



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ
ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΦΟΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣΤΙΞΙΑ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ»**

**ΜΑΥΡΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ-ΔΗΜΗΤΡΑ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ
ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΦΟΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣΤΙΞΙΑ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ»**

**ΜΑΥΡΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ-ΔΗΜΗΤΡΑ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαυρίδου Κωνσταντίνας-Δήμητρας: 26-3-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 607^α/29-5-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπασούκας Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-7-2007

«Συμβολή στον χαρακτηρισμό του πληθυσμού των χρωμοφόρων κυττάρων στη δερματοσιζία του ανθρώπινου δέρματος»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 764^α/17-6-2014

Επιβλέπων

Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 947^α/6-10-2020

Βούλγαρη Παρασκευή	Καθηγήτρια Ρευματολογίας με έμφαση στην Ανοσολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαρσέλος Μάριος -Αθανάσιος	Ομότιμος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπασούκας Ιωάννης	Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λυκούδης Ευστάθιος	Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σερέτης Κωνσταντίνος	Επίκουρος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σπυρίδωνος Παναγιώτα

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Πληροφορικής του Τμήματος Ιατρικής
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-12-2020

Ιωάννινα 7-12-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Κλινική Δερματικών και Αφροδίσιας Νόσων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή σημαντικών συνεργατών και επιστημόνων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή της Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία κ. Μπασούκα Ιωάννη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου. Του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή του, τη συνεχή ενθάρρυνσή του, την υψηλότατου βαθμού ακαδημαϊκή καθοδήγηση, επίβλεψη και δημιουργική κριτική της δουλειάς μου.

Σε αυτή την προσπάθεια καθοριστικό ρόλο έπαιξε η Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, μέλος της τριμελούς επιτροπής, κα. Γούσια Άννα η οποία με τις γνώσεις της, την ακούραστη ενεργό συμμετοχή της και τη συνεχή συμπαράσταση της με καθοδηγούσε με ενθουσιασμό σε όλη την προσπάθεια των τελευταίων ετών.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στον Ομότιμο Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Μαρσέλο Μάριο που δέχθηκε να συμμετέχει ως μέλος της τριμελούς επιτροπής. Τον ευχαριστώ για τις εποικοδομητικές του συμβουλές και τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα. Παπούβου – Μπάη Αλεξάνδρα για τη βοήθειά της στη συλλογή δεδομένων, για την προθυμία και όρεξή της για δουλειά ώστε να ευδοκιμήσει αυτή η προσπάθεια.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και προς τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, που με τίμησαν με τη συμμετοχή και τη συμβολή τους στη διαδικασία βελτίωσης της παρούσας διατριβής.

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

στην οικογένειά μου,
για τη στήριξη και υπομονή
που υπέδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η δερματοστιξία είναι μία από τις αρχαιότερες μορφές τέχνης στην ιστορία της ανθρωπότητας. Άνθρωποι από διάφορους πολιτισμούς σε όλον τον κόσμο «βάφουν» τα σώματά τους εδώ και πάνω από 4.000 χρόνια είτε στο πλαίσιο θρησκευτικών τελετουργικών, είτε ως σύμβολα κοινωνικής θέσης, είτε για λόγους αισθητικής.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η δερματοστιξία έχει βρει εφαρμογές και στην κλινική Ιατρική, κυρίως ως μια υποβοηθητική μέθοδος αποκατάστασης της εμφάνισης της επιφάνειας του σώματος μετά από τραυματικές ή χειρουργικές αλλοιώσεις, αλλά και για την *in vivo* σήμανση περιοχών του σώματος ή παθολογικών αλλοιώσεων, με σκοπό την εύκολη επανεντόπισή τους για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς λόγους.

Το φάσμα των χρωστικών που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη δημιουργία της δερματοστιξίας είναι τεράστιο, καθώς χρωστικές που αναπτύσσονται για διάφορους κλάδους της βιομηχανίας «δοκιμάζονται» και στη δερματοστιξία. Έτσι, δεν είναι περίεργο που βαφές, οι οποίες έχουν συντεθεί για χρήση στην αυτοκινητοβιομηχανία, χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα στο “life style” τατουάζ εξ αιτίας της σταθερότητάς τους και των λαμπρών τους αποχρώσεων. Οι χρωστικές της δερματοστιξίας δεν υπόκεινται σε έλεγχο και έγκριση από κεντρικές ελεγκτικές υπηρεσίες, όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) ή ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA).

Η χρήση της δερματοστιξίας έχει αλματώδη αύξηση. Εν τούτοις, ο κίνδυνος επιπλοκών και μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων είναι σημαντικός, καθώς υπάρχουν ακόμη σημαντικά κενά στην κατανόηση βασικών επιστημονικών δεδομένων της δερματοστιξίας. Ειδικότερα, ερωτηματικά παραμένουν μέχρι σήμερα όσον αφορά στο μηχανισμό με τον οποίον η χρωστική της δερματοστιξίας διατηρείται μακροχρόνια εναποθηκευμένη στα κύτταρα του χορίου του δέρματος, εντοπισμένη στη θέση της έγχυσης παρά τη δυναμική κατάσταση αποδόμησης και αναδόμησης (turnover) του κυτταρικού πληθυσμού του χορίου. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να συνεισφέρει στην ανάδειξη των κυττάρων που συμμετέχουν στην αποθήκευση της εξωγενούς χρωστικής στα πλαίσια της δερματοστιξίας καθώς και της ενδογενούς χρωστικής σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση μελετώντας μέσω ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων τους κυτταρικούς πληθυσμούς του χορίου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
<i>1.1 Ιστορική αναδρομή της δερματοστιξίας και η θέση της στην κοινωνία.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2 Οι χρωστικές της δερματοστιξίας.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3 Οι τεχνικές της δερματοστιξίας.....</i>	<i>14</i>
A. Δερματοστιξία με ηλεκτρική μηχανή.....	14
B. Δερματοστιξία με χένα.....	15
Γ. Αυτοκόλλητη δερματοστιξία	15
Δ. Τραυματική δερματοστιξία	15
<i>1.4 Επιπλοκές της δερματοστιξίας.....</i>	<i>15</i>
A. Από την ηλεκτρική μηχανή.....	15
B. Από τη χένα.....	18
Γ. Από την αυτοκόλλητη δερματοστιξία.....	18
<i>1.5 Μέθοδοι απομάκρυνσης της δερματοστιξίας</i>	<i>18</i>
<i>1.6 Η δερματοστιξία στην ιατρική πράξη.....</i>	<i>20</i>
A. Κοσμητική δερματοστιξία.....	20
B. Δερματοστιξία στη δερματολογία (δερματογραφία).....	20
Γ. Πλαστική χειρουργική	21
Δ. Ογκολογία	21
E. Ενδοσκοπική δερματοστιξία	22
ΣΤ. Δερματοστιξία στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού	22
Ζ. Ο ρόλος της δερματοστιξίας στην ανοσολογική ανταπόκριση DNA εμβολίων	22
<i>1.7 Ανατομία του δέρματος.....</i>	<i>24</i>
A. Επιδερμίδα	24
B. Δερματοεπιδερμικός σύνδεσμος	27
Γ. Χόριο.....	27
Δ. Υποδόριος ιστός.....	35
E. Αγγείωση του δέρματος	36
ΣΤ. Νεύρωση του δέρματος.....	36
<i>1.8 Το δέρμα ως ανοσοποιητικό όργανο.....</i>	<i>36</i>
<i>1.9 Παθοφυσιολογία της δερματοστιξίας.....</i>	<i>38</i>
<i>1.10 Δερματίτιδα από στάση.....</i>	<i>45</i>
<i>1.11 Συστάδα διαφοροποίησης.....</i>	<i>46</i>
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	49
3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
3.1 ΥΛΙΚΟ.....	51
3.1.1 Συλλογή δειγμάτων	51
3.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	51

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52
3.2.1 Χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης.....	52
3.2.2 Ιστοχημικές χρώσεις	52
3.2.3 Ανοσοϊστοχημεία	52
3.2.4 Περιγραφή της μεθόδου στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος.....	53
3.2.5 Αξιολόγηση των ιστοχημικών χρώσεων.....	54
3.2.6 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.....	54
3.3 Ανάλυση της εικόνας (τμηματοποίηση χρώματος)	55
3.4 Στατιστική ανάλυση.....	56
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
4.1 Αξιολόγηση των ιστολογικών χρώσεων αιματοξυλίνης - ηωσίνης.....	57
4.1.1 Πρότυπο κυτταρικής κατανομής.....	57
4.1.2 Τοπογραφική εντόπιση των κοκκίων χρωστικής.....	58
4.2 Αξιολόγηση των ιστοχημικών χρώσεων.....	59
4.3 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	63
4.4 Διαφέρουν οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, που ανιχνεύονται με τον συνδυασμό CD11c και CD163 ως προς την αποθηκευτική τους ικανότητα;	79
4.4.1 Η αποθηκευτική ικανότητα των κυτταρικών υποπληθυσμών	80
4.4.2 Σύγκριση της αποθηκευτικής ικανότητας των υποπληθυσμών	82
4.5. Σύγκριση ανάμεσα σε δερματοστιξία και δερματίτιδα από στάση.....	85
4.5.1 Οι ανοσοφαινοτυπικά διακριτοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί σε δερματοστιξία και δερματίτιδα από στάση.	85
4.5.2 Σύγκριση δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.....	92
A. Σύγκριση κυτταρικών υποπληθυσμών	92
B. Σύγκριση χωρο-κατανομής των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής.....	93
Γ. Σχέση OR αποθήκευσης των κυτταρικών υποπληθυσμών και του βαθμού εξάπλωσης της διαθέσιμης χρωστικής στον ιστό.....	96
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	99
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	111
8 SUMMARY	113
9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	115

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δενδριτικά κύτταρα στο ανθρώπινο δέρμα σε συνθήκες ομοιόστασης. Υποδεικνύονται τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των υποπληθυσμών.....	34
Εικόνα 2: Τα ιστικά μακροφάγα εκτελούν σημαντικές ομοιοστατικές λειτουργίες. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ωριμάζουν από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Οι πρόδρομες μορφές απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως μονοκύτταρα και μεταναστεύουν γρήγορα σε σχεδόν όλους τους ιστούς του σώματος, όπου διαφοροποιούνται σε ώριμα μακροφάγα. Διάφοροι πληθυσμοί ώριμων ιστικών μακροφάγων βρίσκονται σε λειτουργικά στρατηγικά σημεία σε όλα τα όργανα όπου διαμεσολαβούν σημαντικές δραστηριότητες ανοσολογικής παρακολούθησης, όπως φαγοκυττάρωση, αντιγονοπαρουσίαση και ανοσοτροποποίηση.	35
Εικόνα 3: Περίπτωση δερματοστιξίας. Εναποθέσεις κοκκίων χρωστικής στο χόριο και υποδόριο ιστό (χρώση H/EX40).	58
Εικόνα 4: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. Εναποθέσεις κοκκίων χρωστικής (αιμοσιδηρίνης) στο θηλώδες χόριο (χρώση H/EX200).	59
Εικόνα 5: Ιστοχημική χρώση Perl's. Ανάδειξη των κοκκίων αιμοσιδηρίνης στο χόριο και υποδόριο λιπώδη ιστό σε περίπτωση δερματίτιδας από στάση (x40).....	60
Εικόνα 6: Περίπτωση δερματοστιξίας. CD11c ⁺ /CD163 ⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).	64
Εικόνα 7: Περίπτωση δερματοστιξίας. CD11c ⁻ /CD163 ⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600)	65
Εικόνα 8: Περίπτωση δερματοστιξίας. CD11c ⁺ /CD163 ⁻ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).	65
Εικόνα 9: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 1) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.....	66
Εικόνα 10: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 2) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.....	66
Εικόνα 11: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 3) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.....	67

Εικόνα 12: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 4) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	67
Εικόνα 13: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 5) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	68
Εικόνα 14: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c ⁺ /CD163 ⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).....	70
Εικόνα 15: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c ⁻ /CD163 ⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).....	70
Εικόνα 16: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c ⁺ /CD163 ⁻ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).....	71
Εικόνα 17: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 6) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	71
Εικόνα 18: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 7) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	72
Εικόνα 19: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 8) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	72
Εικόνα 20: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 9) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	73
Εικόνα 21: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 10) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	73
Εικόνα 22: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 11) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	74
Εικόνα 23: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 12) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	74

Εικόνα 24: Ιστογράμματα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 13) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	75
Εικόνα 25: Ιστογράμματα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 14) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.	75
Εικόνα 26: Box-plot σχεδιάγραμμα των OR “to be pigmented” για τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς (όλα τα δείγματα).	80
Εικόνα 27: Σχετική πιθανότητα έκφρασης CD11c ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD163 (CD11c CD163) και CD163 ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD11c (CD163 CD11c).	83
Εικόνα 28: Σχηματική παράσταση της αύξησης των OR με τη διαδοχική έκφραση των δεικτών CD11c και CD163. P=πιθανότητα ισότητας των κατανομών (Wilcoxon κατά ζεύγη).	84
Εικόνα 29: % κυττάρων με ανίχνευση αποθήκευσης χρωστικής.	85
Εικόνα 30: Κατανομή κυτταρικών υποπληθυσμών (%) στο σύνολο των κυττάρων του χορίου (Α), και ανάμεσα στα κύτταρα με (Β) και χωρίς (Γ) αποθήκευση χρωστικής.	88
Εικόνα 31: Σύγκριση των OR “to be pigmented” για διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάμεσα σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (box-plot σχεδιάγραμμα).	89
Εικόνα 32: Σχετική πιθανότητα έκφρασης CD11c ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD163 (CD11c CD163) και CD163 ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD11c (CD163 CD11c): Σύγκριση δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.	92
Εικόνα 33: Δερματοστιξία-Ιστολογική εικόνα αιματοξυλίνης-ηωσίνης.	94
Εικόνα 34: Δερματίτιδα από στάση-Ιστολογική εικόνα αιματοξυλίνης-ηωσίνης.	94
Εικόνα 35: Παράδειγμα εντοπισμού των περιοχών με χρωστική (Ιστολογικό δείγμα δερματοστιξίας-Εικόνα 33). Για κάθε εικονοστοιχείο με χρώση (παράδειγμα εικονοστοιχείο που ανήκει στην περιοχή R), υπολογίζεται η πλησιέστερη απόστασή του από το όριο της επιδερμίδας (εντοπισμός πλησιέστερου σημείου B).	95
Εικόνα 36: Αθροιστική κατανομή των κανονικοποιημένων -ως προς το πάχος του χορίου- αποστάσεων των περιοχών των κυττάρων με χρωστική, από την επιδερμίδα.	95

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημική σύσταση των σπουδαιότερων χρωστικών.	13
Πίνακας 2: Χρωστικές με σιδηρομαγνητικά χαρακτηριστικά.	17
Πίνακας 3: Ενδείξεις της δερματογραφίας ως θεραπευτικού μέσου.....	21
Πίνακας 4: Κυτταρικοί και χυμικοί παράγοντες του Ανοσοποιητικού Συστήματος του Δέρματος.	38
Πίνακας 5: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.	52
Πίνακας 6: Στατιστικές μέθοδοι.	56
Πίνακας 7: Ιστολογικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση	61
Πίνακας 8: Εναπόθεση κοκκίων χρωστική σε βιοπτικά υλικά δερματοστιξίας.....	62
Πίνακας 9: Χρώση Masson-Fontana και Perl's σε βιοπτικά υλικά δερματίτιδας από στάση.....	62
Πίνακας 10: Κύτταρα χορίου με αποθήκευση χρωστικής ('pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).	76
Πίνακας 11: Κύτταρα χορίου με αποθήκευση χρωστικής ('pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών κυτταρικών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου με αποθήκευση χρωστικής. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση)	77
Πίνακας 12: Κύτταρα χορίου χωρίς αποθήκευση χρωστικής ('non-pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).	77
Πίνακας 13: Κύτταρα χορίου χωρίς αποθήκευση χρωστικής ('non-pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου χωρίς ανίχνευση χρωστικής. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση)	78
Πίνακας 14: % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση)	78

Πίνακας 15: OR pigmented:non-pigmented – all specimens (N=14, T: δερματοστιξία, D: δερματίτιδα από στάση)	79
Πίνακας 16: Σύγκριση του OR ενός κυτταρικού τύπου να είναι αποθηκευτικό σε σχέση με την τιμή ίσης κατανομής του OR, σε αποθηκευτικά και μη κύτταρα (OR=1, InOR=0): (A) Δερματοστιξία, (B) Δερματίτιδα από στάση και (Γ) όλα τα δείγματα μαζί.	81
Πίνακας 17: Σύγκριση των OR “pigmented vs. non-pigmented” των κυτταρικών υποπληθυσμών που προσδιορίζονται ανάλογα με την έκφραση των δεικτών CD11c και CD163.	82
Πίνακας 18: Σύγκριση % κυτταρικών υποπληθυσμών ανάμεσα σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (A) στο σύνολο των κυττάρων του χορίου, (B) στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής και (Γ) στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής (Mann-Whitney U test).	86
Πίνακας 19: Σύγκριση των OR των κυτταρικών υποπληθυσμών ανά ζεύγη στη δερματίτιδα από στάση.....	90
Πίνακας 20: Σύγκριση των OR των κυτταρικών υποπληθυσμών ανά ζεύγη στη δερματοστιξία.....	91
Πίνακας 21: Σύγκριση των OR για τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάμεσα στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.....	92

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική αναδρομή της δερματοστιξίας και η θέση της στην κοινωνία

Η δερματοστιξία είναι μια διαδικασία κατά την οποία εξωγενείς χρωστικές ουσίες, κατόπιν αντίστοιχου τραυματισμού της επιδερμίδας, εισάγονται διεπιθηλιακά και εναποτίθενται τοπικά στο χόριο του δέρματος ή των βλεννογόνων οδηγώντας σε μακροχρόνια, εντοπισμένη αλλαγή του φυσιολογικού χρώματος των ιστών (1). Ο όρος προέρχεται από τη λέξη “tatau” των ιθαγενών της Ταϊτής που σημαίνει “σημαδεύω”. Η πρώτη συλλαβή “ta” μεταφράζεται ως χέρι και επαναλαμβάνεται δύο φορές για να επισημάνει την επαναληπτικότητα της διαδικασίας, ενώ η συλλαβή “u” σημαίνει χρώμα (2).

Ανατρέχοντας στην ιστορική αναδρομή της δερματοστιξίας, προκύπτει ότι οι ρίζες της χάνονται μέσα στους αιώνες και οι διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται συναντώνται σε λαούς με διαφορετικούς πολιτισμούς και κοινωνικοοικονομική κατάσταση. Η εφαρμογή της υιοθετήθηκε και από τα δύο φύλα και η δημιουργία της αντανακλά θρησκευτικούς, τελετουργικούς, αισθητικούς, ερωτικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς. Το ανεξίτηλο σημάδι της δερματοστιξίας καθόριζε τη μοναδικότητα του ατόμου και την κοινωνική του θέση μέσα στη φυλή (3). Η ύπαρξή της χρονολογείται από χιλιάδες χρόνια με τις πρώτες αρχαιολογικές μαρτυρίες να ανατρέχουν στη Νεολιθική εποχή με την εύρεση ανθρώπου διατηρημένου σε παγετώνα των Άλπεων, να φέρει στα χέρια σημάδια από επιβεβαιωμένη δερματοστιξία (4). Τεκμηριωμένα ευρήματα δερματοστιξίας αποκαλύφθηκαν και μελετήθηκαν σε Αιγυπτιακές μούμιες οι οποίες χρονολογούνται από το 2000 π.χ.. Από την Αίγυπτο η εφαρμογή της μεθόδου εξαπλώθηκε κατά μήκος των εμπορικών δρόμων σε όλη την περιοχή της Μεσογείου και ανατολικά προς την Περσία και την Αραβική χερσόνησο. Περί το 1100 π.χ., η δημοτικότητα της δερματοστιξίας εξαπλώνεται από τις χώρες της Ανατολής στις Φιλιππίνες, στο Βόρνεο και στην Πολυνησία (3).

Σε αντίθεση με την Ανατολή, στην αρχαία Ελλάδα η διακοσμητική δερματοστιξία θεωρούνταν μια βάρβαρη μέθοδος. Στη Ρωμαϊκή εποχή χρησιμοποιούνταν ως τρόπος διακρίσεως των αιχμαλώτων πολέμου, και στιγματισμού των εγκληματιών και των φυλακισμένων (1). Η χρήση της δερματοστιξίας διήλθε περίοδο κάμψης κατά τους πρώτους χριστιανικούς χρόνους, γεγονός που οδήγησε μετέπειτα στον αφορισμό της με παπική εγκύκλιο το 787 μ.χ.(5). Το μεσαιώνα επαναχρησιμοποιήθηκε για το στιγματισμό των εγκληματιών. Παρά την απαγόρευσή της στην Ευρώπη, παρέμεινε δημοφιλής στη Μέση Ανατολή και άνθισε σε νησιά του Ειρηνικού και στην Ιαπωνία (5).

Κατά τη διάρκεια της εποχής της εξερεύνησης του Ειρηνικού, η δερματοστιξία επανήλθε στην Ευρώπη από τον καπετάνιο James Cook (6). Από τη στιγμή της επανεμφάνισής της στη Δύση εξαπλώθηκε από τους ναυτικούς, σε ευρύτερες κοινωνικές ομάδες που αντιπροσωπεύονταν από φυλακισμένους, ναρκομανείς, εγκληματίες, μέχρι την άρχουσα ευγενή τάξη (7, 8).

Τον 20^ο αιώνα, η αντίληψη περί της δερματοστιξίας, αλλάζει καθώς αλλάζουν και τα κοινωνικά πρότυπα. Θεωρείται πλέον από πολλούς μορφή τέχνης αλλά και ένα είδος ‘λαϊκής’ μόδας που μοιάζει να κερδίζει ολοένα και περισσότερο μιμητές. Αρκετοί είναι εκείνοι, ιδιαίτερα οι νέοι, που καταφεύγουν στη μέθοδο αυτή για να αποτυπώσουν στο σώμα τους ένα σχέδιο της αρεσκείας τους που θα τους προσδώσει κάτι το ξεχωριστό και θα αποτελέσει έναν τρόπο εκδήλωσης των ιδεολογικών τους πεποιθήσεων.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που συνδέουν τη χρήση της δερματοστιξίας με ριψοκίνδυνες συμπεριφορές όσον αφορά τους εφήβους αλλά και νεαρούς ενήλικες όπως κατάχρηση ουσιών, βιαιοπραγίες, μαθησιακές δυσκολίες και παράνομες δραστηριότητες (9-11).

Παρά το γεγονός ότι η επιδίωξη δερματοστιξίας μπορεί απλά να αντανακλά μια αντίληψη για σωματικό καλλωπισμό, εντούτοις μπορεί να υποθάλπει και ψυχιατρικές διαταραχές. Στενή συσχέτιση υπάρχει μεταξύ της δερματοστιξίας και διαταραχών της προσωπικότητας, κυρίως της αντικοινωνικής και της μεθοριακής συμπεριφοράς (12, 13). Ο ασθενής με αντικοινωνική διαταραχή προσωπικότητας είναι ευερέθιστος, παρορμητικός, βίαιος και με διαταραγμένες διαπροσωπικές σχέσεις. Επιπλέον δεν αποδέχεται γενικές ηθικές αξίες συμμετέχοντας σε παράνομες και καταστροφικές πράξεις (14). Η συμπτωματολογία του ασθενούς με μεθοριακή διαταραχή προσωπικότητας χαρακτηρίζεται κυρίως από αστάθεια διαπροσωπικών και συναισθηματικών σχέσεων με αποτέλεσμα η συμπεριφορά του να είναι παρορμητική και αυτοκαταστροφική (14). Η δερματοστιξία σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να αναπληρώσει το κενό ενός πληγωμένου εγωισμού και μιας διαταραγμένης προσωπικότητας (12). Άλλες ψυχιατρικές παθήσεις που έχουν συσχετιστεί με τη δερματοστιξία είναι η μανία και η διπολική συμπεριφορά. Τα άτομα αυτά υποβάλλονται σε αυτή τη διαδικασία εξαιτίας της ταυτόχρονης αίσθησης ευχαρίστησης από κάποια μορφή δημιουργίας και του επώδυνου της διαδικασίας (12). Τέλος, στις παραφυλίες και κυρίως στο σεξουαλικό φетиχισμό υπάρχει αυξημένη συχνότητα χρήσης της δερματοστιξίας ως μέσου ολοκλήρωσης μιας φαντασίωσης (15, 16).

1.2 Οι χρωστικές της δερματοστιξίας

Η μελάνη της δερματοστιξίας αποτελείται από μία ή περισσότερες χρωστικές και από ένα διάλυμα φορέα (17). Οι χρωστικές της δερματοστιξίας δεν είναι εγκεκριμένες από την Επιτροπή Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) αλλά μόνο από τοπικούς φορείς. Εξ αιτίας αυτού του γεγονότος οι χρωστικές είναι πολλές φορές υπεύθυνες για διάφορες επιπλοκές στις οποίες θα αναφερθούμε παρακάτω (18). Οι σύγχρονες μελάνες περιλαμβάνουν μεταλλικά στοιχεία, βιομηχανοποιημένες οργανικές, φυτικές και πλαστικοποιημένες ουσίες (17).

Οι χρωστικές της δερματοστιξίας περιέχουν πολλά αλλεργιογόνα έκδοχα όπως θειούχο υδράργυρο, θειούχο κάδμιο, οξείδιο του σιδήρου, αλουμίνιο του κοβαλτίου, μαγγάνιο, χρώμιο, τιτάνιο κ.α. (19). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα κύρια συστατικά των σπουδαιότερων χρωστικών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της δερματοστιξίας (19).

Πίνακας 1: Χημική σύσταση των σπουδαιότερων χρωστικών.

Χρωστική	Χημική Σύσταση
Μαύρη	Ανθρακας
Μπλε	Αλουμίνιο του κοβαλτίου
Καφέ	Ένυδρο οξείδιο του σιδήρου
Πράσινη	Οξείδιο του χρωμίου
Μώβ	Μαγνήσιο
Κόκκινη	Θειούχος υδράργυρος
Λευκό	Οξείδιο του τιτανίου
Κίτρινο	Θειούχο κάδμιο

Εκτός από τη χρωστική, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρειάζεται και ένα διάλυμα φορέας για τη δημιουργία της κατάλληλης βαφής. Το διάλυμα φορέας είναι υπεύθυνο για την αποφυγή συσσωμάτωσης των σωματιδίων της χρωστικής, καθώς και για την αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης βοηθάει την ομοιόμορφη κατανομή της βαφής καθώς και για την ευκολότερη εφαρμογή της στο δέρμα (17). Μεταξύ των πιο κοινών και ασφαλέστερων διαλυμάτων είναι: η αιθανόλη, το απεσταγμένο νερό, η λιστερίνη, η γλυκερίνη και η αμαμηλίσ (17).

Η ανεξέλεγκτη χρήση διαφόρων χρωστικών οδηγεί συχνά στην εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων. Μελέτες δείχνουν ότι μόνο όταν παρουσιαστεί μια τέτοια ανεπιθύμητη αντίδραση οι χρωστικές ελέγχονται και τα αλλεργιογόνα ταυτοποιούνται (20). Έχουν γίνει προσπάθειες να μειωθούν τέτοιου είδους παρενέργειες με αντικατάσταση συστατικών των χρωστικών. Έτσι για παράδειγμα, ο υδράργυρος που αποτελεί συστατικό της κόκκινης χρωστικής και είναι υπεύθυνος για αρκετές αντιδράσεις έχει αντικατασταθεί από άλλες βαφές όπως κόκκινη ώχρα (ferric hydrate), κόκκινο κάδμιο (cadmium selenide) και οργανικές φυτικές βαφές (κοκκινόξυλο). Παρόλα αυτά η ευαισθησία στις κόκκινες χρωστικές μπορεί και πάλι να εμφανιστεί (21). Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων με τις οποίες εμφανίζεται μια αντίδραση υπερευαισθησίας όπως η δερματίτιδα εξ επαφής, η κνίδωση, η φωτοδερματίτιδα, η αλλεργική καταπληξία, καθώς και η λειχηνοειδής, η κοκκιωματώδης (είτε ως ξένου σώματος, είτε ως αντίδραση υπερευαισθησίας) ή η ψευδολεμφοματώδης αντίδραση (2, 19-23). Μακροπρόθεσμες, πιο σπάνιες επιπλοκές έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία όπως η ψευδοεπιθηλιωματώδης υπερπλασία, η αντίδραση τύπου μορφέα και οι πολλαπλές επιδερμидικές κύστες (24-27).

1.3 Οι τεχνικές της δερματοστιξίας

Οι διάφοροι πολιτισμοί έχουν ξεχωριστούς τρόπους και διαδικασίες για τη δημιουργία δερματοστιξίας. Κάποιες φυλές σχεδιάζουν πάνω στο σώμα τους το κατάλληλο σχέδιο κόβοντας το δέρμα και στη συνέχεια πάνω στην πληγή τοποθετούν στάχτη, μελάνη ή άλλες φυσικές χρωστικές (2). Σε άλλες κοινωνίες η δερματοστιξία σχηματίζεται με την έγχυση της μελάνης στο δέρμα μέσω αιχμηρών ξύλων ή οστών ζώων. Στην Ιαπωνία, η παραδοσιακή μέθοδος τατουάζ ονομάζεται Irezumi. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, το μελάνι εισάγεται στο δέρμα χρησιμοποιώντας χειροποίητα εργαλεία που αντί για βελόνες αποτελούνται από αιχμηρά μπαμπού ή ατσάλι (2). Στον 21^ο αιώνα η τεχνική δημιουργίας ενός τατουάζ μακράν διαφέρει από τις παραπάνω διαδικασίες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθες:

A. Δερματοστιξία με ηλεκτρική μηχανή

Η πρώτη ηλεκτρική μηχανή δερματοστιξίας κατασκευάστηκε το 1891 από τον Samuel O' Reilly και ήταν βασισμένη σε ηλεκτρικό εργαλείο του Thomas Edison το οποίο τρυπούσε χαρτί με μια βελόνα. Η δερματοστιξία δημιουργείται με την έγχυση μελάνης

κάτω από την επιδερμίδα μέσω μιας ομάδας βελονών που είναι συγκολλημένες σε μια ράβδο που φέρει μια χειροκίνητη συσκευή που μοιάζει με πιστόλι. Οι βελόνες κινούνται πάνω-κάτω με ρυθμό αρκετών εκατοντάδων δονήσεων το λεπτό και διεισδύουν στο δέρμα σε βάθος ενός χιλιοστού περίπου (2, 3).

B. Δερματοστιξία με χένα

Η παροδική αυτή δερματοστιξία έχει γίνει πολύ δημοφιλής στο δυτικό πολιτισμό, κυρίως μεταξύ των εφήβων. Οι κύριοι λόγοι είναι η χαμηλή τιμή, η γρήγορη και ανώδυνη διαδικασία καθώς και προσφορά σε τουριστικές περιοχές (28). Καθώς η χένα στεγνώνει αργά πάνω στο δέρμα, επιπρόσθετα έκδοχα προστίθενται όπως: έλαια, καφές, τσάι, λουλάκι ή παραφενυλενεδιαμίνη (PPD) για να μειωθεί ο χρόνος και να σκουρύνει το χρώμα (29).

Γ. Αυτοκόλλητη δερματοστιξία

Είναι δημοφιλής μεταξύ των παιδιών (28).

Δ. Τραυματική δερματοστιξία

Αυτού του είδους η δερματοστιξία δημιουργείται από τη διαδερμική εμφύτευση ξένων σωματιδίων όπως: άσφαλτος, χαλίκια, τζάμι, μέταλλα και κόκκοι πυρίτιδας (28). Η θεραπεία της τραυματικής δερματοστιξίας συνίσταται στην άμεση απομάκρυνση των ξένων σωματιδίων με μηχανική δερμοαπόξεση ή με laser (30, 31).

1.4 Επιπλοκές της δερματοστιξίας

A. Από την ηλεκτρική μηχανή

Ο επεμβατικός χαρακτήρας της ηλεκτρικής μηχανής για την εφαρμογή της δερματοστιξίας, που οδηγεί σε λύση της συνέχειας της επιδερμίδας, σε συνδυασμό με την ελλειπή αποστείρωση του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού, μπορεί να προκαλέσουν τις παρακάτω επιπλοκές:

- 1) Μολύνσεις: Κατά τη διαδικασία της δερματοστιξίας, η χρωστική διαπερνάει την επιδερμίδα, φτάνει στο χόριο και έρχεται σε επαφή με τα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία. Σε περίπτωση ανεπαρκούς αποστείρωσης των μηχανημάτων ή πλημμελούς απολύμανσης της περιοχής του δέρματος όπου θα γίνει η δερματοστιξία, αυξάνει η

πιθανότητα μόλυνσης. Αυτή μπορεί να οφείλεται σε μικρόβια (σταφυλόκοκκος, στρεπτόκοκκος, μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, ωχρό τρεπόννημα, μυκοβακτηρίδιο της λέπρας, κλωστηρίδιο του τετάνου), σε ιούς (HSV, HPV, HIV, HBV, HCV) και σε μύκητες (τριχόφυτο, επιδερμόφυτο) (19). Η επικινδυνότητα της δερματοστιξίας όσον αφορά στα αιματογενώς μεταδιδόμενα νοσήματα είναι ένα αμφισβητήσιμο κεφάλαιο στη διεθνή βιβλιογραφία και επισημαίνεται ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστεί κάτι τέτοιο (19, 32, 33).

- 2) Σαρκοειδόμορφα κοκκιώματα: Κοκκιώματα αυτού του τύπου έχουν παρατηρηθεί σαν πρώτη εκδήλωση της σαρκοειδωσης στην περιοχή της δερματοστιξίας ή δευτεροπαθώς μετά την εκδήλωση της συστηματικής σαρκοειδωσης. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία συστήνεται πάντα έλεγχος για την παρουσία ή μη συστηματικής μορφής σαρκοειδωσης (34-37).
- 3) Όγκοι δέρματος: Ο τραυματισμός, οι ουλές και η χρόνια φλεγμονή έχουν αναφερθεί ως προδιαθεσικοί παράγοντες στην εμφάνιση καρκίνων του δέρματος. Η δερματοστιξία είναι μια τραυματική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την εισαγωγή εξωγενούς χρωστικής στο δέρμα.
 - Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC): Αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις BCC σε περιοχές του σώματος με δερματοστιξία, εντούτοις τεκμηριωμένη αιτιολογική συσχέτιση δεν έχει αναφερθεί (38-40).
 - Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC): Μεμονωμένα περιστατικά έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με SCC σε περιοχή του σώματος που προϋπάρχει δερματοστιξία αλλά και σε αυτή την περίπτωση δεν έχει αποδειχθεί κάποια αιτιολογική συσχέτιση (19, 41).
 - Μελάνωμα: Η αυξημένη επίπτωση του μελανώματος τις τελευταίες δεκαετίες έχει οδηγήσει τους ερευνητές στην αναζήτηση παραγόντων κινδύνου. Η δερματοστιξία δε θεωρείται αιτιολογικός παράγοντας και πολύ λίγες περιπτώσεις μελανώματος σε περιοχές με δερματοστιξία έχουν αναφερθεί (40, 42, 43). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η παθογένεια του μελανώματος παραμένει άγνωστη. Σε ογκολογικούς ασθενείς που φέρουν δερματοστιξία μπορεί η ακτινοθεραπεία να σχετίζεται με την εμφάνιση μελανώματος στην περιοχή της δερματοστιξίας λόγω της βλαπτικής αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας και των χρωστικών της δερματοστιξίας.

- **Κερατοακάνθωμα:** Το κερατοακάνθωμα είναι ένα νεόπλασμα του δέρματος που εμφανίζεται συνήθως στις ηλιοεκτεθειμένες περιοχές ηλικιωμένων ασθενών. Χαρακτηρίζεται από ταχεία εξάπλωση με αυτόματη πλήρη υποστροφή τις περισσότερες φορές και θεωρείται ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ιδιαίτερα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (44). Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κερατοακανθωμάτων που αναπτύχθηκαν σε περιοχές με δερματοστιξία, χωρίς να αποδειχθεί κάποια αιτιολογική συσχέτιση.(40, 44-46)

4) Μαγνητική τομογραφία (MRI) και πιθανές παρενέργειες: Ένας μικρός αριθμός ασθενών με δερματοστιξία που υποβλήθηκε σε MRI, παρουσίασε συμπτώματα, όπως ερεθισμό, εφίδρωση και αίσθημα καύσους στο σημείο της δερματοστιξίας (19). Σπανιότερα έχει αναφερθεί έγκαυμα στην περιοχή αυτή (47, 48). Πολλές χρωστικές περιέχουν μεταλλικά στοιχεία με αποτέλεσμα το μαγνητικό πεδίο που εφαρμόζεται κατά την εξέταση MRI να διεγείρει σιδηρομαγνητικά υλικά (πχ οξείδιο του σιδήρου) και να προκαλεί τις παραπάνω παρενέργειες (49). Στον Πίνακα 2 αναφέρονται οι συχνότερες σιδηρομαγνητικές χρωστικές που βρίσκουμε σε χρωστικές δερματοστιξίας του εμπορίου (49). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει αναφερθεί περιστατικό εγκαύματος από δερματοστιξία στα βλέφαρα που δεν περιείχε κάποια σιδηρομαγνητική χρωστική (50).

Πίνακας 2: Χρωστικές με σιδηρομαγνητικά χαρακτηριστικά.

Χρωστική	Σιδηρομαγνητική ουσία
Μπλε	Αλουμίνιο του κοβαλτίου
Κόκκινο της σκουριάς	Οξείδιο του σιδήρου
Χρώμα του δέρματος	Οξείδιο του σιδήρου, Διοξείδιο του σιδήρου, Υδροξείδιο του σιδήρου
Μαύρη	Οξείδιο του σιδήρου
Καφέ	Ένυδρο οξείδιο του σιδήρου, Θεϊκός σίδηρος
Κίτρινη	Ένυδρο οξείδιο του σιδήρου

Η έγκαιρη γνωστοποίηση στον διενεργούντα την εξέταση ότι ο ασθενής φέρει δερματοστιξία σε κάποιο σημείο του σώματός του καθώς και η λήψη προληπτικών μέτρων, όπως ένα κρύο επίθεμα στο σημείο της δερματοστιξίας κατά τη διάρκεια της εξέτασης, μπορεί να μειώσουν την πιθανότητα αυτών των επιπλοκών (19).

B. Από τη χένα

Οι επιπλοκές που εμφανίζονται με τη χρήση χέννας οφείλονται στα έκδοχα που χρησιμοποιούνται για να επιταχύνουν τη διαδικασία του στεγνώματος και κυρίως του PPD (para-phenylenediamine). Η δερματική αντίδραση μπορεί να παρουσιαστεί ως λειχηνοειδής, εκζεματώδης, φυσαλιδώδης ή τύπου πολύμορφου ερυθήματος βλάβη στο σημείο της δερματοστιξίας (29, 51, 52). Επίσης έχει αναφερθεί αντιδραστική υπερτρίχωση μια εβδομάδα μετά την εφαρμογή της χέννας η οποία υποχώρησε αυτόματα μετά από 3-4 μήνες (53). Άμεσες αλλεργικές αντιδράσεις όπως κνίδωση, αναφυλαξία, οξεία αναπνευστική ή νεφρική ανεπάρκεια έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία, γι' αυτό είναι φρόνιμο πριν τη χρήση της χέννας, να γίνεται ένα patch test για το PPD στον ενδιαφερόμενο και η συγκέντρωση του PPD να μη ξεπερνάει τα επιτρεπτά όρια (52). Απώτερες επιπλοκές περιλαμβάνουν την μεταφλεγμονώδη υπο- ή υπερμελάγχρωση, την ουλή αλλά και τη μόνιμη ευαισθητοποίηση σε συγκεκριμένα έκδοχα (54).

Γ. Από την αυτοκόλλητη δερματοστιξία

Από την πρόσφατη βιβλιογραφία δεν προκύπτει συσχέτιση της αυτοκόλλητης δερματοστιξίας με συγκεκριμένες επιπλοκές. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για τη διερεύνηση πιθανών παρενεργειών αυτού του τύπου δερματοστιξίας (28, 55).

1.5 Μέθοδοι απομάκρυνσης της δερματοστιξίας

Τις τελευταίες δεκαετίες ο αριθμός των ατόμων με δερματοστιξία έχει αυξηθεί σημαντικά (10, 56). Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 24% (10) και στις Ευρωπαϊκές χώρες, όπως στη Γερμανία και στο Ηνωμένο Βασίλειο, στο 9% και 12% αντίστοιχα (57, 58). Παράλληλα με το υψηλό ποσοστό ατόμων με δερματοστιξία εξίσου υψηλό είναι και το ποσοστό εκείνων που επιθυμούν να απομακρύνουν μια δερματοστιξία από το σώμα τους. Υπολογίζεται ότι μετά από μία δερματοστιξία ένα ποσοστό που κυμαίνεται ανάμεσα στο ένα στα τέσσερα με ένα στα τρία περίπου άτομα μετανιώνουν για αυτή τους την επιλογή μέσα σε διάστημα μόλις μερικών μηνών και δεν είναι λίγοι αυτοί που προχωρούν στην αφαίρεση κάποιας δερματοστιξίας κατά μέσο όρο μετά από 14 χρόνια (59). Οι κύριοι λόγοι που οδηγούν στην απόφαση για απομάκρυνση της δερματοστιξίας είναι ο κοινωνικός στιγματισμός, οι πιθανές δερματικές παρενέργειες, η ανέλιξη στην επαγγελματική σταδιοδρομία, η κοινωνική προβολή καθώς και η ενδοοικογενειακή πίεση (60, 61).

Η εξέλιξη της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της δερματοστιξίας έχει βελτιωθεί σημαντικά. Οι παλαιότερες μη ειδικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χειρουργική αφαίρεση, την κρυοθεραπεία, τη δερμοαπόξεση, την τριβή με αλάτι, τον καυτηριασμό, την υπέρυθρη πήξη, την αφαίρεση με laser CO₂ καθώς και τη χημική ιστική καταστροφή με τη χρήση καυστικών ουσιών όπως ταννικό οξύ και νιτρικός άργυρος (60, 62). Ο υψηλός κίνδυνος ανάπτυξης ουλών, ο μετεγχειρητικός πόνος, η πιθανή αιμορραγία καθώς και η πιθανότητα αποτυχίας πλήρους αφαίρεσης της δερματοστιξίας είναι μερικές από τις παρενέργειες των παραπάνω μεθόδων (60, 62, 63). Σήμερα, η απομάκρυνση της δερματοστιξίας γίνεται με laser και η εφαρμογή τους βασίζεται στη στοχευμένη καταστροφή των χρωστικών της δερματοστιξίας αξιοποιώντας το μηχανισμό της εκλεκτικής φωτοθερμόλυσης και προκαλώντας μικρή βλάβη της επιδερμίδας, του χορίου και των εξαρτημάτων του δέρματος (64). Σήμερα τα Q switched lasers αποτελούν τη μέθοδο εκλογής για την απομάκρυνση δερματοστιξίας (62). Υπάρχουν 4 ειδών Q switched lasers και αναλόγως με το μήκος κύματος διακρίνονται στα: Q switched ruby (QSR) laser (694nm), Q switched alexandrite laser (755nm) και Q switched Nd:YAG laser (532 και 1064 nm) (61). Η δερματοστιξία μαύρου χρώματος μπορεί να αφαιρεθεί με όλα τα προαναφερθέντα Q switched laser λόγω του ευρέως φάσματος απορρόφησης που έχει. Αντιθέτως, τα χρωματιστά τατουάζ επειδή απορροφούν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος δεν απαντούν το ίδιο αποτελεσματικά σε όλα τα laser (61). Για παράδειγμα η κόκκινη και η κίτρινη χρωστική μπορεί να αντιμετωπιστεί με το Nd:YAG laser 532 nm ενώ για τα πολύχρωμα τατουάζ πιο αποτελεσματικό είναι το Q switched alexandrite laser (62). Οι πιο συχνές παρενέργειες της αφαίρεσης δερματοστιξίας με laser περιλαμβάνουν υπό-υπερμελάγχρωση, αμαύρωση της χρωστικής, μόλυνση, εφελκιδοποίηση, πρόκληση φυσαλίδων, αιμορραγία, ενώ πιο σπάνια έχει παρατηρηθεί δημιουργία ουλών και αλλαγές στην υφή του δέρματος (δέρμα με υφή τσιγαρόχαρτου, ήπιου βαθμού μόνιμο ερύθημα, κηρώδης επιφάνεια δέρματος) (60, 62, 63, 65). Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η χρήση τοπικής ιμικουιμόδης 5% συμπληρωματικά στην επέμβαση με YAG laser οδηγεί σε καλύτερο αποτέλεσμα όσον αφορά την απομάκρυνση της δερματοστιξίας. Η παρατήρηση αυτή χρειάζεται να τεκμηριωθεί με περισσότερες μελέτες (63).

1.6 Η δερματοστιξία στην ιατρική πράξη

Με την αύξηση της δημοτικότητας της δερματοστιξίας τις τελευταίες κυρίως δεκαετίες, το επιστημονικό ενδιαφέρον στράφηκε σε πιθανές εφαρμογές της στην ιατρική. Αναφέρονται οι σπουδαιότερες και οι πιο δημοφιλείς χρήσεις της στην ιατρική πράξη.

A. Κοσμητική δερματοστιξία

Η κοσμητική δερματοστιξία βοηθάει στη βελτίωση της εμφάνισης των βλεφάρων και των οφρύων, καθώς και της περιφέρειας του χείλους μετά από παθήσεις, τραυματισμό ή χειρουργείο (1). Άλλα δυνητικά πεδία μικροχρωματισμού περιλαμβάνουν το μόνιμο make-up και την αισθητική αποκατάσταση βλαβών της θηλής του μαστού (1, 66). Ένα από τα πλεονεκτήματα του μόνιμου make-up είναι η αποφυγή της καθημερινής διαδικασίας από άτομα με φυσικές αναπηρίες όπως, ελαττωμένη οπτική οξύτητα και παραμορφωτική αρθρίτιδα (66).

B. Δερματοστιξία στη δερματολογία (δερματογραφία)

Το 1984 ο van der Velden, Ολλανδός δερματολόγος, υιοθέτησε την κλασική ιαπωνική τεχνική για την εφαρμογή της δερματοστιξίας σε διάφορους κλάδους της ιατρικής (67). Η τεχνική που αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '90 ονομάστηκε “δερματογραφία”. Η διαδικασία περιλαμβάνει την εμφύτευση διαφόρων χρωστικών σε διαδοχικές συνεδρίες, μέχρις ότου επιτευχθεί ταυτόσημο χρώμα με το γειτονικό δέρμα (1). Τα τελευταία 15 χρόνια, η δερματογραφία εφαρμόζεται με άριστα αποτελέσματα σε ένα μεγάλο εύρος παθήσεων. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ενδείξεις της δερματογραφίας ως βασικής και ως επικουρικής θεραπείας (67).

Πίνακας 3: Ενδείξεις της δερματογραφίας ως θεραπευτικού μέσου.

Βασική θεραπεία	Επικουρική θεραπεία
Αλωπεκία (67, 68)	Αδαμαντίνωμα-cancrum oris (67)
Ανάπλαση θηλαίας άλω και θηλής μαστού (67-71)	Αμελοβλάστωμα (67)
Υπό- και υπερμελάγχρωση (67, 72-74)	Εγκαύματα (67, 68, 91)
Ανάπλαση οφρύων (67, 69, 75)	Λαγόχειλο και λυκόστομα (67, 86, 92)
Ενδοσκοπική σήμανση όγκων του παχέως εντέρου (67, 76-78)	Εξωδερμική δυσπλασία (67)
Εξωτερική σήμανση ενδοπρόσθεσης (67, 79)	Σήμανση του κυστικού βηματοδότη Brindley (67, 93)
Αιμαγγείωμα (67, 80, 81)	Σήμανση της περιοχής της εκτομής (67)
Υπερτροφικές και ατροφικές ουλές (67, 82-84)	Σκληρόδερμα (67)
Χηλοειδές (67, 82)	Σύνδρομο Seathre-Chotzen (67)
Σύνδρομο Klippel-Trenaunay-Weber (67)	Δερμικά μοσχεύματα (67,94, 95)
Δημιουργία ψευδομαλλιών (67, 85, 86)	Σύνδρομο Sturge-Weber (67)
Διόρθωση ουλών (67, 82-85)	Μοσχεύματα κεφαλής και τραχήλου (67,94)
Αφαίρεση της δερματοστιξίας με penta-monogalloyl-glucose (67)	Σήμανση όγκων του βλεννογόνου (67,96)
Τριχοτιλλομανία (67)	
Μυρμηκιές vulgaris (67, 87)	
Λεύκη (67, 68, 88-90)	
Ξανθελάσματα (67)	

Γ. Πλαστική χειρουργική

Η δερματοστιξία μπορεί να είναι ένα χρήσιμο μέσο για την ολοκλήρωση πολλών χειρουργικών διαδικασιών, όπως της κρανιοπροσωπικής χειρουργικής, των πλαστικών και επανορθωτικών επεμβάσεων και της αποκατάστασης του μαστού (1).

Δ. Ογκολογία

Μεγάλη είναι η συμβολή της δερματοστιξίας στη στόχευση του όγκου κατά την ακτινοθεραπεία. Χρησιμοποιείται για την περιχαράκωση του όγκου με σκοπό να εξασφαλιστεί το ακριβές αποτέλεσμα στη θεραπεία (1). Επίσης, χρησιμεύει και ως δείκτης

εναπομείναντος καρκινικού ιστού μετά από χημειοθεραπεία σε καρκίνο του μαστού (97). Η υπερηχογραφικά κατευθυνόμενη δερματοστιξία είναι μια καινούργια τεχνική που εφαρμόζεται για την προεγχειρητική σήμανση μη ψηλαφητών απεικονιστικά αποκαλυπτόμενων ύποπτων βλαβών του μαστού (98) και για την εντόπιση υποτροπών μετά από θυρεοειδεκτομή λόγω κακοήθειας του θυρεοειδούς αδένου (99). Η υπερηχογραφική δερματοστιξία είναι μια εύκολη, ασφαλής, γρήγορη και ακριβής διαδικασία που βοηθάει τους χειρουργούς να προγραμματίσουν και να σχεδιάσουν μια ανοιχτή βιοψία ή μια επανεπέμβαση (98, 99).

Ε. Ενδοσκοπική δερματοστιξία

Η σήμανση χρωστικής μέσω της διαδικασίας της δερματοστιξίας βοήθησε τη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση σε ενδοκοιλιακά όργανα όπως το γαστρεντερικό σωλήνα (ΓΕΣ). Είναι μια τεχνική κατά την οποία μια συγκεκριμένη θέση του ΓΕΣ σημαδεύεται, εγχύοντας ενδοτοιχωματικά έναν χρωστικό παράγοντα για μελλοντική παρακολούθηση και χειρουργική ενδοσκοπική θεραπεία (1). Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η σήμανση και επανέυρεση μικρής έκτασης ενδοαυλικών αλλοιώσεων όπως πολύποδες, νεοπλάσματα, αρτηριοφλεβώδεις διαμαρτίες, εκκολώματα, καθώς και περιοχές ατροφικής γαστρίτιδας (1, 76-78, 96).

ΣΤ. Δερματοστιξία στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού

Η μόνιμη δερματοστιξία στον κερατοειδή χιτώνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ιατρικούς όσο και για κοσμητικούς λόγους. Παρά την πρόοδο της κερατοπλαστικής, η δερματοστιξία παραμένει μια εναλλακτική λύση σε περιπτώσεις λευκώματος ή λευκοκορίας, όταν υπάρχει αυξημένος κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος (1). Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί τρόπος αντιμετώπισης της λευκοκορίας με τη χρήση κερατοειδικού κρημνού που έχει εμβυθιστεί σε διαθέσιμη, εμπορική μαύρη χρωστική για δερματοστιξία (100). Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από ιριδεκτομή, ή για την αντιμετώπιση ημιδιαφανών ουλών στον κερατοειδή (1).

Ζ. Ο ρόλος της δερματοστιξίας στην ανοσολογική ανταπόκριση DNA εμβολίων

Τις τελευταίες δεκαετίες η παρασκευή DNA εμβολίων αποτελεί μια προσέγγιση με σκοπό την πρόκληση αποτελεσματικότερης και μεγαλύτερης διάρκειας χυμικής και κυτταρικής ανοσοαπόκρισης συγκριτικά με τα παραδοσιακά εμβόλια (101). Το δέρμα έχει αξιοποιηθεί

ως ένας ιδανικός ιστός στόχος για τη χορήγηση των DNA εμβολίων (102). Η ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση στην εφαρμογή του DNA εμβολιασμού στο δέρμα φαίνεται να οφείλεται στην υψηλή πυκνότητα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC) στο όργανο, των κυττάρων Langerhans στην επιδερμίδα και των δενδριτικών κυττάρων στο χόριο (103, 104). Στα πλαίσια της προσπάθειας να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα των DNA εμβολίων μελετήθηκε η ανοσολογική ανταπόκριση ποντικών μετά από ενδοδερμικό εμβολιασμό μέσω δερματοστιξίας, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνικό κλάσμα του HPV. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τρεις δόσεις εμβολίου μέσω δερματοστιξίας οδήγησαν σε τουλάχιστον δεκαέξι φορές υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων στον ορό των πειραματοζώων συγκριτικά με τρεις δόσεις εμβολίων που έγιναν ενδομυϊκά. Πιθανόν η μεγαλύτερη επιφάνεια που καλύπτει ο εμβολιασμός με δερματοστιξία και επομένως ο μεγαλύτερος προκαλούμενος τραυματισμός αποτελούν τους λόγους για μια αποτελεσματικότερη ανοσολογική απόκριση (105). Η υποσχόμενη παρατήρηση της αυξημένης αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού δια της δερματοστιξίας ώθησε πολύ πρόσφατα την ερευνητική προσπάθεια και στην ανάπτυξη ενός ex vivo ανθρώπινου μοντέλου που επιτρέπει τη μέτρηση της προκληθείσας μετά από εμβολιασμό γονιδιακής έκφρασης σε πραγματικό χρόνο. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το μοντέλο αυτό μπορεί να καθορίσει τις βέλτιστες παραμέτρους για την αξιολόγηση του εμβολιασμού δια της δερματοστιξίας στον άνθρωπο σε κλινικές δοκιμές φάσης 1 (106). Απαιτούνται όμως κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους για να αποδειχθεί εάν η εφαρμογή αυτής της τεχνικής θα αποδώσει υψηλή και γρήγορη ανοσολογική απόκριση στον άνθρωπο κάτω υπό κλινικές συνθήκες (105). Επιπλέον, η ενδοδερμική χορήγηση DNA εμβολίων με δερματοστιξία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μαζικούς εμβολιασμούς ρουτίνας βοοειδών ή άλλων θηλαστικών λόγω του χαμηλού κόστους και της ευκολίας της μεθόδου.

Συμπερασματικά, παρά το γεγονός ότι η δερματοστιξία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο εύρος ιατρικών πράξεων, η σχετική βιβλιογραφία είναι ακόμη περιορισμένη. Πολλές περιπτώσεις απλά καταγράφονται, χωρίς να γίνεται κατανοητή η παθοφυσιολογία της δερματοστιξίας και χωρίς να υπάρχει μια συλλογική βάση δεδομένων. Η μη περαιτέρω εξέλιξη των διαφόρων τεχνικών, η καθυστέρηση στην πιστοποίηση των χρωστικών από διεθνή κέντρα αναφοράς, καθώς και η σχετικά περιορισμένη βασική επιστημονική έρευνα, περιορίζουν την ευρύτερη χρήση της δερματοστιξίας ως εναλλακτικής μεθόδου θεραπείας στην ιατρική πράξη. Χρειάζονται περισσότερες ερευνητικές προσπάθειες που τα αποτελέσματά τους να δείξουν την αξία της δερματοστιξίας στην ιατρική (20,107).

1.7 Ανατομία του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί περίπου το 15% του συνολικού σωματικού βάρους ενός ενήλικα (103). Οι λειτουργίες που επιτελεί το δέρμα είναι πολλές και ουσιώδεις. Επιγραμματικά αναφέρονται οι βασικότερες λειτουργίες:

- 1) Λειτουργεί ως προστατευτικός φυσικός φραγμός σε βλαπτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (μικροοργανισμοί, ακτινοβολία, μηχανικά αίτια, ερεθιστικές, καυστικές, αλλεργιογόνες ουσίες κ.λ.π)
- 2) Λειτουργεί ως ανοσοποιητικό όργανο, συμμετέχοντας στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού
- 3) Δρά ως αισθητήριο όργανο, λαμβάνοντας ερεθίσματα από το εξωτερικό περιβάλλον
- 4) Συμμετέχει στη θερμορρύθμιση του οργανισμού
- 5) Διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στην κοινωνική και σεξουαλική ζωή του ατόμου (108)
- 6) Συμμετέχει στην παραγωγή της βιταμίνης D και στις μεταβολικές επεξεργασίες ορισμένων ορμονών από τις οποίες εξαρτώνται τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου(109, 110)

Ανατομικά, το δέρμα αποτελείται από τρία επίπεδα τα οποία, από έξω προς τα μέσα, διακρίνονται στην επιδερμίδα, στο χόριο (ή ιδίως δέρμα) και στον υποδόριο λιπώδη ιστό (ή υποδερμίδα). Η επιδερμίδα συνδέεται με το χόριο μέσω της ζώνης της βασικής μεμβράνης. Το δέρμα διαθέτει εξαρτήματα με ουσιώδεις λειτουργίες όπως οι τρίχες, τα νύχια, οι σμηγματογόνοι και οι ιδρωτοποιοί αδένες, καθώς και αγγεία και νεύρα.

A. Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα έχει πάχος που κυμαίνεται ανάμεσα 0,05-0,5mm ανάλογα με την ανατομική εντόπιση και διακρίνεται σε 4 επάλληλες κυτταρικές στιβάδες, που αντιστοιχούν σε αντίστοιχα μορφολογικά διακριτά επίπεδα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων:

- 1) Βασική στιβάδα Είναι η βαθύτερη από τις στιβάδες της επιδερμίδας και είναι υπεύθυνη για τη συνεχή παραγωγή των κερατινοκυττάρων. Αποτελείται από ένα στείχο κυλινδρικών κυττάρων τα οποία διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο σαν πάσσαλοι ενός φράχτη. Τα κύτταρα αυτά είναι προσκολλημένα στη βασική μεμβράνη και συνδέονται

μεταξύ τους με τονοϊνίδια που σχηματίζουν τα δεσμοσώματα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν προς την επιφάνεια του δέρματος με σκοπό να σχηματίσουν την κεράτινη στιβάδα.

2) Μαλπιγιανή ή ακανθωτή στιβάδα. Βρίσκεται πάνω από τη βασική στιβάδα και αποτελείται από 5-15 στοίχους πολυγωνικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά συνδέονται με μεσοκυττάρια γέφυρες, οι οποίες προσδίδουν σταθερότητα και αντοχή στη επιδερμίδα.

3) Κοκκιώδης στιβάδα. Αποτελείται από 1-3 στοίχους ρομβοειδών κυττάρων, τα οποία περιέχουν κοκκία κερατοϋαλίνης που αποτελούν την πρόδρομη ουσία της κερατίνης.

4) Κεράτινη στιβάδα. Είναι η τελική εξωτερική στιβάδα. Αποτελείται από επιπεδωμένα απύρηντα κεράτινα κύτταρα τα οποία συνενώνονται σταθερά μεταξύ τους με αποτέλεσμα να προσδίδουν στο δέρμα ελαστικότητα, μηχανική αντοχή, ανθεκτικότητα και αδιαπερατότητα.

Στις παλάμες και τα πέλματα μεταξύ της κεράτινης και της κοκκιώδους στιβάδας αναδεικνύεται και μία επιπλέον στιβάδα, η διαυγής στιβάδα (103, 108).

Η φυσιολογική επιδερμίδα αποτελείται από 4 διαφορετικά είδη κυττάρων:

- 1) Τα επιθηλιακά κύτταρα (κερατινοκύτταρα)
- 2) Τα μελανοκύτταρα
- 3) Τα κύτταρα Langerhans
- 4) Τα κύτταρα Merkel

1) Τα επιθηλιακά κύτταρα (κερατινοκύτταρα): Η μορφολογία των κερατινοκυττάρων διαφέρει ανάλογα με το επιδερμικό στρώμα στο οποίο βρίσκονται. Στη βασική στιβάδα είναι κυλινδρικά ή κυβοειδή. Διαθέτουν βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και μεγάλου μεγέθους πυρήνα. Στοιχίζονται κάθετα προς την υποκείμενη βασική μεμβράνη με την οποία συνδέονται μέσω των ημιδεσμοσωμάτων. Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ανέδειξε την παρουσία τονοϊνιδίων στα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας, τα οποία εισέρχονται στις πλάκες πρόσφυσης των δεσμοσωμάτων και συνεισφέρουν στη δημιουργία του κυτταροσκελετού (cytoskeleton) προσδίδοντας μηχανική αντοχή των κερατινοκυττάρων και γενικότερα της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα της μαλπιγιανής στιβάδας είναι μεγαλύτερα (10-15mm), πολυγωνικού σχήματος με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και κυστικό πυρήνα με 1 ή 2 πυρήνια. Δομικά, περιέχουν δεσμίδες τονοϊνιδίων. Στην κοκκώδη στιβάδα τα κερατινοκύτταρα αποπλατώνονται και φέρονται παράλληλα με την επιφάνεια

του δέρματος, έχουν διάμετρο 25 mm και περιέχουν κοκκία κερατοϋαλίνης. Τα κοκκία κερατοϋαλίνης αποτελούνται από πρωτεΐνες πλούσιες σε ιστιδίνη (κυρίως προφίλαγκρίνη και κερατίνη). Τα κερατινοκύτταρα της ανώτερης μαλλιγιανής και κοκκιώδους στιβάδας περιέχουν επίσης τα κερατινοσώματα ή σωμάτια του Odland. Αυτά τα σωμάτια εμπλέκονται στη διαδικασία της απολέπισης και στη δημιουργία ενός λιπιδικού περικυτταρικού μανδύα που εμποδίζει την απώλεια ύδατος. Στην κεράτινη στιβάδα τα κερατινοκύτταρα είναι απύρνηνα, αποπλατυσμένα, ηωσινοφιλικά, αφυδατωμένα, περιέχουν κερατίνη και το μέγεθός τους ανέρχεται στα 30-40mm. Από την επιφάνεια της κερατίνης απολεπίζονται συνεχώς κερατινοκύτταρα. Η ομαλή λειτουργία της απολέπισης συμβάλλει στην ανανέωση της κεράτινης στιβάδας καθώς και στην απομάκρυνση μικροβίων και ουσιών.(103, 111)

2) Τα μελανοκύτταρα: Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία του εμβρύου και βρίσκονται μεταξύ των κυττάρων της βασικής στιβάδας σε μια αναλογία 1 μελανοκύτταρο ανά 4-10 κερατινοκύτταρα. Οι αποφυάδες των μελανοκυττάρων επεκτείνονται σε μεγάλη απόσταση μέσα στην επιδερμίδα και έτσι κάθε μελανοκύτταρο έρχεται σε επαφή με ένα μεγάλο αριθμό κερατινοκυττάρων. Οι κυτταρικές αποφυάδες είναι γεμάτες από μελανοσώματα (κοκκία που περιέχουν μελανίνη προερχόμενη κατά τη διαδικασία της μελανογένεσης) τα οποία φαγοκυτταρώνονται από τα κερατινοκύτταρα, περιβάλλουν τον πυρήνα των κυττάρων αυτών και τα προστατεύουν από την υπερϊώδη ακτινοβολία(103, 111).

3) Τα κύτταρα Langerhans: Τα κύτταρα Langerhans (LC) είναι δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μεσεγγυματικής προέλευσης. Αποτελούν το 3-6% του επιδερμικού πληθυσμού και βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων της ακανθωτής στιβάδας. Τα LC συμμετέχουν στην ανοσολογική λειτουργία και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση αντιγόνων που διαπερνούν την επιδερμίδα και την παρουσίασή τους στα Τ-λεμφοκύτταρα. Δομικά, τα LC έχουν αραιοχρωματικό κυτταρόπλασμα, χωρίς τονοϊνιδία ή μελανοσώματα και ωοειδή ή λοβωτό πυρήνα. Χαρακτηρίζονται από ένα ειδικό κυτταροπλασματικό οργανίδιο, το κοκκίο του Birbeck, το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία της ενδοκύτωσης (103, 111).

4) Τα κύτταρα Merkel: Τα κύτταρα Merkel βρίσκονται στη βασική στιβάδα και ο πληθυσμός τους είναι μικρός. Διακρίνονται εύκολα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λόγω των κυτταροπλασματικών νευροενδοκρινικών κοκκίων. Σχηματίζουν συναπτικές ενώσεις με τις απολήξεις περιφερικών νευρών, εξυπηρετώντας την αισθητική λειτουργία του δέρματος καθώς και ενώσεις δεσμοσωμάτων με τα γειτονικά κερατινοκύτταρα (103).

B. Δερματοεπιδερμικός σύνδεσμος

Η ένωση της επιδερμίδας και του χορίου γίνεται με καταδύσεις της επιδερμίδας στο χόριο και αντίστοιχες αναδύσεις του χορίου. Μια μεμβράνη, η βασική μεμβράνη, διαχωρίζει την επιδερμίδα από το χόριο και αποτελείται από 2 λεπτά πέταλα, διακριτά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: το διαυγές πέταλο (Lamina lucida) το οποίο έρχεται σε επαφή με τη βασική στιβάδα και το πυκνό πέταλο (Lamina densa) το οποίο έρχεται σε επαφή με το χόριο. Ο δερματοεπιδερμικός σύνδεσμος εξασφαλίζει μηχανική υποστήριξη της επιδερμίδας και επιπλέον, λειτουργεί σαν ημιδιαπερατό φίλτρο που ρυθμίζει τη δίοδο ουσιών (103, 111).

Γ. Χόριο

Το χόριο είναι ένας ινώδης ιστός με μεγάλη σταθερότητα και ελαστικότητα, ο οποίος συγκρατεί και υποστηρίζει την επιδερμίδα. Σ' αυτό εντοπίζονται τα εξαρτήματα, τα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία καθώς και τα νεύρα του δέρματος. Αποτελείται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία στην οποία ενσωματώνεται ένας ιστογενετικά μεικτός κυτταρικός πληθυσμός (ιστικά μακροφάγα, δερματικά δενδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες και μαστοκύτταρα.). Αναγνωρίζονται 2 χαρακτηριστικές ζώνες: το θηλώδες και το δικτυωτό χόριο.

1) Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία: Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αντιπροσωπεύει ειδικά διαμορφωμένα δίκτυα κολλαγόνου, ελαστίνης, γλυκοπρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών με ξεχωριστούς δομικούς και λειτουργικούς ρόλους στους ιστούς. Το κολλαγόνο, αποτελεί μια οικογένεια από ινώδεις πρωτεΐνες, που περιλαμβάνει 28 διακριτούς τύπους εκ των οποίων οι τύπου I, III, XII και XIV ανευρίσκονται στο χόριο, παράγονται από τους ινοβλάστες και έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας τους δέρματος. Οι ελαστικές ίνες προσδίδουν ελαστικότητα σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του δέρματος. Αποτελούνται από την ελαστίνη και τα πρωτεϊνικά νημάτια. Η διάταξη των κολλαγόνων και ελαστικών ινών διαφέρει στα δυο διαμερίσματα του χορίου. Συγκεκριμένα, στο θηλώδες χόριο οι κολλαγόνες και ελαστικές ίνες είναι λεπτές και η διάταξή τους τυχαία ενώ στο δικτυωτό χόριο οι δεσμίδες κολλαγόνων ινών είναι πιο πυκνές και οι ελαστικές ίνες παχιές, επιμήκειες και διατάσσονται παράλληλα προς την επιφάνεια του δέρματος (103, 108, 111, 112). Τα ινιδιακά δίκτυα και οι κυτταρικοί πληθυσμοί του χορίου ενσωματώνονται σε μία άμορφη ουσία που δεσμεύει όγκο νερού και παρέχει την κατάλληλη ενυδάτωση του δέρματος. Αποτελείται από διάφορα είδη πρωτεογλυκανών και γλυκοσαμινογλυκανών. Εκτός από τις δομικές λειτουργίες

(υποστήριξη, ακεραιότητα, ελαστικότητα), η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία συμβάλλει και σε κυτταρικές λειτουργίες όπως στην προσκόλληση, στη μετανάστευση, στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, στον καθορισμό του σχήματος των κυττάρων, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση (112).

2) Δενδριτικά κύτταρα (DCs): Το χόριο περιλαμβάνει ένα πυκνό δίκτυο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που το απαρτίζουν: τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα μακροφάγα (Μφ) Τα εν λόγω κύτταρα καθώς και τα μονοκύτταρα (Μο) ανήκουν στο μονοκυτταρικό φαγοκυτταρικό σύστημα. Η παραπάνω ταξινόμηση βασίζεται κυρίως σε φαινοτυπικά, ανατομικά και/ή λειτουργικά χαρακτηριστικά (113-115). Τα DCs εκπροσωπούν έναν ετερογενή πληθυσμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και διαχωρίζονται σε υποπληθυσμούς ανάλογα με την προέλευσή τους, τον εντοπισμό τους στους ιστούς και τη λειτουργία τους. Στον άνθρωπο, όλα τα DCs εκφράζουν υψηλά επίπεδα αναγνωριστικών μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex-MHC) της τάξης II και παράλληλα έλλειψη άλλων τυπικών γενεαλογικών δεικτών όπως του CD3 (T-λεμφοκύτταρα), των CD19/20 (B-λεμφοκύτταρα) και του CD56 (NK-κύτταρα) (113). Διαφέρουν από τα Μφ και τα Μο, λόγω της υψηλής έκφρασης των μορίων MHC τάξης II, της μεταναστευτικής τους ικανότητας καθώς και της ιδιότητας να ενεργοποιούν τα παρθένα (άωρα) T-λεμφοκύτταρα (115). Τα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα, ανάλογα με την κυτταρική σειρά προέλευσης, διακρίνονται στα μυελογενή DCs (mDCs), στα πλασματοκυτταροειδή DCs (pDCs), στα CD14⁺ DCs, στα κύτταρα Langerhans (LCs) και τη μικρογλοία (113). Τα mDCs εκφράζουν μυελικούς δείκτες όπως το CD11c, CD13, CD33 και CD11b και αντιστοιχούν στα CD11c⁺ συντηρητικά δενδριτικά κύτταρα (cDCs) των ποντικών (113). Στους ανθρώπους, τόσο τα Μο όσο και τα mDCs εκφράζουν το CD11c δείκτη αλλά τα τελευταία δεν παρουσιάζουν έκφραση του δείκτη CD14 ή CD16. Τα mDCs διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες: τα CD1c⁺DCs και τα CD141⁺DCs. Τα pDCs δεν εκφράζουν μυελικούς δείκτες και διαχωρίζονται λόγω της έκφρασης του CD123, CD303 και του CD304. Τα CD14⁺ DCs ανευρίσκονται στους ιστούς και στους λεμφαδένες. Μοιάζουν περισσότερο με τα μακροφάγα και πιθανότατα να προέρχονται από τα μονοκύτταρα (moDCs) Τέλος, τα κύτταρα Langerhans (LCs) και η μικρογλοία αφορούν δύο εξειδικευμένους αυτοανανεώσιμους υποπληθυσμούς των DCs που ανευρίσκονται στην επιδερμίδα και στο εγκεφαλικό παρέγχυμα αντίστοιχα (113). Δεδομένου ότι δεν ανευρίσκονται στο χόριο, δε θα υπάρξει περαιτέρω ανάλυση των κυττάρων αυτών. Η λειτουργία των DCs είναι

άρρηκτα συνδεδεμένη με την εντόπισή τους. Σύμφωνα λοιπόν με την θέση που ανευρίσκονται διακρίνονται στα DCs του αίματος, στα ιστικά μη λεμφοειδή μεταναστευτικά DCs, στα λεμφοειδή μόνιμα DCs και στα φλεγμονώδη DCs (113). Το χόριο, σε συνθήκες ομοιόστασης, περιλαμβάνει ιστικά μη λεμφοειδή μεταναστευτικά DCs, τα οποία έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν το αντιγόνο και να μεταναστεύουν μέσω των προσαγωγών λεμφαγγείων στους επιχώριους λεμφαδένες. Τα συγκεκριμένα DCs διαχωρίζονται σε CD14⁺ και σε CD1a⁺ (Εικόνα 1) (115). Τα CD14⁺ δερματικά δενδριτικά κύτταρα (DDC) εκφράζουν το δείκτη CD11c και εμφανίζουν μεταβλητή έκφραση των δεικτών CD1a, CD1c και CD163. Εμφανίζουν ένα μεικτό φαινότυπο δενδριτικών κυττάρων και μακροφάγων. Σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης του δερματικού CD14⁺DC σχετίζεται με τον ιστικό πληθυσμό μακροφάγων που προέρχονται από μονοκύτταρα, αμφισβητώντας έτσι την DC προέλευσή τους. Παρ'όλα αυτά διαφέρουν από τα ιστικά μόνιμα μακροφάγα καθώς τα τελευταία αν και εκφράζουν τον δείκτη CD14 δεν εκφράζουν τον δείκτη CD1c και επιπλέον εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης των δεικτών CD163 και FXIIIa. Λειτουργικά, είναι σχετικά φτωχοί διακινητές του πολλαπλασιασμού των παρθένων T-λεμφοκυττάρων, είναι όμως ικανά να προσλαμβάνουν το αντιγόνο, πιθανώς λόγω της έκφρασης c τύπου λεκτινών (CD206/CD209). Επίσης, έχουν την ικανότητα να προάγουν τα T ρυθμιστικά κύτταρα μέσω της IL 10 (113,115,116). Τα CD1a⁺DCs διακρίνονται στα CD1c⁺ και στα CD141⁺(115). Τα CD1c⁺DCs αποτελούν την πλειοψηφία των mDCs και όπως έχει ήδη αναφερθεί εκφράζουν μυελικούς δείκτες (CD11b, CD11c, CD13, CD33 κα). Είναι εξοπλισμένα με λεκτίνες (CD205, CD206), συνδιεγερτικά μόρια (CD80, CD86) και ανάλογα των toll υποδοχέων (toll-like receptors) με σκοπό την πρόσληψη, μετανάστευση και παρουσίαση των αντιγόνων στα T-λεμφοκύτταρα. Θεωρούνται ισχυροί διεγέρτες των CD4 λεμφοκυττάρων αλλά έχουν ασθενέστερη δράση στα CD8 λεμφοκύτταρα σε σχέση με τα CD141⁺DCs (113). Τα CD141⁺DCs εκφράζουν σε μικρότερο βαθμό τους μυελικούς δείκτες CD11b και CD11c σε σχέση με τα CD1c⁺DCs όπως διαφαίνεται από τα αποτελέσματα μελετών με χρήση της κυτταρομετρία ροής. In vitro προσλαμβάνουν νεκρά κύτταρα και παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα CD8 λεμφοκύτταρα (113).

3) Μακροφάγα (Μφ): Τα μακροφάγα είναι κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην άμυνα έναντι ξενιστού και στη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιοστασίας. Κύρια χαρακτηριστικά των μακροφάγων είναι η πλαστικότητα και η ετερογένεια (117). Τα μακροφάγα διαχωρίζονται σε υποπληθυσμούς

με βάση την ανατομική τους θέση και τον λειτουργικό τους φαινότυπο. Διακρίνονται στα φλεγμονώδη και στα ιστικά μακροφάγα (115). Για τη διάκριση αυτή αξιοποιούνται διαφορές στην έκφραση επιφανειακών δεικτών καθώς και στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης μετά από διέγερση με κυτοκίνες ή μικροβιακούς παράγοντες (117,118). Τα φλεγμονώδη μακροφάγα, συγκεντρώνονται στους ιστούς σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Διακρίνονται στα κλασικά ενεργοποιημένα (M1 μακροφάγα) και στα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M2 μακροφάγα) με την αντίστοιχη ενεργοποίηση στη μία ή στην άλλη κατεύθυνση να καθορίζεται αναλόγως με τα περιβαλλοντικά – ιστικά ερεθίσματα (115, 117, 119, 120). Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση των M1 μακροφάγων επάγεται από ενδοκυττάρια παθογόνα, από συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, από λιποπρωτεΐνες (LPS) και κυτταροκίνες (IFN- γ) με σκοπό την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) και προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL23, IL12, IFN- γ , TNF- α) καθώς και την επαγωγή φλεγμονώδους απάντησης. Η ενεργοποίηση των M2 μακροφάγων επάγεται από μυκητιακά κύτταρα, παράσιτα, ανοσοσυμπλέγματα, αποπτωτικά κύτταρα, διεγερτικό παράγοντα των μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor- MCSF), IL-4, IL-10, IL-13 κ.α. Έχουν μεγάλη φαγοκυτταρική ικανότητα και εκκρίνουν αγγειογεννητικούς και χημειοτακτικούς παράγοντες καθώς και ιντερλευκίνες. Όσον αφορά στις λειτουργίες τους, εκτός από την άμυνα έναντι των παθογόνων, τα M2 μακροφάγα απομακρύνουν τα αποπτωτικά κύτταρα, μετριάζουν τη φλεγμονώδη ανταπόκριση και προωθούν την επούλωση. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία ορίζονται ως αντιφλεγμονώδη, επουλωτικά και ρυθμιστικά μακροφάγα (117, 119, 120). Τα ανθρώπινα μακροφάγα δεν είναι ακόμη πλήρως χαρακτηρισμένα. Με την κυτταρομετρία ροής, τα M1 μακροφάγα βρέθηκε να έχουν υψηλή έκφραση των δεικτών CD80, CD86, CD64, TLR4 (CD80^{high}, CD86^{high}, CD64^{high}, TLR4^{high}) και χαμηλή έκφραση του δείκτη CD163 (CD163^{low}). Η έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (CD80, CD86) για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, καθώς και η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών υποδεικνύουν την ικανότητα των M1 μακροφάγων έναντι της μικροβιακής/ ενδοτοξικής πρόκλησης (117, 119). Τα εναλλακτικώς ενεργοποιημένα μακροφάγα (M2) έχουν μία πιο ετερογενή πόλωση και διακρίνονται σε τρεις υποπληθυσμούς: M2a, M2b και M2c. Τα M2a μακροφάγα είναι υπεύθυνα για την επούλωση και ενεργοποιούνται κατόπιν έκκρισης της IL-4 και της IL-13, οι οποίες παράγονται κατά τον ιστικό τραυματισμό. Φαινοτυπικά, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των δεικτών CD86, CD200R (CD86^{high}, CD200R^{high}) και χαμηλή των δεικτών CD14, CD163, TLR4

(CD14^{low}, CD163^{low}, TLR4^{low}). Επίσης, παράγουν υψηλές ποσότητες IL-10 η οποία αποτελεί αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη, σημαντική στον περιορισμό της φλεγμονής που προκαλείται από ιστικό τραυματισμό. Η θετική έκφραση του CD86 επάγει την Th2 κυτταρική διαφοροποίηση. Τα M2b και M2c μακροφάγα έχουν ρυθμιστικό ρόλο και εμπλέκονται στην οριοθέτηση της φλεγμονώδους αντίδρασης και στον περιορισμό της ανοσολογικής απόκρισης. Τα M2b μακροφάγα ενεργοποιούνται κατόπιν έκκρισης LPS ή IL1β και παράγουν IL-6 και IL-10. Φαινοτυπικά χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των δεικτών CD14, CD80 (CD14^{high}, CD80^{high}) και χαμηλή του δείκτη CD200R (CD200R^{low}). Επίσης, χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση του HLA-DR που συνάδει με την ελάττωση της ανοσολογικής απόκρισης. Τα M2c μακροφάγα διαφοροποιούνται από μια χαμηλή έκφραση του CD86 και του HLA-DR και μια υψηλή έκφραση του CD163. Ο δείκτης CD163 εμπλέκεται στον περιορισμό της ιστικής φλεγμονής μέσω της καταστροφής συμπλεγμάτων αιμοσφαιρίνης/απτοσφαιρίνης και της αναστολής της T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Συνεπώς, η υψηλή έκφραση του CD163 υποδεικνύει το ρόλο των M2c μακροφάγων στον περιορισμό της ιστικής φλεγμονής. Όπως τα M2a μακροφάγα, τα M2c μακροφάγα επάγουν την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων IL-10 και όχι της IL-4 η οποία χαρακτηρίζει τα M2a μακροφάγα (119, 120). Η δεύτερη ομάδα των μακροφάγων περιλαμβάνει τα ιστικά μακροφάγα. Σε αντίθεση με τα μονοκύτταρα και τα DCs παραμένουν στους ιστούς επί μακρόν και είναι εξειδικευμένα στο να προσλαμβάνουν και να επεξεργάζονται νεκρά κύτταρα και κυτταρικά αποτρίμματα, να προάγουν την επούλωση και τη λύση της φλεγμονής συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην ιστική ομοίωση. Έχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπαγρύπνηση δρώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, κατέχοντας υψηλή πρωτεολυτική ικανότητα, εκκρίνοντας κυτταροκίνες (IL-6, TNF-α), χυμοκίνες (CCL2, CXCL1, MIF), και προσελκύοντας φλεγμονώδη λευκοκύτταρα και μονοκύτταρα, ως απάντηση στη φλεγμονώδη διεργασία (115, 118, 121). Ανάλογα με την ιστική τους εντόπιση χαρακτηρίζονται ως μακροφάγα των πνευμονικών κυψελίδων, κύτταρα Kupffer του ήπατος, ιστιοκύτταρα του συνδετικού ιστού, μικρογλοιακά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος, μακροφάγα των σπληνικών κόλπων, οστεοκλάστες του οστίτη ιστού, κύτταρα Langerhans στην επιδερμίδα και ιστικά μακροφάγα στο χόριο του δέρματος (Εικόνα 2) (118). Φαινοτυπικά τα ιστικά μακροφάγα του χορίου του δέρματος ποντικών έχουν θετική έκφραση των δεικτών δεικτών F4/80, CD11b, CD11c, CD206, MHCII, CD169, Dectin-1, CD301, Dectin-2 (F4/80⁺, CD11b, CD11c^{low}, CD206, MHCII^{low},

CD169, Dectin-1, CD301, Dectin-2) (121). Όσο αφορά τα ανθρώπινα ιστικά μακροφάγα, τα δεδομένα προς το παρόν είναι περιορισμένα. Ο ακριβής φαινότυπός τους, η μεταγραφική και επιγενετική ρύθμιση καθώς και η λειτουργία τους κατά τη διάρκεια της σταθερής κατάστασης παραμένει αδιευκρίνιστη. Η απουσία συγκεκριμένων επιφανειακών δεικτών που θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τα ιστικά μακροφάγα από τα μακροφάγα που προέρχονται από τα μονοκύτταρα συνεισφέρει στους περιορισμούς αυτούς (122). Στους ανθρώπους, οι δείκτες μακροφάγων που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: ο Csf1 υποδοχέας CD115, ο FcγRI CD64, ο FcγRIII CD16 και οι υποδοχείς σάρωσης CD68 και CD163 (123, 124).





Η ακριβής προέλευση των ιστικών μακροφάγων είναι αμφιλεγόμενη και δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αν προέρχονται από μονοκύτταρα ή είναι τοπικά στους ιστούς αυτοανανεούμενοι κυτταρικοί πληθυσμοί. Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια εισηγούνται ότι η πλειονότητα των ιστικών μακροφάγων του δέρματος προέρχεται από το λεκιθικό σάκο κατά τη διάρκεια της εμβρυογέννησης και αυτοανανεώνονται καθώς και από μια ομάδα κυττάρων που αναπτύσσεται μετά τη γέννηση από τα μονοκύτταρα κυρίως σε καταστάσεις φλεγμονής και αφορούν συγκεκριμένους ιστούς όπως του εντερου, της καρδιάς και του δέρματος (114, 115, 121, 122). Αναφορικά με την κατηγοριοποίηση των μακροφάγων σε M1 και M2, τα ιστικά μακροφάγα θεωρείται ότι προσομοιάζουν στα M2 μακροφάγα και έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και στη λύση της φλεγμονής. Διεγείρονται από κοινούς μεσολαβητές των M2 μακροφάγων (MCSF, IL-4, IL-13, TGF-β) και εμφανίζουν λειτουργικές και φαινοτυπικές ομοιότητες με τα M2 μακροφάγα (121).

4) Μαστοκύτταρα: Τα μαστοκύτταρα είναι δυναμικά κύτταρα και έχουν σημαντικό ρόλο στην φυσική και επίκτητη ανοσία, στις αλλεργικές αντιδράσεις καθώς και σε άλλες φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Προέρχονται από το μυελό των οστών και διαφοροποιούνται στους περιφερικούς ιστούς. Ωριμάζουν υπό την επίδραση κυτταροκινών, όπως του παράγοντα των βλαστοκυττάρων (stem cell factor- SCF) και της IL-3, που παράγεται από T- βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Σε συνθήκες ομοιόστασης, ανευρίσκονται κυρίως πέριξ των αγγείων και των εξαρτημάτων αλλά και διάσπαρτα στο χοριοεπιδερμικό σύνδεσμο και στο χόριο. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό ή ωοειδές (σε άθικτο δέρμα) και περιέχουν μεταχρωματικά κοκκία. Αναφέρονται τρεις τύποι βιολογικών απαντήσεων των μαστοκυττάρων: i) αποκοκκίωση, ii) σύνθεση και έκκριση λιπιδικών διαμεσολαβητών (προσταγλανδίνη D2, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων- PAF, λευκοτριένια - LTC4, LTD4 και LTE4) και iii) σύνθεση και έκκριση κυτταροκινών (IL-33, TNF-alpha,

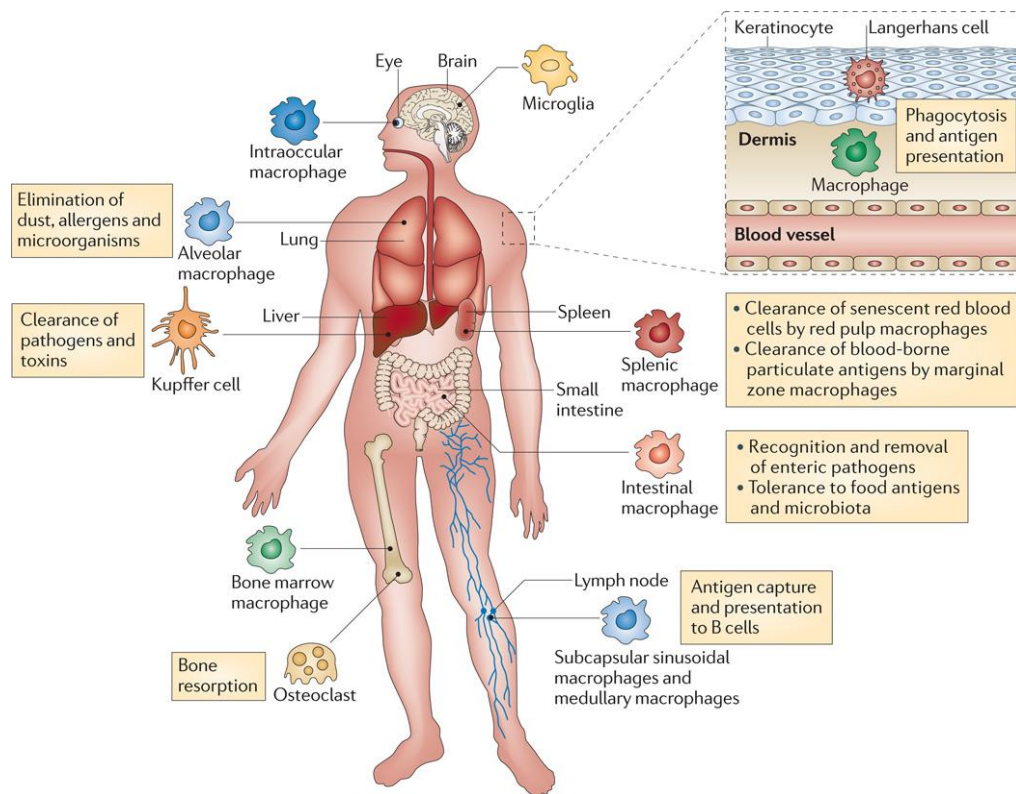
IL-6, IL-5, IL-4, IL-1, IL13) και χυμοκινών (MIP-1alpha, MIP-1beta κ.α.) (125, 126). Πρόσφατες μελέτες με κυτταρομετρία ροής εισηγούνται ότι τα φυσιολογικά ανθρώπινα μαστοκύτταρα έχουν έναν μυελοειδή ανοσοφαινότυπο που χαρακτηρίζεται από CD117⁺, CD33⁺ επιφανειακούς δείκτες (127).

5) Ινοβλάστες: Οι ινοβλάστες αποτελούν τα κύρια κυτταρικά συστατικά του συνδετικού ιστού και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του δέρματος. Χαρακτηρίζονται από πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες όπως σύνθεση και έκκριση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας καθώς και παραγωγή βιοενεργών παραγόντων (πχ αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, χυμοκίνες), συνεισφέροντας έτσι στην ανοσορρύθμιση και στην επούλωση των τραυμάτων. Επιπλέον οι ινοβλάστες αλληλεπιδρούν με γειτονικούς ιστούς και κυτταρικούς πληθυσμούς μέσω της αυτοκρινούς και παρακρινούς κυτταρικής επικοινωνίας συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του μικροπεριβάλλοντος (128, 129). Εμβρυολογικά, είναι μεσεγχυματικής προέλευσης με υψηλό πολλαπλασιαστικό και μεταναστευτικό δυναμικό αλλά περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης. Μορφολογικά, είναι ατρακτόμορφα κύτταρα (128). Οι δερματικοί ινοβλάστες αντιπροσωπεύουν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος καθορίζεται βάσει της ανατομικής εντόπισής τους στο χόριο. Διακρίνονται τρεις τύποι δερματικών ινοβλαστών: οι ινοβλάστες που ανευρίσκονται στο θηλώδες χόριο, στο δικτυωτό χόριο και στους τριχοθύλακες. Οι ινοβλάστες που καλλιεργούνται από κάθε ένα από αυτά τα στρώματα έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οι ινοβλάστες του θηλώδους χορίου απομονώνονται γρηγορότερα σε σχέση με τους ινοβλάστες του δικτυωτού χορίου. Οι δεσμίδες κολλαγόνου τύπου I που προέρχονται από τους ινοβλάστες του δικτυωτού χορίου, συρρικνώνονται ταχύτερα σε σχέση με αυτές που προέρχονται από τους ινοβλάστες του θηλώδους χορίου. Η οργάνωση των δεσμίδων κολλαγόνου και ο τύπος του κολλαγόνου διαφέρουν ανάλογα με την ανατομική θέση του χορίου. Πιο συγκεκριμένα, το θηλώδες χόριο χαρακτηρίζεται από λεπτές, ατελώς οργανωμένες δεσμίδες κολλαγόνου τύπου I και τύπου III σε αντίθεση με τις παχιές, καλά διαμορφωμένες ινιακές δέσμες του δικτυωτού χορίου. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ιστούς από φυσιολογικό δέρμα, υποδεικνύουν διαφορές σε ότι αφορά τη σύσταση της εναπόθεσης πρωτεογλυκανών ανάμεσα στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο. Η πρωτεογλυκάνη ντεκορίνη είναι διάχυτη στο θηλώδες χόριο ενώ στο δικτυωτό βρίσκεται διάσπαρτη μεταξύ των δεσμίδων κολλαγόνου. Αντίθετα, η πρωτεογλυκάνη βερσικάνη εκφράζεται πιο έντονα στις ελαστικές ίνες του δικτυωτού χορίου. Οι μη ινιδικοί τύποι

κολλαγόνου XII και XVI, μαζί με τη γλυκοπρωτεΐνη τεναςκίνη-C, απαντούν χαρακτηριστικά στο θηλώδες χόριο ενώ το κολλαγόνο τύπου IV και η τεναςκίνη-X περιορίζονται κυρίως στο δικτυωτό χόριο (129). Ανοσοφαινοτυπικά οι ινοβλάστες εκφράζουν μεσεγχυματικούς επιφανειακούς δείκτες (CD44, CD73, CD90, CD105), ινοβλαστικούς δείκτες [κολλαγόνο τύπου I, HSP47(πρωτεΐνη θερμικού shock47), βιμεντίνη, FSP (πρωτεΐνη επιφάνειας ινοβλαστών), αSMA (α ακτίνη λείων μυικών ινών)] ενώ δεν εκφράζουν ενδοθηλιακούς (CD31) και αιμοποιητικούς δείκτες (CD14, CD34, CD45). Η βιμεντίνη χρησιμοποιείται ως δείκτης μεσεγχυματικής προέλευσης. Η έκφραση της βιμεντίνης αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς και αξιόπιστους δείκτες για την ανίχνευση των ινοβλαστών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ινοβλάστες αναγνωρίζονται από το ατρακτόμορφο σχήμα τους και επιβεβαιώνονται με τη θετική χρώση του δείκτη βιμεντίνη και την απουσία χρώσης για επιθηλιακά ή άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως μυϊκά κύτταρα, αστροκύτταρα ή αιμοποιητικά κύτταρα (128, 130, 131).

	Langerhans cells	CD14 DDC	CD1a DDC	
			CD1c DC 	CD141 DC 
CD11c	+	+	+	low
CD1a	+	low/variable	+	+
CD1c	+	low/variable	+	low/int
CD14	-	+	-	-
CD163	-	variable	-	-
CD141	-	variable	-	+
Langerin	+	-	-	-
CD209	-	+	-	-
CD80	high	low	high	high
CD86	high	intermediate	high	high
Other characteristics	Birbeck granules	CX3CR1		CLEC9A XCR1

Εικόνα 1: Δενδριτικά κύτταρα στο ανθρώπινο δέρμα σε συνθήκες ομοιόστασης. Υποδεικνύονται τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των υποπληθυσμών.



Εικόνα 2: Τα ιστικά μακροφάγα εκτελούν σημαντικές ομοιοστατικές λειτουργίες. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα ωριμάζουν από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Οι πρόδρομες μορφές απελευθερώνονται στην κυκλοφορία ως μονοκύτταρα και μεταναστεύουν γρήγορα σε σχεδόν όλους τους ιστούς του σώματος, όπου διαφοροποιούνται σε ώριμα μακροφάγα. Διάφοροι πληθυσμοί ώριμων ιστικών μακροφάγων βρίσκονται σε λειτουργικά στρατηγικά σημεία σε όλα τα όργανα όπου διαμεσολαβούν σημαντικές δραστηριότητες ανοσολογικής παρακολούθησης, όπως φαγοκυττάρωση, αντιγονοπαρουσίαση και ανοσοτροποποίηση.

Δ. Υποδόριος ιστός

Ο υποδόριος ιστός είναι ένας συνεκτικός ιστός και αποτελείται από κύτταρα, τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί με σκοπό να αποθηκεύουν λίπος (λιποκύτταρα). Το φύλο, η θρέψη, η κληρονομικότητα καθορίζουν το πάχος αυτής της στιβάδας στις διάφορες ανατομικές περιοχές. Στον υποδόριο ιστό επεκτείνονται συνήθως διάφορα εξαρτήματα του δέρματος όπως τα κατώτερα τμήματα τριχοθυλάκων του τριχωτού της κεφαλής καθώς και μερικοί αποκρινείς και εκκρινείς αδένες. Περιέχει τα κύρια αιμοφόρα αγγεία και νεύρα του δέρματος και συμβάλλει στη δημιουργία των αγγειακών πλεγμάτων. Λειτουργεί ως θερμομονωτική στιβάδα, ως χώρος αποθήκευσης θρεπτικών ουσιών καθώς και ως προστατευτικός μηχανισμός από μηχανικούς τραυματισμούς (103, 108).

Ε. Αγγείωση του δέρματος

Η επιδερμίδα στερείται αγγείωσης ενώ οι άλλες 2 στιβάδες (χόριο και υποδόριος ιστός) έχουν ένα πλούσιο αγγειακό δίκτυο. Το δίκτυο αυτό προέρχεται από τα υποκείμενα αγγεία των μυών και δημιουργεί δυο οριζόντια αγγειακά πλέγματα. Το εν τω βάθει αγγειακό πλέγμα του δέρματος εντοπίζεται στο όριο του δικτυωτού χορίου με τον υποδόριο ιστό, τροφοδοτεί με κατακόρυφους κλάδους το επιφανειακό δίκτυο και παρέχει άμεσα αγγείωση με ανεξάρτητους κλάδους στους ιδρωτοποιούς αδένες και στους τριχοθύλακες. Το επιφανειακό αγγειακό πλέγμα βρίσκεται στη συμβολή του δικτυωτού χορίου με το θηλώδες χόριο. Στο πλέγμα αυτό, τα αρτηριόλια σχηματίζουν παράπλευρες αγγειακές αγκύλες προς το επιπολής χόριο τροφοδοτώντας με αίμα τις θηλές του χορίου πριν μεταπέσουν στα μετατριχοειδή φλεβίδια. Σε μερικές περιοχές (δάκτυλα, αυτιά, μύτη, νύχια) μπορεί να υπάρξει απευθείας ροή από τα αρτηριόλια στα φλεβίδια μέσω ειδικών αρτηριοφλεβωδών αναστομών που λειτουργούν ως σφιγκτήρες (σπειροειδή σωμάτια του Masson). Η τριχοειδική κυκλοφορία μπορεί να παρακάμψει το δέρμα, όταν οι σφιγκτήρες είναι ανοικτοί. Η οδός αυτή παίζει σπουδαίο ρόλο στη θερμορρύθμιση (103, 108).

ΣΤ. Νεύρωση του δέρματος

Το δέρμα έχει μια σύνθετη και πλούσια νεύρωση η οποία αποτελείται από ένα προσαγωγό και ένα απαγωγό σκέλος. Το προσαγωγό σκέλος (κεντρομόλος νεύρωση) είναι υπεύθυνο για την αντίληψη των αλλαγών που γίνονται στο εξωτερικό περιβάλλον (αφή, πίεση, πόνος, κνησμός, θερμότητα). Αυτή η λειτουργία επιτυγχάνεται μέσω ενός δικτύου αισθητικών εμμέλων ή αμύλων νευρικών ινών, από άφθονες ελεύθερες νευρικές απολήξεις και από εξειδικευμένα τελικά σωμάτια (Meissner, Pacini, Golgi-Mazzoni, Ruffini, Krause). Το απαγωγό σκέλος (φυγόκεντρος νεύρωση) αποτελείται από τις αμύελες ίνες του συμπαθητικού αυτόνομου νευρικού συστήματος και νευρώνει τα δερματικά εξαρτήματα και την αιματική αγγειακή ροή (103, 108, 111).

1.8 Το δέρμα ως ανοσοποιητικό όργανο

Το δέρμα αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό άμυνας του ανθρώπινου σώματος ενάντια σε εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. Η αμυντική αυτή λειτουργία επιτυγχάνεται μέσω μη ειδικών φυσικών και χημικών φραγμών. Επιγραμματικά, οι αντίστοιχοι 'φραγμοί είναι:

- 1) Η διαρκής ανανέωση της κεράτινης στιβάδας που επιτυγχάνεται από το συνεχή πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων.
- 2) Το όξινο pH της επιδερμίδας ($\text{pH} < 7$), το οποίο οφείλεται κυρίως στο γαλακτικό οξύ που εκκρίνεται από τον ιδρώτα και εμποδίζει τη βακτηριακή ανάπτυξη.
- 3) Η φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα της επιδερμίδας παρεμποδίζει την ανάπτυξη ενός νέου μικροβιακού πληθυσμού.
- 4) Ο ιδρώτας και τα δάκρυα απομακρύνουν με μηχανικό τρόπο τους μικροοργανισμούς.
- 5) Το σμήγμα από τους θύλακες των τριχών και τους σμηγματογόνους αδένες περιέχει γαλακτικό οξύ και λιπαρά οξέα και έχει αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση (108).

Το δέρμα εκτός από τις παραπάνω προστατευτικές φυσικές του ιδιότητες παράγει μια σειρά ουσιών-μεσολαβητών, οι οποίες είτε προκαλούν την έναρξη είτε συνοδεύουν γενικότερες αμυντικού τύπου ανοσολογικές απαντήσεις. Το λεγόμενο ανοσοποιητικό σύστημα του δέρματος (ΑΣΔ) αποτελεί μια οργανική μονάδα ενός πολύπλοκου δικτύου, που είναι υπεύθυνο για μια σειρά από προστατευτικές και συγχρόνως καθοριστικές λειτουργίες για τον οργανισμό. Στο ΑΣΔ, πέρα από την ανατομική αρχιτεκτονική του δέρματος που συνίσταται από την επιδερμίδα και το χόριο, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλα δύο κύρια μέρη, το στατικό και το δυναμικό (132). Το στατικό μέρος αποτελείται από εκείνα τα κύτταρα τα οποία αφενός μεν συνεισφέρουν στην ανατομική δομή (επιδερμίδα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες) αφετέρου δημιουργούν το πεδίο όπου πραγματοποιούνται οι ανοσολογικές αντιδράσεις μέσω της παραγωγής χημειοκινών, κυτταροκινών και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη και ανοσολογική απάντηση. Από την άλλη μεριά, η δυναμική μονάδα του ΑΣΔ αποτελείται από τα T-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα ιστικά μακροφάγα, τα κύτταρα Langerhans, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα (132, 133). Στη συνέχεια η έννοια του ΑΣΔ διευρύνθηκε με την προσθήκη των χυμικών παράγοντων της ανοσολογικής απάντησης (133).

Πίνακας 4: Κυτταρικοί και χυμικοί παράγοντες του Ανοσοποιητικού Συστήματος του Δέρματος.

Cellular constituents	Humoral constituents
Keratinocytes	β -defensins, cathelicidins
Langerhans cells	Complement and its regulatory proteins
Mature tissue dendritic cells	Mannose binding lectins
Monocytes/macrophages	Immunoglobulins
Granulocytes	Cytokines, chemokines
Mast cells	Neuropeptides
Vascular and lymphatic endothelial cells	Eicosanoids and prostaglandins
T lymphocytes and their subpopulations	Free radicals

1.9 Παθοφυσιολογία της δερματοστιξίας

Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας της δερματοστιξίας συνίσταται κυρίως στην κατανόηση των μηχανισμών διασποράς στους ιστούς, χρόνιας αποθήκευσης και αποδόμησης των χρωστικών ουσιών που στα στα πλαίσια της δερματοστιξίας αποτίθενται στους ιστούς. Επιπλέον η δερματοστιξία είναι μια διαδικασία που η εφαρμογή της επιφέρει λύση της συνέχειας του δέρματος και ως εκ τούτου την ενεργοποίηση μηχανισμών ιστικής επούλωσης αλλά δυνητικά επίσης και ανοσολογικής αντίδρασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανοσολογική απάντηση μέσω του δέρματος ενεργοποιείται από ένα ευρύ φάσμα ερεθισμάτων όπως διαταραχές της λειτουργίας του φυσιολογικού φραγμού, από τη δράση της υπερϊώδους ακτινοβολίας, τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου και την επαφή με νοσογόνα αίτια (βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, ιούς) (132). Για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της δερματοστιξίας έχουν αξιοποιηθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα. Όπως είναι αναμενόμενο, ένα από τα όργανα που έχει επικεντρωθεί η σχετική έρευνα είναι το δέρμα λόγω και της ευρείας χρήσης της δερματοστιξίας με την στενή έννοια του όρου κυρίως για κόσμηση αλλά και δευτερευόντως για θεραπευτικούς σκοπούς στη δερματολογία.

Μια από τις πρώτες μελέτες που εστίασε στην ιστική απάντηση του δέρματος στις χρωστικές της δερματοστιξίας είναι αυτή των Mann και Klingmuller. Συγκεκριμένα οι ερευνητές μελέτησαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και σε χρονικό διάστημα 27 ημερών την ιστοπαθολογική αντίδραση που προκαλεί η χρωστική ουσία στο δέρμα κονίκλων.

Διέκριναν δύο φάσεις: α) την οξεία λευκοκυτταρική και β) την ιστοκυτταρική-μακροφαγική. Οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι κατά την πρώτη φάση, η οποία διήρκησε περίπου 6 ημέρες, η χρωστική παρέμενε είτε στο 'κανάλι' που δημιουργήθηκε κατά μήκος της έγχυσης, είτε ανάμεσα σε ίνες κολλαγόνου. Κατά τη δεύτερη φάση (μετά την 6^η ημέρα), η χρωστική φαγοκυτταρώθηκε αρχικά μόνο από τα μονοκύτταρα μακροφάγα, ενώ από τη 10^η περίπου ημέρα συμμετείχαν στη φαγοκυττάρωση και οι ινοβλάστες (134).

Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία, οι Lea και Pawlowski (1987) μελέτησαν δείγματα ιστών ανθρώπινου δέρματος, στα οποία είχε προηγηθεί δερματοστιξία σε χρονικό διάστημα 1 ημέρας έως και 40 έτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταβολές στο δέρμα ακολουθούν 3 στάδια: α) αρχικά τη φλεγμονώδη αντίδραση με εστιακή ιστική νέκρωση, β) την επαναδημιουργία της βασικής μεμβράνης και γ) την αποκατάσταση φυσιολογικής επιδερμίδας και χορίου. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, κατά την οξεία φάση της φλεγμονώδους αντίδρασης, τα κερατινοκύτταρα καθώς και τα μακροφάγα συμμετείχαν στην προσωρινή αποθήκευση της χρωστικής, σε αντίθεση με τους ινοβλάστες που αποτελούσαν το μοναδικό χώρο ανεύρεσής της, μετά την επαναφορά του δέρματος στη φυσιολογική του δομή (135).

Το 1988, ο Fujita και συν. παρουσίασαν μελέτη τους σε ποντίκια με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών πρόσληψης και μακροπρόθεσμης αποθήκευσης της σινικής μελάνης στον ιστό. Μετά την έγχυση της χρωστικής τεκμηρίωσαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1-3 ημέρες, 1-3 εβδομάδες και 1-9 μήνες) με γυμνό οφθαλμό, με οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την κατανομή και την εναπόθεση της χρωστικής στο χόριο και τον υποδόριο ιστό του ωτός και της ραχιαίας επιφάνειας των ποντικίων. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους, το μέγεθος και σχήμα της δερματοστιξίας διατηρήθηκαν αναλλοίωτα στο χρονικό διάστημα των 9 μηνών σε επίπεδο παρατήρησης με γυμνό οφθαλμό. Με τη βοήθεια του οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου οι μελετητές διαπίστωσαν αρχικά (1^η – 3^η ημέρα από την εφαρμογή δερματοστιξίας) την παρουσία σινικής μελάνης μεταξύ των ινών κολλαγόνου (136). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι παρόμοιες με τα αποτελέσματα της μελέτης του Mann και Klingmuller (134). Αντίθετα, δεν αναγνωρίστηκε φλεγμονώδης αντίδραση όπως είχε διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες (134, 135) οδηγώντας τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι η αποθήκευση της χρωστικής στους ινοβλάστες και στα μακροφάγα αποτελεί έναν ειδικό μη φλεγμονώδη μηχανισμό έναντι ξένων μη τοξικών ουσιών. Μια σημαντική παρατήρηση της μελέτης των Fujita και συν. αφορά στο διαφορετικό τρόπο ενδοκυττάρωσης των μακροφάγων και των ινοβλαστών.

Αναλυτικότερα, κατά τους συγγραφείς, τα μακροφάγα προσλαμβάνουν τη μελάνη στο κυτταρόπλασμά τους τόσο με τη φαγοκυττάρωση όσο και με την πινοκύτωση, ενώ οι ινοβλάστες μόνο με πινοκύτωση. Άλλη σημαντική παρατήρηση των ιδίων ερευνητών, είναι η δημιουργία κενотоπίων στους ινοβλάστες από τη σύντηξη ενδοκυτταρικών κυστιδίων, 1-9 μήνες μετά την έγχυση, τα οποία περιέχουν πολυάριθμα σωματίδια χρωστικής. Στην προσπάθεια τους να ερμηνεύσουν το λόγο για το οποίο η δερματοστιξία δε μεταβάλλεται, διατύπωσαν την υπόθεση ότι οι ινοβλάστες που περιέχουν αυτά τα κενотоπία έχουν χαμηλό ρυθμό αποδόμησης και ανακύκλωσης (turnover) και ότι μέσω της μίτωσης, οι ενδοκυτταριώς αποθηκευμένες ουσίες μπορεί να μεταφέρονται σε θυγατρικά κύτταρα ινοβλαστών τα οποία ουσιαστικά παραμένουν ακίνητα (136).

Ο Sperry περιέγραψε το 1992 τις αλλοιώσεις τόσο των πρόσφατων όσο και των επουλωμένων περιοχών δερματοστιξίας σε ιστικά δείγματα δέρματος ανθρώπων τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά. Μακροσκοπικά, κατά τη διαδικασία της δερματοστιξίας, στην περιοχή της έγχυσης παρατηρήθηκε ιστική αντίδραση με την εμφάνιση ερυθρότητας, θερμότητας και σκληρίας. Η απολέπιση του δέρματος τις επόμενες 2-4 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της χρωστικής από την επιδερμίδα και την παραμονή της μόνο στη βασική μεμβράνη και το χόριο. Το ερύθημα και η σκληρία διαρκούσαν περίπου 5-7 ημέρες με σταδιακή υποχώρηση. Η ίαση επήλθε περί την 7^η-10^η ημέρα και για την πλήρη αναγέννηση της επιδερμίδας εκτιμήθηκε ότι χρειαζόταν περίπου 2 εβδομάδες. Ο Sperry παρατήρησε ότι με την πάροδο του χρόνου το χρώμα εξασθενούσε και το περίγραμμα γίνονταν όλο και πιο ασαφές (137). Το εύρημα αυτό είναι σε αντίθεση, με τη μελέτη του Fujita που κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η δερματοστιξία παραμένει μακροσκοπικά αμετάβλητη για ένα αρκετά μακρύτερο σχετικά χρονικό διάστημα (136). Για την ερμηνεία αυτής της παρατήρησης, ο Sperry στηρίχθηκε στην ικανότητα των μακροφάγων να μεταφέρουν τη χρωστική σε περιφερειακά λεμφαγγεία και στη συνέχεια σε σύστοιχους λεμφαδένες, απομακρύνοντάς την κατ' αυτό τον τρόπο από το χόριο, καθώς επίσης και στην ιδιότητά τους να μετακινούνται διανύοντας μικρές αποστάσεις με αποτέλεσμα τη διάχυση της χρωστικής και τη δημιουργία ασαφών ορίων. Μικροσκοπικά, ο Sperry παρατήρησε οίδημα με μικρή ή σχεδόν μηδενική συμμετοχή οξείας λευκοκυτταρικής αντίδρασης, λόγω των σχετικά αδρανών ουσιών που περιέχει η χρωστική (137). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη μελέτη των Fujita και συν. (136). Σχετικά με την κατανομή και αποθήκευση της χρωστικής, ο Sperry υποστήριξε ότι αυτή ανευρίσκονταν αρχικά εξωκυττάρια στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο σε ακανόνιστες

συσσωρεύσεις και ότι ένα μικρό ποσοστό αυτής απομακρύνονταν από την επιδερμίδα μέσω απολέπισης. Επίσης, διαπίστωσε ότι καθώς η διαδικασία επούλωσης βρισκόταν σε εξέλιξη, τα μακροφάγα συσσωρεύουν τη χρωστική μεταφέροντας την σε περιαγγειακές περιοχές. Στη συνέχεια η χρωστική είτε παρέμενε περιαγγειακά δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο τη μόνιμη, ορατή δερματοστιξία, είτε μεταφέρονταν μέσω των μακροφάγων σε σύστοιχους λεμφαδένες (137). Σε αντίθεση με τους προηγούμενους συγγραφείς (134-136) ο Sperry δεν αναφέρει τους ινοβλάστες ως κύτταρα αποθήκευσης χρωστικών στα πλαίσια δερματοστιξίας (137). Μία πρόσφατη δημοσίευση από τον Bäumlér (2015) επιβεβαιώνει την παρατήρηση ότι το χρώμα της δερματοστιξίας με την πάροδο του χρόνου εξασθενεί και μάλιστα μέσω τριών μηχανισμών: 1) της άμεσης απομάκρυνσης της χρωστικής λόγω αιμορραγίας κατά τη διάρκεια της δερματοστιξίας, 2) της αιματογενούς ή/και λεμφογενούς απαγωγής της και 3) μέσω της αποσύνθεσης της χρωστικής κυρίως από την επίδραση φωτός όπως η υπεριώδης ακτινοβολία. Η εναπομείνουσα χρωστική διατηρούνταν στο χόριο, κυρίως ενδοκυττάρια στα μακροφάγα. Το μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων χρωστικής καθώς και η χαμηλή διαλυτότητά τους εμπόδιζε την περαιτέρω απομάκρυνσή τους μέσω των λεμφαγγείων (138).

Μια σημαντική μελέτη από τους Gopee και συν. επικεντρώθηκε στην τοξικολογία των χρωστικών της δερματοστιξίας καθορίζοντας την ανοσολογική αντίδραση καθώς και το χρόνο ανάρρωσης από το τραύμα σε ένα διάστημα μεταξύ 12 ωρών και 14 ημερών από την εφαρμογή της δερματοστιξίας σε άτριχα ποντίκια. Η επούλωση, εκτιμήθηκε ιστολογικά μελετώντας το δέρμα και τους λεμφαδένες (μασχαλιαίους, βουβωνικούς και πυελικούς) καθώς και με δείκτες φλεγμονής (NF-kB, COX-1, COX-2, IL-1β, IL-10) και κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ODC). Όσον αφορά τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του δέρματος, οι μελετητές διαπίστωσαν αιμορραγία του χορίου το πρώτο εικοσιτετράωρο. Η επιδερμική νέκρωση και η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση παρατηρήθηκαν κυρίως κατά τις 12 πρώτες ώρες με σταδιακή υποχώρηση μέχρι τη 14^η ημέρα. Η νέκρωση του χορίου και η υπερπλασία της επιδερμίδας αναδείχθηκαν κυρίως την 3^η ημέρα με σταδιακή μείωση της έντασης και της σοβαρότητάς τους μέχρι τη 14^η ημέρα. Τέλος, οι αλλοιώσεις χρόνιας φλεγμονής διατηρήθηκαν σε όλα τα ποντίκια από την 3^η μέχρι τη 14^η ημέρα. Όσον αφορά τους λεμφαδένες, παρατηρήθηκε εναπόθεση χρωστικής και στις 3 ομάδες λεμφαδένων με τους βουβωνικούς να παρουσιάζουν πιο έντονη λεμφοειδή υπερπλασία και πολυμορφοκυτταρική διήθηση. Εκτιμώντας τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής (NF-Kβ, COX-1, COX-2, ODC) και των κυτοκινών κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εκδήλωση

της οξειάς φλεγμονώδους αντίδρασης είναι χρονοεξαρτώμενη με μία αύξηση των δεικτών τις πρώτες 4 ημέρες και στη συνέχεια σταδιακή τους μείωση μέχρι τη 14^η ημέρα. Συγκριτικά με το δέρμα, στους λεμφαδένες υπήρχαν κάποιες διαφορές τόσο στα επίπεδα των δεικτών όσο και στο χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση των τιμών τους. Στους λεμφαδένες, τα επίπεδα των δεικτών παρουσίαζαν χαμηλότερες τιμές από το δέρμα. Επίσης στους λεμφαδένες η COX-1 παρουσίαζε αύξηση την 7^η ημέρα, η COX-2 παρέμενε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τη 14^η ημέρα και η ODC εμφάνιζε μια αύξηση μεταξύ των 12 πρώτων ωρών και της 7^{ης} ημέρας. Εκτός από την COX-2, τα επίπεδα των υπόλοιπων 2 δεικτών (COX-1, ODC) επανέρχονταν στα φυσιολογικά όρια μέχρι τη 14^η ημέρα. Τα επίπεδα της IL-1β και της IL-10 ήταν μειωμένα στο δέρμα που εφαρμόστηκε η δερματοστιξία, σε αντίθεση με τους λεμφαδένες όπου ανευρέθησαν υψηλά επίπεδα καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι μελετητές συμπέραναν ότι στο δέρμα των ποντικών απαιτείται ένα χρονικό διάστημα 14 ημερών για επούλωση μετά τη δερματοστιξία. Για τους λεμφαδένες, πιθανώς να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την πλήρη επαναφορά στη φυσιολογική δομή και λειτουργία τους (139). Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που ακολουθούν τη δερματοστιξία, σε ιστικά δείγματα δέρματος ανθρώπων, είναι παρόμοια με την παραπάνω μελέτη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο Sperry παρατήρησε ότι για πλήρη επιδερμική ανάπλαση στον άνθρωπο, μετά την εφαρμογή δερματοστιξίας, απαιτούνται περίπου 2 εβδομάδες τόσες όσες χρειάζονται και στα ποντίκια (137). Η τελειοποίηση των ήδη υπάρχοντων μεθόδων και η ανακάλυψη νέων με μεγαλύτερη ευαισθησία απέδειξαν, ότι παρά τη σχετική αδράνεια των χρωστικών ουσιών, υπάρχει εκδήλωση οξειάς φλεγμονώδους αντίδρασης (139). Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα παλαιότερων μελετών (136, 137).

Εκτός από τις *in vitro* μεθόδους που συνέβαλαν στην ιστοπαθολογική μελέτη του δέρματος (134-137, 139), αναπτύχθηκαν νέες αναίμακτες μεθοδολογίες που απεικονίζουν το δέρμα *in vivo*. Οι O'goshi και συν. (2006) παρουσίασαν μια νέα μη επεμβατική, υψηλής ευκρίνειας μέθοδο, *in vivo* απεικόνισης του δέρματος, την πολυεστιακή, σαρωτική, μικροσκόπηση με laser (reflectance confocal scanning laser microscopy - RCM) με σκοπό την ανάδειξη των χρωστικών κοκκίων της δερματοστιξίας στα διαφορετικά επίπεδα του δέρματος. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν 4 περιπτώσεις δερματοστιξίας σε 2 εθελοντές. Διαπιστώθηκε η συσσώρευση χρωστικών κοκκίων κάτω από το επίπεδο της βασικής μεμβράνης, στην περιφέρεια του θηλώδους χορίου, με πιθανή

επέκταση και στην επιδερμίδα. Το ανεξίτηλο χρώμα και σχήμα της δερματοστιξίας, σύμφωνα με τους συγγραφείς, οφείλονταν στο γεγονός ότι η βασική μεμβράνη δρούσε ως ‘φίλτρο’ κατακρατώντας τα κοκκία στο θηλώδες χόριο και εμποδίζοντάς τα να διαφύγουν μέσω μιας επιδερμικής οδού σε πιο επιφανειακά στρώματα. Το μειονέκτημα αυτής της μελέτης ήταν το περιορισμένο βάθος απεικόνισης που έφτανε μόλις τα 200-400 μm, με αποτέλεσμα την όχι ικανοποιητική απεικόνιση των βαθύτερων στρωμάτων του χορίου, σκιαγραφώντας έτσι μόνο την ‘κορυφή του παγόβουνου’ (140). Μια παρόμοια μελέτη, παρουσιάστηκε το 2007 από τους Morsy και συνεργάτες. Χρησιμοποιήθηκε μια νέα οπτικοακουστική τεχνική, η τομογραφία οπτικής συνοχής (optical coherence tomography - OCT), η οποία παρείχε υψηλής ευκρίνειας κατακόρυφες διατομές των εσωτερικών δομών του ιστού in situ σε πραγματικό χρόνο. Μελετήθηκαν 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας σε 3 εθελοντές. Στις εικόνες που ελήφθησαν με την OCT, η χρωστική εμφανίστηκε στο θηλώδες χόριο και λιγότερο σε βαθύτερα στρώματα, ως μαύρες κάθετες στήλες. Οι μαύρες δομές που ήταν αποτέλεσμα της απορρόφησης του φωτός από τη μαύρη χρωστική, δημιουργούσαν σκιές στο δικτυωτό χόριο, με αποτέλεσμα την αδυναμία απεικόνισης των βαθύτερων στρωμάτων του δέρματος (141). Παρά το γεγονός ότι αυτή η μέθοδος υπερέχει της RCM (140) σχετικά με το βάθος απεικόνισης που φτάνει τα 2mm, υπάρχει περιορισμός ως προς τη διεισδυτικότητα. Η απορρόφηση του φωτός από τη χρωστική και η μερική κατακράτηση του σήματος που επιστρέφει στον OCT ανιχνευτή, έχει ως αποτέλεσμα η απεικόνιση να γίνεται πιο σκοτεινή και η διακριτική ικανότητα να μειώνεται σημαντικά (141).

Οι Zaba και συν., χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα για να κατηγοριοποιήσουν τα δενδριτικά κύτταρα, διαπίστωσαν ότι τα δενδριτικά κύτταρα του χορίου που εκφράζουν το θρομβωτικό παράγοντα FXIIIa, αντιστοιχούν στην πραγματικότητα σε μακροφάγα επειδή συνεκφράζουν τον υποδοχέα CD163. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο υποδοχέας CD163 ανιχνεύεται στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα. Για να αποδειχθεί η φαγοκυτταρική ικανότητα αυτών των κυττάρων, μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείγματα δέρματος εθελοντών με δερματοστιξία. Τα χρωστικά κοκκία ανευρέθησαν σε CD163+ κύτταρα, στρογγυλού σχήματος, με πολυάριθμες μικρολαχνώδεις προσεκβολές και συνδεδεμένα με λυσοσωμάτια. Τα ευρήματα αυτά χαρακτηρίζουν τα αποθηκευτικά κύτταρα σαν μακροφάγα και τα καθιστούν ως μια σημαντική θέση μακροχρόνιας αποθήκευσης χρωστικών ουσιών στα πλαίσια της δερματοστιξίας (142).

Τα μακροφάγα αυτά, έχουν μικρές και λεπτές προσεκβολές που ονομάζονται δενδρίτες και φαινοτυπικά ομοιάζουν με τα δενδριτικά κύτταρα (143). Η φαινοτυπική αυτή ομοιότητα επιβεβαιώνεται και τεκμηριώνεται από πρόσφατη μελέτη των Ochoa και συν (144). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα δερματικά δενδριτικά κύτταρα (DDC) αποτελούνται από τουλάχιστον δύο φαινοτυπικούς υποπληθυσμούς κυττάρων με δενδριτική μορφολογία:

- 1) Τα ανώριμα DDC που εκφράζουν τους υποδοχείς CD1, CD11c και CD208.
- 2) Τα μακροφάγα που εκφράζουν τους υποδοχείς CD209, CD206, CD163 και CD68.

Η πρόσφατη αυτή περιγραφή της υποομάδας των δερματικών δενδριτικών εμφανιζόμενων μακροφάγων σε συνδυασμό με την ανεύρεση χρωστικής μέσα στα CD163 XIIIa μακροφάγα (142) μπορεί να ανοίξει καινούργιους ορίζοντες στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της δερματοστιξίας.

Οι Grant και συν. (2015) αξιοποίησαν τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscope-AFM) και τη φωτεινή μικροσκοπία για να εξετάσουν δείγματα ιστών ανθρώπινου δέρματος με δερματοστιξία. Παρατήρησαν ότι συστάδες χρωστικής ανευρίσκονταν στο πυκνό δίκτυο ινιδίων του κολλαγόνου το οποίο είχε παράλληλη διάταξη. Με τη φωτεινή μικροσκοπία ανέδειξαν τη παρουσία συσσωμάτων χρωστικής στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο, περιαγγειακά και ενδαγγειακά. Τέλος καλλιέργησαν ινοβλάστες μέσα σε αραιωμένο διάλυμα μελάνης και ανέδειξαν με τις προαναφερθείσες μεθόδους την παρουσία χρωστικής στην κυτταρική επιφάνεια των ινοβλαστών (145).

Οι Baranska και συν. (2018) δημιούργησαν γενετικά στελέχη ποντικών που είχαν δερματικά μακροφάγα με υποδοχείς για την τοξίνη της διφθερίτιδας. Το γεγονός αυτό έδινε τη δυνατότητα στους ερευνητές την ικανότητα να θανατώσουν επιλεκτικά τα μακροφάγα με έγχυση της τοξίνης (146). Με τη μελέτη τους ανέδειξαν ότι τα κύτταρα που ήταν υπεύθυνα για την αποθήκευση της χρωστικής της δερματοστιξίας ήταν αποκλειστικά τα δερματικά μακροφάγα, εύρημα παρόμοιο με αυτό της Zaba και συν (142). Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι μετά το θάνατο των μακροφάγων από την τοξίνη η χρωστική παρέμενε αναλλοίωτη εξωκυττάρια έως ότου επανακτηθεί από διερχόμενα μακροφάγα. Σε ένα άλλο σύνολο πειραμάτων το δέρμα της ουράς των ποντικών με δερματοστιξία μεταμοσχεύτηκε στη ράχη ποντικών αλμπίνο. Ομοίως, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι έξι εβδομάδες αργότερα, αν και όλα τα κύτταρα στο μόσχευμα είχαν πεθάνει, η μελάνη παρέμενε. Οι

παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι τα κοκκία χρωστικής υποβάλλονται σε διαδοχικούς κύκλους πρόσληψης –απελευθέρωσης-ανάκτησης από τα μακροφάγα παραμένοντας με αυτόν τον τρόπο αναλλοίωτα (146).

Μέχρι στιγμής οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αναδεικνύουν το χόριο ως το ανατομικό μέρος αποθήκευσης της χρωστικής με τη συμμετοχή των κυτταρικών πληθυσμών του, κυρίως των μακροφάγων αλλά και των ινοβλαστών.

1.10 Δερματίτιδα από στάση

Η δερματίτιδα από στάση αποτελεί δερματική εκδήλωση φλεβικής ανεπάρκειας των κάτω άκρων. Η ανεπάρκεια των βαλβίδων του εν τω βάθει φλεβικού δικτύου οδηγεί σε χρόνια φλεβική υπέρταση, η οποία αποτελεί και το αίτιο εκδήλωσης αυτού του τύπου της δερματίτιδας. Η φλεβική υπέρταση επιβραδύνει τη ροή του αίματος στη μικροκυκλοφορία, προκαλεί διάταση των τριχοειδών και βλάβη της ημιπερατής μεμβράνης των τριχοειδών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οιδήματος και την εξαγγείωση ερυθροκυττάρων. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε μικροαγγειοπάθεια και στην ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων (ICAM-1, VCAM-1), φλεγμονωδών κυτταροκινών, ελευθέρων ριζών και πρωτεασών. Η περιτριχοειδική φλεγμονή που προκύπτει, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ίνωση, λιποδερματοσκλήρυνση, δυσλειτουργία των λεμφαγγείων και φλεβικά έλκη.

Η δερματίτιδα από στάση εκδηλώνεται με τη μορφή ερυθρηματωδών, λεπιδωδών βλατίδων και πλακών, συνήθως με παρουσία κνησμού, στο κατώτερο τριτημόριο των κνημών και πολύ συχνά συνδυάζεται με υπερμελάγχρωση και απώλεια τριχών. Συνήθως, συνυπάρχουν διατεταμένες ή κίρσοειδείς φλέβες (111, 147-149). Η αιμοσιδηρίνη και η μελανίνη έχουν θεωρηθεί υπεύθυνες για την καστανόφαιη χρώση του δέρματος στη δερματίτιδα από στάση. Η αιμοσιδηρίνη είναι αποτέλεσμα της αποδόμησης της αιμοσφαιρίνης η οποία ευοδώνεται λόγω της εξαγγείωσης και λύσης των ερυθροκυττάρων.

Ο Kim και συν. με την ιστοχημική χρώση Fontana-Masson, ανέδειξαν την παρουσία μελανίνης και με την ιστοχημική χρώση Perl's κοκκία αιμοσιδηρίνης στο θηλώδες χόριο. Η χρήση ανοσοϊστοχημικών δεικτών (GP100, CD68) στη μελέτη αυτή ανέδειξε την παρουσία μελανοκυττάρων με κοκκία μελανίνης καθώς και μακροφάγων με κοκκία αιμοσιδηρίνης ή μελανίνης στο θηλώδες χόριο (149). Σε παρόμοια μελέτη, με την ιστοχημική χρώση Fontana-Masson αναδείχθηκε η παρουσία μελανίνης με τη μορφή καφέ, καφέ-μαύρων ή μαύρων κοκκίων σε μελανοκύτταρα, κερατινοκύτταρα και

εξωκυττάρια στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας και με την ιστοχημική χρώση Perl's μπλε κοκκίων αιμοσιδηρίνης σε μακροφάγα (σιδηροφάγα) στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο καθώς και εξωκυττάρια ανάμεσα στις δεσμίδες κολλαγόνου του χορίου (148).

Ο ακριβής κυτταρικός και μοριακός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την υπερμελάγχρωση του δέρματος στη δερματίτιδα από στάση παραμένει άγνωστος. Πιθανώς, η μελανίνη και η αιμοσιδηρίνη να συμμετέχουν σε διαφορετικά στάδια για την εκδήλωση αυτού του τύπου της δερματίτιδας. Σε έδαφος φλεβικής ανεπάρκειας, η αιμοσιδηρίνη ενεργοποιεί πρωτεάσες και ευοδώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, παραγόντων δηλαδή που είναι υπεύθυνοι για την αναδιαμόρφωση του δερματικού ιστού και τη νέκρωση του δέρματος. Για το λόγο αυτό, η εναπόθεσή της συνδυάζεται με την εξέλιξη της δερματίτιδας από στάση σε περιπτώσεις λιποδερματοσκλήρυνσης και φλεβικών ελκών. Όσον αφορά τη μελανίνη, ενδεχομένως να υπάρχει κάποια δυσλειτουργία στο μεταβολισμό της (σύνθεση, διανομή ή turnover) η οποία να εξηγεί την παρουσία της στο χόριο (148). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διευκρινισθούν αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην υπερμελάγχρωση του δέρματος επί δερματίτιδας από στάση.

1.11 Συστάδα διαφοροποίησης

Η συστάδα διαφοροποίησης (Cluster of Differentiation - CD) είναι μόρια κυτταρικής επιφάνειας των λευκοκυττάρων καθώς και αντίστοιχοι συνδέτες που εκφράζονται από άλλους ιστούς. Οι CD δείκτες χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση, τη ποσοτικοποίηση και τη μελέτη των λευκοκυττάρων (150).

Τα CD μόρια έχουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων. Η πλειονότητα αυτών είναι γλυκοπρωτείνες αν και έχουν περιγραφεί και γλυκολιπίδια. Μπορούν να δρουν ως υποδοχείς ή ως συνδέτες παίζοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Μερικά CD μόρια δρουν ως μόρια προσκόλλησης. Το CD σύστημα χρησιμοποιείται πολλές φορές για τον καθορισμό του ανοσοφαινότυπου των υπό μελέτη κυττάρων επιτρέποντας στα κύτταρα αυτά να χαρακτηρίζονται με βάση τα μόρια που ανιχνεύονται στην επιφάνειά τους (150, 151). Από την πληθώρα των CD δεικτών, οι κυριότεροι δείκτες που συμβάλλουν ο καθ' ένας αντίστοιχα στον καθορισμό των μακροφάγων, των δερματικών δένδριτικών κυττάρων, των μαστοκύτταρων, των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων, των κυττάρων δηλαδή που ανευρίσκονται στο χόριο του δέρματος, είναι ο CD163, ο CD11c, ο CD117 (c-kit), η βιμεντίνη και ο CD34 (113, 120, 124, 127, 128, 131,152-156).

1) CD163: Η πρωτεΐνη CD163 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 130Kd. Κωδικοποιείται από το γονίδιο CD163 το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση p13. Το αντιγόνο είναι μέλος του πλούσιου σε κυστεΐνη υποδοχέα σάρωσης της υπεροικογένειας τύπου Β. Εκφράζεται στα μονοκύτταρα, στα M2 μακροφάγα καθώς και στα ιστικά μακροφάγα. Εμπλέκεται στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ανευρίσκεται σε μεγάλο αριθμό στο φλεγμονώδη ιστό και η λειτουργία του είναι να μειώσει τη φλεγμονώδη απάντηση των μακροφάγων. Πρόσφατα έχει μελετηθεί η συμμετοχή του στην επαγωγή ανοχής και στην ιστική αναγέννηση. Η καλύτερα γνωστή λειτουργία του είναι η δράση του ως απαγωγέας της αιμοσφαιρίνης με δέσμευση και εκκαθάριση συμπλοκών αιμοσφαιρίνης-αιμοσφαιρίνης από το αίμα (120, 124, 152-154).

2) CD11c: Η πρωτεΐνη CD11c αποτελεί μέλος της οικογένειας της β2 ιντεγκρίνης με μοριακό βάρος 150Kd. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16, στη θέση 16p11. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και δρουν ως μόρια προσκόλλησης συμμετέχοντας στην κυτταρο-κυτταρική επαφή, στην επαφή του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία, στον πολλαπλασιασμό, στη φαγοκυττάρωση και στη μετανάστευση των ανοσοκυττάρων. Εκφράζεται στα μονοκύτταρα, στα μυελογενή δενδριτικά κύτταρα, στα μακροφάγα, στα κοκκιοκύτταρα και στα NK κύτταρα. (113, 155, 157, 158).

3) CD117 (c-kit): Η πρωτεΐνη CD117 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 145Kd και είναι το παράγωγο του kit γονιδίου το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4, στη θέση 4q12. Ως μέλος της υποομάδας III της οικογένειας των υποδοχέων κινάσες της τυροσίνης δρά στη μεταβίβαση του κυτταρικού σήματος. Έκφραση της πρωτεΐνης CD117 ανευρίσκεται στα μαστοκύτταρα, σε μερικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, στα γεννητικά κύτταρα, στα μελανοκύτταρα και στα κύτταρα Cajal του γαστρεντερικού σωλήνα (127, 159, 160).

4) Βιμεντίνη: Η βιμεντίνη είναι μια πρωτεΐνη ενδιάμεσου νήματος τύπου III. Το γονίδιο VIM που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10, στη θέση 10p13. Αποτελεί μέρος του κυτταροσκελετού μαζί με τα μικροϊνίδια και τα μικροσωληνάρια και συμβάλλει στην κυτταρική κινητικότητα, στην κυτταρική προσκόλληση και στην κυτταρική σηματοδότηση καθώς και στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και της κυτταρικής ακεραιότητας από τη δράση μηχανικού stress. Η βιμεντίνη χρησιμοποιείται ως δείκτης κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών (128, 131, 161).

5) CD34: Η πρωτεΐνη CD34 είναι μια διαμεμβρανική φωσφογλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας με μοριακό βάρος 110Kd και δρα ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, στη θέση 1q32. Εκφράζεται στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του ομφάλιου λώρου και του μυελού των οστών, σε υποομάδα μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων, σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων, στο διάμεσο χώρο και στο χόριο του δέρματος περίξ των εξαρτημάτων (156, 162, 163).

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση της δερματοστιξίας για κοσμητικούς λόγους αλλά και για ένα εύρος ιατρικών πράξεων έχει αλματώδη αύξηση. Παρ' όλα αυτά η σχετική βιβλιογραφία είναι ακόμα περιορισμένη. Ιδιαίτερα, παραμένουν μέχρι σήμερα ερωτηματικά όσον αφορά στο μηχανισμό με τον οποίον η χρωστική της δερματοστιξίας διατηρείται εναποθηκευμένη μακροχρόνια στα κύτταρα του χορίου του δέρματος, εντοπισμένη στη θέση της έγχυσης πάρα τη δυναμική κατάσταση αποδόμησης και αναδόμησης (turnover) του κυτταρικού πληθυσμού του χορίου. Οι μέχρι πρότινος μελέτες που αφορούν στο δέρμα, δίνουν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα ως προς τους κυτταρικούς πληθυσμούς που είναι υπεύθυνοι για τη χρόνια αποθήκευση της χρωστικής σε αυτό.

Σκοπός της μελέτης είναι η συμβολή στην ανάδειξη των κυττάρων που συμμετέχουν στη διασπορά και την αποθήκευση της εξωγενούς χρωστικής από δερματοστιξία καθώς και της ενδογενούς χρωστικής από δερματίτιδα εκ στάσεως. Μελετήθηκε η πιθανή έκφραση των μακροφάγων, των δερματικών δενδριτικών κυττάρων και των μαστοκύτταρων στη θέση εντόπισης της χρωστικής σε 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας και 9 περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση. Επίσης για την εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια εντόπιση και αποθήκευση της χρωστικής χρησιμοποιήθηκαν δείκτες ενδοθηλιακοί ή δείκτες που εκφράζουν τους ινοβλάστες. Για το σκοπό της εργασίας χρησιμοποιήθηκε η χρώση αιματοξυλίνης εωσίνης, ιστοχημικές χρώσεις (χρώση Giemsa, Masson-Fontana και Perl's) και διενεργήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη των δεικτών CD34, CD117, CD163, CD11c και βιμεντίνης.

3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΟ

3.1.1 Συλλογή δειγμάτων

Η παρούσα αναδρομική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε βιοπτικό υλικό 14 δερματικών αλλοιώσεων, από τις οποίες 5 περιπτώσεις αφορούσαν σε αλλοιώσεις από δερματοστιξία και 9 περιπτώσεις σε δερματίτιδα από στάση. Δυο βιοπτικά υλικά δέρματος με δερματοστιξία ήταν ευγενική παραχώρηση του PD Dr med. Hans-Joachim Schulze, Department of Dermatology, Skin Cancer Center Hornheide, Münster, Germany. Τα υπόλοιπα δείγματα προήλθαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η επιλογή του δείγματος έγινε με βάση την παρουσία επαρκούς και κατάλληλου υλικού, ώστε να πραγματοποιηθεί ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική μελέτη.

Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης, από τους οποίους παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 3-5 μm . Μία ιστολογική τομή χρωματίστηκε με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H/E) για τη μορφολογική επανεκτίμηση των αλλοιώσεων και οι υπόλοιπες αξιοποιήθηκαν για ιστοχημική μελέτη με την εφαρμογή ειδικών ιστοχημικών χρώσεων καθώς και για ανοσοϊστοχημική μελέτη με την εφαρμογή ειδικών αντισωμάτων.

3.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Το βιοπτικό υλικό των δερματικών αλλοιώσεων από δερματοστιξία προήλθε από 5 άτομα εκ των οποίων 3 ήταν άντρες και 2 γυναίκες. Το εύρος της ηλικίας των ασθενών κυμαίνονταν μεταξύ 26 και 44 ετών (μέσος όρος 35 έτη). Το χρώμα της δερματοστιξίας ήταν σε όλους τους ασθενείς το μαύρο. Η εντόπιση αφορούσε τα άνω άκρα (n=2), τα κάτω άκρα (n=1) και τον κορμό (n=2). Η εξαίρεση όλης της αλλοίωσης ή τμήματος αυτής έγινε για αισθητικούς λόγους (n=3), λόγω ανάπτυξης κοκκιωματώδους αντίδρασης (n=1) ή παρουσίας σημηματογόνου κύστης (n=1). Το βιοπτικό υλικό δερματίτιδας από στάση προήλθε από 9 ασθενείς με διάφορες επιπρόσθετες κλινικές διαφοροδιαγνώσεις, όπως μελαγχρωματική πορφύρα, έκζεμα, αγγεΐτιδα κ.α. Από τους 9 ασθενείς, 4 ήταν άντρες και 5 γυναίκες. Το ηλικιακό εύρος των ασθενών ήταν από 27 έως 96 έτη (μέσος όρος: 62 έτη). Η εντόπιση των αλλοιώσεων αφορούσε αποκλειστικά τα κάτω άκρα.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης (H/E) πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένο μηχάνημα μετά την αποπαραφίνωση των ιστολογικών τομών (σε κλίβανο στους 60°C για μισή περίπου ώρα). Ακολούθησε επικάλυψη των ιστολογικών πλακιδίων με καλυπτρίδες και για τη μικροσκόπησή τους χρησιμοποιήθηκε διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης (Nikon, Eclipse 50i). Η ιστοπαθολογική διάγνωση των αλλοιώσεων επιβεβαιώθηκε από δύο έμπειρους Παθολογοανατόμους.

3.2.2 Ιστοχημικές χρώσεις

Ειδικές ιστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε ιστολογικές τομές μετά την αποπαραφίνωσή τους, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμες συσκευασίες (kits) και εφαρμόζοντας τις προτεινόμενες οδηγίες από τους κατασκευαστές. Οι ιστοχημικές χρώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν: α) Giemsa β) Masson-Fontana και γ) Perl's. Μετά την εφαρμογή των ειδικών πρωτοκόλλων, οι ιστολογικές τομές επικαλύπτονται με ειδικές καλυπτρίδες για την αξιολόγησή τους σε διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης (Nikon, Eclipse 50i).

3.2.3 Ανοσοϊστοχημεία

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με αντισώματα για: βιμεντίνη, CD163, CD11c, CD117 (c-kit) και CD34 σε ιστολογικές τομές πάχους 3-5 μm, με την εφαρμογή της κλασικής μεθόδου στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labelled StreptAvidin Biotin) (164, 165). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος και η αραιώσή τους παρατίθενται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Αντίσωμα	Πηγή	Κλώνος	Αραιώση
Anti-Vimentin	DAKO	Vq	1:1000
Anti-CD163	Leica	NCL-L-CD163	1:50
Anti-CD11c	Leica	NCL-L-CD11c-563	1:50
Anti-CD117	DAKO	c-kit	1:20
Anti-CD34	DAKO	QB End 10	1:25

3.2.4 Περιγραφή της μεθόδου στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος ανοσοϊστοχημείας (Ventana Benchmark, Strasbourg, France) σύμφωνα με τα ενδεδειγμένα πρωτόκολλα και οδηγίες (Ventana Medical Systems, Inc.).

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την τοποθέτηση, με τη μορφή αυτοκόλλητης ταινίας, ενός γραμμωκώδικα (barcode), πάνω στο πλακίδιο που θα τοποθετηθεί στο μηχάνημα, προκειμένου αφενός μεν να αναγνωρίζεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας που πρόκειται να ακολουθήσει και αφετέρου για να ελέγχονται τα στάδια της διαδικασίας. Στη συνέχεια, ακολουθεί η πλήρως αυτοματοποιημένη, “κλειστή” λειτουργία του μηχανήματος.

Στο 1^ο βήμα, ο ιστός θερμαίνεται και αποπαραφινώνεται σε μια διαδικασία που διαρκεί 60 λεπτά. Ακολούθως, γίνεται η αποκάλυψη του αντιγονικού επιτόπου με τη χρήση κατάλληλου κυτταρικού διαλύματος (CC1), για 60 λεπτά στους 99°C. Κατόπιν, πραγματοποιείται ενζυματική προεπάση για την αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, για 4 λεπτά στους 37°C. Έπεται η εξωγενής προσθήκη του πρωτοταγούς αντισώματος σε συγκέντρωση που προσδιορίζεται με βάση το αποτέλεσμα μιας σειράς δοκιμαστικών χρώσεων για τη βελτιστοποίηση της διάκρισης ανάμεσα στην ‘ειδική’ και μη ‘ειδική’ χρώση. Η τελευταία προκύπτει λόγω δέσμευσης του αντισώματος με μη ειδικούς αντιγονικούς επιτόπους. Στην παρούσα μελέτη, όλα τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 62 λεπτά. Ακολούθως, προστίθεται αυτόματα το δευτεροταγές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, το οποίο επώαζεται για 8 λεπτά στους 37°C. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη του ενζυμικού συμπλόκου αβιδίνης/στρεπταβιδίνης και την επώασή του για 8 λεπτά στους 37°C. Τα δύο επόμενα και τελευταία στάδια είναι η προσθήκη των χρωμογόνων διαλυμάτων διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) για 4 λεπτά και αλκαλική φωσφατάση για 4 λεπτά καθώς και η χρώση των τομών με αιματοξυλίνη. Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της ανωτέρω διαδικασίας, γίνεται αυτόματη έκπλυση των ιστολογικών τομών με TBS (Triphosphate Buffered Saline, pH 7,6).

Μετά την ολοκλήρωση της ανωτέρω διαδικασίας, τα πλακίδια αφαιρούνται από το μηχάνημα, τοποθετούνται κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για δέκα λεπτά και εν συνεχεία ακολουθούν επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απεσταγμένο νερό. Τέλος,

πραγματοποιείται η αφυδάτωση των ιστών με την εμβάπτισή τους σε ανοιούσα σειρά οιοπνευμάτων και η τοποθέτησή τους σε ξυλόλη [δύο διαδοχικές εμβάπτισεις σε 96% αιθανόλη επί δύο λεπτά έκαστη σε θερμοκρασία δωματίου (RT), δύο διαδοχικές εμβάπτισεις σε 100% αιθανόλη επί δύο λεπτά έκαστη σε RT, δύο διαδοχικές εμβάπτισεις σε ξυλόλη επί τρία λεπτά έκαστη σε RT]. Μετά την επικάλυψη των ιστολογικών τομών με ειδικές καλυπτρίδες, ακολουθεί η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στο οπτικό μικροσκόπιο (Nikon, Eclipse 50i).

3.2.5 Αξιολόγηση των ιστοχημικών χρώσεων.

Με την ιστοχημική χρώση Giemsa εκτιμήθηκε η παρουσία μαστοκυττάρων. Με τις χρώσεις Masson-Fontana και Perl's καταγράφηκε η παρουσία ενδοκυττάρων ή/και εξωκυττάρων κοκκίων χρωστικής (μελανίνης και αιμοσιδηρίνης, αντίστοιχα).

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με εκατοστιαία αναλογία ως εξής:

- α) 0%: απουσία κοκκίων μελανίνης ή αιμοσιδηρίνης ή άλλης χρωστικής, ή απουσία μαστοκυττάρων
- β) 1-30%: ολιγάριθμα κοκκία μελανίνης ή αιμοσιδηρίνης ή άλλης χρωστικής ή ολιγάριθμα μαστοκύτταρα
- γ) 31-60%: αρκετά κοκκία μελανίνης ή αιμοσιδηρίνης ή άλλης χρωστικής ή αρκετά μαστοκύτταρα
- δ) 61-100%: άφθονα κοκκία μελανίνης ή αιμοσιδηρίνης ή άλλης χρωστικής ή άφθονα μαστοκύτταρα.

Οι ιστοχημικές χρώσεις αξιολογήθηκαν υπό την καθοδήγηση δύο έμπειρων Παθολογοανατόμων, με την ενεργό συμμετοχή της υποψήφιας διδάκτορα.

3.2.6 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Οι ανοσοχρώσεις για τις πρωτεΐνες βιμεντίνη, CD163, CD11c, CD117 και CD34 ανέδειξαν την παρουσία μακροφάγων, ινοβλαστών, δενδριτικών και ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και μαστοκυττάρων. Συγκεκριμένα, με τη βιμεντίνη ταυτοποιείται το σύνολο των κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης και ειδικότερα ινοβλάστες, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, με το δείκτη CD163 ανιχνεύονται μακροφάγα, με το δείκτη CD11c δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα, με το δείκτη CD117 μαστοκύτταρα και με το δείκτη CD34 ενδοθηλιακά κύτταρα. Η εφαρμογή

διπλών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με την εφαρμογή δύο αντισωμάτων (CD163 και CD11c) και δύο χρωμογόνων (DAB και αλκαλική φωσφατάση) εφαρμόστηκε για την ταυτόχρονη απομόνωση δύο διακριτών κυτταρικών πληθυσμών: μακροφάγα (CD163+/CD11c-) και δενδριτικά κύτταρα (CD163-/CD11c+). Όπως αναμένονταν, η εντόπιση των ανοσοχρώσεων ήταν κυτταροπλασματική για τις πρωτεΐνες βιμεντίνη, CD163, CD11c και CD34 και κυτταροπλασματική/μεμβρανική για το δείκτη CD117. Σε κάθε περίπτωση, εντοπίστηκαν οι περιοχές του ιστού που έφεραν κοκκία χρωστικής. Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η κάτωθι εκατοστιαία αναλογία:

- α) 0%: απουσία ανοσοθετικών κυττάρων με κοκκία
- β) 1-30%: μικρός αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων με κοκκία
- γ) 31-60%: μέτριος αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων με κοκκία
- δ) 61-100%: ικανός αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων με κοκκία

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αξιολογήθηκαν υπό την καθοδήγηση δύο έμπειρων Παθολογοανατόμων με την ενεργό συμμετοχή της υποψήφιας διδάκτορα.

3.3 Ανάλυση της εικόνας (τμηματοποίηση χρώματος)

Ιστοπαθολογικές εικόνες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και περιοχές των κυττάρων που έχουν δεσμεύσει χρωστική ταυτοποιήθηκαν (τμηματοποιήθηκαν) αυτόματα χρησιμοποιώντας αλγορίθμους συσταδοποίησης (clustering). Συγκεκριμένα τα εικονοστοιχεία της εικόνας ομαδοποιούνται αρχικά στο χρωματικό χώρο RGB (binary tree quantization technique) και επιλέγονται περιοχές με παρόμοιες χρωματικές ιδιότητες με αυτήν της χρώσης. Οι περιοχές αυτές αναλύονται περαιτέρω με την εφαρμογή αλγορίθμου συσταδοποίησης (k-means) στο χρωματικό μοντέλο YIQ, αναλύοντας τις χρωματικές συνιστώσες I, Q των εικονοστοιχείων τους. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι να απομονωθούν με ακρίβεια, σε κάθε εικόνα τα εικονοστοιχεία με τη στοχευμένη χρώση. Τέλος για κάθε εικονοστοιχείο που ανήκει σε τμηματοποιημένη περιοχή που φέρει χρωστική, υπολογίζεται η απόστασή του από το όριο της επιδερμίδας.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι του λόγου των σχετικών πιθανοτήτων (odds ratio - OR) των pigmented/non pigmented κυττάρων. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος έκφρασης (mean value), η τυπική απόκλιση της τιμής κάθε παραμέτρου (SD – standard deviation) καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum – minimum values) καθώς και η στατιστική σημαντικότητα (p) των κυτταρικών υποπληθυσμών ανάλογα με την έκφραση των δεικτών CD11, CD163 στο σύνολο των κυττάρων του χορίου, στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής και στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν η στατιστική σημαντικότητα p των ευρημάτων ήταν μικρότερη του 0,05 ($p < 0,05$). Το OR ενός συγκεκριμένου ανοσοφαινοτυπικού υποπληθυσμού υπολογίστηκε ως ο λόγος του κλάσματος του ανοσοφαινοτυπικά διακριτού υποπληθυσμού του χορίου που προσλαμβάνει χρωστική/ το σύνολο των κυττάρων του χορίου που προσλαμβάνει χρωστική προς το λόγο του κλάσματος του ανοσοφαινοτυπικά διακριτού υποπληθυσμού του χορίου που δεν προσλαμβάνει χρωστική/το σύνολο των κυττάρων του χορίου που δεν προσλαμβάνει χρωστική. Συγκεντρωτικά χρησιμοποιήθηκαν οι στατιστικές μέθοδοι που παρατίθενται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Στατιστικές μέθοδοι.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	
t -test	Παραμετρική δοκιμασία για να υπολογισθεί αν οι μέσοι όροι δυο συνόλων τιμών διαφέρουν σημαντικά
Paired t-test	Παραμετρική δοκιμασία για τον έλεγχο της διαφοράς των μέσων για παρατηρήσεις κατά ζεύγη
Mann- Whitney test	Μη παραμετρική δοκιμασία αντίστοιχη του t-test
Wilcoxon test	Μη παραμετρική δοκιμασία αντίστοιχη του t-test για εξαρτημένα δείγματα
Kolmogorov- Smirnov	Δοκιμασία ελέγχου σύγκρισης της κατανομής δυο μεταβλητών

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αξιολόγηση των ιστολογικών χρώσεων αιματοξυλίνης - ηωσίνης

Η χρωστική (εξωγενής και ενδογενής) ανιχνεύεται στον ιστό με τη μορφή μικροσκοπικών άμορφων σωματιδίων (κοκκίων). Με τις ιστολογικές χρώσεις αιματοξυλίνης- ηωσίνης αξιολογήθηκαν μορφολογικά: α) το πρότυπο της κυτταρικής κατανομής β) η τοπογραφική εντόπιση της αποθηκευμένης εξωγενούς (δερματοστιξία) ή ενδογενούς (δερματίτιδα από στάση) χρωστικής και γ) η μορφολογία των κυττάρων που έφεραν, είχαν δηλαδή αποθηκεύσει κοκκία χρωστικής. Το πρότυπο κατανομής των κυττάρων ταξινομήθηκε σε τρεις κατηγορίες: 1) περιαγγειακό με επιμέρους α) επιπολής (μόνο στο θηλώδες χόριο) και β) επιπολής και εν τω βάθει (θηλώδες χόριο, δικτυωτό χόριο και ίσως και πιο επιφανειακή μοίρα του υποδόριου ιστού), 2) διάχυτο και 3) κοκκιωματώδες. Κοκκία χρωστικής εντοπίστηκαν είτε στο χόριο (θηλώδες ή/και δικτυωτό) είτε στο χόριο και τον υποδόριο ιστό. Μορφολογικά, τα κύτταρα που έφεραν κοκκία ήταν επιμήκη, μερικά από τα οποία είχαν σαφείς κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται το πρότυπο κυτταρικής κατανομής, η τοπογραφική εντόπιση των κοκκίων χρωστικής, καθώς και η μορφολογία των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής.

4.1.1 Πρότυπο κυτταρικής κατανομής

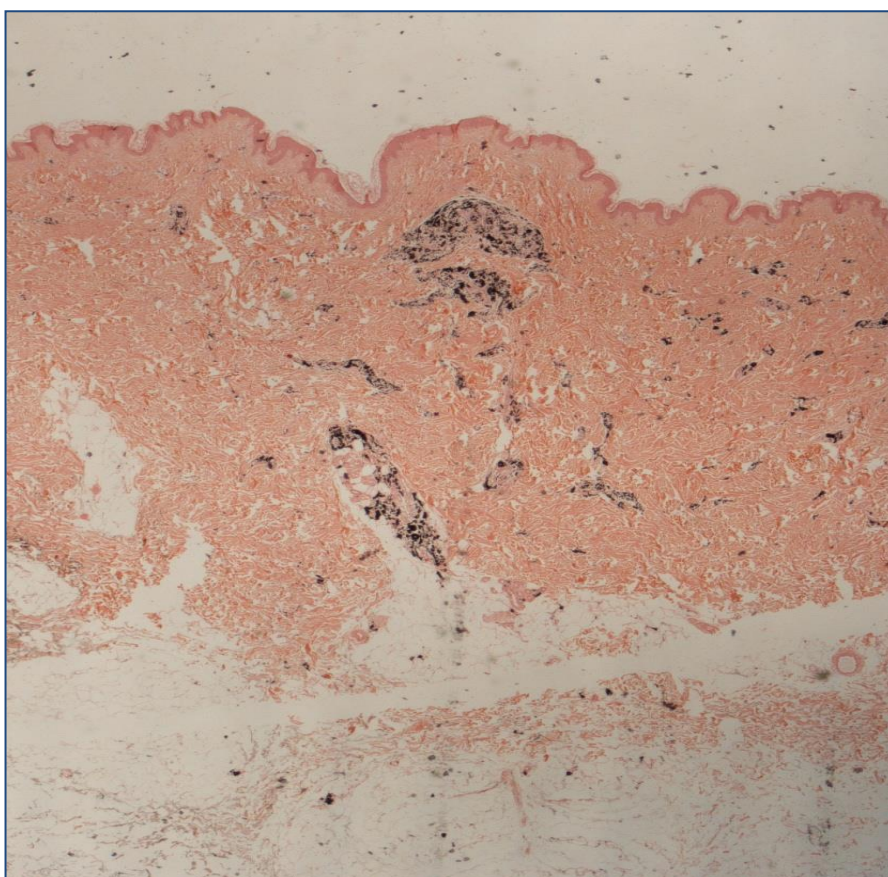
1) Δερματοστιξία: Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δερματοστιξίας (4 από τις 5 περιπτώσεις) παρατηρήθηκε περιαγγειακή κυτταρική κατανομή τόσο στο θηλώδες όσο και στο δικτυωτό χόριο (περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει πρότυπο). Σε μία περίπτωση η περιαγγειακή κατανομή περιοριζόταν στο θηλώδες χόριο (επιπολής περιαγγειακό πρότυπο). Το κυτταρικό διήθημα αποτελούνταν κυρίως από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, ενώ συμμετείχε μικρότερος αριθμός μαστοκυττάρων. Η λεμφοκυτταρική κατανομή ήταν ιδιαίτερα πυκνή σε 2 από τις 5 περιπτώσεις, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις διαπιστώθηκε μικρός αριθμός λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα, σε μία περίπτωση αναγνωρίστηκε κοκκιωματώδης αντίδραση με παρουσία σαρκοειδόμορφων κοκκιωμάτων και ολιγάριθμων πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων (κοκκιωματώδες πρότυπο).

2) Δερματίτιδα από στάση: Το πρότυπο της κυτταρικής κατανομής ήταν περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει σε 8 από τις 9 περιπτώσεις και επιπολής περιαγγειακό σε μία

περίπτωση (Πίνακας 7). Το κυτταρικό διήθημα ήταν μέτρια έως έντονα πυκνό και σε αυτό συμμετείχαν λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Συνυπήρχαν, αρκετά εξαγγειωμένα ερυθροκύτταρα.

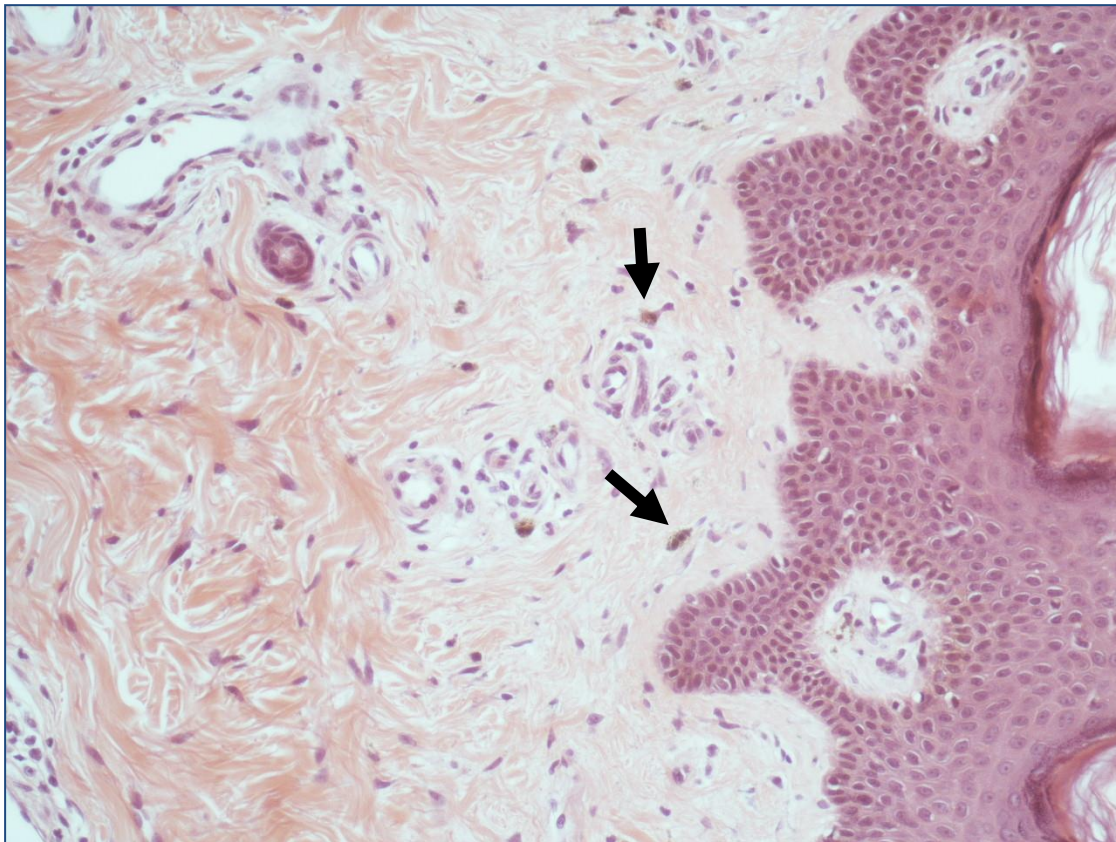
4.1.2 Τοπογραφική εντόπιση των κοκκίων χρωστικής

1) Δερματοστιξία: Κοκκία εξωγενούς χρωστικής εντοπίστηκαν είτε επιφανειακότερα στο θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο (n=3), είτε σε όλο το πάχος του χορίου (n=1), είτε τέλος σε όλο το πάχος του χορίου και στις ανώτερες μοίρες του υποδόριου ιστού (n=1) (Εικόνα 3). Κοκκία χρωστικής ανευρέθησαν τόσο ενδοκυττάρια, σε κύτταρα με επιμήκη μορφολογία όσο και εξωκυττάρια. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις δερματοστιξίας η επί τις εκατό ενδοκυττάρια εναπόθεση χρωστικής κυμάνθηκε από 40% έως 90% και η εξωκυττάρια από 10% έως 60% (Πίνακας 8). Τα κοκκία χρωστικής ήταν είτε διακριτά και ο αριθμός τους κυμαίνονταν από 5 έως 30 είτε ομαδοποιημένα σε συστάδες.



Εικόνα 3: Περίπτωση δερματοστιξίας. Εναποθέσεις κοκκίων χρωστικής στο χόριο και υποδόριο ιστό (χρώση H/EX40).

2) Δερματίτιδα από στάση: Εναπόθεση ενδογενούς χρωστικής στα βιοπτικά υλικά από δερματίτιδα από στάση παρατηρήθηκε στο θηλώδες χόριο (n=1), στο θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο (n=4), σε όλο το πάχος του χορίου (n=3), ή τέλος σε όλο το πάχος του χορίου και στις ανώτερες μοίρες του υποδορίου ιστού (n=1) (Εικόνα 4). Αναγνωρίστηκαν εναποθέσεις κοκκιώδους χρωστικής τόσο ενδοκυττάρια σε επιμήκους μορφολογίας κύτταρα, όσο και εξωκυττάρια. Η αναλογία ανάμεσα σε εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια εναποθέσεις ήταν 1/4.



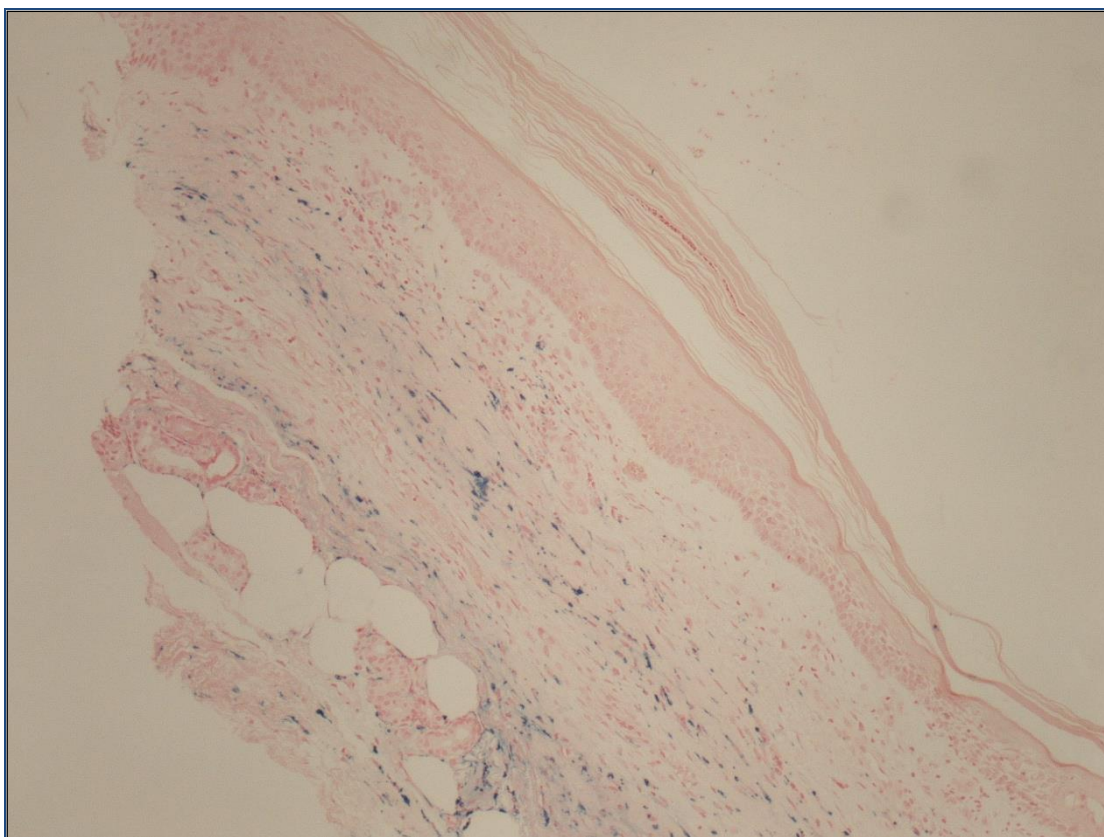
Εικόνα 4: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. Εναποθέσεις κοκκίων χρωστικής (αιμοσιδηρίνης) στο θηλώδες χόριο (χρώση H/EX200).

4.2 Αξιολόγηση των ιστοχημικών χρώσεων

1) Δερματοσιζία: Με την ιστοχημική χρώση Giemsa δεν ανιχνεύθηκαν μαστοκύτταρα στις περιπτώσεις δερματοσιζίας που μελετήθηκαν. Με την ιστοχημική χρώση Masson-Fontana αναδείχθηκαν τα θετικά σε κοκκία μελανίνης μελανοκύτταρα της επιδερμίδας.

Δεν ανιχνεύθηκαν άλλα κυτταρικά στοιχεία με εναποθέσεις κοκκίων μελανίνης. Με την ιστοχημική χρώση Perl's δεν διαπιστώθηκαν εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης, ούτε ενδοκυττάρια ούτε και εξωκυττάρια.

2) Δερματίτιδα από στάση: Η ιστοχημική χρώση Giemsa δεν ανέδειξε την παρουσία μαστοκυττάρων. Η χρώση Masson-Fontana ανέδειξε την παρουσία στο χόριο ολιγάριθμων κοκκίων μελανίνης. Κοκκία μελανίνης παρατηρήθηκαν τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια σε επιμήκη κύτταρα σε 2 περιπτώσεις, ενώ ολιγάριθμα εξωκυττάρια κοκκία σε επιπλέον 3 περιπτώσεις. Στα υπόλοιπα βιοπτικά υλικά (n=4) δεν αναδείχθηκαν κοκκία μελανίνης, ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια. Με τη χρώση Perl's διαπιστώθηκε η παρουσία άφθονων εναποθέσεων αιμοσιδηρίνης σε όλες τις περιπτώσεις (n=9) (Εικόνα 5). Οι εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης ανιχνεύθηκαν ενδοκυττάρια, στο κυτταρόπλασμα επιμήκων κυττάρων, αλλά και εξωκυττάρια. Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται τα ευρήματα ανίχνευσης εναποθέσεων μελανίνης και αιμοσιδηρίνης με τις ιστοχημικές χρώσεις Masson-Fontana και Perl's αντίστοιχα.



Εικόνα 5: Ιστοχημική χρώση Perl's. Ανάδειξη των κοκκίων αιμοσιδηρίνης στο χόριο και υποδόριο λιπώδη ιστό σε περίπτωση δερματίτιδας από στάση (x40).

Πίνακας 7: Ιστολογικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.

Περιπτώσεις	Διάγνωση	Ιστολογικό πρότυπο	Εναπόθεση χρωστικής (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια)	Μορφολογία κυττάρων που φέρουν χρωστική
1	Δερματοστιξία	Περιαγγειακό, επιπολής	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
2	Δερματοστιξία	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες, δικτυωτό χόριο και υποδόριο ιστό	Επιμήκη
3	Δερματοστιξία	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
4	Αντίδραση ξένου σώματος σε έδαφος δερματοστιξίας	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει και κοκκιωματώδης αντίδραση	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
5	Σμηγματογόνος κύστη σε έδαφος δερματοστιξίας	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
6	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής	Θηλώδες χόριο	Επιμήκη
7	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
8	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
9	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
10	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
11	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
12	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και δικτυωτό χόριο	Επιμήκη
13	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Χόριο και υποδόριος ιστός	Επιμήκη
14	Δερματίτιδα από στάση	Περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει	Θηλώδες και δικτυωτό χόριο	Επιμήκη

Πίνακας 8: Εναπόθεση κοκκίων χρωστική σε βιοπτικά υλικά δερματοστιξίας.

Περιπτώσεις	% ενδοκυττάρια εναπόθεση χρωστικής	% εξωκυττάρια εναπόθεση χρωστικής
1	55	45
2	90	10
3	60	40
4	70	30
5	40	60

Πίνακας 9: Χρώση Masson-Fontana και Perl's σε βιοπτικά υλικά δερματίτιδας από στάση.

Περιπτώσεις	Χρώση Masson-Fontana (% κατανομή)	Χρώση Perl's (% κατανομή)	Μορφολογία κυττάρων
6	0	75 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
7	25 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	80 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
8	20 εξωκυττάρια	65 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
9	15 εξωκυττάρια	85 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
10	0	70 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
11	20 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	75 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
12	15 εξωκυττάρια	65 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
13	0	65 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη
14	0	65 ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια	Επιμήκη

4.3 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

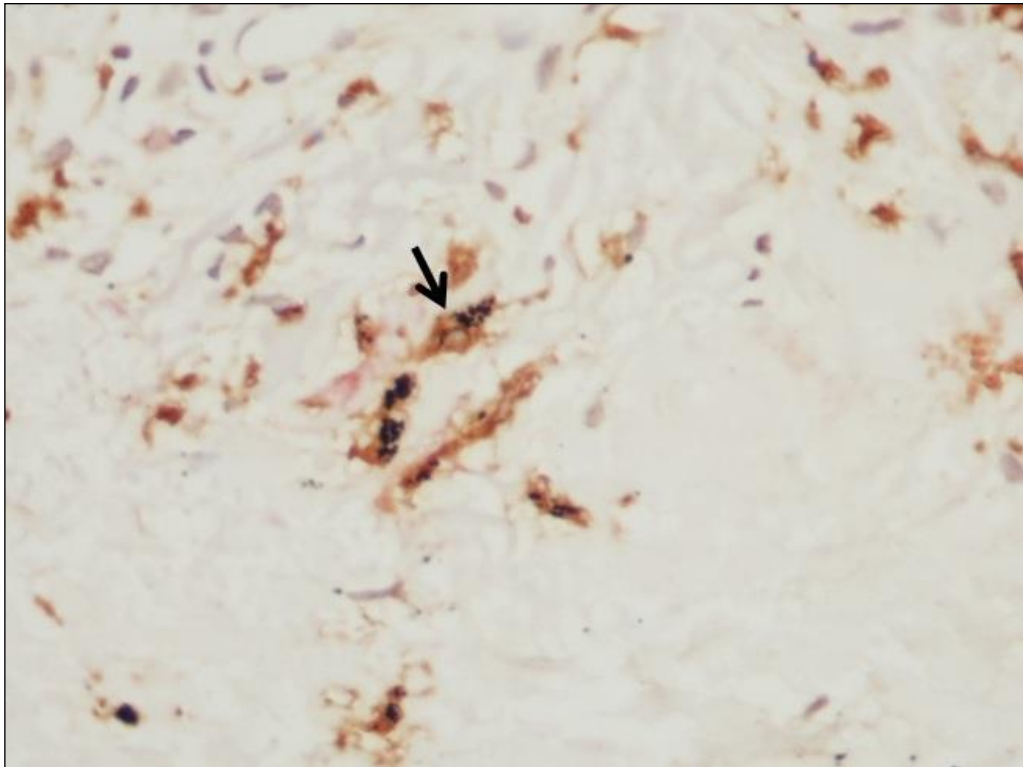
1) Δερματοστιξία: Αξιολογήθηκε η έκφραση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών βιμεντίνη, CD163, CD11c, CD117 και CD34 στους κυτταρικούς πληθυσμούς με ενδοκυττάρια εναποθέσεις εξωγενούς χρωστικής. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν (n=5), όλα τα κύτταρα (100%) με κυτταροπλασματικά κοκκία χρωστικής ήταν θετικά με το δείκτη βιμεντίνη. Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες CD34 και CD117 απέβησαν θετικοί στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και στα μαστοκύτταρα αντίστοιχα, ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφρασή τους σε κύτταρα με κοκκία χρωστικής. Για το διαχωρισμό των μυελογενών δενδριτικών κυττάρων από τα μακροφάγα έγινε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση του δείκτη CD11c και CD163.

Όπως προκύπτει από τις διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, το ποσοστό των κυττάρων του χορίου με πρόσληψη χρωστικής κυμαίνονταν περίπου από 68% έως 78% με διάμεση τιμή (δ.τ) 72,9%. Ανάλογα με την έκφραση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών και την παρουσία ή μη της χρωστικής, τα κύτταρα του χορίου συνιστούν 8 ανοσοφαινότυπους:

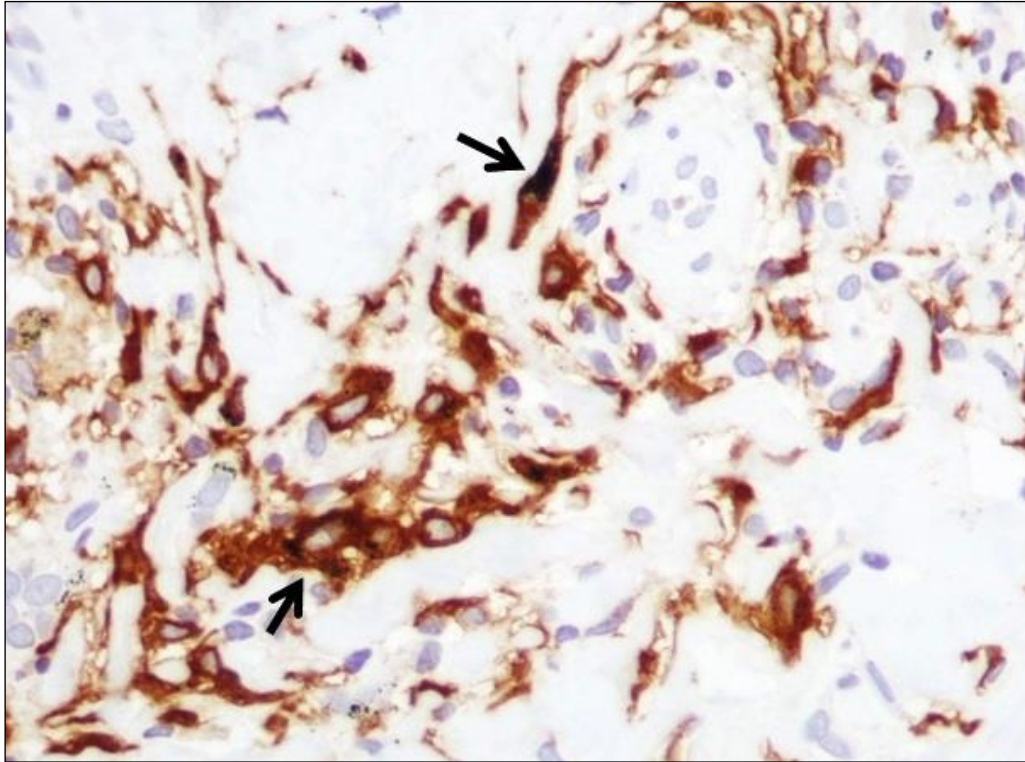
- 1) CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ : μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής
- 2) CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁻: μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα χωρίς πρόσληψη χρωστικής
- 3) CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ : μακροφάγα με πρόσληψη χρωστικής
- 4) CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁻ : μακροφάγα χωρίς πρόσληψη χρωστικής
- 5) CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁺ : δενδριτικά κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής
- 6) CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁻ : δενδριτικά κύτταρα χωρίς πρόσληψη χρωστικής
- 7) CD11c⁻/CD163⁻/pigment⁺ : κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες και προσλαμβάνουν χρωστική
- 8) CD11c⁻/CD163⁻/pigment⁻: κύτταρα που δεν εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες και δεν προσλαμβάνουν χρωστική

Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως το ποσοστό των κυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ κυμαίνονταν από 19,5% έως 41,5% (δ.τ 36%) (Εικόνα 6) ενώ ο αντίστοιχος πληθυσμός που δεν προσλάμβανε χρωστική (CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁻) κυμαίνονταν από 3,6% έως 7,3% (δ.τ 4,2%). Ο ανοσοφαινότυπος CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ ανευρέθηκε σε ποσοστό που κυμαίνονταν από 24,9% έως 41,8% (δ.τ 37%) (Εικόνα 7) και χωρίς πρόσληψη χρωστικής (CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁻) από 1,3%

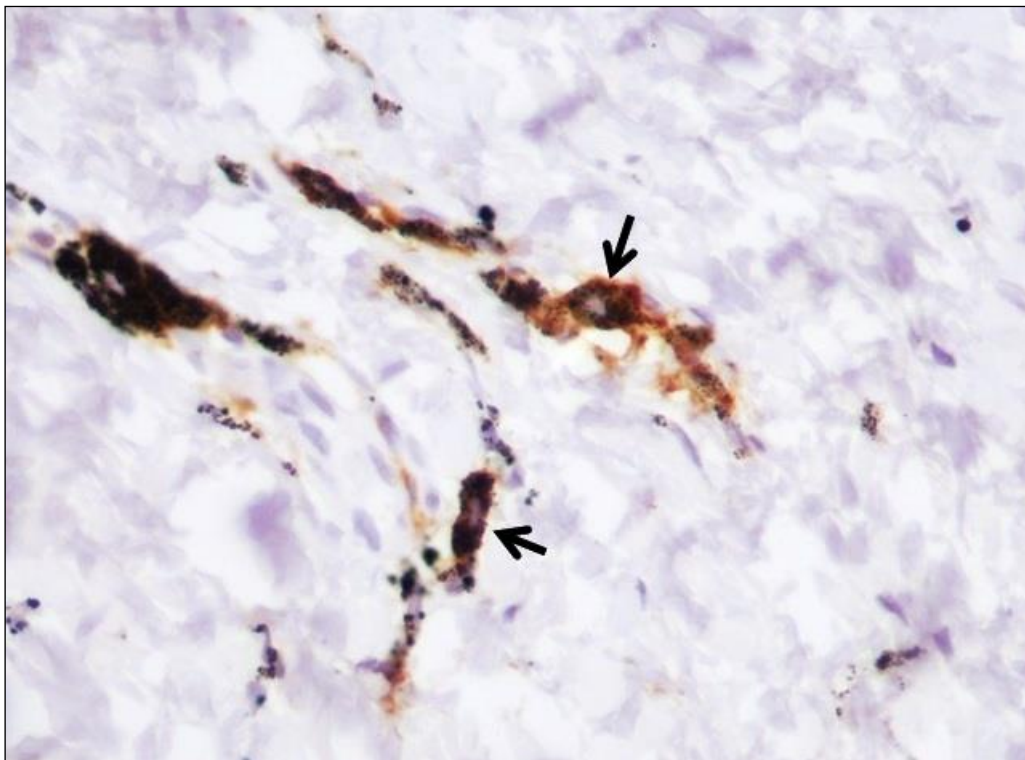
έως 2,2% (δ.τ 1.9%). Όσον αφορά στον ανοσοφαινότυπο $CD11c^+/CD163^-/pigment^+$ το ποσοστό κυμαίνονταν από 2,1% έως 8,9% (δ.τ 4,2%) (Εικόνα 8) και χωρίς πρόσληψη χρωστικής ($CD11c^+/CD163^-/pigment^-$) από 0.9% έως 1,8% (δ.τ 1,5%). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ένας μικρός υποπληθυσμός κυττάρων (1,6%-2,4%) (δ.τ 1,8%), τα οποία ήταν αρνητικά για τους συγκεκριμένους δείκτες αλλά προσλάμβανε χρωστική ($CD11c^-/CD163^-/pigment^+$). Ο τελευταίος ανοσοφαινότυπος ($CD11c^-/CD163^-/pigment^-$) ανευρέθηκε σε ποσοστό που κυμαίνονταν από 14,4% έως 22% (δ.τ 16,8%). Στις Εικόνες 9-13 συνοψίζονται τα ευρήματα των διπλών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους δείκτες CD163 και CD11c.



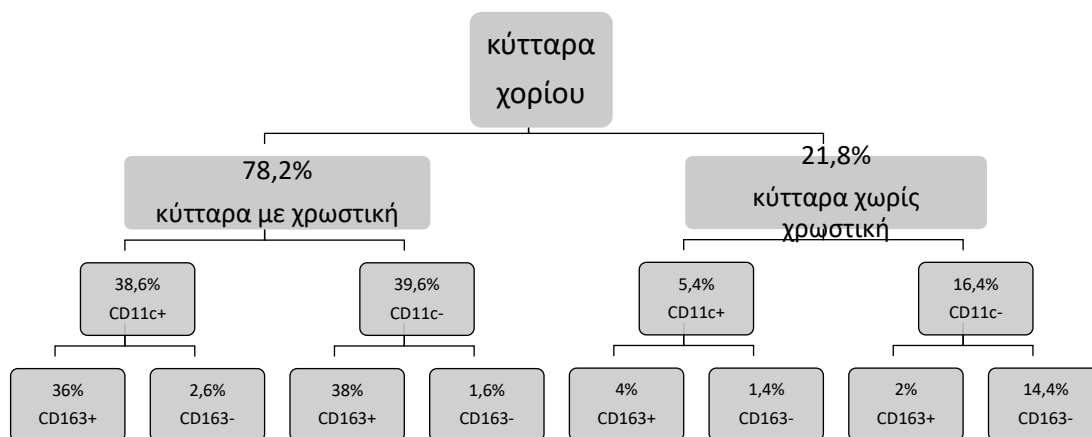
Εικόνα 6: Περίπτωση δερματοστιξίας. $CD11c^+/CD163^+$ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



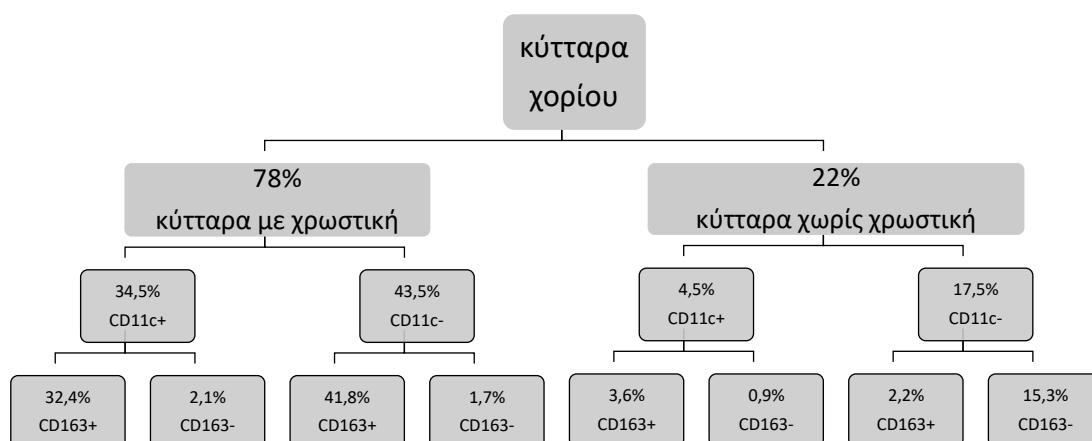
Εικόνα 7: Περίπτωση δερματοσιξίας. CD11c⁺/CD163⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



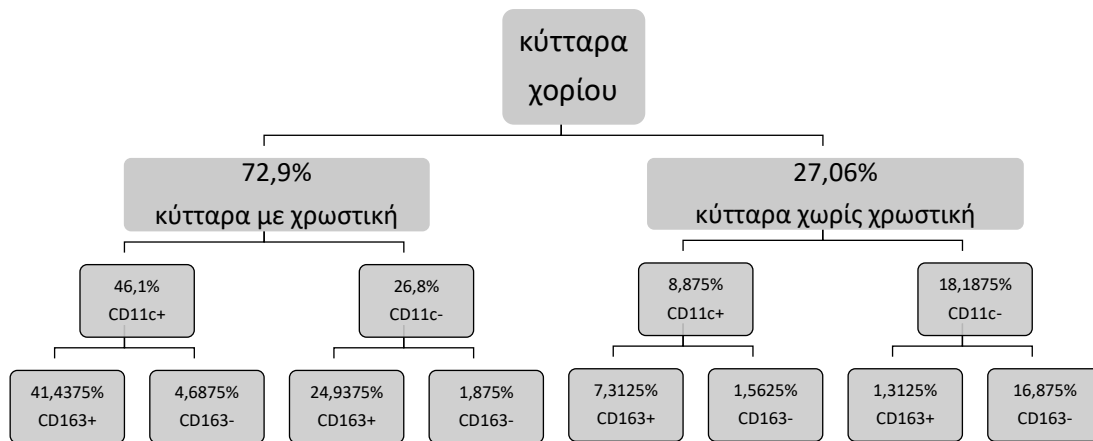
Εικόνα 8: Περίπτωση δερματοσιξίας. CD11c⁺/CD163⁻ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



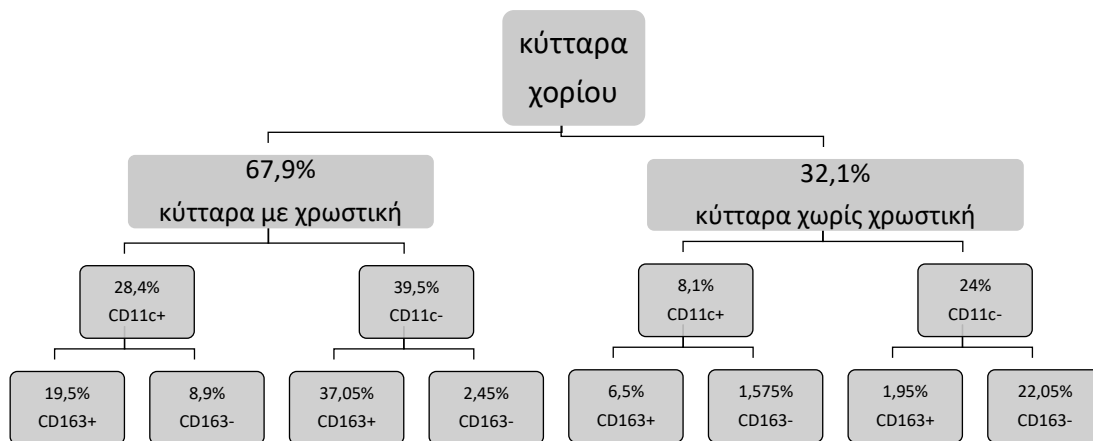
Εικόνα 9: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 1) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



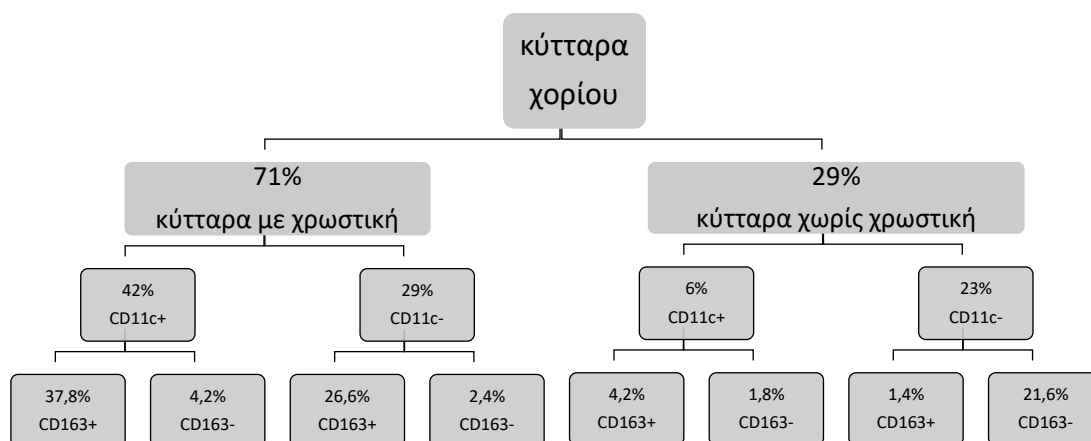
Εικόνα 10: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 2) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 11: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 3) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 12: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 4) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 13: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματοστιξίας (δείγμα 5) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.

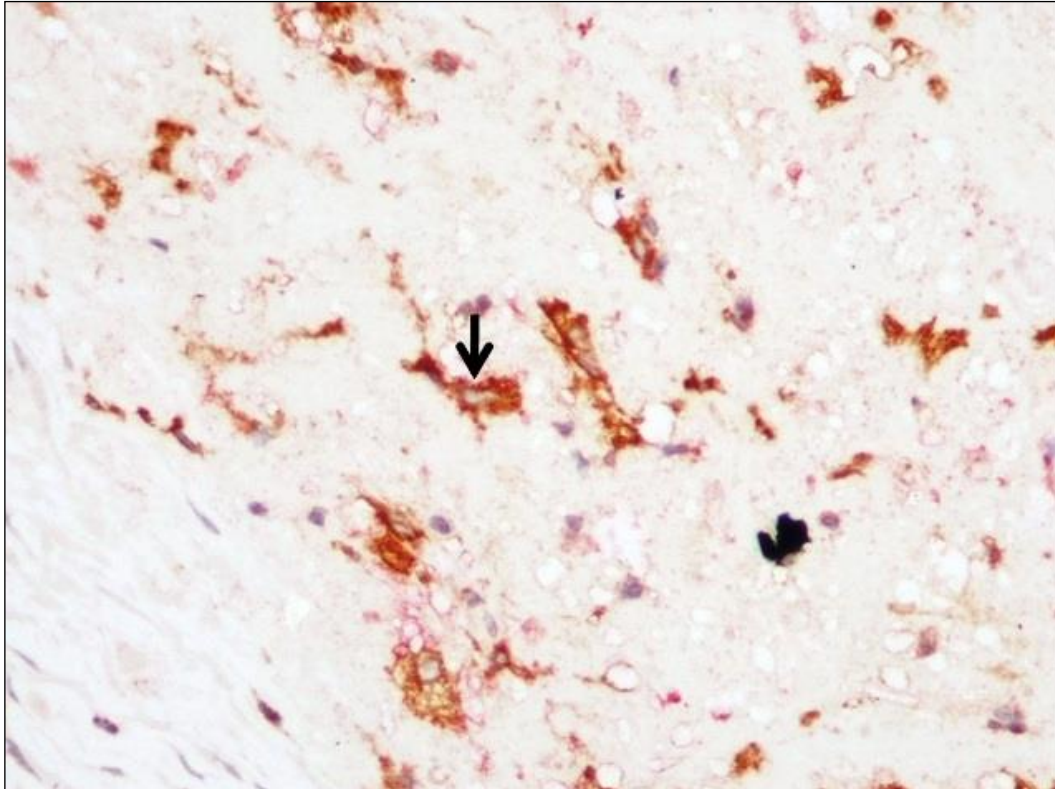
2) Δερματίτιδα από στάση: Αξιολογήθηκε η έκφραση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών: βιμεντίνη, CD163, CD11c, CD117 και CD34 στους κυτταρικούς πληθυσμούς με ενδοκυττάρειες εναποθέσεις ενδογενούς χρωστικής (μελανίνη ή/και αιμοσιδηρίνη). Σε όλες τις περιπτώσεις (n=9) όλα τα κύτταρα με κυτταροπλασματικά κοκκία χρωστικής (100%) εκφράζουν βιμεντίνη. Με την αξιολόγηση των διπλών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους δείκτες CD163 και CD11c επιβεβαιώθηκε η παρουσία δενδριτικών κυττάρων και μακροφάγων που φέρουν κοκκία χρωστικής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 8-16 για κάθε περίπτωση δερματίτιδας από στάση ξεχωριστά. Από τις διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, το ποσοστό των κυττάρων του χορίου με πρόσληψη χρωστικής κυμαίνονταν περίπου από 70% έως 95% (δ.τ 82%).

Αντίστοιχα και με τις περιπτώσεις της δερματοστιξίας στο χόριο προέκυψαν 8 ανοσοφαινότυποι:

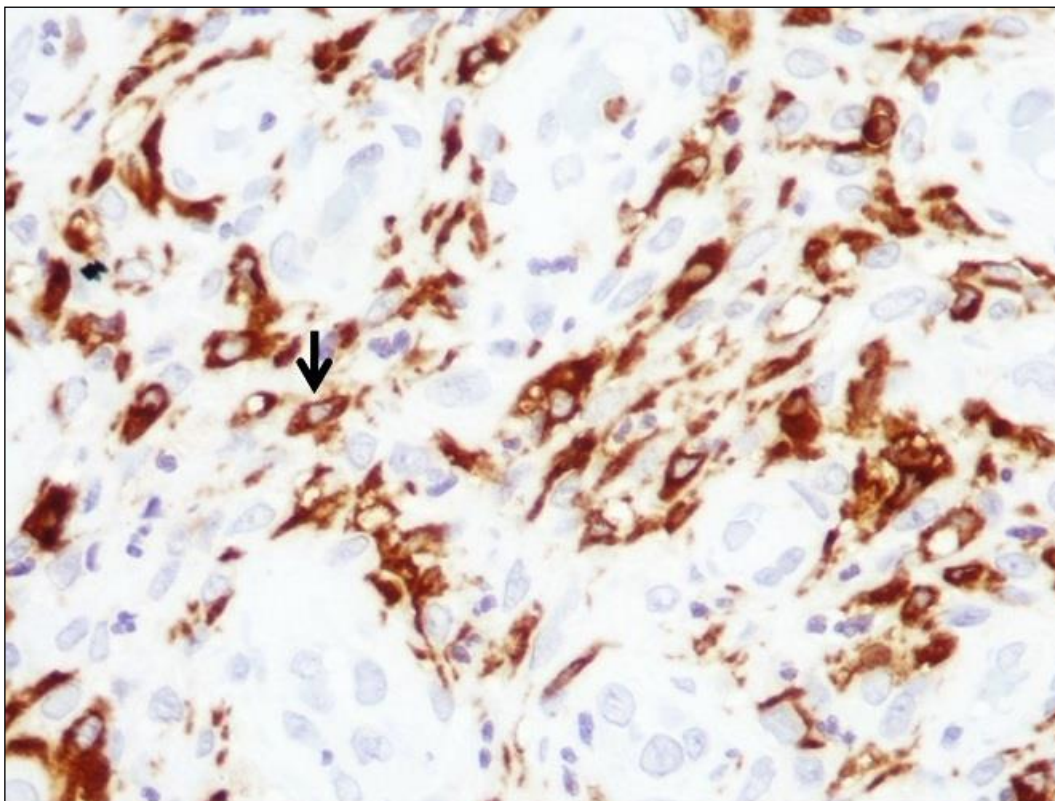
- 1) CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ : μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής
- 2) CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁻: μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα χωρίς πρόσληψη χρωστικής
- 3) CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ : μακροφάγα με πρόσληψη χρωστικής
- 4) CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁻ : μακροφάγα χωρίς πρόσληψη χρωστικής

- 5) CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁺ : δενδριτικά κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής
- 6) CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁻: δενδριτικά κύτταρα χωρίς πρόσληψη χρωστικής
- 7) CD11c⁻/CD163⁻/pigment⁺ : κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες και προσλαμβάνουν χρωστική
- 8) CD11c⁻/CD163⁻/pigment⁻: κύτταρα που δεν εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες και δεν προσλαμβάνουν χρωστική

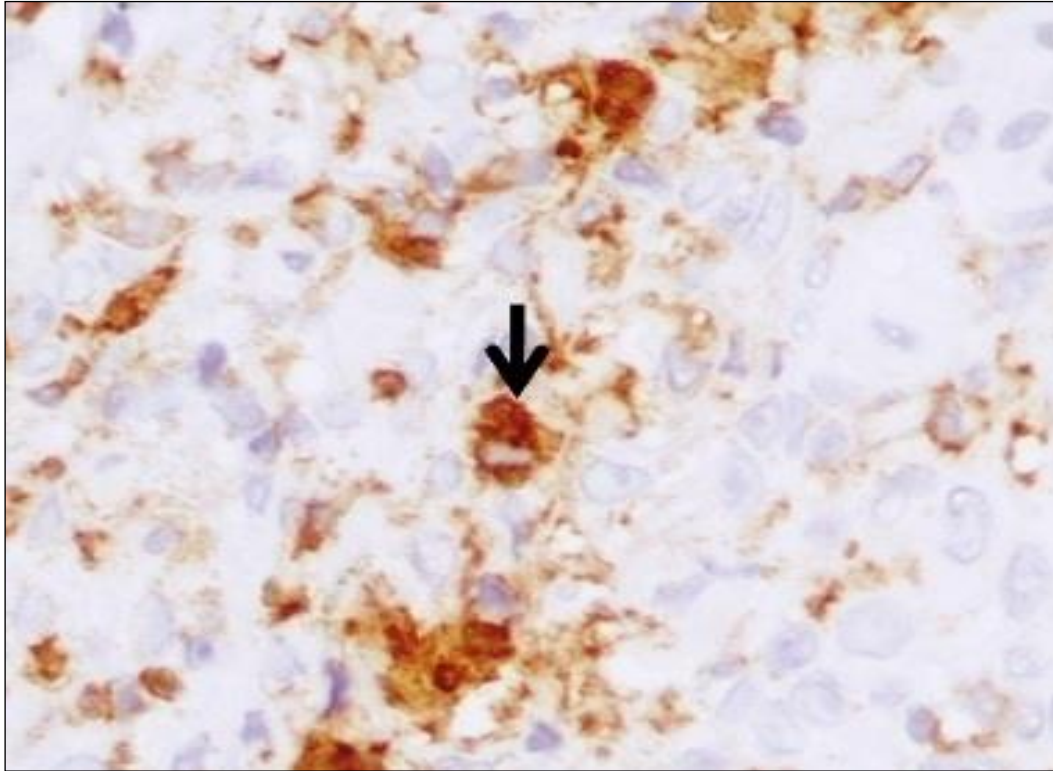
Το ποσοστό κυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ κυμαίνονταν από 37% έως 58,6% (δ.τ 42%) (Εικόνα 14) ενώ ο αντίστοιχος πληθυσμός που δεν προσλάμβανε χρωστική CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁻ από 0,2% έως 1,9% (δ.τ 1,2%). Κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ ανευρέθησαν σε ποσοστό που κυμαίνονταν από 17,8% έως 38,3% (δ.τ 27,5%) (Εικόνα 15) και χωρίς πρόσληψη χρωστικής (CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁻) από 0,3% έως 6,5%. (δ.τ 0,7%). Το ποσοστό κυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁺ κυμαίνονταν από 0,5% έως 16,6% (δ.τ 2,6%) (Εικόνα 16) και αυτός χωρίς πρόσληψη χρωστικής (CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁻) από 0% έως 0,6% (δ.τ 0,2%). Ο έβδομος ανοσοφαινότυπος ανευρέθηκε σε μικρό ποσοστό (1,6% έως 2,8%) (δ.τ 2%) και ο τελευταίος (CD163⁻/CD11c⁻/pigment⁻) ανευρέθηκε σε ποσοστό 3,9% έως 31,6% (δ.τ 17,1%). Παρομοίως με τις περιπτώσεις δερματοστιξίας, σε καμία περίπτωση δερματίτιδας από στάση δεν παρατηρήθηκε έκφραση των δεικτών CD117 και CD34 σε κύτταρα με κοκκία χρωστικής. Στις εικόνες 17-25 συνοψίζονται τα ευρήματα των διπλών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τους δείκτες CD163 και CD11c.



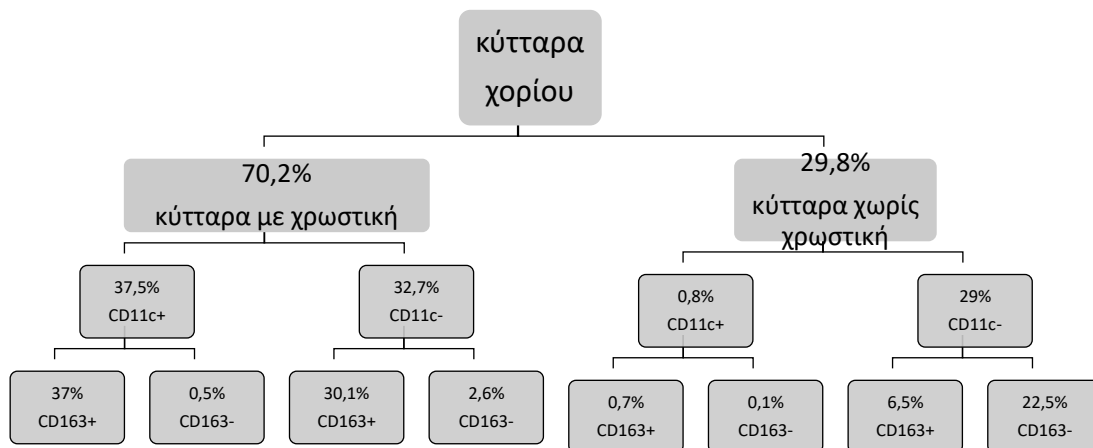
Εικόνα 14: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c⁺/CD163⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



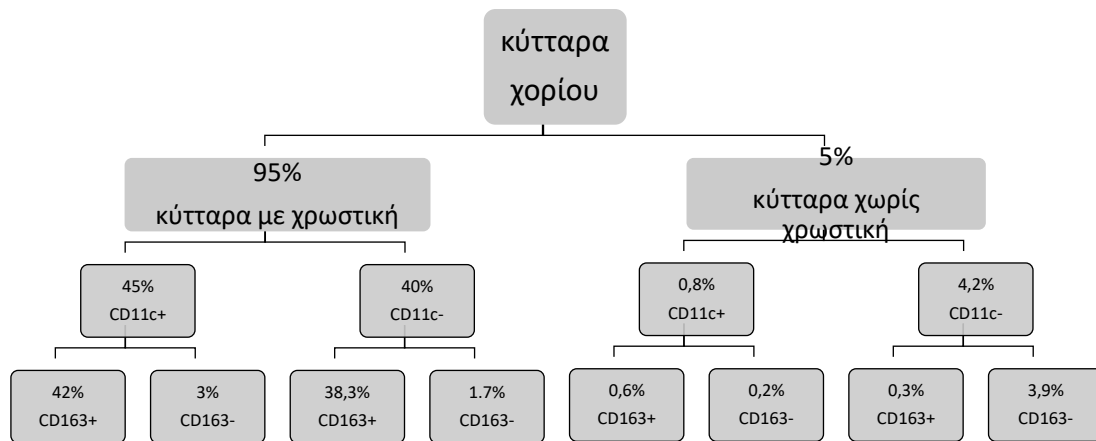
Εικόνα 15: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c⁺/CD163⁺ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



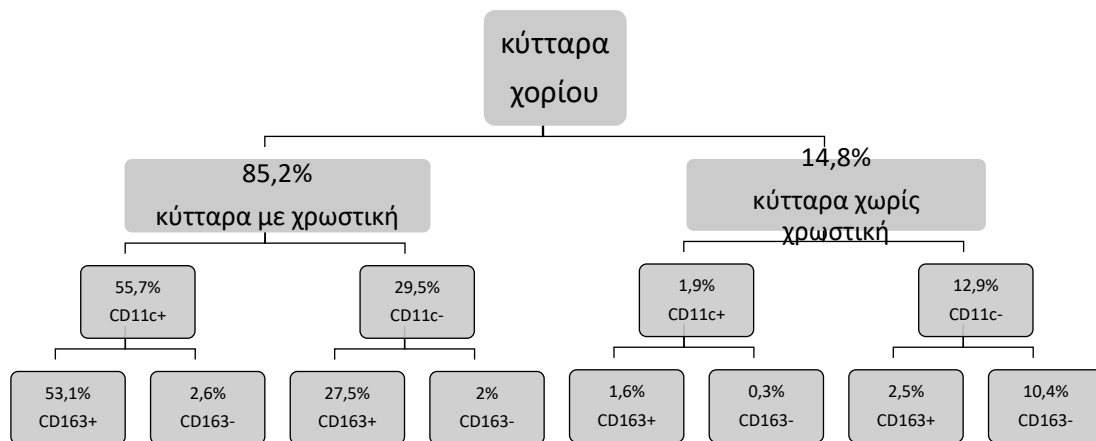
Εικόνα 16: Περίπτωση δερματίτιδας από στάση. CD11c⁺/CD163⁻ κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής (x600).



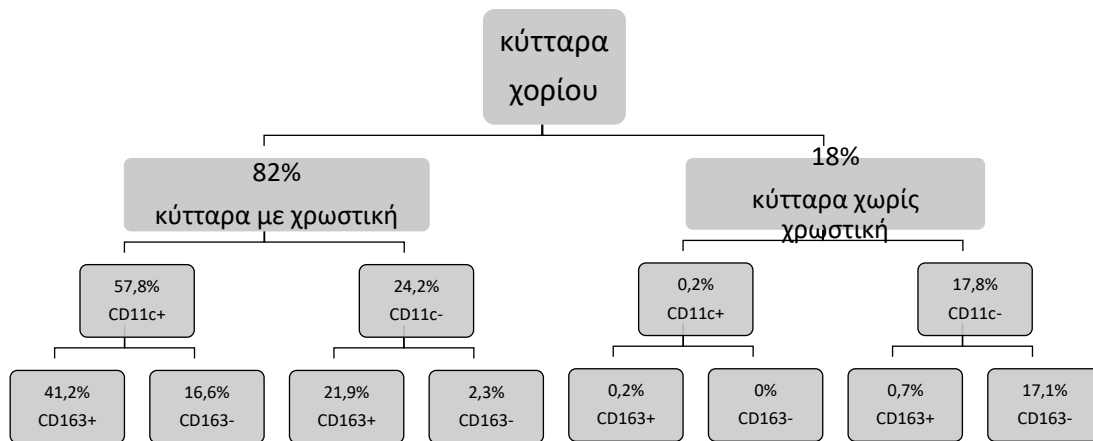
Εικόνα 17: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 6) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



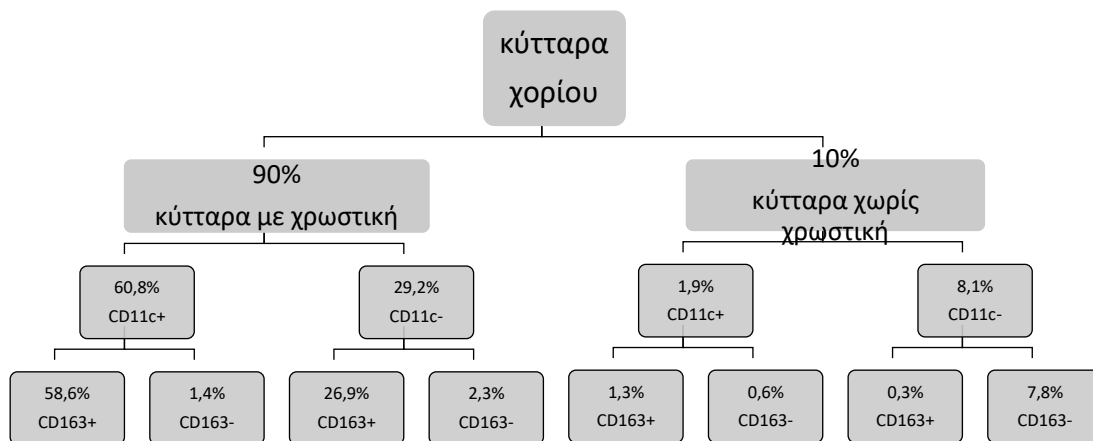
Εικόνα 18: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 7) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



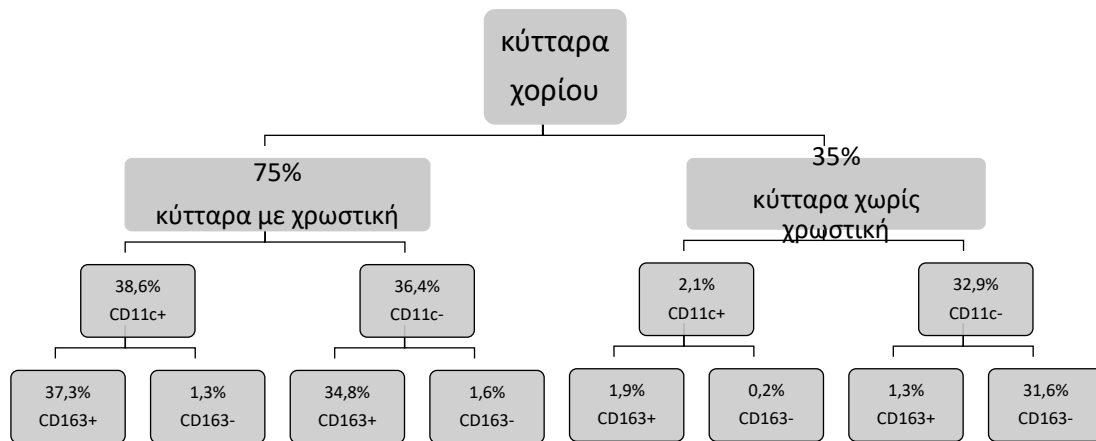
Εικόνα 19: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 8) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



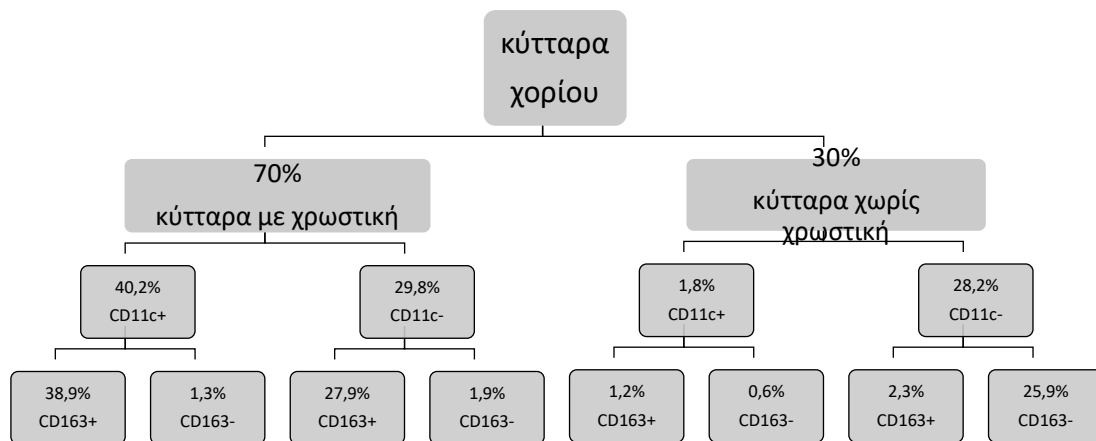
Εικόνα 20: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 9) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



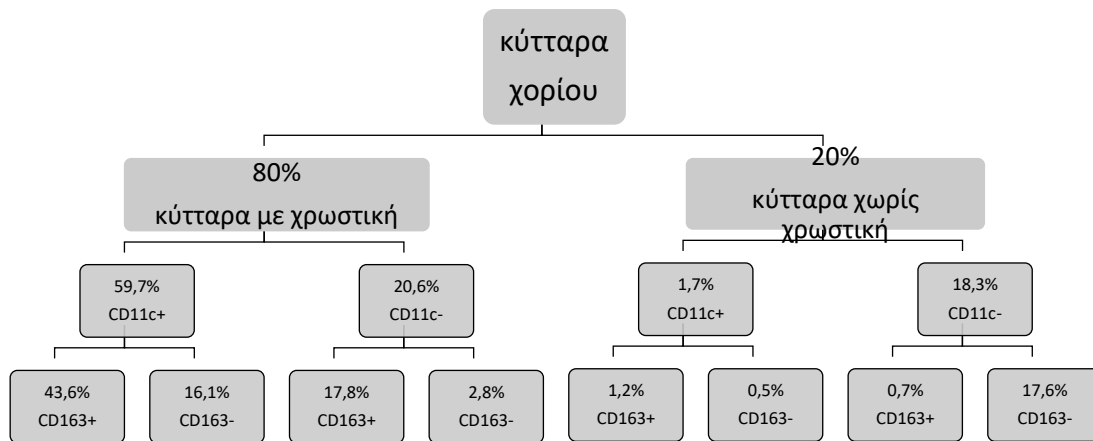
Εικόνα 21: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 10) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



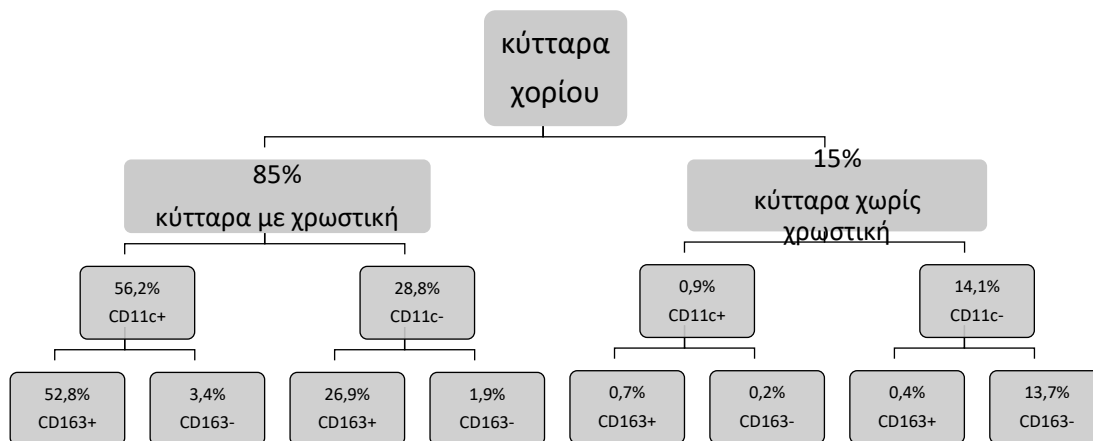
Εικόνα 22: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 11) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 23: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 12) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 24: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 13) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.



Εικόνα 25: Ιστόγραμμα για τη διπλή ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD163 και CD11c σε περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (δείγμα 14) σε κύτταρα με ή χωρίς πρόσληψη χρωστικής.

Οι κατανομές των διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών του χορίου ανάλογα με την αποθήκευση χρωστικής και την έκφραση των δεικτών CD11c και CD163 σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση συνοψίζονται στους Πίνακες 10-14.

Πίνακας 10:Κύτταρα χορίου με αποθήκευση χρωστικής ('pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).

Pigment positive									
State	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻	11c ⁺	11c ⁻	163 ⁺	163 ⁻	Pigment
T	36	2,6	38	1,6	38,6	39,6	74	4,2	78,2
T	32,4	2,1	41,8	1,7	34,5	43,5	74,2	3,8	78
T	41,4	4,7	24,9	1,9	46,1	26,8	66,3	6,6	72,9
T	19,5	8,9	37,1	2,5	28,4	39,6	56,6	11,4	68
T	37,8	4,2	26,6	2,4	42	29	64,4	6,6	71
D	37	0,5	30,1	2,6	37,5	32,7	67,1	3,1	70,2
D	52	3	38,3	1,7	55	40	90,3	4,7	95
D	53,1	2,6	27,5	2	55,7	29,5	80,6	4,6	85,2
D	41,2	16,6	21,9	2,3	57,8	24,2	63,1	18,9	82
D	58,6	1,4	26,9	2,3	60	29,2	85,5	3,7	89,2
D	37,3	1,3	34,8	1,6	38,6	36,4	72,1	2,9	75
D	38,9	1,3	27,9	1,9	40,2	29,8	66,8	3,2	70
D	46,3	16,1	17,8	2,8	62,4	20,6	64,1	18,9	83
D	52,8	3,4	26,9	1,9	56,2	28,8	79,7	5,3	85

Πίνακας 11: Κύτταρα χορίου με αποθήκευση χρωστικής ('pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών κυτταρικών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου με αποθήκευση χρωστικής. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).

Pigment positive relative								
State	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻	11c ⁺	11c ⁻	163 ⁺	163 ⁻
T	46,04	3,32	48,59	2,05	49,36	50,64	94,63	5,37
T	41,54	2,69	53,59	2,18	44,23	55,77	95,13	4,87
T	56,79	6,45	34,16	2,61	63,24	36,76	90,95	9,05
T	28,68	13,09	54,56	3,68	41,76	58,24	83,24	16,76
T	53,24	5,92	37,46	3,38	59,15	40,85	90,70	9,30
D	52,71	0,71	42,88	3,70	53,42	46,58	95,58	4,42
D	54,74	3,16	40,32	1,79	57,89	42,11	95,05	4,95
D	62,32	3,05	32,28	2,35	65,38	34,62	94,60	5,40
D	50,24	20,24	26,71	2,80	70,49	29,51	76,95	23,05
D	65,70	1,57	30,16	2,58	67,26	32,74	95,85	4,15
D	49,73	1,73	46,40	2,13	51,47	48,53	96,13	3,87
D	55,57	1,86	39,86	2,71	57,43	42,57	95,43	4,57
D	55,78	19,40	21,45	3,37	75,18	24,82	77,23	22,77
D	62,12	4,00	31,65	2,24	66,12	33,88	93,76	6,24

Πίνακας 12: Κύτταρα χορίου χωρίς αποθήκευση χρωστικής ('non-pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).

Pigment negative absolute									
State	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻	11c ⁺	11c ⁻	163 ⁺	163 ⁻	No Pigment
T	4	1,4	2	14,4	5,4	16,4	6	15,8	21,8
T	3,6	0,9	2,2	15,3	4,5	17,5	5,8	16,2	22
T	7,31	1,56	1,31	16,88	8,87	18,19	8,62	18,44	27,06
T	6,5	1,58	1,95	22,05	8,08	24	8,45	23,63	32,08
T	4,2	1,8	1,4	21,6	6	23	5,6	23,4	29
D	0,7	0,1	6,5	22,5	0,8	29	7,2	22,6	29,8
D	0,6	0,2	0,3	3,9	0,8	4,2	0,9	4,1	5
D	1,6	0,3	2,5	10,4	1,9	12,9	4,1	10,7	14,8
D	0,2	0,1	0,7	17,1	0,3	17,8	0,9	17,2	18,1
D	1,3	0,6	0,3	7,8	1,9	8,1	1,6	8,4	10
D	1,9	0,2	1,9	21,6	2,1	23,5	3,8	21,8	25,6
D	1,2	0,6	2,3	25,9	1,8	28,2	3,5	26,5	30
D	1,2	0,5	0,7	17,6	1,7	18,3	1,9	18,1	20
D	0,7	0,2	0,4	13,7	0,9	14,1	1,1	13,9	15

Πίνακας 13: Κύτταρα χορίου χωρίς αποθήκευση χρωστικής ('non-pigmented'): % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου χωρίς αντίχρωση χρωστικής. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).

Pigment negative relative								
State	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻	11c ⁺	11c ⁻	163 ⁺	163 ⁻
T	18,35	6,42	9,17	66,06	24,77	75,23	27,52	72,48
T	16,36	4,09	10,00	69,55	20,45	79,55	26,36	73,64
T	27,01	5,76	4,84	62,38	32,78	67,22	31,86	68,14
T	20,26	4,93	6,08	68,73	25,19	74,81	26,34	73,66
T	14,48	6,21	4,83	74,48	20,69	79,31	19,31	80,69
D	2,35	0,34	21,81	75,50	2,68	97,32	24,16	75,84
D	12,00	4,00	6,00	78,00	16,00	84,00	18,00	82,00
D	10,81	2,03	16,89	70,27	12,84	87,16	27,70	72,30
D	1,10	0,55	3,87	94,48	1,66	98,34	4,97	95,03
D	13,00	6,00	3,00	78,00	19,00	81,00	16,00	84,00
D	7,42	0,78	7,42	84,38	8,20	91,80	14,84	85,16
D	4,00	2,00	7,67	86,33	6,00	94,00	11,67	88,33
D	6,00	2,50	3,50	88,00	8,50	91,50	9,50	90,50
D	4,67	1,33	2,67	91,33	6,00	94,00	7,33	92,67

Πίνακας 14: % κυττάρων των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου. Διπλή χρώση για CD11c και CD163. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό (T=δερματοστιξία, D=δερματίτιδα από στάση).

All								
State	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻	11c ⁺	11c ⁻	163 ⁺	163 ⁻
T	40	4	40	16	44	56	80	20
T	36	3	44	17	39	61	80	20
T	48,71	6,26	26,21	18,78	54,97	44,99	74,92	25,04
T	26	10,48	39,05	24,55	36,48	63,6	65,05	35,03
T	42	6	28	24	48	52	70	30
D	37,7	0,6	36,6	25,1	38,3	61,7	74,3	25,7
D	52,6	3,2	38,6	5,6	55,8	44,2	91,2	8,8
D	54,7	2,9	30	12,4	57,6	42,4	84,7	15,3
D	41,4	16,7	22,6	19,4	58,1	42	64	36,1
D	59,9	2	27,2	10,1	61,9	37,3	87,1	12,1
D	39,2	1,5	36,7	23,2	40,7	59,9	75,9	24,7
D	40,1	1,9	30,2	27,8	42	58	70,3	29,7
D	47,5	16,6	18,5	20,4	64,1	38,9	66	37
D	53,5	3,6	27,3	15,6	57,1	42,9	80,8	19,2

4.4 Διαφέρουν οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί, που ανιχνεύονται με τον συνδυασμό CD11c και CD163 ως προς την αποθηκευτική τους ικανότητα;

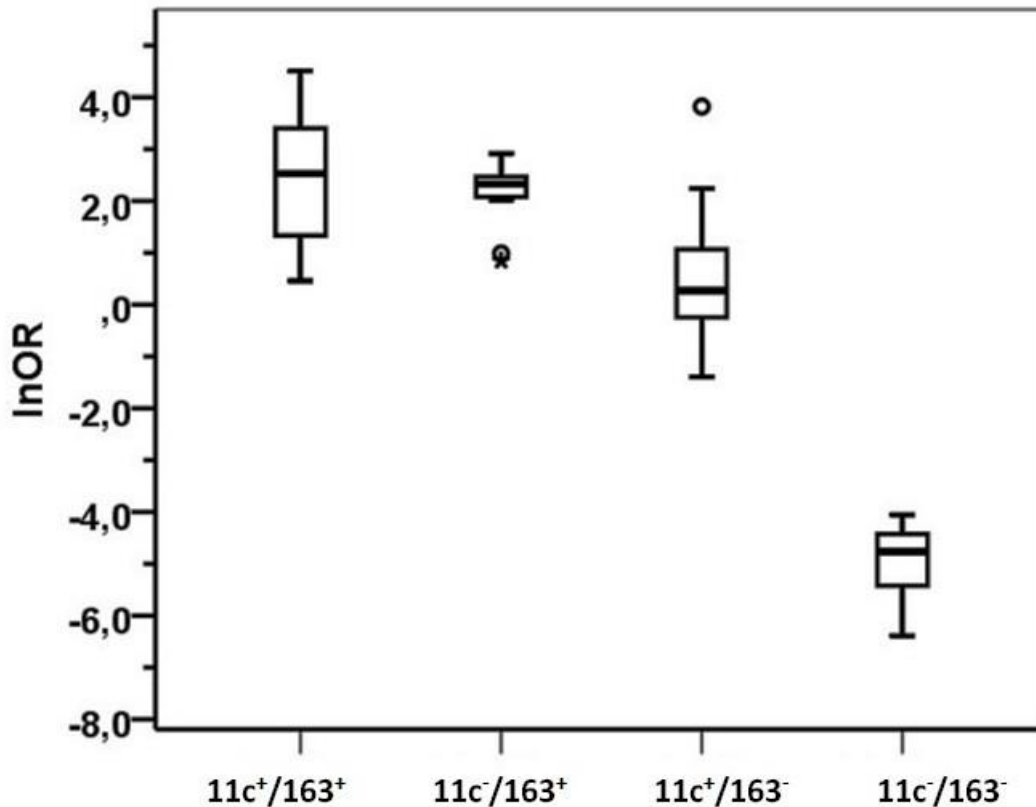
Οι προϋποθέσεις /συνθήκες της ανίχνευσης αποθήκευσης χρωστικής σε κυτταρικό επίπεδο είναι γενικά οι ακόλουθες:

1. Ικανότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού να αποθηκεύσει χρωστική.
2. Παρουσία / διαθεσιμότητα χρωστικής στο άμεσο κυτταρικό περιβάλλον.

Με την παραδοχή ότι οι υποπληθυσμοί έχουν παρόμοια χωρο-κατανομή στο χόριο τα odds ratios (OR) των pigmented σε σύγκριση με τα non-pigmented κύτταρα (Πίνακας 15) είναι μέτρο ικανότητας αποθήκευσης του κυτταρικού πληθυσμού και παρουσιάζονται γραφικά στην Εικόνα 26 (σε φθίνουσα σειρά από αριστερά προς δεξιά).

Πίνακας 15: OR pigmented:non-pigmented – all specimens (N=14, T: δερματοστιξία, D: δερματίτιδα από στάση).

	Cell subpopulation			
	11c ⁺ /163 ⁺	11c ⁺ /163 ⁻	11c ⁻ /163 ⁺	11c ⁻ /163 ⁻
T	3,796209	0,501134	9,358209	0,010734
T	3,631579	0,648661	10,39227	0,009757
T	3,550909	1,126494	10,1968	0,016139
T	1,582268	2,907002	18,55154	0,017362
T	6,722892	0,9501	11,81081	0,011986
D	46,3296	2,13056	2,690696	0,012479
D	8,868217	0,782609	10,5826	0,005139
D	13,6472	1,521388	2,344887	0,01017
D	90,37745	45,68807	9,057761	0,001688
D	12,81599	0,24981	13,96094	0,007465
D	12,34134	2,240163	10,79811	0,004037
D	30,01929	0,92722	7,981307	0,004417
D	19,76476	9,38565	7,527169	0,004761
D	33,49778	3,083333	16,89931	0,00217
Mean				
All	20,49611	5,153014	10,15374	0,00845
Dermatitis	29,74018	7,334312	9,093643	0,005814
Tattoo	3,856771	1,226678	12,06193	0,013195



Εικόνα 26: Box-plot σχεδιάγραμμα των OR “to be pigmented” για τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς (όλα τα δείγματα).

4.4.1 Η αποθηκευτική ικανότητα των κυτταρικών υποπληθυσμών

Για κάθε ένα κυτταρικό υποπληθυσμό συγκρίνουμε τις τιμές των OR με την τιμή $OR=1$ ($\ln OR=0$) ομοιόμορφης κατανομής των κυττάρων με το συγκεκριμένο ανοσοφαινότυπο σε pigmented και non-pigmented κύτταρα (t-test, Πίνακας 16): Τόσο για το σύνολο των περιστατικών, όσο και για τη δερματοστιξία και τη δερματίτιδα από στάση ξεχωριστά η % συχνότητα του πληθυσμού ‘CD11c⁺/CD163⁻’ δεν διαφέρει ανάμεσα στα pigmented και στα non-pigmented κύτταρα. Αντίθετα τα OR των κυττάρων που εκφράζουν CD163 (είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με CD11c) είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από $OR=1$, υποδεικνύοντας κυτταρικό υποπληθυσμό με επιλεκτική ικανότητα αποθήκευσης χρωστικής. Τέλος τα κύτταρα που δεν εκφράζουν ούτε CD11c ούτε CD163 δεν έχουν χαρακτηρήρα αποθηκευτικών κυττάρων.

Πίνακας 16: Σύγκριση του OR ενός κυτταρικού τύπου να είναι αποθηκευτικό σε σχέση με την τιμή ίσης κατανομής του OR, σε αποθηκευτικά και μη κύτταρα (OR=1, lnOR=0): (Α) Δερματοστιξία, (Β) Δερματίτιδα από στάση και (Γ) όλα τα δείγματα μαζί.

Α. Δερματοστιξία (N=5)

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
OR11c ⁺ /163 ⁺	5,423	4	,006	1,25105	,6105	1,8916
OR11c ⁺ /163 ⁻	,008	4	,994	,00226	-,8353	,8399
OR11c ⁻ /163 ⁺	20,224	4	,000	2,45779	2,1204	2,7952
OR11c ⁻ /163 ⁻	-38,516	4	,000	-4,35364	-4,6675	-4,0398

Β. Δερματίτιδα από στάσεως (N=9)

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
OR11c ⁺ /163 ⁺	12,478	8	,000	3,12185	2,5449	3,6988
OR11c ⁺ /163 ⁻	1,654	8	,137	,82909	-,3268	1,9850
OR11c ⁻ /163 ⁺	8,949	8	,000	2,03816	1,5130	2,5634
OR11c ⁻ /163 ⁻	-24,387	8	,000	-5,32668	-5,8304	-4,8230

Γ. Όλα (N=14)

	Test Value = 0					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
OR11c ⁺ /163 ⁺	8,071	13	,000	2,45371	1,7969	3,1105
OR11c ⁺ /163 ⁻	1,532	13	,150	,53380	-,2192	1,2867
OR11c ⁻ /163 ⁺	13,769	13	,000	2,18803	1,8447	2,5313
OR11c ⁻ /163 ⁻	-25,886	13	,000	-4,97916	-5,3947	-4,5636

4.4.2 Σύγκριση της αποθηκευτικής ικανότητας των υποπληθυσμών

Οι τιμές των OR αυξάνονται στατιστικά σημαντικά για τα κύτταρα που εκφράζουν CD11c σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν εκφράζουν κανένα από τους δύο δείκτες (CD11c, CD163) ($p=0.000$; t-test) καθώς και για τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο CD163 (CD11c⁻/CD163⁺) σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο CD11c (CD11c⁺/CD163⁻; $p=0.001$; Πίνακας 17). Αντίθετα τα OR των κυττάρων που εκφράζουν και τους δύο δείκτες (CD11c⁺/CD163⁺) ταυτόχρονα δεν διαφέρουν σημαντικά από τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο CD163 (CD11c⁻/CD163⁺), ($p=0.511$).

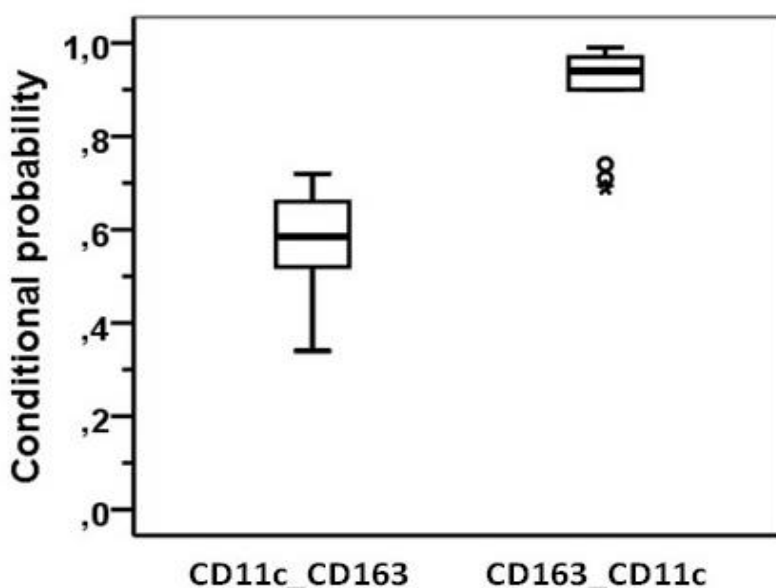
Πίνακας 17: Σύγκριση των OR “pigmented vs. non-pigmented” των κυτταρικών υποπληθυσμών που προσδιορίζονται ανάλογα με την έκφραση των δεικτών CD11c και CD163.

Paired Samples Test

Phenotype	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
OR11c ⁺ /163 ⁻ - OR11c ⁺ /163 ⁻	1,91991	1,18934	0,31786	1,23321	2,60661	6,04	13	0
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁺	0,26568	1,47091	0,39312	-0,5836	1,11496	0,676	13	0,511
OR11c ⁺ /163 ⁻ - OR11c ⁻ /163 ⁻	7,43287	1,73743	0,46435	6,42971	8,43604	16,007	13	0
OR11c ⁺ /163 ⁻ - OR11c ⁻ /163 ⁺	-1,65423	1,47993	0,39553	-2,50871	-0,79974	-4,182	13	0,001
OR11c ⁺ /163 ⁻ - OR11c ⁻ /163 ⁻	5,51296	1,80329	0,48195	4,47178	6,55415	11,439	13	0
OR11c ⁻ /163 ⁻ - OR11c ⁻ /163 ⁻	7,16719	1,01077	0,27014	6,58359	7,75079	26,532	13	0

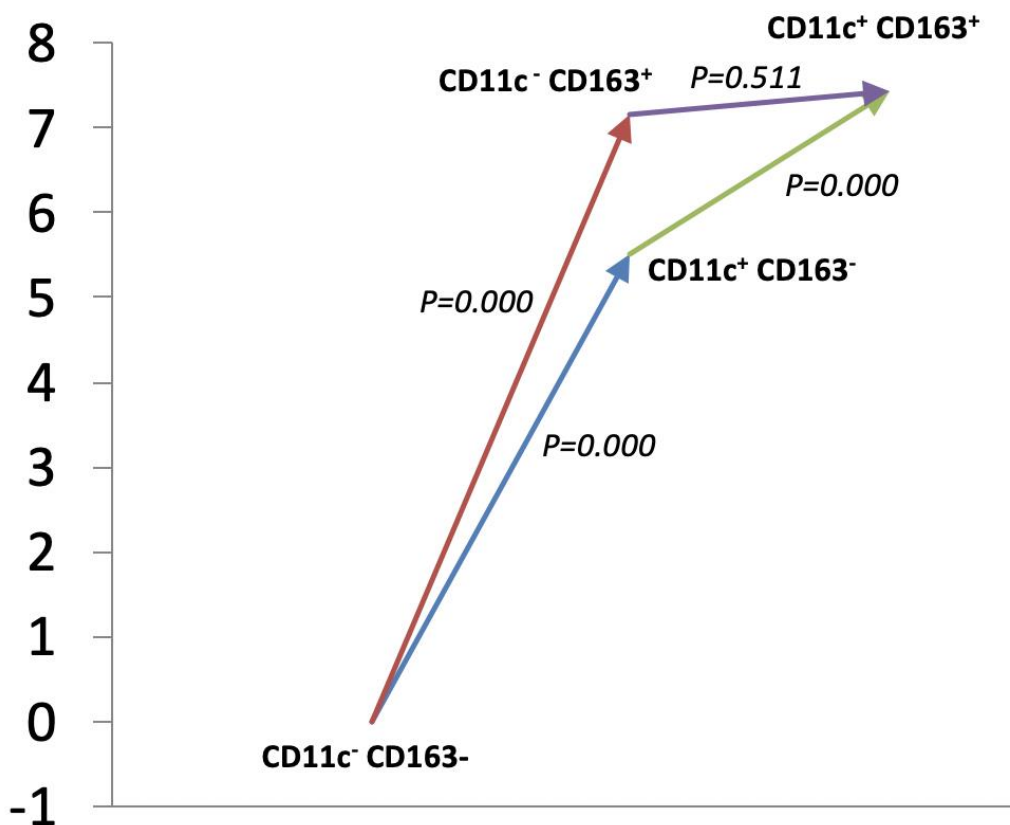
Η έκφραση είτε CD11c είτε CD163 αυξάνει σημαντικά την ικανότητα των κυττάρων για αποθήκευση (σύγκριση με τα διπλά αρνητικά), ιδιαίτερα η έκφραση CD163 (Πίνακας 17): Η αποθηκευτική ικανότητα των κυττάρων που εκφράζουν CD163 είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των CD11c⁺ και η επιπλέον έκφραση CD11c στα τελευταία δεν αυξάνει σημαντικά την ‘αποθηκευτική τους ικανότητα’, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με την έκφραση επιπλέον CD163 σε κύτταρα που εκφράζουν CD11c (σύγκριση με τα ‘διπλά θετικά’). Αυτό έχει σαν συνέπεια τα OR ‘αποθήκευσης’ των κυττάρων, που εκφράζουν μόνο CD163 ($\ln OR=2,19\pm 0.158$) να είναι σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα εκείνων, που εκφράζουν μόνο CD11c ($\ln OR=0,53\pm 0,35$; $p=0,001$, t-test; Εικόνα 26).

Η τελευταία διαφορά γίνεται επίσης φανερή από την σύγκριση των σχετικών πιθανοτήτων (Bayes) να έχουν χαρακτήρα αποθηκευτικού κυττάρου τα κύτταρα, που εκφράζουν CD11c ανάμεσα σε εκείνα που εκφράζουν CD163 και το ανάποδο: Σε αντίθεση με την έκφραση CD11c μόνο στο περίπου 60% των CD163⁺ κυττάρων (είναι δηλ. ‘διπλά θετικά’: CD11c⁺/CD163⁺) πάνω από το 90% των CD11c⁺ κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής είναι και CD163⁺ (p=0.001, Wilcoxon signed ranks test; Εικόνα 27). Επιπλέον, η σχετική πιθανότητα συνέκφρασης CD11c και CD163 ανάμεσα στα κύτταρα, που εκφράζουν CD163 δεν διαφέρει ανάμεσα στους πληθυσμούς με και χωρίς χρωστική: Η επιπλέον έκφραση CD11c δεν τροποποιεί την ικανότητα αποθήκευσης χρωστικής, που στην περίπτωση του πληθυσμού με έκφραση CD163 φαίνεται να καθορίζεται αποκλειστικά από την διαθεσιμότητα της χρωστικής στο περιβάλλον των κυττάρων (p=0,511, Πίνακας 17 και Εικόνα 26). Αντίθετα, η πλειονότητα των CD11c⁺ κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής συνεκφράζουν CD163 και αυτή η πιθανότητα αποτυπώνεται και σε σημαντικά υψηλότερο OR για τα διπλά θετικά κύτταρα σε σύγκριση με εκείνα, που εκφράζουν μόνο CD11c (p=0,000, Πίνακας 17 και Εικόνα 26).



Εικόνα 27: Σχετική πιθανότητα έκφρασης CD11c ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD163 (CD11c|CD163) και CD163 ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD11c (CD163|CD11c).

Η Εικόνα 28 παρουσιάζει διαγραμματικά την προοδευτική αύξηση του OR για την αποθήκευση χρωστικής ενός κυττάρου (‘αποθηκευτική ικανότητα’) σαν συνάρτηση της διαδοχικής έκφρασης των δεικτών CD11c και CD163.



Εικόνα 28: Σχηματική παράσταση της αύξησης των OR με τη διαδοχική έκφραση των δεικτών CD11c και CD163. P=πιθανότητα ισότητας των κατανομών (Wilcoxon κατά ζεύγη).

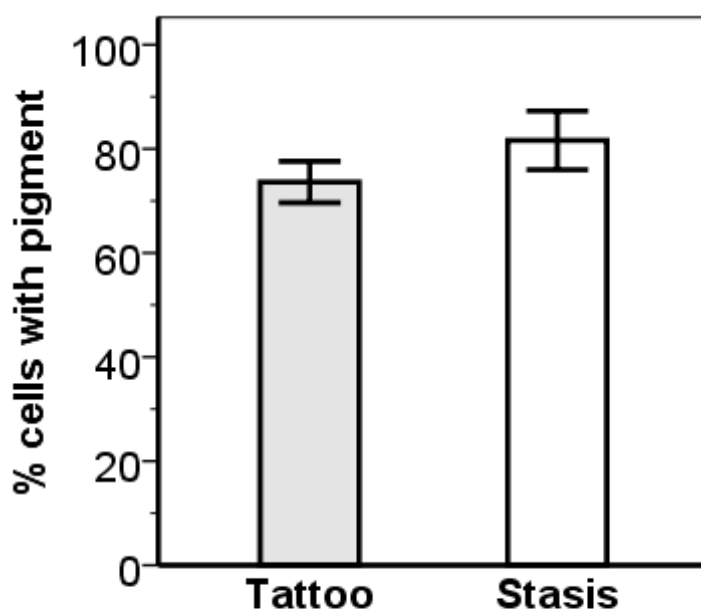
Συμπερασματικά, η έκφραση CD163 συνδέεται με σημαντικά υψηλότερο επίπεδο ανιχνευσιμότητας αποθήκευσης χρωστικής απ' ό,τι η έκφραση του CD11c. Μάλιστα, παρ' ό,τι η έκφραση CD11c συνδέεται με σημαντική ικανότητα αποθήκευσης η επιπλέον έκφραση CD11c δεν φαίνεται να τροποποιεί σημαντικά (μάλλον 'ασήμαντα') την συγκεκριμένη 'ιδιότητα' των CD163⁺ κυττάρων.

Δύο υποθέσεις θα μπορούσαν να συζητηθούν για την ερμηνεία των παραπάνω ευρημάτων:

- Τα CD11c⁺ κύτταρα έχουν μικρότερη ικανότητα αποθήκευσης και φορτίζονται με χρωστική σε μικρότερο βαθμό από τα CD163⁺, αντανακλούν δηλ. κύτταρα που αποθηκεύουν με χαμηλότερη ικανότητα και επομένως καταδεικνύουν 'υψηλή' συγκέντρωση χρωστικής στο περιβάλλον τους.
- Τα CD11c⁺ κύτταρα ανακυκλώνονται με ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με τα CD163⁺ με συνέπεια την προϊούσα απώλεια της χρωστικής.

4.5. Σύγκριση ανάμεσα σε δερματοστιξία και δερματίτιδα από στάση

Το ποσοστό των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής επί του συνόλου των κυττάρων του χορίου είναι μικρότερο στα δείγματα δερματοστιξίας σε σύγκριση με τις ‘δερματικές εκδηλώσεις φλεβικής στάσης’ ($73,6\% \pm 1,99$ έναντι $81,6\% \pm 2,82$; $p=0,039$, Εικόνα 29).



Error bars: +/- 2 SE

Εικόνα 29: % κυττάρων με ανίχνευση αποθήκευσης χρωστικής.

4.5.1 Οι ανοσοφαινοτυπικά διακριτοί κυτταρικοί υποπληθυσμοί σε δερματοστιξία και δερματίτιδα από στάση.

Τα ποσοστά των διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών του χορίου για κάθε δείγμα καταχωρούνται στον Πίνακα 10 και παρουσιάζονται γραφικά στην Εικόνα 30. Η σύνθεση του κυτταρικού πληθυσμού στο σύνολό της αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής δεν διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (Πίνακας 18Α, 18Β). Στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής το % των διπλά CD11c και CD163 θετικών κυττάρων είναι υψηλότερο στα δείγματα δερματοστιξίας σε σύγκριση με δείγματα δερματίτιδας από στάση και το % των διπλά αρνητικών κυττάρων σημαντικά υψηλότερο στα δείγματα δερματίτιδας από στάση σε σύγκριση με δείγματα δερματοστιξίας (Πίνακας 18Γ).

Πίνακας 18: Σύγκριση % κυτταρικών υποπληθυσμών ανάμεσα σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (Α) στο σύνολο των κυττάρων του χορίου, (Β) στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής και (Γ) στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής (Mann-Whitney U test).

A.

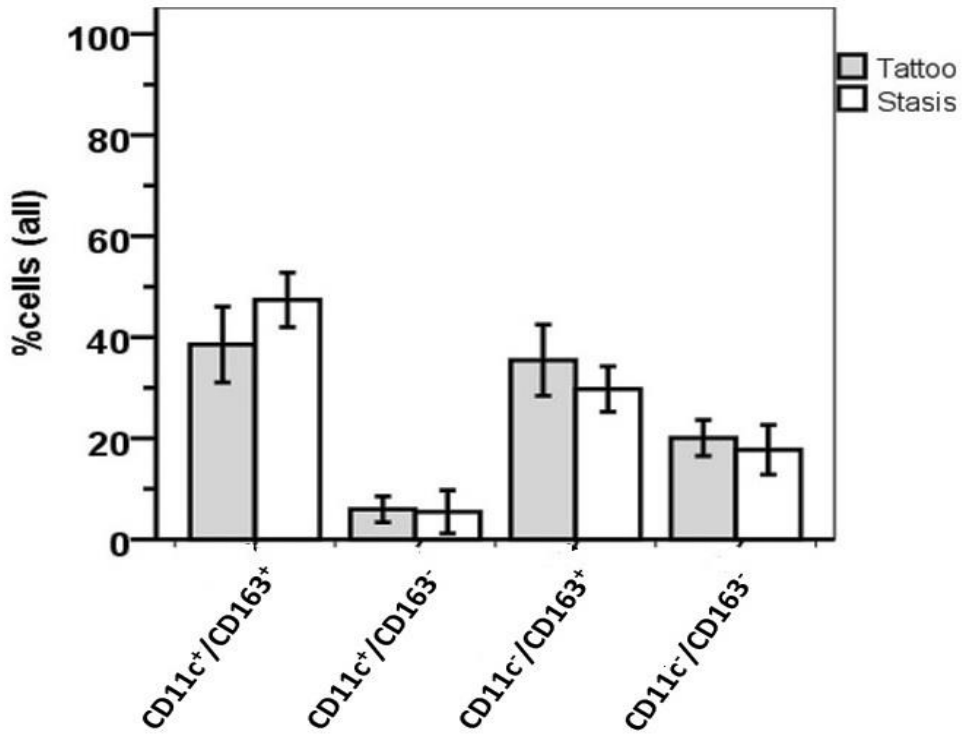
	All_11c ⁺ /163 ⁺	All_11c ⁺ /163 ⁻	All_11c ⁻ /163 ⁺	All_11c ⁻ /163 ⁻
Mann-Whitney U	11,000	12,000	12,000	19,000
Wilcoxon W	26,000	57,000	57,000	64,000
Z	-1,533	-1,400	-1,400	-,467
Asymp. Sig. (2-tailed)	,125	,162	,162	,641
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,147 ^b	,190 ^b	,190 ^b	,699 ^b

B.

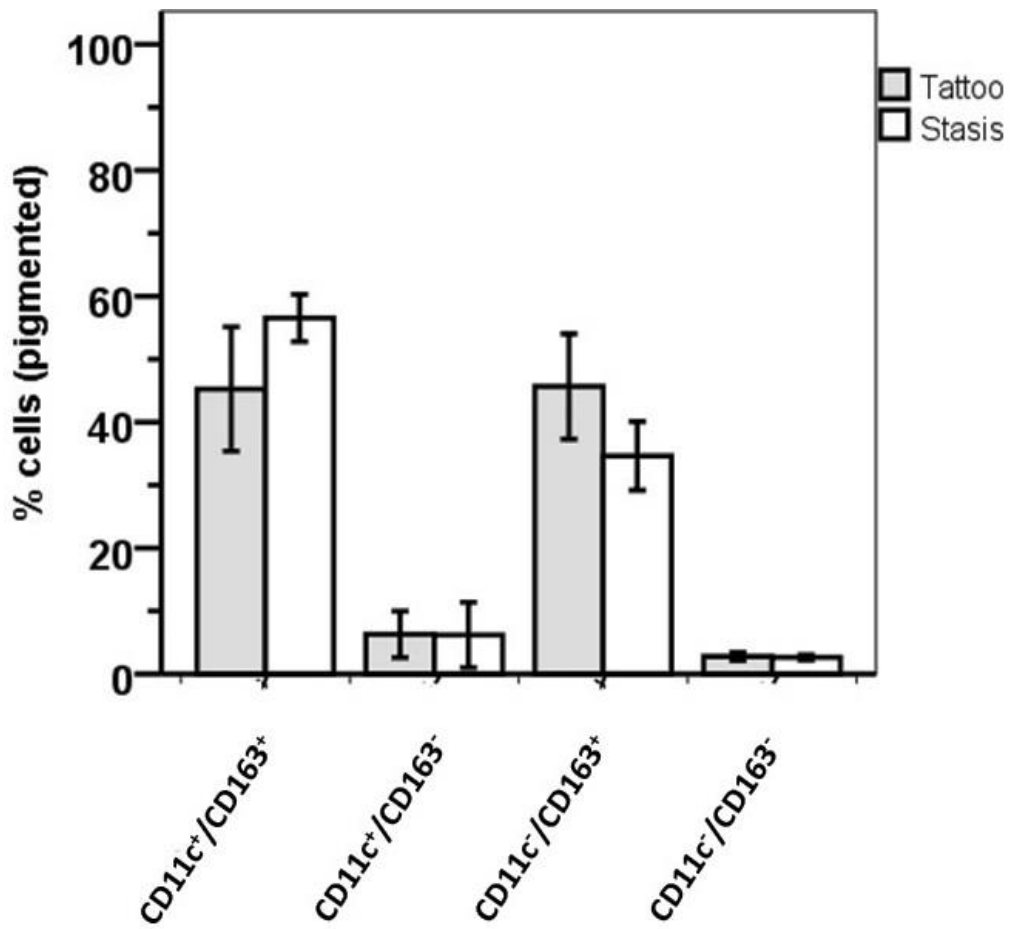
	Pigm_11c ⁺ /163 ⁺	Pigm_11c ⁺ /163 ⁻	Pigm_11c ⁻ /163 ⁺	Pigm_11c ⁻ /163 ⁻
Mann-Whitney U	9,000	14,000	8,000	21,000
Wilcoxon W	24,000	59,000	53,000	66,000
Z	-1,800	-1,133	-1,933	-,200
Asymp. Sig. (2-tailed)	,072	,257	,053	,841
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,083 ^b	,298 ^b	,060 ^b	,898 ^b

Γ.

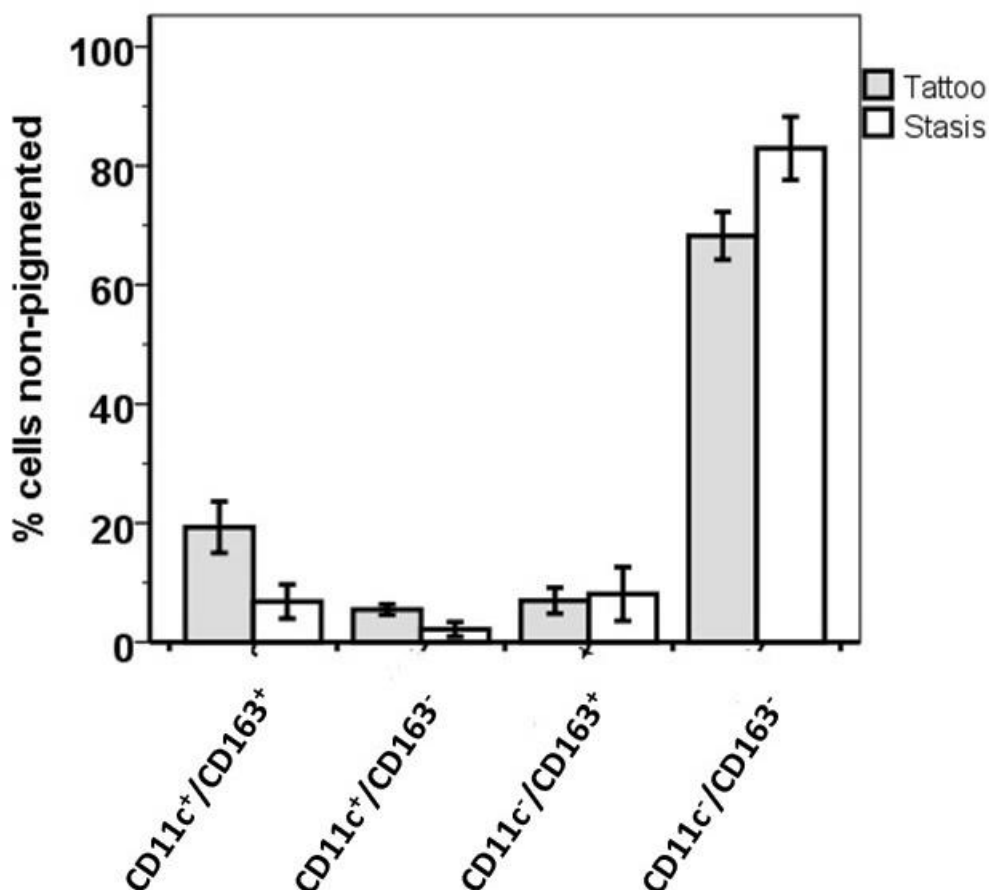
	nPigm_11c ⁺ /163 ⁺	nPigm_11c ⁺ /163 ⁻	nPigm_11c ⁻ /163 ⁺	nPigm_11c ⁻ /163 ⁻
Mann-Whitney U	0,000	3,000	18,000	1,000
Wilcoxon W	45,000	48,000	63,000	16,000
Z	-3,000	-2,600	-,600	-2,870
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,009	,549	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,007 ^b	,606 ^b	,002 ^b



(A)



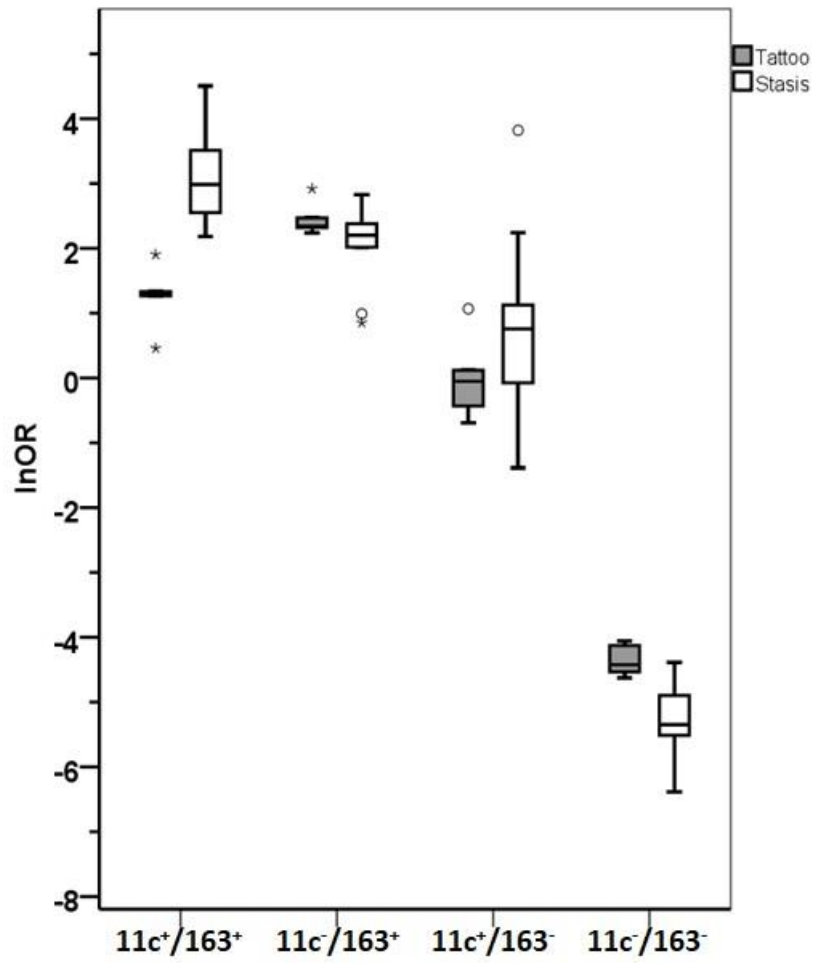
(B)



(Γ)

Εικόνα 30: Κατανομή κυτταρικών υποπληθυσμών (%) στο σύνολο των κυττάρων του χορίου (Α), και ανάμεσα στα κύτταρα με (Β) και χωρίς (Γ) αποθήκευση χρωστικής.

Ακριβώς όπως και για το σύνολο των δειγμάτων (Εικόνα 26) το OR των κυτταρικών υποπληθυσμών που εκφράζουν CD163 είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από OR=1 τόσο στα δείγματα ‘δερματοστιξίας’ όσο και σε εκείνα με ‘δερματίτιδα από στάση’, ενώ δεν διαφέρει από το OR=1 για τα κύτταρα, που εκφράζουν μόνο τον δείκτη CD11c. Τέλος τόσο στη ‘δερματοστιξία’ όσο και στη ‘δερματίτιδα από στάση’ το OR είναι σημαντικά μικρότερο από OR=1 για τα διπλά αρνητικά CD163 και CD11c κύτταρα, που αντιστοιχούν σε κυτταρικούς υποπληθυσμούς με μειωμένη ικανότητα αποθήκευσης χρωστικής (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Σύγκριση των OR “to be pigmented” για διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάμεσα σε δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (box-plot σχεδιάγραμμα).

Όπως και στο σύνολο των δειγμάτων (Εικόνα 26) και την περίπτωση της δερματίτιδας από στάση η ικανότητα αποθήκευσης χρωστικής συνδέεται με την έκφραση του δείκτη CD163 (Πίνακας 19) με το υψηλότερο OR να υπολογίζεται για τα διπλά θετικά κύτταρα.

Πίνακας 19: Σύγκριση των OR των κυτταρικών υποπληθυσμών ανά ζεύγη στη δερματίτιδα από στάση.

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁺ /163 ⁻	2,29276	1,12355	,37452	1,42912	3,15640	6,122	8	,000
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁺	1,08369	1,06861	,35620	,26229	1,90510	3,042	8	,016
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁻	8,44853	1,18931	,39644	7,53434	9,36272	21,311	8	,000
OR11c ⁺ /163 ⁻ OR11c ⁻ /163 ⁺	-1,20906	1,68538	,56179	-2,50456	,08644	-2,152	8	,064
OR11c ⁺ /163 ⁻ OR11c ⁻ /163 ⁻	6,15577	1,96774	,65591	4,64323	7,66831	9,385	8	,000
OR11c ⁻ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁻	7,36483	1,23010	,41003	6,41929	8,31037	17,962	8	,000

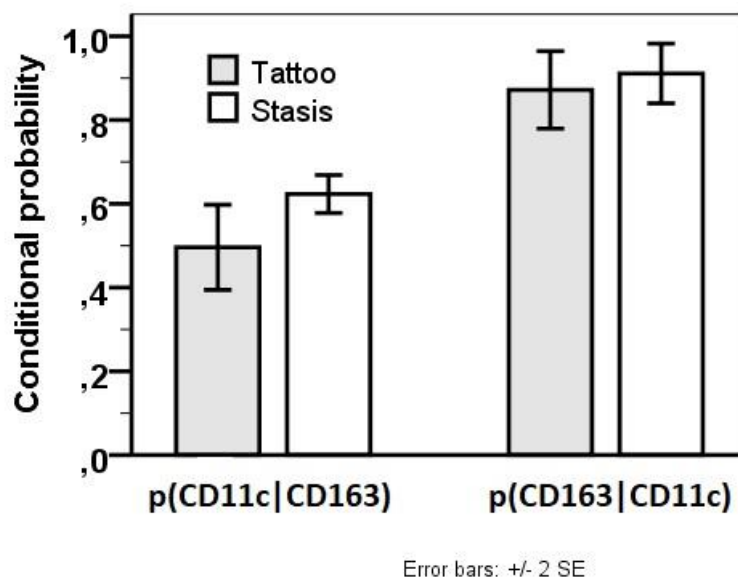
Παρόμοια είναι η διάταξη των OR και στην περίπτωση των δειγμάτων δερματοστιξίας με την μόνη διαφορά ότι η μέγιστη τιμή ανιχνεύεται για τον υποπληθυσμό που εκφράζει μόνο CD163, με την διαφορά ανάμεσα στους δύο υποπληθυσμούς, που εκφράζουν CD163 να είναι σημαντικά διαφορετική (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: Σύγκριση των OR των κυτταρικών υποπληθυσμών ανά ζεύγη στη δερματοστιξία.

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁺ /163 ⁻	1,24879	1,09392	,48922	-,10950	2,60707	2,553	4	,063
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁺	-1,20674	,72948	,32623	-2,11251	-,30097	-3,699	4	,021
OR11c ⁺ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁻	5,60469	,69493	,31078	4,74181	6,46756	18,034	4	,000
OR11c ⁺ /163 ⁻ OR11c ⁻ /163 ⁺	-2,45553	,43424	,19420	-2,99471	-1,91634	-12,644	4	,000
OR11c ⁺ /163 ⁻ OR11c ⁻ /163 ⁻	4,35590	,47040	,21037	3,77183	4,93998	20,706	4	,000
OR11c ⁻ /163 ⁺ OR11c ⁻ /163 ⁻	6,81143	,21899	,09794	6,53951	7,08334	69,550	4	,000

Τέλος τα ευρήματα με την σχετική πιθανότητα (conditional probability) επιβεβαιώνουν και για τις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση ξεχωριστά ότι η έκφραση CD163 συνδέεται ισχυρότερα με ‘αποθηκευτικό’ φαινότυπο σε σύγκριση με την έκφραση CD11c (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Σχετική πιθανότητα έκφρασης CD11c ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD163 (CD11c|CD163) και CD163 ανάμεσα στα κύτταρα που εκφράζουν CD11c (CD163|CD11c): Σύγκριση δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.

4.5.2 Σύγκριση δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση

A. Σύγκριση κυτταρικών υποπληθυσμών

Συγκρίνοντας τις τιμές των OR για τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάλογα με την έκφραση των δεικτών CD11c και CD163 στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (Εικόνα 31) προκύπτει ότι είναι σημαντικά μικρότερη για τη δερματοστιξία από την αντίστοιχη για την δερματίτιδα από στάση για τα διπλά θετικά κύτταρα ($p=0,001$) και σημαντικά μεγαλύτερη για τα διπλά αρνητικά κύτταρα ($p=0,012$), ενώ δεν διαφέρει σημαντικά για τους δύο υποπληθυσμούς που εκφράζουν μόνο τον ένα από τους δύο δείκτες (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Σύγκριση των OR για τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάμεσα στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.

	OR11c ⁺ /163 ⁺	OR11c ⁺ /163 ⁻	OR11c ⁻ /163 ⁺	OR11c ⁻ /163 ⁻
Mann-Whitney U	0,000	13,000	16,000	4,000
Wilcoxon W	15,000	28,000	61,000	49,000
Z	-3,000	-1,267	-,867	-2,467
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,205	,386	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b	,240 ^b	,438 ^b	,012 ^b

Τέλος ενώ η σχετική πιθανότητα έκφρασης CD163⁺ ανάμεσα στα CD11c⁺ κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής (CD163|CD11) δεν διαφέρει μεταξύ δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση ($p=0,520$) το ποσοστό των CD11c⁺ κυττάρων ανάμεσα στα CD163⁺ κύτταρα (CD11|CD163) είναι σημαντικά μικρότερο στην περίπτωση της δερματοστιξίας ($p=0,021$, Εικόνα 32).

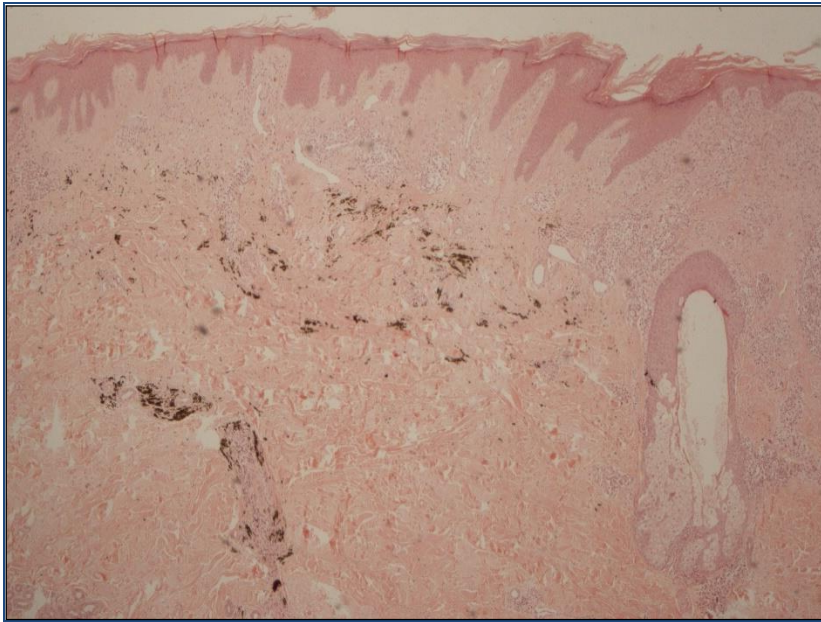
B. Σύγκριση χωρο-κατανομής των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής

Για την ανάδειξη και ποσοτική ανάλυση των περιοχών των κυττάρων που έχουν δεσμεύσει χρωστική χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές εικόνες αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Εικόνες 33-34).

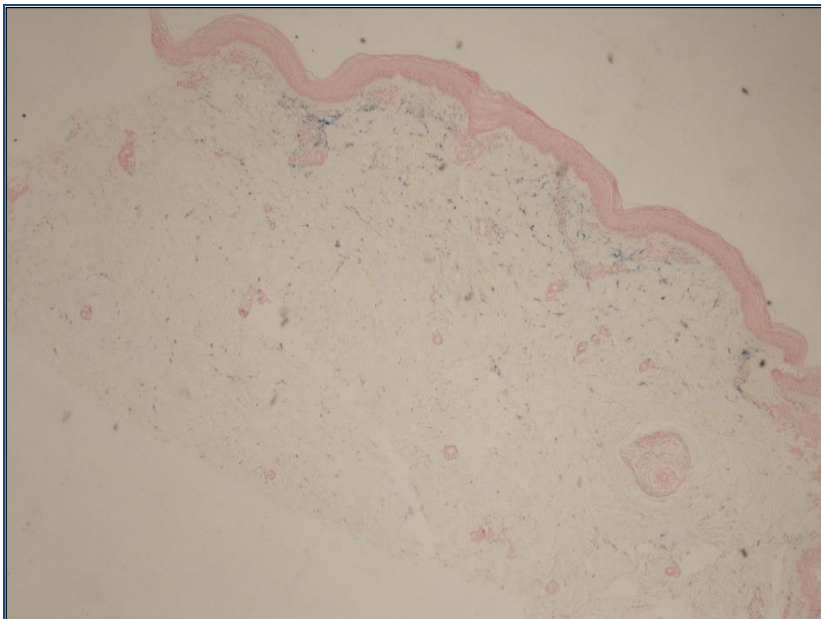
Οι περιοχές με χρωστική εντοπίζονται αυτόματα, με την διαδοχική εφαρμογή αλγορίθμου ομαδοποίησης (clustering) των εικονοστοιχείων αναλύοντας τις χρωματικές τους συνιστώσες στα χρωματικά μοντέλα RGB και YIQ. Για κάθε εικονοστοιχείο που ανήκει σε τμηματοποιημένη περιοχή που φέρει χρωστική, υπολογίζεται η απόστασή του από το όριο της επιδερμίδας (Εικόνα 35).

Λόγω της διαφορετικής μεγένθυσης των εικόνων (X40,X20,X10) που ελήφθησαν, οι μετρήσεις των αποστάσεων σε κάθε εικόνα κανονικοποιούνται ως προς το αντίστοιχο πάχος του χορίου.

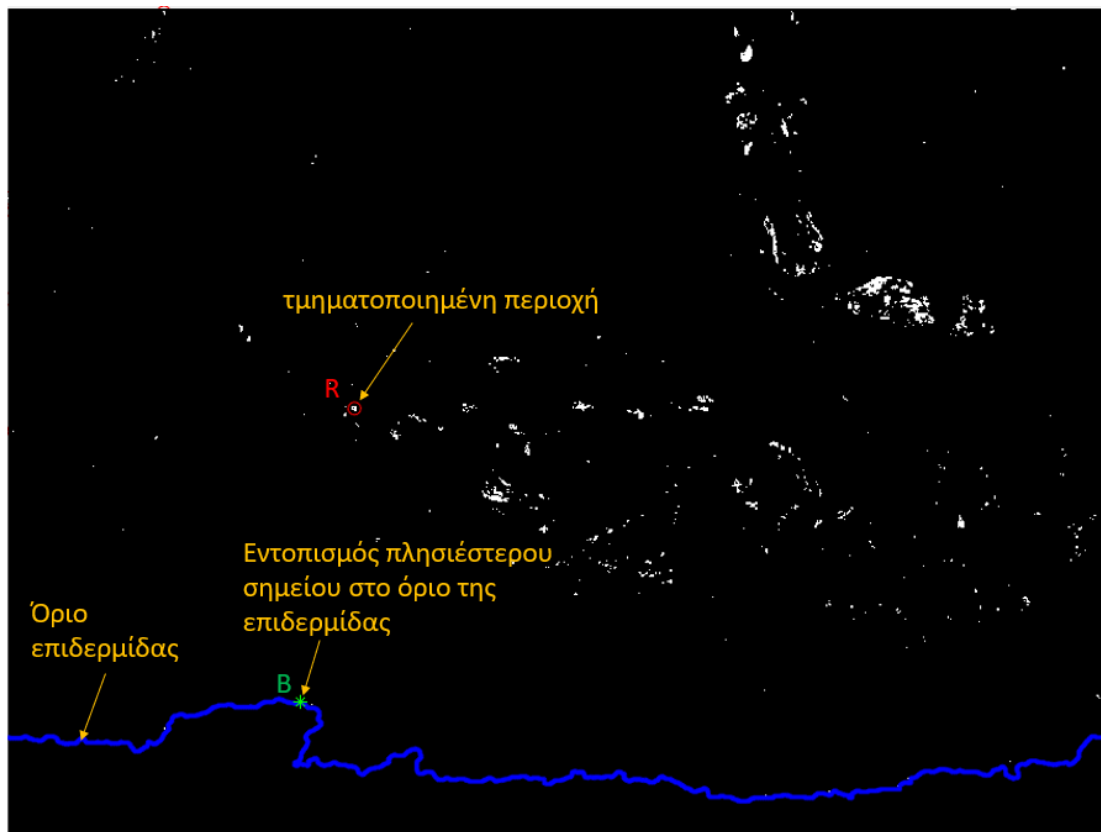
Η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov έδωσε στατιστικά σημαντική διαφορά των χωροκατανομών της χρωστικής στα δείγματα δερματοστιξίας-δερματίτιδας από στάση σε επίπεδο σφάλματος 0.01 (Εικόνα 36).



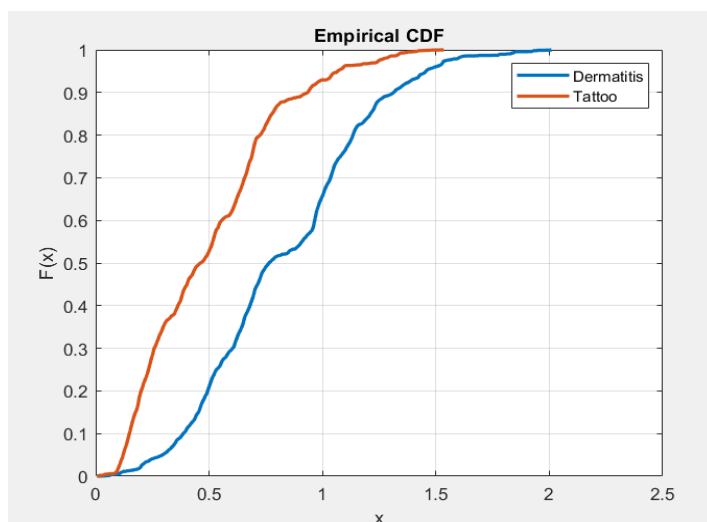
Εικόνα 33: Δερματοστιξία-Ιστολογική εικόνα αιματοξυλίνης-ηωσίνης.



Εικόνα 34: Δερματίτιδα από στάση-Ιστολογική εικόνα αιματοξυλίνης-ηωσίνης.



Εικόνα 35: Παράδειγμα εντοπισμού των περιοχών με χρωστική (Ιστολογικό δείγμα δερματοστιξίας-Εικόνα 33). Για κάθε εικονοστοιχείο με χρώση (παράδειγμα εικονοστοιχείο που ανήκει στην περιοχή R), υπολογίζεται η πλησιέστερη απόστασή του από το όριο της επιδερμίδας (εντοπισμός πλησιέστερου σημείου B).



Εικόνα 36: Αθροιστική κατανομή των κανονικοποιημένων -ως προς το πάχος του χορίου- αποστάσεων των περιοχών των κυττάρων με χρωστική, από την επιδερμίδα.

Συμπερασματικά, η χρωστική περιορίζεται στη δερματοστιξία σε μια στενότερη (και πιο επιφανειακή) ζώνη του χορίου, σε αντίθεση με μια πιο ευρύτερη κατανομή της χρωστικής σε όλο το πάχος του χορίου στην περίπτωση της δερματίτιδας από στάση.

Γ. Σχέση OR αποθήκευσης των κυτταρικών υποπληθυσμών και του βαθμού εξάπλωσης της διαθέσιμης χρωστικής στον ιστό.

Διαπιστώσαμε πιο πάνω ότι το OR των ‘διπλά θετικών’ κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής είναι σημαντικά χαμηλότερο και αντίθετα των CD163⁺/CD11c⁻ ‘διπλά αρνητικών’ σημαντικά υψηλότερο στην περίπτωση της δερματοστιξίας σε σύγκριση με τη δερματίτιδα από στάση. Επιπλέον δείξαμε ότι συνολικά το % των κυττάρων του χορίου που έχουν αποθηκεύσει χρωστική είναι υψηλότερο στα περιστατικά δερματίτιδας από στάση σε σύγκριση με την δερματοστιξία και ότι στην τελευταία περίπτωση τα κύτταρα με την αποθήκευση της εξωγενούς χρωστικής οριοθετούνται σε συγκριτικά πιο επιφανειακές εντοπίσεις μέσα στο χόριο. Δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα της χρωστικής σε ένα σημείο του ιστού είναι απαραίτητη συνθήκη για την αντίχνευση αποθηκευτικών κυττάρων στη συγκεκριμένη περιοχή, γεγονός που επηρεάζει άμεσα τον υπολογισμό των OR αποθήκευσης των κυτταρικών υποπληθυσμών, υποθέσαμε ότι η στατιστικά σημαντική διαφορά στις OR τιμές των ‘αποθηκευτικών’ και των ‘μη-αποθηκευτικών’ κυτταρικών τύπων αντανακλά διαφορές στην ενδοϊστική διαθεσιμότητα της χρωστικής (πιο εξαπλωμένη στην περίπτωση της ‘ενδογενούς’ χρωστικής) και όχι στην παρουσία κυτταρικών υποπληθυσμών με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά στην δερματοστιξία και την δερματίτιδα από στάση. Η τελευταία υπόθεση υποστηρίζεται και από την ποιοτική ανάλυση των παραμέτρων του παρακάτω απλοποιημένου μοντέλου της επίδρασης της διαθεσιμότητας της χρωστικής μέσα στον ιστό και των αντίστοιχων ‘OR αποθήκευσης’ των διαφορετικών ως προς την αποθηκευτική τους ικανότητα κυτταρικών υποπληθυσμών.

Έστω,

μ =ποσοστό ενός κυτταρικού υποπληθυσμού στο χόριο

λ =ποσοστό του συνόλου των κυττάρων του χορίου με πρόσβαση σε χρωστική

κ =ποσοστό των εκτεθειμένων σε χρωστική κυττάρων με αναγνωρίσιμη αποθήκευση χρωστικής

με $0 \leq (\mu, \lambda, \kappa) \leq 1$.

Έστω τώρα υποπληθυσμός ‘1’ με ‘ικανότητα αποθήκευσης’ κ_1 και κ_2 η μέση ‘αποθηκευτική ικανότητα’ των υπόλοιπων κυττάρων (υποπληθυσμός ‘2’):

$$F1+ (\text{:κύτταρα πληθυσμού '1' με αποθήκευση χρωστικής}) = \lambda * \mu * \kappa_1$$

$$F1- (\text{:κύτταρα πληθυσμού '1' χωρίς αποθήκευση χρωστικής}) = \mu - \lambda * \mu * \kappa_1 \\ = \mu * (1 - \lambda * \kappa_1)$$

$$F2+ (\text{:κύτταρα πληθυσμού '2' με αποθήκευση χρωστικής}) = \lambda * (1 - \mu) * \kappa_2$$

$$F2- (\text{:κύτταρα πληθυσμού '2' χωρίς αποθήκευση χρωστικής}) = (1 - \mu) - \lambda * (1 - \mu) * \kappa_2 \\ = (1 - \mu) * (1 - \lambda * \kappa_2)$$

Επομένως για το OR κυττάρων με σε σύγκριση χωρίς χρωστική:

$$OR1 = (F1+/F1-)/(F2+/F2-) = (\kappa_1/\kappa_2) * [(1 - \kappa_2 * \lambda)/(1 - \kappa_1 * \lambda)]$$

$$\text{με } 1^{\text{η}} \text{ παράγωγο ως προς το } \lambda: dOR/d\lambda = (\kappa_1/\kappa_2) * [(\kappa_1 - \kappa_2)/(1 - \kappa_1 * \lambda)^2]$$

Δεδομένου ότι $1 \geq \kappa_1 \geq 0$ και $1 \geq \kappa_2 \geq 0$

στην περίπτωση $\kappa_1 > \kappa_2$, δηλ. ο κυτταρικός υποπληθυσμός '1' έχει μεγαλύτερη αποθηκευτική ικανότητα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κύτταρα του χορίου, το OR όπως αναμένεται είναι μεγαλύτερο από 1 ($OR > 1$) αλλά παράλληλα και η παράγωγος $dOR/d\lambda > 0$, και επομένως με την ευρύτερη διασπορά της χρωστικής στο χόριο το OR για τον συγκεκριμένο υποπληθυσμό αυξάνει.

Στην αντίθετη περίπτωση με $\kappa_1 < \kappa_2$ το OR είναι μικρότερο του 1 ($OR < 1$) και παράλληλα και το $dOR/d\lambda < 0$ και συνεπώς με την ευρύτερη διαθεσιμότητα της χρωστικής στο χόριο το OR του συγκεκριμένου υποπληθυσμού τείνει μειούμενο.

Επομένως, για τους υποπληθυσμούς με 'υψηλή' αποθηκευτική ικανότητα ($OR > 1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής σε όλο το χώρο του ιστού έχει σαν συνέπεια την αύξηση του αντίστοιχου OR ($dOR/d\lambda > 0$), καθώς αποθηκεύουν όλο και περισσότερα κύτταρα, που είχαν την ικανότητα αποθήκευσης αλλά δεν είχαν εκτεθεί στη χρωστική. Αντίθετα, για τους υποπληθυσμούς με 'χαμηλή' αποθηκευτική ικανότητα ($OR < 1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής στον ιστό έχει σαν συνέπεια την μείωση του OR ($dOR/d\lambda < 0$) καθώς αυξάνεται το ποσοστό τους ανάμεσα στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής. Οι παραπάνω υπολογισμοί είναι συμβατοί με τα ευρήματα της σύγκρισης των OR των διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών ανάμεσα σε περιστατικά δερματοστιξίας και στάσης (Εικόνα 31) σε συσχέτιση με την διαφορά στην χωροταξική κατανομή της χρωστικής στο χόριο (Εικόνα 36): Υψηλότερα OR για τα 'αποθηκευτικά' $CD163^+CD11c^+$ και χαμηλότερα OR για τα 'μη-αποθηκευτικά' $CD163^-CD11c^-$ σαν συνέπεια του περιορισμού της χρωστικής στα ανώτερα στρώματα του χορίου στην δερματοστιξία σε αντίθεση με την ευρύτερη διαθεσιμότητα της χρωστικής σε όλο το πλάτος του χορίου στη δερματίτιδα από στάση.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δερματοστιξία αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία εξωγενείς χρωστικές ουσίες, μετά από αντίστοιχο τραυματισμό της επιδερμίδας, εισάγονται διεπιθηλιακά και εναποτίθενται τοπικά στο χόριο του δέρματος ή τις υποβλεννογόνιες στιβάδες των βλεννογόνων, οδηγώντας σε μακροχρόνια, εντοπισμένη αλλαγή του φυσιολογικού χρώματος των ιστών(1). Η δερματοστιξία είναι μια διαδικασία που η εφαρμογή της επιφέρει λύση της συνέχειας του δέρματος και ως εκ τούτου την πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης. Η αλλαγή του χρώματος του δέρματος των κάτω άκρων σε εντοπίσεις δερματίτιδας από στάση είναι αποτέλεσμα της χρόνιας ‘προσφοράς’ και αποθήκευσης ενδογενούς χρωστικής (αιμοσιδηρίνης και μελανίνης) στους ιστούς στα πλαίσια χρόνιας φλεβικής ανεπάρκειας (147). Πιστεύεται ότι η μικροαγγειοπάθεια που προκαλείται στα πλαίσια της φλεβικής ανεπάρκειας πυροδοτεί τη συγκριτικά ήπια αλλά φλεγμονώδη αντίδραση του δέρματος με την καταστροφή κυττάρων και απελευθέρωση ενδογενών δύσκολα αποδομούμενων χρωμοφόρων, όπως η μελανίνη και η αιμοσιδηρίνη. Στην παρούσα μελέτη, συγκρίθηκαν τόσο μορφολογικά όσο και με την εφαρμογή ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί του χορίου σε 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας και 9 περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση με σκοπό το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων που εμπλέκονται στην αποθήκευση της εξωγενούς (δερματοστιξία) και της ενδογενούς (δερματίτιδα από στάση) χρωστικής.

Με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης αναδείχτηκε το πρότυπο της κατανομής των φλεγμονωδών κυττάρων, η τοπογραφική εντόπιση των κοκκίων χρωστικής και η μορφολογία των κυττάρων που έφεραν τη χρωστική. Παρατηρήθηκε περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει κυτταρικό πρότυπο σε 4 από τις 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας και σε 8 από τις 9 περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση, ενώ περιαγγειακό και επιπολής κυτταρικό πρότυπο διαπιστώθηκε σε μία περίπτωση δερματοστιξίας και μία περίπτωση δερματίτιδας από στάση. Το κυτταρικό διήθημα στις περιπτώσεις δερματοστιξίας αφορούσε λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και ολιγάριθμα μαστοκύτταρα. Σε μία περίπτωση αναγνωρίστηκαν και γιγαντοκύτταρα καθώς και σαρκοειδόμορφα κοκκιώματα, προφανώς λόγω ανάπτυξης κοκκιωματώδους αντίδρασης σε έδαφος δερματοστιξίας. Το κυτταρικό διήθημα στις περιπτώσεις της δερματίτιδας από στάση συνίσταται κυρίως σε λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις δερματοστιξίας, η ανίχνευση της χρωστικής (‘μελάνη δερματοστιξίας’) περιορίστηκε στο θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο (n=3). Στις υπόλοιπες δύο περιπτώσεις ανιχνεύτηκε χρωστική και

σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος, δηλαδή σε μία περίπτωση σε όλο το πάχος του χορίου (n=1) και σε μία άλλη επιπλέον και στις ανώτερες μοίρες του υποδόριου ιστού (n=1). Στα ιστικά δείγματα από επαγγελματική δερματοστιξία, η χρωστική εντοπίζεται στο όριο θηλώδους και δικτυωτού χορίου με επέκταση έως τη μεσότητα του χορίου. Αντίθετα, στην ερασιτεχνική δερματοστιξία, η χρωστική αναγνωρίζεται από το θηλώδες χόριο έως το υποδόριο (166). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι με την πάροδο του χρόνου επισυμβαίνει μια ανακατανομή της χρωστικής στον ιστό καθώς αυτή μετακινείται σε βαθύτερες θέσεις του χορίου και ένα μέρος της απομακρύνεται μέσω της αιματικής ή μέσω της λεμφαγγειακής οδού στους τοπικούς λεμφαδένες (138, 145). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, φαίνεται ότι από το υλικό της μελέτης μας τουλάχιστον οι 4 από τις 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας αφορούσαν επαγγελματικά τατουάζ. Παλαιότερες μελέτες, με μη επεμβατική μεθοδολογία (confocal scanning laser microscopy, OCT) που είχαν ως σκοπό την ανίχνευση των κοκκίων χρωστικών της δερματοστιξίας στα στρώματα του δέρματος, υπέδειξαν το θηλώδες χόριο ως την κύρια ανατομική θέση αποθήκευσης της χρωστικής (140, 141). Το μειονέκτημα αυτών των μελετών ήταν το περιορισμένο βάθος απεικόνισης με αποτέλεσμα τη μη δυνατότητα ικανοποιητικής διερεύνησης του δικτυωτού χορίου.

Στην παρούσα μελέτη, τα κοκκία χρωστικής στις περιπτώσεις δερματοστιξίας ανευρέθησαν κυρίως ενδοκυττάρια αλλά και εξωκυττάρια, είτε ως διακριτές μονάδες είτε ως συστάδες κοκκίων. Εξωκυττάρια εναπόθεση χρωστικής διαπιστώθηκε και στη μελέτη των Grant και συν. (2015), οι οποίοι χρησιμοποιώντας τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (-Atomic Force Microscope-AFM), συμπέραναν ότι συστάδες χρωστικής συσσωρεύονταν ανάμεσα στο πυκνό δίκτυο ινών του κολλαγόνου (145).

Από την άλλη πλευρά, στα δείγματα από δερματίτιδα από στάση, η ενδογενής χρωστική ανιχνεύθηκε στο θηλώδες χόριο (n=1), στο θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο (n=4), σε όλο το πάχος του χορίου (n=3) και σε όλο το χόριο και τις ανώτερες μοίρες του υποδόριου ιστού (n=1). Η εναπόθεση ενδογενούς χρωστικής ανευρέθη κυρίως ενδοκυττάρια και σε μικρότερη έκταση και εξωκυττάρια, παρόμοια όπως και στις περιπτώσεις της δερματοστιξίας. Παρόμοιες παρατηρήσεις περιγράφηκαν και σε παλαιότερες μελέτες στις οποίες η αποθήκευση της χρωστικής (μελανίνη και αιμοσιδηρίνη) αφορούσε στο θηλώδες ή στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο και η εναπόθεση χρωστικής (αιμοσιδηρίνη) ανευρισκόταν τόσο ενδοκυττάρια όσο και ανάμεσα σε δέσμες κολλαγόνου (148, 149). Επίσης τα κύτταρα τα οποία προσέλαβαν χρωστική (είτε εξωγενή είτε ενδογενή) ήταν επιμήκη και μερικά από αυτά με σαφείς κυτταροπλασματικές

αποφυάδες. Δεδομένου ότι με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης δεν ήταν δυνατόν να γίνει με ακρίβεια διάκριση μεταξύ των κοκκίων μελανίνης και αιμοσιδηρίνης και για τον αποκλεισμό ή επιβεβαίωση της παρουσίας μαστοκύτταρων που φέρουν κοκκία χρωστικής, πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές χρώσεις. Με την ιστοχημική χρώση Giemsa δεν ανιχνεύτηκαν μαστοκύτταρα με χρωστική σε καμία από τις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση που μελετήθηκαν.

Στα ιστικά δείγματα δερματοστιξίας, με την ιστοχημική χρώση Masson-Fontana, αναδείχθηκαν κοκκία μελανίνης μόνο σε μελανοκύτταρα της επιδερμίδας. Δεν ανιχνεύθηκαν άλλα κυτταρικά στοιχεία με εναποθέσεις κοκκίων μελανίνης. Επίσης με την ιστοχημική χρώση κατά Perl, δεν διαπιστώθηκαν εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης.

Στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση, με την ιστοχημική χρώση Masson-Fontana αναδείχθηκαν κοκκία μελανίνης τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια σε επιμήκη κύτταρα σε 2 περιπτώσεις, ενώ ολιγάριθμα εξωκυττάρια κοκκία χρωστικής σε επιπλέον 3 περιπτώσεις. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν κοκκία μελανίνης ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια. Με τη χρώση κατά Perl, διαπιστώθηκε η παρουσία άφθονων εναποθέσεων αιμοσιδηρίνης σε όλες τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση (n=9). Παρόμοια ευρήματα έχουν καταγράψει και προηγούμενες μελέτες. Οι Kim και Kang (2002) μελέτησαν 25 βιοπτικά υλικά από 20 ασθενείς με δερματίτιδα από στάση. Με την ιστοχημική χρώση Masson-Fontana διαπίστωσαν εναποθέσεις κοκκίων μελανίνης στο θηλώδες χόριο, κυρίως σε μακροφάγα και λιγότερο σε μελανοκύτταρα, σε 5 περιπτώσεις. Με την ιστοχημική χρώση Perl's παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στο θηλώδες χόριο (149). Το 2008 οι Caggiati και συν. διερεύνησαν το ενδεχόμενο παρουσίας μελανίνης και αιμοσιδηρίνης σε βιοψίες ασθενών με κισσούς χωρίς διαταραχές μελάγχρωσης (n=25), με συνυπάρχουσα υπερμελάγχρωση (n=12), με συνυπάρχουσα δερματολιποσκλήρυνση (n=8) καθώς και σε μια ομάδα μαρτύρων (n=4). Όσον αφορά στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση, στις 5 από τις 12 περιπτώσεις με συνυπάρχουσα υπερμελάγχρωση και στις 4 από τις 8 περιπτώσεις με συνυπάρχουσα δερματολιποσκλήρυνση αναδείχθηκε με τη χρώση Masson-Fontana η παρουσία κοκκίων μελανίνης στο χόριο. Η χρώση Perl's ανέδειξε την παρουσία αιμοσιδηρίνης μόνο στις 3 από τα 12 περιπτώσεις με συνυπάρχουσα υπερμελάγχρωση. Αντίθετα κοκκία αιμοσιδηρίνης ανευρέθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις με συνυπάρχουσα δερματολιποσκλήρυνση στο θηλώδες και δικτυωτό χόριο ενώ σε 5 περιπτώσεις ανευρέθηκαν και στον υποδόριο ιστό (148). Η παρουσία ή μη της αιμοσιδηρίνης πιθανώς

να οφείλεται στην ταξινόμηση των ασθενών που έγινε στη μελέτη του Caggiati και συν. (2008) με βάση τη σοβαρότητα των δερματικών αλλοιώσεων (148) κάτι που δεν έγινε στην παρούσα μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη, για τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων με πρόσληψη χρωστικής τόσο στη δερματοστιξία όσο και στη δερματίτιδα από στάση πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με την εφαρμογή αντισωμάτων έναντι βιμεντίνης, CD163, CD11c, CD117 (c-kit) και CD34. Σε όλες τις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση, τα κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής είχαν ανοσοφαινότυπο θετικό για το δείκτη βιμεντίνης. Δεδομένου ότι η έκφραση βιμεντίνης ταυτοποιεί το σύνολο των κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (128, 131), εφαρμόσαμε πιο εξειδικευμένους δείκτες για την περαιτέρω ταξινόμηση των κυτταρικών υποπληθυσμών του χορίου.

Συνολικά, δεν διαπιστώθηκε έκφραση των δεικτών CD117 και CD34, που ως γνωστόν ταυτοποιούν τα μαστοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντίστοιχα (159, 160, 163), σε κύτταρα που έφεραν κοκκία χρωστικής τόσο στις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση. Σε αντίθεση, στη μελέτη του Grant και συν. (2015) με τη μέθοδο AFM και τη φωτεινή μικροσκοπία ανιχνεύθηκε χρωστική εντός του αγγειακού τοιχώματος και περιαγγειακά (145).

Για το διαχωρισμό των μακροφάγων από τα μυελογενή δενδριτικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με τους δείκτες CD163 και CD11c. Παρ' όλο που ο δείκτης CD11c εκφράζεται κυρίως στα mDCs (113, 142, 144) εντούτοις χαμηλή ή μέτρια έκφραση του ανιχνεύεται και σε μερικά μακροφάγα (118). Από την άλλη πλευρά, ενώ ο δείκτης CD163 ανιχνεύεται κυρίως στα M2 και ιστικά μακροφάγα (119, 120, 124, 153), έκφραση του διαπιστώνεται και στα CD14⁺ DCs που όμως έχει αμφισβητηθεί η δενδριτική τους προέλευση και θεωρούνται πια μακροφάγα προερχόμενα από μονοκύτταρα (116). Η δυσκολία διάκρισης των μακροφάγων από τα mDCs οφείλεται στην προέλευσής τους από κοινά αρχέγονα (βλαστικά) κύτταρα (118). Με τον τρόπο αυτό, απομονώθηκαν τέσσερις διακριτοί ανοσοφαινότυποι κυττάρων για τις περιπτώσεις της δερματοστιξίας και της δερματίτιδας από στάση: κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺, κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁻/CD163⁺, κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁻ και κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁻/CD163⁻. Ανάλογα με το αν τα κύτταρα έφεραν ή δεν έφεραν χρωστική στο κυτταρόπλασμά τους χαρακτηρίστηκαν ως pigment + ή pigment -. Με

βάση τον ανοσοφαινότυπο, τα CD11c⁺/CD163⁺ κύτταρα θα μπορούσαν να αντιστοιχούν είτε σε M2 ή ιστικά μακροφάγα είτε σε CD14⁺DCs, τα CD11c⁻/CD163⁺ σε M2 ή ιστικά μακροφάγα, τα CD11c⁺/CD163⁻ σε mDCs της ομάδας CD1a⁺DCs (CD1c⁺ ή CD141⁺) και τα CD11c⁻/CD163⁻ αναλόγα με το αν έφεραν ή όχι ενδοκυττάρια χρωστική (pigment + ή pigment -) θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς οι οποίοι αναφέρονται παρακάτω.

Όπως προκύπτει από τις διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, στις περιπτώσεις της δερματοσιζιάς το ποσοστό των κυττάρων του χορίου με πρόσληψη χρωστικής κυμαίνονταν από 68% έως 78% και στις περιπτώσεις της δερματίτιδας από στάση από 70% έως 95%. Συνολικά, το ποσοστό των κυττάρων με αντίχρωση αποθήκευσης χρωστικής στα δείγματα δερματοσιζιάς είναι μικρότερο σε σύγκριση με τις δερματίτιδες από στάση ($p=0,039$).

Στην παρούσα μελέτη η σύνθεση του κυτταρικού πληθυσμού στο σύνολό της αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής δε διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα δείγματα δερματοσιζιάς και δερματίτιδας από στάση ($p>0,05$). Στα κύτταρα χωρίς αποθήκευση χρωστικής το % των διπλά θετικών κυττάρων είναι υψηλότερο στα δείγματα δερματοσιζιάς σε σύγκριση με τα δείγματα δερματίτιδας από στάση ($p=0,001$) και το % των διπλά αρνητικών κυττάρων σημαντικά υψηλότερο στα δείγματα δερματίτιδας από στάση σε σύγκριση με δείγματα δερματοσιζιάς ($p=0,002$). Στη δερματοσιζία, το ποσοστό των κυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ κυμαίνονταν από 19,5% έως 41,5% (δ.τ 36%) και εκείνο των κυττάρων με ανοσοφαινότυπο CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ από 17,8% έως 38,3% (δ.τ 27,5%). Οι παραπάνω δύο ανοσοφαινότυποι αντιστοιχούν κυρίως σε M2 ή ιστικά μακροφάγα καθώς η προέλευση των CD14⁺DC που εκφράζουν τους CD11c και CD163 αμφισβητείται και θεωρούνται πια μακροφάγα προερχόμενα από μονοκύτταρα τα οποία ανευρίσκονται στο δέρμα (118). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών. Συγκεκριμένα, οι Mann και Klingmüller (1981) με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε ιστικά δείγματα δέρματος κονίκλων έδειξαν ότι τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες είναι τα κύτταρα που αποθηκεύουν τη χρωστική (134). Επίσης, οι Fujita και συν. διαπίστωσαν σε βιοπτικό υλικό ποντικών ότι η σινική μελάνη δερματοσιζιάς ανευρίσκονταν ανάμεσα σε ίνες κολλαγόνου καθώς και σε ινοβλάστες και σε μακροφάγα του χορίου (136). Στη μελέτη των Sperry και συν. (1992) αναφέρεται ότι ο χώρος αποθήκευσης της χρωστικής σε δείγματα δέρματος ανθρώπων ήταν τα μακροφάγα (137). Η μελέτη των Zaba και συν.

(2007), με τη χρήση μονοκλωνικών αντισώματων και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε δείγματα δέρματος ανθρώπων με δερματοστιξία, ανέδειξαν την παρουσία CD163⁺/FXIIIa⁺ μακροφάγων, που έφεραν κοκκία χρωστικής (142). Τέλος σε πρόσφατη μελέτη των Baranska και συν. (2018) αναδείχθηκαν τα μακροφάγα ως ο μοναδικός κυτταρικός υποπληθυσμός που αποθηκεύει χρωστική δερματοστιξίας σε βιοπτικό υλικό δέρματος ποντικών (146).

Όσον αφορά στη δερματίτιδα από στάση, τα ποσοστά ανεύρεσης των M2 ή ιστικών μακροφάγων ήταν παρόμοια με αυτά της δερματοστιξίας. Συγκεκριμένα, κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺/pigment⁺ κυμαίνονταν από 37% έως 58,6% (δ.τ 42%) και κύτταρα με ανοσοφαινότυπο CD11c⁻/CD163⁺/pigment⁺ σε ποσοστό από 17,8% έως 38,3% (δ.τ 27,5%). Επίσης σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης μας στη μελέτη των Kim και συν. (2002) περιγράφεται η παρουσία αιμοσιδηρίνης εντός μακροφάγων που ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα CD68 (149).

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε επίσης ότι σε μικρότερο ποσοστό από ότι τα μακροφάγα και τα mDCs (CD11c⁺/CD163⁻/pigment⁺) συμμετέχουν στην πρόσληψη και αποθήκευση χρωστικής. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις δερματοστιξίας το ποσοστό mDCs με πρόσληψη χρωστικής κυμαίνονταν από 2,1% έως 8,9% (δ.τ 4,2%) και στις περιπτώσεις της δερματίτιδας από στάση το αντίστοιχο ποσοστό κυμαίνονταν από 0,5% έως 16,6% (δ.τ 2,6%). Τα δενδριτικά αυτά κύτταρα ανήκουν στα ιστικά μη λεμφοειδή μεταναστευτικά DCs και ανευρίσκονται στο χόριο του δέρματος. Έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν το αντιγόνο και να μεταναστεύουν μέσω των προσαγωγών λεμφαγγείων στους επιχώριους λεμφαδένες (113). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα δενδριτικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα χρόνιας αποθήκευσης ενδογενούς και εξωγενούς χρωστικής. Από όσον γνωρίζουμε από τη διεθνή βιβλιογραφία, τα δενδριτικά κύτταρα δεν έχουν αναφερθεί ως τώρα ως πιθανά κύτταρα αποθήκευσης χρωστικής.

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε και μια άλλη κατηγορία υποπληθυσμού κυττάρων που προσλάμβανε χρωστική αλλά δεν εξέφραζε δείκτες για CD11c και CD163. Στις περιπτώσεις της δερματοστιξίας, το ποσοστό των κυττάρων αυτών κυμαίνονταν από 1,6%-2,4% (δ.τ 1,8%) και στις περιπτώσεις της δερματίτιδας από στάση από 1,6% έως 2,8% (δ.τ 2%). Ο ιδιαίτερος αυτός κυτταρικός υποπληθυσμός θα μπορούσε να είναι μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες. Μια άλλη υπόθεση είναι να αφορούν σε ινοβλάστες, καθώς τόσο στις περιπτώσεις της δερματοστιξίας

όσο και στις περιπτώσεις της δερματίτιδας από στάση διαπιστώθηκε καθολική (100%) έκφραση του δείκτη βιμεντίνη σε όλα τα κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα που έφεραν χρωστική είχαν επιμήκεις ιστολογικούς χαρακτήρες στη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Ανάλογες παρατηρήσεις αναφέρονται και σε προηγούμενες μελέτες. Συγκεκριμένα οι Mann και Klingmuller (1981) όπως ήδη έχει αναφερθεί, ανέδειξαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες ως κύτταρα αποθήκευσης χρωστικής σε δείγματα δέρματος κονίκλων (134). Οι Lea και Pawlowski (1987) μελέτησαν με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείγματα από ανθρώπινους ιστούς όπου είχε εφαρμοστεί δερματοστιξία και ανέδειξαν τους ινοβλάστες ως τον μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό που αποθήκευε τη χρωστική μετά την αρχική φλεγμονώδη αντίδραση (135). Οι Fujita και συν (1988) χρησιμοποιώντας οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανέδειξαν την παρουσία σινικής μελάνης στους ινοβλάστες, στα μακροφάγα και ανάμεσα σε ίνες κολλαγόνου σε βιοπτικό υλικό δέρματος ποντικών (136). Ο Grant και συν. (2015) καλλιέργησαν ινοβλάστες σε αραιωμένο διάλυμα μελάνης και με τις μεθοδολογίες της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscope-AFM) και της φωτεινής μικροσκοπίας, ανέδειξαν την παρουσία χρωστικής στην κυτταρική επιφάνεια ινοβλαστών σε ανθρώπινους ιστούς (145). Σε ό,τι αφορά τη δερματίτιδα από στάση, στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι ο κυτταρικός υποπληθυσμός που προσλαμβάνει χρωστική αλλά δεν εκφράζει τους CD11c και CD163 δείκτες, θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε ινοβλάστες όπως και στην περίπτωση της δερματοστιξίας. Από όσον γνωρίζουμε δεν αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ότι οι ινοβλάστες αποτελούν κύτταρα αποθήκευσης αιμοσιδηρίνης ή μελανίνης.

Το χόριο περιλαμβάνει ένα πυκνό δίκτυο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων που αποτελούν: δενδριτικά κύτταρα (DCs) και μακροφάγα (Mφ) που μαζί με τα μονοκύτταρα αποτελούν το μονοκυτταρικό φαγοκυτταρικό σύστημα (113) Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα είναι και επαγγελματικά (professional) φαγοκύτταρα. Ένας σημαντικός παράγοντας που διαφοροποιεί το επαγγελματικό από το μη επαγγελματικό φαγοκύτταρο είναι ότι τα επαγγελματικά φαγοκύτταρα εκφράζουν ένα πλήθος υποδοχέων στις επιφάνειές τους που ανιχνεύουν σήματα που συνήθως δεν απαντώνται σε υγιείς ιστούς. Μια τέτοια ομάδα υποδοχέων είναι οι υποδοχείς σάρωσης (scavenger receptors) που είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση και πρόσληψη αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων, οψωνοποιημένων παθογόνων και κυτταρικών συντριμμάτων (118). Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός που ήταν υπεύθυνος για την πρόσληψη και

αποθήκευση της χρωστικής (εξωγενούς και ενδογενούς) ήταν τα μακροφάγα με ανοσοφαινότυπο $CD11c^+/CD163^+$ ή $CD11c^-/CD163^+$. Η πιθανότητα τα $CD11c^+/CD163^+$ κύτταρα να είναι δενδριτικά κύτταρα απομακρύνεται καθώς τα $CD14^+DCs$ θεωρούνται πια ένας παροδικός πληθυσμός μακροφάγων που προέρχονται από μονοκύτταρα (116). Τα μακροφάγα αυτά θα μπορούσαν να είναι είτε M2 είτε ιστικά μακροφάγα καθώς και οι δύο αυτοί τύποι εκφράζουν τον υποδοχέα σάρωσης CD163 (119, 120, 124, 153). Ο δείκτης αυτός εκφράζεται από μεγάλο αριθμό κυττάρων στο φλεγμονώδη ιστό και η λειτουργία του είναι να μειώσει τη φλεγμονώδη απάντηση των μακροφάγων μέσω της καταστροφής συμπλεγμάτων αιμοσφαιρίνης/απτοσφαιρίνης και της αναστολής της T-κυτταρικής ενεργοποίησης (119). Τόσο τα ιστικά μακροφάγα όσο και τα M2 μακροφάγα έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και στη λύση της φλεγμονής (119-121). Φαίνεται ότι η παρουσία εξωγενούς ή ενδογενούς χρωστικής επάγει την ενεργοποίηση των M2 ή ιστικών μακροφάγων τα οποία με τη σειρά τους αφού δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά, στη συνέχεια χρησιμοποιούν τη φαγοκυτταρική τους ιδιότητα, μετριάζουν τη φλεγμονώδη ανταπόκριση και προωθούν την επούλωση. Στη βιβλιογραφία για την εξήγηση της επί μακρόν παραμονής της χρωστικής σε μακροφάγα έχουν προταθεί δύο μοντέλα: Το 'στατικό' μοντέλο της ακινησίας και μακροζωίας των αποθηκευτικών κυττάρων (μακροφάγων) και το δυναμικό μοντέλο δέσμευσης-απελευθέρωσης-ανάκτησης της χρωστικής από τα μακροφάγα. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, τα μακροφάγα διατηρούνται για χρόνια μέσω της μακροζωίας αντί της συνεχούς ανανέωσης (167). Εν τούτοις νεότερα δεδομένα σε πειραματόζωα εισηγούνται ότι όταν τα μακροφάγα που φέρουν χρωστική οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο, γειτονικά μακροφάγα προσλαμβάνουν τα απελευθερωμένα κοκκία χρωστικής εξασφαλίζοντας έτσι τη μακροσκοπική σταθερότητα και τη μακροχρόνια παραμονή της δερματοστιξίας (146). Το ίδιο θα μπορούσε να συμβαίνει και στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση, όπου η μελανίνη και η αιμοσιδηρίνη ανακτώνται σε διαδοχικούς κύκλους δέσμευσης – αποδέσμευσης – επαναδέσμευσης από τα μακροφάγα. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να αποδειχθεί αυτή η θεωρία και στους ανθρώπους.

Εκτός της σύγκρισης των ποσοστών των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών κυττάρων με πρόσληψη χρωστικής έγινε και σύγκριση των κυτταρικών υποπληθυσμών που ανιχνεύονται με το συνδυασμό των δεικτών CD11c και CD163 ως προς την αποθηκευτική τους ικανότητα. Χρησιμοποιώντας τα odds ratios των pigmented σε σύγκριση με τα non pigmented κύτταρα ως μέτρο ικανότητας αποθήκευσης του κυτταρικού πληθυσμού

προέκυψε ότι η έκφραση CD163 συνδέεται με σημαντικά υψηλότερο επίπεδο ανιχνευσιμότητας αποθήκευσης χρωστικής σε σύγκριση με την έκφραση CD11c. Παρ' όλο που η έκφραση CD11c συνδέεται με σημαντική ικανότητα αποθήκευσης η επιπλέον έκφραση CD11c δε φαίνεται να αλλάζει σημαντικά την αποθηκευτική ικανότητα των CD163⁺ κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί βάση δυο υποθέσεων:

- 1) Τα CD11c⁺ κύτταρα έχουν μικρότερη ικανότητα αποθήκευσης και φορτίζονται σε μικρότερο βαθμό από τα CD163, αντανακλούν δηλαδή κύτταρα που αποθηκεύουν με χαμηλότερη ικανότητα και επομένως καταδεικνύουν 'υψηλή' συγκέντρωση χρωστικής στο περιβάλλον τους.
- 2) Τα CD11c⁺ κύτταρα ανακυκλώνονται με ταχύτερο ρυθμό σε σύγκριση με τα CD163⁺ κύτταρα.

Συγκρίνοντας τις τιμές των OR για τους διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς ανάμεσα στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση, ανάλογα με την έκφραση των δεικτών CD11c και CD163, προέκυψε ότι ένα κύτταρο με συνέκφραση των δεικτών είναι πιο πιθανό να αποθηκεύσει χρωστική στη δερματίτιδα από στάση σε σχέση με τη δερματοστιξία ($p=0,001$) και πιο πιθανό ένα κύτταρο διπλά αρνητικό να μην αποθηκεύσει χρωστική στη δερματοστιξία σε σύγκριση με τη δερματίτιδα από στάση ($p=0,012$). Επίσης προέκυψε ότι η σχετική πιθανότητα έκφρασης CD11c⁺ κυττάρων ανάμεσα στα CD163⁺ κύτταρα (CD11|CD163) είναι σημαντικά μικρότερη στην περίπτωση της δερματοστιξίας ($p=0,021$). Πιθανώς αυτή η παρατήρηση είναι ένδειξη συσχέτισης του δείκτη CD11c με φαινότυπο 'πιο σύντομης ζωής' και υψηλότερου ρυθμού ανακύκλωσης στον ιστό. Συγκρίνοντας τη χωρο-κατανομή των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής ανάμεσα στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση, προέκυψε ότι στη δερματοστιξία τα κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής έχουν μια πιο στενή και επιφανειακή κατανομή στο χόριο σε σχέση με μια πιο ευρεία, σε όλο το πάχος του χορίου κατανομή στην περίπτωση της δερματίτιδας από στάση.

Φαίνεται ότι η προσβασιμότητα στη χρωστική επηρεάζει την αποθηκευτική ικανότητα των κυττάρων. Έτσι για τους υποπληθυσμούς με 'υψηλή' αποθηκευτική ικανότητα ($OR>1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής έχει σαν συνέπεια την αύξηση του αντίστοιχου OR. Αντίθετα, για τους υποπληθυσμούς με 'χαμηλή' αποθηκευτική ικανότητα ($OR<1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής στον ιστό έχει σαν συνέπεια τη μείωση του OR.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρίνοντας το % των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών στο σύνολο των κυττάρων του χορίου και το % των ανοσοφαινοτυπικά διακριτών πληθυσμών ανάμεσα στα κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής μεταξύ των περιπτώσεων δερματοστιξίας και δερματίτιδας εκ στάσης. Επίσης προέκυψε ότι ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός με πρόσληψη χρωστικής τόσο για τις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και για τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση ήταν τα μακροφάγα (M2 ή ιστικά). Οι διαφορές που προέκυψαν είχαν να κάνουν με το μικρότερο ποσοστό κυττάρων με χρωστική στα δείγματα δερματοστιξίας σε σύγκριση με τα δείγματα δερματίτιδας από στάση καθώς και στην τοπογραφική εντόπιση των κυττάρων με πρόσληψη χρωστικής: Η χρωστική στη δερματοστιξία είχε μια πιο στενή και επιφανειακή εντόπιση στο χόριο ενώ στη δερματίτιδα από στάση παρατηρήθηκε μια ευρύτερη κατανομή σε όλο το πάχος του χορίου. Το παραπάνω συμπέρασμα που προέκυψε από το μορφομετρικό μοντέλο σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι για τους υποπληθυσμούς με ‘υψηλή’ αποθηκευτική ικανότητα ($OR > 1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής (λ) έχει σαν συνέπεια την αύξηση του αντίστοιχου OR, ενώ για τους υποπληθυσμούς με ‘χαμηλή’ αποθηκευτική ικανότητα ($OR < 1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής (λ) στον ιστό έχει σαν συνέπεια τη μείωση του OR, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής τους ανάμεσα σε κύτταρα με χαμηλή αποθηκευτική ικανότητα, μπορεί να εξηγήσει γιατί ένα $CD11c^+CD163^+$ κύτταρο είναι πιο πιθανό να αποθηκεύσει χρωστική στη δερματίτιδα από στάση ($OR > 1$ και ευρεία κατανομή της χρωστικής σε όλο το χόριο) και ένα $CD11c^-CD163^-$ είναι πιο πιθανό να μην αποθηκεύσει χρωστική στη δερματοστιξία ($OR < 1$ και περιορισμένη διαθεσιμότητα χρωστικής στα ανώτερα στρώματα του χορίου) (Εικόνα 31, Εικόνα 36, Πίνακας 21).

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Το ποσοστό των κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής επί του συνόλου των κυττάρων του χορίου είναι μικρότερο στα δείγματα δερματοστιξίας σε σύγκριση με τις ‘δερματικές εκδηλώσεις φλεβικής στάσης’ ($73,6\% \pm 1,99$ έναντι $81,6\% \pm 2,82$; $p=0,039$)
- 2) Η σύνθεση του κυτταρικού πληθυσμού με ανοσοφαινότυπο $CD11c^+/CD163^+$, $CD11c^-/CD163^+$, $CD11c^+/CD163^-$ και $CD11c^-/CD163^-$ δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στα δείγματα δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση ($p>0.05$).
- 3) Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός με πρόσληψη χρωστικής τόσο για τις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και για τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση ήταν τα ιστικά ή M2 μακροφάγα.
- 4) Τα δενδριτικά κύτταρα συνιστούν ένα δεύτερο κυτταρικό πληθυσμό αποθήκευσης χρωστικής στις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση.
- 5) Ανάδειξη ενός τρίτου κυτταρικού πληθυσμού με πρόσληψη χρωστικής, που πιθανώς να εκπροσωπεί τους ινοβλάστες, τόσο για τις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και για τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση.
- 6) Δεν διαπιστώθηκε έκφραση των δεικτών CD117 (μαστοκύτταρα) και CD34 (ενδοθηλιακά κύτταρα) σε κύτταρα που φέρουν κοκκία χρωστικής τόσο στις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση.
- 7) Η έκφραση CD163 συνδέεται με σημαντικά υψηλότερο επίπεδο ανιχνευσιμότητας αποθήκευσης χρωστικής σε σύγκριση με την έκφραση CD11c τόσο στις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση.
- 8) Για τους υποπληθυσμούς με ‘υψηλή’ αποθηκευτική ικανότητα ($OR>1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής στον ιστό έχει σαν συνέπεια την αύξηση του αντίστοιχου OR ενώ για τους υποπληθυσμούς με ‘χαμηλή’ αποθηκευτική ικανότητα ($OR<1$) η επέκταση της διαθεσιμότητας της χρωστικής στον ιστό έχει σαν συνέπεια την μείωση του OR.
- 9) Η χρωστική στη δερματοστιξία είχε μια πιο στενή και επιφανειακή εντόπιση στο χόριο ενώ στη δερματίτιδα από στάση παρατηρήθηκε μια ευρύτερη κατανομή σε όλο το πάχος του χορίου.

- 10) Ένα $CD11c^+CD163^+$ κύτταρο είναι πιο πιθανό να αποθηκεύσει χρωστική στη δερματίτιδα από στάση ($OR>1$ και ευρεία κατανομή της χρωστικής σε όλο το χόριο) και ένα $CD11c^-CD163^-$ είναι πιο πιθανό να μην αποθηκεύσει χρωστική στη δερματοστιξία ($OR<1$ και περιορισμένη διαθεσιμότητα χρωστικής στα ανώτερα στρώματα του χορίου).

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δερματοστιξία και η δερματίτιδα από στάση χαρακτηρίζονται από εναπόθεση εξωγενούς και ενδογενούς χρωστικής στο δέρμα αντίστοιχα (1, 147). Σκοπός της μελέτης ήταν η συμβολή στην ανάδειξη των κυττάρων που συμμετέχουν στη διασπορά και στην αποθήκευση της χρωστικής από δερματοστιξία και δερματίτιδα από στάση. Μελετήθηκε η κυτταρολογική σύσταση του χορίου (μακροφάγα, δερματικά δενδριτικά κύτταρα, μαστοκύτταρα) στη θέση εντόπισης της χρωστικής, χρησιμοποιώντας τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, ιστοχημικές χρώσεις (χρώση Giemsa, Masson-Fontana και Perl's) καθώς και την ανοσοϊστοχημική μελέτη των δεικτών CD34, CD117, CD163, CD11c και βιμεντίνης σε 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας και 9 περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση.

Με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης παρατηρήθηκε περιαγγειακό, επιπολής και εν τω βάθει κυτταρικό πρότυπο (σε όλο το πάχος του χορίου και ίσως στο πιο επιφανειακό τμήμα του υποδόριου ιστού) σε 4 από τις 5 περιπτώσεις δερματοστιξίας και σε 8 από τις 9 περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση. Σε όλες τις περιπτώσεις το κυτταρικό διήθημα αφορούσε κυρίως λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και ολιγάριθμα μαστοκύτταρα. Σε μία περίπτωση δερματοστιξίας, αναγνωρίστηκαν και γιγαντοκύτταρα καθώς και σαρκοειδόμορφα κοκκιώματα, προφανώς σαν συνέπεια κοκκιωματώδους αντίδρασης στο έδαφος της δερματοστιξίας. Κοκκία χρωστικής στις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση εντοπίστηκαν στο θηλώδες και ανώτερο δικτυωτό χόριο (n=3, n=4), σε όλο το πάχος του χορίου (n=1, n=3) στις ανώτερες μοίρες του υποδόριου ιστού (n=1, n=1). Η εναπόθεση χρωστικής ανευρέθει κυρίως ενδοκυττάρια τόσο στις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση. Τα κύτταρα τα οποία προσέλαβαν τη χρωστική είτε εξωγενή είτε ενδογενή ήταν επιμήκη και μερικά από αυτά είχαν σαφείς κυτταροπλασματικές αποφυάδες.

Στις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση με την ιστοχημική χρώση Masson-Fontana αναδείχτηκαν κοκκία μελανίνης τόσο εξωκυττάρια όσο και ενδοκυττάρια σε επιμήκη κύτταρα σε 2 περιπτώσεις, ενώ ολιγάριθμα εξωκυττάρια κοκκία χρωστικής σε επιπλέον 3 περιπτώσεις. Με τη χρώση Perl's, διαπιστώθηκε η παρουσία άφθονων εναποθέσεων αιμοσιδηρίνης σε όλες τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση. Με την ιστοχημική χρώση Giemsa καθώς και με το δείκτη CD117 δεν ανιχνεύτηκαν μαστοκύτταρα με αποθήκευση χρωστικής σε καμία από τις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση που μελετήθηκαν.

Σε όλες τις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση, τα κύτταρα με πρόσληψη χρωστικής ήταν θετικά για τη βιμεντίνη και αρνητικά για τους CD117 και CD34 δείκτες. Από τις διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (ανίχνευση έκφρασης CD163 και CD11c αντιγόνων) προέκυψε ότι ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός με πρόσληψη χρωστικής τόσο για τις περιπτώσεις δερματοστιξίας όσο και για τις περιπτώσεις δερματίτιδας από στάση ήταν τα ιστικά ή M2 μακροφάγα. Άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί με πρόσληψη χρωστικής που αναδείχθηκαν ήταν τα δενδριτικά κύτταρα και πιθανώς οι ινοβλάστες.

Από την ανάλυση της σύνθεσης του κυτταρικού πληθυσμού στο σύνολό του αλλά και ανάμεσα στα κύτταρα με αποθήκευση χρωστικής, προέκυψε ότι τα ποσοστά των διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών με ανοσοφαινότυπο CD11c⁺/CD163⁺, CD11c⁻/CD163⁺, CD11c⁺/CD163⁻ και CD11c⁻/CD163⁻ δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των περιπτώσεων δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση ($p > 0.05$). Προέκυψε ότι ο δείκτης CD163 συνδέονταν με μεγαλύτερη αποθηκευτική ικανότητα χρωστικής. Ορισμένες διαφορές που προέκυψαν ανάμεσα στις περιπτώσεις δερματοστιξίας και δερματίτιδας από στάση (OR των ‘διπλά θετικών’ κυττάρων με αποθήκευση χρωστικής σημαντικά χαμηλότερο και αντίθετα των CD163⁻/CD11c⁻ ‘διπλά αρνητικών’ σημαντικά υψηλότερο στην περίπτωση της δερματοστιξίας σε σύγκριση με την δερματίτιδα από στάση) είναι αποτέλεσμα διαφορετικού τρόπου διασποράς της χρωστικής στον ιστό στις 2 καταστάσεις: Η εξωγενής χρωστική στη δερματοστιξία μπορούσε να επεκταθεί μόνο σε ένα υποσύνολο αποθηκευτικών κυττάρων τα οποία ανευρίσκονταν σε μια πιο στενή και πιο επιφανειακή ιστική ζώνη σε αντίθεση με την ενδογενή χρωστική στη δερματίτιδα από στάση που ήταν διαθέσιμη για αποθήκευση από όλα τα δυνητικώς αποθηκευτικά κύτταρα σε όλο το χόριο.

8 SUMMARY

Contribution to the characterization of the population of the ink storing cells in human skin tattoo

Mavridou Konstantina Dimitra

Tattoos and stasis dermatitis are characterized by the deposition of exogenous and endogenous pigment in the skin, respectively (1, 147). Aim of the present study was to contribute to the characterization of the cells which are responsible for the dispersion and the storage of the pigment in tattoos and stasis dermatitis.

The pigment bearing cellular populations of the dermis (macrophages, skin dendritic cells, mast cells) at the site of pigmentation were characterized employing hematoxylin-eosin (HE) staining, histochemical (Giemsa, Masson-Fontana and Perl's staining) and an immunohistochemical method with the use of CD34, CD117, CD163, CD11c and vimentin markers in five cases of tattoo and nine cases of stasis dermatitis.

HE staining showed perivascular, superficial, and profoundly cellular pattern (throughout the thickness of the dermis and probably in the most superficial part of the subcutaneous tissue) in four of the five cases of tattooing and in eight of nine cases of stasis dermatitis. In all cases the tissue inflammatory cell infiltrate consisted mainly by lymphocytes, macrophages, and a small number of mast cells. In one tattoo case, a giant cell sarcoid granuloma was identified, apparently due to the development of a granulomatous reaction secondary to tattoo. Pigment granules were found in the papillary and superior reticular dermis (n = 3, n= 4), throughout the thickness of the dermis (n = 1, n=3) and in the superior degrees of subcutaneous tissue (n= 1, n= 1) in the cases of tattooing and stasis dermatitis respectively. The deposited pigment was found mainly intracellular both in cases of tattoo and stasis dermatitis. The pigment bearing cells, were of elongated morphology and in at least some of them clear cytoplasmic outgrowths were evident.

With the histochemical Masson-Fontana staining, both extracellular and intracellular melanin granules in elongated cells were detected in two cases of stasis dermatitis, while a small number of extracellular pigment granules in additional three cases. Perl's staining

revealed the presence of abundant hemosiderine deposits in all cases of stasis dermatitis. With the Giemsa staining and immunohistochemistry with CD117 marker no ink storage could be identified in mast cells neither in cases of tattoo nor of stasis dermatitis.

In all cases of tattoo and stasis dermatitis, all cells with pigment uptake were positive for vimentin and negative for CD117 and CD34 marker expression. Double immunohistochemical staining (for the expression of CD163 and CD11c antigens) confirmed that the main cell population with pigment uptake was the tissue or M2 macrophage both in tattoo and stasis dermatitis cases. A secondary cell population seems to be some dendritic cells and a minority were probably fibroblasts.

The analysis of the composition of the cell population as a whole but also among the cells with pigment storage, showed that the percentages of different cell subpopulations with $CD11c^+/CD163^+$, $CD11c^-/CD163^+$, $CD11c^+/CD163^-$ and $CD11c^-/CD163^-$ immunophenotypes did not differ significantly between samples of both settings ($p > 0.05$). It turned out that the expression of the CD163 index is associated with the greatest pigment storage capacity. Certain differences between tattoo and stasis dermatitis cases (the OR of the 'double positive' cells with pigment storage is significantly lower, whereas the OR of the $CD163^-/CD11c^-$ 'double negative' cells is significantly higher in tattoo compared to stasis dermatitis) are the consequence of differing modes of pigment dispersion within the tissue in the two conditions: The exogenous transepidermally deposited pigment in the tattoo could reach only a subfraction of storing cells located in a narrower, more superficial tissue zone as opposed to the endogenous stasis dermatitis pigment that was available for storage for all potentially storing cells throughout the whole dermis.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vassileva S, Hristakieva E. Medical applications of tattooing. *Clin Dermatol*. 2007;25(4):367-74.
2. Wikipedia the free encyclopedia [Internet]. en. wikipedia. org; Tattoo; [updated 2020 April 25; cited 2020 May 14]; [about 7 p]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tattoo>
3. Δελμούζου Ε. Διακόσμηση του σώματος με τατουάζ και body piercing [Internet]. In.gr; 2002 April 16 [cited 2020 May 14]. Available from: <https://www.in.gr/2002/04/16/health/health-news/diakosmisi-toy-swmatos-me-tatoyaz-kai-body-piercing/>
4. Spindler K. The man in the ice under special consideration of paleopathological evidence. *Verch Dtsch Ges Pathol*. 2001;85:229-36.
5. Levy J, Sewell M, Goldstein N. A short history of tattooing. *J Dermatol Surg Oncol*. 1979;5(11):851-6.
6. Belden E. Captain James Cook and his Contribution to Tattooing [Internet]. Tattoo.com; 2016 March 22 [cited 2020 May 14]. Available from: <https://www.tattoo.com/blog/captain-james-cook-and-his-contribution-tattooing/>
7. Goldstein N, Sewell M. Tattoos in different cultures. *J Dermatol Surg Oncol*. 1979;5(11):857-64.
8. Fried RI. The psychodynamics of tattooing: a review. *Cleve Clin Q*. 1983;50(2): 239-42.
9. Carroll ST, Riffenburgh RH, Roberts TA et al. Tattoos and body piercings as indicators of adolescent risk-taking behaviors. *Pediatrics*. 2002;108(6):1021-7.
10. Laumann AE Derick AJ. Tattoos and body piercings in the United States: A national data set. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(3):413-21.
11. Roberts TA, Ryan SA. Tattooing and high-risk behavior in adolescents. *Pediatrics*. 2002;110(6):1058-63.
12. Raspa RF, Cusack J. Psychiatric implications of tattoos. *Am Fam Physician*. 1990;41(5):1481-6.
13. Manuel L, Retzlaff PD. Psychopathology and tattooing among prisoners. *Int J Offender Ther Comp Criminol*. 2002;46(5):522-31.

14. Βασιλαματζής Γ, Κουταζάκης Β. Ειδικές διαταραχές προσωπικότητας. In: Χριστοδούλου ΓΝ και συν. Ψυχιατρική. 3rd ed. Αθήνα: Βήτα. Ιατρικές Εκδόσεις ΜΕΠΕ; 2004. p. 525-42.
15. Grumet GW. Psychodynamic implications of tattoos. *Am J Orthopsychiatry*. 1983;53(3):482-92.
16. Buhrich N. The association of erotic piercing with homosexuality, sadomasochism, bondage, fetishism, and tattoos. *Arch Sex Behav* 1983;12:167-71.
17. Helmenstine Anne Marie. Tattoo Ink Chemistry [Internet]. ThoughtCo; [updated 2019 Nov 4; cited 2020 May 18]. Available from: <https://www.thoughtco.com/tattoo-ink-chemistry-606170>
18. U.S Food and Drug Administration. Tattoos and permanent makeup: Fact Sheet [Internet]. 2019 [updated 2019 October 31;cited 2020 May 16]. Available from: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-products/tattoos-permanent-makeup-fact-sheet>
19. Kazandjieva J, Tsankov N. Tattoos: dermatological complications. *Clin Dermatol*. 2007;25(4):375-82.
20. Setlur J. Cosmetic and reconstructive medical tattooing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;15(4):253-7.
21. Mortimer NJ, Chave TA, Johnston GA. Red tattoo reactions. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(5):508-10.
22. Amann U, Luger TA, Metze D. Lichenoid pseudolymphomatous tattooing reaction. *Hautarzt*. 1997;48(6):410-13.
23. Dang M, Hsu S, Bernstein E. Lichen planus or lichenoid tattoo reaction? *Int J Dermatol*. 1998;37(11):860-1.
24. Cui W, McGregor DH, Stark SP et al. Pseudoepitheliomatous hyperplasia – an unusual reaction following tattoo: report of a case and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2007;46(7):743-5.
25. Kluger N, Durand L, Minier-Thoumin C, et al. Pseudoepitheliomatous epidermal hyperplasia in tattoos: report of three cases. *Am J Clin Dermatol*. 2008;9(5):337-40.
26. Mahalingam M, Kim E, Bhawan J. Morphea-like tattoo reaction. *Am J Dermatopathol*. 2002;24(5):392-5.
27. Koh MJA, Teo RYL, Liu TT. Multiple epidermal cysts occurring in a tattoo. *Singapore Med J*. 2009;50(11):376-7.

28. Sweeney SM. Tattoos: a review of tattoo practices and potential treatment options for removal. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(4):391-5.
29. Borrego L, Hernandez-Machin B, Gonzalez O et al. Sensitization to paraphenylenediamine in a streetside temporary tattoo artisan. *Contact Dermatitis.* 2005;52(5):288-9.
30. Cambier B, Rogge F. Traumatic tattoo: use of the variable pulsed erbium: YAG laser. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(5):605-9.
31. El Sayed F, Ammouy A, Dhaybi R. Treatment of fireworks tattoos with the Q-switched ruby laser. *Dermatol Surg.* 2005;31(6):706-8.
32. Nishioka Sde, Gyorkos TW. Tattoos as risk factors for transfusion-transmitted diseases. *Int J Infect Dis.* 2001;5(1):27-34.
33. Hwang LY, Kramer JR, Troisi C et al. Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. *Hepatology.* 2006;44(2):341-51.
34. Landers MC, Skokan M, Law S et al. Cutaneous and pulmonary sarcoidosis in association with tattoos. *Cutis.* 2005;75(1):44-8.
35. Antonovich DD, Callen JP. Development of sarcoidosis in cosmetic tattoos. *Arch Dermatol.* 2005;141(7):869-72.
36. Baumgartner M, Feldmann R, Breier F et al. Sarcoidal granulomas in a cosmetic tattoo in association with pulmonary sarcoidosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010;8(11):900-2.
37. Ali SM, Gilliam AC, Brodell RT. Sarcoidosis appearing in a tattoo. *J Cutan Med Surg.* 2008;12(1):43-8.
38. Birnie AJ, Kulkarni K, Varma S. Basal cell carcinoma arising in a tattoo. *Clin Exp Dermatol.* 2006;31(6):820-1.
39. Omidian M, Emad-Mostofi N. Basal cell carcinoma arising from traditional tattoo. *Arch Iranian Med.* 2009;12(2):198,203.
40. Kluger N, Phan A, Debarbieux S et al. Skin cancers arising in tattoos: coincidental or not? *Dermatology.* 2008;217:219-21.
41. Pitarch G, Martinez-Menchón T, Martinez-Aparicio A et al. Squamous cell carcinoma over tattoos. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(6):1072-3.
42. Paradisi A, Capizzi R, De Simone C et al. Malignant melanoma in a tattoo: case report and review of the literature. *Melanoma Res.* 2006;16(4):375-6.

43. Wolfort FC, Hoopes JE, Filtzer HS et al. Superficial melanoma in a tattoo. *Brit J Plastic Surg.* 1974;27:303-4.
44. Gon Ados S, Minelli L, Meissner MC. Keratoacanthoma in a tattoo. *Dermatol Online J.*2009;15(7):9.
45. Chorny JA, Stephens FV, Cohen JL. Eruptive keratoacanthomas in a new tattoo. *Arch Dermatol.* 2007;143(11):1457-8.
46. Kluger N, Minier-Thoumin C, Plantier F. Keratoacanthoma occurring within the red dye of a tattoo. *J Cutan Pathol.* 2008;35(5):504-7.
47. Klitscher D, Blum J, Kreitner KF et al. MRT-induced burns in tattooed patients. Case report of an traumatic surgery patient. *Unfallchirurg.* 2005;108(5):410-4.
48. Kuczkowski KM. Lumbar tattoos, magnetic resonance imaging, and obstetric anesthesia: what do they have in common? *J Anesth.* 2007;21:293.
49. Kreidstein ML, Giguere D, Freiberg A. MRI interaction with tattoo pigments: case report, pathophysiology, and management. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(6):1717-20.
50. Franiel T, Schmidt S, Klingebiel R. First-degree burns on MRI due to nonferrous tattoos. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(5):556.
51. Eager RP. Atopy to henna tattoos in children. *Eur J Emerg Med.* 2005;12(4):189-90.
52. Gunasti S, Aksungur VL. Severe inflammatory and keloidal, allergic reaction due to para-phenylenediamine in temporary tattoos. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2010;76(2):165-7.
53. Durmazlar SP, Tatlican S, Eskioglu F. Localized hypertrichosis due to temporary henna tattoos: report of three cases. *J Dermatolog Treat.* 2009;20(6):371-3.
54. Bukhari IA. Cutaneous hyperpigmentation following nonpermanent henna tattoo. *Saudi Med J.* 2005;26(1):142-4.
55. Rastogi SC, Johansen JD. Colourants in transferable picture tattoos for the skin. *Contact Dermatitis.* 2005;53(4):207-10.
56. Drews DR, Allison CK, Probst JR. Behavioral and self-concept differences in tattooed and nontattooed college students. *Psychol Rep.* 2000;86(2):475-81
57. Long GE, Rickman LS. Infectious complications of tattoos. *Clin Infect Dis.* 1994;18(4):610-9.
58. Stirn A, Brahler E, Hinz A. Prevalence, sociodemography, mental health and gender differences of tattooing and body piercing. *Psychother Psychosom Med Psychol.* 2006;56(11):445-9.

59. Armstrong ML, Roberts AE, Owen DC et al. Contemporary college students and body piercing. *J Adolesc Health*. 2004;35(1):58-61.
60. Pfirrmann G, Karsai S, Roos S et al. Tattoo removal-state of the art. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5(10):889-97.
61. Wenzel S, Landthaler M, Baumler W. Recurring mistakes in tattoo removal. A case series. *Dermatology*. 2009;218(2):164-7.
62. Burris K, Kim K. Tattoo removal. *Clin Dermatol*. 2007;25(4):388-92.
63. Elsaie ML, Nouri K, Vejjabhinanta V et al. Topical imiquimod in conjunction with Nd :YAG laser for tattoo removal. *Lasers Med Sci*. 2009;24(6):871-5.
64. Anderson RR, Margolis RJ, Watanabe S et al. Selective photothermolysis of cutaneous pigmentation by Q-switched Nd:YAG laser pulses at 1064, 532, and 355 nm. *J Invest Dermatol*. 1989;93(1):28-32.
65. Bregnhøj A, Haedersdal M. Q-switched YAG laser vs punch biopsy excision for iatrogenic radiation tattoo markers-a randomized controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(10):1183-6.
66. De Cuyper C. Permanent makeup: indications and complications. *Clin Dermatol*. 2008;26(1):30-4.
67. van der Velden E.M, Defranco J, Ijsselmuiden O.E et al. Dermatography: a review of 15 years of clinical applications in surgery. *Int J Cosmet Surg Aesthet Dermatol*. 2001;3:151-9.
68. Garg G, Thami GP. Micropigmentation: tattooing for medical purposes. *Dermatol Surg*. 2005;31(8):928-31.
69. Abbes M, Boursault C, Conso D et al. Forum: dermopigmentation or medical tattooing. Dermatography in cancerology. Apropos of 220 clinical cases. *Ann Chir Plast Esthet*. 1992;37(4):394-01.
70. Fitoussi AD, Pollet AG, Couturaud B et al. Nipple and areola reconstruction by tattooing, "F" and "Z" flaps. *Ann Chir Plast Esthet*. 2008;53(4):348-57.
71. El-Ali K, Dalal M, Kat CC. Tattooing of the nipple-areola complex: review of outcome in 40 patients. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(10):1052-7.
72. van der Velden EM, Baruchin AM, Jairath D et al. Dermatography: a method for permanent repigmentation of achromic burn scars. *Burns*. 1995;21(4):304-7.

73. Brandt MG, Moore CC, Conlin AE et al. A pilot randomized control trial of scar repigmentation with UV light and dry tattooing. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139(6):769-74.
74. Guyuron B, Vaughan C. Medical-grade tattooing to camouflage depigmented scars. *Plast Reconstr Surg.* 1995;95(3):575-9.
75. van der Velden EM, Drost BH, Ijsselmuiden OE et al. Dermatography as a new treatment for alopecia areata of the eyebrows. *Int J Dermatol.* 1998;37(8):617-21.
76. Cho YB, Lee WY, Yun HR et al. Tumor localization for laparoscopic colorectal surgery. *World J Surg.* 2007;31(7):1491-5.
77. Park JW, Sohn DK, Hong CW et al. The usefulness of preoperative colonoscopic tattooing using a saline test injection method with prepackaged sterile India ink for localization in laparoscopic colorectal surgery. *Surg Endosc.* 2008;22(2):501-5.
78. Yeung JM, Maxwell-Armstrong C, Acheson AG. Colonic tattooing in laparoscopic surgery-making the mark? *Colorectal Dis.* 2009;11(5):527-30.
79. Gunay Y, Erkan M, Gurbuzer B et al. Facilitation of facial prosthesis placement with tattoo markers: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 2007;97(5):256-60.
80. van der Velden EM, de Jong BD, van der Walle HB et al. Cosmetic tattooing as a treatment of port-wine stains. *Int J Dermatol.* 1993;32(5):372-5.
81. van der Velden EM, Drost BH. Dermatography for the treatment of telangiectasis after radiation therapy in the head and neck: report of cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(1):75-6.
82. Naeini FF, Najafian J, Ahmadpour K. Bleomycin tattooing as a promising therapeutic modality in large keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg.* 2006;32(8):1023-9.
83. Chen MA, Davidson TM. Scar management: prevention and treatment strategies. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck.* 2005;13(4):242-7.
84. Spyropoulou GA, Fatah F. Decorative tattooing for scar camouflage: patient innovation. *J Plast Aesthet Surg.* 2009;62(10):353-5.
85. van der Velden EM, Defranq J, van der Dussen MF. Dermatography as an adjunctive treatment of uni- and bilateral scars in combination with pseudo-hair formation after craniosurgery. *J Craniofac Surg.* 2004;15(2):270-3.

86. van der Velden EM, van der Dussen MF. Pseudo-hair formation with dermatography as an adjunctive treatment for cleft lip and palate patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(4):427-8.
87. van der Velden EM, Ijsselmuiden OE, Drost BH et al. Dermatography with bleomycin as a new treatment for verrucae vulgaris. *Int J Dermatol.* 1997;36(2): 145-50.
88. Center JM, Mancini S, Baker GI et al. Management of gingival vitiligo with the use of a tattoo technique. *J Periodontol.* 1998;69(6):724-8.
89. Mahajan BB, Garg G, Gupta RR. Evaluation of cosmetic tattooing in localised stable vitiligo. *J Dermatol.* 2002;29(11):726-30.
90. Singh AK, Karki D. Micropigmentation: tattooing for the treatment of lip vitiligo. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63(6):988-91.
91. Foyatier JL, Comparin JP, Boulos JP et al. Reconstruction of facial burn sequelae. *Ann Chir Plast Esthet.* 2001;46(3):210-26.
92. van der Velden EM, van der Dussen MF. Dermatography as an adjunctive treatment for cleft lip and palate patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(1):9-12.
93. van der Velden EM, Bosch R, Ijsselmuiden OE et al. Dermatography. An effective method for pacemaker marking after spinal cord injuries and implantation of a Brindley stimulator for neurogenic bladder. *Urologe A.* 2001;40(5):394-6.
94. van der Velden EM, Wittkamp AR, de Jong BD et al. Dermatography, a treatment for sequelae after head and neck surgery: a case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 1992;20(6):273-8.
95. Furuta S, Hataya Y, Watanabe T et al. Vermilionplasty using medical tattooing after radial forearm flap reconstruction of the lower lip. *Br J Plast Surg.* 1994;47(6):422-4.
96. Sun L, Si J, Chen S et al. The establishment and clinical appliance of technique of mucosa marking targeting biopsy. *Hepatogastroenterology.* 2009;56(89):59-62.
97. Lannin DR, Grube B, Black DS et al. Breast tattoos for planning surgery following neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg.* 2007;194(4):518-20.
98. Ko K, Han BK, Jang KM et al. The value of ultrasound-guided tattooing localization of nonpalpable breast lesions. *Korean J Radiol.* 2007;8(4):295-301.
99. Kang TW, Shin JH, Han BK. Preoperative ultrasound-guided tattooing localization of recurrences after thyroidectomy: safety and effectiveness. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(6):1655-9.

100. Kymionis GD, Ide T, Galor A et al. Femtosecond-assisted anterior lamellar corneal staining-tattooing in a blind eye with leukocoria. *Cornea*. 2009;28(2):211-3.
101. Bins AD, Jorritsma A, Wolkers MC et al. A rapid and potent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression. *Nat Med*. 2005;11(8):899-904.
102. Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):905-16.
103. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390-9.
104. Mathers AR, Larregina AT. Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res*. 2006;36(1-3):127-36.
105. Pokorna D, Rubio I, Muller M. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet Vaccines Ther*. 2008;6:4.
106. van den Berg JH, Nuijen B, Beijnen JH et al. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther*. 2009;20(3):181-9.
107. van der Velden EM, Defranq J, Baruchin AM. Cosmetic and reconstructive medical tattooing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13(6):349-53.
108. Χαντζής Ι. ΒΑΣΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΑ- ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΙΑ. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας;1994. 822p.
109. Lehmann B, Querings K, Reichrath J. Vitamin D and skin: new aspects for dermatology. *Exp Dermatol*. 2004;13(4):11-5.
110. Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res*. 2007;39(2):85-95.
111. Arnold HL, Odom RB, James WD. *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology*. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;1990. 1062p.
112. Bruckner-Tuderman L. Biology of the Extracellular Matrix. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV editors. *Dermatology*. 3rd ed. China: Elsevier Limited; 2012. p. 1585-1598.
113. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22–30.
114. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):417–28.

115. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:131.
116. McGovern N, Schlitzer A, Gunawan M, et al. Human dermal CD14⁺ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity.* 2014;41(3):465-477.
117. Tarique AA, Logan J, Thomas E, et al. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53(5):676–88.
118. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723–37.
119. Iqbal S, Kumar A. Characterization of In vitro Generated Human Polarized Macrophages. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(6):380.
120. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460.
121. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986–95.
122. Schlitzer A, Schultze JL. Tissue-resident macrophages - how to humanize our knowledge. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(2):173–7.
123. Lavin Y, Merad M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(4):201-209.
124. Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):858–66.
125. Kritas SK, Saggini A, Varvara G, et al. Impact of mast cells on the skin. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26(4):855–9.
126. Joshi MM, Buch AC, Panicker NK, et al. Mast Cells in Non-neoplastic Skin Lesions. *Indian Medical Gazette.* 2013;145(1):8- 13.
127. van Daele PLA, Beukenkamp BS, Geertsma-Kleinekoort WMC, et al. Immunophenotyping of mast cells: a sensitive and specific diagnostic tool for systemic mastocytosis. *Neth J Med.* 2009;67(4):142–6.
128. Fang F, Ni K, Cai Y, et al. Biological characters of human dermal fibroblasts derived from foreskin of male infertile patients. *Tissue Cell.* 2017;49(1):56–63.

129. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 2004;117:667–75.
130. Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, et al. An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(4):347-58.
131. Alt E, Yan Y, Gehmert S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell.* 2011;103(4):197–208.
132. Σταυρόπουλος ΠΓ. Το δέρμα ως τμήμα του ανοσιακού συστήματος του οργανισμού. Το περιοδικό των ιατρών. *Ιατρικό Βήμα* [Internet]. 2003 June [cited 2020 5];87. Available from:
http://www.iatrikionline.gr/IB_87_WEB/06%20ToDerma.html
133. Bos JD. Skin Immune System (SIS). In: Bos JD editor. *Skin Immune System (SIS): Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology.* Boca Raton: CRC Press; 2005. p 3-17.
134. Mann R, Klingmüller G. Electron-microscopic Investigation of Tattoos in Rabbit Skin. *Arch Dermatol Res.* 1981;271(4):367-72.
135. Lea PJ, Pawlowski A. Human tattoo. Electron microscopic assessment of epidermis, epidermal-dermal junction, and dermis. *Int J Dermatol.* 1987;26(7):453-8.
136. Fujita H, Nishii Y, Yamashita K, et al. The uptake and long-term storage of india ink particles and latex beads by fibroblasts in the dermis and subcutis of mice, with special regard to the non-inflammatory defense reaction by fibroblasts. *Arch Histol Cytol* 51(3):285–94.
137. Sperry K. Tattoos and Tattooing. Part II: Gross Pathology, Histopathology, Medical Complications, and Applications. *Am J Forensic Med Pathol.* 1992;13(1):7-17.
138. Bäuml W. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Tattoo Colorants and Ingredients in Mouse and Man: The Known and the Unknown. *Curr Probl Dermatol.* 2015;48:176-84.
139. Gopee NV, Cui Y, Olson G, et al. Response of mouse skin to tattooing: use of SKH-1 mice as a surrogate model for human tattooing. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;209(2):145-58.
140. O'goshi K, Suihko C, Serup J. In vivo imaging of intradermal tattoos by confocal scanning laser microscopy. *Skin Res Technol.* 2006;12(2):94-8.

141. Morsy H, Mogensen M, Thrane L, et al. Imaging of intradermal tattoos by optical coherence tomography. *Skin Res Technol.* 2007;13(4):444-8.
142. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, et al. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2517-25.
143. The Rockefeller University. Common immune cell marker shown to be off-target [Internet]. New York: The Rockefeller University;2007 [cited 2020 June 6]. Available from:
<https://www.rockefeller.edu/news/2602-common-immune-cell-marker-shown-to-be-off-target/>
144. Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, et al. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J Invest Dermatol.* 2008;128(9):2225-31.
145. Grant CA, Twigg PC, Baker R, et al. Tattoo ink nanoparticles in skin tissue and fibroblasts. *Beilstein J Nanotechnol.* 2015 20;6:1183–91.
146. Baranska A, Shawket A, Jouve M, et al. Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal. *J Exp Med.* 2018;215(4):1115–33.
147. Reiter N, Fritsch PO. Other eczematous eruptions. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV editors. *Dermatology.* 3rd ed. China: Elsevier Limited; 2012. p 219-232.
148. Caggiati A, Rosi C, Franceschini M, et al. The nature of skin pigmentations in chronic venous insufficiency: a preliminary report. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;35(1):111–8.
149. Kim D, Kang WH. Role of dermal melanocytes in cutaneous pigmentation of stasis dermatitis: a histopathological study of 20 cases. *J Korean Med Sci.* 2002;17(5): 648–54.
150. Zola H, Swart B. CD Markers. In: Vohr H-W, editor. *Encyclopedia of Immunotoxicology* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [cited 2020 May 15]. p. 1–5. Available from:
https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-27786-3_216-2
151. Zola H, Swart B, Banham A, et al. CD molecules 2006-human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods.* 2007;319(1–2):1–5.

152. Onofre G, Kolácková M, Jankovicová K, Krejsek J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2009;52(2):57–61.
153. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(5):794–801.
154. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2352–63.
155. Sándor N, Lukácsi S, Ungai-Salánki R, et al. CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18. *PLoS ONE*. 2016;11(9):e0163120.
156. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(4):385-95.
157. Shelley CS, Arnaout MA. The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10525–9.
158. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*. 2008;181(9):5829-35.
159. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13(3):205-20.
160. Dirnhofer S, Zimpfer A, Went P. Die diagnostische und prädiktive Bedeutung von Kit (CD117) [The diagnostic and predictive role of kit (CD117)]. *Ther Umsch*. 2006;63(4):273-8.
161. Ferrari S, Cannizzaro LA, Battini R, et al. The gene encoding human vimentin is located on the short arm of chromosome 10. *Am J Hum Genet*. 1987;41(4):616-26.
162. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-9.
163. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, et al. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics*. 1992;12(4):788-94.
164. Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, et al. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*. 2010;5:9-20.
165. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*. 1991;37(5):625-36.

166. Stankiewicz K. Tattoos, Melasma and Dermal Pigment. In: Avram MM, Friedman PM, Avram MR, editors. *Laser and Light Source Treatments for the Skin* [Internet]. New Delhi, india: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd; 2014 [cited 2020 June 8]. p. 17-27.
167. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med*. 2011;208(2):227-34.

