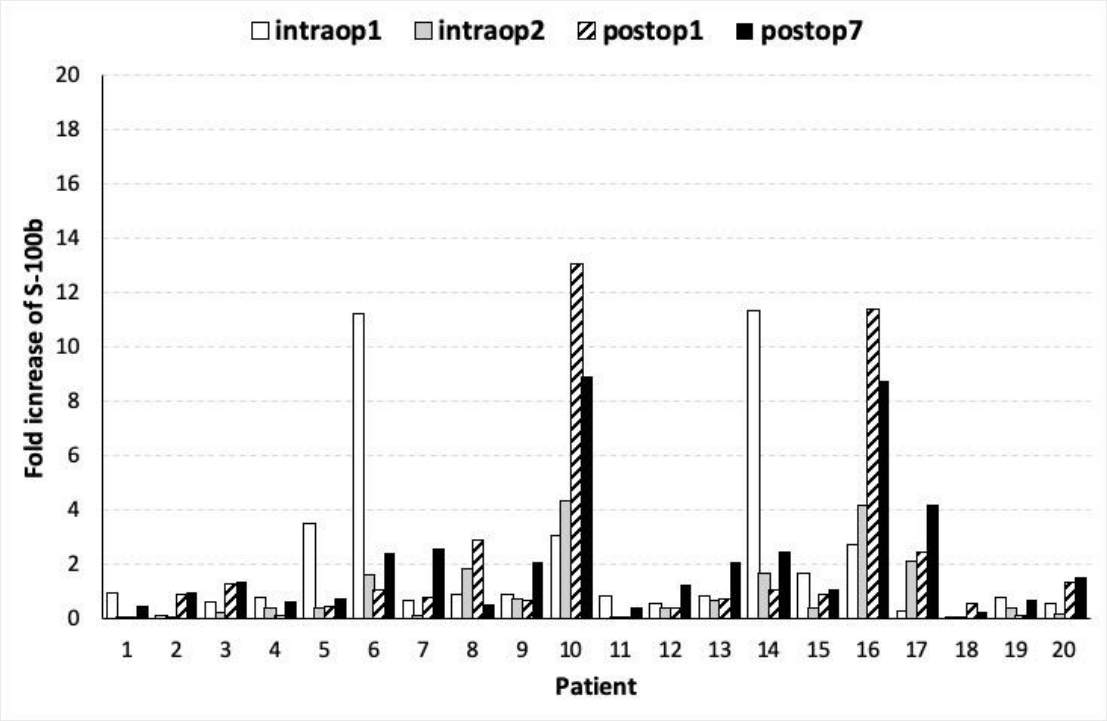
Πίνακας 1: Βασικές κλινικές μεταβλητές και μετεγχειρητικά αποτελέσματα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε TM-HILP θεραπεία για προχωρημένο μελάνωμα μέλους.
TM-HILP: TNF-a and Melphalan hyperthermic isolated limb perfusion, LND: lymph node dissection completion, IFN: interferon, C.R.: complete response, PR: partial response, SD: stable disease,
α 8th edition of American Joint Committee on Cancer staging manual
β Ipilimumab, Vemurafenib
γ Τρεις ασθενείς είχαν πρόσφατα χειρουργηθεί (2017-2018)

7.1. Συσχέτιση των CMCs με τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών

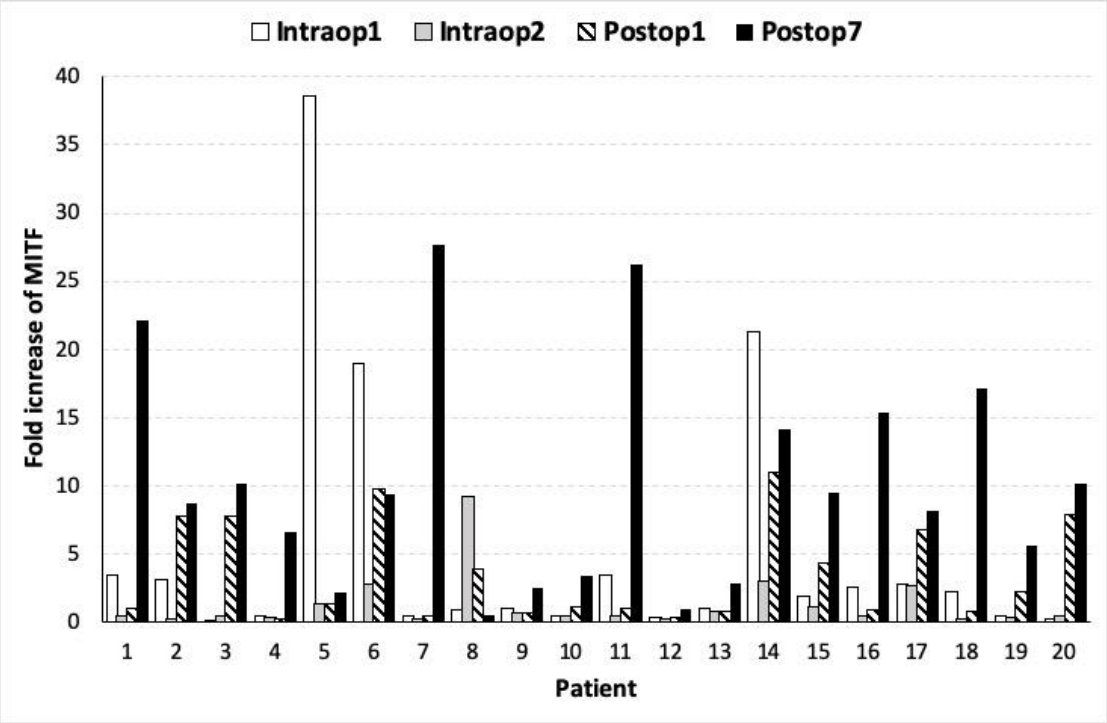
Δεν μετρήθηκαν βασικές τιμές, ούτε μεταβολές των τιμών των CMCs σε κανένα ασθενή σύμφωνα με την ανάλυση των βιοδεικτών Tyrosinase και Melan-A. Ως εκ τούτου, αυτοί οι βιοδείκτες δεν χρησιμοποιήθηκαν σε καμία στατιστική ανάλυση. Όλοι οι ασθενείς είχαν μετρήσιμα CMCs προεγχειρητικά και καθορίστηκαν βασικές τιμές σύμφωνα με τους βιοδείκτες MITF και S100b. Δεν υπήρχε διαφορά στις βασικές τιμές των CMCs ανάλογα με τον αριθμό των βλαβών (<ή>10 βλάβες) (p=0,759 για τον δείκτη MITF και p=0,248 για τον δείκτη S100b). Δεν υπήρχε διαφορά στις βασικές τιμές των CMCs στους ασθενείς με ή χωρίς ιστολογικά αποδεδειγμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις (p=0,416 για τον δείκτη MITF και p=0,285 για τον δείκτη S100b). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της βασικής τιμής των CMCs με την ηλικία του ασθενούς (p=0,524 για τον δείκτη MITF και p=0,752 για τον δείκτη S100b).

7.2. Μεταβολές των CMCs μετά το HILP

Μεταβολές του αριθμού των CMCs παρατηρήθηκαν σύμφωνα με τους βιοδείκτες MITF και S100b. Στο εξής όταν αναφερόμαστε σε μεταβολή των επιπέδων ενός βιοδείκτη αυτόματα θα εννοείται μεταβολή του αριθμού των CMCs στο περιφερικό αίμα του ασθενούς (αντιστοίχηση αντιγράφων mRNA του βιοδείκτη με τον αριθμό των μελανωματικών κυττάρων σύμφωνα με την καμπύλη βαθμονόμησης). Στο Σχήμα 1 απεικονίζεται πόσες φορές αυξήθηκε η συγκέντρωση του βιοδείκτη S100b σε σχέση με τις προεγχειρητικές τιμές, δείχνοντας μια αύξηση στην πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop1) σε οχτώ από τους 20 ασθενείς και την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (Postop7) σε 13 από τους 20 ασθενείς. Οι τιμές για τον βιοδείκτη S100b παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Ένα μη-παραμετρικό τεστ Friedman των διαφορών μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων διεξήχθη και αποδόθηκε μια τιμή του χ^2 στο 18,256, το οποίο ήταν στατιστικά σημαντικό (p=0,001) (Σχήμα 3). Για συγκρίσεις κατά ζεύγη μεταξύ των χρονικών στιγμών, το προσαρμοσμένο κατά ζεύγη τεστ Bonferroni έδειξε μια στατιστικώς σημαντική μεταβολή μεταξύ του διεγχειρητικού δείγματος 2 (Intraop2) και της έβδομης μετεγχειρητικής ημέρας (Postop7) (p<0.0001). Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική αύξηση του βιοδείκτη S100b μεταξύ πρώτης (Postop1) και έβδομης (Postop7) μετεγχειρητικής ημέρας (p>0,05) (Σχήμα 3^{B}).



Σχήμα 1. Πόσες φορές αυξήθηκαν τα CMCs σύμφωνα με τον βιοδείκτη S-100 σε διαφορετικές χρονικές στιγμές συγκρινόμενες με τις προεγχειρητικές τιμές



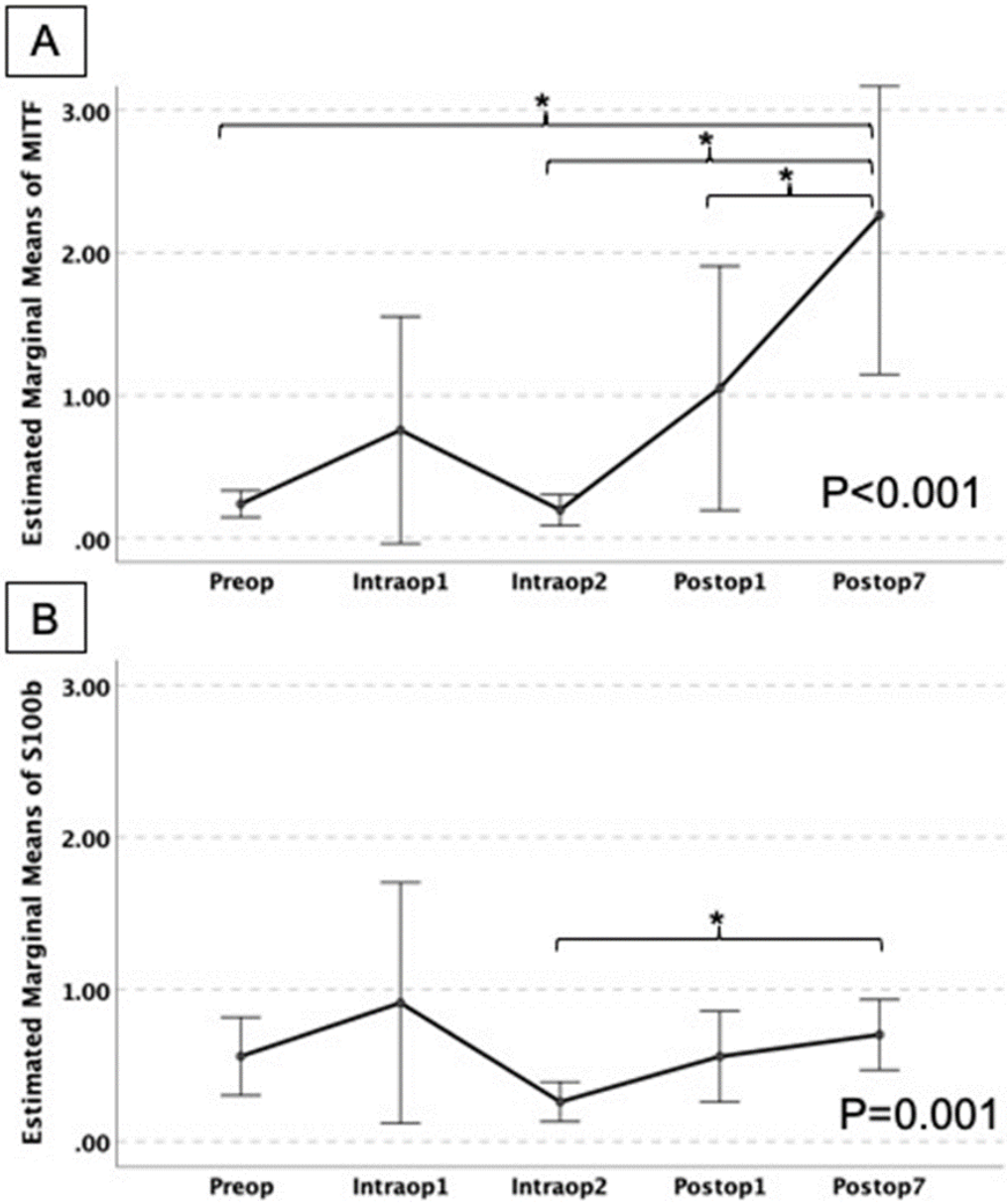
Σχήμα 2. Πόσες φορές αυξήθηκαν τα CMCs σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF σε διαφορετικές χρονικές στιγμές συγκρινόμενες με τις προεγχειρητικές τιμές

	Mean(SD) Median(IQR)	P
MITF		<0.0001*
Preoperative	0.24(0.20) 0.21(0.16)	0.007#
Intraoperative sample 1	0.75(1.70) 0.22(0.61)	
Intraoperative sample 2	0.19(0.23) 0.09(0.23)	0.011#
Postoperative day 1	1.05(1.80) 0.25(0.87)	0.016#
Postoperative day 7	2.26(2.35) 1.76(1.91)	
S-100b		0.001*
Preoperative	0.56(0.55) 0.29(0.78)	
Intraoperative sample 1	0.91(1.69) 0.28(0.91)	
Intraoperative sample 2	0.26(0.28) 0.12(0.23)	<0.001#
Postoperative day 1	0.56(0.63) 0.31(0.58)	
Postoperative day 7	0.70(0.49) 0.54(0.75)	

Πίνακας 2. Τα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα σε διάφορες χρονικές στιγμές πριν και μετά το HILP σε 20 ασθενείς.
SD: standard deviation, IQR: interquartile range
**επαναλαμβανόμενες μετρήσεις test Friedman*
 # προσαρμοσμένο τεστ Bonferroni κατά ζεύγη τιμών

Στο Σχήμα 2 απεικονίζεται η αύξηση του βιοδείκτη MITF σε διάφορες χρονικές στιγμές έναντι των προεγχειρητικών τιμών δείχνοντας μια αύξηση των CMCs την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop1) για 11 από τους 20 ασθενείς και την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (Postop7) για 18 από τους 20 ασθενείς. Οι τιμές του βιοδείκτη MITF φαίνονται στον Πίνακα 2. Ένα μη-παραμετρικό τεστ Friedman διαφορών μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων διεξήχθη και αποδόθηκε μια τιμή χ^2 στο 34,616, το οποίο ήταν στατιστικώς σημαντικό (p<0,0001) (Σχήμα 3). Για σύγκριση κατά ζεύγη μεταξύ των χρονικών στιγμών, το προσαρμοσμένο κατά ζεύγη τεστ Bonferroni έδειξε

μια στατιστικώς σημαντική αύξηση του MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (Postop7) σε σχέση με την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop1), δεύτερο διεγχειρητικό δείγμα (Intraop2) και τις προεγχειρητικές τιμές (Preop) (p<0,05) (Σχήμα 3[A]). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επέμβαση του HILP προκάλεσε αύξηση των CMCs. Η αύξηση ήταν μεγαλύτερη σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα.



Σχήμα 3. Σχεδιάγραμμα των μέσων τιμών του MITF (A) και του S100b (B) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Οι στήλες λάθους αντιπροσωπεύουν διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) 95%. Οι τιμές p είναι σύμφωνα με το τεστ Friedman. Οι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν μια στατιστικώς σημαντική διαφορά της τάξης του 0,05 χρησιμοποιώντας το προσαρμοσμένο τεστ Bonferroni κατά ζεύγη τιμών.

7.3. Συσχέτιση των CMCs με την ανταπόκριση στο HILP

Δώδεκα ασθενείς (60%) είχαν πλήρη τοπικοπεριοχική ανταπόκριση της νόσου, πέντε ασθενείς (25%) είχαν μερική ανταπόκριση και τρεις ασθενείς (15%) είχαν σταθερή νόσο. Οι μέσες τιμές του βιοδείκτη MITF των ασθενών που είχαν πλήρη ανταπόκριση (Complete response-CR) έναντι των υπολοίπων (non-CR) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Μέσα στην ομάδα της CR, διεξήχθη ένα μη-παραμετρικό τεστ Friedman των διαφορών μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και αποδόθηκε μια τιμή χ^2 στο 15,511, το οποίο είναι στατιστικώς σημαντικό (p=0,004). Μέσα στην non-CR ομάδα, διεξήχθη ένα μη-παραμετρικό τεστ Friedman των διαφορών μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και αποδόθηκε ένα χ^2 στο 24,179, το οποίο είναι στατιστικώς σημαντικό (p<0,0001). Στην σύγκριση μεταξύ των ομάδων CR και non-CR, οι μέσες τιμές του βιοδείκτη MITF για την ομάδα CR ήταν υψηλότερες σε όλες τις χρονικές στιγμές και έφτασαν σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα στις τιμές του δεύτερου διεγχειρητικού δείγματος (Intraop2) (p=0,014) και την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop1) (p=0,046). Οι ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις στους περιοχικούς λεμφαδένες είχαν σημαντικά χαμηλότερη ανταπόκριση από εκείνους που δεν είχαν λεμφαδενικές μεταστάσεις (16,7% vs 62,5%, p=0,035). Αυτή η συσχέτιση παρέμεινε στην ανάλυση πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης προσαρμοσμένη για τα επίπεδα MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα (Postop7). (OR[95%CI]: 9,91 [1,07-91,47], p=0,043 για αρνητικούς έναντι θετικούς σε διήθηση λεμφαδένες και OR[95%CI]: 1,10 [0,92-1,22], p=0,043 για την αύξηση του MITF έναντι των προεγχειρητικών τιμών). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και οι δύο ομάδες ασθενών (CR και non-CR) έχουν στατιστικώς σημαντική αύξηση των μετεγχειρητικών τιμών του βιοδείκτη MITF. Επιπλέον, τα επίπεδα του MITF είναι στατιστικώς υψηλότερα για την ομάδα CR έναντι της ομάδας non-CR για τα δείγματα Intraop2 και Postop1

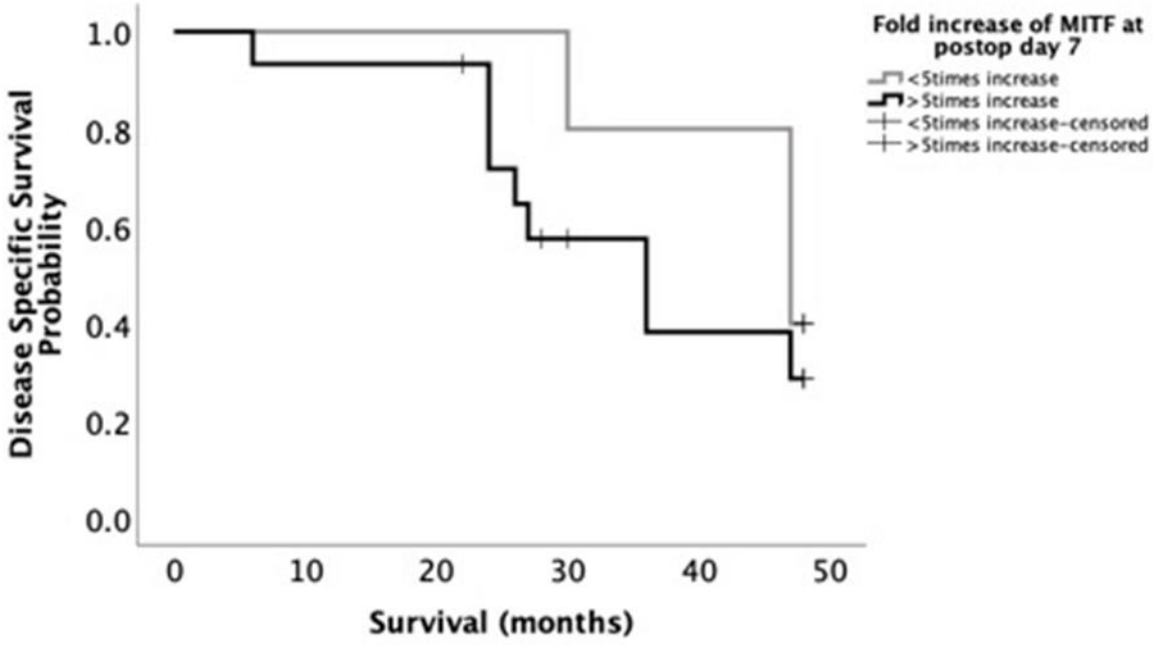
	CR (N=12) MEAN(SD) MEDIAN(IQR)	NON-CR (N=8) MEAN(SD) MEDIAN(IQR)	P*
PREOPERATIVE	0.26(0.25) 0.17(0.19)	0.21(0.09) 0.23(0.14)	0.593
INTRAOPERATIVE SAMPLE 1	1.09(2.15) 0.33(1.23)	0.25(0.24) 0.13(0.24)	0.286
INTRAOPERATIVE SAMPLE 2	0.29(0.27) 0.25(0.22)	0.06(0.02) 0.05(0.05)	0.014
POSTOPERATIVE DAY 1	1.48(2.24) 0.56(1.66)	0.41(0.65) 0.11(0.42)	0.046
POSTOPERATIVE DAY 7	2.43(2.70) 1.87(1.91)	2.00(1.96) 1.75(2.08)	0.706

Πίνακας 3. Κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF σε σχέση με την ανταπόκριση στο HILP σε 20 ασθενείς.
CR: complete response, SD: standard deviation, IQR: interquartile range
**t-test*
Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις τεστ Friedman στην ομάδα CR (χ^2: 15,511 p=0,004)
Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις τεστ Friedman στην ομάδα non-CR (χ^2: 24,179 p<0,001)

7.4. Συσχέτιση των CMCs με την ειδική για την νόσο επιβίωση

Δύο χρόνια μετά το HILP, εννέα ασθενείς (45%) ήταν ζωντανοί χωρίς κλινικά σημεία παρουσίας νόσου, οχτώ ασθενείς (40%) ήταν ζωντανοί αλλά με τοπικοπεριοχική υποτροπή της νόσου και τρεις ασθενείς είχαν πεθάνει. Τέσσερα χρόνια μετά το HILP, πέντε ασθενείς (25%) ήταν ζωντανοί και 12 (60%) είχαν πεθάνει. Οι ασθενείς που ήταν ζωντανοί στα τέσσερα χρόνια μετά το HILP είχαν χαμηλότερες τιμές CMCs βάσει του βιοδέικτη MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα σε σύγκριση με αυτούς που είχαν πεθάνει από μελάνωμα, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (mean±SD, 8,5±5,5 vs 11,2±9,5, *p*=0,480). Στο Σχήμα 4 οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier παρουσιάζουν τους ασθενείς που είχαν μεγαλύτερη ή μικρότερη της πενταπλής (5x) αύξησης του βιοδείκτη MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα. Οι ασθενείς με μικρότερο αριθμό CMCs την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα είχαν μεγαλύτερη ειδική για την νόσο επιβίωση, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (log-rank test, *p*=0,340). Όταν το πόσες φορές αυξήθηκε ο MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα αναλύθηκε ως συνεχής

μεταβλητή στο μοντέλο παλινδρόμησης Cox, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την ειδική για την νόσο επιβίωση (HR[95%CI]: 1,07 [0.99-1,16], *p*=0,07).



Σχήμα 4. Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier των ασθενών οι οποίοι είχαν αύξηση των επιπέδων MITF την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα με διαστρωμάτωση αναλόγως το μέγεθος της αύξησης (λιγότερο από πέντε φορές -γκρι γραμμή- και περισσότερες από πέντε φορές-μαύρη γραμμή). Το πόσες φορές αυξήθηκε είναι σε σύγκριση με τις προεγχειρητικές τιμές.(log-rank p=0,340)

VIII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρόσφατες μοριακές και κυτταρο-βιολογικές μελέτες όπως έχουμε αναλύσει, προτείνουν ότι η καρκινική μετάσταση συμβαίνει μέσω δύο βασικών σταδίων: το πρώτο επιτρέπει το φυσικό διασκορπισμό των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο προς το παρέγχυμα απομακρυσμένων οργάνων, ενώ στο δεύτερο στάδιο, ο αποικισμός εξαρτάται από την προσαρμογή των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον αυτού του ιστού [52]. Στο HILP η δράση του TNFα πάνω στον όγκο προκαλεί διάσπαση της αγγείωσής του το οποίο επιτρέπει την διείσδυση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα (Μελφαλάνη) και καταστροφή του όγκου. Παράλληλα με αυτήν την θεραπευτική δράση, λαμβάνει χώρα και μια άλλη διαδικασία λόγω της έλλειψης σταθερών δεσμών μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αγγεία του όγκου: η απολέπιση και απελευθέρωση των μελανωματικών κυττάρων

στην συστηματική κυκλοφορία (διαδικασία της ενδαγγείωσης). Στην έρευνά μας, η επέμβαση του HILP συσχετίστηκε με αύξηση των κυκλοφορούντων μελανωματικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών.

Από το 1960 οπότε ο Romsdahl [75] ξεκίνησε τις πρώτες προσπάθειες μελέτης των κυκλοφορούντων μελανωματικών κυττάρων, έχουν γίνει πολλές επιστημονικές ανακοινώσεις αποτελεσμάτων ερευνών που αφορούν στην δράση των CMCs πάνω στην μετάσταση, στην πρόοδο της νόσου και στην επιβίωση. Παρόλο που οι έρευνες είναι ετερογενείς και δύσκολο να συγκριθούν μεταξύ τους και να προκύψουν συμπεράσματα, μια γενική γνώμη υπογραμμίζεται: τα CMCs είναι κατάλληλος βιοδείκτης για την κατάσταση της νόσου[59][65]. Τα CMCs μπορούν να ανιχνευτούν σε οποιοδήποτε στάδιο της νόσου, όμως η παρουσία τους υποδεικνύει πρόοδο της νόσου ως απομακρυσμένες μεταστάσεις ή ως τοπικοπεριοχική υποτροπή [64]. Οι ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III με θετικό PCR τεστ για περισσότερους από έναν βιοδείκτη σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, έδειξαν χειρότερη επιβίωση ελεύθερης νόσου και ένα σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων [60]. Εντούτοις, η απομόνωση των CMCs από τους ασθενείς παρουσιάζει μια πρόκληση λόγω της χαμηλής τους συγκέντρωσης στο περιφερικό αίμα και λόγω των εξειδικευμένων βιοδεικτών που εκφράζουν ως αποτέλεσμα της προέλευσης τους από την νευρική ακρολοφία. Επιπλέον παράγοντες που δυσκολεύουν την απομόνωση των CMCs είναι η σημαντική ετερογένεια ανάμεσα στους υποπληθυσμούς των κυκλοφορούντων κυττάρων στο μελάνωμα και η διαφορετική ανταπόκριση αυτών των υποπληθυσμών στην θεραπεία [59][76]. Όταν ξεκινήσαμε την μελέτη μας, το 2012, οι βιοδείκτες MITF, S100b, MelanA και Tyrosinase ήταν οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες για την ανίχνευση κυκλοφορούντων μελανωματικών κυττάρων και το κιτ που περιείχε αυτούς τους τέσσερις βιοδείκτες ήταν εμπορικά διαθέσιμο και προσβάσιμο από το εργαστήριο μας.

Στην μελέτη μας, οι περισσότεροι ασθενείς είχαν μια στατιστικώς σημαντική αύξηση του μετεγχειρητικού αριθμού των CMCs σύμφωνα με qRT-PCR ανάλυση για τον βιοδείκτη MITF. Δείξαμε ότι οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση της νόσου στο HILP είχαν σημαντικά υψηλότερο μέσο αριθμό CMCs τα οποία εκφράζουν MITF αμέσως μετά την επέμβαση (Intraop2) και την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (Postop1). Παρόλα αυτά, η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα

(Postop7) και αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η μεταβολή του αριθμού των CMCs είναι παροδική και να εξηγεί γιατί η αύξηση των CMCs που εκφράζουν MITF δεν συσχετίστηκε με χειρότερη μακροπρόθεσμη επιβίωση. Παρατηρήσαμε μια αύξηση των CMCs σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF και τον βιοδείκτη S100b στο διεγχειρητικο δείγμα 1(Intraop1) σε σύγκριση με τις προεγχειρητικές τιμές (Preop) η οποία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Αυτό το δείγμα λαμβανόταν μετά από λεμφαδενικό καθαρισμό και πριν τον καθετηριασμό των αγγείων. Εκτός αν αυτή η αύξηση παρατηρήθηκε λόγω παραλλαγής της δειγματοληψίας, μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τους χειρουργικούς χειρισμούς των περιοχικών λεμφαδένων οι οποίοι ήταν διηθημένοι στο 35% των ασθενών μας. Εντούτοις, δεν βρήκαμε σημαντική διαφορά στον αριθμό των CMCs σύμφωνα με την κατάσταση των περιοχικών λεμφαδένων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Το διεγχειρητικό δείγμα 2 (Intraop2) λαμβανόταν 20 λεπτά μετά από το ξέπλυμα του μέλους και την επανασύνδεσή του στην συστηματική κυκλοφορία. Έτσι το δείγμα αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει την άμεση κυτταροτοξικότητα του HILP και δεν προκαλεί έκπληξη ότι οι αριθμοί των CMCs μπορεί να μειωθούν. Επιπροσθέτως, το πλήρες ξέπλυμα του μέλους με κρυσταλοειδή και κολλοειδή διαλύματα στο τέλος της επέμβασης, όπως και η αραίωση που προκαλούν τα υγρά που χορηγούνται κατά την διάρκεια της μακράς αυτής επέμβασης, μπορεί να συνεισέφεραν στην παρατηρούμενη μείωση των CMCs σε αυτή την χρονική περίοδο.

Παρατηρούμε ότι ο κλώνος των CMCs, ο οποίος απομονώθηκε κατά τις μετρήσεις, εκφράζει MITF στους περισσότερους ασθενείς. Ο MITF έχει αναγνωριστεί ως βασικός αρωγός της προόδου του μελανώματος. Φαίνεται να δρα ως «ρεοστάτης» ενσωματώνοντας διάφορα σήματα που ρυθμίζουν την έκφραση και την δράση του, έτσι ώστε το αποτέλεσμα να μεταφράζεται σε διαφορετικούς φαινότυπους [17]. Τα μελανωματικά κύτταρα που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση MITF μπορούν είτε να διαφοροποιηθούν είτε να πολλαπλασιαστούν. Χαμηλή έκφραση του MITF σχετίζεται με βλαστικό φαινότυπο ή/και διηθητικό δυναμικό. Η έκφραση και η δραστηριότητα του MITF στα μελανωματικά κύτταρα προσδιορίζεται από γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, αλλαγές στα σηματοδοτικά μονοπάτια και από το μικροπεριβάλλον [21]. Η ποσοτική μέτρηση της έκφρασης είναι ετερογενής και η ανοσοϊστοχημική χρώση αναγνωρίζει «MITF-θετικά» κύτταρα τα οποία εκφράζουν είτε υψηλά είτε χαμηλά επίπεδα MITF, αλλά επίσης και κύτταρα τα οποία έχουν παντελή έλλειψη έκφρασης του MITF. Μελανωματικά κύτταρα τα οποία επισημαίνονται ως «MITF-θετικοί»

πληθυσμοί, μπορούν να έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης MITF [34]. Τέλος, μπορεί να υπάρχουν κύτταρα με αυξημένη έκφραση του MITF mRNA, το οποίο όμως δεν οδηγεί σε αντίστοιχη παραγωγή πρωτεΐνης και στην πραγματικότητα το μελάνωμα είναι χαμηλής έκφρασης MITF [77].

Υπάρχουν τρεις πιθανές καταστάσεις των CMCs-πληθυσμών αναλόγως με τα επίπεδα έκφρασης του MITF: Α) Μέτρια με υψηλή έκφραση του MITF, ταχέως πολλαπλασιαζόμενα αλλά με φτωχή διηθητική ικανότητα, Β) Ανάμεικτη γονιδιακή έκφραση, Γ) Χαμηλή έκφραση του MITF με αργή ανάπτυξη αλλά μεγαλύτερου διηθητικού δυναμικού. Δεδομένα ερευνών δείχνουν ότι τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των ομάδων Α και Γ μπορούν να εναλλάσσουν φαινότυπους (φαινοτυπική πλαστικότητα). Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας πλαστικότητας είναι η αναθεώρηση του μοντέλου ρεοστάτη, ενσωματώνοντας έξι διαφορετικές φαινοτυπικές καταστάσεις του μελανώματος σύμφωνα με την δραστηρίοτητα του MITF: 1) Υπερ-διαφοροποιημένα κύτταρα με υψηλή δραστηριότητα MITF και κυρίως πολλαπλασιαστικό χαρακτήρα, 2) Μελανοκυτταρικού τύπου κύτταρα με υψηλή έκφραση MITF και πολλαπλασιαστικό χαρακτήρα επίσης, 3) Ενδιάμεσος τύπος 4) Κύτταρα που λιμοκτονούν τα οποία μπορούν να εκφράζουν είτε πολλαπλασιαστικό είτε διηθητικό χαρακτήρα με ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης του MITF, 5) Βλαστικά κύτταρα που προσομοιάζουν τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας και 6) Αδιαφοροποίητα κύτταρα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης MITF και διηθητικό χαρακτήρα [77]. Αξιοσημείωτο είναι ότι όλες οι παραπάνω καταστάσεις δημιουργούνται από την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένου την υποξία, τον περιορισμό των θρεπτικών στοιχείων και την φλεγμονώδη σηματοδότηση, όπως επίσης και από τις κατασταλτικές δράσεις των θεραπειών [78].

Η πλαστικότητα του μελανώματος είναι υπεύθυνη για τα μοτίβα ανάπτυξης και μετάστασης του μελανώματος και είναι συνδεδεμένη με την εναλλαγή του διηθητικού/MITF χαμηλής έκφρασης φαινότυπου με τον πολλαπλασιαστικό/MITF υψηλής έκφρασης φαινότυπο [77]. Το HILP είναι μια επιθετική θεραπευτική διαδικασία το οποίο λειτουργεί ως εξωγενής παράγοντας επηρεάζοντας το μικροπεριβάλλον σε μοριακό επίπεδο τόσο τοπικοπεριοχικά όσο και συστηματικά. Όλοι οι παράγοντες που σχετίζονται με το HILP (υπερθερμία, υποξία, οξέωση, φλεγμονή, Melphalan, TNFα και αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση) μπορούν να

προκαλέσουν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του MITF και συνεπώς θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλλαγές στην πορεία της νόσου. Η αληθής υπερθερμία στους 45° C μπορεί να σκοτώσει τα μελανωματικά κύτταρα, αλλά η ήπια υπερθερμία κατά την διάρκεια του HILP δεν επηρεάζει με οποιοδήποτε τρόπο την έκφραση του MITF [79]. Η παρατεταμένη υποξία στο άκρο κατά την διάρκεια του HILP προκαλεί μείωση της έκφρασης του MITF και αυξάνει το μεταστατικό χαρακτήρα της νόσου [80]. Η οξέωση που παρατηρείται μετά το HILP τόσο περιοχικά όσο και συστηματικά είναι ένας κρίσιμος μικροπεριβαλλοντικός παράγοντας ο οποίος πυροδοτεί την φαινοτυπική πλαστικότητα και προάγει την πρόοδο του όγκου μέσω της μείωσης της έκφρασης του MITF [81]. Η οξεία έκθεση σε προφλεγμονώδεις κυττοκίνες όπως ο TNFa μπορεί να προκαλέσει αύξηση των μελανωματικών κυττάρων μέσω της αύξησης της έκφρασης του MITF [82]. Παρατεταμένη όμως έκθεση στον TNFα και στην IL-6 από την άλλη, καταστέλλει τον MITF και προκαλεί εναλλαγή σε διηθητικό φαινότυπο [83]. Η μελφαλάνη έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του MITF mRNA [84]. Ένα σύμπλεγμα πέντε γονιδίων (ATF3, CYR61, IER5, IL-6 και PTGS2) που επάγονται από το στρες, αυξάνουν την έκφρασή τους μετά από θεραπεία με HILP [83]. Το γονίδιο ATP3 προκαλεί μείωση της έκφρασης του MITF μέσω του μονοπατιού αντίδρασης στην υποξία όπως αναφέρθηκε παραπάνω [80]. Το γονίδιο CYR61/CCN1 φυσιολογικά ελέγχει την μελανινογένεση στα μελανοκύτταρα. Ως γονίδιο του στρες προκαλεί αύξηση της έκφρασης του MITF [85]. Το γονίδιο IER5, ένα γονίδιο ανταπόκρισης στην βλάβη του DNA, αναστέλλει την έκφραση του MITF στο μελάνωμα [83]. Το γονίδιο PTSG2 (κυκλοοξυγενάση 2) είναι ένα γονίδιο που ρυθμίζει το μονοπάτι προσταγλανδίνης στην φλεγμονή και προκαλεί αύξηση της έκφρασης του MITF [86].

Όλα τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα CMCs είναι μάλλον ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων με ποικίλες ιδιότητες. Υπάρχει μια πρόταση κατά την οποία ετερογενείς υποομάδες καρκινικών κυττάρων συνεργάζονται για να καθοδηγήσουν την διήθηση και έτσι και την επιβίωση των κυττάρων ακόμα και χωρίς εναλλαγή φαινοτύπου [87]. Άλλα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ακόμα και ένα μονήρες μελανωματικό κύτταρο χωρίς εξειδικευμένη αναγνωρίσιμη γονιδιακή υπογραφή μπορεί να εγκαθιδρύσει και πάλι όγκο μελανώματος [88].

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθούν ορισμένοι περιορισμοί στης μελέτης μας. Οι κύριοι περιορισμοί της μελέτης είναι το μικρό δείγμα και η επιλογή των

ασθενών η οποία μπορεί να χαρακτηρισθεί μεροληπτική. Η κλινική μας είναι κέντρο αναφοράς στην Ελλάδα για αυτή την θεραπεία και οι παραπομπές αντιπροσωπεύουν ένα υπερεπιλεγμένο δείγμα ασθενών οι οποίοι έχουν τοπικά προχωρημένη νόσο, χωρίς συστηματικές μεταστάσεις και είναι ικανοί σωματικά να υποβληθούν σε αυτή την μεγάλης βαρύτητας επέμβαση. Όσο αφορά στο μέγεθος του δείγματος αξίζει να σημειώσουμε ότι αυτοί οι είκοσι ασθενείς ήταν όλοι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αυτήν την επέμβαση για μελάνωμα στην χώρα μας την εξαετία 2012-2018. Ένας άλλος περιορισμός είναι η ετερογένεια του δείγματος: διαφορετικό καρκινικό φορτίο, διαφορετική προηγηθείσα χειρουργική ή/και ιατρική θεραπεία και διαφορετικές επικουρικές θεραπείες. Τέλος, εκτιμήσαμε τα CMCs σε πέντε χρονικές στιγμές μέχρι την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα λόγω πρακτικότητας, αφού οι ασθενείς παραπέμφθηκαν από άλλα νοσοκομεία της ηπειρωτικής Ελλάδας και η συστηματική μακροχρόνια παρακολούθηση στην κλινική μας ήταν από δύσκολη έως αδύνατη. Η εκτίμηση των CMCs σε μια μεταγενέστερη χρονική στιγμή (π.χ. στους δύο μήνες, οπότε αναμένουμε το μέγιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα του HILP) θα μπορούσε να αποκαλύψει για πόσο χρόνο παραμένουν οι παρατηρούμενες αλλαγές μετά την επέμβαση και πιθανές επιπτώσεις των μακροπρόθεσμων μεταβολών των CMCs μετά από HILP.

IX. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η υπερθερμική διάχυση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε αγγειακά απομονωμένο μέλος με χρήση TNFα και Μελφαλάνης προκαλεί αύξηση των κυκλοφορούντων μελανωματικών κυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία των ασθενών με υψηλότερες τιμές την έβδομη μετεγχειρητική ημέρα. Η καταστροφική δράση του HILP πάνω στο μελάνωμα οδηγεί σε εξάλειψη των εστιών του μελανώματος. Οι ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη ανταπόκριση στην θεραπεία είχαν μεγαλύτερη αύξηση των CMCs σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF άμεσα μετά την επέμβαση και την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, αύξηση των CMCs συσχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, πρόοδο νόσου και μειωμένη επιβίωση. Σε αυτό το δείγμα των είκοσι ασθενών η αύξηση των CMCs σύμφωνα με τον βιοδείκτη MITF μετά από HILP δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την τετραετή ειδική για την νόσο επιβίωση.

Η έκφραση του MITF και η σημασία του για την εξέλιξη της νόσου είναι αντικείμενο πολλών σύγχρονων ερευνών. Τα κυκλοφορούντα μελανωματικά κύτταρα που εκφράζουν MITF θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακοδυναμικός βιοδείκτης τόσο στο HILP όσο και σε άλλες μορφές θεραπείας. Η γονιδιακή ταυτότητα και ο φαινότυπος MITF του μελανώματος μπορούν να είναι οδηγοί προσαρμογής των θεραπευτικών πρωτοκόλλων στη μάχη κατά της νόσου.

Παρόλο που η φαρμακευτική θεραπεία του μελανώματος, μέσω της ανοσοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας, έχει σημειώσει εντυπωσιακή πρόοδο, η νόσος αναπτύσσει ικανότητες διαφυγής λόγω της φαινοτυπικής της πλαστικότητας. Έτσι όταν η βιολογία προσδίδει στο μελάνωμα χαρακτηριστικά εμμένουσας περιοχικής νόσου, το HILP θα έχει πάντα θέση στα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

Χ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1]. Κωστάκη Μ., Νικολάου Β., Στρατηγός Α. Κατευθυντήριες οδηγίες για το μελάνωμα. Διάγνωση και αντιμετώπιση. Προσαρμοσμένες στα ελληνικά δεδομένα από δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες (Carbe et al Eur J Cancer 2012 (European Guidelines), Marsden et al J Plast Reconstr Aesthet Surg 2010 (UK Guidelines))

[2]. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html

[3]. Global Cancer Observatory. Data from Cancer Today. gco.iarc.fr/today

[4]. Spot the Dot Organization. spotthedot.org/wp2019/wp-content/uploads/2020/04/2020-campain-report-GC-version-FINAL.pdf

[5]. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ. http://www.elemmel.gr/wp-content/uploads/2017/06/e-book.pdf

[6]. Surgical Oncology. Theory and Multidisciplinary practice. Second Edition. 2017. Edited by Poston G., Wyld L., Audisio R. CRC Press. Taylor & Francis Group. Chapter 41: Melanoma.

[7]. Cutaneous Melanoma. Sixth edition. 2020. Edited by Balch C., Atkins M., Garbe C., Gershenwald J., Halpern A., Kirkwood J.,McArthur G., Thompson J., Sober A. Springer Nature Switzerland.

[8]. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. Nature. 2011;480(7375):99-103.

[9]. Vachtenheim J, Ondrušova L. MITF: A critical transcription factor in melanoma transcriptional regulatory network. In: Recent advances in the biology, therapy and management of melanoma, Lester M. Davids (Ed). IntechOpen, 2013 DOI: 10.5772/55191

[10]. Gershenwald J., Scolyer R., Hess K., Sondak V., Long G., Ross M. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer. Eighth edition. Cancer Staging Manual. CA Cancer J Clin 2017 November; 67(6): 472-492. Doi: 10.3322/caac.21409

[11]. Haydu L., Scolyer R., Lo S., Quinn M., Saw R., Shannon S. et al. Conditional Survival: An assessment of the prognosis of patients at time points after initial diagnosis and treatment of locoregional melanoma metastasis. Journal of Clinical Oncology 2017 doi: 10.1200/JCO.2016.71.9393

[12]. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*. 2017;376(23):2211-2222. doi:10.1056/NEJMoa1613210

[13]. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, Sunderkötter C, Kaatz M, Schulte KW, Lehmann P, Vogt T, Ulrich J, Herbst R, Gehring W, Simon JC, Keim U, Martus P, Garbe C; German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2016 Jun;17(6):757-767. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00141-8. Epub 2016 May 5. PMID: 27161539.

[14]. Domingues B., Lopes JM., Soares P., Populo H. Melanoma treatment in review. ImmunoTargets and Therapy 2018:7 35-39

[15]. From Melanocytes to Melanoma. The progression to malignancy. Edited by Hearing V. And Leong S. 2006. Humana Press. Totowa New Jersey

[16]. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications. Hematol Oncol Clin North Am. 2014;28(3):437-53

[17]. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev. 2006;20(24):3426-39.

[18]. Goding CR, Arnheiter H. MITF-the first 25 years. Genes Develop. 2019;33(15-16):983-1007

[19]. Clark WH, A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. 1967. Advanc Biol Skin 8, 621-647

[20]. Lavelle TJ, Alver TN, Heintz KM, Wernhoff P, Nygaard V, Nakken S, et al. Dysregulation of MITF leads to transformation in MC1R-defective melanocytes. Cancers (Basel). 2020;12(7).
[21]. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2015;72(7):1249-60. Doi: 10.1007/s00018-014-1791-0
[22]. Fane ME, Chhabra Y, Hollingsworth DEJ, Simmons JL, Spoerri L, Oh TG, et al. NFIB mediates BRN2 driven melanoma cell migration and invasion through regulation of EZH2 and MITF. EBioMedicine. 2017;16:63-75. Doi: 10.1016/j.ebiom.2017.01.013
[23]. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. J Transl Med. 2009;7:86. Doi: 10.1186/1479-5876-7-86.
[24]. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, et al. Molecular network associated with MITF in skin melanoma development and progression. J Skin Cancer. 2011;2011:730170. Doi: 10.1155/2011/730170.
[25]. Wiedemann G., Aithal C., Kraechan A., Heise C., Cadilla B., Zhang J. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) regulates immune cell migration into melanoma. Translational Oncology (2019) 12, 350-360. Doi: 10.1016/j.tranon.2018.10.014.
[26]. Feng C, Bai M, Zhang H, Zeng A, Zhang W. Prioritization and comprehensive analysis of genes associated with melanoma. Oncol Lett. 2019;18(1):127-36. Doi: 10.3892/ol.2019.10284
[27]. Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. J Invest Dermatol. 2015;135(2):352-8. Doi: 10.1038/jid.2014.319
[28]. Weinberg A. Robert, The biology of Cancer. 2013. Second edition. Garland Science. Chapter 14: Moving out: Invasion and Metastasis.
[29]. Paget S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev. 1989; 8:98-101.
[30]. Morton D., Hoon D., Cochran A., Turner R., Essner R., Takenchi H. et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early stage melanoma. Therapeutic utility and implications of nodal microanatomy and molecular staging for improving the accuracy of detection of nodal micrometastases. Ann Surg 2003; 238:538-550. Doi: 10.1097/01.s1a.0000086543.45557.cb
[31]. Bell RE, Levy C. The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(6):1088-106. Doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00931.x.
[32]. Arozarena I, Wellbrock C. Targeting invasive properties of melanoma cells. The FEBS J. 2017;284(14):2148-62. Doi: 10.1111/febs.14040
[33]. Bianchi-Smiraglia A., Bagati A., Fink E., Moparthy S., Wawrzyniak J., Martin E. et al. Microphthalmia-associated Transcription Factor suppresses invasion by reducing intracellular GTP pools. 2017. Oncogene January 05; 36(1): 84-96. Doi: 10.1038/onc.2016.178
[34]. Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. Pigment Cell Melanoma Res. 2015;28(4):390-406. Doi: 10.1111/pcmr.12370
[35]. Creech O., Krementz ET., Ryan R., Winblad J. Chemotherapy of cancer: Regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. Annals of Surgery 1958.
[36]. Lienard D., Eggermont AM, Kroon BB., Koops Schraffordt H., Lejeune FJ. Isolated limp perfusion in primary and recurrent melanoma indications and results. Semin Surg Oncol. Apr-May 1998; 14(3): 202-9. Doi: 10.1002/csici.1098-2388(198804/05)14:3<202::aid-ssu>3.0.co;2-c
[37]. Lienard D., Ewalenko P., Delmotte JJ., Renard N., Lejeune FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha inn combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma.J Clin Oncol 1992 Jan; 10(1): 52-60. Doi: 10.1200/JCO.1992.10.1.52
[38]. Zoras O., Isolated limb Perfusion. 1st Edition. 2007. Athens. Paschalides Medical Publications

[39]. DeSimone M., Vaira M. Hyperthermic Isolated Limb Perfusion. Madame Curie Bioscience Database (Internet). Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013
[40]. Stamatiou D, Ioannou CV, Kontopodis N, Michelakis D, Perisinakis K, Lasithiotakis K, Zoras O. Hyperthermic isolated limb perfusion. The switch from Steinmann pins to Omni-tract assisted isolation. The Journal of surgical research. 2017;213:147-57. Doi: 10.1016/j.jss.2017.02.023
[41]. Lasithiotakis K, Economou G, Gogas H, Ioannou C, Perisynakis K, Filis D, et al. Hyperthermic isolated limb perfusion for recurrent melanomas and soft tissue sarcomas: feasibility and reproducibility in a multi-institutional Hellenic collaborative study. Oncology reports. 2010;23(4):1077-83. Doi: 10.3892/or.00000735
[42]. van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. The oncologist. 2006;11(4):397-408. Doi: 10.1634/theoncologist.11-4-397
[43]. Lejeune FJ, Lienard D, Matter M, Ruegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. Cancer immunity. 2006;6:6
[44]. Cornett W., McCall L., Petersen R., Ross M.,Briele H., Noyes D., et al. Randomized multicenter trial o Hyperthermic isolated limp perfusion with Melphalan alone compared withbMelphalan plus Tumor Necrosis Factor. American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0020. J Clin Oncol 24: 4196-4201. Doi: 10.1200/JCO.2005.05.5152
[45]. Deroose JP, Eggermont AM, van Geel AN, de Wilt JH, Burger JW, Verhoef C. 20 years experience of TNF-based isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: TNF dose matters. Annals of surgical oncology. 2012;19(2):627-35. 10.1245/s10434-011-2030-7
[46]. Moreno-Ramirez D., de la Cruz-Merino L., Ferrandiz L., Villegas-Portero R., Nieto-Garcia A. Isolated limp perfusion for malignant melanoma: Systemic review on effectiveness and safety. The Oncologist 2010; 15: 416-427. Doi: 10.1634/theoncologist.2009-0325
[47]. Duprat Neto JPD., Oliveira F., Bertoli E., Molina AS., Nishinari K., Facure L., Fregnani JH. Isolated limp perfusion with hyperthermia and chemotherapy: predictive factors for regional toxicity. Clinics 2012; 67(3) 237-241. Doi: 10.6061/clinics/2012(03)06
[48]. Beromun® (Boehringer-Ingelheim; Tasonermin-παραγοντας νεκτώσεως όγκων αλφα-1αλφα (TNFα-1α) που παράγεται με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA σε E.coli). Περίληψη χαρακτηριστικών του σκευάσματος στην ελληνική γλώσσα. BELPHARMA s.a. www.ema.europa.eu
[49]. Matter M., Lejeune F., Demartines N. Isolated lilmb perfusion (ILP) in surgical oncology. For which patient, how and when. Swiss Knife 2008;3. Focus.
[50]. Grunhagen D., Verhoef C. Isolated limp perfusion for stage III melanoma. Does it still have a role in the present era of effective systemic therapy. Oncology (Williston Prk). 2016; 30(12):1045-1052
[51]. National Comprehensive Cancer Network®. Clinical Practice Guidelinew in Oncology. Melanoma: Cutaneous. Version 2.20121-February 19, 2021. Nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf
[52]. Micalizzi DS, Maheswaran S, Haber DA. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. Genes & development. 2017;31(18):1827-40. Doi: 10.1101/gad.305805
[53]. Smith B., Selby P., Southgate J., Pittman K., Bradley C., Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. The Lancet. 1991; 338: 1227-1229. Doi: 10.1016/0140-6736(91)92100-G
[54]. Mumford BS, Robertson GP. Circulating melanoma cells in the diagnosis and monitoring of melanoma: an appraisal of clinical potential. Molecular diagnosis & therapy. 2014;18(2):175-83. Doi: 10.1007/s40291-013-0071-2
[55]. Reid AL, Millward M, Pearce R, Lee M, Frank MH, Ireland A, et al. Markers of circulating tumour cells in the peripheral blood of patients with melanoma correlate with disease recurrence and progression. The British Journal of dermatology. 2013;168(1):85-92. Doi: 10.1111/bjd.12057
[56]. Koyanagi K, O'Day SJ, Gonzalez R, Lewis K, Robinson WA, Amatruda TT, et al. Microphthalmia transcription factor as a molecular marker for circulating tumor cell detection in blood of melanoma patients. Clin Cancer Res. 2006;12(4):1137-43. 10.1158/1078-0432.CCR-05-1847

[57]. Samija I, Lukac J, Maric-Brozic J, Buljan M, Alajbeg I, Kovacevic D, et al. Prognostic value of microphthalmia-associated transcription factor and Tyrosinase as markers for circulating tumor cells detection in patients with melanoma. Melanoma research. 2010;20(4):293-302. Doi: 10.1097/CMR.0b013e32833906b6

[58]. Rodic S, Mihalcioiu C, Saleh RR. Detection methods of circulating tumor cells in cutaneous melanoma: a systematic review. Critical reviews in oncology/hematology. 2014;91(1):74-92. Doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.01.007

[59]. Marsavela G, Aya-Bonilla CA, Warkiani ME, Gray ES, Ziman M. Melanoma circulating tumor cells: Benefits and challenges required for clinical application. Cancer Lett. 2018;424:1-8. Doi: 10.1016/j.canlet.2018.03.013

[60]. Khoja L, Lorigan P, Dive C, Keilholz U, Fusi A. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: detection methods and clinical relevance. Annals of oncology: official Journal of the European Society for Medical Oncology. 2015;26(1):33-9. Doi: 10.1093/annonc/mdu207

[61]. Mocellin S., Hoon D., Ambrosi A., Nitti D., Rossi CR. The prognostic value of circulating tumor cells in patient with melanoma: A systematic review and meta-analysis. Clin Cancer Res 2006; 12(15). Doi: 10.1158

[62]. Rao C, Bui T, Connelly M, Doyle G, Karydis I, Middleton MR, et al. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. International Journal of oncology. 2011;38(3):755-60. Doi: 10.3892/ijo.2011.896

[63]. Khoja L., Lorigan P., Zhou C., Lancoshire M., Booth J., Cummings J. et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. Journal of Investgative Dermatology (2013) 133, 1582-1590. Doi: 10.1038/jid.2012.468

[64]. Hida T, Yoneta A, Wakamatsu K, Yanagisawa K, Ishii-Osai Y, Kan Y, et al. Circulating melanoma cells as a potential biomarker to detect metastasis and evaluate prognosis. The Australasian Journal of dermatology. 2016;57(2):145-9. Doi: 10.1111/ajd.12455

[65]. Koyanagi K, O'Day SJ, Boasberg P, Atkins MB, Wang HJ, Gonzalez R, et al. Serial monitoring of circulating tumor cells predicts outcome of induction biochemotherapy plus maintenance biotherapy for metastatic melanoma. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16(8):2402-8.doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0037

[66]. Li J., Fu W., Zhang W, Li P. High number of circulating tumor cells predicts poor survival of cutaneous melanoma patients in China. Med Sci Monit 2018; 24: 324-331. Doi: 10.12659/msm.904770

[67]. Xu X., Zhong J. Circulating tumor cells and melanoma progression. J Invest Dermatol 2010 October; 130(10): 2349-2351. Doi: 10.1038/jid.2010.215

[68]. Clawson G., Kimchi E., Patrick S., Xin P., Harouaka R., Zheng S. et al. Circulating tumor cells in melanoma patients. PLoS ONE July 2012, Volume 7, Issue 7, e41052. Doi: 10.1371/journal.pone.0041052

[69]. Li YC., Zou JM., Luo C., Shu Y., Qin J. et al. Circulating tumor cells promote the metastatic colonization of disseminated carcinoma cells by inducing systemic inflammation. Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No 17), 28418-28430.

[70]. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990). 2009;45(2):228-47

[71]. Palmieri G, Satriano S, Budroni M, Cossu A, Tanda F, Canzanella S et al. Serial detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays is a marker for poor outcome in patients with malignant melanoma. BMC Cancer 2006, 6:26 doi: 10.1186/1471-2407-6-266

[72]. Curry BJ, Myers K, Hersey P. MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. Journal of clinical oncology: official Journal of the American Society of Clinical Oncology. 1999;17(8):2562-71

[73]. Gogas H, Eggermont AM, Hauschild A, Hersey P, Mohr P, Schadendorf D, et al. Biomarkers in melanoma. Annals of oncology: official Journal of the European Society for Medical Oncology. 2009;20 Suppl 6:vi8-13

[74]. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, Agelaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. Journal of clinical oncology: official Journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(13):2177-84

[75]. Romsdahl MM, Potter JF, Malmgren RA, Chu EW, Brindley CO, Smith RR. A clinical study of circulating tumor cells in malignant melanoma. Surgery, gynecology & obstetrics. 1960;111:675-81

[76]. Gray ES, Reid AL, Bowyer S, Calapre L, Siew K, Pearce R, et al. Circulating Melanoma Cell Subpopulations: Their Heterogeneity and Differential Responses to Treatment. J Invest Dermatol. 2015;135(8):2040-8

[77]. Rambow F, Marine JC, Goding C.R. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. Genes & development. 2019;33(19-20):1295-318

[78]. Kim IS, Heilmann S, Kansler ER, Zhang Y, Zimmer M, Ratnakumar K, et al. Microenvironment-derived factors driving metastatic plasticity in melanoma. Nature communications. 2017;8:14343

[79]. Garcia MP, Cavalheiro JR, Fernandes MH. Acute and long-term effects of hyperthermia in B16-F10 melanoma cells. PloS one. 2012;7(4):e35489

[80]. Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, Allegra M, Hofman V, Hofman P, et al. Hypoxia and MITF control metastatic behavior in mouse and human melanoma cells. Oncogene. 2012;31(19):2461-70

[81]. Bohme I, Bosserhoff A. Extracellular acidosis triggers a senescence-like phenotype in human melanoma cells. Pigment cell & melanoma research. 2020;33(1):41-51

[82]. Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, Brunton H, Ferguson J, Young H, et al. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. Cancer discovery. 2014;4(10):1214-29

[83]. Wouters J, Stas M, Govaere O, Van den Eynde K, Vankelecom H, van den Oord J.J. Gene expression changes in melanoma metastases in response to high-dose chemotherapy during isolated limb perfusion. Pigment cell & melanoma research. 2012;25(4):454-65

[84]. Comparative Toxicogenomics Database:

http://ctdbase.org/query.go?type=ixn&chemqt=equals&chem=name%3AMelphalan&actionDegreeTypes=increases&actionDegreeTypes=decreases&actionDegreeTypes=affects&actionTypes=ANY&geneqt=equals&gene=name%3AMITF&pathwayqt=equals&pathway=&taxonqt=equals&taxon=&goqt=equals&go=&sort=chemNmSort&perPage=50&action=Search

[85]. Xu Z, Chen L, Jiang M, Wang Q, Zhang C, Xiang LF. CCN1/Cyr61 Stimulates Melanogenesis through Integrin alpha6beta1, p38 MAPK, and ERK1/2 Signaling Pathways in Human Epidermal Melanocytes. The Journal of investigative dermatology. 2018;138(8):1825-33

[86]. Kim JY, Shin JY, Kim MR, Hann SK, Oh SH. siRNA-mediated knock-down of COX-2 in melanocytes suppresses melanogenesis. Experimental dermatology. 2012;21(6):420-5

[87]. Chapman A, Fernandez del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. Cell reports. 2014;8(3):688-95

[88]. Mel Ziman (November 14th, 2011). Circulating Melanoma Cells, Breakthroughs in Melanoma Research, Yohei Tanaka, IntechOpen, DOI: 10.5772/20046. Available from: https://www.intechopen.com/books/breakthroughs-in-melanoma-research/circulating-melanoma-cells