



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΝΟΣΩΝ**

**Επίδραση της ανοσοκρυσταλλουργικής νεοπλασμάτων του δέρματος
προερχόμενων από επιθηλιακά κύτταρα στον ανοσοφαινότυπο των
κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων**

**ΑΡΕΤΗ Θ. ΓΚΑΝΙΑΤΣΑ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΝΟΣΩΝ**

**Επίδραση της ανοσοκρυσταλλοχειρουργικής νεοπλασμάτων του δέρματος
προερχόμενων από επιθηλιακά κύτταρα στον ανοσοφαινότυπο των
κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων**

**ΑΡΕΤΗ Θ. ΓΚΑΝΙΑΤΣΑ
ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γκανιάτσα Αρετής: 24-3-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 687α/8-6-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπριασούλης Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαϊτάνης Γεώργιος, Λέκτορας Δερματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-07-2010

«Επίδραση της ανοσοκρυσταλλουργικής νεοπλασμάτων του δέρματος προερχόμενων από επιθηλιακά κύτταρα στον ανοσοφαινότυπο των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 794^α/31-1-2017

Επιβλέπων:

Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Καψάλη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαϊτάνης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. 956^α/24-3-2021

Επιβλέπων:

Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Καψάλη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παππάς Περικλής, Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: Γ.Σ. 975^α/27-7-2021

1. Μπασούκας Ιωάννης, Καθηγητής Δερματολογίας με έμφαση στην Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Παππάς Περικλής, Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Καψάλη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σερέτης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Πλαστικής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Κίτσος Γεώργιος, Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 19-10-2021

Ιωάννινα 29-11-2021

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



***Αφιερώνεται στον σύζυγό μου και
στα παιδιά μου***

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, στην Ερευνητική Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Δερματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιβλέποντα της διατριβής, κ. Ιωάννη Μπασούκα, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής και τον λεπτομερή σχεδιασμό της, την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον του σε όλα τα στάδια της διατριβής, τις εύστοχες υποδείξεις του, τις γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς και την ηθική στήριξη που μου επέδειξε.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Περικλή Παππά, για την πολύτιμη επιστημονική κατάρτιση και βοήθειά του στο πειραματικό μέρος της διατριβής, την ευχάριστη και εποικοδομητική συνεργασία μας και την άμεση ανταπόκρισή του στις απορίες μου.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. Ελένη Καψάλη, για την συμβολή της, τη συνεργασία μας, τις καίριες παρατηρήσεις και υποδείξεις της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δερματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Γεώργιο Γαϊτάνη, για την συνεργασία, την καθοδήγησή του, τη φιλική συμπεριφορά του, την ουσιαστική βοήθειά του στην προσέγγιση και διαχείριση των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον επιστημονικό υπεύθυνο της μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε για την κυτταρομετρία ροής με μεγάλη προθυμία και ενθουσιασμό, την άοκνη συμμετοχή και επίβλεψή του σε κάθε στάδιο του πειραματικού μέρους της διατριβής και την ευγένειά του.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω για τις εύστοχες και σημαντικές υποδείξεις τους και τη φιλική συμπεριφορά τους και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής και συγκεκριμένα στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γούσια Άννα, στον Καθηγητή Οφθαλμολογίας της Ιατρικής Σχολής του

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κίτσο Γεώργιο , στον Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής- Βιοφυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κουρκουμέλη Νικόλαο και στον Επίκουρο Καθηγητή Πλαστικής Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Σερέτη Κωνσταντίνο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτωρα κ. Αχιλλέα Καραμούτσιο και την παρασκευάστρια του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Ελένη Μπαράκου για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διενέργεια της κυτταρομετρίας ροής καθώς και τον Δρ. Ιωάννη Σίμο, κλινικό διαιτολόγο-διατροφολόγο, για την σημαντική επιστημονική συμβολή του στην ερμηνεία της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Κλινική εικόνα Βασικοκυτταρικού καρκινώματος.....	9
1.2 Μέθοδοι θεραπείας του βασικοκυτταρικού καρκινώματος	10
1.2.1 Χειρουργική εξαίρεση	10
1.2.2 Απόξεση του όγκου σε συνδυασμό με διαθερμοπηξία	11
1.2.3 Απλή απόξεση	11
1.2.4 Μικρογραφική χειρουργική αφαίρεση κατά Mohs	11
1.2.5 Ακτινοθεραπεία	11
1.2.6 Κρυοχειρουργική	11
1.2.7 Φωτοδυναμική θεραπεία	12
1.2.8 Εξαίρεση με Laser	12
1.2.9 Τοπικές φαρμακευτικές θεραπείες	12
1.2.10 Συνδυαστική θεραπεία	13
1.3 Αρχή και πρωτόκολλο ανοσοκρυοχειρουργικής	13
1.3.1 Ο «σωστός» βαθμός φλεγμονής	17
1.3.2 Αντιμετώπιση των παρενεργειών	18
1.3.3 Μηχανισμός δράσης της ανοσοκρυοχειρουργικής	19
1.3.4 Ενδείξεις της ανοσοκρυοχειρουργικής	21
1.3.4.1 Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC)	22
1.3.4.2 Ακτινικές υπερκερατώσεις	24
1.3.4.3 Ακτινική χειλίτιδα	24
1.3.4.4 Νόσος Bowen του δέρματος (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα in situ)	25
1.3.4.5 Κερατοακάνθωμα	25
1.3.4.6 Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος (CSCC)	26
1.3.4.7 Κακοήθης φακή (lentigo maligna) και κακοήθης μελάνωμα	26

1.3.4.8 Σάρκωμα Kaposi	27
1.3.4.9 Καρκίνωμα κυττάρων Merkel	28
1.3.4.10 Καλοήθεις παθήσεις του δέρματος	28
1.3.4.11 Πυογόνο κοκκίωμα	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1 Ασθενείς	34
3.2 Μέθοδοι	35
3.2.1 Κυτταρομετρία ροής	35
3.2.1.1 Υλικά	44
3.2.1.2 Πρωτόκολλο εκτέλεσης	45
3.2.1.3 Ανάλυση	46
3.2.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	52
3.2.2.1 Υλικά	54
3.2.2.2 Πρωτόκολλο εκτέλεσης	57
3.2.3 Μέτρηση ποιότητας ζωής σε σχέση με τη θεραπεία	59
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
4.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής	65
4.1.1 Μεταβολές του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων	65
4.1.2 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD3 ⁺ T- λεμφοκυττάρων	66
4.1.3 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD3 ⁺ T- λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA	67
4.1.4 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4 ⁺ CD25 ^{high} T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg)	68
4.1.5 Μεταβολές του υποπληθυσμού των T ρυθμιστικών κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (TregCLA)	69
4.1.6 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4 ⁺ T-λεμφοκυττάρων	70
4.1.7 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4 ⁺ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (CD4 ⁺ CLA)	72

4.1.8 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD8 ⁺ T-λεμφοκυττάρων	72
4.1.9 Μεταβολές του πληθυσμού των B-λεμφοκυττάρων	73
4.1.10 Μεταβολές του πληθυσμού των NK κυττάρων (κύτταρα φυσικοί φονείς)	74
4.1.11 Μεταβολές του υποπληθυσμού των NK κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CD8 (CD8 ⁺) και του υποπληθυσμού των NK κυττάρων που είναι αρνητικά για το αντιγόνο CD8(CD8 ⁻)..	75
4.1.12 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των CD4 ⁺ CLA προς τον ολικό αριθμό των CD4	77
4.1.13 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των TregCLA προς τον ολικό αριθμό των Treg	77
4.1.14 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των TregCLA προς τον αριθμό των CD4 ⁺ CLA	78
4.1.15 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NK CD8 ⁺ προς τον ολικό αριθμό των NK κυττάρων	78
4.1.16 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NK CD8 ⁻ προς τον ολικό αριθμό των NK κυττάρων	78
4.1.17 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NK CD8 ⁻ προς τον αριθμό των NK CD8 ⁺ κυττάρων	79
4.2 Αποτελέσματα ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	80
4.2.1 Μεταβολές της IL-10	81
4.2.2 Μεταβολές της INFα	81
4.2.3 Μεταβολές του TNFa	81
4.2.4 Μεταβολές των IL-2 και IL-6	81
4.3 Αποτελέσματα ερωτηματολογίων ποιότητας ζωής	82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	96
ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	99
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	100
ABSTRACT	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	117

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC) αποτελεί τον πιο κοινό καρκίνο του ανθρώπου με συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση παγκοσμίως, ιδιαίτερα στην καυκάσια φυλή, ενώ σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως στην Αυστραλία, προσβάλλει ετησίως το 2% του πληθυσμού. Αφορά στο 80% των μη μελανοκυτταρικών καρκίνων του δέρματος (NMSC)^{1,2}. Πρόκειται για έναν κακοήγη όγκο του δέρματος με βραδεία ανάπτυξη σε διάστημα αρκετών ετών, με τοπική διήθηση και καταστροφή του δέρματος και των παρακείμενων ιστών. Εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 40 ετών, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 60 έτη με την συχνότητά του να αυξάνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας, αν και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της επίπτωσής του και σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 40 ετών³⁻¹¹. Οι άνδρες παρουσιάζουν διπλάσια επίπτωση σε σχέση με τις γυναίκες. Φαίνεται πως η υπέρμετρη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ιδίως κατά την παιδική και εφηβική ηλικία αποτελεί κύριο αιτιολογικό παράγοντα στην εκδήλωσή του¹²⁻¹⁸.

Το BCC σπάνια μεθίσταται αλλά μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη τοπική καταστροφή του δέρματος και των υποκείμενων ιστών σε περίπτωση μη αντιμετώπισής του. Γι' αυτό η συνεπής και επίμονη θεραπεία σε όλες τις διαγνωσμένες περιπτώσεις επιβάλλεται προς αποφυγή παραμελημένων όγκων με γενικά πτωχότερη πρόγνωση ή και εκτεταμένων υποτροπών σε ασθενείς με συνοδές παθήσεις. Η αποτυχία να επιτευχθεί μια τέτοια θεραπεία καθώς και η δυσκολία αντιμετώπισης πολλαπλών και μερικές φορές συρρέοντων βλαβών συνιστούν τις κύριες θεραπευτικές προκλήσεις¹⁹.

Σήμερα χρυσός κανόνας στη θεραπεία των «δύσκολα αντιμετωπίσιμων» πρωτοπαθών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων και των υποτροπών προτείνεται η μικρογραφική χειρουργική κατά Mohs, με πιθανότητα υποτροπής μετά από θεραπεία σε εξειδικευμένα κέντρα μόνο 0,8 - 1,7% στην πενταετία. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι θεραπείας, όπως (α) η συμβατική χειρουργική εξαίρεση με προκαθορισμένα όρια εκτομής και (β) η κρυοχειρουργική γενικά αναφέρονται στη βιβλιογραφία με υψηλότερα ποσοστά υποτροπών (2 - 19%)^{18,19,20,21}.

Η προοπτική της αυξανόμενης επίπτωσης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος ανέδειξε την εφαρμογή ελάχιστα επεμβατικών και λιγότερο καταστρεπτικών τεχνικών, όπως η τοπική ανοσοθεραπεία με ιντερφερόνη $\alpha 2\beta$ ²² ή με ιμικουιμόδη²³, σε επιλεγμένες

περιπτώσεις. Στην παρούσα φάση η ιμικουιμόδη έχει εκτιμηθεί κυρίως στην περίπτωση επιφανειακών BCC^{24,25,26}. Για τα οζώδη βασικοκυτταρικά καρκινώματα η αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αποτελεσματικότητα της ιμικουιμόδης είναι 76% και αφορά στο εντατικό σχήμα εφαρμογής της ημερησίως για 12 εβδομάδες^{27,28}. Συστηματικές θεραπείες που στοχεύουν το μονοπάτι του hedgehog είναι ήδη σε χρήση²⁹⁻³⁴.

Η ανοσοκρυστοχειρουργική είναι ο συνδυασμός της κρυστοχειρουργικής με την τοπική εφαρμογή ιμικουιμόδης και αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο αντιμετώπισης των επιφανειακών και οζωδών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων. Χρησιμοποιείται στην Δερματολογική κλινική του Παν/κού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από το 2006 και υπάρχουν επαρκή κλινικά στοιχεία που την καθιερώνουν ως εναλλακτική θεραπευτική επιλογή με αποτελέσματα επιτυχίας συγκρίσιμα με αυτά της συμβατικής χειρουργικής εξαίρεσης και της ακτινοθεραπείας (> 90%)^{35,36,37,17,38,39}.

1.1 Κλινική εικόνα Βασικοκυτταρικού καρκινώματος (BCC)

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται σε περιοχές του δέρματος που έχουν υποστεί βλάβη λόγω μακροχρόνιας έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. Οι κύριοι κλινικο-παθολογοανατομικοί τύποι του είναι οι ακόλουθοι τέσσερις (Bolognia)⁴⁰:

A) Οζώδες

Είναι ο συχνότερος τύπος BCC (50% των περιπτώσεων). Οι βλάβες τυπικά εμφανίζονται ως γυαλιστερές, μαργαριταροειδείς βλατίδες ή οζίδια, με λεία επιφάνεια με διακλαδιζόμενες ευρυαγγείες. Ο όγκος, προϊόντος του χρόνου μπορεί να μεγαλώσει και να εξελκωθεί, διατηρεί όμως ένα κυκλικό υπεργεर्मμένο όριο (όχθο) το οποίο αποτελεί κλινικό σημείο διάγνωσης. Η συνηθέστερη περιοχή εντόπισής του είναι το πρόσωπο, ιδίως οι παρειές, οι ρινοχειλικές πτυχές, το μέτωπο και τα βλέφαρα αλλά μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του δέρματος που φέρει τρίχες. Η εμφάνισή του σε άτριχες περιοχές (π.χ. γεννητικός βλεννογόνας) είναι εξαιρετικά σπάνια.

B) Επιφανειακό

Ο τύπος αυτός εμφανίζεται με τη μορφή καλά περιγεγραμμένων ερυθρηματωδών κηλίδων, επίπεδων βλατίδων και πλακών με διάμετρο που ποικίλλει από λίγα χιλιοστά έως αρκετά

εκατοστά. Επιπλέον ευρήματα αποτελούν η εστιακή απολέπιση, η εφελκιδοποίηση, ένα κυκλοτερές λεπτό όριο και ποικίλη ποσότητα μελανίνης. Στις μεγάλες βλάβες μπορεί να παρατηρηθούν περιοχές αυτόματης υποστροφής που διακρίνονται από ατροφία ή υπομελάγχρωση. Οι συνηθέστερες εντοπίσεις του είναι ο κορμός και τα άκρα και είναι ο πιο συχνός τύπος BCC στις νεαρότερες ηλικιακές ομάδες (μέση ηλικία εμφάνισης τα 57 έτη).

Γ) Δίκηνη σκληροδερμίας

Είναι λιγότερο συχνός τύπος και παρουσιάζεται με τη μορφή μιας ελαφρά υπεργερμένης ή ακόμα και εμβυθισμένης διηθημένης περιοχής με ανοιχτό ροζ ή λευκό χρώμα και ασαφή όρια που συχνά προσομοιάζει με ουλή ή πλάκα σκληροδερμίας. Η επιφάνειά του είναι συνήθως λεία αλλά μπορεί να εμφανίζει εφελκίδες με υποκείμενες διαβρώσεις, εξελκώσεις ή προβάλλουσες βλατίδες. Τυπικά απουσιάζει ο όχθος αλλά μπορεί να υπάρχουν τελαγγειεκτασίες. Έχει πιο επιθετική συμπεριφορά προκαλώντας εκτεταμένη ιστική καταστροφή.

Δ) Ινοεπιθηλίωμα του Pinkus

Αυτός ο σπάνιος τύπος εμφανίζεται ως μια σαρκόχροη ή υπέρυθρη, άμισχη πλάκα ή ως ένα έμμισχο βλατιδο-οζίδιο με λεία επιφάνεια. Εντοπίζεται συνήθως στον κατώτερο κορμό και είναι συχνότερο σε ασθενείς με πολλαπλά επιφανειακά βασικοκυτταρικά καρκινώματα.

Αξίζει να σημειωθεί πως κλινικά οι τρεις τελευταίοι τύποι βασικοκυτταρικού καρκινώματος μπορεί να συνδυάζονται με τον οζώδη τύπο. Επίσης περιγράφονται κάποιοι επιπρόσθετοι ιστοπαθολογικοί τύποι BCC όπως το βασικοπλακώδες και το μικρο-οζώδες καρκίνωμα.

1.2 Μέθοδοι θεραπείας του βασικοκυτταρικού καρκινώματος

1.2.1 Χειρουργική εξαίρεση

Η συμβατική χειρουργική εξαίρεση είναι αρκετά αποτελεσματική στην πλειονότητα των πρωτοπαθών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων, ωστόσο τα ποσοστά ίασης

μειώνονται σε περιπτώσεις υποτροπιαζόντων όγκων, διηθητικών καρκινωμάτων ή όγκων εντοπιζόμενων στις λεγόμενες «περιοχές υψηλού κινδύνου» ^{41,42}. Έχει αποδειχθεί ότι όρια εκτομής 4mm πέρα από τα κλινικά όρια του νεοπλάσματος είναι επαρκή για την αντιμετώπιση του 98% των περιπτώσεων των όγκων με μέγιστη διάμετρο <2cm, με εξαίρεση τα καρκινώματα δίκην σκληροδερμίας ^{43,44}. Ωστόσο στις βλάβες του προσώπου τα στενά όρια εκτομής δεν επαρκούν για μια αποτελεσματική αφαίρεση. Η συχνότητα υποτροπής του όγκου στην περίπτωση της συμβατικής χειρουργικής αφαίρεσης (μη μικρογραφικής) κυμαίνεται από 2-16,5% ^{40,45,46,47}.

1.2.2 Απόξεση του όγκου σε συνδυασμό με διαθερμοπηξία

Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική σε επιλεγμένες περιπτώσεις βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων που δε διηθούν το εν τω βάθει χόριο, διαφορετικά υπάρχει μεγάλος κίνδυνος ατελούς αφαίρεσης της βλάβης ⁴⁰.

1.2.3 Απλή απόξεση

Και στην περίπτωση αυτή αναφέρονται υψηλά ποσοστά υποτροπών λόγω ατελούς αφαίρεσης ⁴⁰.

1.2.4 Μικρογραφική χειρουργική αφαίρεση κατά Mohs

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την πλήρη εξαίρεση του όγκου με τη μέγιστη διατήρηση ιστού και χαμηλά ποσοστά υποτροπών (0,8% -1,7%), διενεργείται όμως σε εξειδικευμένα κέντρα ^{19,48}. Κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης του καρκινώματος με τη μέθοδο Mohs γίνεται ταυτόχρονα ιστολογική εξέταση των περιφερικών και εν τω βάθει χειρουργικών ορίων της αφαιρούμενης βλάβης ^{49,50}.

1.2.5 Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί πρωταρχική επιλογή σε περιπτώσεις όπου δεν είναι εφικτή ή επιθυμητή η χειρουργική αντιμετώπιση, ιδίως σε ηλικιωμένους ασθενείς με συνοδές παθήσεις. Χαρακτηρίζεται όμως από υψηλά ποσοστά υποτροπής καθώς και τον κίνδυνο εμφάνισης άλλων καρκίνων ^{51,40}.

1.2.6 Κρυοχειρουργική

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις που δεν είναι επιθυμητή η χειρουργική και για γενικά μικρές βλάβες, ενέχει όμως αυξημένο κίνδυνο υποτροπής ⁵² και εξέλιξης του όγκου εξαιτίας του ουλώδους ιστού που καλύπτει τον όγκο. Διενεργείται με εφαρμογή υγρού αζώτου με ψεκασμό στην περιοχή του όγκου. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην απότομη επίτευξη εξαιρετικά χαμηλής θερμοκρασίας (-196°C), που σε συνδυασμό με τη σχετικά αργή απόψυξη του ιστού (κύκλος ψύξης-απόψυξης) προκαλεί τήξη και καταστροφή των κυττάρων.

1.2.7 Φωτοδυναμική θεραπεία (PDT)

Η PDT πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τοπικά πρόδρομα μόρια της βιοσυνθετικής οδού της αίμης, όπως το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (5-ALA) και ο μεθυλεστέρας του (MAL) υπό μορφή κρέμας. Καθώς οι ουσίες αυτές συγκεντρώνονται εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα και η ιστική καταστροφή επικεντρώνεται επιλεκτικά στα νεοπλασματικά κύτταρα, αφήνοντας τον περιβάλλοντα ιστό σχετικά άθικτο, έχουν ως συνέπεια ένα καλύτερο αισθητικό αποτέλεσμα, καθώς σπάνια σχηματίζεται σημαντική ουλή. Η κρέμα με 5-ALA ή MAL εφαρμόζεται στην περιοχή του όγκου και μετά από διάστημα 3 ωρών η περιοχή εκτίθεται στην ακτινοβολία. Η φωτοδυναμική θεραπεία με MAL έχει εγκριθεί για επιφανειακά και οζώδη (μετά από αφαίρεση του εξωφυτικού τμήματος του όγκου) βασικοκυτταρικά καρκινώματα στα οποία δεν μπορούν να εφαρμοστούν άλλες μέθοδοι. Πάντως όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του όγκου τόσο μεγαλύτερος κίνδυνος υποτροπής υπάρχει. Επίσης η PDT είναι μια καλή θεραπευτική επιλογή για μεταμοσχευθέντες και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς⁵³.

1.2.8 Εξαίρεση με Laser

Η αφαίρεση βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων με laser είναι μια ασυνήθης μέθοδος θεραπείας με περιορισμένα δεδομένα στη βιβλιογραφία. Έχει χρησιμοποιηθεί σε μικρούς χαμηλού κινδύνου όγκους ⁵⁴.

1.2.9 Τοπικές φαρμακευτικές θεραπείες

Οι μη επεμβατικές θεραπευτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την τοπική εφαρμογή υπό μορφή κρέμας της 5-φθοριοουρακίλης (5-FU) σε επιφανειακά κυρίως BCC ⁵⁵

και της ιμικουιμόδης 5% σε επιφανειακά και οζώδη BCC (στα οζώδη με ποσοστά επιτυχίας έως 81,8%)⁵⁶.

1.2.10 Συνδυαστική θεραπεία

Συνδυάζοντας περισσότερες από μία θεραπευτικές μεθόδους επιτυγχάνονται υψηλότεροι ρυθμοί ίασης με λιγότερες παρενέργειες και καλύτερο αισθητικό αποτέλεσμα. Τόσο 5-FU όσο και η ιμικουιμόδη έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη χειρουργική κατά Mohs ^{57,58,59}. Στην παρούσα έρευνα εστιάσαμε στη μελέτη του συνδυασμού της ιμικουιμόδης με την κρυοχειρουργική (ανοσοκρυοχειρουργική), που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

1.3 Αρχή και πρωτόκολλο της ανοσοκρυοχειρουργικής

Η ανοσοκρυοχειρουργική είναι μια ελάχιστα επεμβατική συνδυαστική μέθοδος θεραπείας, που αξιοποιεί το συνεργικό δυναμικό της συνδυασμένης εφαρμογής της κρυοχειρουργικής με μια ανοσοδιεγερτική θεραπεία, στη συγκεκριμένη μέθοδο με την τοπική εφαρμογή ιμικουιμόδης. Η μέθοδος σχεδιάστηκε, αξιολογήθηκε και από το 2006 εφαρμόζεται συστηματικά στη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για συγκεκριμένες ενδείξεις ⁶⁰.

Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων θεραπευτικών μεθόδων βασίζεται στην αρχή των συνεργικών ή τουλάχιστον συμπληρωματικών μηχανισμών δράσης τους, και σε αντίστοιχα δεδομένα στηρίχτηκε και ο αρχικός σχεδιασμός της ανοσοκρυοχειρουργικής. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα κάθε προτεινόμενου συνδυασμού, ακόμη και αν στη θεωρία μπορεί να προβλεφθεί παθοφυσιολογικά, πρέπει να επιβεβαιώνεται στην πράξη⁶⁰. Σήμερα διαθέτουμε ήδη επαρκή κλινικά δεδομένα που καθιερώνουν την ανοσοκρυοχειρουργική ως μια εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για επιλεγμένους ασθενείς με συγκεκριμένες ενδείξεις ^{61,62}. Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η ανοσοκρυοχειρουργική είναι κλινικά αποτελεσματική λόγω της βελτιστοποίησης της συνεργικής δράσης της ιμικουιμόδης με την κρυοχειρουργική ^{63,64,65}.

Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση προκαρκινικών βλαβών και νεοπλασμάτων δέρματος όπως ακτινικές κερατιάσεις, ακτινική χειλίτιδα, βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, νόσο Bowen, κερατοακάνθωμα, κακοήγη φακή, σάρκωμα Karosi, καρκίνωμα από κύτταρα Merkel αλλά και καλοήθων παθήσεων του δέρματος όπως τα γενετικά κονδυλώματα. Η μεγαλύτερη εμπειρία στη χρήση της αφορά στη θεραπεία του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Η πλήρης ανταπόκριση μη επιλεγμένων βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων με μέγιστη διάμετρο ≤ 2 cm (κλινικό στάδιο I) μετά από ένα κύκλο θεραπείας ανέρχεται στο 97,5% ³⁹, ανεξάρτητα από την ανατομική εντόπιση του όγκου. Μεγαλύτερα νεοπλάσματα ή όγκοι που δεν ανταποκρίθηκαν πλήρως σε έναν κύκλο ανοσοκρυοχειρουργικής μπορούν να αντιμετωπιστούν με επανάληψη του θεραπευτικού κύκλου ή με παρατεταμένη εφαρμογή ιμικουϊμόδης και επαναλαμβανόμενες συνεδρίες κρυοχειρουργικής κάθε 2 εβδομάδες. Η ανατομική περιοχή που εντοπίζεται η βλάβη (περιοφθαλμική χώρα, αυτιά, μύτη, περιστοματική χώρα) δεν αποτελεί αντένδειξη για την εφαρμογή της ανοσοκρυοχειρουργικής, μπορεί όμως να επιβαρύνει τον ασθενή με την προκαλούμενη φλεγμονή και για αυτό προτείνονται τεχνικές ελέγχου της έντασης της φλεγμονής. Συμπερασματικά η ανοσοκρυοχειρουργική είναι μια ευέλικτη, αποτελεσματική, οικονομική και ελάχιστα επεμβατική μέθοδος θεραπείας για κακοήθεις αλλά και καλοήθεις παθήσεις του δέρματος.

Η ανοσοκρυοχειρουργική τυπικά εφαρμόζεται σε κύκλους θεραπείας διάρκειας 5 εβδομάδων («τυπικό πρωτόκολλο ανοσοκρυοχειρουργικής») ^{66,64,17}. Εάν χρειαστεί αυτοί οι κύκλοι επαναλαμβάνονται χωρίς περιορισμό. Στο τυπικό πρωτόκολλο των 5 εβδομάδων δίνονται οδηγίες στον ασθενή να εφαρμόζει κάθε βράδυ ιμικουϊμόδη στη βλάβη καθώς και σε μία ζώνη 0,5 εκατοστά υγιούς δέρματος πέριξ των μακροσκοπικών ορίων αυτής. Στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας από την έναρξη συνεχούς καθημερινής εφαρμογής ιμικουϊμόδης πραγματοποιείται η συνεδρία κρυοχειρουργικής στη βλάβη και σε μία εύλογα ευρεία ζώνη υγιούς δέρματος γύρω από αυτή (συνήθως 0,5 - 1 εκατοστά περιφερικά των ορατών ορίων της βλάβης). Η συνεδρία κρυοχειρουργικής συνίσταται σε 2 κύκλους ψύξης - απόψυξης. Η ψύξη γίνεται με ανοικτό ψεκασμό υγρού αζώτου (N₂) για 10 - 20 sec («αποτελεσματικός χρόνος ψύξης») σε κάθε κύκλο ανάλογα με το μέγεθος του όγκου. Ο «αποτελεσματικός χρόνος ψύξης» μετράται από τη στιγμή που παρατηρείται πλήρης ψύξη της βλάβης. Η καθημερινή βραδινή εφαρμογή ιμικουϊμόδης

συνεχίζεται χωρίς διακοπή ακόμη και την ημέρα της κρυοχειρουργικής. Ακολουθεί τοπική φλεγμονώδης απάντηση, η οποία είναι εντονότερη μετά τη συνεδρία κρυοχειρουργικής και διαρκεί για μερικές ημέρες μετά το τέλος της θεραπείας. Οι ασθενείς ενθαρρύνονται να πλένουν την περιοχή με νερό και σαπούνι το πρωί προκειμένου να αφαιρούνται απαλά τυχόν εφελκίδες που σχηματίζονται καθημερινά ^{60,67}. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι στο τέλος της θεραπείας η περιοχή της βλάβης συχνά καλύπτεται από μια ευδιάκριτη, ανελαστική και στέρα προσκολλημένη εφελκίδα (εύστοχα χαρακτηρίσθαι ως «arbor cutis»)⁶⁸, η οποία μπορεί να μαλακώσει με εφαρμογή κρέμας φουσιδικού οξέος ή βαζελίνης υπό κλειστή περίδεση για 30-60min και ακολούθως να απομακρυνθεί (φωτογραφία 1). Όπως προαναφέρθηκε σε κάποιες περιπτώσεις (π.χ. ατελής ανταπόκριση, μεγάλοι όγκοι) ο «βασικός» κύκλος θεραπείας μπορεί να επαναληφθεί ή να επιμηκυνθεί συμπεριλαμβάνοντας επιπλέον συνεδρίες κρυοχειρουργικής ¹⁷.

Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες αντενδείξεις της ανοσοκρυοχειρουργικής πέραν εκείνων της κρυοχειρουργικής και της ιμικουιμόδης. Όσον αφορά στις γνωστές αντενδείξεις της κρυοχειρουργικής και της ιμικουιμόδης, δηλαδή τα νοσήματα εκ ψύχους και οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς ή οι αλλεργικές αντιδράσεις στην ιμικουιμόδη αντίστοιχα, έχουμε εφαρμόσει την ανοσοκρυοχειρουργική επιτυχώς σε ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία για νοσήματα κολλαγόνου ή αυτοάνοσα νοσήματα, εσωτερική κακοήθεια καθώς και μεταμοσχευμένους ασθενείς χωρίς εμφάνιση παρενεργειών που να οφείλονται στη συννοσηρότητα ή/και την αγωγή τους. Σε ασθενείς με προκαλούμενες εκ του ψύχους νόσους θα πρέπει να αντισταθμίζεται το όφελος σε σχέση με τον κίνδυνο παρενεργειών από τη μάλλον ήπια συνεδρία κρυοχειρουργικής που απαιτείται στην ανοσοκρυοχειρουργική.

Οι παρενέργειες της ανοσοκρυοχειρουργικής εμφανίζονται ως επίταση των παρενεργειών των θεραπειών που συνδυάζονται και μπορούν να διακριθούν σε οξείες, κατά τη διάρκεια της αγωγής, και χρόνιες απώτερες. Η κυριότερη οξεία παρενέργεια είναι η περιστασιακά έντονη τοπική φλεγμονή η οποία κορυφώνεται την εβδομάδα μετά την κρυοχειρουργική. Σε μερικές περιπτώσεις ιδιαίτερα έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης παρατηρείται ερεθισμός ευαίσθητων δερματικών βλαβών σε σχετικά απομακρυσμένες περιοχές σε σχέση με την υπό θεραπεία βλάβη. Επιπλέον, σε περιπτώσεις που ο όγκος

εντοπίζεται στη μετωπιαία χώρα, στα αυτιά ή περιοφθαλμικά, η θεραπεία μπορεί να προκαλέσει άλγος τοπικά, κεφαλαλγία και σημαντικό οίδημα του δέρματος και των μαλακών ιστών. Οι παρενέργειες εμφανίζονται συνήθως στο μέσο του κύκλου θεραπείας και υποχωρούν προς το τέλος της αγωγής. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς αναφέρουν κόπωση και ανορεξία που βαθμιαία εξαφανίζεται μέχρι το πέρας της θεραπείας^{60,67}.

Στις θεραπευθείσες περιοχές μπορεί να αναπτυχθεί υπερ- ή υπομελάγχρωση, η οποία βελτιώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Σε αρκετές περιπτώσεις, μετά από επιτυχή θεραπεία στην περιοχή που υπήρχε ο όγκος παραμένει μια αβαθής ουλή («φάντασμα του όγκου»). Το αισθητικό αποτέλεσμα αξιολογείται από «καλό» μέχρι «εξαιρετικό» τόσο από τους ασθενείς όσο και από τους ιατρούς (φωτογραφία 1). Σε λίγους ασθενείς μπορεί να παραμείνει ένα αίσθημα νυγμών στη θεραπευθείσα περιοχή για διάστημα αρκετών μηνών μετά τη θεραπεία, μερικές φορές με χαρακτήρα νευροπαθητικού άλγους, το οποίο ωστόσο δεν επηρεάζει την καθημερινή τους δραστηριότητα^{17,69}. Η παρακολούθηση μετά το πέρας της αγωγής προσαρμόζεται στην αρχική διάγνωση.



Φωτογραφία 1. Ένα τυπικό οζώδες βασικοκυτταρικό καρκίνωμα στον δεξιό ρώθωνα με διαστάσεις 10X7mm και βάθος 4,6mm στον υπέρηχο. Α-Δ: Φωτογραφίες με παράλληλα πολωμένο φως προκειμένου να αναδειχθεί η επιφάνεια του όγκου και της ουλής. Ε-Η: Φωτογραφίες με κάθετα πολωμένο φως προκειμένου να αναδειχθεί το αγγειακό πλέγμα του όγκου και της ουλής. Α, Ε: Πριν την έναρξη της θεραπείας. Ένθετο: Υψίσυχνος υπέρηχος της βλάβης. Β, ΣΤ: Ημέρα 14, ημέρα της κρυοχειρουργικής (υγρό άζωτο, ανοικτός ψεκασμός, 2 κύκλοι 15 sec έκαστος) Γ, Ζ: Ημέρα 35, τέλος αγωγής. Δ, Η: 12 μήνες μετά το τέλος της αγωγής. Κανένα σημείο υποτροπής και το αισθητικό αποτέλεσμα κρίνεται εξαιρετικό.

Τα πλεονεκτήματα της ανοσοκρυοχειρουργικής περιλαμβάνουν το χαμηλό κόστος, την εύκολη εξωνοσοκομειακή εφαρμογή ⁶⁹, την υψηλή αποτελεσματικότητα και το εξαιρετικό αισθητικό αποτέλεσμα, ιδιαίτερα αισθητά σε περιπτώσεις μεγάλων όγκων όπου αποφεύγεται το φορτίο του χειρουργείου. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε ηλικιωμένους και ασθενείς με συνοδά νοσήματα οποιασδήποτε αιτιολογίας. Ένα επίσης σημαντικό πλεονέκτημα της ανοσοκρυοχειρουργικής είναι ότι σε σχέση με άλλες μη χειρουργικές μεθόδους για καρκίνο του δέρματος όπως η ακτινοθεραπεία ή οι αντινεοπλασματικοί παράγοντες, δεν προκαλεί καρκινογένεση. Επιπλέον στην ανοσοκρυοχειρουργική δεν υπάρχει η ανησυχία για εμφάνιση λοιμώξεων στις υπό θεραπεία περιοχές όπως συμβαίνει αντίθετα σε επεμβατικές μεθόδους. Συγκεκριμένα δεν έχει παρατηρηθεί έξαρση ερπητικών λοιμώξεων όπως σε άλλες μεθόδους ^{67,60}.

Το κύριο μειονέκτημα της ανοσοκρυοχειρουργικής είναι η δυσφορία και η προσωρινή φλεγμονώδης αντίδραση της περιοχής του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι ασθενείς ενθαρρύνονται να συνεχίσουν τη θεραπεία δίνοντας έμφαση στον προσωρινό χαρακτήρα των συμπτωμάτων και στο εξαιρετικό αισθητικό και λειτουργικό αποτέλεσμα που εγγυάται η συγκεκριμένη μέθοδος λόγω της διατήρησης των υγιών ιστών και των ανατομικών δομών στην περιοχή του νεοπλάσματος ^{67,60}.

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα συζητηθούν ειδικά δύο θέματα που ανακύπτουν κατά τη διάρκεια της εφαρμογής της ανοσοκρυοχειρουργικής καθώς και ο τρόπος αντιμετώπισής τους ώστε να βελτιωθεί η συμμόρφωση των ασθενών σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

1.3.1 Ο «σωστός» βαθμός φλεγμονής

Η εμφάνιση έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης στην υπό αγωγή περιοχή είναι γενικά σημείο αποτελεσματικής θεραπείας. Ωστόσο ο βαθμός της φλεγμονής στον εκάστοτε ασθενή είναι δύσκολο να προβλεφθεί. Γι' αυτό ο στόχος μας είναι να επιτευχθεί μια ελεγχόμενη φλεγμονώδης απάντηση ώστε να μην αποθαρρυνθεί ο ασθενής και διακόψει

τη θεραπεία. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς θα εμφανίσουν σημαντική τοπική φλεγμονή μετά τη συνεδρία της κρυοχειρουργικής, ακόμη και εκείνοι που δεν εμφάνισαν ιδιαίτερο τοπικό ερεθισμό κατά τη διάρκεια των πρώτων 14 ημερών εφαρμογής της ιμικουιμόδης. Ο βαθμός της φλεγμονώδους αντίδρασης ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή και ακόμη και μεταξύ βλαβών στον ίδιο ασθενή και δεν μπορεί να προβλεφθεί. Στην ασυνήθη περίπτωση μη εμφάνισης φλεγμονής μετά την κρυοχειρουργική προσθέτουμε ένα τοπικό ρετινοειδές (ταζαροτένη ή τρετινοΐνη: μία εφαρμογή ημερησίως, κάθε πρωί). Ωστόσο, μεγαλύτερη ανησυχία στους ασθενείς προκαλεί η εκτεταμένη φλεγμονώδης απάντηση, ιδίως μετά την κρυοχειρουργική. Επιπλέον, οι ηλικιωμένοι ασθενείς αποτελούν την κύρια ομάδα- στόχο της συγκεκριμένης θεραπείας και το υπό θεραπεία νεόπλασμα βρίσκεται σε περιοχές που έχουν υποστεί ακτινική βλάβη. Η ελεύθερη εφαρμογή ιμικουιμόδης σε αυτό το πεδίο θα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών εκτεταμένης φλεγμονής. Για να αποφευχθεί τέτοιου είδους έξαρση, θα πρέπει οι ασθενείς να ενημερώνονται λεπτομερώς για την ποσότητα της ιμικουιμόδης που πρέπει να εφαρμόζουν πριν την έναρξη καθώς και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Ενδεικτικά, σε ένα ασθενή με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα μέγιστης διαμέτρου 1cm προτείνουμε να εφαρμόζει το 1/3 από την ποσότητα μιας εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας (“φακελάκι”) κρέμας ιμικουιμόδης 5%. Για νεοπλάσματα μέχρι 2cm η προτεινόμενη ημερήσια δόση είναι το 1/2 της συσκευασίας και για νεοπλάσματα διαμέτρου 2- 3cm ένα φακελάκι ^{67,60}.

1.3.2 Αντιμετώπιση των παρενεργειών

Η συμμόρφωση των ασθενών στις οδηγίες του θεράποντος ιατρού είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχία της θεραπείας, καθώς έχει παρατηρηθεί αυξημένος κίνδυνος αποτυχίας της θεραπείας σε περίπτωση παράλειψης της εφαρμογής ιμικουιμόδης για διάφορους λόγους (π.χ. έλλειψη κατανόησης ή συμμόρφωσης στις οδηγίες), ιδίως τις τελευταίες ημέρες προ της διενέργειας της κρυοχειρουργικής. Επομένως το «κλειδί» της επιτυχίας της ανοσοκρυοχειρουργικής είναι η δημιουργία σχέσης εμπιστοσύνης μεταξύ ασθενούς και ιατρού που θα οδηγήσει στη συμμόρφωση στη θεραπεία. Απαιτείται διεξοδική συζήτηση και περιγραφή της θεραπείας και των παρενεργειών της στον ασθενή πριν την έναρξή της με την επίδειξη σχετικών φωτογραφιών. Κατά τη διάρκεια της

θεραπείας ο ασθενής θα πρέπει να διαβεβαιώνεται για την προσωρινή φύση τυχόν ενοχλήσεων και την προοπτική αίσιου αποτελέσματος και ο ιατρός να είναι στη διάθεσή του για οποιαδήποτε πληροφορία ^{67,60}.

Παράλληλα με τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις στην περιοχή του όγκου μπορεί να παρατηρηθούν ήπια συστηματικά συμπτώματα όπως χαμηλή πυρετική κίνηση, ανορεξία ή κόπωση κυρίως σε ασθενείς με μεγάλες βλάβες και ιδιαίτερα την εβδομάδα μετά την κρυοχειρουργική. Οι εκδηλώσεις αυτές υποχωρούν σταδιακά στην πορεία της θεραπείας. Γενικά δε χρειάζεται να χορηγηθεί αντιβιοτική ή αντιική θεραπεία.

1.3.3 Μηχανισμός δράσης της ανοσοκρυοχειρουργικής

Ο συνδυασμός της ιμικουιμόδης με την κρυοχειρουργική έχει συνεργική δράση αυξάνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα και των δύο μεθόδων ^{63,36}. Ο μηχανισμός της συνέργειας φαίνεται να είναι πολυδιάστατος και συνοψίζεται ως εξής:

- Η προθεραπεία με ιμικουιμόδη δημιουργεί ένα προαποπτωτικό περιβάλλον τόσο εντός του όγκου όσο και γύρω από αυτόν που εντείνει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που προκαλείται από την επερχόμενη κρυοχειρουργική, ιδίως στην περιφέρεια της βλάβης (επίταση της φυσικής φάσης της κρυοχειρουργικής) ⁷⁰.
- Η ανοσοκρυοχειρουργική μπορεί να αυξήσει επιπρόσθετα την καταστροφή του αγγειακού υποστρώματος του όγκου που προκαλεί η κρυοχειρουργική και στη συνέχεια να περιορίσει τη νεοαγγείωσή του με συνέπεια τη νέκρωσή του (επίταση της αγγειακής φάσης της κρυοχειρουργικής) ⁷¹.
- Τέλος η ανοσοκρυοχειρουργική μπορεί επιπλέον να ρυθμίσει τον καταρράκτη των ιστικών συμβάντων που οδηγούν σε αποτελεσματική αντινεοπλασματική ανοσολογική απάντηση. Είναι γνωστό ότι τα αθεράπευτα βασικοκυτταρικά καρκινώματα αναπτύσσονται σε ένα μικροπεριβάλλον όπου κυριαρχεί η Th-2 ανοσολογική απάντηση η οποία καταστέλλει την αντινεοπλασματική απάντηση. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εξαιρεθέντα βασικοκυτταρικά καρκινώματα ανέδειξαν την παρουσία κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και άωρων

δενδριτικών κυττάρων ⁷² καθώς και την τοπική έκκριση κυτταροκινών όπως INF- γ , IL-2, IL-10, TGF- β , GM-CSF ^{73,12}. Επίσης αναγνωρίστηκαν CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ κύτταρα που φαινοτυπικά είναι όμοια με τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και πιθανώς καταστέλλουν την αντινεοπλασματική απάντηση ^{74,75}.

Η ιμικουιμόδη μπορεί να αποκαταστήσει την αντινεοπλασματική απάντηση μόνο εν μέρει. Η ιμικουιμόδη είναι μια συνθετική ιμιδαζοκινολόνη, η οποία έχει ανοσοτροποποιητική δράση. Δρα στην εγγενή και επίκτητη ανοσολογική απάντηση με άμεσο και έμμεσο τρόπο. Η άμεση δράση της οφείλεται αφενός στο ότι συνδέεται με τους υποδοχείς Toll-like 7 και 8 (TLR-7, TLR-8) που βρίσκονται στην επιφάνεια των μακροφάγων, των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων, ενεργοποιώντας τα και αφετέρου στο ότι επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων διεγείροντας την έκκριση προ-αποπτωτικών μορίων που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την κασπάση 9. Η έμμεση δράση της ιμικουιμόδης έγκειται στην ικανότητά της να επάγει την απελευθέρωση κυτταροκινών όπως IL-12, TNF- α , INF- γ , οι οποίες αυξάνουν τα επίπεδα των κυτταροροξικών T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων (κύτταρα φυσικοί φονείς- Natural Killers) στο νεόπλασμα. Η αύξηση της IL-12 καταστέλλει τη δράση της IL-10, ενισχύοντας έτσι την αντινεοπλασματική δράση των T-λεμφοκυττάρων ^{76,70}.

Προς αυτή την κατεύθυνση σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει η ενεργοποίηση των πλασμακυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs) που βρίσκονται στην περιοχή του όγκου, τα οποία αν και παρόντα παραμένουν λειτουργικά αδρανή. Βέβαια για την κινητοποίηση της ανοσολογικής απάντησης είναι ουσιώδης και η προσέλκυση νέων pDCs ^{77,78}. Παρόλο που η ιμικουιμόδη μπορεί να προσελκύσει άωρα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα εντός του όγκου, η ανοσολογική απάντηση είναι γενικά απρόβλεπτη και συχνά οδηγεί σε τμηματική καταστροφή του όγκου στην κλινική πράξη. Σε αυτό το σημείο κρίσιμος φαίνεται ότι είναι ο ρόλος της κρυοχειρουργικής, η οποία «τραυματίζοντας» τον όγκο απελευθερώνει μεγάλο αριθμό καρκινικών αντιγόνων μέσα στο προφλεγμονώδες περιβάλλον που δημιούργησε η εφαρμογή της ιμικουιμόδης «εφοδιάζοντας» τα νεοστρατολογημένα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα με ειδικά καρκινικά αντιγόνα. Με τη σειρά τους τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

ωριμάζουν και προωθούν την ενεργοποίηση ανοσοαπάντησης έναντι του νεοπλασματος. Η διαδικασία αυτή προσομοιάζει τη δημιουργία ενός *in-situ* αντινεοπλασματικού εμβολίου. Στη συνέχεια η καθημερινή εφαρμογή της ιμικουιμόδης επιτείνει τη φλεγμονή στην περιοχή του όγκου με την στρατολόγηση δραστικών ανοσοκυττάρων και επίταση της φλεγμονής τοπικά στην περιοχή του νεοπλασματος και την καταστροφή του. Στο τελευταίο συνηγορούν και πρόσφατα δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η ανοσοκρυοχειρουργική τροποποιεί τον καταρράκτη των ιστικών συμβάντων στο εσωτερικό του όγκου οδηγώντας σε αποτελεσματική αντινεοπλασματική ανοσοαπάντηση ⁷⁹. Πιο συγκεκριμένα, ανοσοϊστοχημικά δεδομένα έδειξαν ότι κατά τις πρώτες ημέρες της θεραπείας με ιμικουϊμόδη και μέχρι τη συνεδρία της κρυοχειρουργικής τη 14^η ημέρα του θεραπευτικού κύκλου, αυξάνεται η διήθηση του όγκου από ανοσορυθμιστικά Treg (Foxp3⁺) κύτταρα, ενώ στη συνέχεια ο αριθμός τους μειώνεται σημαντικά. Αντίθετα, ο πληθυσμός των CD3⁺ κυττάρων παρουσιάζει σημαντική αύξηση αμέσως μετά τη συνεδρία της κρυοχειρουργικής ⁷⁹. Οι δύο παραπάνω αλλαγές οδηγούν στην απότομη αύξηση του λόγου CD3⁺/Foxp3⁺, γεγονός που αλλάζει την τοπική ανοσολογική ισορροπία προς την κατεύθυνση μιας έντονης προφλεγμονώδους απάντησης που καταστρέφει τον όγκο. Πρέπει να τονίσουμε τη σημασία που έχει ο συγχρονισμός, δηλαδή η εφαρμογή της κρυοχειρουργικής κατά τη διάρκεια συνεχόμενης θεραπείας με ιμικουιμόδη, καθώς σχήματα με εφαρμογή ιμικουιμόδης μετά από την κρυοχειρουργική δεν βελτιώνουν ιδιαίτερα την αντινεοπλασματική απάντηση.

1.3.4 Ενδείξεις της ανοσοκρυοχειρουργικής

Η ανοσοκρυοχειρουργική είναι μια σχετικά πρόσφατη προσθήκη στη θεραπευτική φαρέτρα του καρκίνου του δέρματος και το φάσμα των ενδείξεών της είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Η μέθοδος έχει κυρίως εφαρμοστεί στη θεραπεία δερματικών νεοπλασμάτων προερχόμενων από κερατινοκύτταρα, με την μεγαλύτερη εμπειρία μέχρι σήμερα να επικεντρώνεται στη θεραπεία του βασικοκυτταρικού καρκινώματος, όπου έχει χρησιμοποιηθεί τόσο ως κύρια θεραπευτική όσο και ως παρηγορική αγωγή. Πρόσφατα,

συζητιέται η προοπτική ένταξης της ανοσοκρυστοχειρουργικής σε πρωτόκολλα θεραπείας δερματικών καρκίνων που δεν ανταποκρίνονται πλήρως (π.χ. συνδυασμός με ενδοβλαβική χορήγηση bevacizumab).

1.3.4.1 Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC)

Στην παρούσα φάση η μεγαλύτερη εμπειρία που έχουμε από τη χρήση της ανοσοκρυστοχειρουργικής είναι στη θεραπεία του τοπικά περιορισμένου βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Αρχική κάθαρση του όγκου μετά από έναν τυπικό κύκλο ανοσοκρυστοχειρουργικής 5 εβδομάδων επιτυγχάνεται σε 97,5% μη επιλεγμένων BCC με μακροσκοπική διάμετρο $\leq 2\text{cm}$ ¹⁷, τα οποία και αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία (80 - 90%)^{80,48,44} όλων των BCC που προσέρχονται για θεραπεία. Η μέθοδος εφαρμόζεται όπως περιεγράφηκε λεπτομερώς σε προηγούμενη παράγραφο με αποτελεσματικό χρόνο ψύξης 15-20 sec. Η παρακολούθηση του ασθενούς προγραμματίζεται σε 1, 3 και 6 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας (το τέλος της τοπικής εφαρμογής ιμικουιμόδης), στη συνέχεια κάθε 6 μήνες για τα πρώτα 2 χρόνια και ακολούθως κάθε χρόνο. Συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα της ανοσοκρυστοχειρουργικής με άλλες μεθόδους, ο ένας κύκλος ανοσοκρυστοχειρουργικής μπορεί να θεωρηθεί ισοδύναμος με τη συμβατική χειρουργική εξαίρεση. Στις λίγες περιπτώσεις ατελούς (μερικής) ανταπόκρισης, η επανάληψη του κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής οδηγεί σε κάθαρση του όγκου σε όλες τις περιπτώσεις (>99%) πρωτοπαθών και υποτροπιάζοντων βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων με διάμετρο $\leq 2\text{cm}$ ¹⁷. Επιπλέον το 97% των θεραπευθέντων όγκων δεν εμφανίζουν υποτροπή 5 χρόνια μετά τη θεραπεία³⁹. Η αποτελεσματικότητα της ανοσοκρυστοχειρουργικής είναι σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της μονήρους εφαρμογής ιμικουιμόδης για τα οζώδη BCC (81,8%)⁵⁶ ή κρυστοχειρουργικής (<50% για αντίστοιχα νεοπλάσματα με βάση τη γενική εμπειρία). Στην περίπτωση της συμβατικής χειρουργικής εξαίρεσης αναμένεται ποσοστό υποτροπών 5-10% κατά τη διάρκεια του follow-up. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βασικοί λόγοι διενέργειας της χειρουργικής κατά Mohs, όπως υποτροπιάζοντες όγκοι με ασαφή κλινικά όρια ή όγκοι εντοπιζόμενοι σε περιοχές υψηλού κινδύνου για υποτροπή μετά το χειρουργείο^{48,81}, δεν αποτελούν περιορισμούς για την

εφαρμογή της ανοσοκρυοχειρουργικής¹⁷. Ειδικά σε περιοχές όπως η μύτη, το αυτί, ο οφθαλμικός κόγχος το λειτουργικό και αισθητικό αποτέλεσμα είναι εξαιρετικό.

Στις πρόσφατες ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάγνωση και τη θεραπεία του BCC η ανοσοκρυοχειρουργική προτείνεται ως μια από τις εναλλακτικές επιλογές συνδυαστικής θεραπείας για ασθενείς που αναμένεται να έχουν μη-ικανοποιητικό αποτέλεσμα από τη χειρουργική αφαίρεση⁸². Κατά την άποψή μας, ωστόσο, η ανοσοκρυοχειρουργική μπορεί με ασφάλεια να προσφερθεί όχι μόνο σε ασθενείς με σχετική αντένδειξη στη χειρουργική αλλά κυρίως εναλλακτικά αντί της χειρουργικής ως πρώτης γραμμής θεραπεία για την πλειονότητα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις είναι τελικά ο ενημερωμένος ασθενής, που ανάμεσα σε δύο το ίδιο αποτελεσματικές μεθόδους θεραπείας θα επιλέξει την από δική του σκοπιά πιο προτιμότερη για την περίπτωση του⁶⁰.

Για το τοπικά εκτεταμένο BCC (συνήθως διάμετρος > 2 cm), η αποτελεσματικότητα ενός τυπικού κύκλου θεραπείας διάρκειας 5 εβδομάδων μειώνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος του όγκου. Το ποσοστό ίασης με ένα τυπικό κύκλο κατέρχεται στο 75% περίπου για όγκους διαμέτρου 3-5 cm (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Για την αντιμετώπιση αυτών των νεοπλασμάτων αυξάνουμε συνήθως τον δραστικό χρόνο ψύξης (2x20 sec) και η κρυοχειρουργική εφαρμόζεται τμηματικά σε ελαφρά επικαλυπτόμενα πεδία θεραπείας 1-2 cm² έκαστο, στην ίδια συνεδρία. Το αποτέλεσμα της θεραπείας αξιολογείται ένα μήνα μετά το τέλος της ανοσοκρυοχειρουργικής και σε περίπτωση υπολειμματικής νόσου διενεργούνται διαγνωστικές βιοψίες και εάν κριθεί απαραίτητο επαναλαμβάνεται η θεραπεία⁶⁰.

Για κάποιους ασθενείς με προχωρημένο BCC η παρηγορητική θεραπεία του όγκου είναι μια πιο ρεαλιστική προσέγγιση σε σχέση με την ίαση. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς εφόσον προσέλθουν εγκαίρως, σε παραμελημένα περιστατικά αναπτύσσονται επιθετικά BCC τα οποία συχνά δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Όλοι αυτοί οι ασθενείς με τοπικά προχωρημένο BCC είναι υποψήφιοι για παρηγορητικές παρεμβάσεις, με κύριο στόχο την προστασία σημαντικών δομών από την ανεξέλεγκτη επέκταση του όγκου⁶⁰. Οι συμβατικές θεραπείες είναι συνήθως λιγότερο αποτελεσματικές σε αυτούς τους ασθενείς

οι οποίοι είναι κυρίως ηλικιωμένοι με πολλαπλά συνοδά νοσήματα και επομένως η θεραπεία πρέπει να εξατομικεύεται ⁸³. Η ανοσοκρυστοχειρουργική είναι μια εναλλακτική μέθοδος θεραπείας σε αυτές τις περιπτώσεις, η οποία, παρότι κατά κανόνα δεν οδηγεί σε ίαση, μπορεί να μειώσει το συνολικό φορτίο του όγκου, να περιορίσει την ιστική καταστροφή και να προστατεύσει σημαντικές ανατομικές δομές διατηρώντας τη λειτουργικότητά τους. Η επικουρική χρήση της ανοσοκρυστοχειρουργικής σε φαρμακολογικές θεραπευτικές μεθόδους για προχωρημένα BCC, όπως οι αναστολείς του μονοπατιού του hedgehog (πχ. vismodegib) χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

1.3.4.2 Ακτινικές υπερκερατώσεις

Οι ακτινικές υπερκερατώσεις είναι προκαρκινικές βλάβες και μπορεί να εμφανίζονται ως μονήρεις βλάβες ή να καταλαμβάνουν εκτεταμένη περιοχή του δέρματος (καρκινογένεση πεδίου). Είναι δεκτικές σε θεραπεία τόσο με κρυστοχειρουργική όσο και με ιμικουιμόδη ⁸⁴. Η ανοσοκρυστοχειρουργική είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των ακτινικών υπερκερατώσεων. Εξαιτίας λοιπόν της υψηλής αποτελεσματικότητάς της και της συνήθως μεγάλης έκτασης των ακτινικών βλαβών, το σχήμα θεραπείας έχει προσαρμοστεί ως εξής για την περίπτωση των ακτινικών υπερκερατώσεων: εφαρμογή ιμικουιμόδης κάθε δεύτερη μέρα για 14 μέρες (όπως και την ημέρα πριν την κρυστοχειρουργική), εφαρμογή κρυστοχειρουργικής με υγρό άζωτο τη 14^η μέρα (2 κύκλοι των 10sec) και συνέχιση της ιμικουιμόδης με εναλλάξ εφαρμογή ήδη από την ημέρα της κρυστοχειρουργικής για άλλη 1 εβδομάδα.

1.3.4.3 Ακτινική χειλίτιδα

Το συνηθισμένο πρωτόκολλο της ανοσοκρυστοχειρουργικής έχει χρησιμοποιηθεί και στη θεραπεία περιπτώσεων ακτινικής χειλίτιδας ⁸⁵. Τα δεδομένα που υπάρχουν προέρχονται από την θεραπεία 8 ασθενών, με ικανό χρόνο παρακολούθησης μετά τη θεραπεία και καταδεικνύουν τόσο την εφαρμοσιμότητα όσο και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Ωστόσο η ανοσοκρυστοχειρουργική στην περιοχή του χείλους συνιστά μια ιδιαίτερα επιβαρυντική για την ποιότητα ζωής του ασθενούς θεραπεία, ειδικά στο διάστημα που

ακολουθεί την κρυοχειρουργική, καθώς λόγω της προκαλούμενης φλεγμονής καθίσταται δύσκολη ακόμη και η λήψη στερεών τροφών. Βασιζόμενοι στην εμπειρία μας η ανοσοκρυοχειρουργική θα πρέπει να προτιμάται σε περιπτώσεις ασθενών που είναι εξαρχής πολύ θετικά προδιατεθειμένοι και εφόσον έχει προηγηθεί διεξοδική ενημέρωση για τις παρενέργειες της θεραπείας.

1.3.4.4 Νόσος Bowen του δέρματος (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα *in situ*)

Τόσο η κρυοχειρουργική όσο και η ιμικουιμόδη έχουν μέτρια αποτελεσματικότητα στη νόσο του Bowen ⁸⁶. Η ανοσοκρυοχειρουργική επιτυγχάνει εξαιρετικά αποτελέσματα ακόμη και σε περιπτώσεις εκτεταμένων βλαβών ή σε δύσκολες ανατομικά εντοπίσεις (όπως στα δάκτυλα) ^{87,88,89}. Σε σχετικά μικρές βλάβες εφαρμόζεται το τυπικό πρωτόκολλο των 5 εβδομάδων ανοσοκρυοχειρουργικής. Οι εκτεταμένες βλάβες, ιδίως στην κεφαλή, μπορούν να αντιμετωπιστούν είτε κατά πεδία των 4-5 cm² ή με επαναλαμβανόμενες συνεδρίες ανοσοκρυοχειρουργικής. Παρόλο που στη βιβλιογραφία υπάρχει ανησυχία ως προς το ενδεχόμενο πιθανής εξέλιξης της νόσου του Bowen σε διηθητικό ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα μετά από θεραπεία με ανοσοκρυοχειρουργική ⁹⁰, μέχρι στιγμής δεν έχει παρατηρηθεί κάτι τέτοιο στην κλινική πράξη.

1.3.4.5 Κερατοακάνθωμα

Η χειρουργική αφαίρεση, όταν είναι εφικτή, προτείνεται από τους ειδικούς ως θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση του κερατοακανθώματος ⁹¹. Κύριο επιχείρημα υπέρ αυτής της επιλογής, είναι η υποκειμενικότητα στην προσέγγιση της διάγνωσης του κερατοακανθώματος ⁹², συχνά σαν συνέπεια της αβεβαιότητας στη διάκρισή του από το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ⁹¹. Πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του κερατοακανθώματος ^{93,94} παρέχουν μοριακά εργαλεία για την πιο αποτελεσματική διαφοροδιάγνωσή του από το SCC και έχουν βοηθήσει σημαντικά στη πιο ορθολογική προσέγγιση αυτών των ασθενών. Η ανοσοκρυοχειρουργική μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική θεραπευτική αντιμετώπιση του κερατοακανθώματος ⁹⁵. Συνήθως προτείνεται η προσθήκη και κάποιου άλλου θεραπευτικού μέσου, όπως είναι η

ενδοβλαβική έγχυση μεθοτρεξάτης. Για ένα νεοδιαγνωσθέν κερατοακάνθωμα προτείνεται ένας κύκλος θεραπείας που ξεκινάει με μια ήπια συνεδρία κρυοχειρουργικής (υγρό άζωτο, ανοιχτός ψεκασμός, 2 κύκλοι των 15 sec), και αμέσως μετά ενδοβλαβική έγχυση 5 mg μεθοτρεξάτης. Στη συνέχεια ο ασθενής εφαρμόζει κρέμα ιμικουϊμόδης κάθε βράδυ για 2 εβδομάδες ξεκινώντας ήδη από την πρώτη μέρα της θεραπείας

1.3.4.6 Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος (CSCC)

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της ανοσοκρυοχειρουργικής στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος είναι γενικά απρόβλεπτα. Σε ορισμένους ασθενείς όπου η ανοσοκρυοχειρουργική εφαρμόσθηκε στα πλαίσια παρηγορητικής θεραπείας, παρά τα εντατικά και παρατεταμένα σχήματα που χρησιμοποιήθηκαν, ο όγκος ενώ αρχικά μειώθηκε σε μέγεθος, υποτροπίασε γρήγορα στη συνέχεια. Από την άλλη, σε ηλικιωμένους ασθενείς με σχετικά αργά επεκτεινόμενα CSCC έχει επιτευχθεί μακροχρόνια ίαση (>12 μήνες). Παρόμοια εμπειρία με εμφάνιση υποτροπών ή ακόμη και επιδείνωση της νόσου με εμφάνιση μεταστάσεων λίγο καιρό μετά τη θεραπεία έχει περιγραφεί και μετά από μονοθεραπεία CSCC με ιμικουϊμόδη ⁹⁶, αν και υπάρχουν και σποραδικές αναφορές για ικανοποιητική αντιμετώπιση διηθητικών CSCC με ιμικουϊμόδη⁹⁷⁻¹⁰².

1.3.4.7 Κακοήθης φακή (lentigo maligna) και κακόηθες μελάνωμα

Η κακοήθης φακή (lentigo maligna) είναι ένα in situ μελάνωμα με περίπου 5% πιθανότητα εξέλιξης σε διηθητικό όγκο κατά τη διάρκεια ζωής του ασθενούς και το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με ιμικουϊμόδη και κρυοχειρουργική ^{103,104}. Μάλιστα, η πρώτη δημοσιευμένη περίπτωση ασθενούς που αντιμετωπίσαμε με ανοσοκρυοχειρουργική αφορούσε ασθενή με κακοήθη φακή ¹⁰⁵. Στη συνέχεια, ακολούθησαν και άλλα παρόμοια περιστατικά με την ίδια καλή ανταπόκριση στη συγκεκριμένη θεραπεία ¹⁰⁶. Όπως και στη θεραπεία του BCC, ένας ικανός βαθμός φλεγμονής είναι απαραίτητος για την ικανοποιητική έκβαση της θεραπείας. Σε περίπτωση μη ανταπόκρισης, ο βαθμός φλεγμονής μπορεί να αυξηθεί με επιπλέον συνεδρίες κρυοχειρουργικής ¹⁰⁷. Μετά το

πέρας της θεραπείας, απαιτείται στενή παρακολούθηση με στοχευμένες βιοψίες μέχρι να εξασφαλιστεί ότι έχουν εκριζωθεί όλες οι εστίες κακοήθων μελανοκυττάρων. Η ανοσοκρυοχειρουργική δεν ενδείκνυται για τα διηθητικά μελανώματα. Ωστόσο, σε δύο περιπτώσεις η συγκεκριμένη θεραπεία θα μπορούσε να αποτελέσει επαρκή εναλλακτική-συμπληρωματική προσέγγιση : (α) μετά από διαγνωστική βιοψία εκτομής για αντιμετώπιση υπολειμματικών βλαβών στα όρια όγκου, που εφάπτεται λειτουργικά κρίσιμων ανατομικών δομών αντί για εκτεταμένη επανεκτομή (πχ. περιοφθαλμικά) και (β) ως παρηγορητική θεραπεία για δερματικές μεταστάσεις μελανώματος. Στη δεύτερη περίπτωση η πρόκληση τοπικής φλεγμονής είναι και πάλι ουσιαστικής σημασίας για την επαρκή αντιμετώπισή τους. Για τον λόγο αυτόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σχήματα παρατεταμένης εφαρμογής ιμικουϊμόδης, επαναλαμβανόμενες συνεδρίες κρυοχειρουργικής κάθε 2 εβδομάδες ή/και τοπικά ρετινοειδή ^{108,109}, έως ότου υποστρέψουν.

1.3.4.8 Σάρκωμα Kaposi

Οι δερματικές βλάβες του σαρκώματος Kaposi ανταποκρίνονται άμεσα στην ανοσοκρυοχειρουργική. Η μέχρι τώρα εμπειρία μας περιορίζεται σε περιστατικά κλασικού Kaposi σε ηλικιωμένους ασθενείς, οι περισσότεροι από τους οποίους ελάμβαναν παράλληλα συστηματική αγωγή με ιντερφερόνη-α. Καθώς η νόσος μπορεί να είναι εκτεταμένη, προτιμούμε να θεραπεύουμε τους όγκους διαδοχικά κατά τμήματα: κάθε τμήμα είναι τέτοιας έκτασης που να μπορεί να καλυφθεί με την ποσότητα ενός φακελίσκου ιμικουϊμόδης 5%, δηλαδή τη μέγιστη επιτρεπτή ημερήσια δόση (περ. 25 cm²). Στη συγκεκριμένη ένδειξη έχουμε παρατηρήσει ότι αν και συνήθως δεν παρατηρείται έντονη φλεγμονώδης αντίδραση, ωστόσο το αποτέλεσμα είναι πολύ ικανοποιητικό. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου καταδεικνύεται από την άμεση υποχώρηση των όγκων στις περιοχές που εφαρμόστηκε η ιμικουϊμόδη σε αντίθεση με τις υπόλοιπες που δεν έχουν ακόμη αντιμετωπιστεί ⁶⁰.

1.3.4.9 Καρκίνωμα κυττάρων Merkel

Το καρκίνωμα κυττάρων Merkel είναι ένα σπάνιο κακόηθες νεόπλασμα του δέρματος που εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα και που χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά τοπικής υποτροπής, με αποτέλεσμα να αποτελεί θεραπευτική πρόκληση. Έχουμε περιγράψει την επιτυχημένη θεραπεία ασθενούς με in transit επιχώριες μεταστάσεις 6 μήνες μετά τη χειρουργική αφαίρεση πρωτοπαθούς καρκινώματος κυττάρων Merkel ¹¹⁰. Συγκεκριμένα, περισσότερες από 15 δερματικές-υποδόριες μεταστάσεις ανταποκρίθηκαν στο τυπικό σχήμα της ανοσοκρυστοχειρουργικής των 5 εβδομάδων. Ενδιαφέρον είναι ότι η παρανεοπλασματική αρθρίτιδα που εμφάνισε παράλληλα ο ασθενής, επίσης υποχώρησε μετά τη θεραπεία των μεταστάσεων ⁶⁰.

1.3.4.10 Καλοήθεις παθήσεις του δέρματος

Ορισμένες καλοήθεις δερματικές παθήσεις μπορούν να αντιμετωπιστούν με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο ανοσοκρυστοχειρουργικής. Τα γενετικά κονδυλώματα ανταποκρίνονται άμεσα στην ανοσοκρυστοχειρουργική. Ωστόσο, απαιτείται προσοχή στον έλεγχο της έντασης της φλεγμονώδους αντίδρασης η οποία μπορεί να προκαλέσει σημαντική ενόχληση στον ασθενή λόγω της εντόπισης της βλάβης. Και στην περίπτωση αυτή εφαρμόζεται το παρήμερο σχήμα που περιγράφεται στο κεφάλαιο της ακτινικής κερατίας. Για μεγαλύτερες εξωφυτικές βλάβες που δεν ανταποκρίνονται άμεσα στη θεραπεία εφαρμόζουμε το καθημερινό σχήμα ιμικουϊμόδης και επαναλαμβάνουμε τους κύκλους της κρυστοχειρουργικής κάθε 2 εβδομάδες μέχρι την κλινική υποχώρηση. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι πέρα από τις άμεσα θεραπευόμενες βλάβες, απομακρυσμένα θηλώματα που δε θεραπεύονται άμεσα (πχ. ενδοπρωκτικά) δείχνουν επίσης να υποστρέφουν (μη δημοσιευμένα δεδομένα) ⁶⁰.

1.3.4.11 Πυογόνο κοκκίωμα

Η συνδυασμένη δράση τόσο της ιμικουϊμόδης όσο και της κρυστοχειρουργικής στην αγγειογένεση είναι αποτελεσματική και στη θεραπεία του πυογόνου κοκκιώματος.

Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι απαιτούνται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κρυοχειρουργικής (2 κύκλοι, 10 δευτερολέπτων ο καθένας). Η ιμικουϊμόδη εφαρμόζεται καθημερινά και η κρυοχειρουργική διενεργείται κάθε 2 εβδομάδες ανάλογα με την ανταπόκριση. Ως εναλλακτικός τρόπος εντατικοποίησης της θεραπείας μπορεί να εφαρμοστεί η ιμικουϊμόδη με κλειστή περίδεση ¹¹¹ αντί για επαναλαμβανόμενους κύκλους κρυοχειρουργικής. Το αποτέλεσμα είναι ικανοποιητικό καθώς δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη ουλών. Είναι σημαντικό βέβαια να είμαστε σίγουροι για τη διάγνωση ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα της θεραπείας ενός αμελανωτικού κακοήθους μελανώματος ¹¹².

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Δεδομένης της συχνότητας και της αυξανόμενης επίπτωσης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος ανακύπτει η ανάγκη εφαρμογής λιγότερο επεμβατικών τεχνικών θεραπείας του, που να επιτρέπουν την επαναλαμβανόμενη χρήση τους σε περιπτώσεις υποτροπών καθώς και σε περιπτώσεις εμφάνισης πολλαπλών όγκων.

Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι να μελετήσει την επίδραση της ανοσοκρυστοχειρουργικής στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι του βασικοκυτταρικού καρκινώματος μέσω της αλλαγής, ποσοτικής και ποιοτικής, των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένων κυτταροκινών στο περιφερικό αίμα στα διάφορα στάδια της θεραπείας.

Πιο συγκεκριμένα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής θα προσδιορίσουμε τυχόν αλλαγές του απόλυτου αριθμού των ολικών λεμφοκυττάρων, των T-λεμφοκυττάρων, των B-λεμφοκυττάρων και των NK λεμφοκυττάρων (Natural Killer lymphocytes) στο περιφερικό αίμα ασθενών με ιστολογικά επιβεβαιωμένο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος οι οποίοι υπόκεινται σε ανοσοκρυστοχειρουργική. Πιο ειδικά θα μελετηθούν οι αλλαγές του απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων ($CD3^+$) που εκφράζουν επιπλέον τους ακόλουθους επιφανειακούς δείκτες: $CD4^+$ (T-helper), $CD8^+$, $CD4^+CD25^{high}$, $CD3^+CLA$, $CD4^+CLA$, $CD4^+CD25^{high}CLA$ καθώς και των εξής υποτύπων των NK λεμφοκυττάρων: NK $CD8^+$, NK $CD8^-$. Τα $CD4^+CD25^{high}$ αναγνωρίζονται ως T ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory- Tregs) στη μελέτη μας. Οι αιμοληψίες έγιναν στα εξής στάδια της θεραπείας: (1) πριν την έναρξη της θεραπείας, (2) την 14^η ημέρα από την έναρξη συνεχόμενης καθημερινής εφαρμογής ιμικουιμόδης (ημέρα κρυστοχειρουργικής), (3) στις 5 εβδομάδες (τέλος θεραπείας) και (4) στις 4 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας.

Ιδιαίτερη αναφορά χρειάζεται να γίνει στον επιφανειακό κυτταρικό δείκτη CLA. Ο δείκτης CLA (Cutaneous lymphocyte-associated antigen ή αλλιώς HECA-452) αφορά σε ένα αντιγόνο επιφανείας που εκφράζεται από μια υποκατηγορία περιφερικών T-λεμφοκυττάρων μνήμης (στην πλειονότητά τους βοηθητικά – $CD4^+$) που έχουν την

ικανότητα επιλεκτικής μετανάστευσης και εγκατάστασης στο δέρμα (επιδερμοτροπισμός). Η «στρατολόγηση» των περιφερικών Τ-λεμφοκυττάρων στο δέρμα ρυθμίζεται από την έκφραση του συγκεκριμένου αντιγόνου CLA, το οποίο έχει αποδειχθεί πως συνδέεται με την E-selectin, ένα μόριο προσκόλλησης που εκφράζουν ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα σε συνθήκες φλεγμονής. Επομένως θα επιχειρήσουμε να ερευνήσουμε αν η ανοσοκρυστοχειρουργική ενισχύει την ενεργοποίηση της έκφρασης του CLA από κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα.

Επιπλέον, με τη μέθοδο της ELISA και στα προαναφερθέντα στάδια της θεραπείας, θα μελετήσουμε την επίδραση της ανοσοκρυστοχειρουργικής στη μεταβολή των επιπέδων των εξής κυτταροκινών στον ορό ασθενών με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα: TNF- α , INF- α , IL-10, IL-2, IL-6.

Τέλος θα προσπαθήσουμε να καθορίσουμε το βαθμό ψυχολογικής επιβάρυνσης των ασθενών που υπόκεινται σε ανοσοκρυστοχειρουργική μέσα από τη συμπλήρωση ειδικού ερωτηματολογίου ποιότητας ζωής.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 14 ασθενείς (άρρενες) με πρωτοπαθές βασικοκυτταρικό καρκίνωμα **διαμέτρου ≤ 2 cm**, το οποίο είχε επιβεβαιωθεί ιστολογικά με punch βιοψία πριν την έναρξη της ανοσοκρυστοχειρουργικής. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 71 έτη . Οι συμμετέχοντες ήταν όλοι ελληνικής καταγωγής και κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου και παρακολουθούνταν στο ιατρείο των όγκων της Δερματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επίσης όλοι είχαν συμπληρώσει έντυπη συγκατάθεση για την εκούσια συμμετοχή τους στη μελέτη, η οποία έχει εγκριθεί από την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από την έρευνα αποκλείστηκαν ασθενείς με υποψία λοίμωξης ή γνωστά αιματολογικά νοσήματα καθώς και ασθενείς που ελάμβαναν κάποια ανοσοκατασταλτική αγωγή.

Η λήψη φλεβικού αίματος από τους ασθενείς γινόταν στα εξής στάδια:

- 1) Πριν την έναρξη της ανοσοκρυστοχειρουργικής (μέσα σε χρονικό διάστημα 4 ημερών προ της έναρξης- 'Εβδομάδα 0').
- 2) Την 14^η ημέρα της θεραπείας κατά την οποία γινόταν κρυστοχειρουργική του όγκου με υγρό άζωτο και ενώ είχαν προηγηθεί 14 ημέρες καθημερινής εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5% στην περιοχή του καρκινώματος. Η αιμοληψία γινόταν αμέσως μετά τη διενέργεια της κρυστοχειρουργικής ('Εβδομάδα 2') και ο ασθενής συνέχιζε να εφαρμόζει καθημερινά την κρέμα ιμικουιμόδης .
- 3) Την 35^η μέρα της θεραπείας, που αντιστοιχεί και στο τέλος ενός κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής ('Εβδομάδα 5').
- 4) Τέσσερις εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας ('Εβδομάδα 9').

Τα δείγματα αίματος αποθηκεύονταν σε σωληνάρια γενικής αίματος της BD Vacutainer (BD, Plymouth, UK) προκειμένου να ακολουθήσει η κατάλληλη επεξεργασία των κυττάρων για την κυτταρομετρία ροής. Επίσης ικανή ποσότητα αίματος τοποθετούνταν σε σωληνάρια Wasserman της BD και ακολούθως υφίσταντο φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 10 λεπτά στη φυγόκεντρο της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού

εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στη συνέχεια γινόταν αναρρόφηση του υπερκείμενου ορού με σιφώνιο ,αποθήκευσή του σε σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2 ml και διατήρησή του σε θερμοκρασία -20 °C προκειμένου να αναλυθεί με τη μέθοδο της ELISA για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Κυτταρομετρία ροής

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι μια τεχνολογία με την οποία γίνονται ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα ή οργανίδια κυττάρων (πυρήνες, χρωμοσώματα κ.λ.π.). Η προετοιμασία των κυττάρων ή οργανιδίων αυτών έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές. Τα υπό έλεγχο σωματίδια, ρέουν με μορφή εναιωρήματος μπροστά από μία ακτίνα LASER , διαμέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Η μέτρηση, αναγνώριση και η διαλογή γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Τα εκπεμπόμενα φωτεινά σήματα από το κάθε κύτταρο ή οργανίδιο αναλύονται, κατευθύνονται στους ανιχνευτές και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα. Αυτά τα σήματα ενισχύονται, μετρούνται και τέλος διοχετεύονται υπό μορφή ψηφιακών ενδείξεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό λογισμικό τα επεξεργάζεται και τα παρουσιάζει. Στο κάθε κύτταρο ή οργανίδιο μετρούνται το μέγεθος, η κοκκίωση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ενδοκυττάριας ή εξωκυττάριας επιφάνειας που έχουν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση αυτά τα δεδομένα τα κύτταρα ή τα σωματίδια ταξινομούνται σε σύνολα και υποσύνολα και στη συνέχεια γίνεται η στατιστική επεξεργασία τους ¹¹³.

Προέκταση της τεχνολογίας αυτής είναι ο κυτταροδιαχωρισμός ροής (cell sorting), κατά τον οποίο οποιοδήποτε μεμονωμένο κύτταρο ή σωματίδιο, που έχει τις προαναφερθείσες πληροφορίες, απομακρύνεται επιλεκτικά από το εναιώρημα. Αυτό επιτυγχάνεται με τον εγκλωβισμό τους σε σταγονίδια, τα οποία φορτίζονται ηλεκτρικά επιλεκτικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια οδηγούνται σε ηλεκτροστατικό πεδίο, όπου, εκείνα που επιλέχθηκαν, εκτρέπονται από την πορεία τους και οδηγούνται για να συλλεχθούν σε ειδικό χώρο. Η

σπουδαιότητα της μεθόδου έγκειται στο ότι εξασφαλίζει τη μέτρηση και ανάλυση των σημάτων του κάθε κυττάρου ή σωματιδίου τα οποία εστιάζονται ένα-ένα στο σημείο ανάλυσης, όπου γίνεται η μέτρηση των διαφόρων παραμέτρων ¹¹³.

Γενικά ο κυτταρομετρητής ροής μπορεί να αναλύσει οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό στο οποίο μπορεί να προσδεθεί χρωστική. Εάν η σύνδεση της χρωστικής είναι στοιχειομετρική (δηλαδή η ποσότητα της δέσμευσης της χρωστικής είναι ανάλογη της ποσότητας του κυτταρικού συστατικού), η μέτρηση είναι ποσοτική και υψηλής ακρίβειας¹¹³.

Πίνακας 1: Ιδιότητες και Συστατικά κυττάρων που μετρούνται με Κυτταρομετρία Ροής

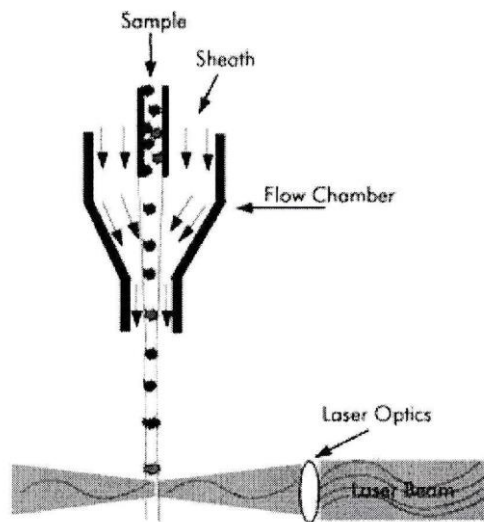
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ
Κυτταρική Διάμετρος	DNA
Κατανομή Χρωστικής	Πυρηνικά Αντιγόνα
Εσωτερική Δομή	Ένζυμα
Δυναμικό Μembrάνης	Πρωτεΐνες
Πυρηνική Διάμετρος	RNA
Εμβαδόν Επιφανείας	Ορμόνες
Όγκος	Αντιγόνα Επιφανείας

Ένας Κυτταρομετρητής Ροής αποτελείται από τρία συστήματα:

1. Σύστημα Ροής
2. Οπτικό Σύστημα
3. Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

Σύστημα Ροής

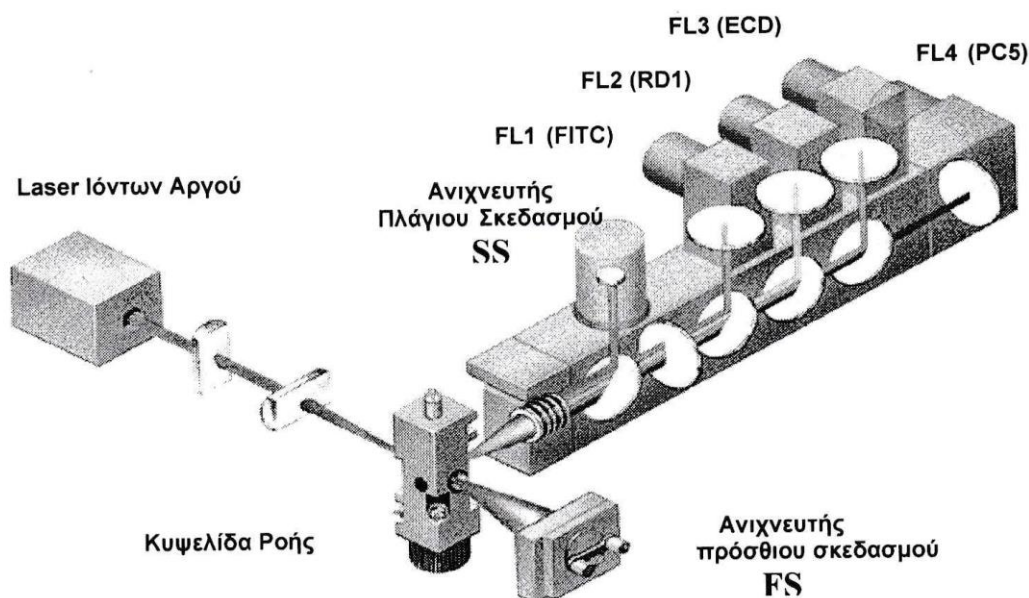
Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα, που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από την ακτίνα Laser, απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού, στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath Fluid). Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα, περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη (sheath). Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής (flow chamber). Εκεί ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται και η υδροδυναμική εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα laser με προσέγγιση $+1\mu\text{m}$ (εικόνα 3.1) ¹¹³.



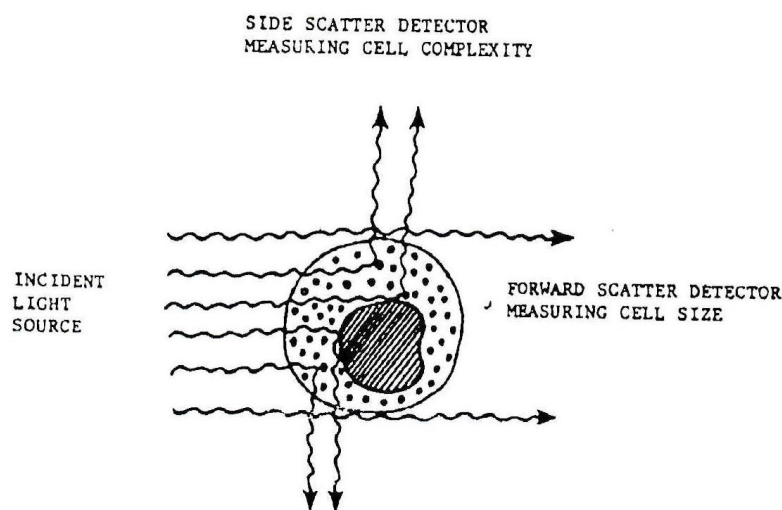
Εικόνα 3.1. Διάταξη κυψελίδας σε Κυτταρομετρητή Ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

Οπτικό σύστημα

Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα ή τα σωματίδια όταν προσπίπτει πάνω τους η φωτεινή δέσμη της λυχνίας. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη σκέδαση του φωτός και στον εκπεμπόμενο φθορισμό καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριοχρώμα (εικόνα 3.2). Η σκέδαση του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη διεύθυνση ροής δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης (ευθεία γραμμή) της ακτίνας Laser, με γωνία 1° - 20° , ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward Light Scatter, FSC) και είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας του Laser, με γωνία 90° , ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Right Angle Scatter, ή Side Scatter, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση του κυτταροπλάσματος του κυττάρου ή σωματιδίου (εικόνα 3.3) ¹¹³.



Εικόνα 3.2. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Διαθέτει μία φωτεινή πηγή laser ιόντων Αργού (488 nm) και τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PerCP/PC5.5) (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

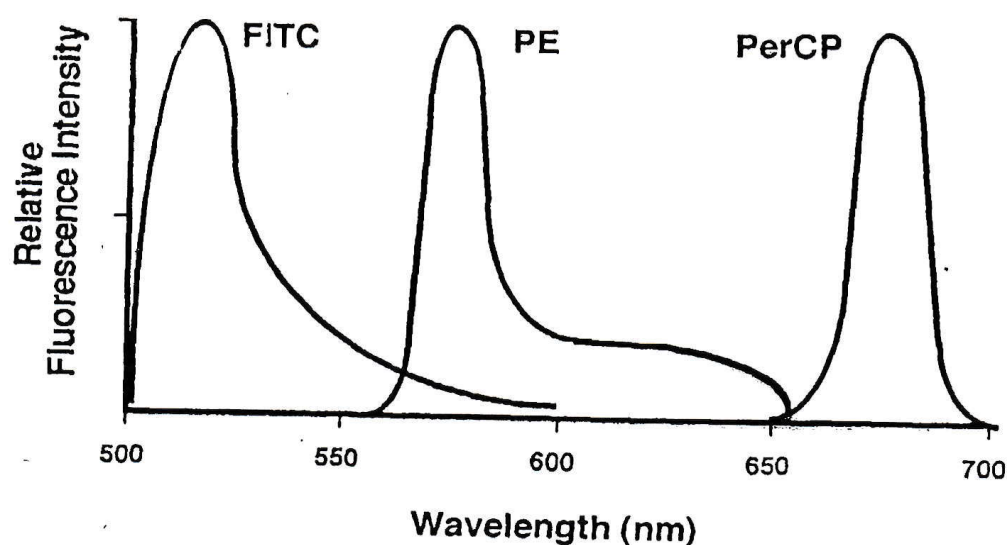


Εικόνα 3.3. Σχηματική ανάλυση κυττάρου ως προς την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθός του (FSC)) (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

Όταν κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος τα κύτταρα ή σωματίδια σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες όπως η ισοθειοκανική φλουορεσκεΐνη FITC (πράσινο), η τετραμεθυλοροδαμίνη, η R-φυκοερυθρίνη PE (κόκκινο), η περιδινούχος χλωροφύλλη-A-πρωτεΐνη PerCP, Texas Red ή άλλες φθορίζουσες ουσίες προσδεσμένες στα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγεται φθορισμός. Τα φθοριοχρώματα αυτά διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (διεγείρουσα) και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος της διεγείρουσας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε φθοριόχρωμα (πίνακας 2). Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE, PerCP, που είναι τα περισσότερο διαδεδομένα δεσμευμένα φθοριοχρώματα στα αντισώματα του εμπορίου ¹¹³.

Πίνακας 2. Φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην Κυτταρομετρία Ροής (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΟΥΣΙΑ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ LASER (nm)	ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ ΕΚΠΟΜΠΗΣ (nm)
FITC	488 nm	525 nm
PE	488 nm	578 nm
ECD	488 nm	613 nm
PerCP	488 nm	675 nm
Alexa Fluor 405	405, 407	421
Alexa Fluor 430	405, 407	541
Alexa Fluor 488	488	519
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	647
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	665
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	690
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	702
APC	633, 635, 647	661



Fluorescence Emission Spectra

Εικόνα 3.4. Τα φάσματα εκπομπής των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και PerCP (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

Από τα φθοριοχρώματα που αναφέρθηκαν, η FITC παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση και διεγείρεται στα 495 nm, ενώ η PE στα 495 nm και 550 nm. Ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm με Laser αργού διεγείρει και τις δύο χρωστικές και η μεν FITC εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL1 στα 520 nm (πράσινος φθορισμός), η δε PE εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL2 στα 575 nm (κόκκινος φθορισμός). Οι δύο διαφορετικοί φθορισμοί FL1 και FL2 συλλέγονται, αναλύονται και μετρούνται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Τα διχροϊκά κάτοπτρα είναι τοποθετημένα στην πορεία της φωτεινής δέσμης υπό γωνία 45°, ενώ τα φίλτρα είναι τοποθετημένα κάθετα ¹¹³.

Οι χρωστικές FITC, PE και PerCP μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, που αναγνωρίζουν τις αντιγονικές καθορίζουσες της κυτταρικής επιφάνειας ή της ενδοκυττάριας επιφάνειας. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης καθορίζουσών στην επιφάνεια του καθενός από τα μετρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του κάθε κυττάρου σε υποπληθυσμούς σύμφωνα με τους συνδυασμούς που έχουν

σχεδιαστεί. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων των φωτεινών σημάτων σκέδασης και φθορισμού, σε κάθε κύτταρο αντιστοιχεί μια τετράδα τιμών (FSC, SSC, FL1, FL2), η οποία μας δίνει τα δεδομένα για το μέγεθος, την κοκκίωση και το βαθμό έκφρασης των δύο αντιγονικών καθοριζουσών ¹¹³.

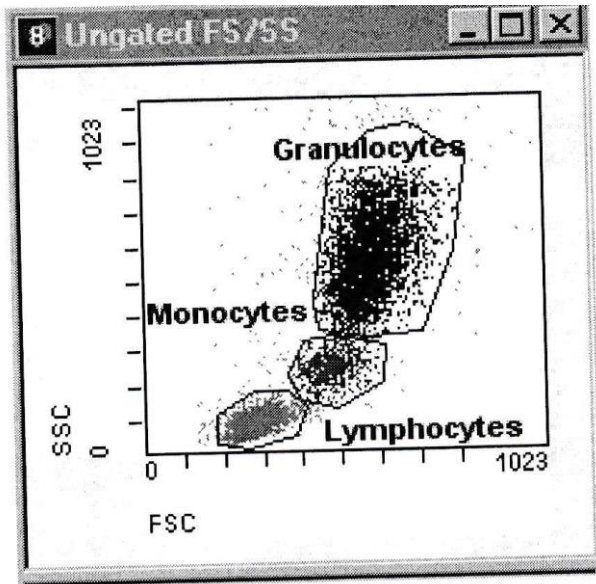
Σύστημα ανίχνευσης, επεξεργασίας και μετατροπής σε ηλεκτρονικό σήμα

Στους κυτταρομετρητές χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από την σκέδαση και τον φθορισμό: α) οι φωτοδιόδοι (PIN diodes) και β) οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes, PMTs). Οι PIN έχουν ευαισθησία στις μετρήσεις FSC και SSC, ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι PMTs, αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν, συγκρινόμενες με τις PIN, μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό. Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-120 μ sec. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται και νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του κυτταρομετρητή ¹¹³.

Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια, δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά μετά από χρήση ενισχυτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα. Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσουν οι ανάλογες επεξεργασίες των δεδομένων ¹¹³.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων όπως τα Κυτταρογράμματα (Dot plot), τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους και χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Στην Εικόνα 3.5 ένα κυτταρόγραμμα παρουσιάζει το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων του περιφερικού αίματος. Παρατηρούμε τους τρεις κύριους

υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα).



Εικόνα 3.5. Κυτταρόγραμμα ως προς το μέγεθος FSS (άξονας χ) και την κοκκίωση SCC (άξονας ψ), μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων περιφερικού αίματος. Διακρίνονται οι τρεις βασικοί υποπληθυσμοί των λευκοκυττάρων (Πηγή: Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της, Γ. Βαρθολομάτος, 2007).

Στα κυτταρογράμματα ανάλογα με τα δεδομένα που δίνονται στις συντεταγμένες, είναι δυνατόν να παίρνουμε: α) την κοκκίωση στον άξονα x και το μέγεθος στον άξονα y ή β) το αντίστροφο.

Άλλοι τρόποι παρουσίας και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι τα διαγράμματα:

α) κατανομής συχνοτήτων ή ιστόγραμμα

β) ισοϋψών καμπυλών

γ) ισομετρικών

δ) όψης διαμαντιού

Τα διαγράμματα αυτά προσφέρουν στον ερευνητή τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάλυσης ακόμη και του μικρότερου παθολογικού ή μη πληθυσμού ¹¹³.

3.2.1.1 Υλικά

- 1) Κυτταρόμετρο ροής BD FACSCalibur (Becton Dickinson) που βρίσκεται στη Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων
- 2) VersaLyse lysing solution Beckman Coulter, λυτικό διάλυμα για την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (περιέχει πυρρολιδίνη 1-2%, υδροχλωρικό οξύ 0,5 -1%)
- 3) Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρολενίου Falcon 12x75mm μιας χρήσης
- 4) Συσκευή ανάδευσης Vortex
- 5) Σιφώνια των 10 και 200μL
- 6) Μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριόχρωμα:
 - A) CD3-PerCP ή PE (κλώνος SK7) από BD-Biosciences (BD-Biosciences, San Jose, USA)
 - B) CD4-APC (κλώνος SK3) από BD-Biosciences
 - Γ) CD25-PC5 (κλώνος B1.49.9) από Beckman Coulter (Beckman Coulter, California, USA)
 - Δ) CLA-FITC (κλώνος HECA-452) από BD-Biosciences
 και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα με 3 φθοριοχρώματα:
 - E) Lymphogram από Cytognos(Cystognos S.L. Salamanca, Spain) , με τους ακόλουθους συνδυασμούς αντισωμάτων: CD8+ CD19 -FITC, CD3+ CD56-PE, CD4-PE-Cyanine7

Το Lymphogram της Cytognos τοποθετούνταν στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς να συνδυαστεί με κάποιο άλλο αντίσωμα και χρησιμοποιούνταν για να προσδιοριστούν οι κύριοι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων όπως τα T (CD3+), B-λεμφοκύτταρα

(CD19+) και τα NK λεμφοκύτταρα (CD3⁻CD56⁺) όπως και οι υποκατηγορίες των Τ-βοηθητικών (CD3⁺CD4⁺) και των κυτταροτοξικών (CD3⁺CD8⁺). Τα υπόλοιπα αντισώματα συνδυάστηκαν με αποτέλεσμα να προκύψουν συνδυασμοί διπλού και τριπλού φθορισμού ως ακολούθως:

- a) CD4APC/ CD25PC5 / CLAFITC
- b) CD3PerCP/ CLAFITC ή CD3PE/ CLAFITC

Τα δεδομένα αποθηκεύτηκαν στο λογισμικό SimulSET™ (BD Pharmigen, Mountainview, CA, USA) και αναλύθηκαν με το λογισμικό CellQuest v3.1.

3.2.1.2 Πρωτόκολλο εκτέλεσης

Χρησιμοποιώντας αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) τοποθετούνται 10 μ L από κάθε αντίσωμα στον πυθμένα των δοκιμαστικών σωλήνων ως εξής: στον 1^ο σωλήνα τοποθετούνται 10 μ L από το Lymphogram, στο 2^ο σωλήνα 10 μ L από το CD4APC, 10 μ L από το CD25PC5 και 10 μ L από το CLAFITC και στον 3^ο σωλήνα 10 μ L από το CD3PerCP και 10 μ L από το CLAFITC. Στην εξωτερική επιφάνεια των δοκιμαστικών σωλήνων σημειώνονται τα αντισώματα που περιέχονται σε αυτούς.

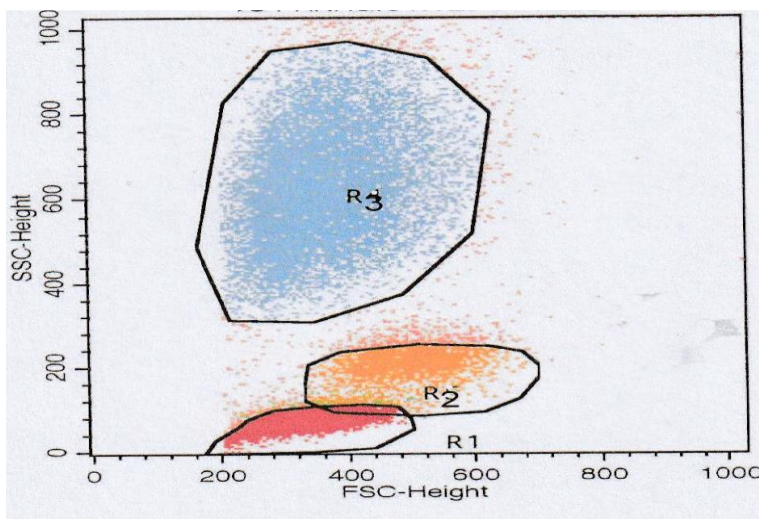
Ακολούθως, με αυτόματο σιφώνιο προσθέτουμε στον πυθμένα των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα αντισώματα 100 μ L φλεβικού αίματος. Στη συνέχεια γίνεται ήπια ανάδευση με τη συσκευή vortex για 5sec και οι σωλήνες τοποθετούνται σε σκοτεινό χώρο για 15min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει η πρόσδεση των αντισωμάτων στα αντίστοιχα επιφανειακά αντιγόνα των κυττάρων.

Μετά την πάροδο των 15 λεπτών προστίθεται 1 ml διαλύματος VersaLyse σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, γίνεται ήπια ανάδευση (vortex) για 1 sec και εκ νέου τοποθέτησή τους σε σκοτεινό μέρος για άλλα 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το περιεχόμενο των σωλήνων γίνεται διαυγές και είναι έτοιμο για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής στο κυτταρόμετρο.

3.2.1.3 Ανάλυση

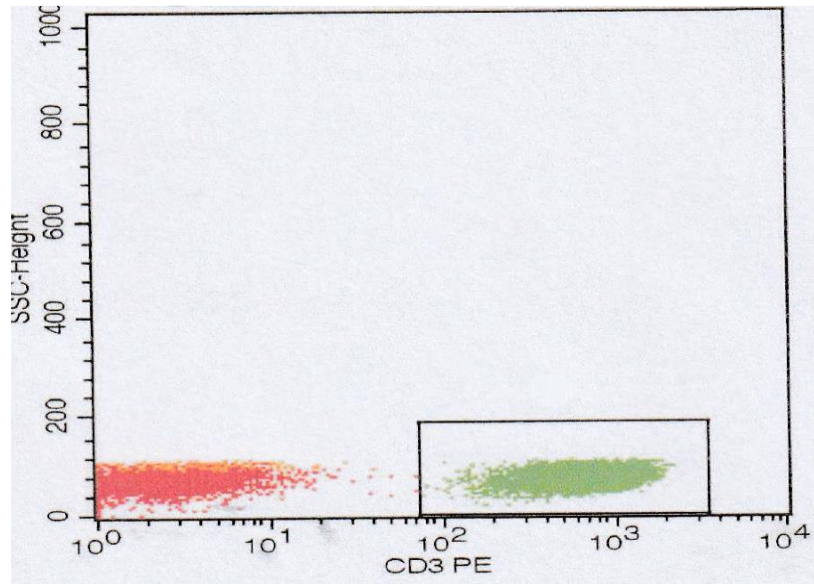
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson). Δημιουργήθηκε ένα κυτταρόγραμμα dot plot, όπου ο άξονας x αντιστοιχεί στο βαθμό πρόσθιου σκεδασμού (FSC) και ο άξονας y αντιστοιχεί στο βαθμό πλάγιου σκεδασμού (SSC). Στο διάγραμμα αυτό αναγνωρίζονται τα λεμφοκύτταρα λόγω του μικρού μεγέθους τους και της μικρής κοκκίωσης και περικλείονται στην πύλη 1. Επίσης αναγνωρίζονται τα πολυμορφοπύρηνα λόγω μεγαλύτερου μεγέθους και κοκκίωσης και περικλείονται στην πύλη 3, ενώ τα μονοκύτταρα αναγνωρίζονται ως μια μικρή ομάδα κυττάρων ανάμεσα στις άλλες δύο και περικλείονται στην πύλη 2 (εικόνα 3.6).

Η ομάδα λοιπόν των λεμφοκυττάρων που αναγνωρίστηκε στην πύλη 1 είναι εκείνη που θα συμπεριληφθεί στην περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να διαχωριστούν οι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων που μας ενδιαφέρουν.



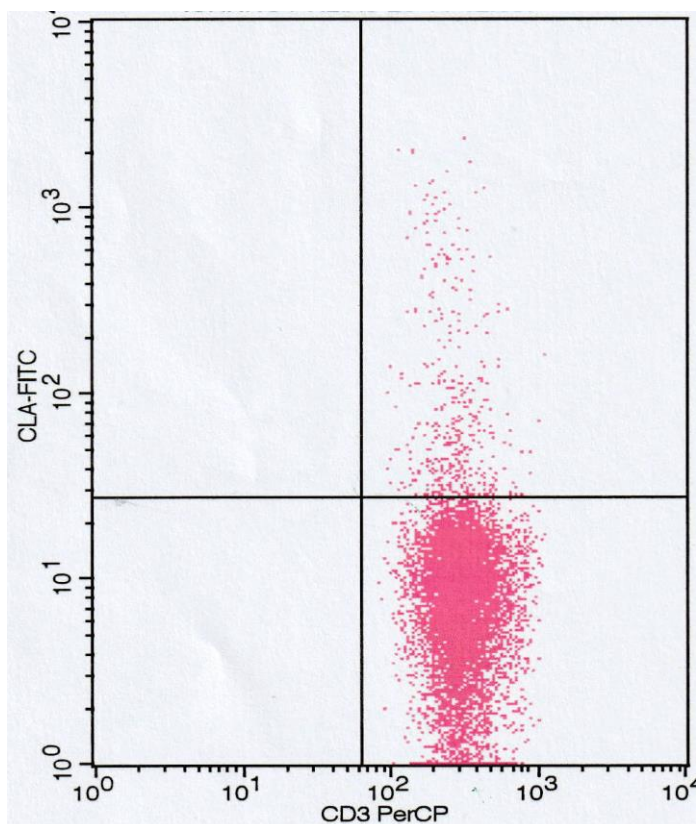
Εικόνα 3.6 Κυτταρόγραμμα διαχωρισμού των λεμφοκυττάρων στην πύλη R1, των μονοκυττάρων στην πύλη R2 και των πολυμορφοπύρηνων στην πύλη R3.

Για να ορίσουμε τον πληθυσμό των $CD3^+$ λεμφοκυττάρων, δημιουργήσαμε ένα κυτταρόγραμμα με άξονα Χ το βαθμό φθορισμού του CD3 και άξονα Υ το βαθμό πλάγιου σκεδασμού των λεμφοκυττάρων (Side Scatter- SSC, εικόνα 3.7).



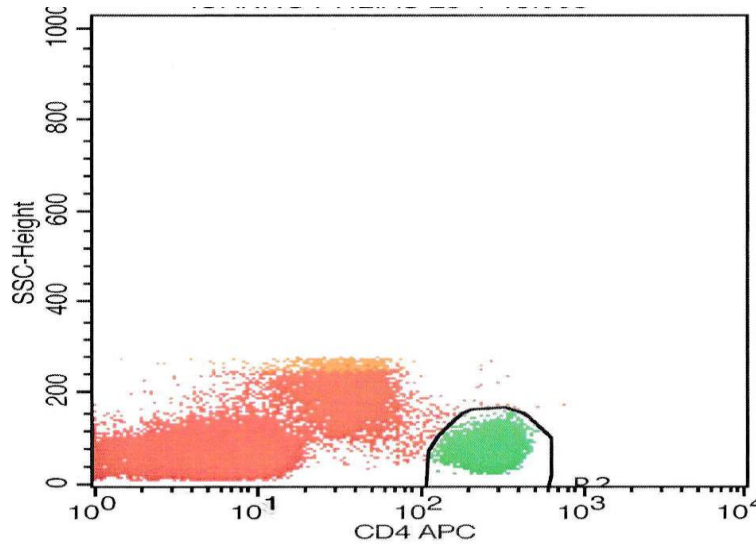
Εικόνα 3.7 Ο πληθυσμός των $CD3^+$ λεμφοκυττάρων απεικονίζεται με πράσινο χρώμα και περικλείεται στην πύλη.

Για τον πληθυσμό των $CD3^+$ λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν σε αυτή την πύλη (συμπεριελήφθησαν τουλάχιστον 10.000 κύτταρα), δημιουργήσαμε ένα νέο κυτταρόγραμμα με άξονα Χ την ένταση φθορισμού του CD3 και με άξονα Υ την ένταση φθορισμού του CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) που αντιστοιχούσε στο συνδυασμό αντισωμάτων $CD3PerCP/CLA-FITC$ ή $CD3PE/CLA-FITC$ στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Απομονώθηκαν τα $CD3^+$ κύτταρα που εμφάνισαν υψηλή έκφραση του αντιγόνου CLA ($>10^2$) (εικόνα 3.8).



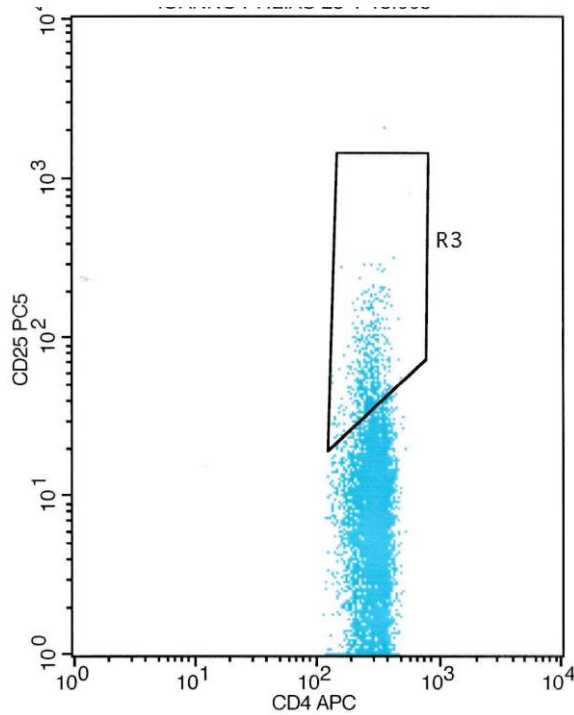
Εικόνα 3.8 Τα $CD3^+CLA$ κύτταρα διακρίνονται στο επάνω δεξί τεταρτημόριο (UpRight) του κυτταρογράμματος

Για να ορίσουμε τον πληθυσμό των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων, δημιουργήσαμε ένα κυτταρογράμμα με άξονα X το βαθμό φθορισμού του CD4 και άξονα Y το βαθμό πλάγιου σκεδασμού των λεμφοκυττάρων (SSC) (εικόνα 3.9).



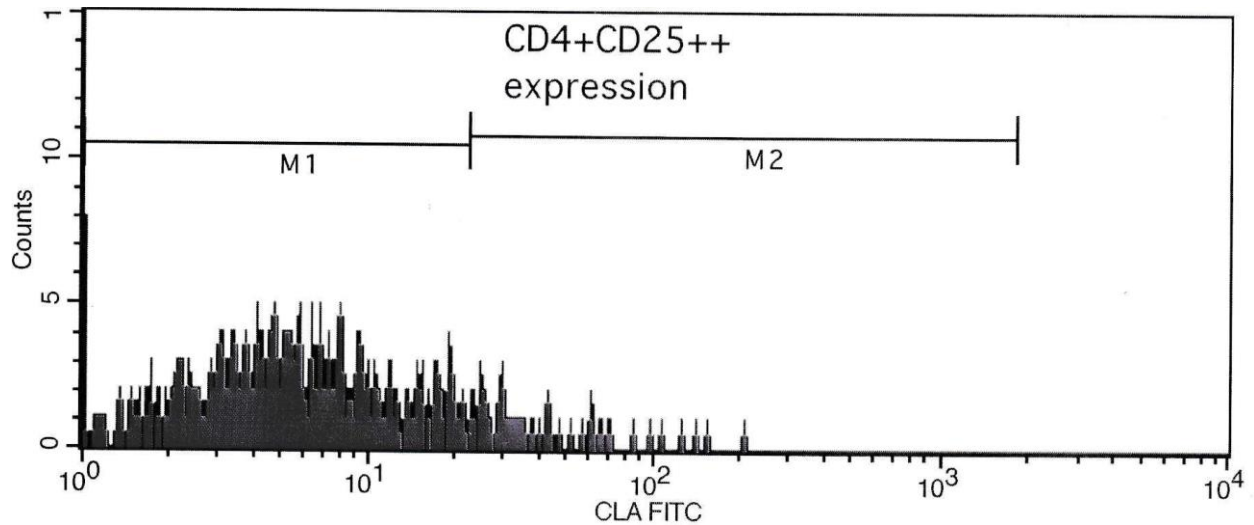
Εικόνα 3.9 Τα $CD4^+$ λεμφοκύτταρα απεικονίζονται με πράσινο χρώμα και περικλείονται στην πύλη R2.

Με τον πληθυσμό των $CD4^+$ λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν στην πύλη του κυτταρογράμματος της εικόνας 3.9 (10.000 κύτταρα), δημιουργήσαμε ένα νέο κυτταρόγραμμα προκειμένου να διαχωρίσουμε τα Tregs ως $CD4$ κύτταρα με υψηλή έκφραση του $CD25$ ($CD4^+CD25^{high}$). Στον άξονα Χ απεικονίστηκε η ένταση φθορισμού του $CD4$ και στον άξονα Υ η ένταση φθορισμού του $CD25$ και προσδιορίστηκαν τα Tregs (εικόνα 3.10).



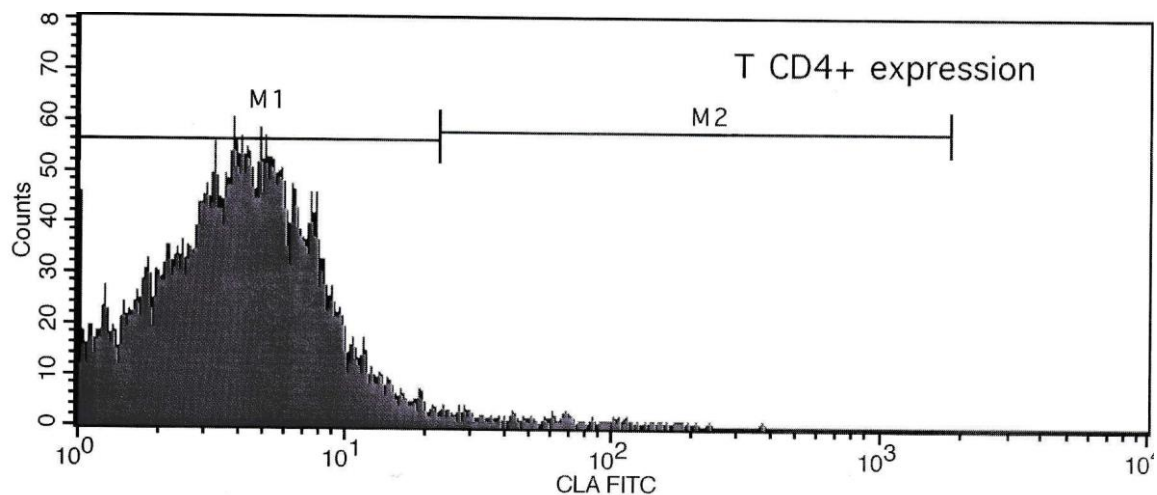
Εικόνα 3.10 Τα Treg λεμφοκύτταρα εμφανίζουν υψηλή έκφραση του αντιγόνου CD25 (υψηλή ένταση φθορισμού) και περικλείονται στην πύλη R3

Από τον πληθυσμό των Tregs που απομονώθηκε με το προαναφερθέν κυτταρόγραμμα (εικόνα 3.10), δημιουργήσαμε ένα ιστογράμμα προκειμένου να διαχωρίσουμε επιπλέον τα Tregs που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) και αντιστοιχούν στο συνδυασμό αντισωμάτων CD4APC/ CD25PC5 / CLAFITC στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στο άξονα Χ του ιστογράμματος απεικονίστηκε η ένταση φθορισμού του CLA και στο άξονα Υ ο αριθμός των Tregs κυττάρων και προσδιορίστηκε ο πληθυσμός των Tregs CLA κυττάρων (εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11 Στην πύλη M2 εντοπίζονται τα Treg που εμφανίζουν υψηλή έκφραση του αντιγόνου CLA.

Δημιουργήσαμε επίσης ένα τελευταίο ιστόγραμμα για να προσδιορίσουμε τα CD4 λεμφοκύτταρα που παρουσίαζαν έκφραση του αντιγόνου CLA. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τον ίδιο πληθυσμό CD4⁺ λεμφοκυττάρων που είχαμε απομονώσει με το κυτταρόγραμμα με άξονα X το βαθμό φθορισμού του CD4 και με άξονα Y το βαθμό πλάγιου σκεδασμού των λεμφοκυττάρων (SSC) της εικόνας 3.9. Στον άξονα X του τελευταίου ιστογράμματος φαίνεται η ένταση φθορισμού του CLA και στον άξονα Y ο αριθμός των CD4 κυττάρων (εικόνα 3.12).

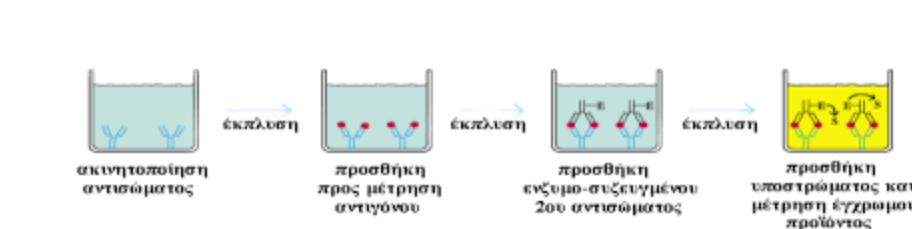


Εικόνα 3.12 Στην πύλη M2 εντοπίζονται τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα με υψηλή έκφραση του αντιγόνου CLA.

3.2.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία Elisa (Δοκιμασία ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης) είναι μια μέθοδος υψηλής ευαισθησίας η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι: (α) κυρίως, η υψηλότερη ευαισθησία της και η επαναληψιμότητά της και (β) η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, όπως στις μεθόδους RIA (Radioimmunoassay). Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent), (2) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και (3) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος (Πηγή: Εργαστηριακές Ασκήσεις Ανοσολογίας - Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων).

Η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich (Εικόνα 3.13), η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην έρευνά μας, χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του ίδιου αντιγόνου.



Εικόνα 3.13. Σχηματική απεικόνιση ELISA τύπου Sandwich (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, Immunology, 6th Ed., 2007).

Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια ενός μικροφρεατίου πολυστυρολενίου που αποτελεί μέρος μιας πλακέτας με πολλά τέτοια μικροφρεάτια ώστε να εξετάζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Στη συνέχεια προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Μετά την αντίδραση του πρώτου αντισώματος με το εξεταζόμενο αντιγόνο γίνεται έκπλυση και ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δεύτερου αντισώματος. Η ποσότητα του δεύτερου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και του ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο χρωμογόνο υποστρώμα που αντιδρά με το ένζυμο του προαναφερθέντος συμπλέγματος, παράγοντας έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμό) και ανιχνεύεται ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής του αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου, δηλαδή διαλύματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του αντιγόνου, και τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε διεθνή μονάδα συγκέντρωσης (g/l ή υποδιαιρέσεις, π.χ. ng/ml, pg/ml). Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργιών (Πηγή: Εργαστηριακές Ασκήσεις Ανοσολογίας - Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων)

3.2.2.1 Υλικά

1. Επιτραπέζιος αναδευτήρας
 2. Φυγόκεντρος
 3. Φωτόμετρο για πλακίδια 96 μικροφρεατίων
 4. Πολυκάναλη πιπέτα
 5. Απεσταγμένο νερό
 6. Human TNFa Quantikine kit, R&D Systems, Inc. MN, USA
 - α) Πλακίδιο 96 μικροφρεατίων πολυστυρενίου (12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμία) καλυμμένων με ειδικό για τον TNFa αντίσωμα.
 - β) Πρότυπο TNFa (ανασυνδυασμένος ανθρώπινος TNFa προσωρινά αποθηκευμένος σε πρωτεϊνική βάση- γίνεται ανασύστασή του με απεσταγμένο νερό και διαδοχικές αραιώσεις με προσθήκη διαλύματος αραιώσης βαθμονομητή)
 - γ) Ανθρώπινο συζευγμένο αντίσωμα TNFa (ειδικό για τον TNFa πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση)
 - δ) Διάλυμα αραιώσης RDF1
 - ε) Διάλυμα αραιώσης βαθμονομητή RD6-12
 - στ) Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (γίνεται ανάμιξη 20 mL συμπυκνωμένου δ/τος με 480 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού και προκύπτει 500 mL διαλύματος πλύσης που τελικά χρησιμοποιούμε στη διαδικασία των πλύσεων)
 - ζ) Αντιδραστήριο χρώματος A (σταθεροποιημένο υπεροξείδιο υδρογόνου)
 - η) Αντιδραστήριο χρώματος B (σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη)

Τα αντιδραστήρια χρώματος A και B αναμιγνύονται σε ίσους όγκους και προκύπτει το διάλυμα υποστρώματος (substrate solution), το οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 15 λεπτών από την ανασύστασή του.

 - θ) Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης
 - ι) Σφραγιστικά πλακιδίων
7. Human IL-2 Quantikine kit, R&D Systems, Inc. MN, USA
 - α) Πλακίδιο 96 μικροφρεατίων πολυστυρενίου (12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμία) καλυμμένων με ειδικό για την IL-2 αντίσωμα.

β) Πρότυπο IL-2 (ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-2 προσωρινά αποθηκευμένη σε πρωτεϊνική βάση- γίνεται ανασύστασή της με διάλυμα αραιώσης βαθμονομητή RD5-5 και διαδοχικές αραιώσεις με το ίδιο διάλυμα)

γ) Ανθρώπινο συζευγμένο αντίσωμα IL-2 (ειδικό για την IL-2 πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση)

δ) Διάλυμα αραιώσης RD1W

ε) Διάλυμα αραιώσης βαθμονομητή RD6-E

στ) Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (γίνεται ανάμιξη 20 mL συμπυκνωμένου δ/τος με 480 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού και προκύπτει 500 mL διαλύματος πλύσης που τελικά χρησιμοποιούμε στη διαδικασία των πλύσεων)

ζ) Αντιδραστήριο χρώματος A (σταθεροποιημένο υπεροξείδιο υδρογόνου)

η) Αντιδραστήριο χρώματος B (σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη)

Τα αντιδραστήρια χρώματος A και B αναμιγνύονται σε ίσους όγκους και προκύπτει το διάλυμα υποστρώματος (substrate solution), το οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 15 λεπτών από την ανασύστασή του.

θ) Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

ι) Σφραγιστικά πλακιδίων

8. Human IL-6 Quantikine kit, R&D Systems, Inc. MN, USA

α) Πλακίδιο 96 μικροφρεατίων πολυστυρενίου (12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμία) καλυμμένων με ειδικό για την IL-6 αντίσωμα.

β) Πρότυπο IL-6 (ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-6 προσωρινά αποθηκευμένη σε πρωτεϊνική βάση- γίνεται ανασύστασή της με απεσταγμένο νερό και διαδοχικές αραιώσεις με προσθήκη διαλύματος αραιώσης βαθμονομητή)

γ) Ανθρώπινο συζευγμένο αντίσωμα IL-6 (ειδικό για την IL-6 πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση)

δ) Διάλυμα αραιώσης RD1W

ε) Διάλυμα αραιώσης βαθμονομητή RD6F

στ) Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (γίνεται ανάμιξη 20 mL συμπυκνωμένου δ/τος με 480 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού και προκύπτει 500 mL διαλύματος πλύσης που τελικά χρησιμοποιούμε στη διαδικασία των πλύσεων)

ζ) Αντιδραστήριο χρώματος A (σταθεροποιημένο υπεροξείδιο υδρογόνου)

η) Αντιδραστήριο χρώματος B (σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη)

Τα αντιδραστήρια χρώματος A και B αναμιγνύονται σε ίσους όγκους και προκύπτει το διάλυμα υποστρώματος (substrate solution), το οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 15 λεπτών από την ανασύστασή του.

θ) Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

ι) Σφραγιστικά πλακιδίων

9. Human IL-10 Quantikine kit, R&D Systems, Inc. MN, USA

α) Πλακίδιο 96 μικροφρεατίων πολυστυρενίου (12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμία) καλυμμένων με ειδικό για την IL-10 αντίσωμα.

β) Πρότυπο IL-10 (ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-10 προσωρινά αποθηκευμένη σε πρωτεϊνική βάση- γίνεται ανασύστασή της με απεσταγμένο νερό και διαδοχικές αραιώσεις με προσθήκη διαλύματος αραιώσης βαθμονομητή)

γ) Ανθρώπινο συζευγμένο αντίσωμα IL-10 (ειδικό για την IL-10 πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση)

δ) Διάλυμα αραιώσης RD1W

ε) Διάλυμα αραιώσης βαθμονομητή RD6P

στ) Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (γίνεται ανάμιξη 20 mL συμπυκνωμένου δ/τος με 480 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού και προκύπτει 500 mL διαλύματος πλύσης που τελικά χρησιμοποιούμε στη διαδικασία των πλύσεων)

ζ) Αντιδραστήριο χρώματος A (σταθεροποιημένο υπεροξείδιο υδρογόνου)

η) Αντιδραστήριο χρώματος B (σταθεροποιημένη τετραμεθυλβενζιδίνη)

Τα αντιδραστήρια χρώματος A και B αναμιγνύονται σε ίσους όγκους και προκύπτει το διάλυμα υποστρώματος (substrate solution), το οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 15 λεπτών από την ανασύστασή του.

θ) Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

ι) Σφραγιστικά πλακιδίων

10. Human INFa ELISA kit, PBL Assay Science, NJ, US

- α) Πλακίδιο 96 μικροφρεατίων πολυστυρενίου (12 ράβδοι των 8 μικροφρεατίων η καθεμία) καλυμμένων με ειδικό για την INF-a αντίσωμα
- β) Πρότυπο INFa (ανασυνδυασμένη ανθρώπινη INFa με συγκέντρωση 10.000 pg/ml)
- γ) Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης (γίνεται ανάμιξη 50 mL συμπυκνωμένου δ/τος πλύσης με 450 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού και προκύπτουν 500mL δ/τος πύσης που τελικά χρησιμοποιούμε στη διαδικασία των πλύσεων δ μας)
- δ) Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
- ε) Συμπυκνωμένο αντίσωμα
- στ) HRP Conjugate Concetrate
- ζ) συμπυκνωμένο διάλυμα αραίωσης
- η) υπόστρωμα TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη)
- θ) Όξινο διάλυμα διακοπής της αντίδρασης
- ι) Σφραγιστικά πλακιδίων

3.2.2.2 Πρωτόκολλο εκτέλεσης

Για να μετρήσουμε τα επίπεδα των κυτταροκινών που αναφέρθηκαν χρησιμοποιήσαμε ορό ασθενών, ο οποίος είχε αποθηκευτεί στους -20 °C. Πριν την έναρξη της διαδικασίας της sandwich elisa ο ορός καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια για τον προσδιορισμό της εκάστοτε κυτταροκίνης:

A. Προσθήκη 100 μ L διαλύματος αραίωσης σε κάθε μικροφρεάτιο με πολυκάναλη πιπέτα.

B. Επακόλουθη προσθήκη 100 μ L ορού ασθενών και αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος αναφοράς (βαθμονομητή) στα μικροφρεάτια του πλακιδίου σε συγκεκριμένες θέσεις το καθένα, σφράγισμα του πλακιδίου με τα ειδικά αυτοκόλλητα σφραγιστήρια και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Γ. Το περιεχόμενο των μικροφρεατίων αφαιρείται αναποδογυρίζοντας το πλακίδιο με γρήγορες κινήσεις. Στη συνέχεια ακολουθούν οι πλύσεις με την προσθήκη του διαλύματος πλύσεων (400μL διαλύματος σε κάθε μικροφρεάτιο) στα μικροφρεάτια και απομάκρυνσή του πάλι αναποδογυρίζοντας το πλακίδιο, μια διαδικασία που επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται η περίσσεια του αντιγόνου. Το πλακίδιο στο τέλος τοποθετείται ανάποδα πάνω σε στεγνό χαρτί ώστε να έχουν απομακρυνθεί όλα τα υγρά.

Δ. Προσθήκη 200μL συζευγμένο αντίσωμα κυτταροκίνης σε κάθε μικροφρεάτιο , κάλυψη του πλακιδίου με νέο αυτοκόλλητο σφραγιστικό και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.

Ε. Επανάληψη του βήματος Γ με τον ακριβώς ίδιο τρόπο.

ΣΤ. Προσθήκη 200μL διαλύματος υποστρώματος (που περιέχει τα δυο χρωμογόνα αντιδραστήρια που ανασυστάθηκαν δημιουργώντας το εν λόγω διάλυμα) σε κάθε μικροφρεάτιο και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ζ. Μετά την πάροδο των 20 λεπτών προσθέτουμε 50 μL όξινου διαλύματος διακοπής της αντίδρασης σε κάθε μικροφρεάτιο για να σταματήσουμε την εξελισσόμενη αντίδραση. Στη φάση αυτή παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του περιεχομένου στα μικροφρεάτια. Αν το χρώμα που προκύπτει δεν είναι το επιθυμητό ή είναι ανομοιόμορφο, τότε ανακινούμε απαλά το πλακίδιο.

Η. Ακολουθεί φωτομετρία για την ανίχνευση του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης, εντός 30 λεπτών από τη διακοπή της αντίδρασης, σε μήκος κύματος 450 nm (κάνοντας διορθώσεις του μήκους κύματος σε 540 ή 570 nm όταν είναι εφικτό).

Στο τελικό στάδιο υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των κυτταροκινών σε κάθε δείγμα ασθενή με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης για την δημιουργία της οποίας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα σταθερών συγκεντρώσεων κυτταροκίνης. Όλη η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας προμήθειας του ELISA kit (R&D Systems, Inc. MN, USA).

3.2.2 Μέτρηση ποιότητας ζωής σε σχέση με τη θεραπεία

Οι καρκίνοι του δέρματος που προέρχονται από κερατινοκύτταρα θεωρείται ότι έχουν μία «οριακή» επίδραση στην ποιότητα ζωής των ασθενών, καθώς εμφανίζουν συγκριτικά χαμηλή νοσηρότητα, περιορισμένη δυνατότητα μεταστάσεων και χαμηλό κίνδυνο θνητότητας^{114,115,116,117}. Οι όγκοι αυτοί όμως έχουν την τάση να εμφανίζονται συχνότερα στις εκτεθειμένες περιοχές του προσώπου, κάτι που μπορεί να έχει σημαντική ψυχολογική επιβάρυνση και επίδραση στην ποιότητα ζωής των ασθενών^{118,119}. Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος ιδιαίτερα εξαιτίας της «προτίμησής» του για τις εμφανείς περιοχές του προσώπου και της κεφαλής¹²⁰, μπορεί να προκαλέσει σημαντική αύξηση των επιπέδων άγχους, κατάθλιψης και κοινωνικής απομόνωσης¹²¹. Επιπλέον οι διάφορες θεραπευτικές παρεμβάσεις μπορεί να έχουν επιπρόσθετη σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση στους ασθενείς, καθώς ενδέχεται έστω και προσωρινά, να επιτείνουν την αίσθηση της δυσμορφίας του προσώπου¹²². Αυτό ισχύει περισσότερο στην περίπτωση των ελάχιστα επεμβατικών τοπικών θεραπειών διάρκειας αρκετών εβδομάδων, οι οποίες εξαρτώνται από την επαρκή συμμόρφωση των ασθενών. Εφόσον η πλειονότητα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων εντοπίζεται στο πρόσωπο, οι έντονες τοπικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις στην υπό θεραπεία περιοχή μπορεί να προκαλέσουν σημαντική δυσφορία στους ασθενείς, επηρεάζοντας τόσο την ποιότητα ζωής τους όσο και τη συμμόρφωσή τους στη θεραπεία^{119,123,124}. Γι' αυτούς τους λόγους στη μελέτη μας θεωρήθηκε σημαντικό να εκτιμηθεί ο βαθμός ψυχο-σωματικής επιβάρυνσης που προκαλεί στους ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα ο ίδιος ο όγκος αλλά και τυχόν μεταβολές της επιβάρυνσης αυτής κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ανοσοκρυστοχειρουργική. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ερωτηματολόγιο ποιότητας ζωής Hornheide. Το εν λόγω ερωτηματολόγιο αναπτύχθηκε στην εξειδικευμένη για όγκους του δέρματος κλινική Hornheide στο Münster της Γερμανίας από το 1986 έως το 1988 και εκτιμά ειδικά την ψυχολογική επιβάρυνση των ασθενών με όγκους στην περιοχή του προσώπου και του λαιμού καθώς και την ανάγκη ειδικής παρέμβασης για την ψυχολογική υποστήριξη των συγκεκριμένων ασθενών^{125,121,126,127,128}.

Στο ερωτηματολόγιο Hornheide περιλαμβάνονται 27 ερωτήσεις και οι απαντήσεις των ασθενών συνδυάζονται ώστε να εκτιμηθούν 8 ξεχωριστές ψυχοκοινωνικές παράμετροι και συγκεκριμένα η σωματική ευεξία, η συναισθηματική ευεξία, η σχετιζόμενη με τον καρκίνο ανησυχία, η ψυχολογική ένταση, η ανάγκη για κοινωνική υποστήριξη (από συγγενείς ή φίλους), το προκαλούμενο από τη θεραπεία άγχος, η ποιότητα της ιατρικής ενημέρωσης και άλλες ανησυχίες. Το ερωτηματολόγιο συμπληρώνεται από τους ίδιους τους ασθενείς και μεταφράστηκε από τα Γερμανικά στα Ελληνικά (από δύο δίγλωσσους μεταφραστές, ο πρώτος Γερμανικής φιλολογίας και ο δεύτερος με γνώσεις ιατρικής).

Στη μελέτη μας συμφώνησαν να απαντήσουν στο ερωτηματολόγιο 30 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο βασικοκυτταρικό προσώπου και τραχήλου, οι οποίοι παρακολουθούνται στο ιατρείο όγκων της Δερματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από αυτούς 17 ήταν γυναίκες και 13 άντρες ηλικίας 31-87 ετών, ελληνικής καταγωγής και κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου. Η έρευνά μας εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ερευνών και Ηθικής του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ιωαννίνων [αρ.έγκρισης: (4/8-4-2009(θ.18))]. Τα ερωτηματολόγια διενεργήθηκαν στις ακόλουθες φάσεις: α) πριν την έναρξη της θεραπείας και αφού οι ασθενείς είχαν ενημερωθεί για το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης και τις θεραπευτικές επιλογές (εβδομάδα 0), β) στις 2 εβδομάδες συνεχούς καθημερινής εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5% και πριν την κρυοχειρουργική (εβδομάδα 2), γ) μετά τη συμπλήρωση 5 εβδομάδων ανοσοκρυοχειρουργικής (εβδομάδα 5- τέλος της θεραπείας) και δ) ένα μήνα μετά το τέλος της θεραπείας (εβδομάδα 9) (φωτογραφία 2). Οι ασθενείς καλούνται αρχικά να απαντήσουν με ένα «ναι» ή ένα «όχι» στις ερωτήσεις και στη συνέχεια να ποσοτικοποιήσουν την επιβάρυνσή τους δίνοντας μια βαθμολογία από 0 έως 5 σύμφωνα με την κλίμακα Likert, όπου το 0 αντιστοιχούσε στο καθόλου και το 5 στο πάρα πολύ (εικόνα 3.14). Στην περίπτωση που κάποια από τις απαντήσεις που αφορούν στις 8 παραμέτρους που εξετάζονται υπερβεί την αποδεκτή βαθμολογία ή το σύνολο των απαντήσεων εμφανίζει βαθμολογία μεγαλύτερη από 41 πόντους (δηλαδή >30% των μέγιστων 135 πόντων του ερωτηματολογίου) , θεωρούμε ότι ο ασθενής χρειάζεται ψυχολογική υποστήριξη (πίνακας 3).

Τα αποτελέσματα των ερωτηματολογίων αναλύθηκαν με την ανάλυση διπλής διακύμανσης Friedman και το Wilcoxon-signed rank test.



Φωτογραφία 2. Εικόνες από ασθενείς με βασικοκυτταρικά καρκινώματα ανάλογα με τα στάδια της ανοσοοκρυστοχειρουργικής (αρχείο Δερματολογικής κλινικής ΠΠΓΝΙ)

Επίθετο _____ Όνομα _____

Ημερομηνία _____

Οι παρακάτω απόψεις αναφέρονται στην τελευταία εβδομάδα

Στάδιο Θεραπείας:

ΠροΚρυοΧ ☐

Κ ☐

Μετά ΚρυοΧ ☐

1 Μήνας FU ☐

0: Καθόλου

1: Ελαφρά

2: Μέτρια

3: Αρκετά

4: Πολύ

5: Πάρα πολύ

1. Από τότε που αρρώστησα δυσκολεύομαι να κινούμαι (περπάτημα, ανέβασμα σκάλας, οδήγηση) _____
2. Ανησυχώ αρκετά συχνά. _____
3. Μου είναι δυσάρεστο να βλέπω το άρρωστο σημείο. _____
4. Εξαιτίας της αρρώστιας επηρεάζεται προς το χειρότερο η επαγγελματική μου κατάσταση _____
5. Δεν μπορώ να χαλαρώσω και να ηρεμήσω. _____
6. Πρέπει να φανώ δυνατός για τους στενούς συγγενείς μου. _____
7. Υποφέρω από πόνο. _____
8. Αισθάνομαι χάλια και τελειωμένος. _____
9. Φοβάμαι ότι θα χάσω την εργασία μου εξαιτίας της αρρώστιας. _____
10. Εξαιτίας της αρρώστιας δεν κάνω πλέον πράγματα που μου άρεσαν. _____
11. Φοβάμαι να ζήσω με την αρρώστια _____
12. Ανησυχώ για διάφορα πράγματα που δεν έχουν καμία απολύτως σχέση με την αρρώστια. _____
13. Μου είναι δύσκολο να απαντώ σε ερωτήσεις που αφορούν την αρρώστια μου. _____
14. Διστάζω να καταπιαστώ ή/και να ασχοληθώ με την συνήθη εργασία μου. _____
15. Αισθάνομαι σωματικά λιγότερο ικανός σε σχέση με την κατάσταση πριν αρρωστήσω. _____
16. Αισθάνομαι πεσμένος και λυπημένος. _____
17. Η σκέψη ότι θα επεκταθεί ο όγκος με φοβίζει. _____
18. Φοβάμαι ότι θα με απορρίψουν άλλοι άνθρωποι εξαιτίας της αλλαγμένης μου εμφάνισης. _____
19. Αισθάνομαι ότι οι κοντινοί μου άνθρωποι με στηρίζουν ελάχιστα. _____
20. Ο ιατρός μου εδώ στην κλινική έχει ελάχιστο χρόνο για μένα. _____
21. Είμαι οικονομικά περιορισμένος εξαιτίας της αρρώστιας. _____
22. Υποφέρω και από άλλη αρρώστια που με επηρεάζει αρνητικά. _____
23. Μου είναι δύσκολο να μιλώ με τους στενούς συγγενείς μου για τις έγνοιες και τους φόβους μου. _____
24. Διάφοροι ιατροί εδώ στην κλινική έχουν διαφορετική άποψη για την αρρώστια μου. _____
25. Φοβάμαι το βλέμμα των άλλων. _____
26. Αισθάνομαι ότι δεν είμαι επαρκώς ενημερωμένος για την αρρώστια και περίθαλψή μου. _____
27. Υποφέρω από αϋπνίες. _____

Εικόνα 3.14 Δείγμα του μεταφρασμένου ερωτηματολογίου Hornheide.

Πίνακας 3. Διακύμανση της επιβάρυνσης της ποιότητας ζωής (QoL) διαρθρωμένο σύμφωνα με τις 8 παραμέτρους του ερωτηματολογίου Hornheide και σε συνάρτηση με τις χρονικές στιγμές από την έναρξη ενός κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής διάρκειας 5 εβδομάδων, σε ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου.

Dimension	Items	Survey score		% Threshold for need for support mean / SEM				P=*
		Range	Threshold	Baseline	Week 2	Week 5	Week 9	
<i>Physical health</i>	4	0 -20	10	7.04 2.05	18.52 3.41	31.85 7.66	12.22 4.44	.000
<i>Mental (emotional) health</i>	3	0 -15	9	33.74 5,58	46.50 6,44	54.32 7,69	35.39 6,81	.003
<i>Cancer-related fear</i>	2	0 - 10	7	38.10 6.15	34.92 6.07	44.97 8.13	14.29 4.11	.000
<i>Tension and inner unrest</i>	4	0 - 20	9	48.97 8.58	48.15 8.72	55.97 8.08	46.50 9.03	.383
<i>Need for social support</i>	2	0 - 10	3	25.93 10.72	12.35 5.08	14.81 5.72	16.05 7.83	.876
<i>Self-uncertainty</i>	5	0 - 25	6	45.06 11.28	59.26 10.54	96.91 17.30	22.22 10.03	.000
<i>Need for medical support</i>	3	0 -15	3	24.69 10.00	9.88 4.64	3.70 2.05	1.23 1.23	.005
<i>Professional/ financial problems</i>	4	0 -20	5	12.59 5.14	12.59 3.56	16.30 5.34	11.11 3.75	.912
Total	27	0 - 135	41	38.21 5.64	42.91 5.81	57.36 7.89	29.27 6.13	.000

*p: p-value by Friedman's test

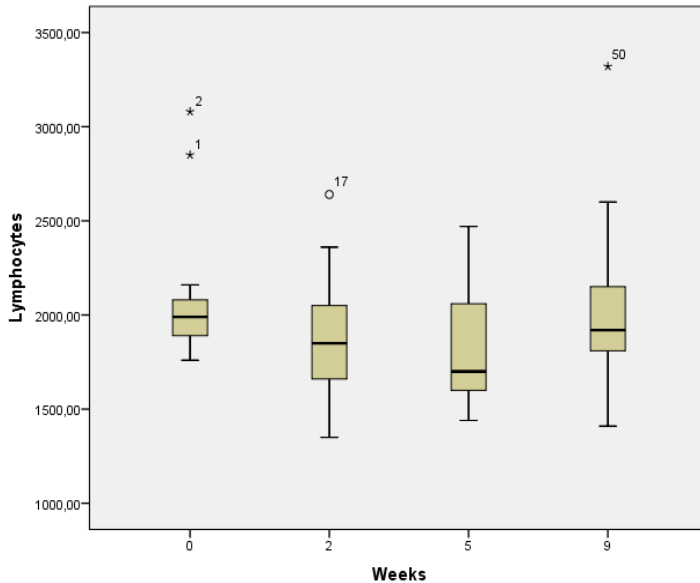
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής

Τα κυτταρογράμματα που δημιουργήθηκαν και αναλύθηκαν με το λογισμικό Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson) απέδωσαν τη συγκέντρωση του εκάστοτε υποπληθυσμού των λεμφοκυττάρων με τη μορφή ποσοστών επί τοις εκατό (%), επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια οι συγκεντρώσεις των υποπληθυσμών υπολογίστηκαν σε απόλυτους αριθμούς για να έχουμε μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις μας, αφού ήδη γνωρίζαμε τον συνολικό αριθμό των λεμφοκυττάρων (T και B) από τις γενικές εξετάσεις αίματος που στέλναμε κάθε φορά παράλληλα με την κυτταρομετρία ροής. Τα εν λόγω αριθμητικά αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με τη χρήση του Friedman test, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών στο δείγμα μας.

4.1.1 Μεταβολές του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων

Πραγματοποιήθηκε μη-παραμετρικός έλεγχος των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Εβδομάδα 0, 2, 5 και 9) με τη χρήση του Friedman test και υπολογίστηκε τιμή χ^2 (chi-square) ίση με 8,721 η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5% ο αριθμός των λεμφοκυττάρων μειώθηκε σημαντικά (από 2102/ μL σε 1888/ μL , $p < 0,05$). Η συνεδρία της κρυοχειρουργικής που πραγματοποιήθηκε τη 2^η εβδομάδα μείωσε ακόμα περισσότερο τον αριθμό των λεμφοκυττάρων: από 1888/ μL τη 2^η εβδομάδα σε 1842/ μL την 5^η εβδομάδα, χωρίς ωστόσο η μείωση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Κατά τον επανέλεγχο την 9^η εβδομάδα ο αριθμός των λεμφοκυττάρων σημείωσε αύξηση και επανήρθε στα αρχικά επίπεδα (2035/ μL), όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.1.



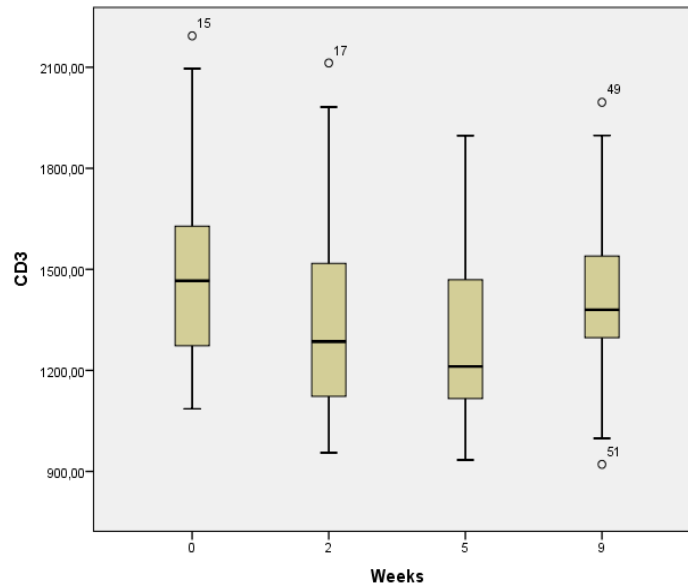
Σχήμα 4.1 Μεταβολή του αριθμού των λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας (το * παριστάνει μεμονωμένες, απομακρυσμένες τιμές) .

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική μειώνει τον αριθμό των λεμφοκυττάρων στο αίμα , κυρίως 2 εβδομάδες μετά την έναρξή της και πριν την εφαρμογή της κρυοπηξίας, ενώ 1 μήνα μετά τη διακοπή της θεραπείας ο αριθμός των λεμφοκυττάρων επανέρχεται στα αρχικά προ της θεραπείας επίπεδα.

4.1.2 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD3⁺ T -λεμφοκυττάρων

Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε με τη χρήση του Friedman test σε 8,775 η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5% παρατηρήθηκε μια μείωση του αριθμού των CD3 T κυττάρων η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (από 1500 κύτταρα/μλ σε 1367 κύτταρα/μλ, $p = 0,098$). Μετά την εφαρμογή της κρυοθεραπείας τη 2^η εβδομάδα ο πληθυσμός τους μειώθηκε ακόμα περισσότερο σε 1276 κύτταρα/μλ, και η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα πριν την έναρξη της θεραπείας ($p < 0,05$). Αν και παρατηρήθηκε

σημαντική αύξηση του αριθμού τους από την 5^η στην 9^η εβδομάδα ($p < 0,05$), ο πληθυσμός τους παρέμεινε μικρότερος απ' ό,τι πριν την έναρξη της θεραπείας ($p < 0,05$), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.2.



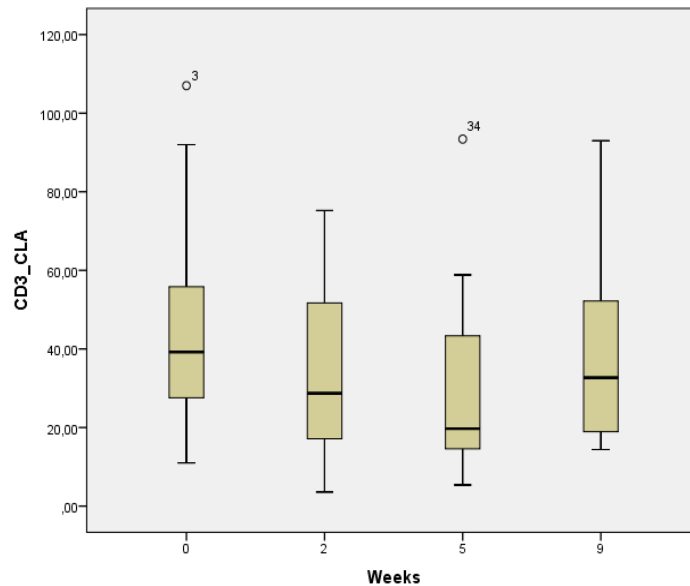
Σχήμα 4.2 Μεταβολή του αριθμού των CD3 T κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική προκαλεί μείωση του αριθμού των CD3 T λεμφοκυττάρων και φαίνεται πως η κρυστοχειρουργική που πραγματοποιείται κατά τη 2^η εβδομάδα της θεραπείας επιτείνει αυτή τη μείωση. Ο αριθμός των CD3 T λεμφοκυττάρων παραμένει μικρότερος σε σχέση με την προ θεραπείας τιμή τους ακόμη και μετά την πάροδο 1 μήνα από την ολοκλήρωση της ανοσοκρυστοχειρουργικής.

4.1.3 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD3 T -λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA

Αν και παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση του αριθμού των CD3⁺ T κυττάρων που εκφράζουν το CLA την 5^η εβδομάδα ($p = 0,049$), η τιμή χ^2 (chi-square) που υπολογίστηκε

με τη χρήση του Friedman test ήταν 3,225, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,358$). Τόσο την 2^η όσο και την 9^η εβδομάδα ο πληθυσμός των CD3⁺ T κυττάρων που εκφράζουν το CLA δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (σχήμα 4.3)



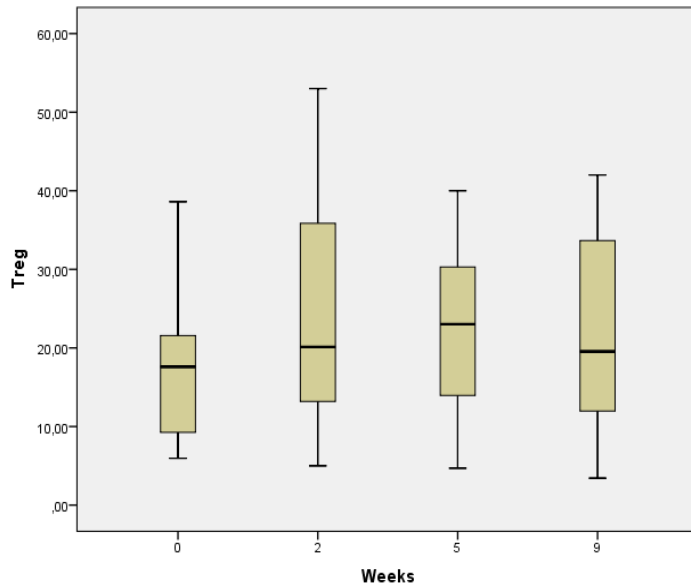
Σχήμα 4.3 Μεταβολή του αριθμού των CD3 T κυττάρων που εκφράζουν το CLA κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Η ανοσοκρυστοχειρουργική φαίνεται να προκαλεί κάποια μείωση του αριθμού των CD3⁺ CLA T-λεμφοκυττάρων στο τέλος της 5^{ης} εβδομάδας χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ ο αριθμός τους 1 μήνα μετά τη διακοπή της ανοσοκρυστοχειρουργικής κυμαίνεται στα προ της θεραπείας επίπεδα.

4.1.4 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4⁺CD25^{high} T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg)

Ο αριθμός των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) δε μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της θεραπείας αλλά ούτε και στον επανέλεγχο, ένα μήνα μετά το τέλος της

θεραπείας. Η τιμή χ^2 (chi-square) ήταν ίση με 5,775 και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,123$). Δεν καταγράφηκαν διαφορές του πληθυσμού των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) μεταξύ των χρονικών σημείων των μετρήσεων (σχήμα 4.4).



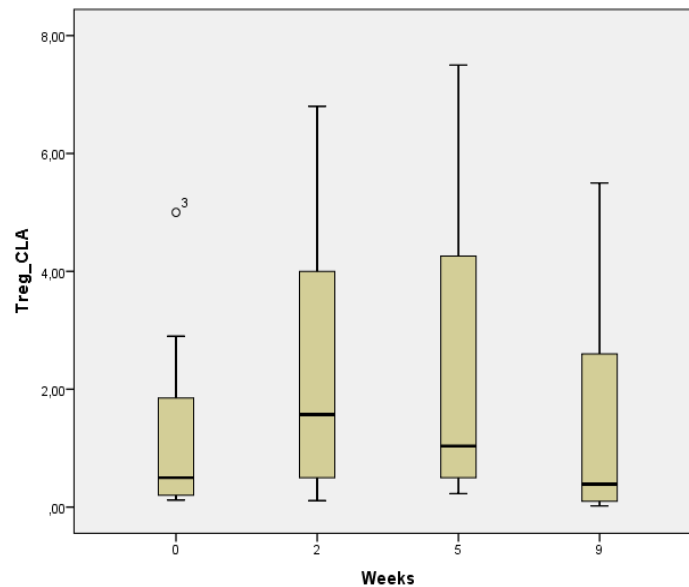
Σχήμα 4.4 Μεταβολή του αριθμού των T ρυθμιστικών κυττάρων (T reg) κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να μεταβάλλει τον αριθμό των T ρυθμιστικών (Treg).

4.1.5 Μεταβολές του υποπληθυσμού των T ρυθμιστικών κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (TregCLA)

Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5%, ο πληθυσμός των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) που εκφράζουν το CLA αυξήθηκε και η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (από 1,410 κύτταρα/μλ σε 3,290 κύτταρα/μλ, $p<0,05$). Ωστόσο ο αριθμός τους επιστρέφει στα αρχικά επίπεδα την 5^η εβδομάδα, μετά τη συνεδρία της

κρυοχειρουργικής (σχήμα 4.5). Η τιμή χ^2 (chi-square) ήταν ίση με 5,100 και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,165$).

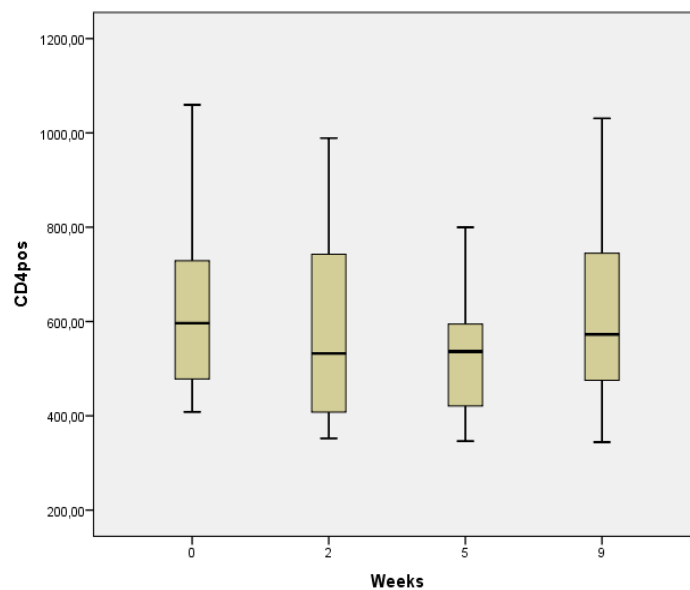


Σχήμα 4.5 Μεταβολή του αριθμού των T ρυθμιστικών κυττάρων (T reg) που εκφράζουν το CLA κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυοχειρουργική προκαλεί αύξηση του αριθμού των TregCLA στις 2 εβδομάδες εφαρμογής της ιμικουιμόδης 5% (πριν την εφαρμογή κρυοχειρουργικής) ενώ ο αριθμός τους επανέρχεται στα αρχικά προ θεραπείας επίπεδα, στο τέλος της θεραπείας (5^η εβδομάδα).

4.1.6 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων

Ο πληθυσμός των CD4⁺ T κυττάρων μειώθηκε σημαντικά μετά την εφαρμογή της κρέμας ιμικουιμόδης 5% ($p<0,05$). Ωστόσο την 5^η και 9^η εβδομάδα ο αριθμός τους δε διέφερε από τα αρχικά επίπεδα πριν την έναρξη της θεραπείας (σχήμα 4.6). Η τιμή χ^2 (chi-square) ήταν ίση με 5,925 και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,115$).

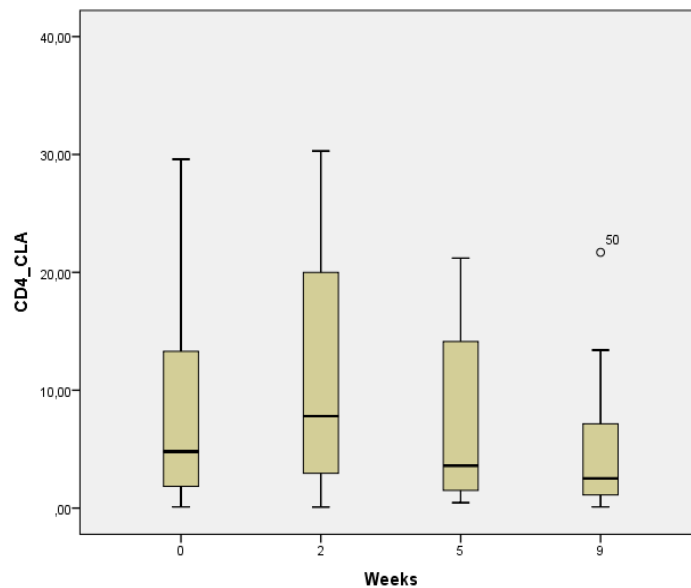


Σχήμα 4.6 Μεταβολή του αριθμού των CD4⁺ T κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυσταλλική οδηγεί σε μείωση του αριθμού των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας εφαρμογής της ιμικουιμόδης, ο οποίος επιστρέφει σύντομα στα αρχικά επίπεδα, την 5^η εβδομάδα και παραμένει σταθερός 1 μήνα μετά τη διακοπή της θεραπείας (9^η εβδομάδα).

4.1.7 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (CD4⁺CLA)

Η ανάλυση με το Friedman test έδειξε ότι η θεραπεία δεν επηρεάζει τον αριθμό των CD4 T κυττάρων που εκφράζουν το CLA ($\chi^2 = 1,500$, $p > 0,05$). Μεταξύ των μετρήσεων δε παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (σχήμα 4.7).



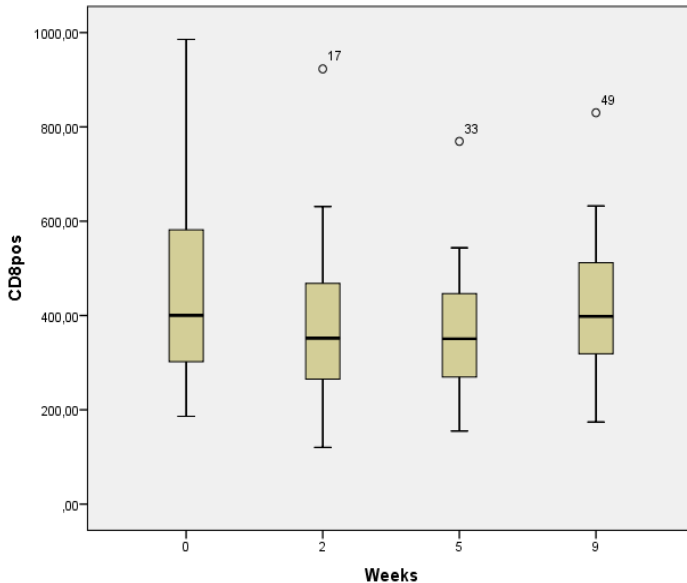
Σχήμα 4.7 Μεταβολή του αριθμού των CD4 T κυττάρων που εκφράζουν το CLA κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να μεταβάλλει τον αριθμό των CD4⁺CLA λεμφοκυττάρων.

4.1.8 Μεταβολές του υποπληθυσμού των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων

Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε με τη χρήση του Friedman test σε 9,375, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Η εφαρμογή της ανοσοκρυστοθεραπείας οδήγησε σε σημαντική μείωση του πληθυσμού των CD8⁺ T κυττάρων ήδη από τη 2^η εβδομάδα (από 461 σε 395 κύτταρα/μl), ενώ ο αριθμός τους παρέμεινε μειωμένος ως και την 5^η εβδομάδα

(από 461 σε 377 κύτταρα/μl). Ο πληθυσμός τους επανήρθε στα αρχικά επίπεδα (επίπεδα πριν την έναρξη της θεραπείας) την 9^η εβδομάδα (420 κύτταρα/μl), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.8.



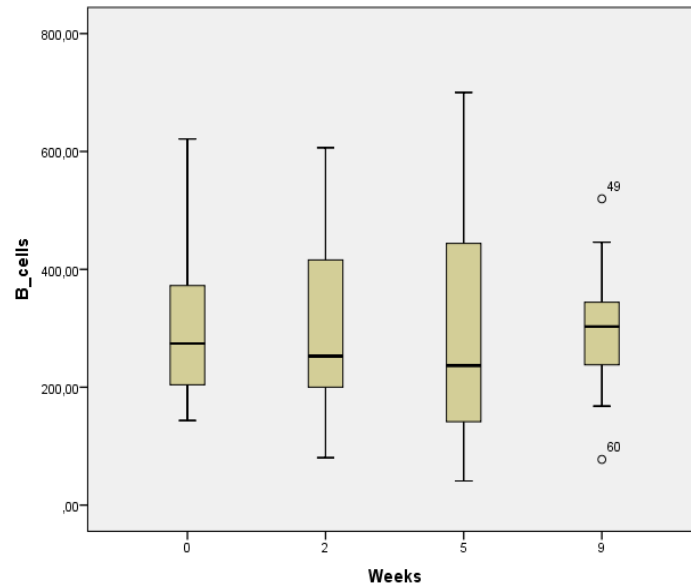
Σχήμα 4.8 Μεταβολή του αριθμού των CD8⁺ T κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική μεταβάλλει τον αριθμό των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων, δηλαδή προκαλεί μείωσή τους στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας της θεραπείας και επάνοδό τους στα αρχικά επίπεδα στην παρακολούθηση (follow up) του 1 μήνα μετά τη διακοπή της θεραπείας.

4.1.9 Μεταβολές του πληθυσμού των B-λεμφοκυττάρων

Ο πληθυσμός των B λεμφοκυττάρων μειώθηκε σταδιακά φτάνοντας εντός των ορίων στατιστικής σημαντικότητας την 5^η εβδομάδα. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος μειώθηκε από 328 κύτταρα/μl σε 304 κύτταρα/μl τη 2^η εβδομάδα μετά την εφαρμογή της κρέμας ιμικουιμόδης 5% και σε 278 κύτταρα/μl την 5^η εβδομάδα μετά τη συνεδρία κρυστοχειρουργικής. Ο αριθμός των B λεμφοκυττάρων αυξήθηκε (στατιστικά σημαντική

αύξηση, $p < 0,05$) στη συνέχεια και επανήρθε στα αρχικά επίπεδα πριν την έναρξη της θεραπείας (312 κύτταρα/μl). Η τιμή χ^2 υπολογίστηκε με τη χρήση του Friedman test σε 6,150 η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,105$), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.9.

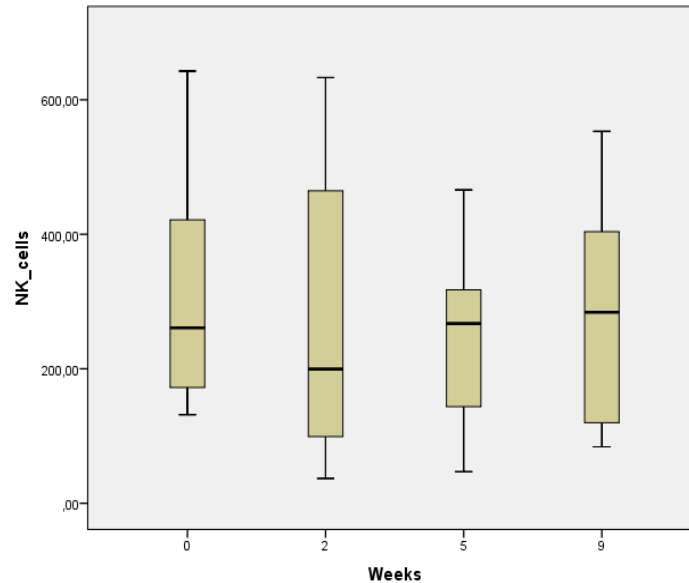


Σχήμα 4.9. Μεταβολή του αριθμού των Β λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική μειώνει σταδιακά τον αριθμό των Β-λεμφοκυττάρων μέχρι το τέλος της θεραπείας (5^η εβδομάδα) και ο αριθμός τους επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα σε 1 μήνα από τη διακοπή της θεραπείας.

4.1.10. Μεταβολές του πληθυσμού των NK κυττάρων (κύτταρα φυσικοί φονείς)

Η τιμή χ^2 (chi-square) ήταν ίση με 5,475 και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,14$). Ο αριθμός των NK κυττάρων δε μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της θεραπείας αλλά ούτε και στον επανέλεγχο, ένα μήνα μετά το τέλος της θεραπείας. Αν και παρατηρήθηκε μια μείωση του αριθμού τη 2^η εβδομάδα η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (σχήμα 4.10).

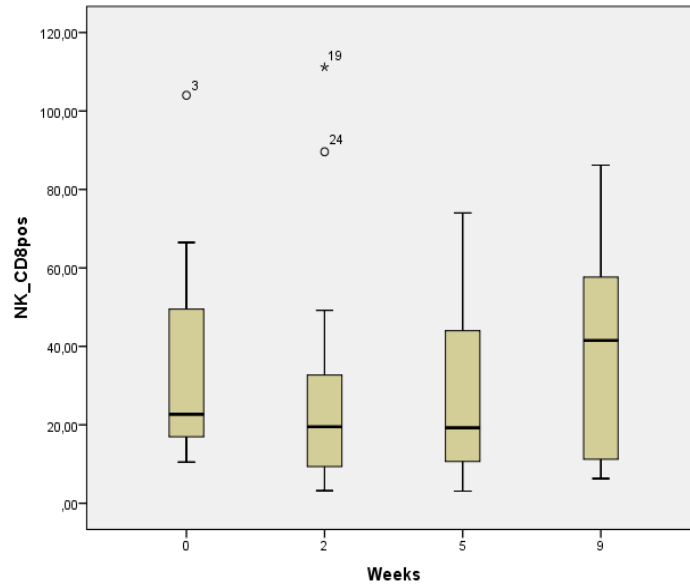


Σχήμα 4.10 Μεταβολή του αριθμού των κυττάρων φυσικών φονέων (NKCs) κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

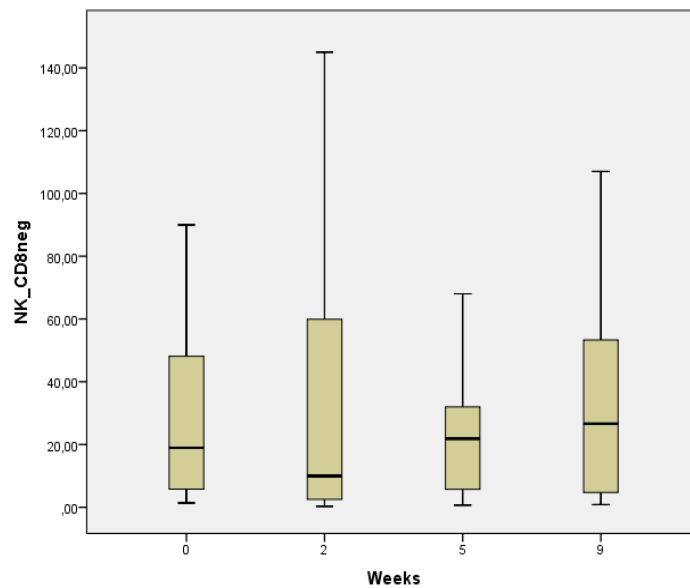
Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να μεταβάλλει τον αριθμό των NK κυττάρων.

4.1.11 Μεταβολές του υποπληθυσμού των NK κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CD8 (CD8⁺) και του υποπληθυσμού των NK που είναι αρνητικά για το αντιγόνο CD8 (CD8⁻)

Τα NK κύτταρα αναλύθηκαν περαιτέρω σε CD8⁺ και CD8⁻. Ο πληθυσμός των CD8⁺ και CD8⁻ T κυττάρων δε μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια εφαρμογής του πρωτοκόλλου. Η τιμή χ^2 (chi-square) των CD8⁺ και CD8⁻ T κυττάρων ήταν ίση με 3,750 ($p=0,290$) και 2,698 ($p=0,441$) αντίστοιχα (σχήματα 4.11 και 4.12).



Σχήμα 4.11 Μεταβολή του αριθμού των κυττάρων φυσικών φονέων CD8⁺ κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.



Σχήμα 4.12 Μεταβολή του αριθμού των κυττάρων φυσικών φονέων CD8⁻ κατά τη διάρκεια της θεραπείας (0-5 εβδομάδες) καθώς και μετά από ένα μήνα (9^η εβδομάδα) από το τέλος της θεραπείας.

Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να μεταβάλλει ούτε τον αριθμό των υποομάδων των NK κυττάρων.

4.1.12 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των CD4⁺CLA προς τον ολικό αριθμό των CD4⁺

Η εφαρμογή για 2 εβδομάδες της κρέμας ιμικουιμόδης 5% οδήγησε σε σημαντική αύξηση της αναλογίας των CD4CLA:CD4 (από 0,031 σε 0,066; $p < 0,05$). Μετά τη συνεδρία της κρυστοχειρουργικής, που πραγματοποιήθηκε τη 2^η εβδομάδα, η αναλογία μειώθηκε από 0,066 σε 0,025 την 5^η εβδομάδα ($p < 0,05$) ενώ κατά τον επανέλεγχο την 9^η εβδομάδα παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση χωρίς ωστόσο αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (από 0,035 σε 0,034). Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε σε 1,029 η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

Επομένως παρατηρήθηκε αύξηση των CD4⁺CLA κυττάρων σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των CD4⁺ κυττάρων στις 2 εβδομάδες θεραπείας.

4.1.13 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των TregCLA προς τον ολικό αριθμό των Treg

Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων εφαρμογής κρέμας ιμικουιμόδης 5%, η αναλογία TregCLA:Treg αυξήθηκε και η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (από 0,07 σε 0,14, $p < 0,05$). Την 5^η εβδομάδα μετά τη συνεδρία της κρυστοχειρουργικής επανήλθαν στα αρχικά επίπεδα (0,076) και παρέμειναν ως και την 9^η εβδομάδα (0,06). Η τιμή χ^2 (chi-square) ήταν ίση με 7,425 και ήταν δεν στατιστικά σημαντική ($p = 0,060$).

Όπως και στην περίπτωση της αναλογίας CD4⁺CLA/CD4⁺, έτσι και εδώ παρατηρήθηκε αύξηση των TregCLA σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό των Treg στις 2 εβδομάδες θεραπείας.

4.1.14 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των TregCLA προς τον αριθμό των CD4⁺CLA

Καταγράφηκε μια σταδιακή αύξηση της αναλογίας TregCLA:CD4⁺CLA η οποία έφθασε στη μέγιστη τιμή της (0,29) την 5^η εβδομάδα, στο τέλος συνεπώς της θεραπείας. Τέσσερις εβδομάδες μετά (9^η Εβδομάδα) η αναλογία TregCLA:CD4⁺CLA στη χαμηλότερη τιμή (0,21) παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε σε 8,143 η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώθηκαν μεταξύ της 2^{ης} και 5^{ης} εβδομάδας καθώς και μεταξύ της 5^{ης} και 9^{ης} εβδομάδας.

Επομένως ο αριθμός των TregCLA σε σχέση με τον ολικό αριθμό των CD4⁺ κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA αυξανόταν σε όλη τη διάρκεια των 5 εβδομάδων θεραπείας, φτάνοντας στη μέγιστη τιμή του στο τέλος της θεραπείας.

4.1.15 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NKCD8⁺ προς τον ολικό αριθμό των NK κυττάρων

Η αναλογία NKCD8⁺:NK παρέμενε σταθερή κατά τις 5 εβδομάδες της θεραπείας (με τιμές από 0,10 έως 0,11) ωστόσο κατά το follow up την 9^η εβδομάδα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της (0,13, $p < 0,05$).

4.1.16 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NKCD8⁻ προς τον ολικό αριθμό των NK κυττάρων

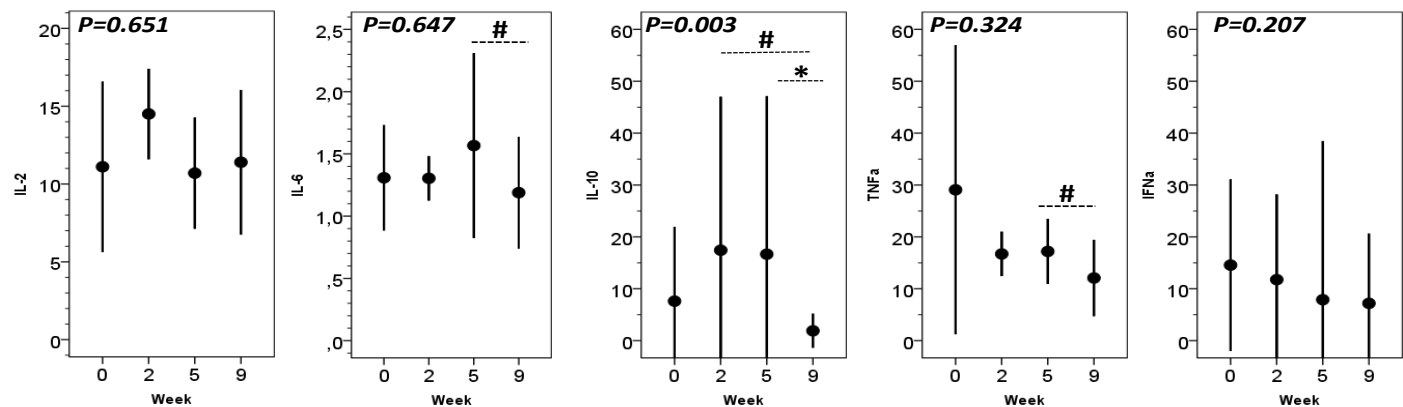
Όπως και με την αναλογία των NKCD8⁺:NK, η αναλογία των NKCD8⁻:NK παρέμενε σταθερή κατά τις 5 εβδομάδες της θεραπείας (με τιμές από 0,08 έως 0,12) όμως κατά την 9^η εβδομάδα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (0,72, $p < 0,05$). Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε με τη χρήση του Friedman test και ήταν ίση με 21,923 ($p < 0,05$).

4.1.17 Μεταβολή της αναλογίας του αριθμού των NKCD8⁻ προς τον αριθμό των NKCD8⁺ κυττάρων

Η τιμή χ^2 (chi-square) υπολογίστηκε με τη χρήση του Friedman test σε 23,031 η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Κατά τη διάρκεια της θεραπείας η αναλογία παρέμεινε σταθερή (από 1,18 την Εβδομάδα 0 σε 1,03 την 5^η Εβδομάδα) χωρίς να σημειωθεί στατιστικά σημαντικά μεταβολή. Ωστόσο, την 9^η εβδομάδα καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$), με την αναλογία NKCD8⁻:NKCD8⁺ να είναι ίση με 5,9, σχεδόν 5 φορές υψηλότερη από την μέση τιμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

4.2 Αποτελέσματα ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Λόγω των σημαντικών ανά ασθενή παραλλαγών στις εξεταζόμενες μεταβλητές και του σχετικά μικρού αριθμού των εξεταζόμενων δειγμάτων υιοθετήθηκε μια ομοιόμορφη ερμηνεία των αποτελεσμάτων με τη χρήση του Friedman test για τέσσερις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (εβδομάδες 0, 2, 5 και 9 μετά την έναρξη της θεραπείας) και του Wilcoxon signed-rank test με σύγκριση ανά ζεύγη. Δηλαδή στην περίπτωση του Wilcoxon signed-rank test για κάθε μεταβλητή γινόταν σύγκριση της κάθε μιας από τις 4 μετρήσεις (στα χρονικά διαστήματα που προαναφέρθηκαν) με τις υπόλοιπες τρεις, ορίστηκε $p < 0,008$ για τις στατιστικά σημαντικές μεταβολές και $p < 0,05$ για την ανάδειξη μιας στατιστικά μη σημαντικής «τάσης» (Σχήμα 4.13)



Σχήμα 4.13 Μεταβολή των κυτταροκινών IL-2 (pg/ml), IL-6 (ng/ml), IL-10 (ng/ml), TNFα και INFα (pg/ml) κατά την εβδομάδα 0 (έναρξη θεραπείας), εβδομάδα 2 (συνεδρία κρυοχειρουργικής), εβδομάδα 5 (τέλος θεραπείας) και εβδομάδα 9 (παρακολούθηση 1 μήνα από το τέλος της θεραπείας) (0-5 εβδομάδες).

4.2.1 Μεταβολές της IL-10

Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές της IL-10, ενώ αυξήθηκαν από τη 14^η έως την 35^η μέρα της θεραπείας (τέλος της θεραπείας), παρουσίασαν πτώση και επιστροφή στα αρχικά προθεραπείας επίπεδα την 9^η εβδομάδα, δηλαδή 1 μήνα μετά το τέλος της ανοσοκρυστοχειρουργικής .

4.2.2 Μεταβολές της INF-a

Οι τιμές της INF-a παρουσίασαν μια συνεχόμενη πτώση σε όλη τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής, χωρίς να επιστρέψουν στα αρχικά προθεραπευτικά επίπεδα στο τέλος της θεραπείας.

4.2.3 Μεταβολές του TNF-a

Σε αντιστοιχία με την INF-a, οι τιμές του TNF-a εμφάνισαν συνεχόμενη μείωση σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας, η οποία διατηρήθηκε μέχρι το τέλος της.

4.2.4 Μεταβολές των IL-2 και IL-6

Οι τιμές της IL-2 και της IL-6 κυμάνθηκαν στα προθεραπείας επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής καθώς και στο follow-up του ενός μήνα.

4.3 Αποτελέσματα ερωτηματολογίων ποιότητας ζωής

Η στατιστική ανάλυση των ερωτηματολογίων Hornheide που συμπλήρωσαν 30 ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα έγινε με ανάλυση διπλής διακύμανσης Friedman και το Wilcoxon-signed rank test. Στην ανάλυση των 8 παραμέτρων του ερωτηματολογίου Hornheide συνυπολογίστηκαν και προγνωστικοί δημογραφικοί και σχετιζόμενοι με τον όγκο παράγοντες κατά την έναρξη της θεραπείας, όπως: ηλικία (≥ 75 ετών έναντι <75 ετών), φύλο (άνδρες έναντι γυναικών), αριθμός όγκων κατά την κλινική εξέταση (1 έναντι πολλαπλών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων) και μέγιστη διάμετρος του μεγαλύτερου όγκου ανά ασθενή ($>15\text{mm}$ έναντι $\leq 15\text{mm}$) (πίνακας 4).

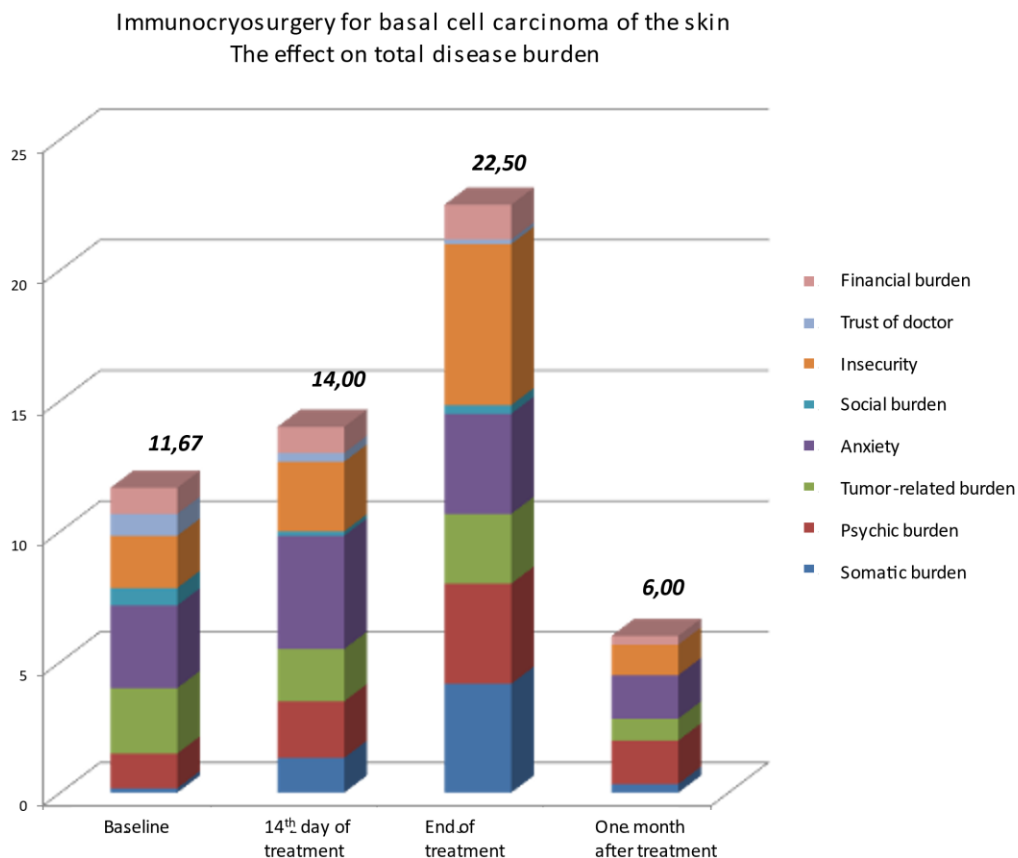
Πίνακας 4. Δημογραφικοί και σχετιζόμενοι με τον όγκο προγνωστικοί παράγοντες της επιβάρυνσης της ποιότητας ζωής στο ερωτηματολόγιο κατά την έναρξη της θεραπείας. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε τιμές p του Mann-Whitney test ($p < 0,05$).

HQ dimension	Sex	Age ≥ 75	Tumor size $>15\text{mm}$	>1 tumors	Relapse ^a
Physical health	.702*	.880	.837	.594	.842
Mental health	.134	.930	.425	.683	.907
Cancer fear	.554	.346	.600	.514	.075
Tension and inner unrest	.136	.878	.384	.749	.862
Lack of social support	.573	.853	.084	1.000	.000
Self-uncertainty	.525	.561	.347	.859	.081
Lack of medical support	.428	.081	.023	.420	.005
Financial affairs	.595	.002	.610	.878	.939
Total distress	.363	.844	.146	.931	.093

^aRelapse from previous surgery at baseline

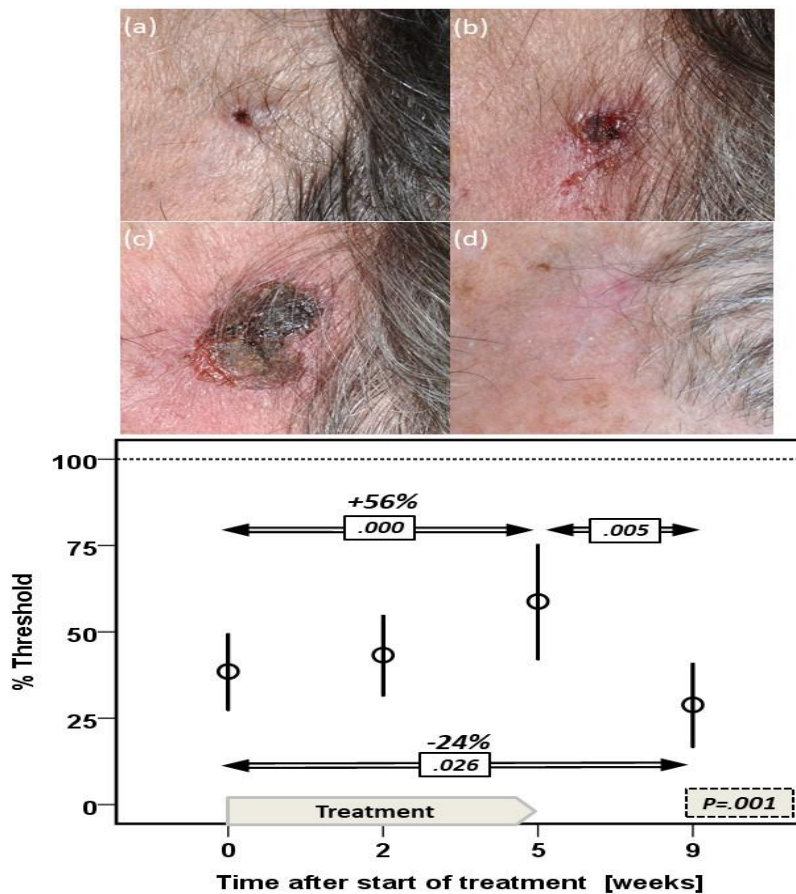
Το φύλο, η ηλικία των ασθενών και ο αριθμός των ταυτόχρονων όγκων δε φαίνεται να σχετίζονται με τη δυσφορία των ασθενών κατά την έναρξη της θεραπείας. Αντιθέτως οι ασθενείς με μεγαλύτερα νεοπλάσματα ($p=0,023$) εμφανίζουν αυξημένη ανάγκη για ιατρική υποστήριξη και οι ασθενείς με υποτροπιάζοντες μετά από χειρουργική εξαίρεση όγκους αυξημένη ανάγκη τόσο για ιατρική υποστήριξη ($p=0,005$) όσο και για κοινωνική υποστήριξη ($p< 0,001$) ήδη κατά την έναρξη της θεραπείας. Όσον αφορά την ηλικία, οι νεότεροι ασθενείς (<75 ετών) εμφανίζουν μεγαλύτερη ανησυχία σχετικά με τις οικονομικές παραμέτρους της θεραπείας σε σχέση με τους μεγαλύτερους ασθενείς (≥ 75 ετών).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των ερωτηματολογίων αποδίδονται εν συντομία στο Σχήμα 4.14.



Σχήμα 4.14 Επίδραση της ανοσοκρυοχειρουργικής στη συνολική επιβάρυνση της νόσου

Γενικά η βαθμολογία της συνολικής επιβάρυνσης φαίνεται να φτάνει στην ανώτερη τιμή της κατά τη διάρκεια των 5 εβδομάδων (τέλος της θεραπείας) ενώ 4 εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας μειώνεται σημαντικά, εμφανίζοντας τιμή σχεδόν ίση με το ήμισυ της προθεραπευτικής τιμής της ($p=0,026$, φωτογραφία 3).



Φωτογραφία 3. Συσχέτιση των σταδίων της ανοσοκρυσταλλοχειρουργικής με την συνολική επιβάρυνση-δυσφορία των ασθενών

Πιο αναλυτικά:

Ξεκινώντας με τη σωματική κόπωση (somatic burden) των ασθενών κατά τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής, φαίνεται ότι αυτή είναι πιο έντονη κατά τη 2^η και 5^η εβδομάδα της θεραπείας, δηλαδή σε διαστήματα που η τοπική φλεγμονή που έχει δημιουργηθεί στην περιοχή του όγκου είναι επίσης έντονη. Στην παρακολούθηση του ενός μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας η κόπωση υποχωρεί.

Η ψυχολογική επιβάρυνση (psychic burden) των ασθενών αυξάνεται στο διάστημα των 2 και των 5 εβδομάδων της θεραπείας, παράλληλα με τη σωματική κόπωση, και επανέρχεται σχεδόν στα αρχικά προθεραπευτικά επίπεδα στις 4 εβδομάδες μετά το τέλος της ανοσοκρυστοχειρουργικής.

Η επιβάρυνση-ανησυχία που προκαλεί η ύπαρξη του όγκου (tumor-related burden) δε φαίνεται να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής, ωστόσο εμφανίζεται μικρότερη ένα μήνα μετά το τέλος της θεραπείας, όπου και είναι έκδηλη πλέον η ίασή του.

Η γενικότερη ανησυχία (anxiety) των ασθενών κατά τη διάρκεια της θεραπείας διατηρείται σχεδόν σταθερή, παρουσιάζοντας μια μικρή αύξηση τη 2^η εβδομάδα. Στην παρακολούθηση όμως του ενός μήνα μετά την ολοκλήρωσή της, η ανησυχία των ασθενών μειώνεται σημαντικά, σε επίπεδα αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με την αρχική προ θεραπείας τιμή.

Η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να επηρεάζει την κοινωνική συμπεριφορά των ασθενών (social burden).

Η ανασφάλεια (insecurity) παρουσιάζει αύξηση με την πρόοδο της θεραπείας, κατά την 2^η και 5^η εβδομάδα, ενώ 1 μήνα μετά τη διακοπή της έχει μειωθεί, προσεγγίζοντας τα αρχικά προθεραπευτικά επίπεδα (ελαφρώς μικρότερη όμως).

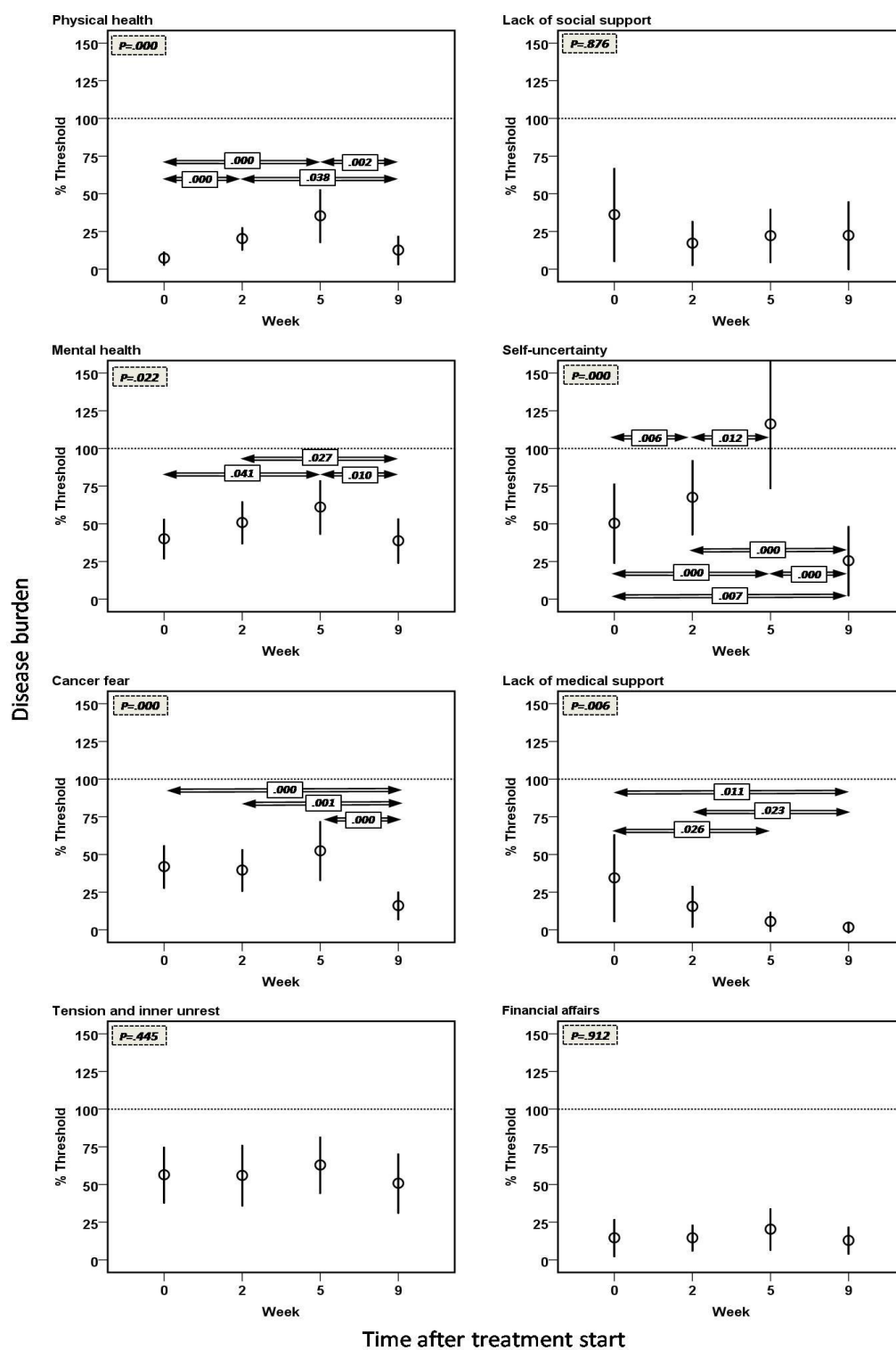
Η έλλειψη εμπιστοσύνης στους θεράποντες ιατρούς (lack of trust of doctors) φαίνεται να αυξάνεται στο μέσο και το τέλος της θεραπείας, την 2^η και 5^η εβδομάδα, που αντιστοιχούν και στο μέγιστο βαθμό φλεγμονής του δέρματος από την ανοσοκρυστοχειρουργική. Ωστόσο

ένα μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας παρατηρείται εξάλειψη της έλλειψης εμπιστοσύνης στους ιατρούς.

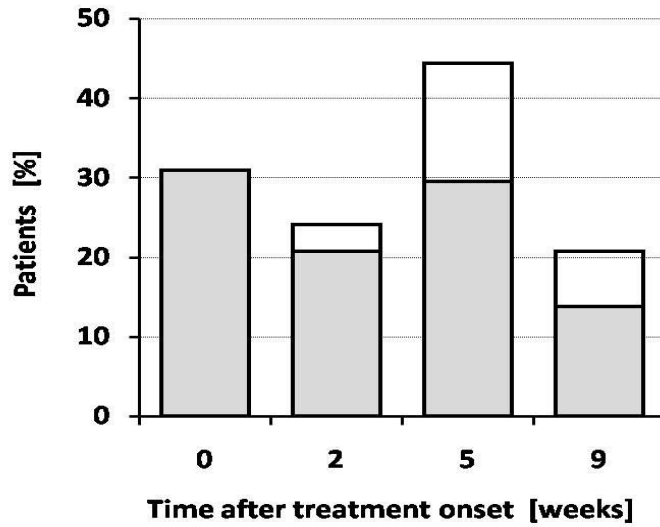
Τέλος η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να προκαλεί οικονομική επιβάρυνση (financial burden) στους ασθενείς. Μάλιστα στο follow-up του ενός μήνα την αξιολογούν χαμηλότερα σε σχέση με την έναρξη της θεραπείας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγάλη αύξηση της συνολικής επιβάρυνσης που παρατηρείται κατά την 5^η εβδομάδα θεραπείας σε σχέση με τις προθεραπευτικές μετρήσεις οφείλεται κυρίως στην επιδείνωση των παραμέτρων «σωματική κόπωση» ($p < 0,001$) και «ανασφάλεια» ($p < 0,001$). Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η σχετιζόμενη με τον όγκο ανησυχία δε μεταβλήθηκε καθόλου κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μάλιστα εμφάνισε εντυπωσιακή βελτίωση στο τέλος της θεραπείας (εβδομάδα 5). Η σχετιζόμενη με τον όγκο ανησυχία, η σωματική κόπωση και η ανασφάλεια ήταν οι παράμετροι που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη βελτίωση μετά το τέλος της θεραπείας (Σχήμα 4.15). Επίσης η εμπιστοσύνη στις παρεχόμενες ιατρικές υπηρεσίες βελτιώθηκε σημαντικά σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας (Σχήμα 4.15).

Το ερωτηματολόγιο Hornheide επιτρέπει την αναγνώριση των ασθενών που χρειάζονται ψυχολογική υποστήριξη. Στη μελέτη μας το ποσοστό των ασθενών που χρειάζονται υποστήριξη δεν έμεινε σταθερό σε όλη την διάρκεια των παρατηρήσεών μας: κατά την έναρξη της θεραπείας το 33% των ασθενών έχρηζαν υποστήριξης, στο τέλος της θεραπείας (5^η εβδομάδα) το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σε 44%, για να επιστρέψει στην τιμή του 22% ένα μήνα μετά τη διακοπή της ανοσοκρυστοχειρουργικής (9^η εβδομάδα) (σχήμα 4.16). Παρά την αύξηση της δυσφορίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η οποία επηρεάζει αναπόφευκτα σε κάποιο βαθμό όλους τους ασθενείς, η ανάγκη για υποστήριξη είναι τελικά εξατομικευμένη υπόθεση, καθώς φαίνεται να διαγιγνώσκεται κατά προτίμηση σε μια υπο-ομάδα μάλλον προδιατεθειμένων ασθενών. Συγκεκριμένα οι ασθενείς που εμφανίζουν αυξημένη ανάγκη για υποστήριξη κατά την έναρξη της θεραπείας είναι εκείνοι που έχουν προδιάθεση για ανάγκη υποστήριξης κατά την 5^η εβδομάδα της ανοσοκρυστοχειρουργικής, που αντιστοιχεί και στην κορύφωση της δυσφορίας (πίνακας 5).



Σχήμα 4.15 Μεταβολή των 8 ψυχοκοινωνικών παραμέτρων του ερωτηματολογίου στα στάδια θεραπείας



Σχήμα 4.16. Ποσοστό ασθενών που χρειάζονται υποστήριξη κατά τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής.

Πίνακας 5. Προγνωστικοί παράγοντες για «ανάγκη υποστήριξης» κατά την κορύφωση της δυσφορίας στο τέλος ενός κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής για βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος στην περιοχή του προσώπου-τραχήλου. Σημειώστε ότι η «ανάγκη υποστήριξης» την 5^η εβδομάδα συσχετίζεται με το θήλυ φύλο και την «ανάγκη υποστήριξης κατά την έναρξη της θεραπείας» (Logistic regression).

Factor	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
			Lower	Upper
Sex (female vs. male)	.045	29.506	1.839	473.480
Support Need ^a	.018	48.483	3.261	720.772
Relapse ^b	.584	2.747	.132	57.230
Age ^c	.543	.432	.044	4.192
Tumor size ^d	.781	1.500	.137	16.455

^a 'need for support' at baseline

^b tumor relapse after surgery

^c patients <75 vs. ≥75 years age

^d tumors <15 vs. ≥15 cm

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί τον πιο συνήθη καρκίνο του δέρματος αλλά και γενικότερα του ανθρώπου. Παρόλο που ο συγκεκριμένος όγκος εξαιρετικά σπάνια εμφανίζει μεταστάσεις, η τοπική διήθηση και καταστροφή των υποκείμενων ιστών που προκαλεί, είναι σε αρκετές περιπτώσεις αρκετά σημαντική δημιουργώντας συχνά δυσμορφίες και λειτουργικά προβλήματα, ιδιαίτερα όταν εντοπίζεται στην περιοχή της κεφαλής, η οποία είναι και η συχνότερη θέση εμφάνισής του.

Η θεραπεία εκλογής μέχρι τώρα είναι η χειρουργική εξαίρεση και ιδανικά η εξαίρεση κατά Mohs. Η χειρουργική κατά Mohs όμως διενεργείται σε εξειδικευμένα κέντρα και επομένως δεν είναι προσιτή σε όλους. Επιπλέον έχει τους ίδιους περιορισμούς με όλες τις χειρουργικές τεχνικές, δηλαδή είναι σε αρκετές περιπτώσεις ακρωτηριαστική, καθώς οι όγκοι συχνά είναι αρκετά εκτεταμένοι σε επιφάνεια και βάθος και εντοπίζονται συνηθέστερα στο πρόσωπο και σε δύσκολα ανατομικά σημεία (π.χ. μύτη, βλέφαρα, αυτί). Επίσης οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν περισσότερα του ενός βασικοκυτταρικά καρκινώματα και οι πρωτοπαθείς όγκοι ενδέχεται να υποτροπιάσουν απαιτώντας νέα εκτομή. Οι συνεχείς όμως εκτομές οδηγούν σε δυσμορφίες και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις σε λειτουργική απώλεια διαφόρων περιοχών του σώματος με όλες τις ψυχολογικές επιπτώσεις που αυτό συνεπάγεται. Επομένως κρίνεται αναγκαία η χρήση μιας θεραπείας που να είναι μη επεμβατική, μη ακρωτηριαστική, να μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές και να μην επιφέρει ιδιαίτερη ψυχολογική και οικονομική επιβάρυνση στους ασθενείς.

Η ανοσοκρυοχειρουργική, δηλαδή ο συνδυασμός της κρυοχειρουργικής με τη συνεχόμενη για 5 εβδομάδες εφαρμογή τοπικής ιμικουιμόδης 5%, είναι μια θεραπεία που εφαρμόζεται στο ιατρείο των όγκων της Δερματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από το 2006 , με μεγάλη επιτυχία και σε ικανό αριθμό ασθενών.

Λόγω του εξαιρετικού αποτελέσματος , θεραπευτικού και αισθητικού, της μεθόδου κρίθηκε σκόπιμο να μελετήσουμε την τυχόν συστηματική δράση της θεραπείας μέσω της επίδρασής της στους πληθυσμούς και υποπληθυσμούς των κυκλοφορούντων στο αίμα λεμφοκυττάρων καθώς και των επιπέδων κυταροκινών. Επιλέξαμε να μελετήσουμε τις μεταβολές στις κατηγορίες των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένων κυταροκινών με τις μεθόδους της κυταρομετρίας ροής και της ELISA αντίστοιχα. Επίσης θέλαμε να

επικεντρωθούμε στους υποπληθυσμούς των CD4CD25^{high} (Treg) και συγκεκριμένα να εντοπίσουμε εκείνα τα Treg αλλά και CD4 λεμφοκύτταρα που εκφράζουν επιδερμοτροπισμό. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CLA (Cutaneous Lymphocyte associated Antigen) στα εν λόγω λεμφοκύτταρα, ένα αντιγόνο που εκφράζεται από λεμφοκύτταρα που «στρατολογούνται» στο δέρμα.

Το ανοσολογικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει και να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα, όχι όμως πλήρως, καθώς τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναπτύξουν μηχανισμούς που παρακάμπτουν την ανοσολογική αντίδραση. Υπάρχει δηλαδή μία δυναμική κατάσταση όπου οι ανοσοδιεγερτικές και οι ανοσοκατασταλτικές δυνάμεις συνυπάρχουν και ανταγωνίζονται η μία την άλλη. Το τελικό αποτέλεσμα της ισορροπίας ανάμεσα στην αντικαρκινική αντίδραση του ανοσολογικού συστήματος και τις «τακτικές» επιβίωσης του όγκου θα οδηγήσει είτε στην εξάλειψη- υποχώρηση του όγκου ή στην ανάπτυξή του. Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, όπως προαναφέρθηκε, αναπτύσσεται σε ένα μικροπεριβάλλον όπου επικρατεί η Th2 ανοσολογική απόκριση με προεξάρχουσα κυτταροκίνη την IL-10 και την παρουσία T-ρυθμιστικών κυττάρων, τα οποία φαίνεται να προάγουν την ανοσοανοχή και να παρεμποδίζουν την ανοσολογική απάντηση ενάντια στον όγκο ¹²⁹. Σε πιο πρόσφατη μελέτη των S. H. Omland et al. το 2016, παρατηρήθηκαν με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας και της PCR, υψηλές συγκεντρώσεις Treg κυττάρων τόσο εντός του όγκου όσο και στο περιβάλλον δέρμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα μη εκτεθειμένων στην υπεριώδη ακτινοβολία περιοχών. Μάλιστα ο πληθυσμός των T-ρυθμιστικών κυττάρων αποτελούσε το 45% του συνόλου των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων που διηθούν την περιοχή του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Ο αριθμός αυτός είναι εντυπωσιακός αν σκεφτούμε ότι τα Treg αποτελούν το 5-10% των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και το 8-20% των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων του υγιούς δέρματος. Επίσης στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση κυτταροκινών σχετιζόμενων με τη χημειοταξία των Treg (CCL17, CCL18, CCL22) και ελάχιστη έκφραση Th-1 κυτταροκινών (T-bet, TNF-α, IFN-γ, IL-12) στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Οι παρατηρήσεις αυτές καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα Treg λεμφοκύτταρα στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος ανοσοανοχής που ευνοεί την ανάπτυξη του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Αξίζει επίσης να αναφέρουμε ότι έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με βασικοκυτταρικό

καρκίνωμα του δέρματος που δεν έχει υποστεί θεραπεία εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση IL-10 και TNF-α και μειωμένη συγκέντρωση IL-2 στο περιφερικό αίμα^{131,132}. Με βάση αυτά τα δεδομένα μελετήσαμε εάν η ανοσοκρυστοχειρουργική μπορεί να επάγει την παρουσία στο περιφερικό αίμα T-ρυθμιστικών κυττάρων που στοχεύουν το δέρμα, διαθέσιμα για στρατολόγηση στο δέρμα, όπως επίσης και την έκκριση Th1 κυτταροκινών (IL-2, TNF-α, INF-α) έτσι ώστε να μετριαστεί ή και να ανατραπεί η Th2 υπεροχή.

Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019⁷⁹, εξετάστηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας η μεταβολή συγκεκριμένων υποπληθυσμών φλεγμονωδών κυττάρων που διηθούν τον ιστό στην περιοχή του βασικοκυτταρικού καρκινώματος κατά τη διάρκεια ενός θεραπευτικού κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής. Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 26 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένα BCCs οι οποίοι κατανεμήθηκαν τυχαία σε 3 ομάδες μελέτης σύμφωνα με τις οποίες διενεργήθηκε σε αυτούς και δεύτερη βιοψία κατά τη διάρκεια της θεραπείας ως εξής: στην 1^η ομάδα η δεύτερη βιοψία έγινε τη 12^η ημέρα της θεραπείας (2 μέρες πριν την κρυστοχειρουργική), στη 2^η ομάδα η δεύτερη βιοψία πραγματοποιήθηκε την 16^η μέρα της θεραπείας (2 μέρες μετά την κρυστοχειρουργική) και στην 3^η ομάδα η δεύτερη βιοψία διενεργήθηκε την 28^η ημέρα της θεραπείας (δηλαδή στο τέλος της 4^{ης} εβδομάδας). Ακολούθως μελετήθηκε η μεταβολή των T-λεμφοκυττάρων (CD3+ κύτταρα), των Treg κυττάρων (Foxp3 κύτταρα) και των μακροφάγων (CD68+ κύτταρα) που διηθούν τον ιστό του δέρματος στην περιοχή του όγκου με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των μακροφάγων στους ιστούς ήδη από την 12^η μέρα της θεραπείας, η οποία διατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκειά της. Ο βαθμός ιστικής διήθησης του όγκου από τα CD3+ κύτταρα αρχικά παρέμεινε σχετικά σταθερός και παρουσίασε μια απότομη αύξηση τη 16^η μέρα, δηλαδή αμέσως μετά την εφαρμογή της κρυστοχειρουργικής. Αντίθετα η διήθηση του όγκου από Treg κύτταρα παρουσίασε αύξηση κατά τα αρχικά στάδια της θεραπείας πριν την κρυστοχειρουργική, επιστρέφοντας σταδιακά μετά την κρυστοχειρουργική στα προ θεραπείας επίπεδα προς το τέλος της θεραπείας. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα της παρούσας μελέτης. Στην παρούσα μελέτη ο αριθμός των CD3+ κυττάρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση τη 5^η εβδομάδα, μετά την εφαρμογή της κρυστοχειρουργικής, παρατήρηση που συμπίπτει χρονικά με την απότομη αύξηση της ιστικής συγκέντρωσής τους. Επομένως θα μπορούσαμε να

υποστηρίζουμε πως μετά την εφαρμογή της κρυοχειρουργικής υπάρχει μία μετακίνηση CD3+ κυττάρων από την κυκλοφορία στο δέρμα. Επίσης η αύξηση της συγκέντρωσης των Treg που διηθούν την περιοχή του βασικοκυτταρικού καρκινώματος συμπίπτει χρονικά με την αύξηση του αριθμού των Treg κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (δηλαδή εκφράζουν δερμοτροπισμό) στην κυκλοφορία και επομένως θα μπορούσαμε και σε αυτή την περίπτωση να υποθέσουμε πως η ανοσοκρυοχειρουργική επάγει τον δερμοτροπισμό των κυκλοφορούντων Treg και την επακόλουθη μετακίνησή τους στο δέρμα.

Το ερωτηματολόγιο Hornheide (HQ) αποτελεί μία χρήσιμη και αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμηση της επιβάρυνσης στην ποιότητα ζωής των ασθενών με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα πριν, κατά την διάρκεια και μετά το τέλος ενός κύκλου 5 εβδομάδων ανοσοκρυοχειρουργικής. Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος είναι ένας τύπος καρκίνου με πολύ χαμηλό κίνδυνο θνητότητας και μικρή επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Ωστόσο τόσο στη μελέτη μας όσο και γενικά, οι ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα είναι συνήθως ηλικιωμένοι που υπόκεινται συχνότερα σε σημαντικό βαθμό σωματικό και ψυχοκοινωνικό στρες ήδη πριν την έναρξη της θεραπείας. Το γεγονός αυτό καθιστά αρκετά δύσκολη την εκτίμηση οποιασδήποτε επίπτωσης του όγκου στην ποιότητα ζωής τους χωρίς εξειδικευμένα «εργαλεία». Επιπλέον μέχρι στιγμής η εκτίμηση της επίδρασης της θεραπείας σε ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα αφορά σε προεγχειρητικές και μετεγχειρητικές συγκρίσεις, καθώς η χειρουργική εξαίρεση αποτελεί την προεξάρχουσα μέθοδο θεραπείας του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Παρόλο που παλαιότερες μελέτες δεν αναφέρουν ουσιαστικές επιπτώσεις της θεραπείας ^{114,123}, νεότερες μελέτες συνεχώς αναφέρουν βελτίωση της ποιότητας ζωής μετά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου ^{133,134,135,10}. Οι ελάχιστα επεμβατικές τοπικές μέθοδοι αναδεικνύονται ως χρονοβόρες άλλα άκρως αποτελεσματικές εναλλακτικές της χειρουργικής θεραπείας ^{136,137}. Ωστόσο σε σύγκριση με την χειρουργική θεραπεία, είναι αρκετά πιο δύσκολο να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις των μεθόδων αυτών στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Σε αντίθεση με την χειρουργική, οι τοπικές θεραπείες εφαρμόζονται από τον ίδιο τον ασθενή, διαρκούν συνήθως αρκετές εβδομάδες και ,όπως αναδείξαμε και στην περίπτωση της ανοσοκρυοχειρουργικής , μπορούν να επιδεινώσουν προσωρινά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Το γεγονός αυτό

μπορεί να διαταράξει τη συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν το ερωτηματολόγιο Hornheide ως μία ευαίσθητη μέθοδο αξιολόγησης παρατεταμένων τοπικών θεραπευτικών μεθόδων αντιμετώπισης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Η ευαισθησία της μεθόδου έγκειται και στο γεγονός ότι οι αλλαγές του επιπέδου δυσφορίας των ασθενών ταυτίζονται με τοπικές αλλαγές της μορφής του όγκου (π.χ η κορύφωση του άγχους αντιστοιχεί στην κορύφωση της τοπικής φλεγμονής του όγκου κατά την ανοσοκρυοχειρουργική). Επίσης το ερωτηματολόγιο αναγνώρισε το θήλυ φύλο και την υπάρχουσα κατά την έναρξη της θεραπείας ανάγκη υποστήριξης των ασθενών ως σημαντικούς ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες επιδείνωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών στο τέλος της θεραπείας (week 5, πίνακας 5). Επιπλέον η ανάγκη για υποστήριξη των ασθενών στην παρούσα μελέτη κορυφώθηκε στο τέλος της ανοσοκρυοχειρουργικής, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με αντίστοιχες παρατηρήσεις από παρόμοιες μελέτες για άλλες αντικαρκινικές θεραπείες ¹³⁸. Η επιδείνωση της ποιότητας ζωής των ασθενών στη μελέτη μας κατά 56% στο τέλος της ανοσοκρυοχειρουργικής σε σύγκριση με την έναρξη της θεραπείας, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην επιδείνωση των παραμέτρων «σωματική κόπωση» και «ανασφάλεια». Και το εύρημα αυτό συμφωνεί με αντίστοιχες μελέτες που αποδίδουν την επιβάρυνση της ποιότητας ζωής των ασθενών με μη μελανοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος στη σωματική κόπωση που προκαλεί ο ίδιος ο καρκίνος και η θεραπεία του ¹²⁴. Επίσης η σχετιζόμενη με τον όγκο ανησυχία των ασθενών στην παρούσα μελέτη μειώθηκε σημαντικά μόνο μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας επούλωσης, δηλαδή 4 εβδομάδες μετά το τέλος της ανοσοκρυοχειρουργικής. Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει την τάση των ασθενών να αξιολογούν το αποτέλεσμα της θεραπείας μόνοι τους με βάση την ορατή εξάλειψη των όγκων τους και όχι στηριζόμενοι στη διαβεβαίωση των θεραπόντων ιατρών. Μπορούμε λοιπόν υποθέσουμε ότι το αισθητικό αποτέλεσμα της ανοσοκρυοχειρουργικής με την παραμονή ελάχιστα ορατής ουλής στη θέση του όγκου συνέβαλε στη ραγδαία μείωση του σχετιζόμενου με τον όγκο άγχους. Γενικά η αποτελεσματικότητα μιας θεραπείας (χαμηλός κίνδυνος υποτροπής) και το αισθητικό αποτέλεσμα (ελάχιστη ουλοποίηση της περιοχής) έχουν ταξινομηθεί από τους ασθενείς ως οι υψηλότερες προτεραιότητες των θεραπευτικών μεθόδων αντιμετώπισης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος ¹³⁹, ενώ ο φόβος της παραμόρφωσης αποτελεί σημαίνοντα λόγο

επιδείνωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών με όγκους του δέρματος σε εμφανείς περιοχές της κεφαλής και του τραχήλου ¹¹⁷. Επομένως η ανοσοκρυστοχειρουργική καλύπτει τις θεμελιώδεις θεραπευτικές ανάγκες των ασθενών με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, καθώς συνδυάζει αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με την χειρουργική μέθοδο ¹⁷ και χαμηλό κίνδυνο ουλοποίησης. Το γεγονός ότι η ποιότητα ζωής των ασθενών παρουσιάζει σημαντική βελτίωση μετά την εφαρμογή της ανοσοκρυστοχειρουργικής, υπογραμμίζει την αποδοχή και την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου στην αντιμετώπιση του βασικοκυτταρικού καρκινώματος προσώπου-τραχήλου. Με βάση τις παρατηρήσεις μας λοιπόν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μελέτη της των αλλαγών της ποιότητας ζωής των ασθενών με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι σημαντική ώστε να αποκτήσουμε καλύτερη γνώση του βαθμού επίδρασης της θεραπείας στους ασθενείς, να εντοπίσουμε τους ασθενείς εκείνους που χρειάζονται ψυχολογική υποστήριξη με απώτερο σκοπό την εφαρμογή καλύτερων στρατηγικών διαχείρισης των ευάλωτων ασθενών και την αναβάθμιση των τοπικών μη επεμβατικών μεθόδων αντιμετώπισης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερης διάρκειας διαστήματα παρακολούθησης και με αξιολόγηση επιπλέον παραμέτρων επιβάρυνσης της ποιότητας ζωής ώστε να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η σχετιζόμενη με τον όγκο και τη θεραπεία δυσφορία των ασθενών με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα.

Πρέπει τέλος να αναφερθούμε και στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης όπως είναι ο μικρός αριθμός ασθενών σε σχέση με τη συχνότητα του βασικοκυτταρικού καρκινώματος και το μεγάλο βιολογικό εύρος των τιμών των κυτταροκινών ως απόρροια αυτού του μικρού αριθμού, καθώς και η απουσία συγκριτικού σκέλους, δηλαδή «ασθενών-μαρτύρων» που έχουν υποβληθεί μόνο σε κρυστοχειρουργική ή μόνο σε εφαρμογή ιμικουιμόδης ή ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν στην ανοσοκρυστοχειρουργική. Όμως η παρούσα έρευνα είναι μια ανοικτή προοπτική μελέτη που σκοπό έχει να μετρήσει τη μεταβολή συγκεκριμένων παραμέτρων κατά τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής και όχι να συγκρίνει διαφορετικές θεραπείες. Η απουσία ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο ποσοστό ίασης που παρέχει η συγκεκριμένη θεραπευτική μέθοδος (97,5% σε πρωτοπαθή βασικοκυτταρικά καρκινώματα).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης μας:

Από την ανάλυση των ερωτηματολογίων ποιότητας ζωής προκύπτει ότι η εν λόγω θεραπεία δε φαίνεται να επιβαρύνει οικονομικά τους ασθενείς ούτε να επηρεάζει την κοινωνική τους συμπεριφορά τόσο κατά τη διάρκειά της, όσο και στην παρακολούθησή τους ένα μήνα μετά τη διακοπή της. Η σωματική και ψυχολογική κόπωση των ασθενών επιτείνεται ελαφρά την 2^η και 5^η εβδομάδα της θεραπείας, που συμπίπτουν χρονικά με την περίοδο της μέγιστης τοπικής φλεγμονής του δέρματος. Ωστόσο σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη διακοπή της θεραπείας παρατηρείται υποχώρηση των συμπτωμάτων και πλήρης επάνοδος των ασθενών στην προ θεραπείας κατάστασή τους και μάλιστα με σημαντικά μικρότερη επιβάρυνση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην παρακολούθηση του ενός μήνα μετά την ολοκλήρωση του κύκλου της ανοσοκρυστοχειρουργικής, η ανησυχία που προκαλεί στους ασθενείς η ύπαρξη του όγκου μειώνεται σε σύγκριση με τις προθεραπευτικές μετρήσεις. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην ορατή κατά την εν λόγω χρονική στιγμή ίαση του όγκου καθώς και στο εξαίρετο αισθητικό αποτέλεσμα. Τέλος η εμπιστοσύνη των ασθενών προς τους θεράποντες ιατρούς εμφανίζεται μειωμένη κατά το μέσο της ανοσοκρυστοχειρουργικής (14^η ημέρα) καθώς και στο τέλος της θεραπείας (35^η ημέρα). Αντίθετα στις μετρήσεις μας ένα μήνα μετά τη διακοπή της ανοσοκρυστοχειρουργικής παρατηρείται ενίσχυση της εμπιστοσύνης των ασθενών προς του ιατρούς τους. Συμπερασματικά λοιπόν η στατιστική ανάλυση των ερωτηματολογίων ποιότητας ζωής συγκλίνει στο ότι η ανοσοκρυστοχειρουργική είναι μια οικονομικά προσιτή, μη επιβαρυντική για την ψυχολογική και σωματική υγεία των ασθενών, θεραπεία με ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά στις μεταβολές των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, παρατηρήσαμε ότι η ανοσοκρυστοχειρουργική προκαλεί μείωση του απόλυτου αριθμού των ολικών, T και B λεμφοκυττάρων σε όλη σχεδόν τη διάρκειά της. Επίσης μείωση κατά το ίδιο χρονικό διάστημα υπέστησαν και οι εξής υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων: CD4+, CD8+. Επικεντρώνοντας την προσοχή μας στα Treg κύτταρα, παρατηρήσαμε ότι ο ολικός τους αριθμός δε μεταβλήθηκε κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Εντούτοις διαπιστώσαμε αύξηση του απόλυτου αριθμού των Treg κυττάρων που εκφράζουν το ειδικό για το δέρμα αντιγόνο CLA τη 14^η ημέρα της θεραπείας (μέσο της θεραπείας) και

επάνοδό του στα αρχικά προθεραπευτικά επίπεδα στο τέλος της θεραπείας. Σε αντίθεση με τον υποπληθυσμό των TregCLA+ λεμφοκυττάρων οι υποπληθυσμοί των CD3+ και CD4+ T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το επιφανειακό αντιγόνο CLA δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Τέλος από τις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν η IL-10 παρουσίασε αύξηση από το μέσο έως το τέλος της θεραπείας, οι INFα και TNFα εμφάνισαν μείωση σε όλη τη διάρκεια της ανοσοκρυστοχειρουργικής η οποία διατηρήθηκε και 4 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωσή της, ενώ οι IL-2 και IL-6 διατηρήθηκαν σταθερές.

Επιχειρώντας λοιπόν να ερμηνεύσουμε τις παρατηρηθείσες μεταβολές στο περιφερικό αίμα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως η ανοσοκρυστοχειρουργική προκαλώντας στην περιοχή του όγκου σημαντική φλεγμονή, προσελκύει στο δέρμα T και B λεμφοκύτταρα από το περιφερικό αίμα καθώς και κυτταροκίνες (TNFα, INFα) , κάτι που θα δικαιολογούσε την μείωση τους στις διαδοχικές μετρήσεις με την κυτταρομετρία και την elisa αντίστοιχα. Επίσης φαίνεται να επάγει τον επιδερμοτροπισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) με την έκφραση του αντιγόνου CLA, κατευθύνοντας «νέα» Treg στην περιοχή του καρκινώματος, προάγοντας έτσι μια καλύτερη ανοσοεπιτήρηση και απάντηση στον όγκο. Συνεπώς θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε πως η ανοσοκρυστοχειρουργική έχει και συστηματική επίδραση στην ανοσολογική απάντηση του δέρματος ενάντια στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, δρώντας κατά κάποιον τρόπο ως ένα *in vivo* εμβόλιο.

ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Health-related quality of life associated with immunocryosurgery, a minimally invasive modality, for cervicofacial basal cell carcinoma.
Bassukas ID, Ganiatsa A, Gaitanis G
.Eur J Dermatol. 2019 Apr 1;29(2):234-236. doi: 10.1684/ejd.2019.3521.
- Immunocryosurgery for basal cell carcinoma: impact on circulating CD4⁺ CD25^{high} T regulatory cells and serum cytokines.
Gaitanis G, Ganiatsa A, Vartholomatos G, Karamoutsios A, Pappas P, Bassukas ID.
Eur J Dermatol. 2020 Oct 1;30(5):605-606. doi: 10.1684/ejd.2020.3864.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC) αποτελεί τον πιο κοινό καρκίνο του ανθρώπου με συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση παγκοσμίως, ιδιαίτερα στην καυκάσια φυλή, ενώ σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως στην Αυστραλία, προσβάλλει ετησίως το 2% του πληθυσμού. Αφορά στο 80% των μη μελανοκυτταρικών καρκίνων του δέρματος (NMSC). Πρόκειται για έναν κακοήγη όγκο του δέρματος με βραδεία ανάπτυξη σε διάστημα αρκετών ετών, με τοπική διήθηση και καταστροφή του δέρματος και των παρακείμενων ιστών. Εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 40 ετών, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 60 έτη με την συχνότητά του να αυξάνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας, αν και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της επίπτωσής του και σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 40 ετών. Το BCC σπάνια προκαλεί μεταστάσεις αλλά μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη τοπική καταστροφή του δέρματος και των υποκείμενων ιστών σε περίπτωση μη αντιμετώπισής του. Γι' αυτό η έγκαιρη και επίμονη θεραπεία σε όλες τις διαγνωσμένες περιπτώσεις επιβάλλεται προς αποφυγή παραμελημένων όγκων ή και εκτεταμένων.

Ο «χρυσός» κανόνας σήμερα στην αντιμετώπιση των πρωτοπαθών βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων του δέρματος και των υποτροπών τους θεωρείται η χειρουργική εξαίρεση και συγκεκριμένα η μικρογραφική χειρουργική κατά Mohs. Οι χειρουργικές εξαιρέσεις όμως αρκετά συχνά μπορεί να είναι ακρωτηριαστικές προκαλώντας δυσμορφίες, ιδιαίτερα στην περιοχή του προσώπου, που αποτελεί και μία από τις συχνότερες θέσεις εμφάνισής του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την πιθανότητα υποτροπής των θεραπευθέντων όγκων ή εμφάνισης νέων πρωτοπαθών, καθώς και με την αυξανόμενη επίπτωση του βασικοκυτταρικού καρκινώματος, καθιστούν αναγκαία την εφαρμογή τοπικών, λιγότερο εμπεμβατικών αλλά αποτελεσματικών θεραπευτικών μεθόδων.

Η ανοσοκρυοχειρουργική είναι μια ελάχιστα επεμβατική συνδυαστική μέθοδος θεραπείας, που αξιοποιεί το συνεργικό δυναμικό της συνδυασμένης εφαρμογής της κρυοχειρουργικής με μια ανοσοδιεγερτική θεραπεία, στη συγκεκριμένη μέθοδο με την τοπική εφαρμογή ιμικουϊμόδης. Η μέθοδος σχεδιάστηκε, αξιολογήθηκε και από το 2006 εφαρμόζεται συστηματικά στη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου

Ιωαννίνων για συγκεκριμένες ενδείξεις. Στην παρούσα φάση η μεγαλύτερη εμπειρία που έχουμε με την ανοσοκρυοχειρουργική αφορά στα τοπικά περιορισμένα BCC, μέγιστης μακροσκοπικής διαμέτρου ≤ 2 cm, που αποτελούν και την πλειονότητα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων (80-90 %). Η ανοσοκρυοχειρουργική εφαρμόζεται σε κύκλους διάρκειας 5 εβδομάδων και μπορεί να επαναληφθεί χωρίς περιορισμό. Οι ασθενείς ξεκινούν τη θεραπεία εφαρμόζοντας καθημερινά και αδιάκοπα τοπική κρέμα ιμικουιμόδης στην περιοχή του όγκου και σε όριο 0,5cm περίξ αυτής. Στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας συνεχόμενης εφαρμογής ιμικουιμόδης γίνεται κρυοχειρουργική με ανοικτό ψεκασμό υγρού αζώτου πάνω στον όγκο καθώς και σε περιοχή 0,5-1cm περίξ αυτού, σε 2 κύκλους ψύξης- απόψυξης διάρκειας 15-20 λεπτών. Ο ασθενής συνεχίζει ήδη από τη μέρα της κρυοχειρουργικής να εφαρμόζει την κρέμα ιμικουιμόδης για άλλες 3 εβδομάδες, συμπληρώνοντας συνολικά 5 εβδομάδες θεραπείας (ένας κύκλος). Αρχική κάθαρση του όγκου μετά από έναν τυπικό κύκλο ανοσοκρυοχειρουργικής 5 εβδομάδων επιτυγχάνεται σε 97,5% μη επιπλεγμένων BCC διαμέτρου ≤ 2 cm, ποσοστό ίσης συγκρίσιμο με εκείνο της χειρουργικής εξαίρεσης. Επίσης στην περίπτωση επανάληψης του κύκλου ανοσοκρυοχειρουργικής λόγω ελλιπούς ανταπόκρισης, η κάθαρση του όγκου ανέρχεται σε ποσοστό 99%. Το αισθητικό αποτέλεσμα της θεραπείας είναι εξαιρετικό με την παραμονή ανεπαίσθητης ουλής στο σημείο του καρκινώματος. Οι παρενέργειες της μεθόδου είναι ελάχιστες και αφορούν κυρίως σε προσωρινή, έντονη κάποιες φορές τοπική φλεγμονή.

Είναι γνωστό ότι τα αθεράπευτα βασικοκυτταρικά καρκινώματα αναπτύσσονται σε ένα μικροπεριβάλλον όπου κυριαρχεί η Th-2 ανοσολογική απάντηση η οποία καταστέλλει την αντινεοπλασματική απάντηση με την παρουσία κυταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και άωρων δένδριτικών κυττάρων καθώς και την τοπική έκκριση κυταροκινών όπως INF- γ , IL-2, IL-10, TGF- β , GM-CSF. Επίσης αναγνωρίστηκαν CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ κύτταρα που φαινοτυπικά είναι όμοια με τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και πιθανώς καταστέλλουν την αντινεοπλασματική απάντηση. Ο συνδυασμός της ιμικουιμόδης με την κρυοχειρουργική έχει συνεργική δράση αυξάνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα και των δύο μεθόδων. Η ιμικουιμόδη είναι μία ημισυνθετική ιμιδαζοκινολόνη με ανοσοτροποποιητική δράση. Η άμεση δράση της οφείλεται αφενός στο ότι συνδέεται με τους υποδοχείς Toll-like 7 και 8 (TLR-7, TLR-8) που βρίσκονται στην επιφάνεια των μακροφάγων, των

μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων, ενεργοποιώντας τα και αφετέρου στο ότι επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων διεγείροντας την έκκριση προ-αποπτωτικών μορίων που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την κασπάση 9. Η έμμεση δράση της ιμικουιμόδης έγκειται στην ικανότητά της να επάγει την απελευθέρωση κυτταροκινών όπως IL-12, TNF- α , INF- γ , οι οποίες αυξάνουν τα επίπεδα των κυτταροροξικών T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων (κύτταρα φυσικοί φονείς-Natural Killers) στο νεόπλασμα. Η αύξηση της IL-12 καταστέλλει τη δράση της IL-10, ενισχύοντας έτσι την αντινεοπλασματική δράση των T-λεμφοκυττάρων (Schön et al., 2007-2008). Παρόλο που η ιμικουιμόδη μπορεί να προσελκύσει άωρα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα εντός του όγκου, η ανοσολογική απάντηση είναι γενικά απρόβλεπτη και συχνά οδηγεί σε τμηματική καταστροφή του όγκου στην κλινική πράξη. Σε αυτό το σημείο κρίσιμος φαίνεται ότι είναι ο ρόλος της κρυοχειρουργικής, η οποία «τραυματίζοντας» τον όγκο απελευθερώνει μεγάλο αριθμό καρκινικών αντιγόνων μέσα στο προφλεγμονώδες περιβάλλον που δημιουργήσε η εφαρμογή της ιμικουιμόδης «εφοδιάζοντας» τα νεοστρατολογημένα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα με ειδικά καρκινικά αντιγόνα. Με τη σειρά τους τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ωριμάζουν και προωθούν την ενεργοποίηση ανοσοαπάντησης έναντι του νεοπλάσματος. Η διαδικασία αυτή προσομοιάζει τη δημιουργία ενός *in-situ* αντινεοπλασματικού εμβολίου.

Σκοπός: Η μελέτη της επίδρασης της ανοσοκρυοχειρουργικής στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού έναντι του βασικοκυτταρικού καρκινώματος μέσω της ποσοτικής και ποιοτικής αλλαγής των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένων κυτταροκινών στο περιφερικό αίμα ασθενών στα διάφορα στάδια της θεραπείας και επιπλέον η εκτίμηση της ψυχολογικής επιβάρυνσης των ασθενών από την εφαρμογή της ανοσοκρυοχειρουργικής.

Υλικά και μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν 14 ασθενείς (άρρενες) με πρωτοπαθές βασικοκυτταρικό καρκίνωμα **διαμέτρου ≤ 2 cm**, το οποίο είχε επιβεβαιωθεί ιστολογικά με punch βιοψία πριν την έναρξη της ανοσοκρυοχειρουργικής. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 71 έτη. Οι συμμετέχοντες ήταν όλοι ελληνικής καταγωγής και κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου και παρακολουθούνταν στο ιατρείο των όγκων της Δερματολογικής

κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από την μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με συνοδό αιματολογικό νόσημα.

Η λήψη του φλεβικού αίματος γινόταν κατά τα εξής στάδια: 1. πριν την έναρξη της θεραπείας (μέσα σε χρονικό διάστημα 4 ημερών προ της έναρξης, 'εβδομάδα 0') 2. τη 14^η μέρα της θεραπείας, μετά από συνεχόμενη καθημερινή εφαρμογή κρέμας ιμικουιμόδης 5% στην περιοχή όγκου και πριν γίνει η κρυστοχειρουργική την ίδια μέρα ('εβδομάδα 2') 3. την 35^η ημέρα, που αντιστοιχεί στο τέλος ενός κύκλου ανοσοκρυστοχειρουργικής διάρκειας 5 εβδομάδων (εβδομάδα '5') και 4. τέσσερις εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας ('εβδομάδα 9'). Τα δείγματα αίματος αποθηκεύονταν σε σωληνάρια γενικής αίματος της BD Vacutainer (BD, Plymouth, UK) προκειμένου να ακολουθήσει η κατάλληλη επεξεργασία των κυττάρων για την κυτταρομετρία ροής. Επίσης ικανή ποσότητα αίματος τοποθετούνταν σε σωληνάρια Wasserman της BD και ακολούθως υφίσταντο φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 10 λεπτά στη φυγόκεντρο της Μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Στη συνέχεια γινόταν αναρρόφηση του υπερκείμενου ορού με σιφώνιο ,αποθήκευσή του σε σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2 ml και διατήρησή του σε θερμοκρασία -20 °C προκειμένου να αναλυθεί με τη μέθοδο της ELISA για τον προσδιορισμό των κυτταροκινών.

Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής (Κυτταρόμετρο ροής BD FACSCalibur, Becton Dickinson) προδιορίστηκαν ο πληθυσμός των ολικών λεμφοκυττάρων, οι κύριοι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένα τα T (CD3⁺), B-λεμφοκύτταρα (CD19⁺) και τα NK λεμφοκύτταρα (CD3⁻CD56⁺) όπως και οι υποκατηγορίες των T-βοηθητικών (CD3⁺CD4⁺), των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Treg, CD4⁺CD25^{high}) ,των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CD3⁺CD8⁺), των CD3⁺CLA , CD4⁺CLA και TregCLA κυττάρων, όπου το CLA (Cutaneous Lymphocyte- associated Antigen) είναι ένα αντιγόνο επιφανείας που εκφράζεται από μια υποκατηγορία περιφερικών T-λεμφοκυττάρων μνήμης (στην πλειονότητά τους βοηθητικά – CD4⁺) που έχουν την ικανότητα επιλεκτικής μετανάστευσης και εγκατάστασης στο δέρμα (επιδερμοτροπισμός). Τα μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των αντίστοιχων δεικτών στην κυτταρομετρία ροής είναι : CD3-perCP ή PE (κλώνος SK7,

BD-biosciences, San Jose, USA), CD4-APC (κλώνος SK3, BD-Biosciences), CD25-PC5 (Beckman Coulter, California, USA), CLA-FITC (κλώνος HECA-452, BD-Biosciences) και το πολυκλωνικό αντίσωμα Lymphogram Cytognos με 3 φθοριοχρώματα (Cytognos, S.L. Salamanca, Spain), με τους ακόλουθους συνδυασμούς αντισωμάτων, CD8⁺CD19-FITC, CD3⁺CD56-PE, CD4-PE-Cyanine 7.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson). Δημιουργήθηκε ένα κυτταρόγραμμα dot plot, όπου ο άξονας x αντιστοιχεί στο βαθμό πρόσθιου σκεδασμού (FSC) και ο άξονας y αντιστοιχεί στο βαθμό πλάγιου σκεδασμού (SSC), όπου αναγνωρίζονται τα λεμφοκύτταρα λόγω του μικρού μεγέθους τους και της μικρής κοκκίωσης. Η ομάδα αυτή των λεμφοκυττάρων που αναγνωρίστηκε συμπεριελήφθηκε στην περαιτέρω ανάλυση των υποπληθυσμών που αναφέρθηκαν. Η έκφραση των δεικτών των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων έγινε με τη μορφή κυτταρογραμμάτων και ιστογραμμάτων. Τα κυτταρογράμματα που δημιουργήθηκαν και αναλύθηκαν με το λογισμικό Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson) απέδωσαν τη συγκέντρωση του εκάστοτε υποπληθυσμού των λεμφοκυττάρων με τη μορφή ποσοστών επί τοις εκατό (%), επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων. Στη συνέχεια οι συγκεντρώσεις των υποπληθυσμών υπολογίστηκαν σε απόλυτους αριθμούς για να έχουμε μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις μας. Η στατιστική ανάλυση των αριθμητικών αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του Friedman test.

Με τη βοήθεια της sandwich Elisa προσδιορίστηκαν οι τιμές των κυτταροκινών IL-2, IL-6, IL-10, TNFa και INFa. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα έτοιμα kit αντισωμάτων: Human TNFa Quantikine kit, Human IL-2 Quantikine kit, Human IL-6 Quantikine kit, Human IL-10 Quantikine kit (R&D Systems, Inc. MN, USA) και Human INFa ELISA kit (PBL Assay Science, NJ, USA). Για να μετρήσουμε τα επίπεδα των κυτταροκινών που αναφέρθηκαν χρησιμοποιήσαμε ορό ασθενών, ο οποίος είχε αποθηκευτεί στους -20 °C. Για την ανίχνευση του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε μήκος κύματος 450 nm και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών σε κάθε δείγμα ασθενή έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης για την δημιουργία της οποίας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα σταθερών συγκεντρώσεων κυτταροκίνης. Όλη η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας προμήθειας του ELISA kit (R&D

Systems, Inc. MN, USA). Για τη στατιστική ανάλυση και την ομοιόμορφη ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του Friedman test για τέσσερις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (εβδομάδες 0, 2, 5 και 9 μετά την έναρξη της θεραπείας) και του Wilcoxon sign test με σύγκριση ανά ζεύγη.

Η επίδραση της ανοσοκρυστοχειρουργικής στην ποιότητα ζωής των ασθενών μελετήθηκε σε 32 ασθενείς με βασικοκυτταρικό καρκίνωμα προσώπου-τραχήλου (17 γυναίκες και 15 άνδρες) ηλικίας 31-87 ετών με τη βοήθεια του ερωτηματολογίου ποιότητας ζωής Hornheide, που εκτιμά ειδικά την ψυχολογική επιβάρυνση των ασθενών με όγκους στην περιοχή του προσώπου και του λαιμού. Στο ερωτηματολόγιο Hornheide περιλαμβάνονται 27 ερωτήσεις και οι απαντήσεις των ασθενών συνδυάζονται ώστε να εκτιμηθούν 8 ξεχωριστές ψυχοκοινωνικές παράμετροι και συγκεκριμένα η σωματική ευεξία, η συναισθηματική ευεξία, η σχετιζόμενη με τον καρκίνο ανησυχία, η ψυχολογική ένταση, η ανάγκη για κοινωνική υποστήριξη (από συγγενείς ή φίλους), το προκαλούμενο από τη θεραπεία άγχος, η ποιότητα της ιατρικής ενημέρωσης και άλλες ανησυχίες. Οι ασθενείς συμπλήρωσαν μόνοι τους το ερωτηματολόγιο πριν την έναρξη της θεραπείας (εβδομάδα 0), τη 14^η μέρα (εβδομάδα 2), στο τέλος της θεραπείας (εβδομάδα 5) και τέσσερις εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (εβδομάδα 9). Για την στατιστική ανάλυση των ερωτηματολογίων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διπλής διακύμανσης Friedman και το Wilcoxon-test.

Αποτελέσματα: Με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήσαμε ότι ο πληθυσμός των ολικών λεμφοκυττάρων παρουσίασε σημαντική μείωση στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας της ανοσοκρυστοχειρουργικής και επανήλθε στην αρχική τιμή την 9^η εβδομάδα, δηλαδή ένα μήνα μετά τη διακοπή της θεραπείας. Ο υποπληθυσμός των CD3⁺ T-λεμφοκυττάρων παρουσίασε κάποια μείωση στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδα της θεραπείας, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ωστόσο μετά την κρυστοχειρουργική όμως εμφάνισε αρκετά σημαντική μείωση και ο αριθμός τους παρέμεινε μικρότερος από τον αρχικό ακόμα και στην μέτρηση της 9^{ης} εβδομάδας (1 μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας). Ο υποπληθυσμός των B-λεμφοκυττάρων μειώθηκε σταδιακά μέχρι την 5^η εβδομάδα της θεραπείας, με επάνοδο στην αρχική προθεραπείας τιμή ένα μήνα μετά την

ολοκλήρωση της ανοσοκρυστοχειρουργικής. Ο αριθμός των NK λεμφοκυττάρων δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή στις μετρήσεις μας.

Η υποκατηγορία των $CD3^+$ T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το ειδικό αντιγόνο CLA ($CD3^+CLA$) παρουσίασε μείωση στο τέλος των 5 εβδομάδων θεραπείας, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο αριθμός των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων μειώθηκε σημαντικά 2 εβδομάδες μετά την έναρξη της ανοσοκρυστοχειρουργικής, ενώ στις μετρήσεις της 5^{ης} και 9^{ης} εβδομάδας ο αριθμός τους κυμαινόταν στα αρχικά προ θεραπείας επίπεδα. Ο υποπληθυσμός των $CD4^+$ T-λεμφοκυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο CLA ($CD4^+CLA$) παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος καθόλη τη διάρκεια των μετρήσεών μας. Η ανοσοκρυστοχειρουργική δε φαίνεται να μεταβάλλει τον αριθμό των Treg λεμφοκυττάρων ($CD4^+ CD25^{high}$). Αντίθετα ο υποπληθυσμός των Treg που εκφράζουν το αντιγόνο CLA (TregCLA) αυξήθηκε στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας θεραπείας πριν την κρυστοχειρουργική, με επάνοδό του στις αρχικές τιμές στο τέλος της ανοσοκρυστοχειρουργικής (5^η εβδομάδα). Τα $CD8^+$ T-λεμφοκύτταρα εμφάνισαν αριθμητική μείωση μετά από 2 εβδομάδες θεραπείας και επανήλθαν στην αρχική τους τιμή ένα μήνα μετά τη διακοπή της ανοσοκρυστοχειρουργικής. Προσδιορίστηκαν επίσης δύο υποπληθυσμοί των NK λεμφοκυττάρων, εκείνα που εκφράζουν το αντιγόνο CD8 και εκείνα που είναι αρνητικά για τον δείκτη CD8. Και οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί δεν μεταβλήθηκαν κατά την διάρκεια των μετρήσεών μας. Τα $CD4^+CLA$ λεμφοκύτταρα παρουσίασαν αύξηση σε σχέση με τον ολικό αριθμό των $CD4^+$ στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας της θεραπείας (ο λόγος $CD4^+CLA / CD4$ αυξήθηκε στο εν λόγω διάστημα). Τα Treg CLA λεμφοκύτταρα αυξήθηκαν σε σχέση με τα ολικά Treg μετά από δύο εβδομάδες ανοσοκρυστοχειρουργικής (ο λόγος Treg CLA/Treg αυξήθηκε), ενώ ο αριθμός των Treg CLA σε σχέση με τα $CD4^+CLA$ εμφανίστηκε αυξημένος σε όλη τη διάρκεια των 5 εβδομάδων της θεραπείας (αύξηση του λόγου TregCLA/ $CD4^+CLA$). Τέλος παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού τόσο των NK $CD8^+$ όσο και των NK $CD8^-$ σε σχέση με τον ολικό αριθμό των NK κυττάρων ένα μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και μάλιστα ο λόγος NK $CD8^- / NKCD8^+$ ήταν ίσος με 5,9.

Αναφορικά με τις κυτταροκίνες, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της IL-10 από την 14^η έως την 35^η ημέρα της ανοσοκρυστοχειρουργικής και μετά μείωση και επιστροφή της στα αρχικά προ θεραπείας επίπεδα την 9^η εβδομάδα (1 μήνα μετά την ολοκλήρωση

της θεραπείας). Οι συγκεντρώσεις των INFα και TNFα εμφάνισαν συνεχόμενη μείωση σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας μέχρι και το τέλος των μετρήσεών μας. Αντίθετα οι IL-2 και IL-6 κυμάνθηκαν στα προ θεραπείας επίπεδα σε όλες τις μετρήσεις.

Από τα ερωτηματολόγια ποιότητας ζωής προέκυψε ότι οι παράγοντες σωματική κόπωση, ψυχολογική επιβάρυνση και ανασφάλεια των ασθενών αυξήθηκαν στο τέλος της 2^{ης} και 5^{ης} εβδομάδας της ανοσοκρυστοχειρουργικής, όμως υποχώρησαν στα προθεραπευτικά επίπεδα στη ένα μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Επίσης η γενικότερη ανησυχία των ασθενών και η έλλειψη εμπιστοσύνης στους θεράποντες ιατρούς εντάθηκαν κατά τη 2^η και 5^η εβδομάδα της θεραπείας, εντούτοις στη μέτρηση του ενός μήνα μετά τη διακοπή της ανοσοκρυστοχειρουργικής η ανησυχία κυμάνθηκε σε επίπεδα αρκετά χαμηλότερα των αρχικών και η έλλειψη εμπιστοσύνης στους θεράποντες ιατρούς εξαλείφθηκε. Η ανησυχία για την ύπαρξη του όγκου δεν παρουσίασε μεταβολές κατά τη διάρκεια της θεραπείας και μάλιστα εμφανίστηκε μικρότερη της αρχικής στην παρακολούθηση του ενός μήνα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Τέλος η κοινωνική συμπεριφορά των ασθενών δεν επηρεάστηκε από την ανοσοκρυστοχειρουργική όπως ούτε και η οικονομική τους κατάσταση.

Συμπεράσματα: Από τα παραπάνω ευρήματα μπορούμε να υποθέσουμε πως η ανοσοκρυστοχειρουργική προκαλώντας στην περιοχή του όγκου σημαντική φλεγμονή, προσελκύει στο δέρμα T και B λεμφοκύτταρα από το περιφερικό αίμα καθώς και κυτταροκίνες (TNFα, INFα), κάτι που θα δικαιολογούσε την μείωση τους στις διαδοχικές μετρήσεις με την κυτταρομετρία και την elisa αντίστοιχα. Επίσης φαίνεται να επάγει τον επιδερμοτροπισμό των T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) με την έκφραση του αντιγόνου CLA, κατευθύνοντας «νέα» Treg στην περιοχή του καρκινώματος, προάγοντας έτσι μια καλύτερη ανοσοεπιτήρηση και απάντηση στον όγκο. Τέλος η ανοσοκρυστοχειρουργική αναδεικνύεται ως μια τοπική, ελάχιστα επεμβατική θεραπευτική μέθοδος αντιμετώπισης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος, η οποία είναι καλά ανεκτή από τους ασθενείς, προκαλεί μικρή αλλά προσωρινή επιδείνωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και έχει ομολογουμένως υψηλό ποσοστό επιτυχίας και εξαιρετικό αισθητικό αποτέλεσμα.

ABSTRACT

Introduction: Basal cell carcinoma (BCC) is the most common human cancer with an ever-increasing incidence worldwide, especially in the Caucasian race, while in certain areas, such as Australia, it affects 2% of the population annually. It represents 80% of non-melanoma skin cancers (NMSCs). It is a malignant tumor of the skin with slow growth over several years, with local infiltration and destruction of the skin and adjacent tissues. It usually occurs after the age of 40, with an average age of onset of 60 years with its frequency increasing significantly with age, although in recent years there has been an increase in its incidence in people under the age of 40. BCC rarely causes metastases but can cause extensive local damage to the skin and underlying tissues if left untreated. Therefore, timely and persistent treatment in all diagnosed cases is necessary to avoid neglected or extensive tumors.

The "golden" rule today in the treatment of primary basal cell carcinomas of the skin and their recurrences is considered to be the surgical excision and specifically the Mohs micrographic surgery. Surgical excision, however, can often be amputating, causing deformities, especially in the facial area, which is one of the most common sites of basal cell carcinoma. This, combined with the possibility of recurrence of the treated tumors or the emergence of new primary ones, as well as the increasing incidence of basal cell carcinoma, necessitate the application of local, less invasive but effective treatment methods.

Immuno-cryosurgery is a minimally invasive combinational method of treatment, which utilizes the synergistic potential of the combined application of cryosurgery with an immunostimulatory therapy, in the specific method with the topical application of imiquimod. The method was designed, evaluated and since 2006 is systematically applied in the Dermatology Clinic of the University Hospital of Ioannina for specific indications. At the present stage, the greatest experience we have with immuno-cryosurgery concerns the locally limited BCCs, with a maximum macroscopic diameter ≤ 2 cm, which constitute the majority of basal cell carcinomas (80-90%). Immuno-cryosurgery is applied in cycles lasting 5 weeks and can be repeated without restriction. Patients begin treatment by applying daily and uninterrupted topical imiquimod cream to

the area of the tumor and within 0.5 cm around it. At the end of the 2nd week of continuous application of imiquimod, cryosurgery is performed with open spray liquid nitrogen on the tumor as well as in an area of 0.5-1cm around it, in 2 cooling-thawing cycles lasting 15-20 minutes. The patient continues to apply the imiquimod cream for another 3 weeks from the day of cryosurgery, completing a total of 5 weeks of treatment (one cycle). Initial tumor clearance after a typical 5-week cycle of immuno-cryosurgery is achieved in 97.5% of uncomplicated BCCs $\leq$ 2cm in diameter, a cure rate comparable to that of surgical excision. Also in the case of repetition of the cycle of immuno-cryosurgery due to insufficient response, the clearance of the tumor is 99%. The aesthetic effect of the treatment is excellent by leaving a faint scar at the site of the cancer. The side effects of the method are minimal and mainly concern temporary, sometimes intense local inflammation.

It is known that incurable basal cell carcinomas develop in a microenvironment dominated by the Th-2 immune response which suppresses the antineoplastic response in the presence of cytotoxic T lymphocytes and immature dendritic cells as well as local secretion of cytokines IL-10, TGF- β , GM-CSF. CD4 + CD25 + Foxp3 + cells have also been identified that are phenotypically similar to T regulatory cells (Tregs) and possibly suppress the antineoplastic response. The combination of imiquimod with cryosurgery has a synergistic effect increasing the therapeutic effect of both methods. Imiquimod is a semisynthetic imidazoquinolone with immunomodulatory activity. Its direct action is due to its binding to Toll-like 7 and 8 receptors (TLR-7, TLR-8) located on the surface of macrophages, monocytes and dendritic cells, thus activating them, as well as its ability to induce the apoptosis of cancer cells by stimulating the secretion of pro-apoptotic molecules which in turn activate caspase 9. The indirect action of imiquimod lies in its ability to induce the release of cytokines such as IL-12, TNF- α , INF- γ , which increase the levels of cytotoxic T-lymphocytes and NK cells (natural killer cells) in the tumor. The increase in IL-12 suppresses the action of IL-10, thus enhancing the antineoplastic activity of T-lymphocytes (Schön et al., 2007-2008). Although imiquimod may attract premature plasmatoid dendritic cells into the tumor, the immune response is generally unpredictable and often leads to partial destruction of the tumor in clinical practice. At this point, the role of cryosurgery seems to be crucial, which by "injuring" the tumor releases a large number

of cancer antigens into the pro-inflammatory environment created by the application of imiquimod, "supplying" the newly recruited antigen-presenting dendritic cells with specific cancer antigens. In turn, the antigen-presenting cells mature and promote the activation of an immune response against the tumor. This process simulates the development of an in-situ antineoplastic vaccine.

Aim of this study: To study the effect of immune-cryosurgery on the body's immune response to basal cell carcinoma through the quantitative and qualitative change of lymphocyte subpopulations and specific cytokines in the peripheral blood of patients at different stages of treatment and in addition to assess the psychological burden of the patients after and during the application of immune-cryosurgery.

Materials and methods: The study involved 14 patients (males) with primary basal cell carcinoma ≤ 2 cm in diameter, which was confirmed histologically by punch biopsy before the start of immunocrystalline surgery. The mean age of the patients was _____ years. The participants were all of Greek origin and residents of the wider area of Epirus and were monitored in the Dermatology Clinic of the University Hospital of Ioannina. Patients with concomitant hematological disease were excluded from the study.

The venous blood was taken in the following stages: 1. before the start of the treatment (within 4 days before the start, 'week 0') 2. on the 14th day of the treatment, after continuous daily application of imiquimod cream 5 % in the tumor area and before the cryosurgery on the same day ('week 2') 3. on the 35th day, which corresponds to the end of one cycle of immuno-cryosurgery lasting 5 weeks (week '5') and 4. four weeks after the end of treatment ('week 9'). Blood samples were stored in BD Vacutainer blood tubes (BD, Plymouth, UK) for proper cell treatment for flow cytometry. A sufficient amount of blood was also placed in WD Wasserman tubes of BD and then centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes in the centrifuge unit of the Molecular Biology Unit of the Hematology Laboratory of the University Hospital of Ioannina. The supernatant was then pipetted, stored in 2 ml Eppendorf tubes, and stored at -20 °C for analysis by ELISA to determine cytokines.

Flow cytometry (BD FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson) determined the total lymphocyte population, the main lymphocyte subpopulations and specifically the T-cells

(CD3⁺), B-cells (CD19⁺) and NK-cells (CD3⁻CD56⁺) as well as the subcategories of T-helpers (CD3⁺ CD4⁺), T-regulatory cells (Treg, CD4⁺ CD25^{high}), cytotoxic lymphocytes (CD3⁺CD8⁺), CD3⁺CLA, CD4⁺CLA and TregCLA cells, where CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) is a surface antigen expressed by a subset of peripheral memory T cells (mostly CD4⁺ helpers) that have the ability to selectively migrate and settle on the skin (epidermotropism). The fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies used to detect the corresponding markers in the flow cytometry are: CD3-perCP or PE (clone SK7, BD-biosciences, San Jose, USA), CD4-APC (clone SK3, BD-Biosciences), CD25-PC5 (clone, Beckman Coulter, California, USA), CLA-FITC (clone HECA-452, BD-Biosciences) and a multiclonal antibody with 3 fluorochromes, Lymphogram Cytognos (Cytognos, SL Salamanca, Spain), with the following antibody combinations, CD8 + CD19-FITC, CD3 + CD56-PE, CD4-PE-Cyanine 7.

Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson) software was used to analyze the flow cytometry results. A dot plot cytogram was created, where the x-axis corresponds to the degree of anterior scattering (FSC) and the y-axis corresponds to the degree of lateral scattering (SSC), where the lymphocytes are identified due to their small size and small granulation. This group of identified lymphocytes was included in the further analysis of the reported subpopulations. The expression of the surface markers of the lymphocyte subpopulations was depicted in the form of cytograms and histograms. The cell graphs created and analyzed with the software Cell Quest v3.1 (Becton Dickinson) yielded the concentration of the respective lymphocyte population in the form of percentages (%), on the total of the lymphocytes. Then the concentrations of the subpopulations were calculated in absolute numbers to have greater accuracy in our measurements. The statistical analysis of the numerical results was done with the help of the Friedman test.

The values of cytokines IL-2, IL-6, IL-10, TNF α and INF α were determined with the help of the Elisa sandwich. The following antibody kits were used: Human TNF α Quantikine kit, Human IL-2 Quantikine kit, Human IL-6 Quantikine kit, Human IL-10 Quantikine kit (R&D Systems, Inc.MN, USA) and Human INF α ELISA kit (PBL Assay Science, NJ,SA). To measure the reported cytokine levels we used patient serum stored at -20 .C. To detect the color product of the reaction, a wavelength of 450 nm was used and the calculations

of cytokine concentrations in each patient sample were calculated using a standard curve for the formation of which solutions of constant cytokine concentrations were used. The whole process was done according to the instructions of the supply company of the ELISA kit (R&D Systems, Inc. MN, USA). For the statistical analysis and the uniform interpretation of the results, the Friedman test was used for four repeated measurements (weeks 0, 2, 5 and 9 after the start of the treatment) and the Wilcoxon sign test with comparison by pairs.

The effect of immuno-cryosurgery on patients' quality of life was studied in 32 patients with basal cell carcinoma of the face and neck (17 women and 15 men) aged 31-87 years using the Hornheide quality of life questionnaire, which specifically assesses the psychological burden of patients with tumors in the area of the face and neck. The Hornheide questionnaire includes 27 questions and patient responses are combined to assess 8 distinct psychosocial parameters, namely physical well-being, emotional well-being, cancer-related anxiety, psychological tension, the need for social support (by family or friends), treatment-induced stress, quality of medical information and other concerns. Patients completed the questionnaire themselves before the start of treatment (week 0), on the 14th day (week 2), at the end of treatment (week 5) and four weeks after the end of treatment (week 9). Friedman double variance analysis and the Wilcoxon-test were used for the statistical analysis of the questionnaires.

Results: With the help of flow cytometry, we observed that the total lymphocyte population showed a significant decrease at the end of the 2nd week of immune-cryosurgery and returned to the initial value in the 9th week, ie one month after cessation of treatment. The CD3 + T-cell subpopulation showed a decrease at the end of the 2nd week of treatment, which was not statistically significant, however after cryosurgery it showed a significant decrease and their number remained lower than the original even at the 9th week count. (1 month after completion of treatment). The B-cell subpopulation gradually decreased by the 5th week of treatment, returning to baseline one month after completion of immune-cryosurgery. The number of NK lymphocytes did not show much change in our measurements.

The subtype of CD3 + T lymphocytes expressing the specific antigen CLA (CD3 + CLA) showed a decrease at the end of 5 weeks of treatment, which was not statistically significant. The number of CD4 + T-cells decreased significantly 2 weeks after the start of immuno-cryosurgery, while in the measurements of the 5th and 9th week their number fluctuated in the initial pre-treatment levels. The subpopulation of CD4 + T cells expressing the CLA antigen (CD4 + CLA) remained almost unchanged throughout our measurements. Immuno-cryosurgery does not appear to alter Treg lymphocyte count (CD4 + CD25high). In contrast, the subpopulation of Treg expressing the CLA antigen (TregCLA) increased at the end of the 2nd week of treatment before cryosurgery, returning to baseline at the end of immuno-cryosurgery (5th week). CD8 + T-lymphocytes showed a numerical decrease after 2 weeks of treatment and returned to their original value one month after the cessation of immuno-cryosurgery. Two subpopulations of NK lymphocytes were also identified, those expressing the CD8 antigen and those being negative for the CD8 marker. Both of these subpopulations did not change during our measurements. CD4 + CLA lymphocytes increased in relation to the total number of CD4 + at the end of the 2nd week of treatment (the CD4+ CLA / CD4 ratio increased during this period). Treg CLA lymphocytes increased compared to total Treg lymphocytes after two weeks of immunocrystalline surgery (Treg CLA / Treg ratio increased), while the number of Treg CLAs relative to CD4 + CLAs increased throughout the 5 weeks of treatment (increase in the TregCLA / CD4 + CLA ratio). Finally, there was an increase in the number of both NKCD8 + and NKCD8- compared to the total number of NK cells one month after the end of treatment and in fact the ratio NKCD8- / NKCD8 + was equal to 5.9.

Regarding cytokines, an increase in the concentration of IL-10 was observed from the 14th to the 35th day of immuno-cryosurgery and then a decrease and return to the initial pre-treatment levels in the 9th week (1 month after the end of treatment). INF α and TNF α concentrations decreased continuously throughout treatment until the end of our measurements. In contrast, IL-2 and IL-6 ranged at pre-treatment levels in all measurements.

The quality-of-life questionnaires showed that the factors of physical fatigue, psychological burden and insecurity of the patients increased at the end of the 2nd and 5th week of the immuno-cryosurgery but decreased to the therapeutic levels in one month after the completion of the treatment. Also, the general anxiety of the patients and the lack of trust in the treating doctors were intensified during the 2nd and 5th week of the treatment, however in the measurement of one month after the cessation of the immuno-cryosurgery the anxiety was at levels much lower than the initial ones and the lack of was eliminated. The concern about the existence of the tumor did not show any changes during the treatment and in fact appeared less than the initial one month after the completion of the treatment. Finally, the social behavior of the patients was not affected by the immuno-cryosurgery, nor their financial situation.

Conclusions: From the findings above we can assume that immuno-cryosurgery, causing significant inflammation in the tumor area, attracts T and B lymphocytes from the peripheral blood to the skin as well as cytokines (TNF α , INF α), which would justify their reduction in our measurements with cytometry and elisa respectively. It also appears to induce epidermal modulation of T regulatory cells (Treg) by CLA antigen expression, directing "new" Treg to the cancer site, thus promoting better immune surveillance and tumor response. Finally, immuno-cryosurgery is emerging as a local, minimally invasive treatment for basal cell carcinoma of the skin, which is well tolerated by patients, causes a small but temporary deterioration in the quality of life of patients and has an admittedly high success rate and excellent aesthetic effect.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. *An. Bras. Dermatol* 2011; 86(2): 292–305
2. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol* 2012;166(5): 1069–1080
3. Osterlind A, Hou-Jensen K, Moller Jensen O. Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer*. 1988;58: 385-391
4. Chuang TY, Popescu A, Su WP, et al. Basal cell carcinoma. A population-based incidence study in Rochester, Minn. *J Am Acad Dermatol*. 1990; 22:413-417
5. Serrano H, Scotto J, Shornick G, et al. Incidence of nonmelanoma skin cancer in New Hampshire and Vermont. *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:574-579
6. Green A, Battistutta D, Hart V, et al. Skin cancer in a subtropical Australian population: incidence and lack of association with occupation. The Nambour Study Group. *Am J Epidemiol*. 1996; 144:1034-1040
7. English DR, Krickler A, Heenan PJ, et al. Incidence of non-melanocytic skin cancer in Geraldton, Western Australia. *Int J Cancer*. 1997;73:629-633
8. Staples MP, Elwood M, Burton RC, et al. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 2006;184:6-10
9. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, et al. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007;157(suppl 2):47-51
10. Asgari MM, Moffet HH, Ray GT, et al. Trends in basal cell carcinoma incidence and identification of high-risk subgroups, 1998-2012. *JAMA Dermatol*. 2015;151:976-981
11. Andersen LK, Davis MD. Sex differences in the incidence of skin and skin-related diseases in Olmsted County, Minnesota, United States, and a comparison with other rates published worldwide. *Int J Dermatol*. 2016; 55:939-955
12. Wong CS¹, Strange RC², Lear JT¹. Basal cell carcinoma. *BMJ* 2003 Oct;327(7418):794-8
13. Demers AA¹, Nugent Z, Mihalcioiu C, et al. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 320-328

14. Richmond-Sinclair NM^{1,2}, Pandeya N¹, Ware RS³, et al. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 323–328
15. Dyer RK¹, Weinstock MA, Cohen TS, et al. Predictors of basal cell carcinoma in high-risk patients in the VATTC (VA Topical Tretinoin Chemoprevention) trial. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2544–2551
16. Michelle R Iannacone¹, Wei Wang, Heather G Stockwell et al. Patterns and timing of sunlight exposure and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin--a case-control study. *BMC Cancer*. 2012 Sep 20;12:417
17. Georgios Gaitanis¹, Ioannis D Bassukas. Immunocryosurgery for non-superficial basal cell carcinoma: a pro-spective, open-label phase III study for tumours ≤ 2 cm in diameter. *Acta Derm Venereol* 2014 Jan;94(1):38-44
18. Berking C, Hauschild A, Kolbl O, et al. Basal cell carcinoma- treatment for the commonest skin cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2014 May 30; 111(22): 389-95
19. Thissen MR¹, Neumann MH, Schouten LJ. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1177–1183
20. Smeets NW¹, Krekels GA, Ostertag JU, et al. Surgical excision vs Mohs micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 1766–1772
21. Klara Mosterd¹, Gertruud A M Krekels, Fred Hm Nieman. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol* 2008 Dec;9(12):1149-56
22. Stephen B Tucker¹, Jerry W Polasek, Anthony J Perri, et al. Long-term follow-up of basal cell carcinomas treated with perilesional interferon alfa 2b as monotherapy. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Jun;54(6):1033-8.
23. John Geisse¹, Ivor Caro, Jane Lindholm, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol*. 2004 May; 50(5):722-33
24. H J Schulze¹, B Cribier, L Requena et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol* 2005 May;152(5):939-47
25. Chris Quirk¹, Kurt Gebauer, Mary Owens, Patti Stampone. Two-year interim results from a 5-year study evaluating clinical recurrence of superficial basal cell carcinoma after treatment with imiquimod 5% cream daily for 6 weeks. *Australas J Dermatol* 2006 Nov;47(4):258-65
26. Eigentler TK, Kamin A, Weide BM, et al. A phase III, randomized, open label study to evaluate the safety and efficacy of imiquimod 5% cream applied thrice weekly for 8 and 12 weeks in the treatment of low-risk nodular basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 616–621

27. Shumack S, Robinson J, Kossard S, et al. Efficacy of topical 5% imiquimod cream for the treatment of nodular basal cell carcinoma: comparison of dosing regimens. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1165–1171
28. Christina M Huang¹, Mark G Kirchhof¹. Topical Imiquimod as a Treatment Option for Nodular Basal Cell Carcinoma: A Systemic Review. *J Cutan Med Surg*. 2020 Jun;24(5):495-503
29. O'Bryan KW, Ratner D. The role of targeted molecular inhibitors in the management of advanced nonmelanoma skin cancer. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30: 57–61
30. Kasper M, Jaks V, Hohl D, et al. Basal cell carcinoma – molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest* 2012; 122: 455–463
31. Aleksandar Sekulic¹, Michael R Migden, Anthony E Oro et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012 Jun; 366(23):2171-9
32. Aleksandar Sekulic¹, Michael R Migden², Nicole Basset-Séguin³ et al. Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer* 2017 May 16;17(1):332
33. James E Frampton¹, Nicole Basset-Séguin². Vismodegib: A Review in Advanced Basal Cell Carcinoma. *Drugs* 2018 Jul; 78(11):1145-1156
34. Ralf Gutzmer¹, James A Solomon². Hedgehog Pathway Inhibition for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *Target Oncol* 2019 Jun;14(3):253-267
35. Georgios Gaitanis, Christos Kalogeropoulos, Ioannis D Bassukas. Imiquimod can be combined with cryosurgery (immunocryosurgery) for locally advanced periocular basal cell carcinomas. *Br J Ophthalmol* 2011 Jun;95(6):890-2
36. Gaitanis G, Bassukas ID. Immunocryosurgery for basal cell carcinoma: An audit for combination, minimally invasive approach. *Treatment Strategies Dermatology* 2012; 2:56-60. http://tzmags.com/publications/cd22c9f9?page=574/cd22_c9f9/56 Accessed on 15/06/2020
37. George Gaitanis, Katon Nomikos, Christoforos Vlachos, et al. Immunocryosurgery for patients with therapeutically challenging basal cell carcinomas: report of two representative cases. *J Dermatolog Treat* 2012 Feb;23(1):70-1
38. Gaitanis G, Bassukas ID. Intralesional bevacizumab as in-add adjuvant to immunocryosurgery for locally advanced basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28:1117–1121.
39. Georgios Gaitanis¹, Ioannis D Bassukas². Immunocryosurgery for non-superficial basal cell carcinomas ≤ 20 mm in maximal diameter: Five-year follow-up. *J Geriatr Oncol* 2019 May;10(3):475-478
40. Jean L. Bolognia, Joseph L. Jorizzo, Julie V. Schaffer. Actinic keratosis, Basal cell carcinoma and Squamous cell carcinoma. *Dermatology*. 2012. Volume 2.1784-1792

41. Bath-Hextall F, Bong J, Perkins W, et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. *BMJ* 2004; 329(7468): 705–705
42. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1), CD003412 (2007)
43. Nagore E, Grau C, Molinero J, et al. Positive margins in basal cell carcinoma: relationship to clinical features and recurrence risk. A retrospective study of 248 patients. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol* 2003; 17(2):167–170
44. Gulleth Y, Goldberg N, Silverman RP et al. What is the best surgical margin for a basal cell carcinoma: A meta-analysis of the literature. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126:1222-1231
45. Charlotte M Clark¹, Megan Furniss, Julian M Mackay-Wiggan. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. *Am J Clin Dermatol.* 2014 Jul;15(3):197-216
46. Flávio Barbosa Luz¹, Camila Ferron¹, Gilberto Perez Cardoso¹. Surgical treatment of basal cell carcinoma: an algorithm based on the literature. *An Bras Dermatol* May-Jun 2015;90(3):377-83
47. Martin Glud¹, Silje Haukali Omland, Robert Gniadecki. Basal cell carcinoma surgery. *Ugeskr Laeger* 2016 May 16;178(20)
48. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, et al. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia I. Experience over 10 years. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:445-451
49. Glen M Bowen¹, George L White Jr, John W Gerwels. Mohs micrographic surgery. *Am Fam Physician* 2005 Sep 1;72(5):845-8
50. Ofer Arnon¹, Ronald P Rapini, Adam J Mamelak et al. Mohs micrographic surgery: current techniques. *Isr Med Assoc J* 2010 Jul;12(7):431-5
51. Alexander G. Marzuka¹, Samuel E. Book². Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, Histopathology, and Management. *Yale J Biol Med.* 2015 Jun; 88(2): 167–179
52. Christopher K Bichakjian, Thomas Olencki, Sumaira Z Aasi. Basal Cell Skin Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016 May;14(5):574-97
53. Alter M¹, Hillen U², Leiter U³, et al. Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015 Sep;13(9):863-75
54. C Salavastru^{1,2}, G S Tiplica^{3,4}, K Fritz^{3,5}. Laser treatment of basal cell carcinoma. *Hautarzt* 2018 Jan;69(1):10-16
55. Kenneth Gross¹, Leon Kircik, Greg Kricorian. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial Basal cell carcinoma: efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. *Dermatol Surg.* 2007 Apr;33(4):433-9

56. Bath-Hextall F, Ozolins M, Armstrong S, et al. Surgical excision versus imiquimod 5% cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): A multicentre, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:96-105
57. Butler DF, Parekh PK, Lenis A. Imiquimod 5% cream as adjunctive therapy for primary, solitary, nodular nasal basal cell carcinomas before Mohs micrographic surgery: a randomized, double blind, vehicle-controlled study. *Dermatol Surg* 2009; 35: 24–29
58. van der Geer S, Martens J, van Roij J, et al. Imiquimod 5% cream as pretreatment of Mohs micrographic surgery for nodular basal cell carcinoma in the face: a prospective randomized controlled study. *Br J Dermatol* 2012; 167: 110–115
59. Pederson H, Staples CJ, Housewright C. Topical Fluorouracil Therapy for Residual Superficial Basal Cell Carcinoma Following Mohs Micrographic Surgery. *J Drugs Dermatol*. 2020 May 1;19(5):485-486
60. Τσιρώνη Θ, Γαϊτάνης Γ, Μπασούκας ΙΔ. Ανοσοκρυστοχειρουργική: Σύνοψη ανασκόπησης και πρακτικός οδηγός εφαρμογής. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφροδ.* 2020;31:2 119-132, 202
61. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Basal Cell Skin Cancer. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf. Version 1.2020 October 24, 2019. Accessed on 15/06/2020.
62. Bader RS, James WD. Surgical Treatment of Basal Cell Carcinoma. *MedScape Oncology* 2015 <http://emedicine.medscape.com/article/277783-overview>. Accessed on 15/06/2020
63. Ioannis D Bassukas, Georgios Gaitanis. Combination of cryosurgery and topical imiquimod: Does timing matter for successful immunocryosurgery? *Cryobiology*. 2009 Aug;59(1):116-7
64. Gaitanis G, Alexopoulos EC, Bassukas ID. Cryosurgery is more effective in the treatment of primary, non-superficial basal cell carcinomas when applied during and not prior to a five week imiquimod course: A randomized, prospective, open-label study. *Eur J Dermatology* 2011; 21:952–958
65. Georgios Gaitanis¹, Areti Ganiatsa¹, Georgios Vartholomatos², et al. Immunocryosurgery for basal cell carcinoma: impact on circulating CD4⁺ CD25^{high} T regulatory cells and serum cytokines. *Eur J Dermatol* 2020 Oct 1;30(5):605-606
66. Gaitanis G, Nomikos K, Vava E et al. Immunocryosurgery for basal cell carcinoma: Results of a pilot, prospective, open-label study of cryosurgery during continued imiquimod application. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:1427–1431
67. Γαϊτάνης Γ, Γκανιάτσα Α, Τσιρώνη Θ, et al. Η ανοσοκρυστοχειρουργική στη θεραπεία του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφροδ.* 28:3 229-241
68. Knabel P, Cleaver L. Arbor cutis: Hyperkeratotic plaque secondary to the use of imiquimod for the treatment of squamous cell carcinoma in situ. *Dermatol Surg* 2013; 39:655–657

69. Nakuçi¹ M, Bassukas ID. Office-based treatment of basal cell carcinoma with immunocryosurgery: feasibility and efficacy. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2013; 22:35-8
70. Schön MP¹, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* 2008; 27:190–199
71. Sidbury R, Neuschler N, Neuschler E et al. Topically Applied Imiquimod Inhibits Vascular Tumor Growth In Vivo. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1205–1209
72. E Azizi¹, C Bucana, L Goldberg, et al. Perturbation of epidermal Langerhans cells in basal cell carcinomas. *Am J Dermatopathol* 1987 Dec;9(6):465-73
73. Kim J, Modlin RL, Moy RL, et al. (1995) IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 155:2240–7
74. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006 Aug; 108 (3): 804-11
75. Beyer M, Kochanek M, Giese T, et al. In vivo peripheral expansion of naïve CD4+ CD25^{high}FoxP3 regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; 107 (10): 3940-9
76. M P Schön¹, M Schön. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157 Suppl 2:8-13.
77. Urošević M, Dummer R, Conrad C et al. Disease-Independent Skin Recruitment and Activation of Plasmacytoid Predendritic Cells Following Imiquimod Treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1143-1153
78. Wolf IH, Kodama K, Cerroni L et al. Nature of inflammatory infiltrate in superficial cutaneous malignancies during topical imiquimod treatment. *Am J Dermatopathol* 2007; 29:237-241
79. K. Nomikos¹, E. Lampri², P. Spyridonos³, et al. Alterations in the inflammatory cells infiltrating basal cell carcinomas during immunocryosurgery. *Arch Dermatol Res* 2019 Aug;311(6):499-504
80. Igal Leibovitch¹, Shyamala C Huilgol, Dinesh Selva, et al. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol* 2005 Sep;53(3):452-7
81. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, et al. Cutaneous lip tumors treated with Mohs micrographic surgery: clinical features and surgical outcome. *Br J Dermatol*. 2005 Dec; 153 (6): 1147- 52
82. Peris K, Fargnoli MC, Garbe C et al. Diagnosis and treatment of basal cell carcinoma: European consensus–based interdisciplinary guidelines. *Eur J Cancer* 2019; 118:10-34

83. Nakuci M. Récidive de carcinome basocellulaire, traitée par immunocryochirurgie -Skin. 2017 <https://www.skin.be/fr/actualites/medical/recidive-de-carcinome-basocellulaire-traitee-par-immunocryochirurgie.html>. Accessed on 15/6/2020
84. de Oliveira ECV, da Motta VRV, Pantoja PC et al. Actinic keratosis – review for clinical practice. *Int J Dermatol* 2019; 58:400–407
85. Spyridonos P, Gaitanis G, Tzaphlidou M et al. Spatial fuzzy c-means algorithm with adaptive fuzzy exponent selection for robust vermilion border detection in healthy and diseased lower lips. *Comput Methods Programs Bio-med* 2014; 114:291–30
86. Shimizu I, Cruz A, Chang KH et al. Treatment of squamous cell carcinoma in situ: A review. *Dermatol Surg* 2011; 37(10):1394–14117
87. Gaitanis G, Mitsou G, Tsiouri G et al. Cryosurgery during imiquimod cream treatment ('immunocryosurgery') for Bowen's disease of the skin: A case series. *Acta Derm Venereol* 2010; 90:533–534
88. Gaitanis G, Bassukas ID. Immunocryosurgery - an effective combinational modality for Bowen's disease. *Dermatol Ther* 2016; 29:334–337
89. Benmously-Mlika R, Hammami-Ghorbel H, Koubaa W et al. Bowen's disease of the digit successfully treated with immunocryosurgery. *Int J Dermatol* 2013; 52:514–516
90. Gong HS, Cho JH, Roh YH et al. Bone Invasion by Squamous Cell Carcinoma In Situ (Bowen's Disease) of the Finger During Treatment With Imiquimod 5% Cream: Case Report. *J Hand Surg Am* 2010; 35:999–1002
91. Kwiek B, Schwartz RA. Keratoacanthoma (KA): An update and review. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74:1220– 1233
92. Carr RA, Houghton JP. Histopathologists' approach to keratoacanthoma: A multisite survey of regional variation in Great Britain and Ireland. *J Clin Pathol* 2014; 67:637–638
93. Takai, T. Advances in histopathological diagnosis of keratoacanthoma. *J Dermatol* 2017; 44:304–314
94. Gleich T, Chiticariu E, Huber M et al. Keratoacanthoma: A distinct entity? *Exp. Dermatol* 2016;. 25:85–91
95. Gaitanis G, Bassukas ID. Cryosurgery, Intralesional Methotrexate and Imiquimod for Keratoacanthoma: Tuning the Combination. *Case Rep Dermatol Med* 2019; 2019:3489748
96. Dika E, Fanti Pa, Lambertini M et al. Cutaneous squamous cell carcinoma progression during imiquimod treatment. *J Am Acad Dermatol* 2018; 79:e11-e12
97. Hengge UR, Schaller J. Successful Treatment of Invasive Squamous Cell Carcinoma Using Topical Imiquimod. *Arch. Dermatol* 2004; 140:404-406

98. Oster-Schmidt C. Two cases of squamous cell carcinoma treated with topical imiquimod 5%. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18:93-95
99. Martín-García RF. Imiquimod: An Effective Alternative for the Treatment of Invasive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Dermatol Surg*.2005; 31:371-374
100. Todorovic-Zivkovic D, Zalaudek I, Longo C et al. Successful treatment of two invasive squamous cell carcinomas with topical 5% imiquimod cream in elderly patients. *Eur J Dermatol* 2012; 22:579-80
101. Dirschka T, Schmitz L, Bartha Á. Clinical and histological resolution of invasive squamous cell carcinoma by topical imiquimod 3.75%: a case report. *EurJ Dermatol* 2016; 26:408-9
102. Konstantopoulou M, Lord MG, Macfarlane AW. Treatment of invasive squamous cell carcinoma with 5-percent imiquimod cream. *Dermatol Online J* 2006; 12:10
103. McLeod M, Choudhary S, Giannakakis G et al. Surgical treatments for lentigo maligna: A review. *Dermatol Surg* 2011; 37:1210-1228.
104. Ellis LZ, Cohen JL, High W et al. Melanoma in situ treated successfully using imiquimod after nonclearance with surgery: Review of the literature. *Dermatol Surg* 2012; 38:937-946
105. Bassukas ID, Gamvroulia C, Zioga A, et al. Cryosurgery during topical imiquimod: a successful combination modality for lentigo maligna. *Int J Dermatol*. 2008 May;47(5):519-21
106. Matas-Nadal C, Soria X, García-de-la-Fuente MR et al. Immunocryosurgery as monotherapy for lentigo maligna or combined with surgical excision for lentigo maligna melanoma. *J Dermatol* 2018; 45:564-570
107. Gaitanis G, Bassukas ID. Long-term outcomes of imiquimod-treated lentigo maligna: add on cryosurgery to induce inflammation and increase efficacy? *Clin Exp Dermatol* 2020; 45:272
108. Cotter MA, McKenna JK, Bowen GM. Treatment of lentigo maligna with imiquimod before staged excision. *Dermatol Surg* 2008; 34:147–151
109. Hyde MA, Hadley ML, Tristani-Firouzi P et al. A randomized trial of the off-label use of imiquimod, 5%, cream with vs without tazarotene, 0.1%, gel for the treatment of lentigo maligna, followed by conservative staged excisions. *Arch Dermatol* 2012; 148:592–596
110. Voulgari PV, Gaitanis G, Markatseli TE et al. In transit recurrence of merkel cell carcinoma associated with polyarthritis effectively treated with immunocryosurgery. *Acta Derm Venereol* 2014; 94:739-740
111. Georgiou S, Monastirli A, Pasmatzis E et al. Pyogenic granuloma: Complete remission under occlusive imiquimod 5% cream. *Clin. Exp. Dermatol*. 2008; 33:454- 456

112. Bassukas ID, Kuhnert A, Diepgen TL, et al. Clinically relevant differences between amelanotic malignant melanoma and granuloma pyogenicum. *Dermatologica* 1991; 182:81-84
113. Βαρθολομάτος Γεώργιος 2007. Κυτταρομετρία Ροής: Αρχές και Κλινικοερευνητικές Εφαρμογές της (Για τους ειδικευόμενους γιατρούς στη Βιοπαθολογία και Αιματολογία)
114. Rhee JS, Loberiza FR, Matthews BA, et al. Quality of life assessment in nonmelanoma cervicofacial skin cancer. *Laryngoscope* 2003; 113: 215-20
115. Shah M, Coates M. An assessment of the quality of life in older patients with skin disease. *Br J Dermatol* 2006; 154: 150-3
116. Weinstock MA, Lee KC, Chren MM, et al. Quality of life in the actinic neoplasia syndrome: the VA Topical Tretinoin Chemoprevention (VATTC) Trial. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61: 207-15
117. Gaulin C, Sebaratnam DF, Fernández-Peñas P. Quality of life in non-melanoma skin cancer. *Australas J Dermatol*. 2015; 56: 70-6
118. Rhee JS, Matthews BA, Neuburg M, et al. Skin cancer and quality of life: assessment with the Dermatology Life Quality Index. *Dermatol Surg*. 2004; 30: 525–9
119. Rhee JS, Matthews BA, Neuburg M, et al. Validation of a quality-of-life instrument for patients with nonmelanoma skin cancer. *Arch Facial Plast Surg*. 2006; 8: 314–8
120. de Vries E, Louwman M, Bastiaens M, et al. Rapid and continuous increases in incidence rates of basal cell carcinoma in the southeast Netherlands since 1973. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 634–8
121. G Rumpold¹, M Augustin, I Zschocke, et al. The validity of the Hornheide questionnaire for psychosocial support in skin tumor patients: a survey in an Austrian and German outpatient population with melanoma. *Psychother Psychosom Med Psychol*. 2001 Jan;51(1):25-33
122. Essers BAB, Nieman FHM, Prins MH, et al. Determinants of satisfaction with the health state of the facial skin in patients undergoing surgery for facial basal cell carcinoma. *Patient Educ Couns* 2006; 60: 179-86
123. Blackford S, Roberts D, Salek MS, et al. Basal cell carcinomas cause little handicap. *Qual Life Res* 1996; 5: 191-4
124. Steinbauer J, Koller M, Kohl E, et al. Quality of life in health care of non-melanoma skin cancer - results of a pilot study. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011; 9: 129-35
125. M Tilkorn¹, R Mawick, S Sommerfeld, et al. Quality of life of patients with malignant facial and skin tumors--development of a questionnaire and initial findings of a study. *Rehabilitation (Stuttg)* 1990 May;29(2):134-9

126. Gerhard Strittmatter¹, Marlene Tilkorn, Reinhard Mawick. How to identify patients in need of psychological intervention Recent Results Cancer Res. 2002; 160:353-61
127. Christina Brix¹, Christine Schleussner, Jürgen Füller, et al. The need for psychosocial support and its determinants in a sample of patients undergoing radiooncological treatment of cancer. J Psychosom Res. 2008 Dec;65(6):541-8
128. Sabine Fischbeck¹, Barbara H Imruck², Maria Blettner³ et al. Psychosocial Care Needs of Melanoma Survivors: Are They Being Met? PLoS One . 2015 Aug 21;10(8):e0132754
129. Helen G Kaporis¹, Emma Guttman-Yassky, Michelle A Lowes, et al. Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment. J Invest Dermatol. 2007 Oct;127(10):2391-8
130. Silje H. Omland¹, Patricia S. Nielsen², Lise M. R. Gjerdrum³, et al. Immunosuppressive Environment in Basal Cell Carcinoma: The Role of Regulatory T Cells. Acta Derm Venereol 2016; 96: 917–921
131. Skov L, Allen MH, Bang B, et al. Basal cell carcinoma is associated with high TNF-alpha release but nor with TNF-alpha polymorphism at position-308. Exp Dermatol 2003; 12: 772-6
132. Smeets NW¹, Krekels GA, Ostertag JU, et al. Surgical excision vs Mohs micrographic surgery for basal-cell carcinoma of the face: randomised controlled trial. Lancet 2004; 364: 1766–1772
- 133.
134. Sobjanek M, Zabłotna M, Bien E, et al. Clinical significance of IL-2 and IL-10 gene polymorphisms and serum levels in patients with basal-cell carcinoma. Biomark Med 2016; 10: 185-95.
132. Sobjanek M, Zablotna M, Bien E, et al. Clinical significance of IL-2 and IL-10 gene polymorphisms and serum levels of in patients with basal-cell carcinoma. Biomark Med 2016; 10: 185-95
133. Chren MM, Sahay AP, Bertenthal DS, et al. Quality-of-life outcomes of treatments for cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol 2007; 127: 1351-7
134. Rhee JS, Matthews BA, Neuburg M et al. The skin cancer index: clinical responsiveness and predictors of quality of life. *Laryngoscope* 2007; 117: 399–405
135. Chen T, Bertenthal D, Sahay A, et al. Predictors of skin-related quality of life after treatment of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. Arch Dermatol 2007; 143: 1386-92
136. Lanoue J, Goldenberg G. Basal Cell Carcinoma: A comprehensive review of existing and emerging nonsurgical therapies. J Clin Aesthet Dermatol. 2016; 9: 26-36
137. Ariza S, Espinosa S, Naranjo M. Nonsurgical therapies for basal cell carcinoma: A review. Actas Dermosifiliogr. 2017; 108: 809-17

138. Harrison JD, Young JM, Price MA, et al. What are the unmet supportive care needs of people with cancer? A systematic review. *Support Care Cancer* 2009; 17: 1117-28
139. Gerritsen MJ, De Rie MA, Beljaards RC, et al. Survey among patients with basal cell carcinoma in The Netherlands. *J Dermatolog Treat.* 2009; 20: 213-8