



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ

ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΠΑΥΛΙΔΗΣ

ΚΑΙ

ΜΟΝΑΔΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ

ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ WESTMINSTER, ΛΟΝΔΙΝΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Δρ. Σ. ΡΕΤΣΑΣ MD, FRCP

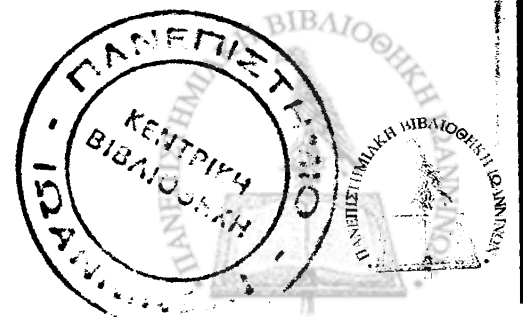
**"Η IN VITRO ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ S12363,
ΕΝΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΤΗΣ VINCA,
ΕΝΑΝΤΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ "**

ΧΡΗΣΤΟΣ ●. ΤΟΛΗΣ

ΕΠΙΜΕΛΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΣΧΟΛΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΛΕΥΚΩΣΙΑ

ΕΚΔΟΣΗ

ΟΡΙΣΜΟΣ

ΕΚΔΟΣΗ

356/2002



ΕΚΔΟΣΗ

ΕΚΔΟΣΗ

ΕΚΔΟΣΗ

ΕΚΔΟΣΗ



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΘΕΤΩΝ

Μιχάλης Παυλίδης, Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας,

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΚΑΙ

Βασίλης Μπαλάρης, Καθηγητής Χειρουργικής Κεφαλής και Τράχηλας,

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μιχάλης Μπίλιος, Επίκουρος Καθηγητής Οφθαλμολογίας,

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ν. 5343/92, άρθρο 202, παράγραφος 2





ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ!

ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ!



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων

**Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

Μέλη

**Βασιλική Μαλάμου Μήτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής
Ανατομικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

**Μιχάλης Μάλαμας, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**



ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΑΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Νικόλαος Παυλίδης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 2. Βασιλική Μαλάμου Μήτση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής
Ανατομικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 3. Μιχάλης Μάλαμας, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 4. Νίκη Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων**
- 5. Μάριος Μαρσέλος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων**
- 6. Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**
- 7. Μιχάλης Φατούρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΓΕΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΣΧΟΛΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΕΚΚΛΗΣΙΑΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΡΘΟΔΟΞΗ ΕΚΚΛΗΣΙΑ
ΕΠΙΣΚΟΠΙΚΟ ΤΟΜΕΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ



ΠΡΟΛΟΓΟΙ

**στην σύζυγό μου Ράνια
και στα παιδιά μου
Φώτη και Όλγα**

Αφιερώνεται

στους γονείς μου

Αριθμ. Πρωτ. 1070

Παράρτημα 1

Παράρτημα 2

Αριθμ. Πρωτ. 1070

Αριθμ. Πρωτ. 1070



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία 20 χρόνια αποτέλεσαν για την ογκολογία περίοδο μεγάλης προόδου. Οι μεγάλες εξελίξεις στην βιοχημεία, στην μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία και στην γενετική βοήθησαν ώστε να μελετήσουμε, να περιγράψουμε και να κατανοήσουμε ιδιαίτερα σύνθετες και έως τότε δυσνόητες λειτουργίες του φυσιολογικού και του καρκινικού κυττάρου.

Η περιγραφή των ογκογονιδίων και των οδών της απόπτωσης, η αγγειογένεση, η ανοσοθεραπεία, η θεραπεία με ολιγονουκλεοτίδια, η γονιδιακή θεραπεία και επίσης η βιοτεχνολογία είναι μόνο μερικά από τα πεδία στα οποία εστιάζει η σύγχρονη έρευνα.

Όμως, η πρόοδος αυτή και μεγάλος όγκος γνώσεων που αθροίστηκε μέχρι σήμερα δεν μεταφράστηκε ακόμη σε σημαντικό κλινικό όφελος για την πλειονότητα των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο.

Είναι προφανές ότι το πεδίο της έρευνας είναι ακόμη διάπλατα ανοικτό τόσο για την μελέτη της βιολογίας του νεοπλασματικού κυττάρου όσο και για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων δραστικών φαρμακευτικών ουσιών.

Το μελάνωμα αποτελεί μία απρόβλεπτη στην συμπεριφορά της κακοήθεια, επιθετική στην κλινική της εκδήλωση και εξαιρετικά ανθεκτική στην αντιμετώπισή της με τα φάρμακα που έχουμε σήμερα στην διάθεσή μας.

Η ανακάλυψη νέων δραστικών ουσιών κατά του μελανώματος αποτελεί μία ιδιαίτερη πρόκληση και σε αυτό το σκοπό στοχεύει η παρούσα μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Πρώτα και πάνω από όλους ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Ν. Παυλίδη. Είχα την τύχη να τον γνωρίσω από τα φοιτητικά μου χρόνια στα πρώτα βήματα που έκανα στην κλινική ιατρική. Αυτός με μύησε στη ογκολογία και από τότε και μέχρι σήμερα υπήρξε πάντοτε σπουδαίος δάσκαλος. Με τις παραινέσεις, την επιμονή και την υπομονή του ξεκίνησε και τελικά ολοκληρώθηκε αυτή η επίπονη εργασία.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Σ. Ρέτσα που με προθυμία δέχθηκε να εργασθώ στο τμήμα του, αλλά και για την αμέριστη συμπαράστασή του, τις διδακτικές και δημιουργικές συζητήσεις μας στο διάστημα που είχα την τύχη να εργάζομαι κοντά του στο νοσοκομείο Westminster του Λονδίνου.



Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεργάτη μου Ανδρέα (Andrew) Φωτίου ο οποίος πέρα από την εξαιρετική επιστημονική του καθοδήγηση στα πρώτα μου βήματα στην έρευνα υπήρξε πάνω από όλα σπάνιος και ανεκτίμητος φίλος.

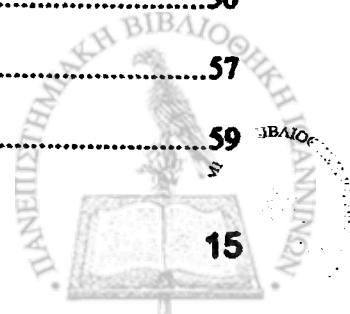
Ευχαριστώ τον αείμνηστο Ιωάννη Καμπέρη και το ίδρυμα Καμπέρη για την πολύτιμη και ανεπιφύλακτη συνδρομή του στο δύσκολο ξεκίνημα.

Ευχαριστώ την Δήμητρα Σταμούλη για τη βοήθειά της στην διαμόρφωση της δομής και της εμφάνισης του κειμένου.

Για τους γονείς μου οι λέξεις δεν αρκούν να τους ευγνωμονήσω, διότι στερήθηκαν και το ελάχιστο για να μου δώσουν τα μέγιστα.

Ράνια σε ευχαριστώ για την υπομονή σου μαζί μου στις ατελείωτες ώρες συγγραφής και για την συνεχή σου υποστήριξη.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	13
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	21
1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	22
1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ	22
1.2.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	23
1.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	28
1.3.1 ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΕΠΙ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΚΗΛΙΔΑΣ	28
1.3.2 ΕΠΙΠΟΛΗΣ ΕΞΑΠΛΟΥΜΕΝΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	29
1.3.3 ΟΖΩΔΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	30
1.3.4 ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ	30
1.4 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	31
1.5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	35
1.5.1 ΣΤΑΔΙΟ I ΚΑΙ II ΚΑΤΑ AJCC	35
1.5.2 ΔΟΡΥΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	37
1.5.3 ΣΤΑΔΙΟ III (ΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΗ ΝΟΣΟΣ)	38
1.5.4 ΜΕΛΑΝΩΜΑ ΜΕ ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	39
1.5.5 ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	44
1.5.6 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ -ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΙ	54
1.6 ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΗΣ VINCA ROSEA	55
1.6.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ	55
1.6.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ	56
1.6.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΩΝ	56
1.6.4 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΑΡΙΑ	57
1.6.5 ΑΛΚΑΛΟΕΙΔΗ ΤΗΣ VINCA ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΑΡΙΑ	59



1.7	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ: ΕΝΑ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ	62
1.7.1	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	63
1.7.2	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	64
1.7.3	ΠΟΛΥΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ (MULTIDRUG RESISTANCE, MDR)	65
1.8	Η IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	67
1.8.1	ΓΕΝΙΚΑ.....	67
1.8.2	ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	67
1.8.3	ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (NCI) ΤΩΝ ΗΠΑ	68
2.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	75
2.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	77
2.2	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
2.2.1	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	79
2.2.2	ΦΑΡΜΑΚΑ	81
2.2.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	81
2.2.4	ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΤΤ.....	81
2.2.5	ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΩΝΟΓΕΝΟΥΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (CLONOGENIC ASSAY)	84
2.2.6	ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	85
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	87
3.1.1	ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ S12363 ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΜΤΤ.	89
3.1.2	ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ S12363 ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΚΛΩΝΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.	96
3.1.3	ΕΠΔΡΑΣΗ ΤΟΥ S12363 ΣΤΗΝ ΠΡΟΟΔΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	101
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
5.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	115
6.	SUMMARY AND CONCLUSIONS	119
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	123

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επίπτωση του κακοήθους μελανώματος αυξάνεται παγκοσμίως με συχνότητα περίπου 5% ετησίως. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου (American Cancer Society - ACS), το 1998 διαγνώσθηκαν 41.600 νέα περιστατικά μελανώματος στις ΗΠΑ, και κατεγράφησαν 7.300 θάνατοι. Ιδιαίτερα ανησυχητικές είναι οι προβλέψεις της ACS το έτος 2000 σύμφωνα με τις οποίες περίπου 1 στα 75 άτομα θα διατρέχει κίνδυνο να αναπτύξει μελάνωμα στην διάρκεια της ζωής του. Γίνεται λοιπόν προφανές ότι το μελάνωμα αποτελεί σοβαρό ιατρικό αλλά και σημαντικό κοινωνικό πρόβλημα, καθότι προσβάλλει κυρίως νέα και μέσης ηλικίας άτομα.

Σήμερα η ριζική θεραπεία του μελανώματος βασίζεται κυρίως στην έγκαιρη διάγνωση και πρώιμη χειρουργική αντιμετώπιση. Σε άτομα στα οποία η νόσος δεν είναι πλέον ιάσιμη χειρουργικά, η χρήση συστηματικής θεραπείας είναι αναγκαιότητα και διάφοροι θεραπευτικοί χειρισμοί έχουν δοκιμασθεί. Σε άτομα υψηλού κινδύνου για υποτροπή (στάδιο IIB και III), η χορήγηση συμπληρωματικής θεραπείας αποτελεί ακόμη αμφιλεγόμενο και αναπάντητο ερώτημα. Τα αρχικώς ενθαρρυντικά αποτελέσματα με IFN- α 2b τέθηκαν υπό αμφισβήτηση και επανακρίνονται, ενώ η χρήση κυτταροστατικών δεν τυγχάνει γενικής αποδοχής.

Σημαντική κινητικότητα παρατηρείται στο θέμα της ανοσοθεραπείας αφορούσα κυρίως την προκλινική αλλά και την κλινική έρευνα εμβολίου, με στόχο την πρόληψη σε άτομα υψηλού κινδύνου αλλά και την θεραπεία του μελανώματος.

Η αντιμετώπιση του μεταστατικού μελανώματος δεν έχει κάνει ουσιαστική πρόοδο, και οι μέχρι τώρα δοκιμασθέντες νέοι κυτταροτοξικοί παράγοντες δεν μπόρεσαν να βελτιώσουν την περιορισμένη κλινική δραστικότητα της ντακαρμπαζίνης. Τα αισιόδοξα μηνύματα των πρώτων κλινικών μελετών με ανοσο-χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς δεν επαληθεύθηκαν σε τυχαιοποιημένες μελέτες. Λόγω της απουσίας δραστικής συστηματικής θεραπείας το μεταστατικό μελάνωμα εξακολουθεί να αποτελεί ανοικτό πεδίο έρευνας και κλινικής δοκιμασίας νέων θεραπευτικών παραγόντων.

SECRET

Γ. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1.1 Ιστορική Αναδρομή

Επιδημιολογικές παρατηρήσεις αναφέρουν ότι 80% έως 90% των ανθρωπίνων καρκίνων είναι δυνατόν να οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και ότι 30% έως 40% των νεοπλασιών μπορούν να αποδοθούν σε διαιτητικές συνήθειες¹, γεγονός που θα δικαιολογούσε την υψηλή επίπτωση της νόσου στην εποχή μας.

Όμως φαίνεται ότι ο καρκίνος δεν είναι νόσος μόνο του σύγχρονου πολιτισμού, διότι τόσο από αναφορές σε αρχαία γραπτά αλλά και από αρχαιολογικά ευρήματα φαίνεται ότι νεοπλασίες υπήρχαν και στην αρχαιότητα, σε μικρότερη όμως για διάφορους λόγους συχνότητα.

Στο Περού βρέθηκε μούμια των Ίνκας, που χρονολογείται τον 4^ο π.Χ. αιώνα, στην οποία παρατηρήθηκαν εκτεταμένες οστικές μεταστάσεις στο κρανίο και στα άκρα προερχόμενες από κακόηθες μελάνωμα, όπως επίσης παρατηρήθηκαν και εστίες μελανωτικών μαζών στο δέρμα. Το εύρημα αυτό είναι αρκετά σπάνιο και παράδοξο ταυτοχρόνως, εάν κανείς υπολογίσει την σχετικώς μικρή επίπτωση μελανώματος σε πληθυσμούς με σκουρόχρωμα δερματικά χαρακτηριστικά².

Αναφορές και περιγραφές νεοπλασιών όπως και του μελανώματος θεωρείται από ορισμένους μελετητές ότι υπάρχουν στους αιγυπτιακούς παπύρους όπως αυτόν του Eber (περίπου 1502 π.Χ.), αν και οι ισχυρισμοί αυτοί αμφισβητούνται από άλλους οι οποίοι πιστεύουν ότι αποτελούν απλά περιγραφές οιδημάτων ή κισμών³.

Μελετώντας την ιστορία της ιατρικής, θα συναντήσουμε για πρώτη φορά τους όρους "καρκίνος" ή "καρκίνωμα" στα συγγράμματα του Ιπποκράτη (460-375 π.Χ.). Οι όροι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν όγκους τόσο της ρινός, τραχήλου, μαστού, μήτρας αλλά και του μελανώματος.

Ακολούθησε ο Ρούφος ο Εφέσσιος (60-120 μ.Χ.), ο Έλληνας ιατρός που ήταν γνωστός στους αρχαίους για τις περιγραφές των μηνίγγων, του οπτικού χιάσματος, του συγχρονισμού των καρδιακών παλμών και του σφυγμού, της ποδάγρας και ορισμένων καρκίνων μεταξύ των οποίων και του μελανώματος. Στο πέρασμα των αιώνων πολλοί άλλοι ιατροί περιέγραψαν κακοήθεις μελαγχρωματικούς όγκους του δέρματος, όμως μόλις τον 18^ο αιώνα έγιναν πιο ουσιαστικά επιστημονικά βήματα στην περιγραφή και στη θεραπεία του κακοήθους μελανώματος. Το 1806 ο Laennec σε μια ομιλία του στην Faculte de Medicine στο Παρίσι, έκανε λόγο για "la melanose", περιγράφοντας το κακόηθες μελάνωμα. Η πρώτη περιγραφή μελανώματος στην αγγλική βιβλιογραφία

γίνεται από τον Norris⁴ και χρονολογείται από το 1820. Το 1838 ο Robert Carswell χρησιμοποίησε τον όρο "μελάνωμα" για να περιγράψει αυτήν την κακοήθεια. Το 1858 ο Pemberton για πρώτη φορά εφάρμοσε μια εκτεταμένη και εις βάθος χειρουργική εξαίρεση μελανώματος, φέροντας τα όρια της εξαίρεσης έως την υποκείμενη περιτονία και παράλληλα πραγματοποιώντας σύστοιχο λεμφαδενικό καθαρισμό. Το 1908 ο Pringle για πρώτη φορά υιοθέτησε την αρχή της "κατά συνέχεια εξαίρεσης και εκτομής" ή της "en bloc" αφαίρεσης που να περιλαμβάνει το πρωτοπαθές μελάνωμα, τους επιχώριους λεμφαδένες και μια ευρεία περιοχή δέρματος, υποδορίου λίπτους και περιτονίας μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των διηθημένων λεμφαδένων.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς του μελανώματος, όμως η πρόοδος στη θεραπεία του είναι πιο πτωχή και επικεντρώνεται κυρίως στην έγκαιρη διάγνωση και πρώιμη χειρουργική εξαίρεση.

1.2 Επιδημιολογία μελανώματος

1.2.1 Γενικά

Έως τις αρχές του αιώνα το μελάνωμα θεωρείτο σπάνια νόσος. Για ασαφείς λόγους παρουσίασε ραγδαία αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες (έως 700% μέσα στα τελευταία 40 χρόνια) και σήμερα αποτελεί την 7^η κατά σειρά συχνότητας νεοπλασία στις ΗΠΑ⁵.

Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία των ΗΠΑ, το 1935 μόνο 1 στα 1500 άτομα διέτρεχαν κίνδυνο να αναπτύξουν μελάνωμα στην διάρκεια της ζωής τους. Το 1980 ο κίνδυνος αυξήθηκε σε 1 στα 250 άτομα, το 1987 σε 1 στα 135, το 1991 σε 1 στα 105, ενώ για το έτος 2000 η επίπτωση αναμένεται να είναι 1 στα 75 άτομα. Ο ρυθμός αύξησης είναι ο ταχύτερος όλων των άλλων νεοπλασιών με εξαίρεση τον καρκίνο του πνεύμονος στις γυναίκες (για άτομα άνω των 65 ετών) και τον καρκίνο του προστάτη (για άτομα κάτω των 65 ετών)^{6,7}.

Περίπου 40.000 νέα περιστατικά μελανώματος καταγράφονται ετησίως στις ΗΠΑ, με τάση ανόδου, και 7.000 πεθαίνουν στο ίδιο χρονικό διάστημα. Στη Βρετανία η επίπτωση του μελανώματος είναι πλέον συχνότερη, από αυτή της νόσου του Hodgkin⁸. Παρόμοια στοιχεία αναφέρονται και από τις ΗΠΑ με το μελάνωμα να προηγείται πλέον σε συχνότητα των όγκων του εγκεφάλου, του λάρυγγα, φάρυγγα και του θυρεοειδούς.

Παρά τη δραματική αύξηση της επίπτωσης και νοσηρότητας του κακοήθους μελανώματος, η θνησιμότητα από τη νόσο φαίνεται να ακολουθεί ελαφρώς

χαμηλότερους ρυθμούς. Προς το παρόν το μελάνωμα ευθύνεται για το 1% περίπου των θανάτων από καρκίνο. Η πενταετής επιβίωση ασθενών με μελάνωμα όλων των σταδίων στις ΗΠΑ αυξήθηκε από 60% στα έτη 1960-1963 σε 84% μεταξύ των ετών 1983-1989, με υπεροχή των γυναικών έναντι των ανδρών και των λευκών έναντι των μαύρων⁸. Αυτό οφείλεται αφενός μεν στην ευαισθητοποίηση του πληθυσμού για πρόωμη διάγνωση και αφετέρου στην έγκαιρη διάγνωση λεπτών και λιγότερο διηθητικών βλαβών^{9,11}. Η πρόωμη διάγνωση και χειρουργική αφαίρεση του μελανώματος μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη ίαση. Στην περίπτωση διηθητικής και μεταστατικής νόσου η χημειοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία δεν έχουν καταφέρει μέχρι στιγμής να δώσουν ριζικά αποτελέσματα, παρά την μικρή ίσως παράταση του προσδόκιμου επιβίωσης. Νέοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες δοκιμάζονται, ενώ η έρευνα επεκτείνεται και στη γονιδιακή θεραπεία και την παρασκευή εμβολίων.

1.2.2 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος

Ο αιτιολογικός παράγοντας για την δημιουργία του μελανώματος παραμένει ακόμη άγνωστος. Ως εκ τούτου η γνώση μας για την αιτία του προέρχεται από επιδημιολογικά κυρίως δεδομένα. Έτσι, παράγοντες όπως περιβαλλοντικοί, γενετικοί, φυλετικοί, ορμονικοί και ιδιοσυγκρασιακοί έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί και φαίνεται πράγματι να συσχετίζονται με ανάπτυξη μελανώματος, αν και ασαφείς παραμένουν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις και συσχετίσεις¹²⁻¹⁶.

1.2.2.1 Η ηλιακή ακτινοβολία

Ο ρόλος της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας (UV) στην ανάπτυξη του κακοήθους μελανώματος είναι για πολλούς αμφιλεγόμενης σημασίας, καθότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχει αξιόπιστο πειραματικό πρότυπο που να αποδεικνύει τη σχέση ανάπτυξης μελανώματος και ηλιακής ακτινοβολίας. Ενδείξεις όμως για την συμμετοχή της UV υπάρχουν και προέρχονται τόσο από επιδημιολογικές μελέτες όσο και από κλινικές παρατηρήσεις¹⁷. Επίσης, παρατηρήσεις ότι το DNA είναι ευαίσθητο σε βλάβες προκαλούμενες από την ηλιακή ακτινοβολία καθώς και ατελή πειραματικά πρότυπα στα οποία επιχειρήθηκε η αναπαραγωγή της νόσου σε πειραματόζωα μετά από παρατεταμένη έκθεση σε UVB ακτινοβολία (290-320nm)^{18,19}, προβάλλουν την έκθεση στον ήλιο ως τον σημαντικότερο ίσως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος, στους Καυκάσιους τουλάχιστον πληθυσμούς. Πιθανολογείται ότι η ηλιακή

ακτινοβολία έχει δράση εναρκτή, προαγωγού η και τα δύο, αλλά σε συνδυασμό με ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA και με μειωμένη ανοσολογική ανταπόκριση.

Οι τρόποι έκθεσης στον ήλιο ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες: α) διαλείπουσα, β) επαγγελματική, γ) αθροιστική και δ) ηλιακά εγκαύματα, με βασική δυσκολία στην ταξινόμηση αυτή την ποσοτικοποίηση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. Όμως, από τις ήδη δημοσιευμένες εργασίες μπορούν να εξαχθούν ορισμένα σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την σημασία της έκθεσης στον ήλιο και την επίπτωση του μελανώματος. Παρατηρείται σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ μελανώματος και υψηλών επιπέδων διαλείπουσας έκθεσης με σχετικό κίνδυνο που ανέρχεται σε 1.87 και αναφέρεται σε μελέτες από την Αυστραλία, τον Καναδά και την Ευρώπη²⁰⁻²². Αντιθέτως, η έκθεση στον ήλιο για επαγγελματικούς λόγους, σε γεωγραφικές περιοχές με ενδιάμεση επίπτωση μελανώματος, φαίνεται ότι έχει ουδέτερη συσχέτιση (η ακόμη και αρνητική συσχέτιση) με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος και εμμέσως θεμελιώνει την προστατευτική αξία της χρόνιας έκθεσης στον ήλιο^{15,20,23}. Σε μια μεγάλη μελέτη από το Queensland της Αυστραλίας, όπου υπάρχει η υψηλότερη περιβαλλοντική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάπτυξης μελανώματος τόσο στην διαλείπουσα όσο και στην χρόνια επαγγελματική έκθεση, υποστηρίζοντας την άποψη ότι σε αυτά τα υψηλά επίπεδα έκθεσης ο διαχωρισμός μεταξύ διαλείπουσας και χρόνιας έκθεσης εκλείπει²⁴. Το ηλιακό έγκαυμα συσχετίζεται ισχυρά με την επίπτωση του μελανώματος ιδιαίτερα όταν συμβαίνει σε νεαρή ηλικία, με σχετικό κίνδυνο εάν συμβεί στην παιδική ηλικία 1.95, εάν συμβεί στην εφηβεία 1.73 και συνολικό κίνδυνο για όλη την ζωή 1.91^{13,25}. Οι περισσότεροι συμφωνούν πως η πλέον κρίσιμη περίοδος είναι η ηλικία από 10 έως 24 ετών, περίοδος κατά την οποία αναπτύσσονται οι περισσότεροι μελανοκυτταρικοί σπίλοι του σώματος. Νεαροί μετανάστες σε χώρες με μεγάλη ηλιοφάνεια (π.χ. Αυστραλία) παρουσιάζουν συχνότερα μελάνωμα από τους ενήλικες μετανάστες. Ορισμένοι μάλιστα ερευνητές συνδύασαν τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος με τον αριθμό των ηλιακών εγκαυμάτων, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής²⁴. Εδώ καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει η «ποιότητα» του δέρματος, δηλαδή δέρμα που εμφανίζει ερύθημα και έγκαυμα με ελάχιστη έκθεση στον ήλιο κινδυνεύει περισσότερο από δέρμα που «μαυρίζει». Η επίπτωση του μελανώματος στους Καυκάσιους είναι, παραδόξως, αντιστρόφως ανάλογη προς το γεωγραφικό πλάτος διαμονής. Άτομα που διαμένουν στη Βόρειο Ευρώπη παρουσιάζουν συχνότερα μελάνωμα από τους μεσογειακούς πληθυσμούς. Επίσης ο γηγενής πληθυσμός χωρών

με μεγάλη ηλιοφάνεια (π.χ. χώρες με γεωγραφικό πλάτος κοντά στον ισημερινό) και άτομα με μεγάλη χρονική έκθεση στον ήλιο (π.χ. αγρότες) δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένη επίπτωση της νόσου. Σε αυτό πιθανόν να συνεισφέρουν τα διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μεταξύ των βόρειων και νότιων πληθυσμών, ενώ και άλλοι άγνωστοι μέχρι στιγμής παράγοντες πιθανώς να συμμετέχουν.

Η έκθεση στον ήλιο συνδέεται περισσότερο με ορισμένους τύπους μελανώματος, και συγκεκριμένα με το μελάνωμα επί κακοήθους κηλίδας (Lentigo Maligna Melanoma - LMM) και σε κάποιο βαθμό με το επιπολής εξαπλούμενο μελάνωμα (Superficial Spreading Melanoma - SSM). Για το οζώδες μελάνωμα (Nodular Melanoma) και το μελάνωμα των ακρών (Acral Lentiginous Melanoma - LMM) η συσχέτιση - εάν υπάρχει - παραμένει απροσδιόριστη. Το SSM, που είναι ο συχνότερος τύπος μελανώματος, έχει συσχετισθεί με την έντονη διαλείπουσα έκθεση και οι βλάβες εντοπίζονται κυρίως στον κορμό και στα κάτω άκρα. Αντιθέτως, το LMM που αναπτύσσεται στις ηλιοεκτεθέμενες περιοχές της κεφαλής και του τραχήλου, συσχετίζεται με την μακροχρόνια αθροιστική έκθεση στον ήλιο.

Η χρήση αντηλιακών κρεμών αντίθετα με την κοινή αντίληψη, δεν φαίνεται να παρέχει την αναμενόμενη προστασία όπως αποδεικνύεται και από την μελέτη της EORTC²⁶. Έτσι, άτομα που χρησιμοποιούσαν κοινές αντηλιακές κρέμες διατρέχουν σχετικό κίνδυνο για ανάπτυξη μελανώματος 1.5, μάλιστα ο κίνδυνος αυτός για χρήστες κρεμών με βάση το ψωραλένιο ανέρχεται σε 2.28, και μάλιστα για άτομα που δύσκολα μαυρίζουν και κάνουν χρήση ψωραλενίου ο κίνδυνος ανέρχεται σε 4.45. Η μελέτη αυτή θεωρεί ότι οι αντηλιακές κρέμες δεν προστατεύουν από το μελάνωμα διότι επιβραδύνουν το ηλιακό έγκαυμα και παρατείνουν την έκθεση στις βλαβερές υπερκώδεις ακτινοβολίες.

1.2.2.2 Φυλετικά χαρακτηριστικά

Το μελάνωμα είναι κατεξοχήν νόσος της λευκής φυλής. Με μόνη εξαίρεση τους Ιάπωνες, που παρουσιάζουν τα τελευταία χρόνια μια αύξηση στη συχνότητα του μελανώματος, οι υπόλοιπες έγχρωμες φυλές διατηρούν την επίπτωση της νόσου σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Στους μαύρους και τους ασιάτες το μελάνωμα είναι σπάνιο και εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις παλάμες και τα πέλματα. Η επιδερμίδα των Αφρικο-Αμερικανών έχει φυσικό δείκτη προστασίας 13.4, ενώ η μελανίνη της επιδερμίδας τους απορροφά αποτελεσματικά την διπλάσια ποσότητα υπερκώδους ακτινοβολίας Β (UVB) σε σχέση με τους λευκούς²⁷. Ορισμένα μάλιστα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

συνδέονται με αυξημένη επίπτωση μελανώματος. Τέτοια είναι τα ανοιχτόξανθα ή κόκκινα μαλλιά, το λευκό δέρμα με εφηλίδες και τα μπλε ή πράσινα μάτια, από αυτά το χρώμα των μαλλιών φαίνεται υπερισχύει έναντι των υπολοίπων. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνδέονται με την αντίδραση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία και την ευκολία ανάπτυξης εφηλίδων και σπύλων²⁸.

1.2.2.3 Επάγγελμα και κοινωνική κατάσταση

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει άμεση συσχέτιση της επίπτωσης του κακοήθους μελανώματος με την κοινωνικο-οικονομική κατάσταση των ασθενών^{29,30}. Αυξημένη επίπτωση και θνησιμότητα παρατηρήθηκε σε "ανώτερα" επαγγέλματα όπως σε υπαλλήλους, δασκάλους, πυροσβέστες και αρχιτέκτονες. Οι ερμηνείες που δόθηκαν σε αυτό το παράδοξο είναι ότι τα άτομα αυτά έχουν την οικονομική άνεση να ταξιδεύουν σε χώρες με μεγάλη ηλιοφάνεια όπου και εκτίθενται διαλειπόντως στην υπεριώδη ακτινοβολία προκαλώντας ηλιακά εγκαύματα²³. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει και μία μελέτη από την Σουηδία, από την οποία επίσης διαφαίνεται ότι άτομα υψηλότερης κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης ταξιδεύουν πολύ πιο συχνά σε χώρες της Νοτίου Ευρώπης στη διάρκεια των διακοπών τους σχετικά με άτομα χαμηλότερης κοινωνικο-οικονομικής κατάστασης και γι' αυτό διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος³¹. Αντιθέτως, στη Νορβηγία η οποία έχει την υψηλότερη επίπτωση μελανώματος στην Ευρώπη, παρατηρείται μια θετική συσχέτιση μελανώματος και διακοπών σε χώρες με μεγάλη ηλιοφάνεια, ενώ αρνητική είναι συσχέτιση με το εισόδημα²⁸, ενώ και σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε συσχέτιση της διαλείπουσας έκθεσης στον ήλιο και ανάπτυξης κακοήθους μελανώματος³². Άτομα που εργάζονται σε γραφείο αναπτύσσουν πιο συχνά μελάνωμα σε περιοχές του σώματος που συνήθως είναι καλυμμένες. Μία άλλη ερμηνεία για το γεγονός αυτό είναι ότι τα άτομα αυτά έχουν μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση σε θέματα υγείας και κατά συνέπεια η διάγνωση γίνεται και πιο έγκαιρα³⁰. Παρόμοια θετική κοινωνικο-οικονομική συσχέτιση έχει βρεθεί και στον καρκίνο του μαστού, ενώ αρνητική συσχέτιση βρέθηκε στον καρκίνο του στομάχου και τον καρκίνο του πνεύμονα³³.

1.2.2.4 Οικογενές μελάνωμα

Σε 8% έως και 12% των ασθενών με μελάνωμα ανευρίσκεται συγγενής πρώτου βαθμού με την ίδια νόσο³⁴. Μάλιστα οι ασθενείς με οικογενές μελάνωμα έχουν κατά μέσο

όρο λεπτότερες βλάβες και καλύτερη πρόγνωση. Σε ένα ποσοστό αυτών των ασθενών το μελάνωμα αναπτύσσεται χωρίς να προϋπάρχει δερματολογική αλλοίωση. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις το μελάνωμα αναπτύσσεται σε έδαφος του συνδρόμου των δυσπλαστικών σπύλων (Dysplastic nevus syndrome – DNS), μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την πρώιμη ανάπτυξη μεγάλου αριθμού άτυπων σπύλων. Οι πρώτες σύγχρονες μελέτες που πιθανολογούν την ύπαρξη κληρονομικότητας στο μελάνωμα προέρχονται από τον Cawley³⁵ ο οποίος περιέγραψε έναν πατέρα και τα δύο του παιδιά που εμφάνισαν μελάνωμα. Ο τρόπος με τον οποίο κληρονομείται η νόσος φαίνεται να είναι αρκετά πολύπλοκος και πιθανότατα συμμετέχουν αρκετά γονίδια, περιβαλλοντικές επιδράσεις, μεταλλάξεις και αθροιστικά γενετικά ελλείμματα.

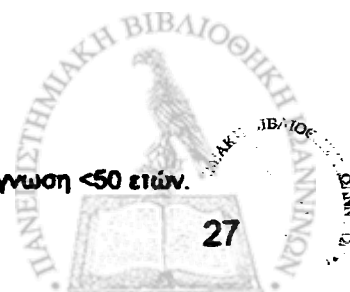
Το 1994 οι Kamb και Nobori^{36,37} ανακάλυψαν ότι το γονίδιο p16/CDKN2A, που συμμετέχει στην ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην S, παρουσιάζει γεννητικές μεταλλάξεις (germline mutations) στο 20-40% των οικογενειών με ισχυρό ιστορικό μελανώματος¹. Εντούτοις, παρά το γεγονός ότι η δοκιμασία ανίχνευσης είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμη, δεν συνιστάται ακόμη η χρήση της σε επίπεδο ρουτίνας λόγω της αβέβαιης ακόμη ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση πάντως θετικής δοκιμασίας, η συνιστώμενη πρακτική είναι ριζική αλλαγή του τρόπου ζωής προς αποφυγή καταστάσεων που αυξάνουν τον σχετικό κίνδυνο νόσησης όπως αποφυγή έκθεσης στον ήλιο (UVB) ή συμμετοχή σε μελέτες χημειοπροφύλαξης^{38,39}.

1.2.2.5 Ορμονικοί παράγοντες

Η επίπτωση της νόσου είναι ίση στα δύο φύλα. Υπάρχει μια μικρή υπεροχή των γυναικών πριν την ηλικία των 40 ετών, η οποία αντισταθμίζεται από μια αντίστοιχη υπεροχή των ανδρών μετά τα 50 έτη. Οι γυναίκες παρουσιάζουν καλύτερη επιβίωση, τουλάχιστον για μελάνωμα σταδίου I, ενώ η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια πριν την εφηβεία.

Η μελάγχρωση του δέρματος (μέλασμα) που εμφανίζεται στην εγκυμοσύνη και μετά τη λήψη αντισυλληπτικών οδήγησε στην έρευνα για την παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε κύτταρα μελανώματος. Πάντως η χρήση

¹ Αφορούν οικογένειες με >3 προσβεβλημένα μέλη ή 2, ένα των οποίων με ηλικία κατά την διάγνωση <50 ετών.



ταμοξιφαίνης και οξικής κυτπροτερόνης σε μεταστατικό μελάνωμα δεν έδωσε δυστυχώς ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

1.2.2.6 Μελανοκυτταρικοί σπίλοι

Επιδημιολογικά περίπου το ένα τρίτο των μελανωμάτων σχετίζεται με την ύπαρξη κάποιου σπίλου ή υπόλειμμα σπίλου. Η τάση για ανάπτυξη σπύλων είναι συνάρτηση της φυλής και του χρώματος του δέρματος. Πολλαπλές case-control μελέτες για το μελάνωμα στην Αυστραλία^{24,40}, στην Ευρώπη^{41,42} και την Β. Αμερική²⁹ επιβεβαίωσαν ότι ο μεγάλος αριθμός κοινών και άτυπων σπύλων αποτελεί ισχυρότατο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Ο αριθμός των σπύλων συσχετίζεται κυρίως με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία κατά την παιδική ηλικία παρά στην ενήλικη ζωή⁴³. Η ανάπτυξη πολλαπλών σπύλων ελέγχεται γενετικώς, όπως φαίνεται από μελέτες σε άτομα με οικογενές μελάνωμα⁴⁴.

Από τους συγγενείς σπύλους το μεγαλύτερο κίνδυνο παρουσιάζουν οι γιγαντιαίοι ή τριχωτοί μελανοκυτταρικοί σπίλοι. Η παρουσία πολλαπλών σπύλων (>50 σπίλοι μεγέθους >2mm) αυξάνει κατά 64 φορές τον κίνδυνο για μελάνωμα, ιδιαίτερα όταν οι σπίλοι είναι δυσπλαστικοί⁴⁵.

1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά μελανώματος

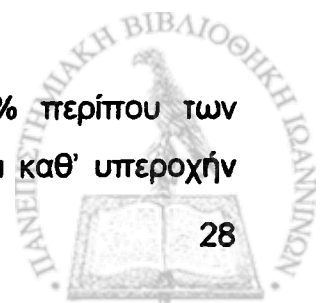
Διακρίνονται τέσσερις βασικοί κλινικοί τύποι μελανώματος :

1. Μελάνωμα επί κακοήθους κηλίδας του Hutchinson (Lentigo Maligna Melanoma-LMM)
2. Επιπολής εξαπλούμενο μελάνωμα (Superficial Spreading Melanoma-SSM.)
3. Οζώδες μελάνωμα (Nodular Melanoma-NM)
4. Κακόηθες μελάνωμα των άκρων (Acral Lentiginous Melanoma-ALM)

Κάθε τύπος έχει ιδιαίτερα μορφολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά που θα περιγράψουν εν συντομία.

1.3.1 Μελάνωμα επί κακοήθους κηλίδας

Το μελάνωμα επί κακοήθους κηλίδας αντιπροσωπεύει το 5% περίπου των μελανωμάτων. Είναι η πιο καλοήθους μορφή της νόσου και προσβάλλει καθ' υπεροχήν



ηλικιωμένα άτομα (55-80 ετών). Έχει την αμεσότερη συσχέτιση με την ηλιακή ακτινοβολία και αναπτύσσεται επί προϋπάρχουσας επίπεδης μελαγχρωματικής βλάβης - "κακοήθους κηλίδας" (Lentigo Maligna)⁴⁶.

Η βλάβη εντοπίζεται στο πρόσωπο (παρειές), το λαιμό και τα άνω άκρα, συνήθως σε συνδυασμό με συνυπάρχουσες εκφυλιστικές αλλοιώσεις από τον ήλιο. Έχει μακρά περίοδο οριζόντιας επιπολής επέκτασης από 3 έως 15 χρόνια. Κλινικά χαρακτηρίζεται από μεγάλη επίπεδη βλάβη που φθάνει συχνά τα 3-6 cm και φέρει στην επιφάνεια της ανωμάλως κατανομημένα οζίδια. Εμφανίζει μεγάλη χρωματική ποικιλία με περιοχές μαύρου, καφέ, γκρι-μπλε ή λευκού χρώματος. Ιστολογικά παρατηρείται πολυμορφισμός των μελανοκυττάρων στις διάφορες περιοχές της βλάβης. Στις καφεοειδείς περιοχές υπάρχει αυξημένος αριθμός μελανοκυττάρων που διατάσσονται κατά μήκος της βασικής στιβάδας. Απ' αυτά, άλλα είναι φυσιολογικού μεγέθους, άλλα μεγαλύτερα από το φυσιολογικό και άλλα άτυπα. Στις επίπεδες μαύρες περιοχές πολυάριθμα μελανοκύτταρα ποικίλης μορφολογίας αντικαθιστούν τη βασική στιβάδα σχηματίζοντας δική τους στιβάδα ανάμεσα στα ακανθωτά κύτταρα και το θηλώδες χόριο, με αποτέλεσμα υπερμελάγχρωση και ατροφία των ακανθωτών κυττάρων. Το θηλώδες χόριο εμφανίζει έντονη διήθηση από λεμφοκύτταρα και μακροφάγα που περιέχουν μελανίνη. Στις θέσεις των οζιδίων ανευρίσκονται φωλιές από κακοήγη μελανοκύτταρα, τα οποία συνήθως είναι ατρακτοειδή.

1.3.2 Επιπολής εξαπλούμενο μελάνωμα

Το επιπολής εξαπλούμενο μελάνωμα είναι η συχνότερη μορφή αποτελώντας το 70% όλων των μελανωμάτων στους Καυκάσιους. Ανευρίσκεται σε ασθενείς μέσης ηλικίας (40-50 ετών) και εντοπίζεται σε ηλιοεκτεθειμένες και μη περιοχές, με προτίμηση τον κορμό στους άντρες και τα πόδια στις γυναίκες. Συνδέεται περισσότερο από κάθε άλλη μορφή με την παρουσία μελανοκυτταρικών σπύλων⁴².

Αναπτύσσεται σε διάστημα 1 έως 5 ετών επεκτεινόμενο κυρίως οριζόντια, φυγόκεντρα και επιπολής, διηθώντας το επιπολής χόριο. Ακολούθως, η βλάβη αρχίζει να διηθεί κάθετα τους υποδερματικούς ιστούς και στη συνέχεια εμφανίζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Κλινικά χαρακτηρίζεται από βλάβες επηρμένες, μέσης διαμέτρου έως 2.5 cm, με ανώμαλο πολυγωνικό περίγραμμα και ποικίλο χρώμα (μελανό, ροδόχρωο, καστανό, ερυθρωπό, φαιό ή λευκωπό). Ιστολογικά δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός των

μελανοκυττάρων που παρατηρείται στο LMM. Τα μεγάλα κακοήγη μελανοκύτταρα εμφανίζουν μια “πατζετοειδή” κατανομή στην επιδερμίδα. Ανευρίσκονται μεμονωμένα ή σε φωλιές και έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα με λεπτά κοκκία μελανίνης που δίνουν στα κύτταρα την εντύπωση “σκόνης”. Ενίοτε μπορεί να ανευρεθούν ατρακτοειδή ή μικρά κακοήγη κυτταρα.

1.3.3 Οζώδες μελάνωμα

Το οζώδες μελάνωμα αποτελεί το δεύτερο κατά συχνότητα τύπο κακοήθους μελανώματος (15- 25%). Η μορφή αυτή έχει ως ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την προτίμηση για κάθετη επέκταση και γρήγορη διείσδυση των υποδερματικών ιστών (6-18 μήνες). Ως εκ τούτου εμφανίζει υψηλή μεταστατική ικανότητα και αποτελεί την πιο επιθετική μορφή της νόσου⁴².

Μπορεί να αναπτυχθεί επί κλινικά υγιούς δέρματος ή σε έδαφος μελανοκυτταρικού σπίλου. Έχει εντόπιση παρόμοια με του SSM, με συχνότερες θέσεις τον κορμό στους άντρες και τα πόδια στις γυναίκες. Εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες σε σχέση με το SSM και κατά τη διάγνωση η μέση διάμετρος του όγκου είναι 1-2 cm.

Κλινικά διακρίνεται ως μια μικρή μαύρη κηλίδα, βαθυχρωματικό οζίδιο ή επηρμένη πλάκα ομοιογενούς σκούρου χρώματος. Το χρώμα της βλάβης μπορεί να ποικίλει ανάμεσα σε μαύρο, σκούρο καφέ, μπλε-γκρι ή ακόμα και λαμπερό ερυθρό. Ορισμένες μάλιστα οζώδεις βλάβες καθώς μεγαλώνουν αποκτούν πολυποειδή χαρακτήρα.

Ιστολογικά η διήθηση αρχίζει από το δερμο-επιδερμικό όριο και επεκτείνεται στο χόριο. Η διήθηση της επιδερμίδας είναι πολύ μεταγενέστερη, ενώ η επιδερμίδα στα πλάγια της βλάβης δεν περιέχει άτυπα μελανοκύτταρα.

1.3.4 Μελάνωμα των άκρων

Το κακόηθες μελάνωμα των άκρων, αν και σχετικά σπάνιο στους Καυκάσιους (3-10% των μελανωμάτων), αποτελεί τη συχνότερη μορφή μελανώματος στις σκουρόχρωμες φυλές (μαύροι, ασιάτες). Εντοπίζεται στις παλάμες, στα πέλματα και στην κοίτη του νυχιού. Προσβάλλει άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών και έχει μέσο χρόνο ανάπτυξης 2,5 χρόνια. Κατά τη διάγνωση τα περισσότερα μελανώματα αυτού του τύπου έχουν μέγεθος άνω των 3 cm. Κλινικά και ιστολογικά μοιάζει με το LM, αλλά η βιολογική του συμπεριφορά είναι πολύ πιο επιθετική. Κλινικά εμφανίζεται ως κηλίδα με ανώμαλη περιφέρεια, βλατίδες ή οζίδια και ποικιλία στο χρωματισμό. Ιστολογικά στις κηλιδώδεις

βλάβες ανευρίσκεται πολλαπλασιασμός των μελανοκυττάρων της βασικής στιβάδας, τα οποία εμφανίζουν μεγάλους πυρήνες και ανώμαλη χρωματίνη. Στις περιοχές των βλατίδων και οζιδίων τα κακοήγη μελανοκύτταρα είναι συνήθως ατρακτοειδή και επεκτείνονται στο χόριο.

1.4 Σταδιοποίηση μελανώματος

Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορα συστήματα σταδιοποίησης του κακοήθους μελανώματος, με άλλοτε ιστολογικά και άλλοτε κλινικά κριτήρια⁴⁷⁻⁴⁹.

Τα τελευταία 10 περίπου χρόνια έχει επικρατήσει ένας συνδυασμός των ανωτέρω συστημάτων ο οποίος φαίνεται να ανταποκρίνεται περισσότερο στις κλινικές ανάγκες για πρόγνωση και θεραπεία. Αξίζει πάντως να αναφέρουμε και τις παλαιότερες ταξινόμησεις καθώς αρκετοί κλινικοί ιατροί συνεχίζουν να τις χρησιμοποιούν.

Στην κατά Clark σταδιοποίηση η ταξινόμηση γίνεται με την κατά ανατομικό επίπεδο διήθηση της βλάβης (Πίνακας 1)⁵⁰.

Πίνακας 1. Στην κατά Clark σταδιοποίηση του μελανώματος, η ταξινόμηση γίνεται με βάση την κατά ανατομικό επίπεδο διήθηση.

Επίπεδο 1	άτυπα κύτταρα στην επιδερμίδα (<i>in situ</i>); δεν είναι διηθητική βλάβη
Επίπεδο 2	Η διήθηση περιορίζεται στο θηλώδες χόριο χωρίς να επεκτείνεται πέραν του ορίου θηλώδους-δικτυωτού χορίου
Επίπεδο 3	πλήρωση θηλώδους χορίου και διήθηση μέχρι τα όρια θηλώδους και δικτυωτού χορίου
Επίπεδο 4	Σαφής διήθηση δικτυωτού χορίου, αλλά όχι του υποδόριου ιστού
Επίπεδο 5	διήθηση του δικτυωτού χορίου και των υποδορίων ιστών

Υπάρχει και η κλινική σταδιοποίηση ανάλογα με την έκταση της νόσου, που ορίζεται:

Σ τ ά δ ι ο I : η εντοπισμένη στο δέρμα νόσος

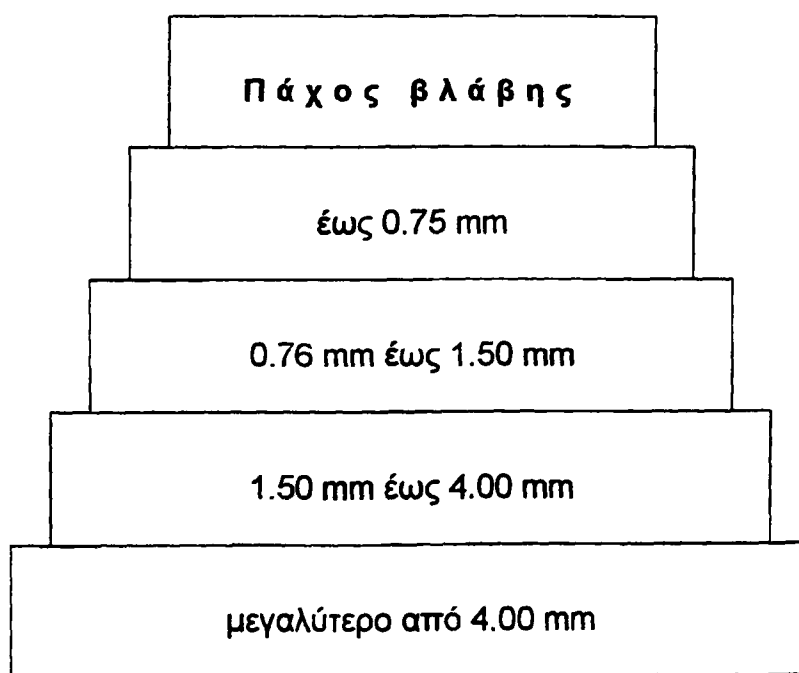
Σ τ ά δ ι ο II : επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις

Σ τ ά δ ι ο III : απομακρυσμένες μεταστάσεις

Η ανωτέρω ταξινόμηση είναι μια υπεραπλουστευμένη μέθοδος που δεν ανταποκρίνεται πλέον στις κλινικές προγνωστικές ανάγκες καθότι το 70-80% των μελανωμάτων εντάσσεται στο στάδιο I της κατάταξης και δεν προσδιορίζει τον κίνδυνο να αναπτυχθούν μεταστάσεις.

Στην σταδιοποίηση κατά Breslow (Πίνακας 2) μετράται με μικρομετρικό φακό το πάχος της βλάβης από την επιφάνεια αυτής έως το βαθύτερο σημείο διήθησης^{50,51}. Ασθενείς με πάχος βλάβης έως 0.75 mm έχουν 5ετή επιβίωση >90%, ενώ η επιβίωση είναι ιδιαίτερα πτωχή όταν το πάχος της βλάβης υπερβαίνει τα 4mm.

Πίνακας 2. Κατά Breslow ταξινόμηση του μελανώματος



Έχει αποδειχθεί ότι το πάχος της βλάβης είναι καλύτερη παράμετρος για την σταδιοποίηση της νόσου παρά το επίπεδο διήθησης, και ταυτίζεται με την κλινική πορεία και πρόγνωση.

Για να ξεπερασθούν οι δυσκολίες και τα λάθη που προκύπτουν από τις παραπάνω ταξινομήσεις έχει προταθεί (AJCC) και χρησιμοποιείται ένα νέο σύστημα ταξινόμησης που βασίζεται τόσο σε ιστολογικά όσο και σε κλινικά κριτήρια και διευκολύνει τον κλινικό ιατρό τόσο να εκτιμήσει την πρόγνωση όσο και να καθορίσει την πλέον ενδεδειγμένη θεραπεία³² (Πίνακας 3 & 4).

Πίνακας 3. Κατά AJCC σταδιοποίηση του μελανώματος

Στάδιο	Κριτήρια	Ταξινόμηση TNM
IA	Εντοπισμένο μελάνωμα πάχους <0.75 mm η επίπεδο II	(T1N0M0)
IB	Εντοπισμένο μελάνωμα πάχους 0.75-1.5 mm η επίπεδο III	(T2N0M0)
IIA	Εντοπισμένο μελάνωμα πάχους 1.5-4 mm η επίπεδο IV	(T3N0M0)
IIB	Εντοπισμένο μελάνωμα πάχους >4mm η επίπεδο V	(T4N0M0)
III	Περιορισμένη επιχώρια λεμφαδενοπάθεια προσβάλλοντας μια μόνο ομάδα λεμφαδένων	(T N1M0)
IV	Εκτεταμένες επιχώριες η απομακρυσμένες μεταστάσεις	(TN2M0) (TN1M1-2)

Πίνακας 4. Ορίσμοι της TNM ταξινόμησης

Π ρ ω τ ο π α θ ή ς ό γ κ ο ς (p T)	
pTX	Δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί-ανευρεθεί πρωτοπαθής όγκος
pT0	Δεν υπάρχουν ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
pTis	Μελάνωμα in situ (άτυπη μελανοκυτταρική υπερπλασία; σημαντική μελανοκυτταρική δυσπλασία), όχι διηθητική βλάβη (επίπεδο I κατά Clark)
pT1	Όγκος πάχους έως 0.75mm, που διηθεί το θηλώδες χόριο (επίπεδο II κατά Clark)
pT2	Όγκος πάχους 0.75-1.50mm και/η διήθηση του ορίου θηλώδους-δικτυωτού χορίου (επίπεδο III κατά Clark)
pT3	Όγκος πάχους 1.50-4.00mm και/η διήθηση του δικτυωτού χορίου (επίπεδο IV κατά Clark)
pT3a	Όγκος πάχους 1.50-3.00mm
pT3b	Όγκος πάχους 3.00-4.00mm
pT4	Όγκος πάχους μεγαλύτερο των 4.00mm, και/η διήθηση των υποδόριων ιστών (επίπεδο V κατά Clark), και/η δορυφόρες βλάβες σε ακτίνα 2cm από την πρωτοπαθή εστία
pT4a	Όγκος πάχους μεγαλύτερο των 4.00mm, και/η διήθηση των υποδόριων ιστών
pT4b	Δορυφόρες βλάβες σε ακτίνα 2cm από την πρωτοπαθή εστία
Ε π ι χ ώ ρ ι ο ι λ ε μ φ α δ έ ν ε ς (N)	
NX	Δεν μπορεί να ανευρεθούν οι επιχώριοι λεμφαδένες
N0	Χωρίς επιχώριες λεμφαδενικές μεταστάσεις
N1	Μετάσταση σε οιονδήποτε επιχώριο λεμφαδένα μεγέθους έως 3cm
N2	Μετάσταση μεγαλύτερη των 3cm σε όποιον επιχώριο λεμφαδένα και/η εν διελεύσει μεταστάσεις
N2a	Μετάσταση μεγαλύτερη των 3cm σε όποιον επιχώριο λεμφαδένα
N2b	Εν διελεύσει μεταστάσεις
N2c	N2a και N2b. Σημείωση: Οι in-transit μεταστάσεις περιλαμβάνουν δέρμα και υποδόριο ιστό πέραν των 2cm από τον πρωτοπαθή όγκο, αλλά όχι πέραν των επιχώριων λεμφαδένων
Α π ο μ α κ ρ υ σ μ έ ν ε ς μ ε τ α σ τ ά σ ε ι ς (M)	
MX	Δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν-ανευρεθούν απομακρυσμένες μεταστάσεις
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1a	Μεταστάσεις στο δέρμα ή στους υποδόριους ιστούς ή στους λεμφαδένες πέραν των επιχώριων λεμφαδένων
M1b	Σπλαχνικές μεταστάσεις

1.5 Θεραπεία μελανώματος

1.5.1 Στάδιο I και II κατά AJCC

(pT1-pT2, N0, M0 και pT3, N0, M0)

Μελανώματα αυστηρά εντοπισμένα στο δέρμα έχουν υψηλό δείκτη ίασης και η χειρουργική αφαίρεση αποτελεί τη θεραπεία εκλογής. Η επαρκής εξαίρεση της βλάβης αποτελεί το βασικότερο παράγοντα που καθορίζει την πρόγνωση της νόσου. Μολονότι συνιστάται εξαίρεση με χειρουργικά όρια που θα εκτείνονται σε ιστολογικά φυσιολογικό δέρμα, το εύρος και βάθος μιας τέτοιας επέμβασης υπήρξε επί μακρόν θέμα συζητήσεων.

Για αρκετά χρόνια η εκτομή του όγκου γινόταν επί ευρέων χειρουργικών ορίων (έως 5 εκ.), ανεξάρτητα από το πάχος της πρωτοπαθούς βλάβης. Αυτό οδηγούσε συχνά, ανάλογα με την εντόπιση του όγκου (πρόσωπο, άκρα) σε βαριές παραμορφώσεις. Η ευρεία χειρουργική αφαίρεση στηριζόταν στην αρχή της φυγόκεντρης λεμφικής επέκτασης της νόσου, η οποία όμως δεν αποτελεί το μοναδικό μηχανισμό επέκτασης της νόσου. Σύμφωνα με άλλη υπόθεση το μελάνωμα δεν αναπτύσσεται μόνο από εστιακές μεταλλάξεις ενός ή μερικών κυττάρων, αλλά μεταλλαξογόνες διεργασίες ανευρίσκονται και σε περιοχές γειτονικού μακροσκοπικά υγιούς δέρματος⁵³. Βρέθηκε δηλαδή ότι σε περιοχές έως 5cm από τα χείλη του όγκου μπορεί να υπάρχουν άτυπα η "κακοήγη" μελανοκύτταρα με ασυνήθιστα μορφολογικά χαρακτηριστικά⁵⁴.

Σήμερα, τα χειρουργικά όρια καθορίζονται από τη μικροσκοπική σταδιοποίηση της πρωτοπαθούς βλάβης (Πίνακας 4). Χειρουργικά χείλη 1 εκ. θεωρούνται απολύτως ασφαλή για μελανώματα πάχους < 1mm^{55,56}. Οι τοπικές υποτροπές είναι περίπου 1.3% και συνήθως συμβαίνουν σε όγκους πάχους μεγαλύτερου από 1mm. Για όγκους πάχους >1mm τα χειρουργικά χείλη μπορεί να επεκταθούν έως τα 2cm^{57,58}. Η εφαρμογή του κανόνα των ορίων δεν είναι πάντα εφικτή και σε δύσκολες εντοπίσεις ισχύουν ειδικοί κανόνες, όπως είναι ο ακρωτηριασμός του δακτύλου για υπονύχιο μελάνωμα η επέκταση της εκτομής έως το υποδόριο λίπος με σύγκλιση των χειρουργικών χειλέων και χρήση δερματικού κρημνού σε περιοχές όπως το πρόσωπο, οι παλάμες και τα πέλματα⁵⁹.

Πίνακας 4. Ασφαλή όρια εκτομής πρωτοπαθούς μελανώματος

Πάχος βλάβης	Όρια εκτομής	Τοπική υποτροπή (%)
<1mm	1 cm	0
(1-4 mm)	2 cm	
1-2mm		1.3
2-3mm		3.7
3-4mm		6.5
>4mm	2-3 cm	

Η ακτινοβολία του όγκου αποτελεί εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση σε ηλικιωμένους ασθενείς με LMM και εκτεταμένες βλάβες στο πρόσωπο.

Η ανάγκη για εκλεκτικό χειρουργικό καθαρισμό των κλινικώς αρνητικών επιχώριων λεμφαδένων (ασθενείς σταδίου II) εξακολουθεί να αποτελεί θέμα συζήτησης. Οι υποστηρικτές αυτής της άποψης στηρίζονται στην υπόθεση ότι ο όγκος δίνει πρώτα “μικρομεταστάσεις” στους επιχώριους λεμφαδένες, οι οποίες αποτελούν εστίες για μετέπειτα μετάσταση στα εσωτερικά όργανα. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν τεκμηριωμένες μελέτες ότι όλοι οι ασθενείς σταδίου I και II που θα υποβληθούν σε τέτοια ριζική επέμβαση θα επωφεληθούν σε χρόνο ελεύθερο νόσου όσο και σε χρόνο ολικής επιβίωσης. Οι μελέτες που έδειξαν καθαρό πλεονέκτημα επιβίωσης σε επιλεγμένους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε λεμφαδενικό καθαρισμό σχολιάσθηκαν για μεθοδολογικές παραλείψεις^{55,60,61}.

Ασθενείς με μελάνωμα πάχους $<1\text{mm}$ (πιθανόν και πάχους $<1.5\text{mm}$) έχουν πολύ μικρό κίνδυνο ύπαρξης λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων και ως εκ τούτου και πολύ καλή πρόγνωση. Αντιθέτως ασθενείς με μελάνωμα πάχους $>4\text{mm}$ έχουν υψηλό δείκτη κίνδυνου για εμφάνιση μικρομεταστάσεων και απομακρυσμένων εντοπίσεων και ως εκ τούτου δεν επωφελούνται από λεμφαδενικό καθαρισμό^{62,63}. Παραμένει λοιπόν μια ομάδα ασθενών που πιθανόν να επωφελούνται από τον επιχώριο λεμφαδενικό καθαρισμό, και αυτοί είναι οι ασθενείς με μελάνωμα πάχους μεταξύ $1,5\text{mm}$ και 4mm .

Η μέθοδος της χημειοθεραπείας που χορηγείται με ενδαρτηριακή χορήγηση απομονωμένου σκέλους (isolated limb perfusion – ILP) έχει ασαφή και αμφιλεγόμενα αποτελέσματα και εξακολουθεί να παραμένει αντικείμενο μελέτης⁶⁴.

1.5.2 Εν διελεύσει μεταστάσεις

Ως εν διελεύσει μεταστάσεις ορίζονται οι δερματικές ή υποδόριες μεταστατικές εστίες που εκδηλώνονται κατά τη διαδρομή των λεμφαγγείων παροχέτευσης της πρωτοπαθούς εστίας προς τους επιχώριους λεμφαδένες⁶⁵⁻⁶⁸.

Παρότι σε ποσοστό 85% οι εν διελεύσει μεταστάσεις αποτελούν προοίμιο εκδήλωσης συστηματικής νόσου, στις περιπτώσεις που δεν συνυπάρχουν σημεία γενικευμένης διασποράς, ενδείκνυται η περιοχική θεραπεία. Αυτή μπορεί να είναι χειρουργική θεραπεία ή ακτινοθεραπεία σε περιπτώσεις με μικρό αριθμό βλαβών, ενώ επί υποτροπής ή εκτεταμένης νόσου αξίζει να χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή με τεχνικές απομόνωσης της κυκλοφορίας σκέλους^{16,69-79}. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται εδώ και 40 χρόνια και βασίζονται στην ικανότητα απομόνωσης του προσβεβλημένου σκέλους από τη συστηματική κυκλοφορία, επιτυγχάνοντας τοπικά υψηλές συγκεντρώσεις κυτταροτοξικών παραγόντων και ελαχιστοποιώντας τη συστηματική έκθεση και τοξικότητα. Οι συνδυασμοί που εφαρμόζονται σήμερα στην περιοχική θεραπεία in-transit μεταστάσεων είναι οι TIM (TNF α - IFN γ -Melfhalan) και TM (TNF α -Melfhalan) επιτυγχάνοντας μάλιστα ανταποκρίσεις της τάξης άνω του 75%. Ωστόσο, παρά τα θεαματικά υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης στην περιοχική κυτταροτοξική θεραπεία μέχρι σήμερα δεν έχει τεκμηριωθεί όφελος επιβίωσης. Νεότερες μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη εστιάζουν στην επίτευξη κλινικού οφέλους επιβίωσης με την εφαρμογή νέων τεχνικών ILP με διαφορετικούς συνδυασμούς φαρμάκων, διαφορετικές συνθήκες και δοσολογίες χορήγησης καθώς και μεγαλύτερο αριθμό συνεδριών.

1.5.3 Στάδιο III (Περιοχική λεμφαδενική νόσος)

(pT4, N0, M0 η κάθε pT, N1, M0 η κάθε pT, N2, M0)

Οι επιχώριοι λεμφαδένες αποτελούν την πλέον συχνή θέση μετάστασης του μελανώματος και ο χειρουργικός καθαρισμός τους θεωρείται αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση με στόχο την ίαση σε ένα ποσοστό ασθενών. Πενταετής επιβίωση μετά από θεραπευτική λεμφαδενεκτομή είναι της τάξης του 19% - 38%^{69,72,76,80,81}.

1.5.3.1 Μη έκδηλη κλινικά λεμφαδενική νόσος

Το θέμα του χειρισμού των επιχώριων λεμφαδένων στις περιπτώσεις εντοπισμένων μελανωμάτων κλινικών σταδίων AJCC I και II έχει επί μακρόν απασχολήσει την ιατρική ογκολογική κοινότητα με δύο κυρίαρχα ερωτήματα:

A) Εκλεκτικός Λεμφαδενικός Καθαρισμός:

Το πρώτο ερώτημα αφορά στο όφελος του πρώιμου έναντι του όψιμου θεραπευτικού λεμφαδενικού καθαρισμού, που εφαρμόζεται επί κλινικής πιστοποίησης των μεταστάσεων. Η άποψη που υποστηρίζει τον πρώιμο εκλεκτικό χειρουργικό καθαρισμό κλινικά αρνητικών επιχώριων λεμφαδένων στηρίζεται στην υπόθεση ότι το μελάνωμα δίνει πρώτα “μικρομεταστάσεις” στους επιχώριους λεμφαδένες, οι οποίες στην συνέχεια αποτελούν εστίες για περαιτέρω μετάσταση στα εσωτερικά όργανα. Αναφέρθηκε ήδη ότι ασθενείς με μελάνωμα πάχους <1mm έχουν πολύ μικρό κίνδυνο ύπαρξης λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων και ως εκ τούτου πολύ καλή πρόγνωση. Αντίθετα, ασθενείς με όγκο πάχους >4 mm έχουν υψηλό δείκτη κινδύνου για εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων παρά περιοχικών λεμφαδενικών εντοπίσεων (72% vs 62%). Παραμένει λοιπόν η ομάδα ασθενών με μελάνωμα πάχους μεταξύ 1,5mm και 4mm που αναμένεται ότι θα ωφεληθούν από τον επιχώριο λεμφαδενικό καθαρισμό επειδή έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα περιοχικών λεμφαδενικών παρά απομακρυσμένων μεταστάσεων^{70,71,73,80,82,83}.

Ήδη από το 1982, βάσει των αποτελεσμάτων τυχαιοποιημένης πολυκεντρικής μελέτης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας WHO (Collaborating Centers for the Evaluation of Methods of Diagnosis and Treatment of Melanoma) ο άμεσος

λεμφαδενικός καθαρισμός συνιστάται αποκλειστικά για ασθενείς με πρωτοπαθή μελανώματα πάχους $>2\text{mm}$ οι οποίοι δεν δύνανται να έχουν τακτική κλινική παρακολούθηση. Παρόλα ταύτα, μελέτες που να τεκμηριώνουν ουσιαστικό όφελος σε χρόνο ελεύθερο νόσου και κυρίως επιβίωσης για ασθενείς σταδίου I και II που υποβλήθηκαν σε ριζική επέμβαση πρώιμου λεμφαδενικού καθαρισμού δεν έχουν δημοσιευθεί. Πρόσφατα δημοσιεύθηκε μια ενδιάμεση ανάλυση (interim) πολυκεντρικής μελέτης κατευθυνόμενης του Intergroup Melanoma Surgical Program, που περιελάμβανε 740 ασθενείς σταδίου I και II οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε άμεσο εκλεκτικό λεμφαδενικό καθαρισμό (μηριαίο, μασχαλιαίο ή τροποποιημένο τραχηλικό) ή σε κλινική παρακολούθηση. Σε αυτήν τη μελέτη με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 7.4 χρόνια δεν πιστοποιήθηκε όφελος 5ετούς επιβίωσης στην ομάδα εκλεκτικού λεμφαδενικού καθαρισμού σαν σύνολο. Στατιστικά σημαντικό κλινικό όφελος διαπιστώθηκε μόνο για τους ασθενείς <60 ετών με μελάνωμα πάχους 1-2mm.

B) Βιοψία Λεμφαδένα Φρουρού:

Το δεύτερο ερώτημα στο θέμα του χειρισμού των επιχωρίων λεμφαδένων αφορά την ακριβή εντόπισή τους και την ευαισθησία ανίχνευσης της μικρομεταστατικής νόσου. Δυστυχώς η κλινική εκτίμηση της ακριβούς τοπογραφίας των επιχωρίων λεμφαδένων δεν είναι πάντοτε ασφαλής η δε ιστολογική διάγνωση των λεμφαδενικών μικρομεταστάσεων δεν έχει απόλυτη ευαισθησία. Λύση στα σημαντικά αυτά προβλήματα έρχεται να προσφέρει η εξέλιξη της μεθόδου ανίχνευσης της μεταστατικής διήθησης του λεμφαδένα-φρουρού η οποία έχει αρχίσει να υιοθετείται ως κλινική πράξη ρουτίνας σε διάφορα κέντρα. Υποστηρίζεται μάλιστα ότι σε μελανώματα πάχους $<1.5\text{mm}$ η εκτομή-βιοψία του φρουρού λεμφαδένα αποτελεί επαρκή διαγνωστικό αλλά και θεραπευτικό χειρουργικό χειρισμό^{70,82,84,85}.

1.5.4 Μελάνωμα με απομακρυσμένες μεταστάσεις

(κάθε pT, κάθε N, M1)

Λόγω του χαμηλού προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών με απομακρυσμένες μεταστάσεις (μέσος όρος επιβίωσης 6 μήνες) η επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών μέσων στοχεύει κυρίως στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, την παράταση του προσδόκιμου επιβίωσης και τον περιορισμό της έκτασης της νόσου. Σε αρκετές

περιπτώσεις η χειρουργική θεραπεία (ειλεός, αιμορραγία) και η ακτινοθεραπεία (οστικές η εγκεφαλικές μεταστάσεις, δερματικές επιπολής μεταστάσεις) έχουν ουσιαστικά ανακουφιστικό ρόλο. Τόσο οι ιατροί αλλά κυρίως οι ασθενείς θα πρέπει να ενθαρρύνονται να συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές.

1.5.4.1 Χειρουργική θεραπεία - Ακτινοθεραπεία

Η χειρουργική θεραπεία και ακτινοθεραπεία έχουν θέση ως θεραπευτικά μέσα σε περιπτώσεις μονήρων μεταστατικών εστιών. Η χειρουργική ενδείκνυται κυρίως σε περιπτώσεις μονήρων εστιών βραδείας εξέλιξης και μπορεί σε σπάνιες περιπτώσεις να επιτύχει μακροχρόνια ύφεση της νόσου. Αναφορικά με την ακτινοθεραπεία έχει διαπιστωθεί συσχέτιση της κλασματικής δόσης με την ανταπόκριση στο μεταστατικό μελάνωμα και προτείνονται δόσεις της τάξης των 5-6 Gy ανά συνεδρία^{83,86-88}.

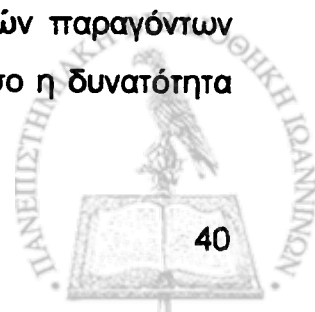
1.5.4.2 Κυτταροτοξική χημειοθεραπεία

Το μεταστατικό μελάνωμα χαρακτηρίζεται από αντοχή στην χημειοθεραπεία. Μόνο 10-25% των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα ανταποκρίνονται σε μόνο - η πολυχημειοθεραπεία, η οποία επί του παρόντος εξακολουθεί να έχει ανακουφιστικό χαρακτήρα^{69,70,89,90}. Οι διαθέσιμοι σήμερα κυτταροτοξικοί παράγοντες παρά τα όποια ποσοστά κλινικής δραστηριότητας δεν έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να συμβάλλουν σε σημαντική παράταση επιβίωσης σε ασθενείς με γενικευμένη νόσο. Η αντοχή στην κυτταροτοξική χημειοθεραπεία αποτελεί σημαντικό κλινικό πρόβλημα και φαίνεται ότι συσχετίζεται με την έκφραση των παραγόντων ενδογενούς πολυφαρμακευτικής αντίστασης όπως η Pgp, η MRP και η LRP⁹¹.

Μονοθεραπεία

Η ανταπόκριση του μεταστατικού μελανώματος στα παλαιότερα αντικαρκινικά φάρμακα κυμαίνεται στο 10-20% ενώ το όφελος ως προς την επιβίωση θεωρείται αμελητέο. Οι σημαντικότεροι δραστικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είναι η ντακαρμπαζίνη, οι νιτροζουρίες καρμουςτίνη (BCNU) και λομουςτίνη (CCNU), η πλατίνα, τα αλκαλοειδή της νίνεα και οι ταξάνες⁹²⁻⁹⁴.

Λόγω της πτωχής δραστηριότητας των διαθέσιμων κυτταροτοξικών παραγόντων αξίζει να προσφέρεται κατά περίπτωση σε ασθενείς με μεταστατική νόσο η δυνατότητα



συμμετοχής σε τρέχουσες κλινικές μελέτες αξιολόγησης νέων φαρμάκων στο πλαίσιο θεραπείας πρώτης εκλογής.

Νέα φάρμακα

Μόνο 1 στα 15 δοκιμαζόμενα φάρμακα σε μελέτη φάσης II αξιολογούνται ως μετρίως δραστικά για το μεταστατικό μελάνωμα με ανταποκρίσεις της τάξης του 10-20%. Οι νεότεροι παράγοντες που έδειξαν κλινική δραστηριότητα αφορούν κατεξοχήν ταξάνες, παράγωγα ντακαρμπαζίνης, νέες νιτροζουρίες και νεότερες πλατίνες.

Η κλινική δραστηριότητα της ταξόλης στο μεταστατικό μελάνωμα είναι της τάξης του 16%, ενώ έχει αναφερθεί και μικρός αριθμός παρατεταμένων πλήρων υφέσεων (33+ και 46+ μήνες). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ενδιαφέρουσας συνέργιας του συνδυασμού των αντιμιτωτικών παραγόντων ταξόλης και βινoreλμπίνης σε σχετικά μικρές δόσεις⁸⁰. Μέτρια είναι η τεκμηριωθείσα ανταπόκριση στη δοσεταξέλη (ταξοτέρη) σε δύο μελέτες φάσης II. Στην πρώτη μελέτη αναφέρεται ανταπόκριση σε 2/35 ασθενείς η οποία όμως διήρκησε >1 έτος ενώ στην πολυκεντρική μελέτη του EORTC καταγράφηκε ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 17%^{82,88}.

Η τεμοζολαμίδη είναι ένα ημιδαζοτετραζινικό παράγωγο και αποτελεί έναν από τους πλέον ενδιαφέροντες νέους αντικαρκινικούς παράγοντες με καλή δραστηριότητα στο μελάνωμα. Η αξιολόγηση της δραστηριότητάς του είναι παρόμοια με εκείνη των παλαιότερων παραγόντων (21%) αλλά πλεονεκτεί ως προς την ευκολία χορήγησης, τη χαμηλή τοξικότητα και την ικανότητα διαπέρασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Χορηγείται από του στόματος σε δοσολογία 150-200 mg/m²/ημέρα x 5 ημέρες⁸⁹.

Η σιστεμουστίνη είναι μια νέα χλωροεθυλνιτροζουρία (CENU) με ανταποκρίσεις της τάξης του 25%^{71,92}. Βελτίωση της δραστηριότητας του παράγοντα επιχειρείται με τη συγχορήγηση Ο6-βενζυλ-N2-ακετυλγουανοσίνης (BNAG), ενός αναστολέα της Ο6-μεθυλγουανίνης-DNA μεθυλτρανσφεράσης (MGMT) που αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αντοχής στις νιτροζουρίες. Αντιθέτως, η ταουρομουστίνη (TCNU) μια χλωρεθυλνιτροσουρία που χρησιμοποιήθηκε δεν εμφάνισε σημαντική ανταπόκριση (16%)^{84,95}.

Τέλος, για τη φοτεμουστίνη η επιβεβαιωτική πολυκεντρική μελέτη φάσης II της ομάδας EORTC-MCG με 144 ασθενείς τεκμηρίωσε κλινική δραστηριότητα της τάξης του

12%, ενώ προηγηθείσες μονοκεντρικές μελέτες ανέφεραν σημαντικά μεγαλύτερη δραστικότητα^{70,84,96}.

Χημειοθεραπευτικοί συνδυασμοί

Συνδυασμοί διάφορων χημειοθεραπευτικών παραγόντων συνεχίζουν να μελετώνται σε μελέτες φάσης II. Δυστυχώς στις περισσότερες περιπτώσεις τα ποσοστά κλινικής ανταπόκρισης σπάνια υπερβαίνουν το 25%. Κάποιες μελέτες παρουσιάζουν αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία η προσθήκη ταμοξιφαίνης ενισχύει τη δραστικότητα της ντακαρμπαζίνης με ιδιαίτερα σημαντικό κλινικό όφελος για την ομάδα των γυναικών-ασθενών. Επίσης ο συνδυασμός DTIC + BCNU + σισπλατίνη + ταμοξιφαίνη (σχήμα Dartmouth) φέρεται να έχει μεγαλύτερη δραστικότητα σε σχέση με τη μονοθεραπεία με ντακαρμπαζίνη^{69,96}. Πρόσφατα ερευνητές βρήκαν την τοξικότητα αυτού του σχήματος, σε συνδυασμό με την περιορισμένη του δραστικότητα, απαγορευτική για την περαιτέρω κλινική χρήση και μελέτη. Μία τυχαίοποιημένη προοπτική μελέτη μεταξύ του σχήματος Dartmouth και μονοθεραπείας με ντακαρμπαζίνη που έκλεισε πρόσφατα αναμένεται να δώσει ουσιαστική απάντηση στο ερώτημα της κλινικής σημασίας της συνδυασμένης χημειοθεραπείας στο μεταστατικό μελάνωμα⁶⁹.

1.5.4.3 Βιολογικοί τροποποιητές

Στο μεταστατικό μελάνωμα οι βιολογικοί παράγοντες που έχουν περισσότερο μελετηθεί είναι η IFN-α και η IL-2. Η IFN-α έχει δείξει δραστικότητα παρόμοια με εκείνη των πιο δραστικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όταν χορηγείται σε σχετικά υψηλές και αρκετά τοξικές δόσεις^{82,97,98}. Η δραστικότητα της IL-2 που χορηγήθηκε σε 140 ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα σε υψηλές δόσεις 720,000 IU/Kg ενδοφλεβίως/τρεις φορές ημηρεσίως ήταν 17%, ενώ ενδείξεις δραστικότητας διαπιστώθηκαν και σε μία πιλοτική μελέτη αξιολόγησης υποδόριας εβδομαδιαίας χορήγησης rHuIL-12 σε προθεραπευμένους ασθενείς^{84,91,91,92,95}.

Θεραπείες συνδυασμού ανοσοτροποποιητικών παραγόντων με LAK ή αυτόλογα TIL κύτταρα δεν παρουσίασαν κλινικό όφελος τέτοιο που να δικαιολογούν τόσο το κόστος όσο και την πολυπλοκότητά τους^{70,95}.

1.5.4.4 Συνδυασμένη ανοσο-χημειοθεραπεία

Σε αρκετά κέντρα ερευνάται τελευταία ο συνδυασμός χημειοθεραπευτικών και βιολογικών παραγόντων με σκοπό τη μεγιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος

Οι Legha και συν. από το MD Anderson Cancer Center μελέτησαν τον χημειοθεραπευτικό συνδυασμό σισπλατίνης, βινπλαστίνης, ντακαρμπαζίνης (CVD) εναλλασσόμενο με/ή ακολουθούμενο από ανοσοθεραπεία με IL-2 (9×10^6 IU/ m^2 /ημέρα x 4 ημέρες) και IFN- α (5×10^6 U/ m^2 /ημέρα υποδορίως x 5 ημέρες) (Bio). Το υψηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης παρατηρήθηκε στην ακολουθία CVD/Bio (69%) ενώ υπήρξαν και δύο μακροχρόνιες πλήρεις υφέσεις (3+ και 6+ έτη)⁹⁹. Στην ίδια μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν υπεροχή ως προς την επιβίωση της ομάδας ανοσοχημειοθεραπείας χρησιμοποιώντας ως ιστορική ομάδα μαρτύρων την ομάδα που αντιμετωπίστηκε με μόνη χημειοθεραπεία CVD.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης αντικρούονται από άλλη πρόσφατα δημοσιευθείσα προοπτική τυχαιοποιημένη βρετανική μελέτη φάσεως II. Κατ' αυτήν η προσθήκη υποδόριας IL-2 και IFN- α στο χημειοθεραπευτικό σχήμα BCDT επέφερε μεν ανοσολογική ενεργοποίηση, αλλά δεν βελτίωσε τη δραστικότητα της θεραπείας εκφραζόμενης ως ποσοστό ανταπόκρισης¹⁰⁰. Η διαφοροποίηση του αποτελέσματος των δύο σκελών αφορούσε μόνο την τοξικότητα. Ενδιαφέρουσα είναι επίσης μια διπλή τυχαιοποιημένη προοπτική μελέτη της ECOG που δημοσιεύθηκε πρόσφατα και αφορούσε 258 ασθενείς με μεταστατική νόσο. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη η δραστικότητα και το κλινικό όφελος της ντακαρμπαζίνης δεν τροποποιούνται από τον συνδυασμό της με ιντερφερόνη ή ταμοξφαίνη ή και αμφότερους τους παράγοντες¹⁰¹.

Μία άλλη πρόσφατη μελέτη ανοσοχημειοθεραπείας με ντακαρμπαζίνη, σισπλατίνη, καρμουστίνη, ταμοξφαίνη και ιντερφερόνη- $\alpha 2b$ ήταν επίσης αρνητική. Αρνητικές ήταν και οι μελέτες που αφορούσαν το συνδυασμό της IFN- $\alpha 2b$ με φοτεμουστίνη ή φοτεμουστίνη και ντακαρμπαζίνη όπως και ο συνδυασμός καρμποπλατίνης-βινπλαστίνης-IL2-IFN α ¹⁰²⁻¹⁰⁵. Πέρα από την παρατηρηθείσα μικρή βελτίωση του ποσοστού ανταπόκρισης δεν διαφαίνεται σημαντικό επιπρόσθετο κλινικό όφελος.

1.5.4.5 Ειδική Ανοσοθεραπεία

Έχουν ήδη αρχίσει να παρουσιάζονται τα πρώτα ενδιαφέροντα αποτελέσματα από την κλινική εφαρμογή της ειδικής ανοσοθεραπείας στο μεταστατικό μελάνωμα.

Ενθαρρυντική ήταν η εμπειρία εμβολιοθεραπείας με ενεργοποιημένα δένδριτικά κύτταρα σε 16 ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα. Η θεραπεία αυτή επέφερε αντιγονο-ειδική ανταπόκριση ενώ διαπιστώθηκε και αντικειμενική ανταπόκριση σε 5 ασθενείς.

Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πεπτιδικοί επίτοποι του gp100 μελάνωμα-συσχετιζόμενου αντιγόνου για την εμβολιοθεραπεία ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα, ενώ στους ασθενείς αυτούς χορηγήθηκε και IL-2. Στο σύνολο των 31 ασθενών της μελέτης, το 91% ανοσοποιήθηκε επιτυχώς και σε ποσοστό 42% τεκμηριώθηκε αντικειμενική ανταπόκριση.

1.5.5 Προφυλακτική συμπληρωματική χημειοθεραπεία

Παρά την αυξημένη επίπτωση του κακοήθους μελανώματος τις τελευταίες δεκαετίες, η επιβίωση των ασθενών έχει βελτιωθεί σημαντικά στην ίδια χρονική περίοδο κυρίως λόγω της εγκαίρου διαγνώσεως πρώιμων βλαβών. Εντούτοις, παραμένει ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με δυσμενή πρόγνωση. Ασθενείς υψηλού κίνδυνου για υποτροπή μπορούν να αναγνωρισθούν με την μικροσκοπική σταδιοποίηση της πρωτοπαθούς βλάβης (βάθος διήθησης) και την διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων. Έτσι ασθενείς με βλάβες μικρότερες από 1.5cm (στάδιο I κατά AJCC) έχουν δεκαετή επιβίωση ~85%. Για ασθενείς με βλάβες >4.0cm (στάδιο IIB κατά AJCC) ο κίνδυνος υποτροπής μετά από χειρουργική εξαίρεση είναι 50-70%, ενώ για ασθενείς με λεμφαδενικές (στάδιο III κατά AJCC) ή με απομακρυσμένες μεταστάσεις (στάδιο IV κατά AJCC) (οι οποίες αφαιρέθηκαν χειρουργικά) ο κίνδυνος ανέρχεται σε 85% και 95% αντιστοίχως¹⁰⁶ (Πίνακας 5). Η μελέτη προφυλακτικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής (στάδιο IIB και III) ενθαρρύνθηκε κυρίως από τα πτωχά αποτελέσματα θεραπευτικής αντιμετώπισης της κλινικώς εμφανούς νόσου. Βασίζεται στην αρχή ότι η θεραπεία θα είναι πιο αποτελεσματική όταν ο όγκος της νόσου (tumor burden) είναι μικρός, όπως αποδείχθηκε για τον καρκίνο του μαστού και του παχέος εντέρου. Κατά παράδοση η προφυλακτική θεραπεία (χημειο- η ανοσο-θεραπεία) χορηγείται μετά την χειρουργική αντιμετώπιση συνήθως συστηματικά ενίστε δε εστιακά ή τοπικά. Σχετικά πρόσφατα προφυλακτική θεραπεία χορηγείται και προεγχειρητικά, οπότε

ονομάζεται προεγχειρητική (neo-adjuvant)¹⁰⁷. Με την προσέγγιση αυτή είναι δυνατόν να προσδιορισθούν οι ασθενείς με χημειοευαίσθητα νεοπλάσματα, αλλά ο κύριος σκοπός της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας είναι να καταστήσει έναν όγκο από ανεγχείρητο σε χειρουργήσιμο.

Πίνακας 5. Συσχέτιση μικροσταδιοποίησης πρωτοπαθούς βλάβης, επιπτώση λεμφαδενοκινών μεταστάσεων και δεκαετής επιβίωση ασθενών με κακόηθες μελάνωμα (John Wayne Cancer Institute)

Σταδιοποίηση	Μικροσταδιοποίηση	Αριθμός ασθενών	Λεμφαδενοκινές μεταστάσεις (%)	10-ετής επιβίωση (%)
B r e s l o w	<0,75 mm	768	8.3	97
	0.76-1.50 mm	802	20.2	87
	1.51-3.99 mm	765	36.6	67
	>4.00 mm	205	40.0	40
C l a r k	I/II	622	9.2	97
	III	1046	26.9	85
	IV	785	35.0	68
	V	87	38.0	46

1.5.5.1 Μη ειδική ανοσοθεραπεία

Bacillus Calmette-Guerin (BCG)

Το 1970 ο Morton και συν¹⁰⁸ περιέγραψαν την ύφεση δερματικών βλαβών κακοήθους μελανώματος μετά από την ενδοδερμική χορήγηση BCG (σε 5 από του 8 ασθενείς). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ήταν όμως η παρατήρηση ότι υφέθηκαν και βλάβες απομακρυσμένες από την θέση έγχυσης του BCG (σε 2 από τους 8 ασθενείς), υποδηλώνοντας κάποια συστηματική ανοσολογική δράση. Ακολούθησε και δεύτερη μελέτη από την ίδια ομάδα¹⁰⁹ κατά την οποία χορηγήθηκε τοπικά BCG στις βλάβες μελανώματος σε 36 ασθενείς και παρατηρήθηκε ύφεση στο 91% των ενϊόμενων βλαβών, ενώ στην ίδια μελέτη το 17% των ασθενών παρουσίασε ανταπόκριση και σε απομακρυσμένες βλάβες. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η ανοσολογική απόκριση των ασθενών στο BCG αποτελούσε σημαντικό προγνωστικό παράγοντα και ασθενείς με αρχικά αρνητική Mantoux που θετικοποιήθηκε μετά το BCG είχαν καλύτερη 10-ετή επιβίωση (40%) έναντι αυτών που παρουσίασαν επιβραδυνόμενου τύπου αντίδραση πριν τον πρώτο εμβολιασμό (10%, $p=0.02$). Αυτά τα αρχικά ενθαρρυντικά δεδομένα οδήγησαν σε μια σειρά από τυχαιοποιημένες μελέτες με σκοπό να μελετήσουν την αποτελεσματικότητα του BCG ως μη ειδική μετεγχειρητική ανοσοθεραπεία σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου πρωτοπαθείς βλάβες ή με θετικούς λεμφαδένες¹¹⁰. Έξι μελέτες διερεύνησαν τον ρόλο του BCG σε μελάνωμα σταδίου II ($>1.5\text{cm}$). Σε μια από αυτές το BCG συνδυάσθηκε με ντακαρμπαζίνη ενώ σε άλλη δόθηκε το BCG από του στόματος. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 21-72 μήνες και σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν αποδείχθηκε σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση, το χρόνο ελεύθερο νόσο και το ρυθμό υποτροπής¹¹¹⁻¹¹⁶. Άλλες τυχαιοποιημένες μελέτες διερεύνησαν τον ρόλο της μετεγχειρητικής προφυλακτικής θεραπείας με BCG σε μελάνωμα σταδίου III (κατά AJCC). Στις 4 από αυτές το BCG χορηγήθηκε μαζί με ντακαρμπαζίνη. Ο χρόνος παρακολούθησης κυμάνθηκε από 1-10 έτη. Μόνο δύο από τις μελέτες (με λιγότερους από 22 ασθενείς έκαστη) και με χρόνο παρακολούθησης 2.5 χρόνια έδειξαν ότι το BCG μόνο του ή με DTIC μπορεί να επιβραδύνει τους ρυθμούς υποτροπής και να παρατείνει την επιβίωση^{117,118}. Η μελέτη του Veronesi, υπό την αιγίδα της ΠΟΥ, δεν ανέδειξε όφελος στην επιβίωση ασθενών με σταδίου III (κατά AJCC) μελάνωμα, μολονότι μια υποομάδα ασθενών με αρχικώς αρνητική δερματική αντίδραση στο BCG είχε σημαντικά καλύτερη επιβίωση ($p=0.02$)¹¹⁹.

Corynebacterium Parvum

Το *C. Parvum* είναι ένας αναερόβιος θετικός κατά Gram βάκιλος, με ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες όταν χορηγείται νεκρός, πλεονεκτώντας έτσι του BCG που είναι ζών εμβόλιο. Από τις 3 δημοσιευμένες μελέτες^{120,121} στις οποίες χορηγήθηκε *C. Parvum* για προφυλακτική θεραπεία ασθενών με AJCC III κακόηθες μελάνωμα, οι δύο συνέκριναν την υποδόρια χορήγηση *C. Parvum* έναντι BCG¹²². Στην πρώτη μελέτη με 48 ασθενείς βρέθηκε ότι τόσο χρόνος ελεύθερος νόσου αλλά και η ολική επιβίωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερες σε ασθενείς που έλαβαν 22 δόσεις *C. parvum* (5mg/m²/δόση) για 2 χρόνια¹²⁰. Στην δεύτερη μελέτη 162 ασθενών που έλαβαν 55 δόσεις (5mg/m²/δόση) σε μια περίοδο επίσης 2 ετών διαπιστώθηκε μόνο μια μικρή βελτίωση της ολικής επιβίωσης που όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική¹²¹. Στην Ευρωπαϊκή μελέτη η ενδοφλέβια χορήγηση *C. parvum* (2mg/m²/δόση κάθε 3 εβδομάδες για 24 εβδομάδες) σε 115 ασθενείς με χειρουργημένο AJCC III μελάνωμα, δεν ανέδειξε σημαντικό όφελος συγκρινόμενο με εικονικό φάρμακο¹²³.

Levamisole

Η λεβαμιζόλη είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο με αναφερόμενες ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες. Έχει εγκριθεί ως προφυλακτική θεραπεία, σε συνδυασμό με 5-Φθοριουρακίλη σε ασθενείς με Duke's C καρκίνο παχέος εντέρου. Ο μηχανισμός της αντινεοπλασματικής δράσης είναι ακόμη αδιευκρίνιστος.

Τέσσερις τυχαιοποιημένες μελέτες συνέκριναν την λεβαμιζόλη ως προφυλακτική θεραπεία σε ασθενείς με μελάνωμα^{124,125} έναντι ομάδας έλεγχου που αντιμετωπίστηκε μόνο χειρουργικά¹²⁶. Οι 3 από τις μελέτες συμπέραναν ότι η λεβαμιζόλη δεν ήταν δραστική στη παράταση της επιβίωσης, όμως υπήρχαν σημαντικές διακυμάνσεις στην δοσολογία της λεβαμιζολης^{125,126}. Στην μελέτη του Quirt και συν. η δόση της λεβαμιζόλης υπολογίσθηκε με βάση το βάρος σώματος, και βρέθηκε διαφορά στην επιβίωση στην ομάδα που έλαβε λεβαμιζόλη έναντι της ομάδας ελέγχου (74% έναντι 62% αντιστοίχως στην 5-ετη επιβίωση με $p=0.03$)¹²⁴. Η διαφορά αυτή όμως εξέλειψε μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

1.5.5.2 Ειδική (ενεργός) ανοσοθεραπεία

Βασίζεται στην αρχή ότι ειδικά αντιγόνα σχετιζόμενα με τα καρκινικά κύτταρα θα επάγουν ειδική ανοσολογική απόκριση και θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι πρώτες περιγραφές έγιναν πριν 40 χρόνια όταν παρατηρήθηκε αυτόματη ύφεση μελανώματος μετά από μετάγγιση αίματος. Η ανίχνευση αντιγόνων σχετιζόμενων με το μελάνωμα καθώς και η παρουσία αντισωμάτων που αντιδρούν με αντιγόνα επιφάνειας των κυττάρων μελανώματος στον ορό ασθενών, οδήγησε στην δημιουργία διάφορων εμβολίων με σκοπό να ενισχύσουν την ανοσολογική απόκριση έναντι αντιγόνων μελανώματος¹²⁷⁻¹²⁹, περιλαμβανόμενων κεκαθαρμένων γαγγλιοσιδίων, απεκκρινόμενων αντιγόνων, εκχυλισμάτων μελανώματος και αλλογενών και αυτόλογων παρασκευασμάτων ολικών κυττάρων. Σε μελέτες φάσης II, οι ανταποκρίσεις σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα κυμαίνονται από 13-23%¹³⁰. Επίσης η ανακάλυψη των πεπτιδίων MAGE1 και 3, τυροσινάσης, gp100, Mart-1, που αναγνωρίζονται από τα T-κύτταρα ενθάρρυνε επιπλέον την ερευνά δημιουργίας εμβολίων^{131,132,133}.

1.5.5.3 Χημειοθεραπεία

Εκτεταμένες μελέτες με κυτταροστατικά έδειξαν ότι μόνο λίγες από αυτές είναι δραστικές έναντι του μεταστατικού μελανώματος. Από τις ουσίες αυτές οι πιο εκτενείς μελέτες έγιναν χρησιμοποιώντας ντακαρμπαζίνη. Η ντακαρμπαζίνη είναι ανάλογο ενός ενδιαμέσου στη βιοσύνθεση των πουρινών, εντούτοις δρα ως αλκυλιώντας παράγοντας. Στην μεγαλύτερη μελέτη τυχαιοποιήθηκαν 716 ασθενείς με στάδιο νόσου I, II ή III σε χειρουργική εξαίρεση (185 ασθενείς), σε χειρουργείο και χορήγηση ντακαρμπαζίνη (192 ασθενείς), σε εξαίρεση συν BCG (203 ασθενείς) ή σε εξαίρεση συν ντακαρμπαζίνη και BCG (181 ασθενείς)¹¹⁹. Αν και ο βραχίονας της ντακαρμπαζίνης είχε καλύτερη επιβίωση, δεν ήταν στατιστικώς σημαντική η διαφορά έναντι της ομάδας έλεγχου.

Καμία από τις άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν ντακαρμπαζίνη (με λιγότερους από 100 ασθενείς ανά ομάδα) δεν κατόρθωσε να αποδείξει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ ντακαρμπαζίνης και ομάδας έλεγχου¹³⁴⁻¹³⁶. Σε όλες αυτές τις μελέτες συμπεριλήφθησαν ασθενείς σταδίων I, II και III και υπήρχε σημαντικό εύρος στην δοσολογία της DTIC. Αξιόλογη παρατήρηση στην μελέτη των Hill και συν είναι ότι ασθενείς που παρουσίασαν σημαντική αιματολογική τοξικότητα από το DTIC είχαν και καλύτερο χρόνο ελεύθερο νόσου (30%, $p=0.0003$) σε σύγκριση με την ομάδα έλεγχου,

έναντι των ασθενών χωρίς τοξικότητα στην DTIC (10%, $p < 0.05$)¹³⁶. Εδώ θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι παρότι η DTIC είναι από τα ηπιότερης τοξικότητας φάρμακα, η χορήγηση της έχει συσχετισθεί με θρόμβωση των ηπατικών φλεβών¹³⁷.

Τα στοιχεία για την προφυλακτική χορήγηση σεμουστίνης (methyl-CCNU) είναι ενδιαφέροντα καθότι η διαφορά στον χρόνο ελεύθερο νόσου μεταξύ ομάδας έλεγχου και σεμουστίνης ήταν 12 και 22 μήνες αντιστοίχως ($p = .048$)¹¹⁴. Όμως, επειδή απεδείχθη ότι η ουσία αυτή έχει λευχαιμιογόνο δράση, η παραπάνω παρατήρηση δεν αξιοποιήθηκε¹³⁸. Από τα λοιπά κυτταροστατικά μόνο η βιντεσίνη έχει μελετηθεί ως χημειοπροστατευτικό σε μελάνωμα υψηλού κινδύνου.

Η βιντεσίνη, ημισυνθετικό ανάλογο της βινπλαστίνης, έχει ένα ευρύ φάσμα αντινεοπλασματικής δραστηριότητας και ειδικά στο μελάνωμα η δραστηριότητα της ως μονοθεραπεία φθάνει το 20% σε μεταστατική νόσο^{97,135,139,140}.

Βασιζόμενοι στην δράση της στο μεταστατικό μελάνωμα οι Retsas και συν¹⁴¹ μελέτησαν την δράση της βιντεσίνης σε 169 ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III (κατά AJCC). Από τους ασθενείς αυτούς οι 87 έλαβαν προφυλακτική χημειοθεραπεία με βιντεσίνη μετά από την χειρουργική εξαίρεση της πρωτοπαθούς βλάβης και των επιχώριων λεμφαδένων. Η ομάδα έλεγχου περιελάμβανε 82 ασθενείς οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν μόνο χειρουργικά και τέθηκαν σε παρακολούθηση. Το σχήμα χορήγησης της βιντεσίνης ήταν $3\text{mg}/\text{m}^2$ κάθε 2 εβδομάδες για 1 έτος, στην συνέχεια κάθε 3 εβδομάδες για 6 μήνες και κάθε 4 εβδομάδες για τους επόμενους 6 μήνες μέχρι συμπλήρωσης 2 ετών θεραπείας. Ο χρόνος έναρξης της θεραπείας ήταν εντός 6 εβδομάδων από την χειρουργική εξαίρεση της βλάβης (εύρος 2-20 εβδομάδες). Στην περίπτωση εστιακής-περιοχικής υποτροπής η βλάβη εξαιρείτο και η θεραπεία συνεχιζόταν μέχρι της συμπλήρωσης των δύο ετών. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 8 έτη (ελάχιστος χρόνος παρακολούθησης ήταν 2 έτη).

Ο μέσος χρόνος επιβίωσης ήταν 4.6 χρόνια έναντι 2.2 για την ομάδα βιντεσίνη και την ομάδα έλεγχου αντιστοίχως. Η 5-ετής επιβίωση μετά τον λεμφαδενικό καθαρισμό ήταν 49% (43 ασθενείς) και 28% (23 ασθενείς) για τις δύο ομάδες όπως προαναφέρθηκαν ($p < 0.01$). Το μέγιστο όφελος παρατηρήθηκε στην υποομάδα ασθενών που είχαν διήθηση μόνο ενός επιχώριου λεμφαδένα. Ένα από τα μείζονα πλεονεκτήματα της θεραπείας με βιντεσίνη είναι το ήπιο φάσμα τοξικότητας. Στην παραπάνω μελέτη μόνο ένας ασθενής διέκοψε την θεραπεία λόγω περιφερικής νευροπάθειας (προϋπήρχε

ιστορικό αλκοολισμού). Άλλες παρενέργειες της θεραπείας ήταν ήπια περιφερική νευροπάθεια, παροδική αλωπεκία και δύο συνολικά σηπτικά επεισόδια.

Τα αποτελέσματα της συμπληρωματικής θεραπείας με βιντεσίνη σίγουρα θα πρέπει να ενθαρρύνουν και άλλους ερευνητές για την επαλήθευση τους με τυχαιοποιημένες μελέτες και την ανάπτυξη νέων πιο δραστικών ουσιών της ομάδας αυτής.

1.5.5.4 Ιντερφερόνη

Η ιντερφερόνη έχει δείξει βιολογική δράση έναντι του μελανώματος προκαλώντας τόσο άμεση όσο και έμμεση κυτταροτοξική δράση μέσω ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του μελανώματος¹⁴².

Κλινικές μελέτες με ανασυνδυασμένη ιντερφερόνη άλφα σε μεταστατικό μελάνωμα έδειξαν ποσοστά ανταπόκρισης 14-20%, συγκρίσιμα με την δραστηριότητα της ντακαρμπαζίνης¹²¹.

Η πολυσυζητημένη μελέτη της Eastern Cooperative Oncology Group συνέκρινε χορήγηση ιντερφερόνης αλφα-2b (IFN-2b) για ένα χρόνο έναντι παρακολούθησης¹⁴³. Τυχαιοποιήθηκαν 280 ασθενείς με πρωτοπαθείς όγκους ίσους ή μεγαλύτερους των 4mm, διηθημένους επιχώριους λεμφαδένες διαγνωσμένους είτε κλινικώς (CSII/PSII) είτε παθολογοανατομικώς μετά από εξαίρεση των (CSI/PSII). Μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 6.9 χρόνια και η μελέτη έδειξε μεγαλύτερο χρόνο ελεύθερο νόσου και ολικής επιβίωσης στο σκέλος που έλαβε ιντερφερόνη. Το όφελος ήταν εμφανές για την ομάδα ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες ενώ οι ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες δεν φάνηκε να επωφελούνται σημαντικά από την θεραπεία. Ο χρόνος ελεύθερος νόσου ήταν 1 και 1.7 χρόνια για την ομάδα έλεγχου και την ομάδα ιντερφερόνης αντιστοίχως. Ο χρόνος ολικής επιβίωσης ήταν 2.8 και 3.8 χρόνια για τις δύο ομάδες. Η πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε την θετική δράση της ιντερφερόνης στην ολική επιβίωση. Το σχήμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20 MU/m² ενδοφλεβίως την ημέρα για 5 ημέρες για 4 εβδομάδες στην φάση εφόδου (induction period) και συνεχίσθηκε με 10 MU/m² στην φάση συντήρησης (maintenance phase) υποδορίως 3 φορές την εβδομάδα για 48 εβδομάδες. Οι υψηλές αυτές δόσεις είχαν ως αποτέλεσμα το 26% των ασθενών να σταματήσουν τη θεραπεία λόγω σημαντικών παρενεργειών. Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσίασαν συμπτώματα

γρίπης, νευροψυχιατρικές διαταραχές (κατάθλιψη), μυελοκαταστολή (ουδετεροπενία) και ηπατοτοξικότητα. Η δράση της IFN-άλφα στην ποιότητα ζωής αναλύθηκε με την μέθοδο Q-TWIST. Και με την προσέγγιση αυτή, στην οποία ο χρόνος τοξικότητας και υποτροπής της νόσου αφαιρείται από τον χρόνο ολικής επιβίωσης, φάνηκε ότι για την πλειοψηφία των ασθενών το όφελος από την IFN-άλφα υπερτερεί του κόστους των παρενεργειών¹⁴⁴.

Δυστυχώς τα θετικά αυτά αποτελέσματα δεν επανελήφθησαν σε επιβεβαιωτική τυχαιοποιημένη πολυκεντρική μελέτη που διεξήγαγε η ίδια ομάδα (E1690) της οποίας τα πρώιμα αρνητικά αποτελέσματα ανακοινώθηκαν πρόσφατα από τον Kirkwood στο 23^ο συνέδριο της ESMO. Σε αυτή τη μελέτη τυχαιοποιήθηκαν 642 ασθενείς σε τρία σκέλη: α) υψηλή δόση IFN, β) συμβατική δόση IFN και γ) παρακολούθηση. Σε διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 52 μήνες δεν διαπιστώθηκε κλινικό όφελος υπέρ κάποιου από τα σκέλη της μελέτης.

Άλλες 4 μελέτες χρησιμοποίησαν την ιντερφερόνη ως προφυλακτική θεραπεία. Η γαλλική πολυκεντρική μελέτη του Grob και συν τυχαιοποίησε 499 ασθενείς να λάβουν IFN-αλφα2α, 3×10^6 U 3 φορές την εβδομάδα για 18 μήνες είτε να τεθούν σε παρακολούθηση¹⁴⁵. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε διήθηση λεμφαδένων. Ο χρόνος παρακολούθησης ήταν 2.3 χρόνια και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον χρόνο ελεύθερο νόσου ($p=0.037$) προς όφελος της ιντερφερόνης, όχι όμως στον χρόνο ολικής επιβίωσης.

Ο Creagan και συν. τυχαιοποίησαν 262 ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο μεγαλύτερο από 1.69 mm ή με Λεμφαδενικές μεταστάσεις να λάβουν είτε υψηλές δόσεις IFN-αλφα2α ($20 \times \text{MU}/\text{m}^2$, 3 φορές την εβδομάδα, ενδομυϊκώς) για 3 μήνες, είτε παρακολούθηση. Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 6.1 χρόνια. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση του χρόνου ολικής επιβίωσης, πλην μιας υποομάδας με διηθημένους λεμφαδένες ($p=0.04$)¹⁴⁶. Ο Meyskens και συν επέλεξαν 284 ασθενείς με πρωτοπαθή όγκο μεγαλύτερο από 1.5 mm ή με διηθημένους λεμφαδένες να λάβουν IFN-γ ($0.2 \text{mg}/\text{ημέρα}$, υποδορίως) για ένα χρόνο η μόνο παρακολούθηση¹⁴⁷. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο χρόνο ελεύθερο νόσου και ολικής επιβίωσης μετά από 2.5 χρόνια παρακολούθησης. Τέλος στην μελέτη της ΠΟΥ 444 ασθενείς με επιχώρια λεμφαδενική διήθηση έλαβαν είτε IFN-αλφα2α (3×10^6 U, 3 φορές την εβδομάδα, υποδορίως) για 3 χρόνια είτε τέθηκαν σε παρακολούθηση. Μετά από 3.3 χρόνια παρακολούθησης δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση των χρόνων επιβίωσης.

Όφελος παρατηρήθηκε μόνο στην υποομάδα ασθενών με διήθηση της κάψας των προσβεβλημένων λεμφαδένων. Από τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται πως μόνο υψηλές δόσεις IFN-α είναι ικανές να προσφέρουν όφελος σε μελάνωμα υψηλού κινδύνου για υποτροπή μετά από χειρουργική εξαίρεση.

Όμως ορισμένα ερωτήματα παραμένουν ακόμη αναπάντητα: (α) ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και πρωτοπαθείς βλάβες μεγαλύτερες του 1.5 mm θα επωφεληθούν από αυτήν την θεραπεία, (β) ασθενείς με παχέα μελανώματα (>1.5 mm) και κλινικώς αρνητικούς λεμφαδένες θα πρέπει να υποβάλλονται σε λεμφαδενικό καθαρισμό, στο ερώτημα αυτό απάντηση ίσως δώσει η μοριακή βιολογία με την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων με RT-PCR, όπως επίσης και η ανίχνευση μικρομεταστατικής νόσου με PET (Positron Emission Tomography), (γ) ποια είναι η ιδανική δοσολογία, χρόνος και οδός χορήγησης, και (δ) ποιο το κόστος της βαρείας αυτής θεραπείας σε τοξικότητα και ποιότητα ζωής.

1.5.5.5 Ορμονοθεραπεία

Τα αποτελέσματα μόνο από μια μικρή τυχαιοποιημένη μελέτη που χρησιμοποίησε οξική μεγεστρόλη ανακοινώθηκαν από τον Creagan⁴⁸. Τριάντα τρεις ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 80mg οξικής μεγεστρόλης, και 34 ασθενείς εικονικό φάρμακο. Οι ασθενείς είχαν πρωτοπαθείς βλάβες >1.5 mm ή επιχώρια λεμφαδενοπάθεια. Η ομάδα που έλαβε οξική μεγεστρόλη είχε μέση επιβίωση 7.6 χρόνια ενώ η ομάδα έλεγχου 2.6 χρόνια ($p=0.03$). Άλλες μελέτες δεν έχουν δημοσιευθεί.

Μελλοντικές προσεγγίσεις για προφυλακτική θεραπεία μελανώματος

Παρά την όποια προσφορά της ιντερφερόνης στην πρόληψη υποτροπών και παράταση επιβίωσης, η χρήση της συνοδεύεται από σημαντικές παρενέργειες και κόστος ενώ η πλειοψηφία των ασθενών υψηλού κινδύνου υποτροπιάζουν.

Η βιντεσίνη και ίσως άλλα νεότερα και δραστικότερα αλκαλοειδή της Vinca αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, εκτιμώντας τη δραστηριότητα τους, το ήπιο φάσμα παρενεργειών και το χαμηλό τους κόστος.

Μια ποικιλία από εμβόλια όπως από συνδεδεμένο αυτόλογο όγκο, εκχυλίσματα ολικών κυττάρων, απεκκρινόμενα αντιγόνα μελανώματος, γαγγλιοσίδια, και HLA-περιοριζόμενα ανοσογενή πεπτιδία μελετώνται. Μερικά από τα παραπάνω ενώ έχουν

δείξει κάποιο όφελος δεν έχουν ελεγχθεί σε μελέτες φάσης III. Μια πιθανή εξαίρεση είναι το εμβόλιο με το GM2 γαγγλιοσίδιο που σχεδιάστηκε στο Memorial Sloan-Kettering, και το οποίο σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη (120 ασθενείς) μείωσε τις υποτροπές σε επίπεδο όμοιο με εκείνο υψηλών δόσεων IFN-a, χωρίς όμως μείζονες παρενέργειες^{149,150}. Αυτό το εμβόλιο με την συνχορήγηση του ανοσοενισχυτικού KLH/QS21, συγκρίνεται με την IFN-a με τον τρόπο που χορηγήθηκε στην μελέτη 1684 (E1694).

Άλλη ερευνητική ομάδα από τις ΗΠΑ (Southwest Oncology Group) ολοκλήρωσε μια μελέτη με την χορήγηση εμβολίου Melacin (εκχύλισμα κυτταρικών σειρών πολλαπλού μυελώματος) μαζί με ενισχυτικό DETOX¹⁵¹. Στην μελέτη περιελήφθησαν 680 ασθενείς με μελάνωμα σταδίου T2a (1.5-4.0mm). Τα αποτελέσματα αναμένονται. Σε άλλη πολυκεντρική μελέτη φάσης III, συγκρίνεται η χορήγηση ενδιάμεσης δόσης IFN-a (5 MU/m², υποδορίως, 3 φορές την εβδομάδα x 12 μήνες) και εμβολίου Melacin με IFN-a όπως χορηγήθηκε στην μελέτη 1684.

Άλλη εναλλακτική προσέγγιση είναι η χορήγηση υψηλών δόσεων IFN-a και ταυτόχρονη χορήγηση ακτινοθεραπείας σε ασθενείς με εκτεταμένη επιχώρια λεμφαδενοπάθεια, η χορήγηση συνδυασμένης βιοχημειοθεραπείας καθώς και η χρήση άλλων κυτταροκινών σε συνδυασμό με διάφορα εμβόλια σε χειρουργημένο μεταστατικό μελάνωμα¹⁵².

1.5.6 Ανοσοθεραπεία -Εμβολιασμοί

Τα εμβόλια κατά του καρκίνου είναι γενετικά τροποποιημένα καρκινικά κύτταρα, τα οποία με έκκριση κυτταροκινών η έκφραση συνδिएεργτικών μορίων είναι ικανά να κινητοποιήσουν την άμυνα του ξενιστή προς καταστροφή καρκινικών κυττάρων.

Άλλες μορφές θεραπείας περιλαμβάνουν τη χρήση τροποποιητών βιολογικών απαντήσεων (biologic response modifiers) και τη "θετή" (adoptive) ανοσοθεραπεία. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η ανασυνδυασμένη ιντερφερόνη (τόσο η άλφα όσο και η γάμα) και η ανασυνδυασμένη ιντερλευκίνη 2 (IL-2). Αξίζει βέβαια εδώ να σημειωθεί ότι καμιά κυτταροκίνη δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική ως μονοθεραπεία¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Η "θετή" ανοσοθεραπεία είναι μια διαδικασία κατά την οποία συλλέγονται λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος από τους ασθενείς, επωάζονται in vitro με IL-2 και επανεγχύονται στους ασθενείς μαζί με IL-2. Μια παρόμοια τεχνική περιλαμβάνει την

συλλογή λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο (tumor-infiltrating lymphocytes), την καλλιέργειά τους *in vitro* και την επαναχορήγησή τους στον ασθενή μαζί με IL-2^{156,157}.

1.6 Αλκαλοειδή της *Vinca Rosea*

1.6.1 Ιστορικά

Στην θεραπεία πολλών νόσων όπως και στον καρκίνο σημαντικό ρόλο παίζουν ουσίες φυσικής προέλευσης, όπως τα αλκαλοειδή τα οποία είναι νιτρώδεις βάσεις φυτικής προέλευσης. Στην κατηγορία των αλκαλοειδών ανήκουν η δεμεκολχίδη, η βινπλαστίνη και η βινκριστίνη, όπως και μια σειρά από ημισυνθετικά και συνθετικά παράγωγα τους. Η δεμεκολχίδη είναι παράγωγο της κολχικίνης και προέρχεται από το φυτό *Colchicum autumnale* Linn (*autumn crocus*). Το φυτό αυτό πήρε το όνομα του από την Κολχίδα της Μικράς Ασίας όπου ευδοκίμούσε ευρέως. Οι τοξικές του δράσεις ήταν γνωστές στο Διοσκουρίδη, ενώ οι θεραπευτικές του ιδιότητες αξιοποιήθηκαν στο Βυζάντιο όπως περιγράφεται από τον Αλέξανδρο της Τράλλης τον 6^ο μ.Χ. αιώνα. Χρησιμοποιήθηκε από τον Βαρόνο Anton von Störek ήδη από το 1763 για την θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας, όμως η δραστική ουσία απομονώθηκε μόλις το 1820 από τους Pelletier και Cavenou. Η δεμεκολχίνη έχει δείξει δράση έναντι ορισμένων λευχαιμιών (ΧΜΛ) και λεμφωμάτων, αλλά έχει αντικατασταθεί στην κλινική πράξη από πιο δραστικές ουσίες.

Η βινπλαστίνη και η βινκριστίνη είναι διμερή ινδολο-ινδολικά αλκαλοειδή προερχόμενα από το φυτό *Vinca Rosae* (*Catharanthus roseus* Linn). Η ανακάλυψή τους δρομολογήθηκε μετά από πολλαπλές πληροφορίες από την Ιαμαϊκή και τις Φιλιππίνες για την υπογλυκαιμική δράση του εκχυλίσματος φύλλων του φυτού και οδήγησε δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες στον Καναδά και στα εργαστήρια της φαρμακοβιομηχανίας Lilly (Svoboda) στην μελέτη αυτού του φυτού. Η Καναδική ομάδα παρατήρησε σημαντική ακοκκιοκυτταραιμία κατά την 4^η έως την 8^η ημέρα μετά την λήψη του εκχυλίσματος, ενώ ελάχιστη ήταν η δράση που παρατηρήθηκε σε μεμονωμένους διαβητικούς ασθενείς και μια μόνο ασθενής παρουσίασε παροδική ύφεση της γλυκοζουρίας και των τιμών γλυκόζης αίματος. Το εκχύλισμα προκαλούσε επίσης ουδετεροπενία και καταστολή του μυελού των οστών σε αρουραίους. Η βιολογικώς δραστική ουσία που απομονώθηκε από τα φύλλα της *Vinca Rosea* ονομάστηκε

Vincalkeboblustine. Στα εργαστήρια της Lilly ο Svoboda έδειξε ότι το εκχύλισμα του φυτού είχε κυτταροστατική δράση σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας και κατόρθωσε να απομονώσει την βινκριστίνη και άλλα λιγότερο δραστικά αλκαλοειδή¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

1.6.2 Μηχανισμός εισόδου των αλκαλοειδών στο κύτταρο

Τα περισσότερα αντineοπλασματικά φάρμακα πρέπει να εισέλθουν στο κύτταρο και να έρθουν σε επαφή με τον ενδοκυττάριο στόχο τους, ώστε να εκδηλώσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Για τα αλκαλοειδή της Vinca τουλάχιστον δύο διαφορετικοί μηχανισμοί εισόδου στο κύτταρο έχουν περιγραφεί. Ο Bleyer και συν έδειξε ότι η μεταφορά της βινκριστίνης σε L1210 και P388 κυτταρικές σειρές λευχαιμίας γίνεται μέσω ειδικού μεταφορέα¹⁶¹. Η μεταφορά αυτή είχε χαρακτηρες κινητικής Michaelis-Menten (με σταθερά μεταφοράς $K_m=9.2 \mu\text{mol/L}$) και αναστελλόταν ανταγωνιστικά από την βινπλάστίνη, υποδεικνύοντας ότι και τα δύο φάρμακα χρησιμοποιούν το ίδιο μεταφορέα. Σ' άλλες μελέτες χρησιμοποιώντας την ανθρώπινη λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά CEM¹⁶²⁻¹⁶⁴ και την πολλαπλής φαρμακευτικής αντίστασης κυτταρική σειρά καρκίνου πνεύμονος ινδικού χοιριδίου DC-3F/VCRd-5L¹⁶⁵, έδειξαν ότι υπάρχει ισχυρή εξάρτηση από θερμότητα για την είσοδο της βινκριστίνης, ενισχύοντας την άποψη παρουσίας μεταφορέα.

Αντιθέτως, ο Rahmani και η Rahmani-Jourdheuil χρησιμοποιώντας κεκαθαρμένες κυτταρικές μεμβράνες από ήπαρ ποντικού, έδειξαν ότι η μεταφορά βινορελμπίνης ήταν ισχυρή και ταχεία, κυρίως όμως ήταν ανεξάρτητη από θερμότητα και ακόρεστη, μηχανισμός δηλαδή συμβατός με απλή διάχυση^{166,167}.

1.6.3 Μηχανισμός δράσης των αλκαλοειδών

Τα αλκαλοειδή της Vinca έχουν μια πλειάδα από δράσεις σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, όπως επίδραση στα μικροσωληνάρια, αναστολή σύνθεσης πρωτεϊνών (μέσω ανταγωνισμού για την μεταφορά αμινοξέων ενδοκυτταρίως), αναστολή βιοσύνθεσης πουρινών, αναστολή σύνθεσης πυρηνικών οξέων (DNA και RNA), αύξηση των επιπέδων οξειδωμένης γλουταθειόνης, διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων και των λιπιδίων των μεμβρανών, αύξηση των επιπέδων κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), αναστολή της γλυκόλυσης, διαταραχές στην έκκριση της αντιδιουρητικής ορμόνης, αναστολή της έκκρισης ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και

αυξημένη έκκριση επινεφρίνης¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Από όλες αυτές τις δράσεις η πιο καλά και εις βάθος μελετημένη είναι ο αποπολυμερισμός των μικροσωληναρίων.

1.6.4 Τα μικροσωληνάκια

Τα μικροσωληνάκια είναι ενδοκυττάρια σχηματισμοί με πλειάδα φυσιολογικών λειτουργιών. Δομικά αποτελούνται από τον κορμό των διμερών τουμπουλίνης και από τις σχετιζόμενες με τα μικροσωληνάκια πρωτεΐνες (microtubule-associated proteins-MAPs)¹⁷². Τα πεπτιδία της α- και β-τουμπουλίνης συνδυάζονται στοιχειομετρικά και σχηματίζουν τα ετεροδιμερή της τουμπουλίνης. Μια τρίτη τουμπουλίνη, η γ-τουμπουλίνη, δεν πολυμερίζεται σε μικροσωληνάκια αλλά λειτουργεί ως πυρήνας για τον πολυμερισμό των α-β μικροσωληναρίων, υπάρχει σε πολύ μικρότερες ποσότητες στο κύτταρο και βρίσκεται κυρίως στα κεντροσωμάτια^{173,174}. Σημαντικό ρόλο στην σύνθεση λειτουργικών μονάδων τουμπουλίνης παίζουν τα χαπερόνια και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναδίπλωση της τουμπουλίνης¹⁷⁵. Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί 6 ισόμορφες α-τουμπουλίνης και άλλες 6 ισόμορφες β-τουμπουλίνης¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Στον άνθρωπο όμως η ανάλυση των γονιδίων της τουμπουλίνης ήταν πιο δύσκολη κυρίως λόγω της ύπαρξης ψευδογονιδίων που δεν κωδικοποιούν για ακέραιες πρωτεΐνες^{179,180}. Η διατήρηση υψηλής συγγένειας (conservation) της β-τουμπουλίνης ανάμεσα σε διάφορα είδη (species) οδήγησε διάφορους ερευνητές στην αναζήτηση λειτουργικών διαφορών ειδικές για τους διάφορους ισοτύπους τουμπουλίνης. Η ανάλυση της έκφρασης των διάφορων ισοτύπων τουμπουλίνης στους διάφορους ιστούς ανέδειξε μία ιδιαίτερα σύνθετη κατανομή, δηλώνοντας έμμεσα ότι υπάρχει λειτουργική εξειδίκευση¹⁸¹. Στους νευρώνες υπάρχουν ενδείξεις διαχωρισμού ισοτύπων τουμπουλίνης και διαφορετική σύνθεση και φωσφωρυλίωση¹⁸². Αντιθέτως, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση διάφορων μικροσωληναρίων (πχ, ατράκτου, ενδιάμεσης φάσης, μαστιγίων-βλεφαρίδων, ταινίας) δεν κατόρθωσε να αποδείξει διαχωρισμό των ισοτύπων σε εξειδικευμένους μικροσωληναριακούς σχηματισμούς και ως εκ τούτου η φύση και η έκταση της λειτουργικής εξειδίκευσης της β-τουμπουλίνης παραμένει αμφιλεγόμενη¹⁸³.

Κάθε α-β ετεροδιμερές τουμπουλίνης δεσμεύει δύο μόρια GTP νουκλεοτιδίων. Μια θέση σύνδεσης GTP βρίσκεται στην α-τουμπουλίνη, στην οποία το GTP συνδέεται μη αναστρέψιμα και δεν το υδρολύει, αντιθέτως με την δεύτερη θέση σύνδεσης που βρίσκεται στην β-τουμπουλίνη το GTP συνδέεται αναστρέψιμα και υδρολύεται σε GDP. Η

υδρόλυση αυτή σχετίζεται με την προσθήκη υπομονάδων τουμπουλίνης στα άκρα των μικροσωληναρίων και την επιμήκυνση αυτών. Σε κάθε μικροσωληνάριο υπάρχουν πλάγιοι και επιμήκεις δεσμοί μεταξύ των ετεροδιμερών τουμπουλίνης υπεύθυνοι για την διατήρηση του σωληνώδους σχήματος τους. Μια ομάδα δεσμών είναι υπεύθυνες για την διατήρηση του ετεροδιμερούς συμπλόκου α-β τουμπουλίνης και είναι τόσο ισχυροί που πολύ σπάνια παρατηρείται διάσπαση σε μονομερή α και β τουμπουλίνης. Η δεύτερη σειρά δεσμών είναι στις επιμήκεις επαφές των ετεροδιμερών συμπλόκων, που έχουν σκοπό να στοιχίσουν τις υπομονάδες σε ευθεία στήλη που ονομάζεται πρωτονημάτιο (protofilament). Τα διμερή τουμπουλίνης είναι τα βασικά δομικά στοιχεία των μικροσωληναρίων και με τους πλάγιους δεσμούς τα πρωτονημάτια στοιχίζονται το ένα δίπλα στο άλλο σε ένα κύλινδρο, το μικροσωληνάριο. Ουσιαστικά κάθε μικροσωληνάριο σε ένα κύτταρο είναι μια απλή σωληνώδης κατασκευή φτιαγμένη από 13 πρωτονημάτια, σε σπάνιες δε περιπτώσεις, όπως μικροσωληνάρια των νευρώνων μπορεί να έχουν 11-15 πρωτονημάτια.

Τα μικροσωληνάρια είναι ιδιαίτερα δυναμικοί σχηματισμοί οι οποίοι βρίσκονται σε ένα ασταθές ισοζύγιο, με την συνεχή παρουσία μίας δεξαμενής διαλυτών διμερών τουμπουλίνης. Υπάρχει συνεχής ενσωμάτωση ελευθέρων διμερών στους πολυμεριζόμενους σχηματισμούς και ταυτόχρονη απελευθέρωση διμερών στην δεξαμενή τουμπουλίνης¹⁸⁴.

Διακρίνουμε δύο πληθυσμούς μικροσωληναρίων, τα δυναμικά με σχετικά μικρή διάρκεια ζωής και τα σταθερά με μεγάλη διάρκεια ζωής. Τα δυναμικά μικροσωληνάρια ανευρίσκονται σε εκείνες τις καταστάσεις που απαιτείται γρήγορος σχηματισμός και αποδιοργάνωση αυτών, όπως κατά την διάρκεια της μιτώσεως στην οποία το κυτταροπλασματικό δίκτυο των μικροσωληναρίων αποδιοργανώνεται, εξαφανίζεται και η τουμπουλίνη που απελευθερώνεται χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Μετά την ολοκλήρωση της μιτώσεως, η άτρακτος αποδιοργανώνεται (disassembly) και ξαναδημιουργείται το κυτταροπλασματικό δίκτυο της ενδιάμεσης κυτταρικής φάσης.

Σε αντίθεση με αυτούς τους βραχείας ζωής παροδικούς σχηματισμούς, ορισμένα κύτταρα (κυρίως μη-πολλαπλασιαζόμενα) περιέχουν δομές μικροσωληναρίων που είναι πιο σταθερές. Τέτοιες παρατηρούνται στους κροσσούς και στις βλεφαρίδες (στα

σπερματοζώαρια), στην περιφέρεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τα αιμοπετάλια καθώς και στους νευρώνες.

Ο πολυμερισμός της τουμπουλίνης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως την GTP, το περιβάλλον ιόντων και βεβαίως από τις σχετιζόμενες με τα μικροσωληνάρια πρωτεΐνες (MAPs). Οι MAPs είναι μια σύνθετη ομάδα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις MAP2, MAP4, Mip-90, tau, Stor και ρυθμίζουν τόσο τον πολυμερισμό όσο και την λειτουργία της τουμπουλίνης¹⁸⁵⁻¹⁹⁰.

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι τα μικροσωληνάρια είναι δομικοί και λειτουργικοί κυτταρικοί σχηματισμοί που πληρούν τον χώρο μεταξύ πυρήνα και κυτταρικής μεμβράνης και είναι υπεύθυνα για μια σειρά από κυτταρικές λειτουργίες όπως: οι κινήσεις του κροσσώτου επιθηλίου, αλλαγές στο σχήμα κυττάρων του αίματος καθώς περνάνε από πολύ μικρά τριχοειδή, μεταφορά διάφορων μεταβολιτών, κινήσεις ενδοκυττάρικων οργανιδίων (όπως των μιτοχονδρίων και εκκριτικών κοκκίων), αξονοπλασματική μεταφορά στους νευρώνες και ιδιαίτερος είναι ο ρόλος τους στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την μίτωση και μείωση. Όλες αυτές οι κυτταρικές κινήσεις οφείλονται στον πολυμερισμό και αποπολυμερισμό των μικροσωληναρίων.

Με την τουμπουλίνη αντιδρούν διάφορες φαρμακευτικές ουσίες όπως φυτοκτόνα, αντιπαρασιτικά αλλά και διάφορα φάρμακα με σημαντική κλινική δράση.

Από τα αντινεοπλασματικά φάρμακα τα αλκαλοειδή της Vinca, χαρακτηρίζονται ως «ουσίες αποπολυμερισμού των μικροσωληναρίων». Σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτά τα φάρμακα μειώνουν έως και εξαφανίζουν τα μικροσωληνάρια των κυττάρων και προλαμβάνουν τον πολυμερισμό της κεκαθαρμένης τουμπουλίνης *in vitro*^{191,192}. Σε αντίθεση, μια νεότερη κατηγορία ουσιών που αλληλεπιδρούν με τα μικροσωληνάρια είναι οι ταξάνες οι οποίες προάγουν τον πολυμερισμό κεκαθαρμένης τουμπουλίνης *in vitro* και σε υψηλές συγκεντρώσεις αυξάνουν το κλάσμα της πολυμερισμένης τουμπουλίνης και γι'αυτό χαρακτηρίζονται ως «ουσίες σταθεροποίησης των μικροσωληναρίων»^{193,194}.

1.6.5 Αλκαλοειδή της vinca και μικροσωληνάρια

Ο βασικότερος μηχανισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τα αλκαλοειδή της Vinca θεωρείται ότι είναι η αναστολή της μίτωσης, ως αποτέλεσμα του αποπολυμερισμού των μικροσωληναρίων της μιτωτικής ατράκτου. Η αλληλεπίδραση

των αλκαλοειδών με την τουμπουλίνη και τα μικροσωληνάρια έχει μελετηθεί εκτενώς *in vitro*.

Παρά την εκτενή μελέτη και τον χαρακτηρισμό της οργάνωσης και λειτουργίας των μικροσωληναρίων, ο καθορισμός της φύσης και του αριθμού των σημείων σύνδεσης των αλκαλοειδών με την τουμπουλίνη δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί και αυτό οφείλεται κυρίως σε μεθοδολογικές δυσκολίες. Από τα δεδομένα (και κυρίως από πειραματικά δεδομένα με την βινπλαστίνη) όμως προκύπτει ότι το ετεροδιμερές α-β τουμπουλίνης περιέχει δύο τουλάχιστον θέσεις υψηλής χημικής συγγένειας για τα αλκαλοειδή οι οποίες βρίσκονται στα άκρα των μικροσωληναρίων^{195,196}. Άλλες λιγότερο ειδικές, αγνώστου αριθμού και με μικρότερη χημική συγγένεια θέσεις βρίσκονται στον κορμό των μικροσωληναρίων. Η σύνδεση με τις θέσεις αυτές είναι δοσοεξαρτώμενη. Χαρακτηριστικό της σύνδεσης των αλκαλοειδών με της υψηλής χημικής συγγένειας θέσεις, είναι ότι αναστολή του πολυμερισμού των μικροσωληναρίων γίνεται σε υπό-στοιχειομετρικές συγκεντρώσεις, δηλαδή επιτυγχάνεται με συγκεντρώσεις φαρμάκου (βινπλαστίνης, βινκριστίνης, κολχικίνης και ποδοφυλλοτοξινών) πολύ χαμηλότερες των συγκεντρώσεων ελεύθερης τουμπουλίνης. Έχει υπολογισθεί ότι σύνδεση των αλκαλοειδών με το 1 έως 2% της τουμπουλίνης μπορεί να αναστείλει την δημιουργία μικροσωληναρίων κατά 50% (όπως απεδείχθη με την βινπλαστίνη)¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν ότι η βινπλαστίνη δεν δρα μέσω δημιουργίας αναστρέψιμων συμπλόκων με την διαλυτή τουμπουλίνη αλλά την αδρανοποιεί, ώστε να μην μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση δημιουργίας των μικροσωληναρίων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις συνδέεται είτε μόνη της είτε ως σύμπλοκο με την τουμπουλίνη στα άκρα επιμήκυνσης των μικροσωληναρίων σταθεροποιώντας αυτά, εμποδίζοντας την προσθήκη αλλά και την απώλεια τουμπουλίνης. Αντιθέτως, σε υψηλές συγκεντρώσεις το φάρμακο συνδέεται με τις μικρότερης χημικής συγγένειας θέσεις της τουμπουλίνης. Τέτοιες υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου έχουν ως αποτέλεσμα αφενός μεν τον αποπολυμερισμό των μικροσωληναρίων, αφετέρου δε την καθίζηση τουμπουλίνης (καθώς και σειρά άλλων πρωτεϊνών όπως η ακτίνη) και την δημιουργία μικροκρυστάλλων²⁰⁰.

Δομικά τα αλκαλοειδή είναι διμερή μόρια, αποτελούμενα από δύο περιοχές (domains), την βιντολίνη (VDN) και την καταρανθίνη (CTN). Η CTN έχει την ικανότητα να διεγείρει την έκκριση αμυλάσης από το πάγκρεας και επίσης να προκαλεί σημαντική αποκοκκίωση των παγκρεατικών λοβιακών κυττάρων με άθροιση μεμβρανικών

στοιχείων στον σχηματισμό του Golgi²⁰¹. Κλινικά όμως η CTN διατηρεί μόνο το 1/1000 της δράσης της βινπλαστίνης και της βινκριστίνης ως αντιμιτωτικός παράγοντας, εκφραζόμενος ως 50% μιτωτική αναστολή σε κύτταρα HeLa²⁰². Η CTN είναι το μόριο των αλκαλοειδών υπεύθυνο για την σύνδεση με την τουμπουλίνη, την αναστολή της αυτό-συνάθροισης (self-assembly) της τουμπουλίνης σε μικροσωληνάρια και είναι ιδιαίτερα ισχυρή στην επαγωγή του πολυμερισμού της τουμπουλίνης σε γραμμικούς σχηματισμούς, που όπως στην περίπτωση της βινπλαστίνης οδηγεί στο σχηματισμό παρακρυστάλλων. Αντιθέτως η VDN δεν έχει ισχυρή σύνδεση με την τουμπουλίνη, άλλα η δράση της είναι να προσκολλά ενδοκυτταρίως το μόριο (ρόλος άγκυρας).

Η ισχύς με την οποία τα αλκαλοειδή συνδέονται με την τουμπουλίνη είναι κατά σειρά η βινκριστίνη, η βιντεσίνη, η βινπλαστίνη (VCR>VDS>VLB)²⁰³. Επίσης στον σχηματισμό των μικροσωληναρίων η βινκριστίνη και η βιντεσίνη είναι πιο ισχυρές από την βινορελμπίνη²⁰⁴. Οι διαφορές όμως αυτές δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο ούτε ερμηνεύουν πλήρως τις διάφορες δράσεις που παρατηρούνται μεταξύ των αλκαλοειδών στην κλινική πράξη και σε διαφορετικούς ιστούς. Οι in vivo διαφορές της βιολογικής δράσης που παρατηρούνται θα πρέπει να οφείλονται σε παράγοντες όπως η ύπαρξη ισομορφών τουμπουλίνης που ανευρίσκονται σε διάφορους ιστούς ή σε παράγοντες που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των φαρμάκων με την τουμπουλίνη (πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τα μικροσωληνάρια και κυτταροπλασματικούς παράγοντες).

Ο βασικότερος όμως παράγοντας που καθορίζει την δραστικότητα του φαρμάκου φαίνεται ότι είναι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση αυτού.

Βεβαίως δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα αλκαλοειδή αλληλεπιδρούν και διαταράσσουν τα μικροσωληνάρια. Όμως ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τελικώς προκαλούν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Η διαταραχή που προκαλείται στην μιτωτική άτρακτο και κατά συνέπεια στην ολοκλήρωση της μιτώσεως και του κυτταρικού κύκλου δεν μπορεί από μόνη της να ερμηνεύσει την κυτταροτοξική δράση των αλκαλοειδών. Είναι γνωστό ότι κυτταρικός θάνατος σαν απάντηση στην θεραπεία με διάφορα κυτταροτοξικά φάρμακα, κυτταροκίνες και ακτινοβολία, περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός ιδιαίτερα περίπλοκου συστήματος μοριακών και βιοχημικών αντιδράσεων μεταξύ των οποίων και τις οδούς των p53, bcl2 και fas, που ως τελικό αποτέλεσμα έχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Αρκετά στοιχεία υποστηρίζουν ότι

αυτές οι οδοί ενεργοποιούνται σε καρκινικά κύτταρα μετά από έκθεση στα αλκαλοειδή της Vinca²⁰⁵⁻²⁰⁷.

1.7 Φαρμακευτική αντίσταση στον καρκίνο: ένα πολυπαραγοντικό πρόβλημα

Αντίσταση στη κυτταροτοξική χημειοθεραπεία είναι ένα συχνό κλινικό πρόβλημα, με συνέπεια την μη αποτελεσματική θεραπεία ασθενών με εκτεταμένα νεοπλάσματα. Παρά τις προόδους στην χειρουργική, ακτινοθεραπεία και κλινική ογκολογία, η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων θα διαφύγει από την πρωτοπαθή τους εστία και θα δώσει συστηματικές μεταστάσεις. Στη μεταστατική νόσο η ανταπόκριση στα υπάρχοντα κυτταροστατικά είναι περιορισμένη και παροδική.

Ανάπτυξη αντίστασης μπορεί να δημιουργηθεί κατά την διάρκεια της θεραπείας αλλά μπορεί να αποτελεί και ενδογενές χαρακτηριστικό του νεοπλάσματος. Νεοπλάσματα με ενδογενή ή *de novo* αντίσταση χαρακτηρίζονται εκείνα που παρότι δεν έχουν εκτεθεί σε κυτταροστατικά φάρμακα στο παρελθόν δεν θα ανταποκριθούν στην χημειοθεραπεία που θα χορηγηθεί. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν νεοπλάσματα όπως του παγκρέατος, ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονος, το κακόηθες μελάνωμα και ο καρκίνος παχέος εντέρου²⁰⁸⁻²¹⁰.

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν νεοπλάσματα όπως του μαστού, των ωοθηκών και τα μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα τα οποία αρχικώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα χορηγούμενα χημειοθεραπευτικά, αλλά είτε στη διάρκεια της θεραπείας είτε με την υποτροπή της νόσου εμφανίζουν έναν εντελώς διαφορετικό φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από σημαντική χημειοαντίσταση τόσο στα φάρμακα στα οποία αρχικώς ήταν ευαίσθητα, αλλά και αντίσταση σε ουσίες στις οποίες ουδέποτε εκτέθηκαν και οι οποίες έχουν εντελώς διαφορετικές χημικές δομές και μηχανισμούς δράσεως. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται πολυφαρμακευτική αντίσταση (*multidrug resistance - MDR*)²¹¹⁻²¹³.

Θα πρέπει να ξεχωρίσουμε δύο τύπους φαρμακευτικής αντίστασης. Ο πρώτος είναι η κλινική φαρμακευτική αντίσταση που παρατηρούμε στην καθημερινή αντιμετώπιση των διάφορων όγκων και ο δεύτερος τύπος είναι η πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση, ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε και περιγράφηκε αρχικώς

στο εργαστήριο και μετά συσχετίσθηκε με την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως αντλίες μεταφοράς χημικών ουσιών.

Οι παράγοντες που εμπλέκονται στην κλινικώς παρατηρούμενη φαρμακευτική αντίσταση μπορούν να ταξινομηθούν σε φαρμακευτικούς και κυτταρικούς.

1.7.1 Φαρμακευτικοί παράγοντες

Ένας βασικός παράγοντας που καθορίζει την χημειοευαισθησία είναι η επαρκής έκθεση του καρκινικού κυττάρου στο φάρμακο. Η επαρκής έκθεση στο φάρμακο είναι συνάρτηση τόσο της συγκεντρώσεως αυτού, όσο και της διάρκειας-χρόνου έκθεσης σε αυτό. Ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει και ελέγχει την έκθεση στο φάρμακο είναι το θεραπευτικό σχήμα που χορηγείται, δηλαδή η δόση και η διάρκεια εγχύσεως, παράμετροι όμως που περιορίζονται από την τοξικότητα που προκαλούν στους φυσιολογικούς ιστούς²¹⁴. Στον σχεδιασμό ενός θεραπευτικού σχήματος θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη και παράγοντες σχετιζόμενοι με το κυτταροστατικό που χορηγείται. Για παράδειγμα η μέγιστη αποτελεσματικότητα των αλκυλιούντων παραγόντων (όπως η κυκλοφωσφαμίδη) καθορίζεται από την μέγιστη συγκέντρωσή τους, σε αντίθεση με φάρμακα που έχουν ειδική δράση σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου (όπως οι αντιμεταβολίτες και τα αλκαλοειδή της Vinca) των οποίων η δράση εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης στο κυτταροστατικό^{82,215-220}.

Επαρκής έκθεση στο κυτταροστατικό μπορεί να περιορίζεται και από μορφολογικούς και ανατομικούς παράγοντες του όγκου και του ασθενούς, όπως για παράδειγμα σε νεοπλασμάτα του κεντρικού νευρικού συστήματος στα οποία ο αιματο-εγκεφαλικός φραγμός δεν επιτρέπει υψηλές και επαρκείς συγκεντρώσεις στον στόχο. Μεγάλων διαστάσεων νεοπλασμάτα με περιοχές πτωχές σε αιμάτωση όπως και υποξικές περιοχές μπορεί να μετριάσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας²²¹. Σε άλλες περιπτώσεις πάλι επαρκής έκθεση των καρκινικών κυττάρων στο κυτταροστατικό εξαρτάται από την μετατροπή του φαρμάκου στην δραστική του μορφή. Παράδειγμα αποτελούν οι αλκυλιούντες παράγοντες των οποίων η μετατροπή στους δραστικούς μεταβολίτες εξαρτάται από τον ηπατικό τους μεταβολισμό στον οποίο συμμετέχει το σύστημα ενζύμων του κυτοχρώματος P450^{222,223}. Τα επίπεδα ενεργοποίησης σε αυτήν την περίπτωση έχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ ασθενών, γεγονός που οφείλεται

σε γενετικές παραλλαγές έκφρασης των ενζύμων αλλά και σε παραμέτρους σχετιζόμενες με τον ίδιο τον όγκο.

Παράκαμψη των φαρμακευτικών αιτιών αντίστασης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Με την τοπική χορήγηση των φαρμάκων (ενδοηπατική, ενδοπεριτοναϊκή και περιοχική έγχυση στα άκρα), μπορούν να επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις στους νεοπλασματικούς ιστούς. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε περιορισμένη και τοπική και όχι σε μεταστατική νόσο. Χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας με την ταυτόχρονη χρήση τεχνικών για την προστασία των φυσιολογικών ιστών από την τοξικότητά τους. Παράδειγμα αποτελεί η μεγα-χημειοθεραπεία με την ταυτόχρονη μετάγγιση περιφερικών αρχέγονων κυττάρων για την προστασία του μυελού των οστών. Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως σε ασθενείς με χημειοευαίσθητα νεοπλάσματα όπως τα λεμφώματα και ο καρκίνος του μαστού όχι όμως και σε χημειοάντοχα νεοπλάσματα όπως για παράδειγμα το μελάνωμα. Επίσης η χορήγηση φαρμάκων που θα ενεργοποιούνται στην δραστική τους μορφή σε περιοχές υποξίας, όπως αυτή παρατηρείται σε μεγάλους όγκους με πτωχή αιμάτωση, αναμένεται να έχει συνεργική δράση με την ακτινοθεραπεία.

1.7.2 Κυτταρικοί παράγοντες

Οι κυτταρικοί παράγοντες που ενέχονται στην φαρμακευτική αντίσταση είναι εκείνοι που επηρεάζουν την συγκέντρωση του φαρμάκου σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Εδώ περιλαμβάνονται μηχανισμοί:

- α) διαταραγμένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φαρμάκου λόγω υπερέκφρασης διάφορων πρωτεϊνών-μεταφορέων (Pgp, MRP, LRP),
- β) διαταραχές στην έκφραση και λειτουργία μεταβολικών οδών (glutathione-S-transferase),
- γ) μειωμένη ευαισθησία στο φάρμακο λόγω μεταβολών στα συμπλέγματα φαρμάκου-στόχου, είτε λόγω αυξημένων επιπέδων των στόχων είτε λόγω μεταλλάξεων αυτών (τοποϊσομεράση II),
- δ) διαταραχές σε οδούς σήμανσης (erb-B2, ras),
- ε) αυξημένη επιδιόρθωση βλαβών (O^6 -alkylguanine-DNA-alkyltransferase) και
- στ) διαταραχές στις οδούς της απόπτωσης (p53, bcl-2)

Μετάφραση των παραπάνω δεδομένων στην κλινική πράξη είναι αρκετά δύσκολη αλλά αποτελεί και μεγάλη πρόκληση για τον σχεδιασμό και εκτέλεση κλινικών μελετών.

1.7.3 Πολυφαρμακευτική αντίσταση (Multidrug resistance, MDR)

Η πολλαπλή Φαρμακευτική αντίσταση είναι όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα φαινόμενο που αρχικώς παρατηρήθηκε και μελετήθηκε στο εργαστήριο σε *in vitro* πρότυπα, χρησιμοποιώντας κυρίως κυτταρικές σειρές και αργότερα αξιολογήθηκε στην κλινική πράξη. Ανθεκτικές σε κυτταροστατικά φάρμακα κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται στο εργαστήριο, με την συνεχή ή διαλείπουσα έκθεση των κυττάρων αυτών στο εν λόγω φάρμακο. Πολύ συχνά παρατηρείται τα κύτταρα αυτά να έχουν διασταυρούμενη αντίσταση και σε μια σειρά από άλλα φάρμακα με εντελώς διαφορετική χημική δομή και μηχανισμό δράσης, στα οποία φάρμακα τα κύτταρα ουδέποτε είχαν εκτεθεί στο παρελθόν. Το φάσμα των ουσιών αυτών περιλαμβάνει διάφορες φυσικής κυρίως προέλευσης ουσίες όπως, ανθρακυκλίνες, επιπτοδοφυλλοτοξίνες και αλκαλοειδή της Vinca. Η ταυτόχρονη αντίσταση σε αυτό το ευρύ φάσμα κυτταροστατικών με διαφορετική δομή και λειτουργία, ονομάστηκε πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση (Multidrug Resistance, MDR) (Πίνακας 6). Σε αντίθεση με την κλινικώς παρατηρούμενη πολλαπλή Φαρμακευτική αντίσταση, η *in vitro* πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση δεν περιλαμβάνει ουσίες όπως την πλατίνη, τους αντιμεταβολίτες και τους αλκυλιούντες παράγοντες. Οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν συσχετισθεί με MDR περιλαμβάνουν την αυξημένη άντληση εκτός κυττάρου των φαρμάκων από πρωτεΐνες όπως η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Pgp) και η σχετιζόμενη με πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση πρωτεΐνη (multidrug resistance-associated protein, MRP), διαταραχές σε στόχους φαρμάκων όπως η DNA τοποϊσομεράση II, αυξημένη αποτοξίνωση ουσιών (μέσω του συστήματος της γλουταθειόνης, GSH) και τέλος υπερέκφραση της μείζονος εφαιλήριας πρωτεΐνης LRP (lung resistance-associated protein).

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι όλοι αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να ανιχνευθούν σε ανθρώπινους όγκους και μερικοί από τους παραπάνω μηχανισμούς έχουν συσχετισθεί με πτωχή κλινική έκβαση σε ορισμένα νεοπλασμάτα²²⁴.

Πίνακας 6. Φάρμακα υπόστρωμα για Pgp

Κατηγορία	Φάρμακο
Ανθρακυκλίνες	Δοξορουβικίνη Νταουνορουβικίνη Μιτοξαντρόνη
Αντιβιοτικά	Ακτινομυκίνη D Μιτομυκίνη C Πλικαμυκίνη
Αντιμικροσωληναριακά φάρμακα	Βινκριστίνη Βινπλαστίνη Κολχικίνη Ταξόλη
Επιποδοφυλλοτοξίνες	Ετοποσίδη Τενιποσίδη
Αναστολείς Τοποισομεράσης I	Τοποτεκάνη

1.8 Η in vitro δοκιμή νέων φαρμάκων

1.8.1 Γενικά

Η κλασσική χημειοθεραπεία αποτελεί σήμερα έναν από τους ακρογωνιαίους λίθους στην αντιμετώπιση των περισσότερων νεοπλασμών. Ενώ η χειρουργική και η ακτινοθεραπεία έχουν θέση στην αντιμετώπιση της τοπικής νόσου, η χημειοθεραπεία ενδείκνυται στην αντιμετώπιση συστηματικής νόσου όπως αυτή παρατηρείται στα περισσότερα κακοήγη νεοπλάσματα. Παρά τις όποιες εξελίξεις στην ανοσοθεραπεία και την γονιδιακή θεραπεία, η χημειοθεραπεία θα έχει και στο μέλλον πρωτεύοντα ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου είτε από μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες προαναφερθείσες μορφές θεραπείας.

Η ανακάλυψη νέων πιο δραστικών κυτταροστατικών αποτελεί έναν μείζονα στόχο της σύγχρονης βιοϊατρικής έρευνας. Γίνεται λοιπόν μία σημαντική προσπάθεια αφενός να αναγνωρισθούν νέοι κυτταρικοί στόχοι, αφετέρου να ενισχυθεί η δράση ήδη υπαρχόντων φαρμακευτικών παραγόντων (βελτιώνοντας την βιοδιαθεσιμότητα τους, τροποποιώντας την φαρμακοκινητική τους, δημιουργώντας προφάρμακα που θα ενεργοποιούνται μόνο στη περιοχή του όγκου από ένζυμα που εκκρίνει το νεόπλασμα) με τελικό πάντα στόχο την παράκαμψη όλων των μηχανισμών αντίστασης του καρκινικού κυττάρου.

1.8.2 Ιστορική αναδρομή στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων

Η ανακάλυψη νέων δραστικών κυτταροστατικών φαρμάκων στο παρελθόν βασίστηκε κυρίως σε εύστοφες παρατηρήσεις ερευνητών και σε διάφορα τυχαία γεγονότα. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της ανακάλυψης του πρώτου κυτταροστατικού της σύγχρονης χημειοθεραπευτικής. Στην διάρκεια του Α' και του Β' παγκόσμιου πολέμου, ένα από χημικό όπλο, προκαλούσε λευκοπενικούς πυρετούς σε όσους εκτέθηκαν σε αυτό. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη του και διαπιστώθηκε αντινεοπλασματική δράση έναντι μεταμοσχευθέντων λεμφοειδούς προελεύσεως νεοπλασμάτων ποντικών. Τα εργαστηριακά αυτά δεδομένα μεταφράστηκαν στην κλινική πρακτική και οδήγησαν στην ανακάλυψη του ιδιαίτερα χρήσιμου και δραστικού κυτταροστατικού, του αζωθυπερίτη²²⁵.

Παρομοίως και στα μέσα της δεκαετίας του 1950 και στις αρχές του 1960, η παρατήρηση ότι το εκχύλισμα του φυτού *periwinkle*, το οποίο μελετούσαν για πιθανή

υπογλυκαιμική δράση, προκαλούσε λεμφοπενία και ουδετεροπενία σε πειραματόζωα και ασθενείς, οδήγησε στην ανακάλυψη των αλκαλοειδών της Vinc^{159,160}.

Άλλο παράδειγμα τυχαίας ανακάλυψης κυτταροστατικού φαρμάκου, αποτελεί η πλατίνη. Η παρατήρηση ότι η ανάπτυξη βακτηριδίων αναστελλόταν με την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσα από ηλεκτρόδια πλατίνης που αιωρούνταν σε θρεπτικό υλικό, οδήγησε στην ανακάλυψη μιας νέας ομάδας ανόργανων πλατινούχων συμπλόκων με βακτηριοκτόνο δράση. Η υποψία ότι οι ουσίες αυτές μπορεί να έχουν και αντineοπλασματική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς επιβεβαιώθηκε και οδήγησε στην ανακάλυψη του ισχυρού κυτταροστατικού σισπλατίνης^{226,227}.

Παρόμοια ήταν και η οδός ανακάλυψης ορισμένων ορμονών που σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως στην ογκολογία. Η παρατήρηση ότι υπέρ-θεραπευτικές δόσεις γλυκοκορτικοειδών προκαλούσαν λεμφοπενία και ατροφία θύμου σε πειραματόζωα οδήγησε στην διαπίστωση ότι είχαν και αντineοπλασματική δράση έναντι ορισμένων λευχαιμιών και λεμφωμάτων²²⁸.

Επίσης εμπειρικές παρατηρήσεις ότι ο ευνουχισμός αρσενικών πειραματόζωων είχε ως αποτέλεσμα την υποστροφή του προστάτη, η οποία μπορούσε να αποκατασταθεί με την χορήγηση ανδρογόνων, ενώ τα οιστρογόνα είχαν αντίθετο αποτέλεσμα, οδήγησαν στην διαπίστωση ότι ο προστάτης είναι ανδρογόνο-εξαρτώμενο όργανο. Περαιτέρω κλινικές μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ορχεκτομή ή χορήγηση οιστρογόνων σε καρκίνο προστάτου επιβεβαίωσαν τις αρχικές παρατηρήσεις²²⁹.

Την ίδια πορεία είχε και η ανακάλυψη ότι η ανάπτυξη του μαζικού αδένος συσχετίζεται με την δράση των οιστρογόνων και των ανδρογόνων και ότι τα αντineοιστρογόνα (ταμοξιφαίνη) έχουν ανασταλτική δράση στον καρκίνο του μαστού^{230,231}.

1.8.3 Το πρόγραμμα ελέγχου νέων φαρμάκων του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (NCI) των ΗΠΑ

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων περιστρέφεται γύρω από δύο άξονες, την εμπειρική ανακάλυψη και τον αιτιολογικό σχεδιασμό φαρμάκων²³²⁻²³⁵. Τα περισσότερα κυτταροστατικά που βρίσκονται σήμερα σε κλινική χρήση, προήλθαν από εμπειρικές προσπάθειες ελέγχου μεγάλου αριθμού φυτικής κυρίως προέλευσης ουσιών. Αυτός ο έλεγχος για αντineοπλασματικές ουσίες έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος για την

ανακάλυψη δραστικών ουσιών οι οποίες αποτελούν τον πυρήνα για την περαιτέρω δημιουργία ημισυνθετικών και συνθετικών δραστικότερων παραγώγων τους.

Ανασκοπώντας το πρόγραμμα ελέγχου νέων φαρμάκων του NCI, θα δούμε ότι αρχικώς (περίπου από το 1955 έως το 1975) η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασιζόταν στην αντineοπλασματική δράση που επιδείκνυαν σε κυτταρικές σειρές από λευχαιμίες τρωκτικών (L1210 και P388). Μόνο εφόσον διαπιστυνόταν δραστικότητα σε αυτές τις σειρές θα προωθούνταν μια ουσία σε περαιτέρω *in vivo* μελέτη πάλι όμως με την χρήση των ίδιων λευχαιμικών σειρών ενοφθαλμίζοντας τα ίδια αυτά κύτταρα σε πειραματόζωα. Ο λόγος για την προσέγγιση αυτή ήταν ότι τα πρότυπα μελέτης των λευχαιμιών και λεμφωμάτων ποντικών ήταν σχετικά φθηνά και έδιναν την δυνατότητα γρήγορου ρυθμού μελέτης των ουσιών. Και όντως από την πρώτη εφαρμογή του προγράμματος μέχρι την τροποποίησή του στα μέσα της δεκαετίας του '70 ελέγχθηκαν περισσότερες από 400.000 νέες ουσίες²³⁶⁻²³⁸.

Ήταν εξαρχής όμως φανερό ότι το σύστημα είχε σημαντικούς περιορισμούς. Ο βασικότερος ήταν ότι με το σύστημα αυτό επιλεγόταν ουσίες που ήταν δραστικές μόνο έναντι ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων με δείκτες πολλαπλασιασμού σχεδόν 100%, ήταν δηλαδή ουσίες ειδικές του κυτταρικού κύκλου. Απορρίπτονταν ουσίες με δράση έναντι κυττάρων σε φάση ηρεμίας. Τα φάρμακα τα οποία προήλθαν από αυτόν τον αρχικό τρόπο ελέγχου αποδείχθηκαν δραστικά κυρίως έναντι λευχαιμιών και λεμφωμάτων και λιγότερο έναντι συμπαγών όγκων.

Για να επεκταθεί το φάσμα αναγνώρισης πιθανών δραστικών ουσιών, στην δεκαετία 1975-1985 περιελήφθησαν στο πρόγραμμα ελέγχου του NCI και ξενομοσχεύματα από συμπαγείς όγκους τρωκτικών και ανθρώπων. Όμως πάλι η αρχική επιλογή των δραστικών ουσιών προερχόταν από την μελέτη στις κυτταρικές σειρές των λευχαιμιών (L1210 και P388). Έτσι, η προσθήκη συμπαγών όγκων στην δεύτερη φάση του προγράμματος δεν επέφερε μεγάλες αλλαγές στην προώθηση δραστικών ουσιών και τα νέα φάρμακα που επιλεγόταν έδειχναν πάλι δραστικότητα κυρίως έναντι αιματολογικών κακοηθειών.

Το 1985 έγινε ριζική αλλαγή στο πρόγραμμα και στην πρωταρχική *in vitro* μελέτη των ουσιών περιλήφθηκαν 60 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, με προέλευση από ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών (πνεύμονας, μαστός, έντερο, μελάνωμα, νεφρός, ωοθήκες, κεντρικό νευρικό σύστημα, αλλά και λευχαιμίες-λεμφώματα). Η αρχή του νέου

συστήματος ήταν ότι με τον τρόπο αυτό θα αναγνωριζόταν ουσίες που θα έχουν δράση έναντι συγκεκριμένων κακοηθειών και στην συνέχεια θα μπορούσε να μελετηθεί η δράση τους έναντι των *in vivo* μοντέλων των αντιστοίχων όγκων²³³.

Ο σχεδιασμός αυτός είχε αρκετά πλεονεκτήματα. Πρώτον δίδεται ιδιαίτερη έμφαση στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, δεύτερον αναπτύχθηκε νέα *in vitro* τεχνική (MTT και SRB) ταχύτατης μελέτης νέων ουσιών (συνθετικές χημικές ουσίες αλλά και ανάλυση εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων) σε ευρεία κλίμακα και τρίτον αποφεύγεται η χρήση πειραματόζων, για το αρχικό τουλάχιστον στάδιο ελέγχου.

Θα περιγράψουμε συνοπτικά τον τρόπο ελέγχου της δραστηριότητας μίας νέας φαρμακευτικής ουσίας.

Ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων κάθε υπό μελέτη ουσίας δοκιμάζεται έναντι και των 60 κυτταρικών σειρών. Τα καρκινικά κύτταρα τοποθετούνται σε δισκία των 96-φρεατίων και μετά από 24 ώρες προστίθεται το προς μελέτη φάρμακο, το οποίο επωάζεται με τα κύτταρα για περαιτέρω 48 ώρες. Μετά το πέρας του πειράματος, τα κύτταρα μονιμοποιούνται *in situ* (με τριχλωροακετοξικό οξύ - TCA), εκπλένονται και αποξηραίνονται, προστίθεται στην συνέχεια σουλφοροδαμίνη Β (SRB), μια ροζ ανιονική χρωστική που συνδέεται με τα βασικά αμινοξέα των μονιμοποιημένων καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα πλένονται εκ νέου και το υπόλοιπο της χρωστικής που παραμένει δηλώνει την βιωσιμότητα της μάζας των προσκολλημένων κυττάρων. Η χρωστική διαλύεται και μετράται φασματοφωτομετρικά. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε βάσεις δεδομένων για περαιτέρω ανάλυση.

Τα αποτελέσματα καταγράφονται ως καμπύλες δόσης-αποτελεσματικότητας για κάθε ουσία έναντι των 60 κυτταρικών σειρών. Έτσι δημιουργείται το "δακτυλικό αποτύπωμα" κάθε ουσίας το οποίο δίδεται με την μορφή ενός πίνακα όπου η επιμέρους ευαισθησία κάθε κυτταρικής σειράς συγκρίνεται με την μέση ευαισθησία όλων των λοιπών κυτταρικών σειρών. Ο πίνακας αυτός αποτελείται από ράβδους οι οποίες προβάλλουν δεξιά και αριστερά από την μέση ευαισθησία όλων των κυτταρικών σειρών, εξαρτώμενο από το εάν η κυτταρική σειρά είναι πιο ευαίσθητη (δεξιά) η λιγότερο ευαίσθητη (αριστερά) από τον μέσο όρο. Το μήκος της ράβδου είναι ανάλογο με την σχετική ευαισθησία της κάθε κυτταρικής σειράς.

Το πλήθος των "δακτυλικών αποτυπωμάτων" αρχειοθετείται σε βάσεις δεδομένων, όπου ένα ειδικό πρόγραμμα "COMPARE"²³⁹ χρησιμοποιώντας απλούς

αλγορίθμους συγκρίνει κάθε ουσία με όλο το φάσμα των ήδη μελετηθέντων και δίδεται ένα πρότυπο ομοιότητας που τις περισσότερες φορές αντιπροσωπεύει και πρότυπο ομοιότητας στον μηχανισμό δράσης, μηχανισμού αντίστασης και μοριακής δομής^{240,241}.

Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στην αναγνώριση ουσιών με κοινούς μηχανισμούς δράσης (πχ ουσίες που αλληλεπιδρούν με την τουμπουλίνη και τις τοποϊσομεράσες ή δρουν ως αντιμεταβολίτες), παρά τις σημαντικές διαφορές που μπορεί να έχουν στην χημική τους δομή. Με το σύστημα αυτό, ουσίες που δεν ταυτίζονται με άλλες στο φάσμα δραστηριότητας, στο πρόγραμμα COMPARE, είναι και οι πλέον ενδιαφέρουσες (ουσίες με πιθανό νέο μηχανισμό δράσης) και έτσι παίρνουν προτεραιότητα στην περαιτέρω μελέτη.

Σε μία πρόσφατη δημοσίευση²⁴², περιγράφεται η νεότερη δομή και ταξινόμηση των βάσεων δεδομένων στις οποίες καταγράφονται οι πληροφορίες από τις μελετούμενες ουσίες. Υπάρχουν 3 βάσεις δεδομένων οι A, T και S (A=activity, T=target, S=structure). Στην πρώτη υπάρχουν όλα τα στοιχεία σχετικά με την δραστηριότητα μια δεδομένης ουσίας έναντι των 60 κυτταρικών σειρών και η σχέση της με όλες τις άλλες μελετηθείσες ουσίες όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Η βάση δεδομένων T περιέχει πιθανούς κυτταρικούς στόχους και τροποποιητές δραστηριότητας στα κύτταρα. Τέτοιοι στόχοι είναι ογκογονίδια, κατασταλτικά του όγκου γονίδια, πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας, υποδοχείς κυτταροκινών, μόρια ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, ένζυμα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, στοιχεία από τις αρχιτεκτονικές δομές του κυττάρου, ενδοκυττάρια μόρια σήμανσης, μεταβολικά ένζυμα και πρωτεΐνες πολυφαρμακευτικής αντίστασης. Στην βάση δεδομένων S περιέχονται οι πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με την διαδιάστατη και τρισδιάστατη δομή των μορίων.

Με το νέο αυτό σύστημα μπορούν να ανεβρεθούν και να χαρακτηρισθούν ουσίες με δράση σε μεταλλαγμένο p53, ουσίες που αποτελούν υπόστρωμα της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης, ουσίες με ειδική δράση σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

Προτεραιότητα μελέτης λαμβάνουν οι ουσίες που έχουν: (α) δράση έναντι κυτταρικών σειρών ενός μόνο νεοπλασματος (πχ πνεύμονας ή μελάνωμα), (β) μοναδική χημική δομή, (γ) πρότυπο COMPARE που δεν ταιριάζει με άλλες ουσίες που έχουν γνωστό μηχανισμό δράσης και (δ) να υπάρχει επαρκής ποσότητα της ουσίας διαθέσιμη για μελέτη.

Το επόμενο βήμα στον έρευνα ενός φαρμάκου είναι η *in vivo* μελέτη του σε πειραματόζωα, χρησιμοποιώντας ένα περιορισμένο αρχικώς φάσμα ξενομοσχευμένων όγκων που προέρχονται από τις πιο ευαίσθητες κυτταρικές σειρές στην συγκεκριμένη ουσία. Οι ουσίες που θα αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του όγκου ή ακόμη και υποστροφής αυτού θα προωθηθούν για μελέτη σε μεγαλύτερο φάσμα νεοπλασμάτων. Μόνο οι ουσίες με *in vivo* δραστικότητα χωρίς παράλληλη σημαντική τοξικότητα στα ποντίκια θα χαρακτηρισθούν ως "έχουσες ευνοϊκό θεραπευτικό δείκτη άξιο περαιτέρω ανάπτυξης"^{243,244}.

Η συνέχεια περιλαμβάνει ενοφθαλμισμό όγκων σε τρωκτικά και μελέτη της ανασταλτικής ικανότητας πολλαπλασιασμού ή υποστροφής του όγκου. Επιλέγονται τουλάχιστον 3 κυτταρικές σειρές που έχουν δείξει την μεγαλύτερη ευαισθησία στον αρχικό έλεγχο.

Ο τρόπος που μελετώνται τα νέα φάρμακα *in vivo* σε πειραματόζωα (ποντίκια) είναι:

1. απευθείας έγχυση του φαρμάκου σε υποδόριες καρκινικές μάζες (ορισμένοι αντιμεταβολίτες ανακαλύφθηκαν με τον τρόπο αυτό),
2. εμφύτευση καρκινικών κυττάρων ενδοπεριτοναϊκά και έγχυση του φαρμάκου, επίσης ενδοπεριτοναϊκά (τα περισσότερα από τα εν χρήση κυταροστατικά μελετήθηκαν με τον τρόπο αυτόν),
3. εμφύτευση ή έγχυση των καρκινικών κυττάρων υποδορίως, ενδοφλεβίως ή στην περινεφρική κάψα ενώ το φάρμακο ενίεται ενδοπεριτοναϊκά (πολύ λίγες ουσίες μελετήθηκαν με τον τρόπο αυτό),
4. εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων υποδορίως και χορήγηση του φαρμάκου από του στόματος, ενδομυϊκώς ή ενδοφλεβίως (η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται από λίγα μόνο κέντρα).

Η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων κρινόταν παλαιότερα από την ολική επιβίωση των πειραματόζωων, ενώ τώρα πλέον για λόγους προστασίας των ζώων οι όγκοι ενοφθαλμίζονται υποδορίως, το ζώο θυσιάζεται μετά από εύλογο χρονικό διάστημα (προτού εμφανίσει συστηματικές εκδηλώσεις της νόσου) και μετράται το μέγεθος του όγκου και το βάρος του ζώου σε σχέση με ομάδα ελέγχου.

Εκτός από την μελέτη δραστικότητας στα πειραματόζωα, συγκεντρώνονται και πληροφορίες σχετικά με παραμέτρους όπως η συγκέντρωση του φαρμάκου και των

μεταβολιτών του στα βιολογικά υγρά, η κάθαρση αυτών και η περιγραφή κάθε είδους τοξικότητας πριν το φάρμακο εισέλθει σε μελέτη φάσης I.

Μερικά παραδείγματα φαρμάκων που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν από το πρόγραμμα ελέγχου του NCI και προωθήθηκαν στην κλινική πράξη αποτελούν η ταξόλη (ουσία που αλληλεπιδρά με τα μικροσωληνάρια)²⁴⁵, η καμπποθεκίνη (αναστολέας τοποισομεράσης I) και τα παράγωγα της 9-αμινοκαμπποθεκίνη και CPT-11²⁴⁶, η πενκλομεδίνη (συνθετικό παράγωγο της α-πικολίνης με δράση έναντι καρκίνου μαστού), η τεμοζολαμίδη (ιμιδαζοτετραζινόνη με δράση έναντι γλοιοβλαστώματος, μελανώματος και σπογγοειδούς μυκητιάσεως), η φοστριεκίνη (αναστολέας τοποϊσομεράσης II, προϊόν ζύμωσης του *Streptomyces pulveraceus*), το TNP-470 (ένα συνθετικό παράγωγο ενός εκδόχου του *Aspergillus fumigatus*, που δρα ως αναστολέας αγγειογένεσης με πιθανή δράση έναντι σαρκώματος Kaposi και άλλων νεοπλασμών)^{247,248}.

Ορισμένα ακόμη παράγωγα που προήλθαν από το ίδιο πρόγραμμα και βρίσκονται τώρα σε μελέτη φάσης I είναι η φλαβοπυριδόλη και το UCN-01 που είναι ανταγωνιστές της πρωτεϊνικής κινάσης, με εκλεκτική δράση επί των κινάσων που εξαρτώνται από τις κυκλίνες και της κινάσης πρωτεΐνης C αντιστοίχως²⁴⁹, η κινocaρμυκίνη (quinocarmycin, DX-52-1), που πιθανώς αλληλεπιδρά με το DNA, το ανάλογο της σπιραμυκίνης KRN-5500, που δρα επί γλυκοπρωτεϊνών και η δεψιπεπτιδίνη της οποίας ο μηχανισμός δράσης είναι ακόμη αδιευκρίνιστος²⁵⁰.

Το πρόγραμμα ευρέος ελέγχου νέων ουσιών του NCI λειτουργεί με τον τρόπο αυτό από τον Απρίλιο του 1990 και πάνω από 20.000 νέες ουσίες ελέγχονται κάθε χρόνο στο φάσμα των 60 κυτταρικών σειρών. Λιγότερο από το 4% των ουσιών αυτών θα προωθηθεί για περαιτέρω in vivo μελέτη δραστηριότητας σε πειραματόζωα και μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτές θα προωθηθεί για μελέτη σε κλινικές δοκιμές.

Το NCI έχει αναγνωρίσει ότι ουσίες φυσικής προελεύσεως είναι μια ανεξίτηλη πηγή πιθανών αντινεοπλασματικών ουσιών, καθότι οι σύνθετες χημικές δομές που απαντούνται στην φύση ξεπερνούν κατά πολύ την φαντασία και τις δυνατότητες σύνθεσης του ανθρώπινου νου. Πολλές από τις ήδη εν χρήση ουσίες προέρχονται από φυσικά προϊόντα ή από τροποποιήσεις στη δομή του μορίου αυτών.

Έμφαση δίδεται και στην εκμετάλλευση δραστηκών ουσιών που περιγράφονται στην παραδοσιακή ιατρική (εθνοφαρμακολογία - τροπικά φυτά). Το πρόγραμμα εκμετάλλευσης φυσικών προϊόντων στοχεύει στην ανάλυση ουσιών προερχόμενων από

διάφορες πρώτες ύλες (φυτικές, θαλάσσιες - φυτά και μαλάκια ή μικροβιακές - κυανοβακτήρια και μύκητες). Η προτεραιότητα με την οποία θα επιλεγούν οι ουσίες από το φυτικό ή το ζωικό Βασίλειο για μελέτη δραστηριότητας καθορίζεται από την ιδιαίτερη μοναδική χημική τους δομή, τον πιθανό νέο μηχανισμό δράσης, είτε κάποιο νέο ενδοκυτταρικό στόχο και βεβαίως την δυνατότητα που υπάρχει για παραγωγή ικανής ποσότητας (από mg έως gr) αυτών των ουσιών ώστε να γίνει *in vitro* και *in vivo* μελέτη (οι βάσεις δεδομένων το NCI περιέχουν πάνω από 500.000 χημικές δομές). Αναφερόμενοι στο τελευταίο σημείο δεν θα πρέπει να ξεχνάμε τις αρχικές δυσκολίες μελέτης της ταξόλης λόγω των μικρών ποσοτήτων που μπορούσαν να προμηθευθούν.

Εκτός από τις ουσίες φυσικής προέλευσης, ελκυστική φαίνεται και ο αιτιολογικός-μοριακός σχεδιασμός νέων κυτταροστατικών. Με τον τρόπο αυτό σχεδιάσθηκαν ορισμένοι αντιμεταβολίτες και ορμονικά παράγωγα και καθώς υπάρχει το δυναμικό για σχεδιασμό με ηλεκτρονικό υπολογιστή διάφορων χημικών ουσιών, μπορούμε σίγουρα να ευελπιστούμε ότι στο μέλλον κάποιες δραστικές ουσίες θα προέλθουν και με αυτή την προσέγγιση²⁴⁴.

Με τα τεράστια άλματα στην κατανόηση της βιολογίας του καρκινικού κυττάρου όπως τον χαρακτηρισμό και την έκφραση ογκογονιδίων, κατασταλτικών γονιδίων, την περιγραφή ενδοκυττάρων οδών σήμανσης, προέκυψαν και νέοι κυτταρικοί-μοριακοί στόχοι για αντινεοπλασματικά φάρμακα. Το πρόβλημα που παραμένει να παρακαμφθεί είναι η ειδικότητα αυτών των στόχων για τα καρκινικά μόνο κύτταρα.

Προσπάθειες γίνονται να χαρακτηρισθούν όλοι οι γνωστοί μοριακοί στόχοι των κυτταρικών σειρών που περιλαμβάνονται στο πρόγραμμα ελέγχου του NCI όπως η έκφραση MDR1, MRP, LRP, μεταλλάξεων στο p53 και ras, έκφραση τοποϊσομεράσης I και II, έκφραση υποδοχέων για αυξητικούς παράγοντες²³⁶. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα: (α) να κατανοηθεί καλύτερα ο μηχανισμός δράσης και αντίστασης των νέων φαρμάκων, (β) να διευκολυνθεί η αναζήτηση νέων φαρμάκων που αναστέλλουν στόχους με ειδικό ενδιαφέρον, (γ) να αποκλεισθούν από τον έλεγχο κυτταρικές σειρές χωρίς σημαντικές βιολογικές πληροφορίες, (δ) να γίνεται αναζήτηση ουσιών όχι με βάση την ειδικότητα τους έναντι συγκεκριμένων ιστολογικών τύπων νεοπλασιών, αλλά ουσίες με βιολογική ειδικότητα.

2. EIAIKO MEPOZ

2.1 Εισαγωγή

Το κακόηθες μελάνωμα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας που οφείλεται τόσο στην ραγδαία αύξηση της επίπτωσης της νόσου όσο και στην υψηλή θνησιμότητα. Το μελάνωμα αποτελεί μόνο το 5% των νεοπλασμάτων του δέρματος αλλά ευθύνεται για περισσότερους από 75% των θανάτων οφειλομένων σε νεοπλασμάτα του δέρματος⁵.

Με την πρώιμη και έγκαιρη διάγνωση μπορούμε σήμερα να επιδιώξουμε την χειρουργική ίαση, σε προχωρημένα όμως στάδια της νόσου η πρόγνωση είναι ιδιαίτερα δυσμενής. Η συστηματική χημειοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία αποτελούν σήμερα τους κυριότερους τρόπους αντιμετώπισης της νόσου.

Η χημειοθεραπεία έχει να καταδείξει περιορισμένη μεν αλλά αξιολογήσιμη αποτελεσματικότητα, όμως παραμένει ακόμη μη ικανοποιητική. Λίγα φάρμακα έχουν δείξει αποτελεσματικότητα χορηγούμενα ως μονοθεραπεία στο μεταστατικό μελάνωμα. Από αυτά οι μεγαλύτερες ανταποκρίσεις παρατηρήθηκαν με την ντακαρμπαζίνη και τις νιτροζουρίες με ποσοστά ανταπόκρισης από 15-30%. Επίσης σημαντική θέση στην θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος κατέχουν και τα αλκαλοειδή της νινσα με παρόμοια με την ντακαρμπαζίνη αποτελέσματα, αλλά αξιόλογη είναι και η προσφορά τους στην συμπληρωματική χημειοθεραπεία.

Τα αλκαλοειδή της νινσα έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία διότι είναι λιγότερο τοξικά από άλλα κυτταροστατικά και μπορεί να χορηγηθούν με σχετική ασφάλεια για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όμως παρά την όποια δράση τους η πλειοψηφία των ασθενών δεν επωφελείται σημαντικά από την χορήγησή τους.

Ένας από τους βασικότερους παράγοντες που καθορίζουν τη δραστικότητα των κυτταροστατικών είναι η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους. Όπως έχει αποδειχθεί για τις νιτροζουρίες, αλλαγές στην δομή του μορίου τους όπως γίνεται με την προσθήκη αμινοξέων στο μόριό τους μπορεί να επιφέρει δραματικές αλλαγές στη βιολογική τους συμπεριφορά, αυξάνοντας σημαντικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους²⁵¹.

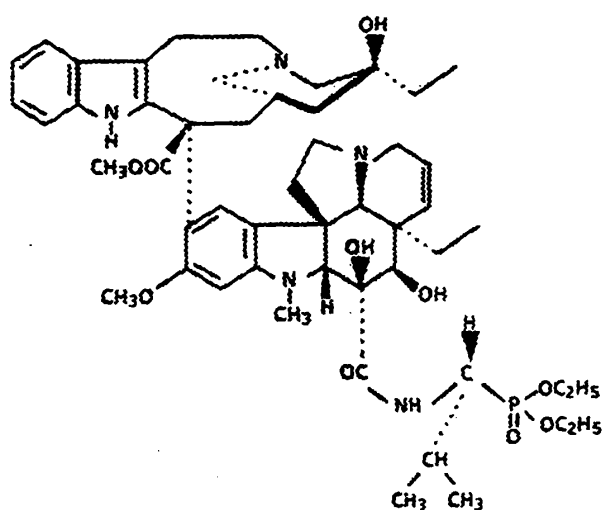
Παρομοίως, μικρές αλλαγές στη δομή του μορίου των αλκαλοειδών μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο φάσμα δραστικότητας των φαρμάκων αυτών, αλλά και στο φάσμα των παρενεργειών στους φυσιολογικούς ιστούς. Όπως έχει αποδειχθεί για τη

βινκριστίνη, τη βινπλαστίνη και τη βιντεσίνη, οι διαφορές των μορίων τους επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό την αξονοπλάσματική μεταφορά^{252,253}. Η πρόσληψη βινκριστίνης από παρασκευάσματα ισχιακού νεύρου είναι τετραπλάσια της βινπλαστίνης και της βιντεσίνης, γεγονός συμβατό με την μεγαλύτερη νευροτοξικότητα της βινκριστίνης²⁵⁴.

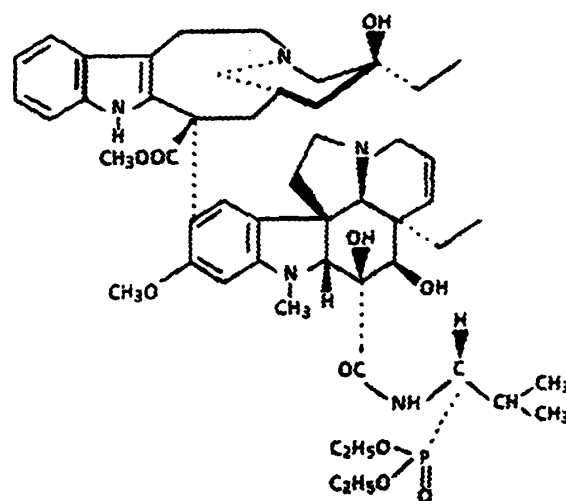
Με σκοπό να διευκολυνθεί η ενδοκυττάρια μεταφορά μεγάλων μορίων έχουν μοσχευθεί τμήματα αμινοξέων στο μόριο της βινπλαστίνης και παρατηρήθηκε διαφορετική φαρμακολογική συμπεριφορά.

Υπό το φάσμα αυτών των δεδομένων και με σκοπό να τροποποιηθεί και να ενισχυθεί σημαντικά η δραστηριότητα των αλκαλοειδών της *vinca* εισάγοντας μικρές σχετικά δομικές αλλαγές, παρασκευάστηκαν μία σειρά από α-αμινοφωσφονικά παράγωγα της βινπλαστίνης²⁵⁵. Το πιο δραστικό αυτών των παραγωγών ήταν το S12363, που αποτελείται από ένα αμινοφωσφονικό, δηλαδή έναν βιοεστέρα του αμινοξέος βαλίνη, που μοσχεύτηκε στο τμήμα βινδολίνης του μορίου της βινπλαστίνης (Σχήμα 1). Αυτή η προσθήκη έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη διαμεμβρανική διείσδυση όπως επίσης και την ενδοκυττάρια κατακράτηση του φαρμάκου²⁵⁶.

Σχήμα 1. Χημική δομή του S12363. Το επιμέρες του μόριο S12363 αποδείχθη ότι δεν έχει αντνεοπλασματική δράση



S 12363



S 12362

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της ανπινεοπλασματικής δράσης του S12363, έναντι κυτταρικών σειρών ανθρωπίνου μελανώματος, συγκρινόμενο με τα γνωστά αλκαλοειδή της νίτσα βινκριστίνης, βινπλαστίνης, βιντεσίνης καθώς και η μελέτη της δράσης του στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

2.2 Υλικό και Μέθοδοι

2.2.1 Κυτταρικές σειρές

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 συνεχείς κυτταρικές σειρές ανθρωπίνου μελανώματος.

Η C32 αμελανωτική αποκτήθηκε από την ATCC και η G361 μελανωτική κυτταρική σειρά αποκτήθηκαν από την ETCC (European Collection of Animal Cultures, PHLS, Porton Down, Salisbury, UK).

Οι StMI 11a και StMI 12d και StMI 14a κυτταρικές σειρές παραχωρήθηκαν ευγενικώς από τον Δρ. Ζουμπούλη και συν. από το Δερματολογικό Τμήμα University Medical Centre Steglitz, «The Free University», Βερολίνο^{257,258}.

Η StMI 11a κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε από δερματική μετάσταση μελανώματος, η StMI 12d από πρωτοπαθές οζώδες κακόηθες μελάνωμα και η StMI14b από πλευριτική συλλογή μεταστατικού μελανώματος. Η WHMeI 1 δημιουργήθηκε από δερματική μετάσταση κακοήθους μεταστατικού μελανώματος γυναίκας ασθενούς 49 ετών, στο τμήμα κλινικής ογκολογίας του νοσοκομείου Westminster, Λονδίνο.

Η τεχνική που εφαρμόσθηκε για την δημιουργία αυτής της WHMεl1 συνεχούς κυτταρικής σειράς ήταν η ακόλουθη:

1. Μετά από την χειρουργική εξαίρεση ο νεοπλασματικός ιστός τοποθετήθηκε υπό στείρες συνθήκες σε δοχείο περιέχον θρεπτικό υλικό RPMI συμπληρωμένο όπως περιγράφηκε παραπάνω και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο χωρίς καθυστέρηση ώστε να εξασφαλισθεί η υψηλή βιωσιμότητα του υλικού.
2. Αφαιρέθηκε προσεκτικά κάθε νεκροβιοτικός, λιπώδης και συνδετικός ιστός.
3. Τεμαχίσθηκε ο νεοπλασματικός ιστός με νυστέρι, παρουσία μικρής ποσότητας θρεπτικού υλικού, προσπαθώντας να δημιουργηθεί διάλυμα μεμονωμένων κυττάρων.
4. Ο μηχανικός τεμαχισμός συμπληρώθηκε με ενζυματική πέψη του ιστού

επωάζοντας αυτόν σε θρεπτικό υλικό (όπως περιγράφεται παρακάτω) που περιείχε κολλαγενάση για 3 ημέρες προκαλώντας έτσι την αποκόλληση των κυττάρων.

5. Διηθήθηκε το μίγμα για τον περαιτέρω καθαρισμό αυτού και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 στρ/min για 7 min.
6. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκε θρεπτικό υλικό και έγινε ανάδευση.
7. Καθορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με την χρώση του κυανού του τρυπανιού.
8. Προστέθηκαν περίπου 1×10^6 βιώσιμα κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού (συμπληρωμένο με 15% ορό βοείου εμβρύου) σε φιάλες που τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης.
9. Οι υπολειπόμενοι ιστοί καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο.
10. Τα κύτταρα παρέμειναν για 24-48 h στον κλίβανο για επώαση με σκοπό να προσκολληθούν στην φιάλη.
11. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό με τα νεκρωμένα κύτταρα και διατηρήθηκαν μόνο όσα είχαν προσκολληθεί και σε αυτά προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό υλικό.
12. Μετά από καλλιέργεια ικανής ποσότητας κυττάρων, μέρος αυτών καταψύχθηκε σε υγρό άζωτο.

Τα κύτταρα της WHMel1 κυτταρικής σειράς ήταν μορφολογικώς ατρακτοειδή, και ο έλεγχος του ιζήματός τους δεν ανέδειξε παρουσία μελανίνης ούτε σε κορεσμένη καλλιέργεια, αλλά ούτε και σε εκθετικώς πολλαπλασιαζόμενη φάση. Η κυτταρική σειρά χαρακτηρίστηκε ανοσοϊστοχημικά με την έμμεση μέθοδο του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης και απεδείχθη θετική στην χρώση με αντι-S 100 και αντι-βιμεντίνη.

Η χρώση με αντι-NSE (ειδική ενολάση του νευρώνα) ήταν ασθενέστερη. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μελανοκύτταρα μονιμοποιημένα σε παραφίνη.

Τα αντισώματα κατά S-100, NSE και Βιμεντίνη προμηθεύτηκαν από την Dakopatts Ltd., High Wycombe, Bucks, UK.

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640, συμπληρωμένο με 10% θερμο-αδρανοποιημένο ορό βοείου εμβρύου (Sera Labs Ltd., Sussex, και NBL, Northumbria, UK.), 2mM L-γλουταμίνη, 50IU/ml πενικιλίνη, 50μg/ml στρεπτομυκίνη και 2.5 μg/ml, αμφοτερικίνη B (Hyclone, UK). Οι καλλιέργειες επωάσθηκαν στους 37 °C σε υγρατοποιημένη ατμόσφαιρα αεριζόμενη με 5% CO₂.

2.2.2 Φάρμακα

Το S12363 είναι 1[3(04-deacetyl-3-demethoxycarbonyl - vincal leukoblastinyl) carbonylamino]-2-methylpropylphosphonic acid diethylester sulfate προμηθεύθηκε από τα εργαστήρια Servier, Paris, France. Η θειική βινπλαστίνη και βινκριστίνη χορηγήθηκαν από τα εργαστήρια Lederle, ενώ η θειική βιντεσίνη από την Eli Lilly Ltd. Τα φάρμακα ήταν διαλυμένα σε PBS (1mM) και φυλάγονταν στους -20 °C μέχρι την χρήση τους. Στη διάρκεια των πειραμάτων τα φάρμακα διαλυόταν σε θρεπτικό υλικό.

2.2.3 Μέθοδος αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Από την κυτταρική σειρά WHM611 τοποθετήθηκαν 10⁴ κύτταρα σε δίσκους των 6 φρεατίων συμπληρωμένων με 2 ml θρεπτικού υλικού. Μετά από επώαση 24h προστέθηκε στα κύτταρα το S12363 ή η βιντεσίνη για διάρκεια 1h, 24h ή συνεχώς (72-96h). Μετά από 96h εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου συλλέγοντας και μετρώντας τα κύτταρα με coulter counter. Κατάλληλα δείγματα πληθυσμών ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα.

2.2.4 Μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT αναπτύχθηκε αρχικώς από τον Mosmann (1983), με σκοπό να ποσοτικοποιήσει χρωματομετρικά κυτταρικούς πολλαπλασιασμούς, κυτταρική επιβίωση και κυτταροτοξικότητα φαρμάκων²⁵⁹. Αυτή η χρωματομετρική μέθοδος, βασίζεται στη χρήση του άλατος τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthioazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Το MTT μετατρέπεται στο πορφυρόχρωμο παράγωγό του φορμαζάν, από ένζυμο που είναι παρόντα μόνο σε μεταβολικώς ενεργά κύτταρα. Αρχικώς ο Slater και συν περιέγραψαν πως το μιτοχονδριακό ένζυμο σουκκινίκη δεϋδρογενάση ανάγει το MTT και ο Mosmann κατόρθωσε να δείξει ότι κάτω από

κατάλληλες συνθήκες η αναγωγή MTT σε φορμαζάν είναι ανάλογη με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων δηλαδή αυτών που έχουν ενεργά μιτοχόνδρια²⁶⁰. Χρειάστηκε να γίνουν ορισμένες τροποποιήσεις αυτής της μεθόδου από άλλους ερευνητές μέχρι την τελική της μορφή που εφαρμόζεται σήμερα²⁶¹.

Η ταχύτητα αυτής της μεθόδου (ημι-αυτοματισμός) επέτρεψε να μελετάται μεγαλύτερος αριθμός κυτταρικών σειρών και φαρμάκων, συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους όπως π.χ. τεστ αποκλεισμού με χρωστική και διάφορες μεθόδους πρόσληψης ραδιενεργών νουκλεοτιδίων.

Πριν την εφαρμογή της MTT στην μελέτη μας χρειάστηκε να εκτιμηθούν και να τελειοποιηθούν ορισμένες παράμετροι, όπως η επιλογή του ιδανικού μήκους κύματος που θα μετρηθεί η απορρόφηση της φορμαζάνης, ο ορισμός για κάθε κυτταρική σειρά του κατάλληλου αριθμού κυττάρων που θα καλλιεργηθούν ώστε να παραμένουν σε εκθετικό πολλαπλασιασμό σε όλη την διάρκεια του πειράματος, η αναγκαιότητα της φυγοκέντρωσης των δίσκων πριν αναγνωστούν στο φασματοφωτόμετρο και ο ιδανικός αριθμός κυττάρων που θα χρησιμοποιείται για κάθε σειρά.

Το MTT (Sigma, Dorset, UK) διαλύθηκε σε PBS (5 mg/ml) και διηθήθηκε μέσα από ηθμό 0.2 μm , ώστε να απομακρυνθούν οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι και μετά αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι της χρήσεως.

Με σκοπό να καθορίσουμε το καταλληλότερο μήκος κύματος στο οποίο θα μετρηθεί η απορρόφηση της φορμαζάνης, πήραμε κύτταρα από μια καθιερωμένη κυτταρική σειρά με γνωστά χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα ελήφθησαν από εκθετικώς πολλαπλασιαζόμενη καλλιέργεια και καλλιεργήθηκαν σε διάφορες πυκνότητες σε τετραπλά δείγματα (σε δίσκους των 96 φρεατίων) σε 100 μl θρεπτικού υλικού ανά φρεάτιο, χρησιμοποιώντας πολυαυλική προχοϊδα (multichannel pipet-Flow Labs, Titertek). Στην συνέχεια τα κύτταρα επωάσθηκαν για 1h στους 37°C , 5% CO_2 , 100% σχετική υγρασία, και μετά προστέθηκαν 20 μl MTT (5mg/ml) σε κάθε φρεάτιο και οι δίσκοι επωάσθηκαν για άλλες 4h. Οι δίσκοι στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν και οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύθηκαν σε 100 μl διμεθυσουλφοξειδίου (DMSO, Sigma, Poole, Dorset, UK). Οι δίσκοι μετά ανάδευση για 5 min σε αναδευτήρα Titertek (ICN/Flow Labs, Herts, UK) μετρήθηκαν σε μήκη κύματος 340, 405, 414, 492, 540, 620 και 690 nm. Αναλύοντας τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι υπήρχε θετική-γραμμική συσχέτιση μεταξύ αριθμού κυττάρων και απορρόφησης στα 540 nm. Η αναγκαιότητα να

φυγοκεντρούνται οι δίσκοι στο τέλος του πειράματος με σκοπό να συγκρατούνται ακόμη και τα επιπλέοντα κύτταρα της καλλιέργειας δεν είχε διευκρινισθεί από προηγούμενες μελέτες για κύτταρα που προσκολλώνται. Για τον λόγο αυτόν ελήφθησαν κύτταρα από υποκορεσμένες καλλιέργειες και τα ενοφθαλμίσαμε σε διάφορες συγκεντρώσεις σε δίσκους των 96 φρεατίων σε τετραπλά δείγματα. Μετά από 1h, προστέθηκε MTT και τα κύτταρα επώασθηκαν για περαιτέρω 4h σε συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω. Για κάθε κυτταρική σειρά ετοιμάσθηκαν 2 δίσκοι. Ο ένας φυγοκεντρήθηκε πριν αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, ενώ στον δεύτερο δίσκο αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και οι κρύσταλλοι διαλύθηκαν σε DMSO χωρίς να προηγηθεί φυγοκέντρηση και έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο δίσκων.

Επίσης προκαταρκτικά πειράματα ήταν απαραίτητα ώστε να καθορισθεί ο ιδανικός αριθμός κυττάρων που έπρεπε να τοποθετηθούν σε κάθε φρεάτιο, ώστε αυτά να παραμένουν σε εκθετική φάση πολλαπλασιασμού σε όλη την διάρκεια του πειράματος. Για τις σειρές StMI11a, StMI 12d, StMI 14a, G361 και WHMe1 1 τοποθετήθηκαν 1000, 2000 και 3000 κύτταρα σε 200 μl/φρεάτιο την ημέρα 0. Για την σειρά C32 τοποθετήθηκαν 3000, 4000 και 5000 κύτταρα ανά φρεάτιο, διότι είναι σειρά με τον μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού. Η απορρόφηση μετρήθηκε καθημερινά για τις επόμενες 5 ημέρες (εκτός την C32 για 7 ημέρες). Αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός παρέμενε εκθετικός για τουλάχιστον 96 ώρες με αρχικές πυκνότητες κυττάρων 1000-2000 (εκτός της C32 που ήταν 3000-4000).

Για να συγκριθεί η κυτταροτοξική δράση του S12363 έναντι των άλλων αλκαλοειδών της vlnca (βινκριστίνης, βινπλαστίνης και βιντεσίνης), πάρθηκαν κύτταρα από εκθετικώς πολλαπλασιαζόμενες καλλιέργειες (κορεσμός καλλιέργειας 60-70%) και αφού μετρήθηκαν (2000 κύτταρα για όλες τις σειρές εκτός της C32 που ήταν 4000 κύτταρα) τοποθετήθηκαν σε δίσκους των 96 φρεατίων σε 200 μl θρεπτικό υλικό. Οι δίσκοι παρέμεναν σε κλίβανο επώασης για 24h (στους 37 °C, 5% CO₂, 100% σχετική υγρασία) ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 100 μl θρεπτικού υλικού που περιείχε το φάρμακο (S12363, βινκριστίνη, βινπλαστίνη και βιντεσίνη) και δημιουργήθηκαν 10 τουλάχιστον αραιώσεις αυτού με συνεχείς αναρροφήσεις. Τα περιφερικά φρεάτια κάθε δίσκου (κενά κυττάρων) χρησιμεύουν ως (αρνητικοί εσωτερικοί μάρτυρες (blanks)).

Τα κύτταρα εκτέθηκαν στο φάρμακο είτε για 1h (μετά αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό που περιείχε το φάρμακο, εκλύθηκε με PBS και αντικαταστάθηκε με ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού), είτε συνεχώς (72-96h) έως το τέλος του πειράματος.

Μετά από επώαση 72 h (εκτός από την C32 σειρά που επωάσθηκε για 96 h) προστέθηκαν 20 µl MTT, 0.5% διάλυμα σε PBS, σε κάθε φρεάτιο και επωάσθηκαν για 4h. Οι δίσκοι στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 στρ/min για 7min (MSE Mistral 3000I). Αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό, διότι κάθε υπολειμματική ποσότητα αυτού και ακριβέστερα τα διττανθρακικά που περιέχονται, μπορούν να μετατοπίσουν την καμπύλη απορρόφησης, όπως έχουν δείξει οι Twentyman και Luscombe²⁶². Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που παρέμειναν διαλύθηκαν με 100 µl διμεθυλσουλφοξειδίου και οι δίσκοι αναδεύτηκαν για 5 min.

Η απορρόφηση (A) μετρήθηκε στα 540 nm σε Titertek Multiscan MCC/340 MK II plate φασματοφωτόμετρο. Όλα τα στοιχεία της απορρόφησης αποθηκεύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Titersoft II (ICN/Flow Labs, Herts, UK).

Η συγκέντρωση που απαιτείτο να προκαλέσει κατά 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού (IC50) καθορίσθηκε από την καμπύλη του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων έναντι της δόσεως, όπου η :

κυτταρική βιωσιμότητα (%) =

$$\frac{\text{μέσος όρος A των θεραπευμένων κυττάρων} - \text{μέσος όρος A των κενών φρεατίων}}{\text{μέσος όρος A των κυττάρων ελέγχου} - \text{μέσος όρος A των κενών φρεατίων}} \times 100$$

2.2.5 Μέθοδος κλωνογενούς ικανότητας (Clonogenic Assay)

Στην μέθοδο αυτή έγινε άμεση σύγκριση μεταξύ της βιντεσίνης και του S12363 και την ικανότητα αυτών να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο, χρησιμοποιώντας 3 από τις κυτταρικές σειρές μελανώματος (StMI 11a, StMI 12d, StMI 14a). Οι σειρές αυτές έχουν την ικανότητα να δημιουργούν κλώνους σε επιφανειακές καλλιέργειες με ικανότητα επίστρωσης (plating efficiency) 10-20%. Κύτταρα από υποκορεσμένες καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 25cm² σε πυκνότητα 5000 κυττάρων/4ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640 συμπληρωμένο με 15% FCS, με L-γλουταμίνη, πενικιλίνη,

στρεπτομυκίνη, αμφοτερικίνη Β και πυρουβικό νάτριο (1mM) σε αναλογίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μετά από 24 h επώασεως, στις καλλιέργειες προστέθηκαν τα φάρμακα σε διάφορες συγκεντρώσεις και επωάσθηκαν για 1 h στον κλίβανο. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το φάρμακο και οι καλλιέργειες εκπλύθηκαν 3 φορές με PBS. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν ενζυματικά (θρυψίνη) από τα φιαλίδια, μετρήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις σε φιαλίδια με 5 ml θρεπτικό υλικό (σε τριπλότυπα). Ο αριθμός των κυττάρων που τοποθετήθηκε σε κάθε φιάλη ήταν τέτοιος που σε 12-14 ημέρες να δημιουργούνται περίπου 100-200 αποικίες. Σε 14 ημέρες αποσύρθηκαν οι καλλιέργειες από τον κλίβανο και χρωματίσθηκαν οι αποικίες με 1% crystal violet (Sigma Co. Ltd., Dorset, UK) σε διάλυμα φορμαλδεύδης/μεθανόλης. αποικίες ορίσθηκαν όλες οι αθροίσεις από 50 τουλάχιστον κύτταρα, ενώ οι τιμές IC_{50} καθορίσθηκαν από την καμπύλη της επιβίωσης (σε λογαριθμική κλίμακα) έναντι της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Οι καμπύλες επιβίωσης συγκρίθηκαν μεταξύ των εφαρμόζοντας το τεστ ANOVA.

Η μέθοδος της κλωνογενούς ικανότητας θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους για την αξιολόγηση και εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Πρέπει όμως να επισημάνουμε και να τονίσουμε ότι πρόκειται για μέθοδο που απαιτεί πολύ χρόνο, εργασία και σημαντικό κόστος, συγκρινόμενη με τις ταχύτερες μεθόδους όπως η MTT.

2.2.6 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Από υποκορεσμένες καλλιέργειες των σειρών C32, StMI 11a, StMI 12d και WHMe1 τοποθετήθηκαν 2×10^6 κύτταρα σε φιαλίδια των 75 cm² σε 30 ml θρεπτικού υλικού.

Μετά από 24 h, στις καλλιέργειες προστέθηκε φάρμακο (VCR, VBL, VDS και S12363) για 1h σε συγκέντρωση αντίστοιχη με την τιμή IC_{50} , που υπολογίσθηκε από τις προηγούμενες μεθόδους κυτταροτοξικότητας (MTT). Στις ομάδες ελέγχου προστέθηκε απλώς θρεπτικό υλικό. Μετά από 8 η 23h, τα κύτταρα αφαιρέθηκαν από τις καλλιέργειες και περάστηκαν πολλαπλώς από βελόνη 25G, με σκοπό να δημιουργηθεί μονοκυτταρικό διάλυμα. Αυτά τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με στάγδην προσθήκη 10ml παγωμένης αιθανόλης 70% και αποθηκεύθηκαν στους 4 °C έως την ανάλυσή τους.

Την ημέρα της αναλύσεως, τα μονιμοποιημένα σε αιθανόλη κύτταρα διαλύθηκαν σε PBS και επωάσθηκαν με RNase (200μg/ml) και ιωδιούχο προπιδίο (propidium iodide- 50 μg/ml). Το ίζημα των κυττάρων επωάσθηκε για 30min στους 37 °C και τα δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα Argon-ion laser συντονισμένο στα 488nm, σε κυτταροροόμετρο Becton-Dickinson FACScan, δίδοντας ιστογράμματα του DNA για κάθε δείγμα. Αναλύθηκαν περίπου 10,000 κύτταρα για κάθε δείγμα. Το προφίλ του DNA ενσωματώθηκε στα στοιχεία χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα "curvefit" (Becton-Dickinson). Τα ποσοστά των κυττάρων που βρίσκονταν στις φάσεις G1, S και G2/M του κυτταρικού κύκλου υπολογίσθηκαν από το προφίλ του DNA χρησιμοποιώντας το μοντέλο RFIT του προγράμματος CellFIT από την Becton-Dickinson.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Την φάση της αναμόρφωσης τη υποστηρίζουμε με ανιχνεύσιμη ποσότητα βολύφινου σε PBS και αποκαθίζουμε με 4000g (10' 30'') και καθιζάμε το πύκνωμα (precipitant) 100 mg/ml. Το κίτρινο των επιπλοκών αποβάλλεται με 10ml σιλικόνης G1. Το υπόλοιπο αναθεωρείται χρησιμοποιώντας ένα Argon-ion laser (λειτουργεί στα 488nm) σε κυτταροκεντρίκο Beckon-Dickinson FACScan. Απαιτείται ισχύς 100mW, σταθερό DNA για κάθε δείγμα. Αναθέτουμε περίπου 10.000 κύτταρα για κάθε δείγμα. Το πλάσμα του DNA ενσωματώνεται στα στοιχεία χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα "align" (Beckon-Dickinson). Τα ποσοστά των κυττάρων που βολκνύονται στις φάσεις G1, S και G2/M του κυτταρικού κύκλου υπολογίζονται από το πλάσμα του DNA χρησιμοποιώντας το μοντέλο REIT του προγράμματος CellFIT από την Beckon-Dickinson.



3.1.1 Δραστικότητα του S12363 με τις μεθόδους αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού και MTT.

Τα χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών μελανώματος φαίνονται στον πίνακα 1. Διακρίνεται ότι υπάρχει ποικιλομορφία στα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών. Από αυτές η C32 και η WHMε1 1 ήταν αμελανωτικές, ενώ όλες οι άλλες παρήγαγαν μελανίνη. Η StMI 12d προέρχεται από πρωτοπαθές μελάνωμα και οι υπόλοιπες από μεταστατικές εστίες κακοήθους μελανώματος (δέρμα, πλευριτική συλλογή).

Ο χρόνος διπλασιασμού όλων των σειρών ήταν αντιστρόφως αναλόγως της κυτταρικής πυκνότητας που καλλιεργείτο. Οι σειρές C32 και G361 είχαν τον μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού του πληθυσμού των με χρόνους 175.2h και 69.6h αντιστοίχως, όταν η αρχική κυτταρική πυκνότητα ήταν 10^4 κύτταρα σε τριβλία των 60mm. Για τις ίδιες σειρές οι χρόνοι διπλασιασμού ήταν 48.8h και 29.8h για κυτταρικές πυκνότητες 10^5 κύτταρα στα ίδια τριβλία. Η σειρά με τον μικρότερο χρόνο διπλασιασμού ήταν η StMI 12d, που δημιουργούσε και τις ταχύτερες καλλιέργειες είχε χρόνο διπλασιασμού 48h για κυτταρικό πληθυσμό 10^4 και 25.2h για πληθυσμό 10^5 κύτταρα

Στα σχήματα 2α & 2β απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου αναστολής κυτταρικού πολλαπλασιασμού για την κυτταρική σειρά WHMε1. Η δράση της βιντεσίνης συγκρίνεται με το S12363. Φαίνεται ότι η ανασταλτική δράση του S12363 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι σταθερά ισχυρότερη αυτής της βιντεσίνης. Η διαφορά είναι εμφανής για χρόνο έκθεσης στα φάρμακα 1h, ενώ για χρόνο έκθεσης 24h και 96h η αναστολή του πολλαπλασιασμού με το S12363 ήταν σχεδόν πλήρης ακόμη και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Στο σχήμα 3 απεικονίζονται χαρακτηριστικές καμπύλες επιβίωσης για τις κυτταρικές σειρές StMI11a και StMI12d μετά από 1h έκθεση στο S12363 και τα αλκαλοειδή αναφοράς. Στο σχήμα 4 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αποκτήθηκαν μετά από έκθεση 1h στα διάφορα φάρμακα όλων των κυτταρικών σειρών με την μέθοδο MTT.

Οι τιμές αυτές για την βινκριστίνη, βινπλαστίνη και βιντεσίνη κυμαίνονταν από 24 nM έως 357 nM, ενώ για το S12363 οι αντίστοιχες τιμές κυμαίνονταν από 4.6 nM έως 15 nM για όλες τις κυτταρικές σειρές. Στο σχήμα 5 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} για συνεχή έκθεση στα φάρμακα (72h), και είναι 0.7nM-7nM για τα αλκαλοειδή αναφοράς (βινκριστίνη, βινπλαστίνη, βιντεσίνη) και 0.04nM-0.09nM για το S12363.

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά των 6 κυτταρικών σειρών μελώνωματος

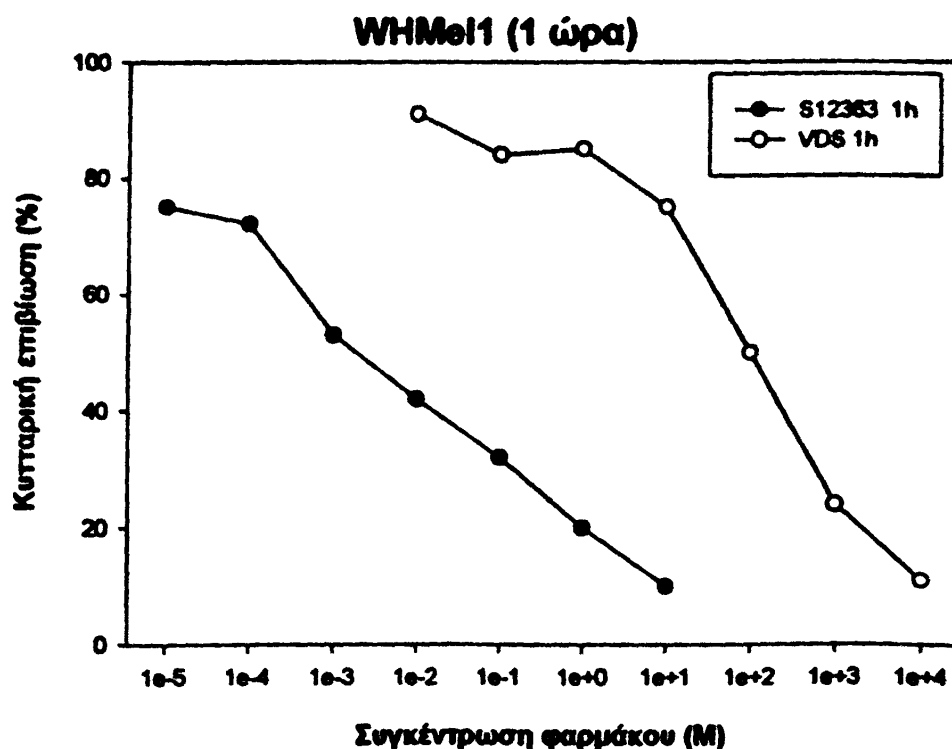
Κυτταρική σειρά	Προέλευση	Χρώση	Κύτταρα (60mm δίσκος)	ΧΔΠ (ώρες)	N	Ανάλυση Κυτταρικού Κύκλου (% κυτταρικού πληθυσμού)			
						G0/G1	S	G2/M	N
C 3 2	μεταστατικό	Αμεινωτικό	10 ⁴ 10 ⁵	176.2 48.8	3	74.0	17.0	9.0	4
G 3 6 1	-	Μεινωτικό	10 ⁴ 10 ⁵	69.6 29.8	3	69.3	23.7	17.0	1
S t M i 1 1 a	δερματική μετόσταση	Μεινωτικό	10 ⁴ 10 ⁵	48.0 28.8	1	67.4	23.5	9.1	5
S t M i 1 2 d	αζώδες μελάνωμα	Μεινωτικό	10 ⁴ 10 ⁵	26.4 26.2	2	66.0	24.6	10.5	5
S t M i 1 4 a	πλευρική συλλογή	Μεινωτικό	10 ⁴ 10 ⁵	43.2 31.2	1	66.0	23.2	11.8	1
W H M e i 1	δερματική μετόσταση	Αμεινωτικό	10 ⁴	37.2	3	69.6	22.0	8.4	6

ΧΔΠ: χρόνος διπλασιασμού πληθυσμού, N: αριθμός πειραμάτων

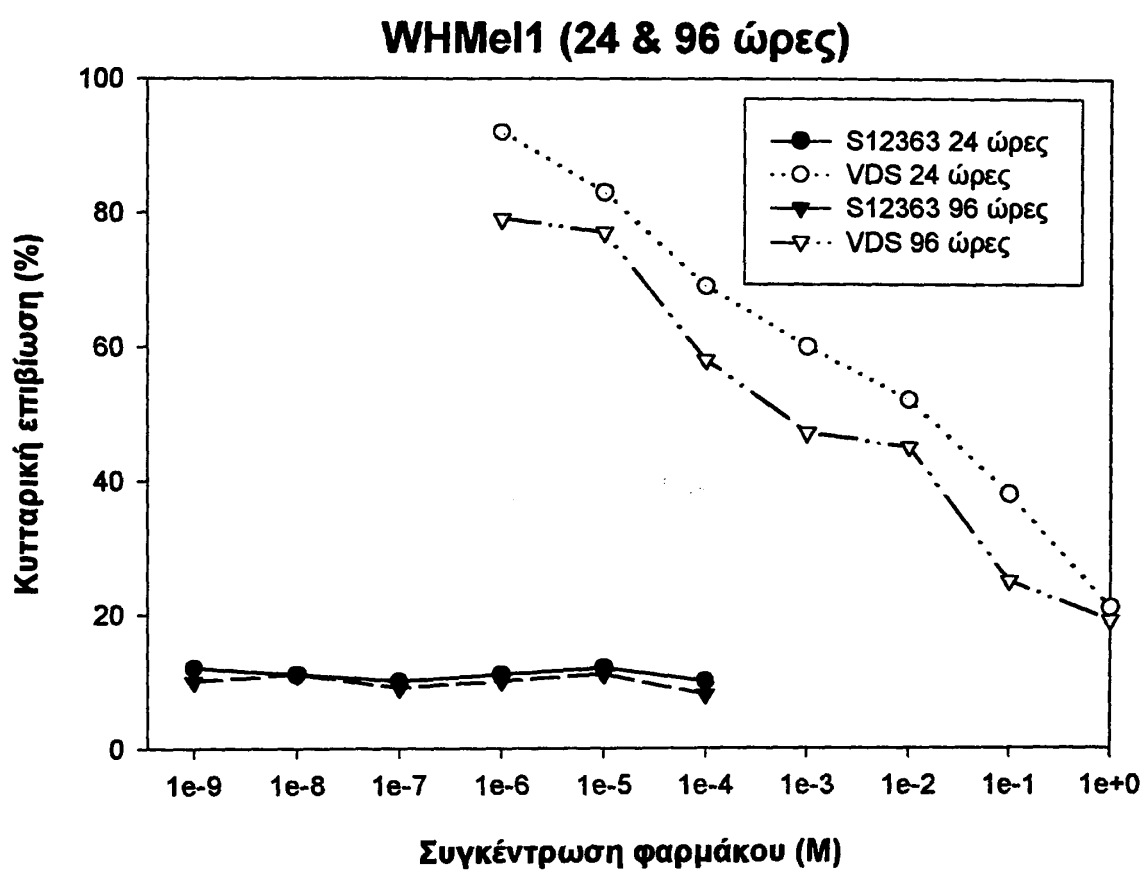
Η άμεση σύγκριση των φαρμάκων έδειξε ότι το S12363 ήταν 20-78 φορές πιο κυτταροτοξικό από την βινπλαστίνη, 36-83 φορές πιο κυτταροτοξικό από την βινκριστίνη και 19-34 φορές πιο ισχυρό από την βιντεσίνη. Συνολικά, το S12363 μετά από άμεση σύγκριση με τα λοιπά αλκαλοειδή ήταν στατιστικώς σημαντικά πιο ισχυρό στην αντινεοπλασματική του δράση ($p < 0.05$) στις 15 από τις 18 συγκρίσεις (unpaired t-test).

Τα τρία γνωστά αλκαλοειδή είχαν περίπου ίδια κυτταροτοξικότητα για όλες τις κυτταρικές σειρές ($p > 0.05$). Χωρίς βέβαια να είναι στατιστικώς σημαντική η διάφορα μεταξύ των αλκαλοειδών αναφοράς η βιντεσίνη είχε την τάση να είναι το πιο ισχυρό από αυτά. Η βινκριστίνη ήταν το λιγότερο δραστικό φάρμακο μετά από 1h έκθεσης και η βινπλαστίνη το ελαφρώς ισχυρότερο μετά από 72h έκθεσης σε αυτό.

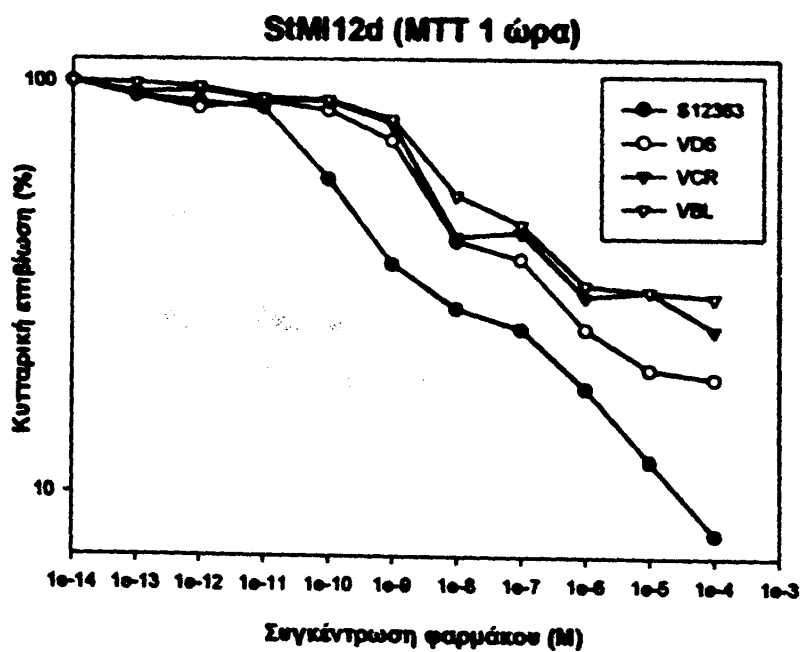
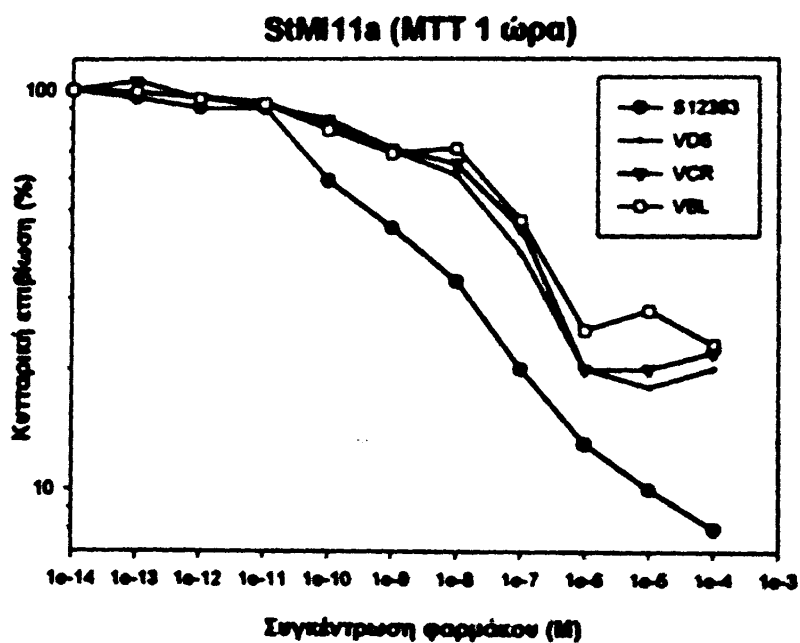
Σχήμα 2α. Ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς WHMe1 μετά από 1ώρα έκθεση στο S12363 και στη βιντεσίνη (VDS).



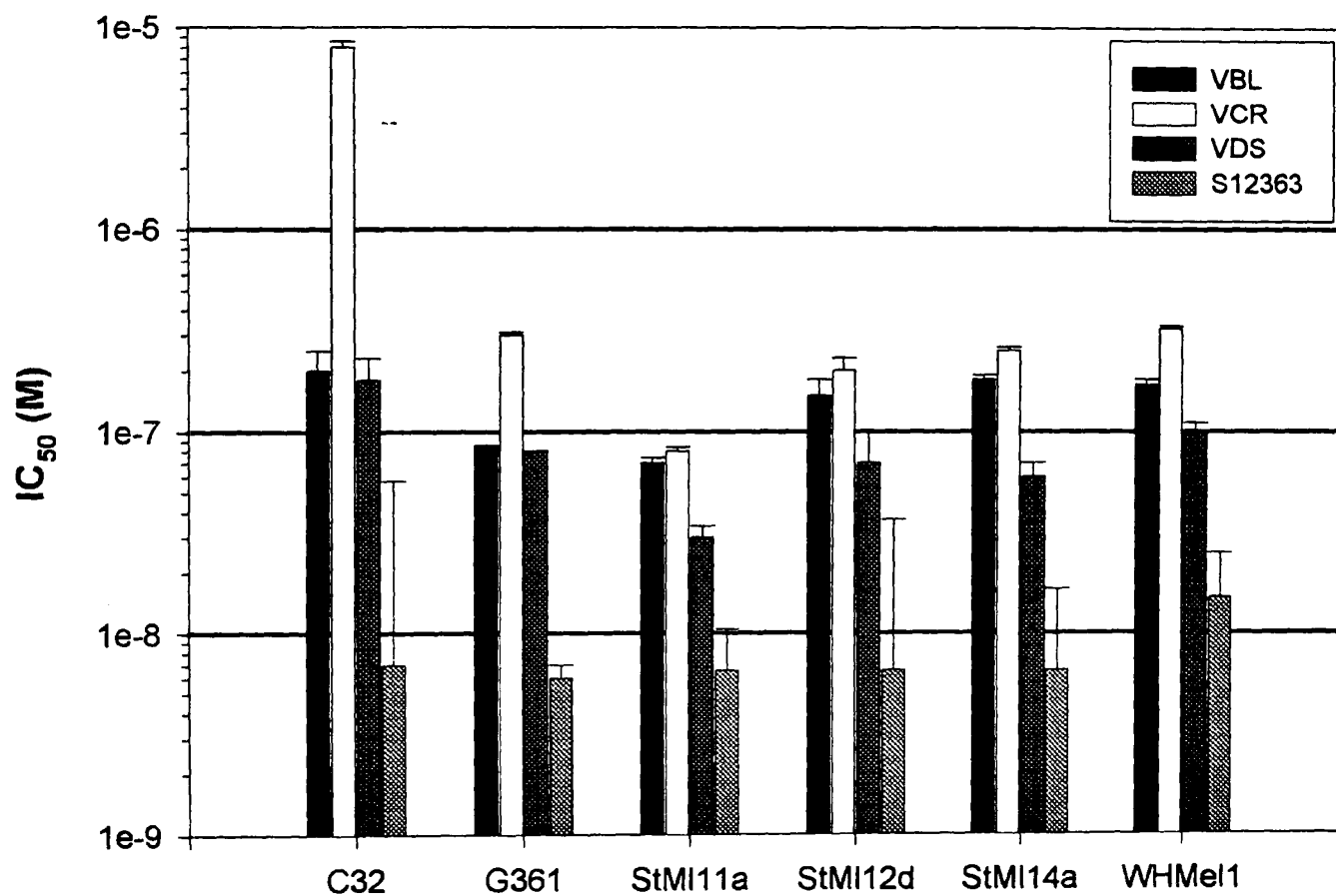
Σχήμα 2β. Ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς WHMe1 μετά από 24h και 96h έκθεση στο S12363 και στη βιντεσίνη (VDS).



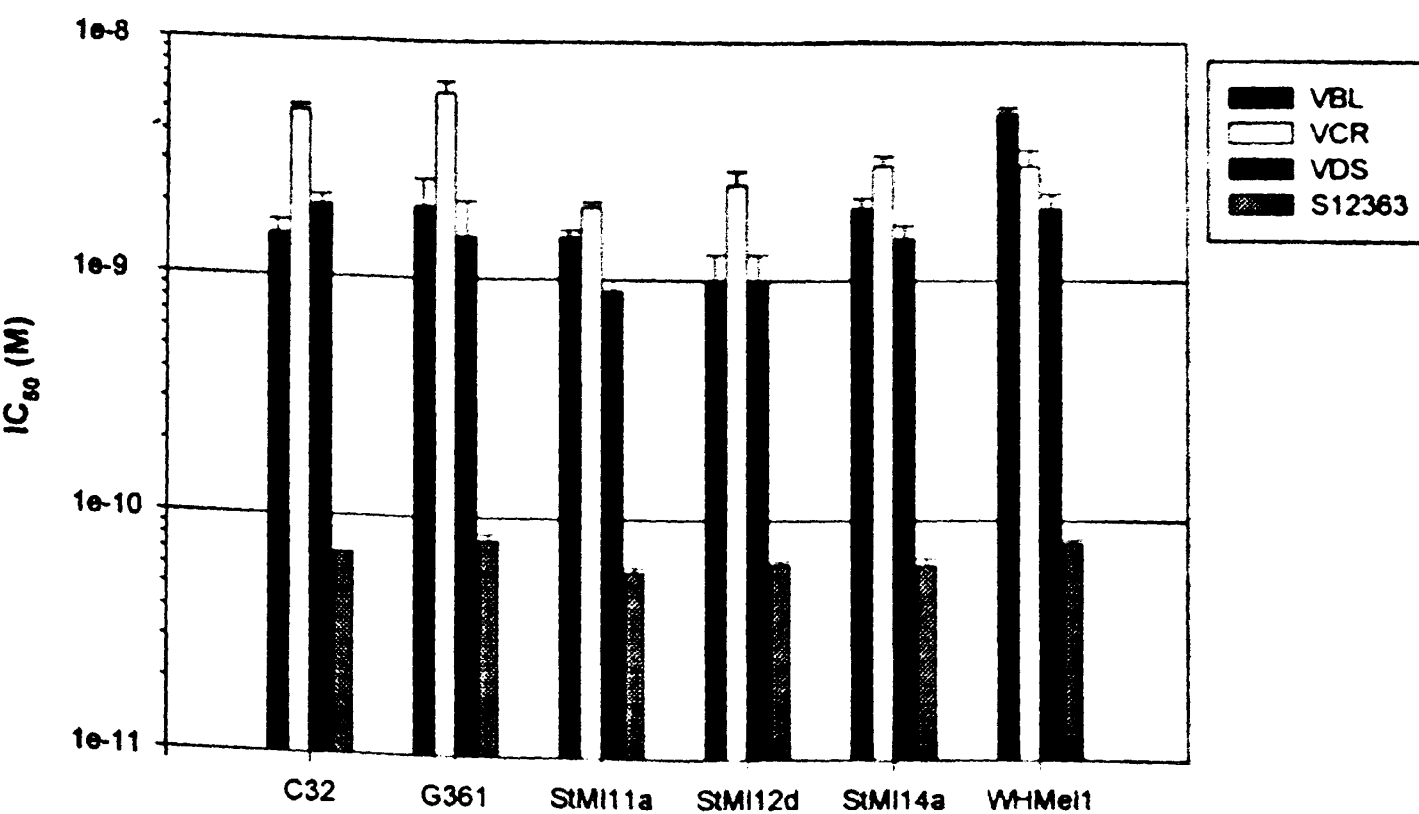
Σχήμα 3. Χαρακτηριστικές καμπύλες επιβίωσης για τις κυτταρικές σειρές StMI11a και StMI12d, όπως αποκτήθηκαν με την μέθοδο MTT, μετά από 1h έκθεση στα φάρμακα.



Σχήμα 4. Οι τιμές IC_{50} για το S12363, την βινπλαστίνη (VBL), την βινκριστίνη (VCR) και την βιντεσίνη (VDS), μετά από 1 ώρα έκθεση όπως προσδιορίσθηκαν με την μέθοδο MTT για τις κυτταρικές σειρές C32, G361, StMI11a, StMI12d, StMI14a και WHMe1.



Εικόνα 8. Οι τιμές IC_{50} για το S12363, την βινπλαστίνη (VBL), την βινκριστίνη (VCR) και την βιντεσίνη (VDS), μετά από 72h έκθεσης όπως προσδιορίστηκαν με την μέθοδο MTT για τις κυτταρικές σειρές C32, G361, StMI11, StMI12d, StMI14a και WHMe1. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση τιμή 6 μεμονωμένων πειραμάτων.



3.1.2 Δραστικότητα του S12363 με την μέθοδος κλωνογενούς ανάπτυξης.

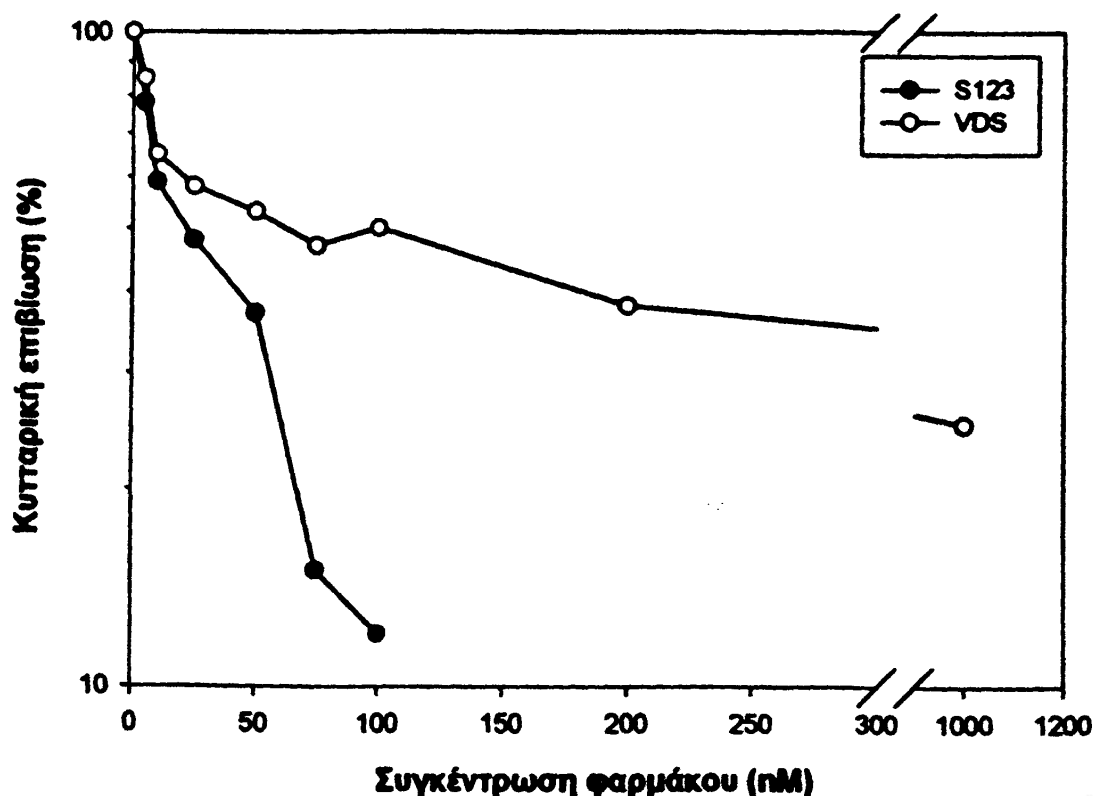
Στην μέθοδο αυτή η σύγκριση έγινε μεταξύ της βιντεσίνης και του S12363 για τις κυτταρικές σειρές StMI 11a, StMI 12d και StMI 14a μετά από 1h έκθεσης στα ανωτέρω φάρμακα.

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα σχήματα 5α, 5β και 5γ. Το S12363 ανέδειξε σημαντικά πιο ισχυρή κυτταροτοξική δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Η μέση τιμή IC_{50} της βιντεσίνης (από 4-6 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα) για την StMI 11a ήταν 45 nM, για την StMI 12d ήταν 500 nM και για την StMI 14a ήταν 300 nM, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το S12363 ήταν 17 nM για την StMI 11a, 75 nM για την StMI 12d και 28 nM για την StMI 14a κυτταρική σειρά. Για όλες τις κυτταρικές σειρές το S12363 έδειξε 3-11 φορές ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση από την βιντεσίνη ($p < 0.001$, ANOVA). Βεβαίως, και τα δύο φάρμακα πέτυχαν σημαντικό κυτταρικό θάνατο σε συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν και σε ασθενείς. Αντιθέτως με τα αναμενόμενα, οι καμπύλες κυτταρικής επιβίωσης που δημιουργήσαν τα δύο φάρμακα ήταν εντελώς διαφορετικές. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, εάν αναλογιστούμε ότι πρόκειται για φάρμακα που θεωρείται ότι έχουν κοινό κυτταρικό στόχο και μηχανισμό δράσης. Το προφίλ καμπύλης της βιντεσίνης ήταν εκθετικό αρχικώς, ακολουθούμενο από πλατό, δηλώνοντας ότι το φάρμακο αυτό έχει δράση ειδική στον κυτταρικό κύκλο. Δεν παρατηρήθηκε καμμία επιπλέον αύξηση του κυτταρικού θανάτου με την βιντεσίνη ακόμη και για δόσεις πέραν των 300 nM. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και άλλες *in vitro* μελέτες με το ίδιο φάρμακο⁹⁵. Αντιθέτως, η καμπύλη κυτταρικής επιβίωσης του S12363 ήταν εκθετική χωρίς καμία ένδειξη δημιουργίας επιπέδου. Μάλιστα στις υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου 100nM και 200nM ο κυτταρικός θάνατος ήταν αντιστρόφως ανάλογος με τον αριθμό των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν (σχήμα 6). Δηλαδή, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος κυτταρικός θάνατος από 100nM και 200nM S12363, όταν είχαμε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στις καλλιέργειες, φαινόμενο ιδιαίτερα παράδοξο αναλογιζόμενοι την δράση που έχουν τα αλά αλκαλοειδή.

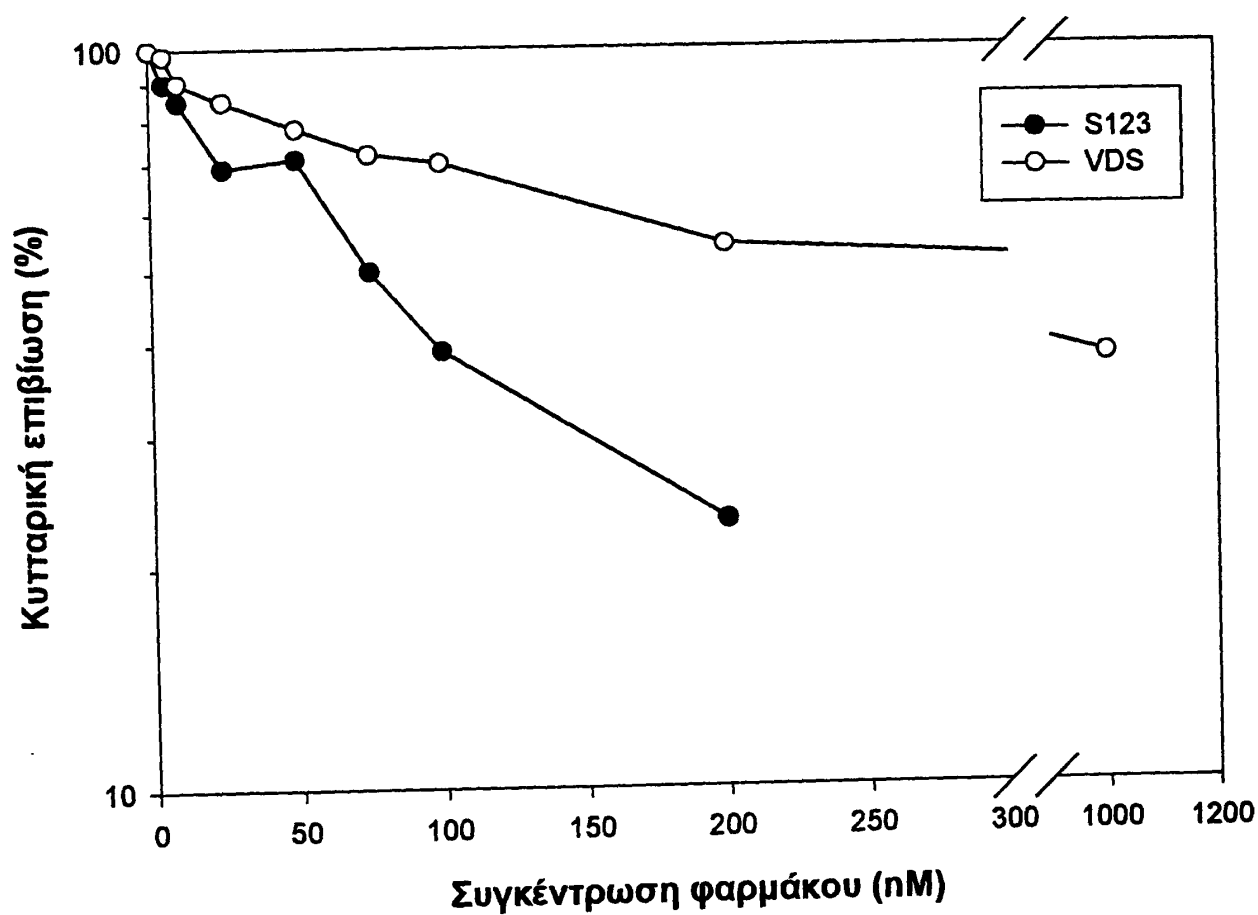
Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να ερμηνευθεί γνωρίζοντας την φαρμακοκινητική και την πιθανή βιολογική συμπεριφορά S12363. Η γρήγορη είσοδος του φαρμάκου στο κύτταρο λόγω της ειδικής αμινοφωσφονικής ομάδας που έχει στο μόριό του, σημαίνει και

μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου ακόμη και μετά από σύντομη έκθεση των κυττάρων σε αυτό. Η γρήγορη κυτταρική καταστροφή και λύση της μεμβράνης του απελευθερώνει πιθανώς εκ νέου το φάρμακο στο περιβάλλον της κυτταροκαλλιέργειας, το οποίο επαναπροσλαμβάνεται από τα βιώσιμα κύτταρα προκαλώντας τα ίδια εκ νέου φαινόμενα. Με την VDS, ακόμη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, ο αριθμός των αποικιών ανά φιάλη που αποκτήθηκαν ήταν ανάλογος των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν.

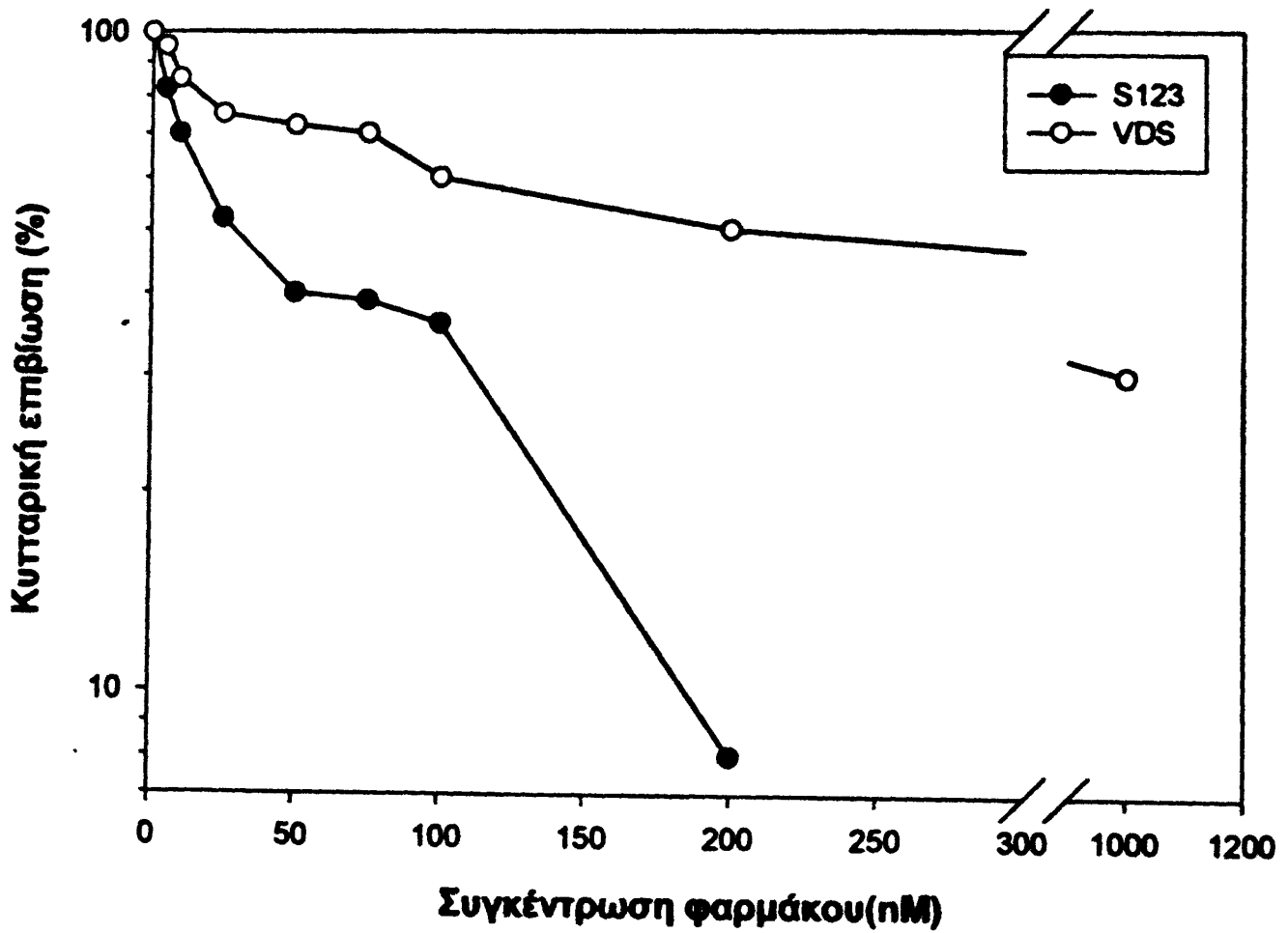
Σχήμα 5α. Καμπύλη επιβίωσης για την κυτταρική σειρά S123, με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης, μετά από έκθεση για 1 ώρα στο S12363 και την βινπρεσίνη (VDS).



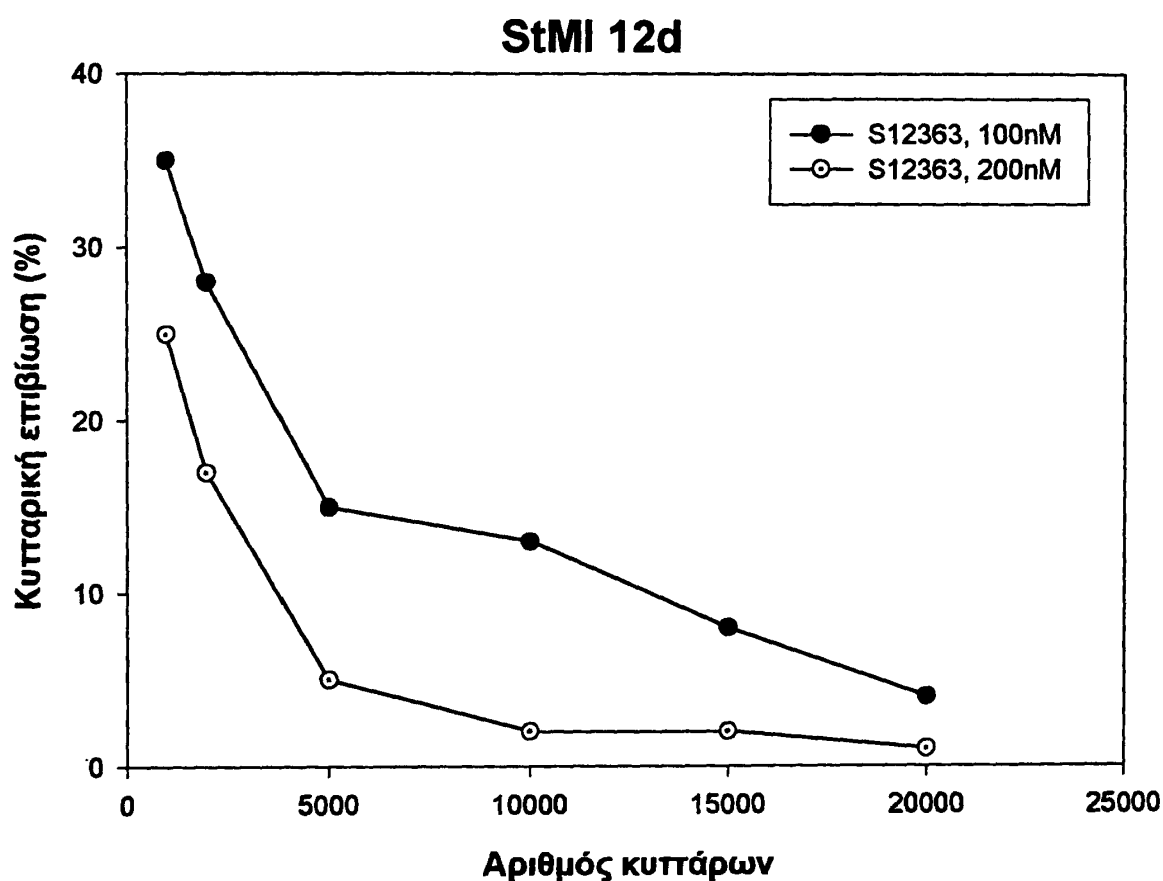
Σχήμα 5β. Καμπύλη επιβίωσης για την κυτταρική σειρά SIM12α, με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης, μετά από έκθεση για 1 ώρα στο S12363 και την βιντεσίνη (VDS).



Σχήμα 5γ. Καμπύλη επιβίωσης για την κυτταρική σειρά S123, με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης, μετά από έκθεση για 1 ώρα στο S12363 και την διαζωτία (VDS).



Σχήμα 6. Σε υψηλές συγκεντρώσεις του S12363 (100 και 200 nM) η επιβίωση ήταν απροσδόκητα αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε και στις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (SiMI11a, SiMI12d, SiMI14a) με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης.

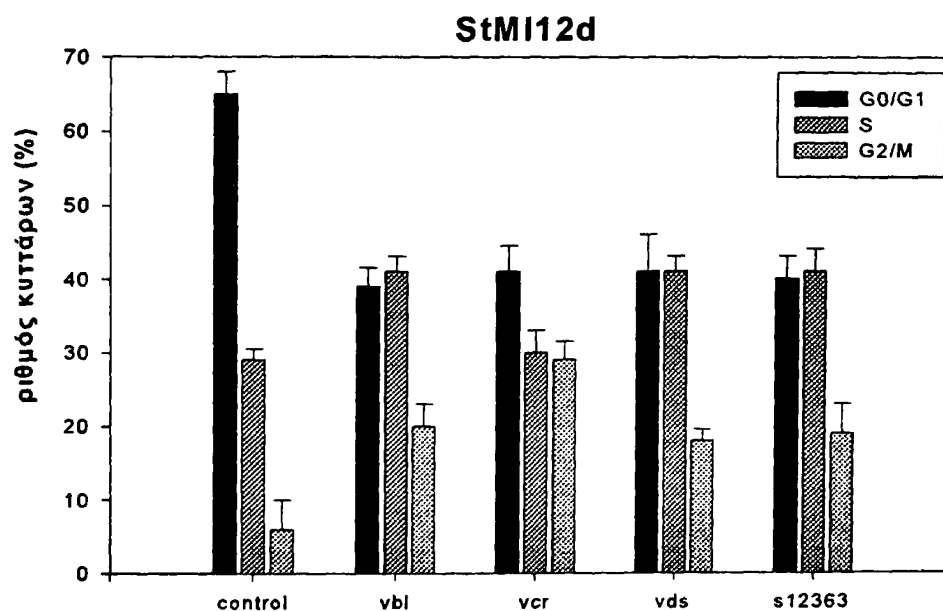
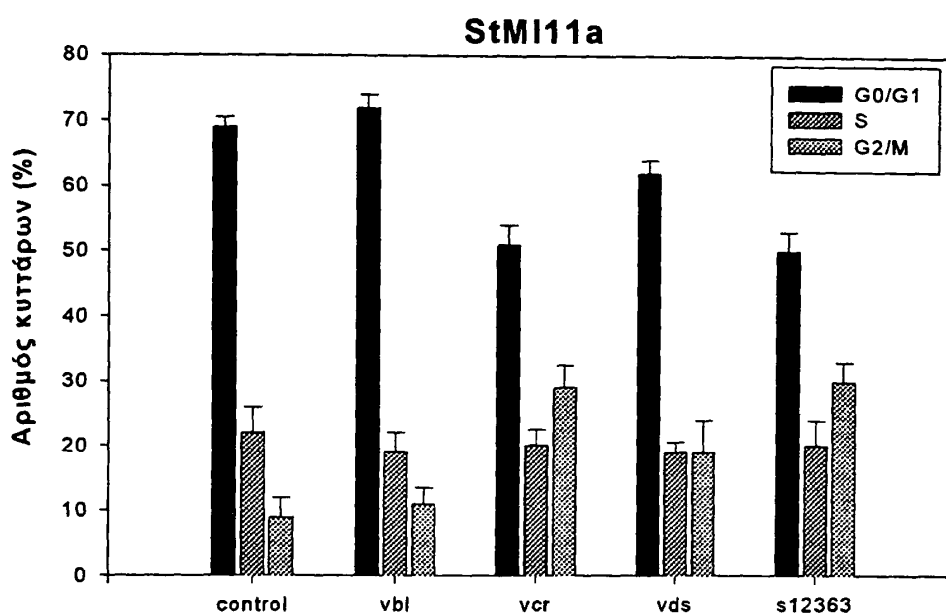


3.1.3 Επίδραση του S12363 στον κυτταρικό κύκλο

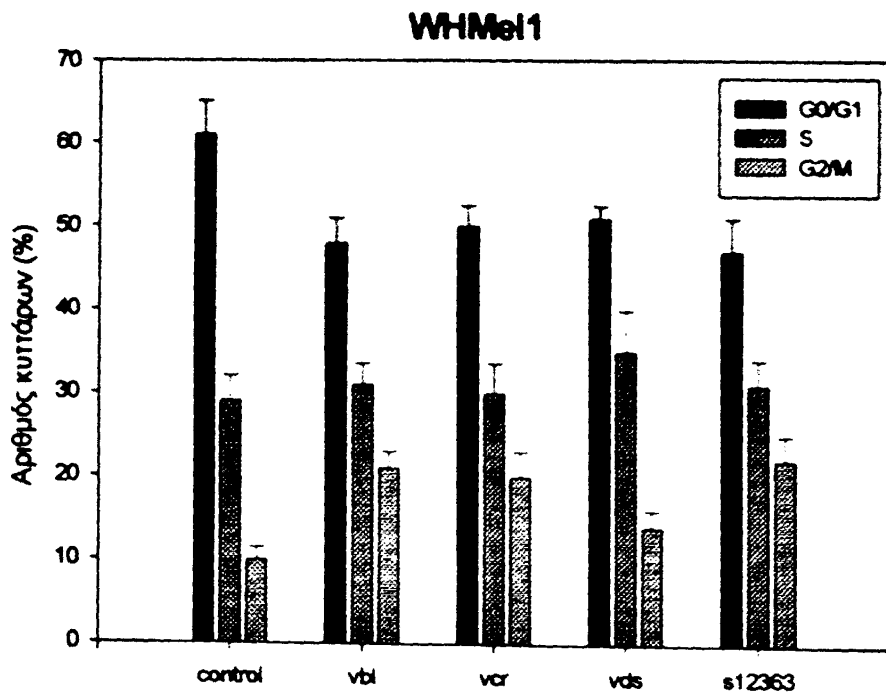
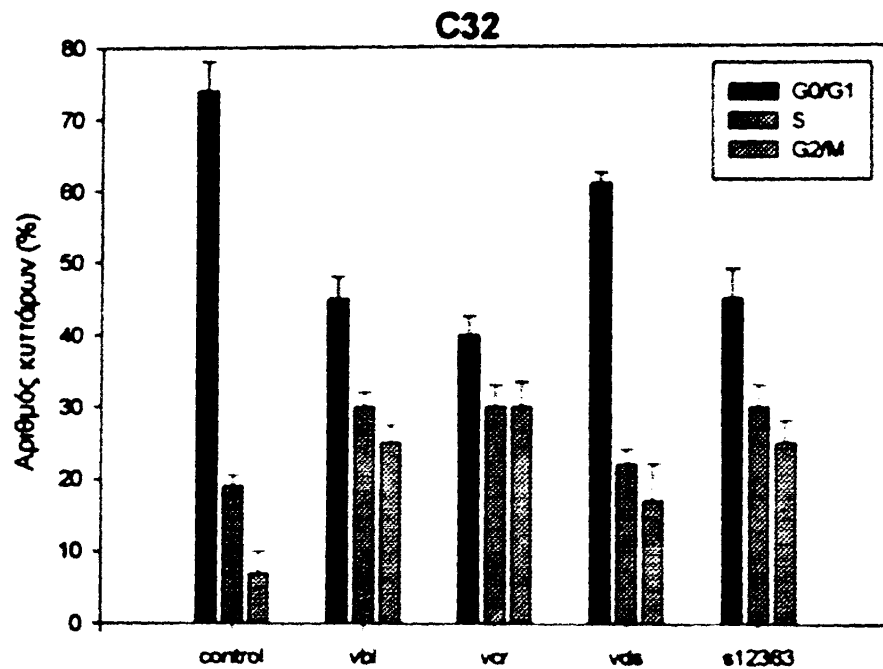
Τόσο το S12363 όσο και τα αλλά αλκαλοειδή προκάλεσαν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στον κυτταρικό κύκλο, μετά από σύντομη (1h) φαρμακευτική έκθεση. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν 24h μετά την έναρξη της θεραπείας με τις IC_{50} συγκεντρώσεις των φαρμάκων παρατηρήθηκε άθροιση των κυττάρων στην G_2/M φάση του κυτταρικού κύκλου, με ταυτόχρονη μείωση του πληθυσμού στην $G1$ φάση. Για την C32 κυτταρική σειρά, εκτός από την άθροιση των κυττάρων στην G_2/M φάση παρατηρήθηκε και μια μικρή αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονταν στην S-φάση του κύκλου, γεγονός που ερμηνεύεται από την μεγάλη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε αυτήν την σειρά.

Η άθροιση των κυττάρων στην $G2/M$ -φάση παρατηρήθηκε με μικρότερες συγκεντρώσεις S12363 στις 3 από τις 4 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Σχήματα 7α, 7β, και 8). Ειδικότερα, οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον κυτταρικό κύκλο επετεύχθησαν με συγκεντρώσεις του S12363 που ήταν 27 και 28 φορές μικρότερες από αυτές της βινπλαστίνης και βιντεσίνης αντιστοίχως, και 1000 φορές χαμηλότερες των αντιστοίχων συγκεντρώσεων βινκριστίνης. Εντούτοις, για τις κυτταρικές σειρές StMI12d και WHMe1 1 όταν εκτέθηκαν σε υψηλές και μη κλινικά εφικτές συγκεντρώσεις VBL και VDS δεν παρατηρήθηκε η προαναφερθείσα άθροιση των κυττάρων στην $G2/M$ -φάση του κύκλου. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και όταν οι κυτταρικές σειρές StMI12d και WHMe1 1, εκτέθηκαν πάλι στις IC_{50} συγκεντρώσεις των φαρμάκων, αλλά τώρα μονιμοποιήθηκαν 8h μετά την θεραπεία, οπότε και πάλι παρατηρήθηκε άθροιση στην $G2/M$ -φάση (εκτός από την WHMe1 1 μετά από έκθεση στην βιντεσίνη).

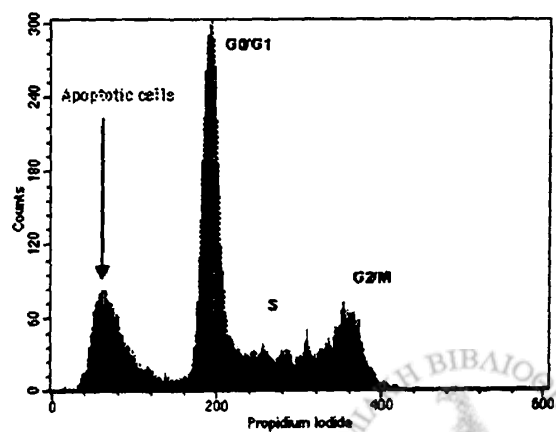
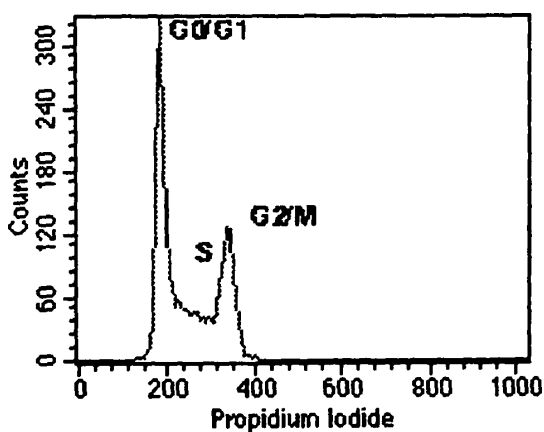
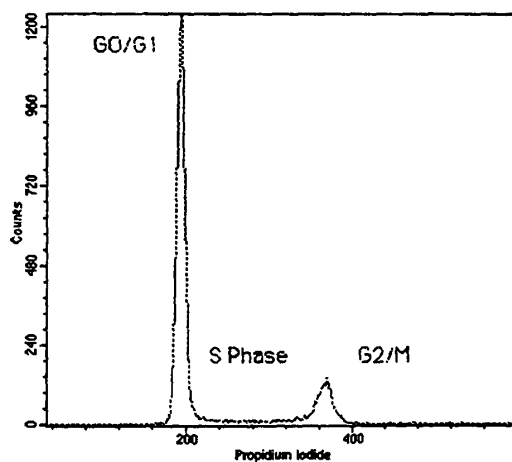
Σχήμα 7α. Η δράση των αλκαλοειδών της νινεα στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε φάση του κύκλου μετά από έκθεση για 1h στην IC₅₀ τιμή για κάθε αλκαλοειδές για τις StMI 11a και StMI 12d κυτταρικές σειρές.



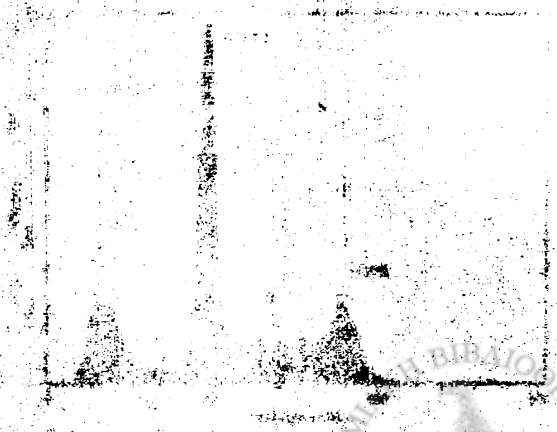
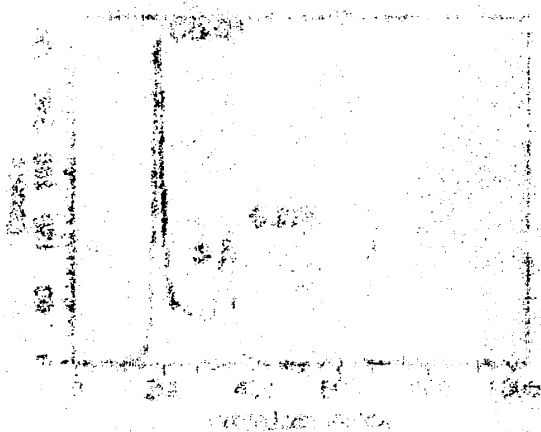
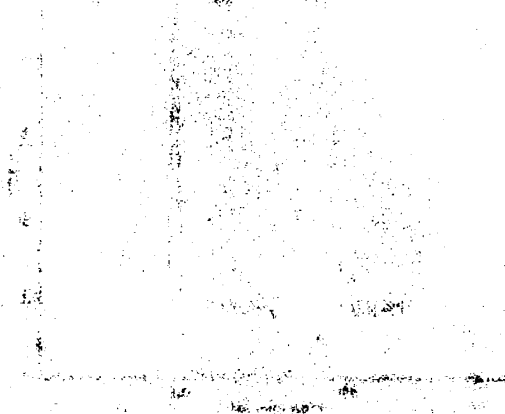
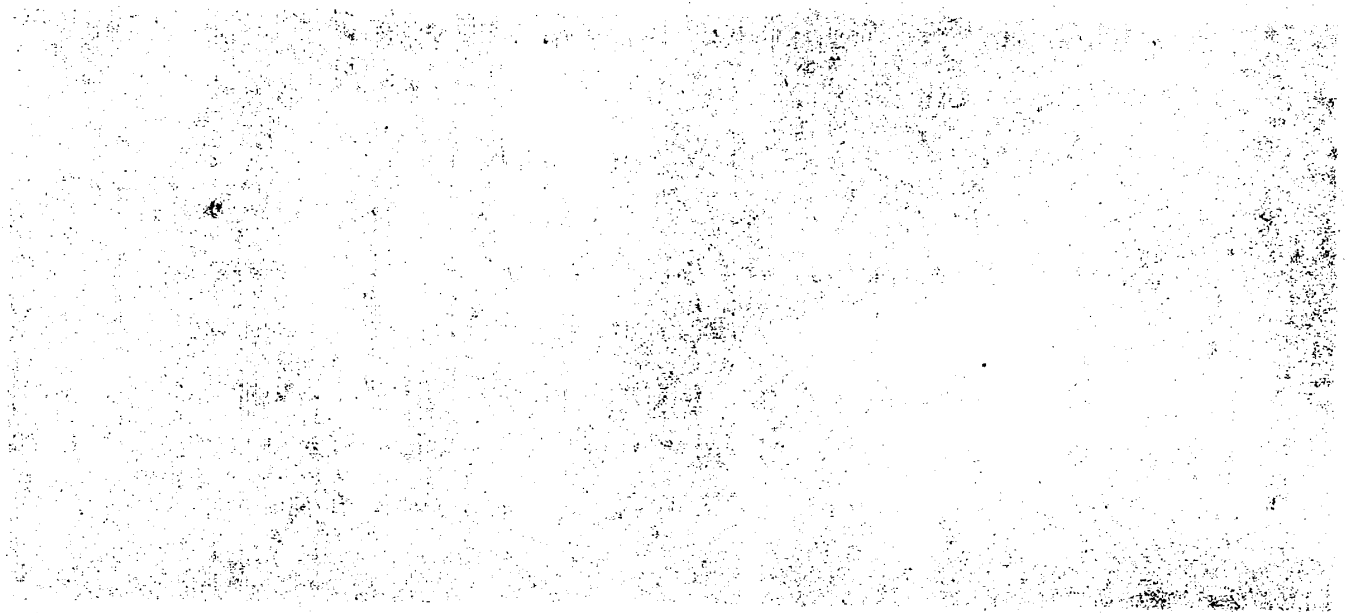
Εξήμα 7β. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε φάση του κύκλου μετά από έκθεση για 1h στην IC₅₀ τιμή για κάθε αλκαλοειδές για τις C32 και WHMe1 κυτταρικές σειρές.



Σχήμα 8α. Χαρακτηριστικές απεικονίσεις κατανομής κυτταρικών πληθυσμών στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, όπως αποκτάται με κυτταρομετρία ροής. Το άνω γράφημα αντιπροσωπεύει πληθυσμούς κυτάρων με φυσιολογική πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στο κάτω γράφημα αριστερά απεικονίζονται τα ίδια κύτταρα μετά από έκθεση για 1h στο S12363. Παρόμοια είναι η δράση και μετά από έκθεση στα αλκαλοειδή αναφοράς. Εφαρμόζοντας ειδικό πρόγραμμα ανάλυσης είναι δυνατόν να χαρακτηρισθούν και τα νεκρά-αποπτωτικά κύτταρα που εμφανίζονται ως κορυφή στην περιοχή πριν την G0/G1 φάση του κύκλου (γράφημα κάτω δεξιά).



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Το S12363 (Vinfosiltine) είναι ένα νέο συνθετικό παράγωγο της βινπλαστίνης, που δημιουργήθηκε με την προσθήκη ενός α-αμινοφωσφονικού στη θέση C23 της O₄-deacetyl-vinblastine, με σκοπό την μεγαλύτερη ενδοκυττάρια κατακράτηση του μορίου⁷².

Η μελέτη αυτή περιγράφει τη δραστικότητα αυτού του νέου αλκαλοειδούς της vincta έναντι 6 κυτταρικών σειρών ανθρωπίνου μελανώματος, οι οποίες είχαν διαφορετικούς δείκτες πολλαπλασιασμού, διαφορετική ιστική προέλευση, διαφορετική χρονολογική ηλικία και διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Το S12363 συγκρίνεται στη μελέτη αυτή με άλλα 3 αλκαλοειδή που βρίσκονται σε κλινική χρήση, τη βινκριστίνη (VCR), τη βινπλαστίνη (VLB) και τη βιντεσίνη (VDS).

Για την μελέτη της δραστικότητας χρησιμοποιήσαμε τρεις διαφορετικές μεθόδους, οι οποίες είναι κατάλληλες για την πρωταρχική εκτίμηση της *in vitro* δραστικότητας νέων φαρμάκων. Αυτές είναι η μέθοδος αναστολής πολλαπλασιασμού, η MTT και η μέθοδος κλωνογενούς ανάπτυξης^{259,261,263-268}. Οι δύο πρώτες είναι οι πιο κοινές και εύχρηστες μέθοδοι, και από αυτές η MTT (και από άλλους η μέθοδος SRB-Sulphorhodamine B) θεωρείται η πιο κατάλληλη για ταχεία και ευρείας κλίμακας μελέτη νέων φαρμακευτικών ουσιών^{266,267}. Βιολογικά οι μέθοδοι αυτές αντικατοπτρίζουν την δράση των φαρμάκων και τις συνέπειες τους στην καθυστέρηση ή στην πλήρη αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και ενδεχομένως στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Αντιθέτως, η μέθοδος κλωνογενούς ανάπτυξης αν και δεν τυγχάνει ευρείας χρήσης, λόγω των τεχνικών δυσκολιών που την συνοδεύουν, όπως μεγάλη διάρκεια πειράματος και υψηλό κόστος, θεωρείται ως η πλέον ικανή να εκτιμήσει εκείνους τους κυτταρικούς πληθυσμούς που μετά από έκθεση σε κάποιο φάρμακο θα διατηρήσουν την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό και δημιουργία αποικιών-κλώνων^{263,265,268-270}. Είναι ίσως η μόνη μέθοδος που μπορεί άμεσα να εκτιμήσει την πρόκληση ανεπανόρθωτης κυτταρικής βλάβης και κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης)²⁷¹.

Τα αποτελέσματα μας και με τις 3 μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε δείχνουν ότι το S12363 είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό φάρμακο έναντι κυτταρικών σειρών μελανώματος και πολύ ισχυρότερο από τα άλλα τρία αλκαλοειδή.

Συνολικά η δραστικότητα αυτού του νέου αλκαλοειδούς ήταν 4-50 και 19-83 φορές πιο ισχυρό από την βινκριστίνη, την βινπλαστίνη και την βιντεσίνη μετά από 1h και 72h έκθεσης στο φάρμακο με την μέθοδο MTT, και 3-11 φορές πιο κυτταροτοξικό από την βιντεσίνη μετά από 1h έκθεση με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης.

Η δραστικότητα του είναι εμφανής τόσο μετά από μακρά-συνεχή έκθεση στα φάρμακα (72-96h), όσο και μετά από σύντομη έκθεση (1h), και ήταν πάντα πιο ισχυρό από τα συγκρινόμενα αλκαλοειδή. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά δραστικότητας σε κάποια από τις 6 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, όπως επίσης και η δραστικότητα των τριών αλκαλοειδών αναφοράς ήταν παρόμοια. Υπήρχε μια τάση για την βιντεσίνη να είναι ισχυρότερη για 1h έκθεση και η βινπλαστίνη ισχυρότερη για 96h έκθεση, χωρίς να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αλκαλοειδών αναφοράς. Συγκρίνοντας την μέθοδο MTT με την μέθοδο κλωνογενούς ανάπτυξης παρατηρήσαμε ότι οι τιμές IC_{50} του S12363 και της βιντεσίνης μετά από 1h έκθεση στα φάρμακα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των. Για την κυτταρική σειρά StMI12d οι τιμές IC_{50} με την μέθοδο MTT ήταν 60nM και 5.3nM για την βιντεσίνη και το S12363 αντιστοίχως, ενώ για την μέθοδο κλωνογενούς ανάπτυξης οι αντίστοιχες τιμές για τα δύο φάρμακα ήταν πολλαπλάσιες δηλαδή 500nM και 75nM. Φαίνεται λοιπόν ότι για να ανασταλεί η ικανότητα δημιουργίας αποικιών απαιτούνται δεκαπλάσιες περίπου συγκεντρώσεις φαρμάκου από τις τιμές που προκύπτουν από την μέθοδο MTT. Η ικανότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως εκτιμάται με την μέθοδο MTT, πιθανώς να μην αντικατοπτρίζει την πραγματική δραστικότητα ενός φαρμάκου, η οποία σκιαγραφείται πιο αντικειμενικά με την μέθοδο κλωνογενούς ανάπτυξης.

Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά την δράση του S12363 στην κυτταρική επιβίωση. Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει μια σημαντική διάφορα στο σχήμα των καμπυλών επιβίωσης μεταξύ βιντεσίνης και S12363 μετά από 1h έκθεσης στο φάρμακο. Όπως ήδη έχει περιγραφεί⁹⁵ για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε, η βιντεσίνη μετά από βραχεία έκθεση δημιουργεί καμπύλες επιβίωσης εκθετικού-plateau τύπου, στις οποίες παρατηρείται μία μέγιστη δραστικότητα η οποία δεν μπορεί να ενισχυθεί περισσότερο ακόμη και με πολύ υψηλές δόσεις του φαρμάκου. Τέτοιου είδους καμπύλες δημιουργούνται από φάρμακα με δράση ειδική σε φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι τα αλκαλοειδή της Vinca, οι αντιμεταβολίτες και οι ταξάνες²⁶⁹. Αντιθέτως, η δράση του S12363 ήταν αποκλειστικά εκθετικού τύπου, χωρίς καμία ένδειξη δημιουργίας plateau, ακόμη και μετά από σύντομη έκθεση στο φάρμακο. Αυτός ο τύπος καμπύλης παρατηρείται βέβαια και με τα αλκαλοειδή της Vinca, αλλά μόνο μετά από παρατεταμένη έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο, δηλαδή για την διάρκεια πολλαπλών κυτταρικών κύκλων²¹⁹. Είναι γνωστό ότι τα αλκαλοειδή της vinca, αλλά και αντιμεταβολίτες όπως η 5-φθοριουρακίλη και η κυταραβίνη παρουσιάζουν μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση μετά

από παρατεταμένη δράση όπως περιγράφηκε σε *in vitro* πειραματικά μοντέλα αλλά και όπως παρατηρήθηκε στην κλινική πράξη²⁷². Μάλιστα ο Ludwig και συν μελέτησε την παρατεταμένη χορήγηση βινπλαστίνης (200h) έναντι βραχείας έκθεσης (1h) σε 77 δείγματα νεοπλασμάτων με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης²⁸⁵. Βρήκε ότι ο λόγος των IC₅₀ (IC₅₀ για έκθεση 1h προς την IC₅₀ για έκθεση 200h) ήταν μεγαλύτερος από 200 στα περισσότερα δείγματα που μελέτησε επισημαίνοντας το πλεονέκτημα δράσης που έχει η παρατεταμένη χορήγηση του φαρμάκου. Σε αντίθεση με τα γνωστά αλκαλοειδή της *vinca* η δράση του S12363 είναι μάλλον δόσοεξαρτώμενη παρά χρονοεξαρτώμενη, επιδεικνύοντας ισχυρή κυτταροτοξική δράση ακόμη και μετά από βραχεία έκθεση²¹⁹.

Η απρόσμενη για αλκαλοειδές συμπεριφορά του S12363 είναι ενδιαφέρουσα και πιθανώς να ερμηνεύεται με το γεγονός ότι η ιδιαίτερη μοριακή του σύνθεση και η κυτταρική του φαρμακολογία ευνοούν την αυξημένη πρόσληψη και την μεγαλύτερη ενδοκυττάρια κατακράτηση του και έτσι και την παρατεταμένη δράση πέραν του ενός κυτταρικού κύκλου²⁷³.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα αλκαλοειδή εισέρχονται στο κύτταρο δεν είναι γνωστός. Δύο είναι οι πιθανοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση αυτών των μορίων: α) παθητική μεταφορά, που υπόκειται σε κορεσμό, απαιτεί ενέργεια και είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία ή β) παθητική διάχυση, που δεν υπόκειται σε κορεσμό αλλά εξαρτάται από την ενδοκυττάρια δέσμευση και εξουδετέρωση των αλκαλοειδών σε κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα. Για το S12363 μελέτες έχουν δείξει ότι μάλλον η μεταφορά διαμέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης γίνεται με παθητική διάχυση και εξαρτάται από την ενδοκυττάρια δέσμευση του μορίου²⁷³. Η ενεργητική μεταφορά όμως του S12363 δεν μπορεί να αποκλεισθεί πλήρως όπως φάνηκε από την υψηλή εκλεκτικότητα που διαθέτει έναντι του ισομερούς S12362 το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση²⁵⁶.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε επίσης ότι στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του S12363 (100nM και 200nM) που χρησιμοποιήσαμε και σε αντίθεση με τα αναμενόμενα, η κυτταρική επιβίωση ήταν αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν (Σχήμα 5). Έτσι σε καλλιέργειες με μεγάλη πυκνότητα κυττάρων ίδια συγκέντρωση φαρμάκου προκαλούσε μεγαλύτερο κυτταρικό θάνατο σε σύγκριση με πιο αραιές καλλιέργειες. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν και ενισχύει την υπόθεση ότι τα κύτταρα λειτουργούν ως «μεταφορείς φαρμάκου», απελευθερώνοντας ενεργό φάρμακο μετά τον θάνατό τους.

Η διαφορά στην δραστικότητα του S12363 έναντι των άλλων αλκαλοειδών δεν φαίνεται να οφείλεται σε μεγαλύτερη και ισχυρότερη αλληλεπίδραση του με τα μικροσωληνάρια. Από την μελέτη του Pierre και συν φάνηκε ότι η ικανότητα αναστολής πολυμερισμού της τουμπουλίνης ήταν παρόμοια μεταξύ S12363, βινκριστίνης και βινπλαστίνης²⁵⁶. Επίσης, το γεγονός ότι το S12363 προκαλεί άθροιση των κυττάρων στην G2/M φάση του κυτταρικού, όμοια με τα άλλα αλκαλοειδή, δηλώνει ότι η κυτταροτοξική του δράση προκαλείται με παρόμοιο μηχανισμό δηλαδή σύνδεση με τα διμερή τουμπουλίνης και αλλοίωση της μιτωτικής ατράκτου. Το πλεονέκτημα του S12363 έναντι των άλλων αλκαλοειδών φαίνεται ότι οφείλεται στην χημική του δομή με την προσθήκη του α-αμινοφωσφονικού. Οι Pierre και συν μελέτησαν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και κατακράτηση του S12363 σε 6 κυτταρικές σειρές διάφορων νεοπλασμάτων, και την συνέκριναν με την βινκριστίνη και την βινπλαστίνη²⁷³. Διαπίστωσαν ότι η βινπλαστίνη είχε πιο ταχεία είσοδο στο κύτταρο από την βινκριστίνη, αλλά είχε μικρότερη ενδοκυττάρια κατακράτηση. Σε αντίθεση, το S12363 είχε ταχύτατη είσοδο στο κύτταρο και 4-18 φορές μεγαλύτερη ενδοκυττάρια κατακράτηση από την βινκριστίνη και την βινπλαστίνη, μετά από μόνο 1h έκθεση στα φάρμακα και μάλιστα χωρίς να παρατηρείται δημιουργία plateau.

Η ιδιότητα αυτή μπορεί να του δώσει σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων αλκαλοειδών, ιδιαίτερα υπό το πρίσμα της πολυφαρμακευτικής αντίστασης.

Το S12363 προκαλεί διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο όμοιες με τα υπόλοιπα αλκαλοειδή, αθροίζοντας τους κυτταρικούς πληθυσμούς στην φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με κινητικές μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας λευχαιμικά κύτταρα L1210⁷². Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου όμως προκλήθηκε με πολύ χαμηλότερες δόσεις του S12363 συγκριτικά με τα άλλα αλκαλοειδή.

Η ιδιότητα αυτή μπορεί να αποδειχθεί αρκετά σημαντική στην κλινική πράξη, ιδιαίτερα στην χορήγηση συνδυασμών κυτταροστατικών, στους οποίους οι χαμηλές δόσεις S12363 μπορεί να προκαλούν συγχρονισμό κυτταρικών πληθυσμών ευνοώντας και ενισχύοντας την δράση άλλων ειδικών του κύκλου κυτταροστατικών.

Εμπόδιο στην δραστικότητα των αλκαλοειδών όπως σημειώνεται σε *in vitro* πρότυπα αλλά και όπως παρατηρείται στην κλινική πράξη είναι η ενδογενής παρουσία αλλά και η επίκτητη ανάπτυξη χημειοαντίστασης^{274,275}.

Αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην δράση των αλκαλοειδών αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα *in vitro* όταν οι κυτταρικές σειρές εκτίθενται συνεχώς ή διαλειπόντως στην δράση του φαρμάκου. Μέχρι σήμερα έχουν περιγράψει δύο κύριοι μηχανισμοί

αντίστασης στα αλκαλοειδή. Ο πρώτος σχετίζεται με μεταλλάξεις στο μόριο της α η β τουμπουλίνης, που οδηγεί σε μειωμένη σύνδεση τους με τα αλκαλοειδή. Ο δεύτερος και πιο καλά μελετημένος και τεκμηριωμένος μηχανισμός αντίστασης, περιλαμβάνει τον φαινότυπο της πολλαπλής αντοχής σε φάρμακα (Multi Drug Resistance - MDR).

Το MDR χαρακτηρίζει τον κυτταρικό φαινότυπο που παρουσιάζει ταυτόχρονη χημειοαντοχή σε ένα ευρύ φάσμα από χημικές ουσίες με διαφορετική δομή και μηχανισμό δράσης όπως τα αλκαλοειδή της Vinca, οι ανθρακυκλίνες, οι ταξάνες και οι επιποδοφυλλοτοξίνες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να υπάρχει *de novo* στα κύτταρα ή μπορεί να είναι επίκτητο μετά από έκθεση σε κυταροτοξικά φάρμακα. Χαρακτηριστικό του φαινοτύπου αυτού είναι η παρουσία κυτταρομεμβρανικών πρωτεϊνών που δρουν ως αντλίες μεταφέροντας ουσίες από τον ενδοκυττάριο στον εξωκυττάριο χώρο. Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο MDR φαινότυπο είναι οι Pgp, MRP και LRP.

Το μελάνωμα χαρακτηρίζεται από την ιδιαίτερη αντοχή του στην χημειοθεραπεία. Μόνο 10-25% των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα θα ανταποκριθούν σε μόνο- ή πολύ-χημειοθεραπεία²⁷⁶. Αυτό δηλώνει την παρουσία ενδογενών μηχανισμών αντίστασης που προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από τα κυταροτοξικά φάρμακα. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τη αντίσταση του στην θεραπεία δεν είναι ακριβώς γνωστοί, όμως φαίνεται ότι εμπλέκονται περισσότεροι του ενός μηχανισμού στο φαινόμενο αυτό.

Η έκφραση της Pgp, MRP και LRP σε κακόηθες μελάνωμα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα αποτελέσματα δε των μελετών είναι αντικρουόμενα όσον αφορά την έκφραση και την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών αυτών και ουσιαστικά εκφράζουν τις διαφορές ευαισθησίας των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν, όπως διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα για τις ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και διαφορετικές συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Ο Berger και συν²⁷⁷, μελέτησαν την έκφραση Pgp σε 33 κυτταρικές σειρές μελανώματος, που δημιουργήθηκαν από βιοπτικά κυρίως υλικά, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και με RT-PCR (ενίσχυση του mRNA του γονιδίου MDR1). Χρησιμοποίησαν τρία διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα, από τα οποία δύο (JSB-1 και C219) αναγνωρίζουν κυταροπλασματικούς επιτόπους της Pgp, ενώ το MRK16 αναγνωρίζει εξωμεμβρανικό επίτοπο. Για το RT-PCR χρησιμοποίησαν ειδικούς εναρκτές για το mRNA του MDR1. Τα αποτελέσματα τους δείχνουν ότι η έκφραση του MDR1 γονιδίου και της αντίστοιχης πρωτεΐνης παρατηρείται συχνά στο μελάνωμα. Με την πρώτη μέθοδο 33% των όγκων ήταν θετικοί για Pgp, ενώ με RT-PCR το 76% των μελανωμάτων ήταν θετικά

για MDR1. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση τους ότι τα περισσότερα δείγματα που ήταν θετικά για MDR1 και Pgp, προέρχονταν από πρωτοπαθείς βλάβες ή από μεταστατικές εστίες ασθενών που ουδέποτε είχαν λάβει κάποια μορφή χημειοθεραπείας με φάρμακα που θα μπορούσαν να επάγουν τον MDR. Έτσι, η έκφραση Pgp μπορεί να θεωρηθεί σαν ενδογενής μορφή αντίστασης. Στις κυτταρικές σειρές με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, στάθηκε δυνατό να αποκατασταθεί η ευαισθησία στην νταουνομυκίνη με την χορήγηση βεραπαμίνης, που είναι γνωστός αναστολέας της Pgp. Άλλοι μελετητές²⁷⁸, χρησιμοποιώντας και αυτοί RT-PCR, βρήκαν ότι μόλις 45% των μεταστατικών κακοηθών μελανωμάτων ήταν θετικά για MDR1, υποστηρίζοντας ότι η PGP δεν είναι ο κυριότερος μηχανισμός αντίστασης αυτής της νόσου.

Η λειτουργικότητα της Pgp πρωτεΐνης είναι επίσης θέμα μελέτης και ο Ramachandran και συν²⁷⁹ κατόρθωσαν να αποδείξουν την συσχέτιση έκφρασης Pgp και ενδοκυττάριας συγκέντρωσης φαρμάκων, σε αντίθεση με την μελέτη των Berger και συν²⁷⁷.

Σε άλλη εργασία²⁸⁰ μελετήθηκαν 16 κυτταρικές σειρές μελανώματος και δείγματα από 71 καλοήθεις και κακοήθεις μελανοκυτταρικούς ιστούς, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και κυτταρομετρία. Δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικά επίπεδα Pgp στις κυτταρικές σειρές, ενώ μόνο 2% των μελανοκυτταρικών βλαβών εξέφραζαν την πρωτεΐνη. Στις ίδιες κυτταρικές σειρές έκφραση MRP βρέθηκε στο 40% αυτών, με ανοσοϊστοχημεία και RT-PCR, ενώ η έκφραση LRP κυμαινόταν από 80-100%, αναλόγως την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Αντιθέτως, 50% των ιστών που εξετάσθηκαν εξέφραζαν MRP (χωρίς να υπάρχει σημαντική διάφορα μεταξύ δειγμάτων που ελήφθησαν πριν και Μετά χημειοθεραπεία) και περίπου 62% των ιστών έβαφαν θετικά για LRP (>25% των κυττάρων ανά δείγμα).

Στη μοναδική μελέτη που εξέτασε την έκφραση και παράλληλα και την λειτουργικότητα της MRP σε κυτταρικές σειρές μελανώματος²⁸¹, βρέθηκε ότι όλες σχεδόν οι 35 σειρές που ελέγχθηκαν, εξέφραζαν mRNA MRP και η πρωτεΐνη ήταν λειτουργική, όπως εκτιμήθηκε από την ικανότητα της να μεταφέρει νταουνορουμπικίνη ή καλσεΐνη. Επίσης, οι αναστολείς της MRP, βεραπαμίνη (VP), προβενεσίδη (PRO), N-εθυλμαλεϊμίδη (NEM) και βενζοβρωμαρόνη (BB), ήταν ικανές να αναστείλουν την λειτουργία της αντλίας, που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης νταουνορουμπικίνης και καλσεΐνης. Η ευαισθησία των κυτταρικών σειρών στην νταουνορουμπικίνη και στην δοξορουμπικίνη ήταν σχετιζόμενη με την έκφραση MRP,

αλλά η έκφραση της πρωτεΐνης δεν συσχετίστηκε με την ευαισθησία σε βινπλαστίνη, ετοποσίδη και σισπλατίνη.

Ανακεφαλαιώνοντας μπορούμε να πούμε ότι ενώ η έκφραση Pgp δεν φαίνεται να είναι μείζων παράγοντας χημειοαντοχής στο κακόηθες μελάνωμα, η παρουσία MRP και ενδεχομένως και η LRP είναι πιο βασικοί παράγοντες ενδογενούς πολυφαρμακευτικής αντίστασης. Τα παραπάνω δεδομένα θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη τόσο στο σχεδιασμό όσο και στην ανάλυση της δραστηριότητας και αποτελεσματικότητας διάφορων χημειοθεραπευτικών θεραπευτικών σχημάτων που περιέχουν φάρμακα που είναι υπόστρωμα των πρωτεϊνών αυτών, όπως για παράδειγμα τα αλκαλοειδή της νίνκα.

Η ισχυρή δράση έναντι των κυτταρικών σειρών μελανώματος, σε συνδυασμό με την ιδιαίτερη χημική του δομή που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το S12363 μπορεί να παρακάμψει τον φαινότυπο της πολυφαρμακευτικής αντίστασης.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το S12363 είναι ένα πολύ ισχυρό παράγωγο των αλκαλοειδών της νίνκα, με δράση έναντι κυτταρικών σειρών μελανώματος πολλαπλάσια των παλαιότερων αλκαλοειδών. Τα παραπάνω αποτελέσματα θεωρήθηκαν ιδιαίτερα αξιόλογα και σε συνδυασμό με την δράση του S12363 και έναντι άλλων τύπων καρκινικών κυττάρων, προωθήθηκε η ανάλυση της δράσης του τόσο σε *in vivo* πειράματα αλλά στην συνέχεια και σε μελέτες φάσης I και II.

[illegible]



Η πρόγνωση του κακοήθους μελανώματος είναι ιδιαίτερα πτωχή όταν η νόσος είναι εκτεταμένη. Τα αλκαλοειδή της νίνσα έχουν να καταδείξουν κάποια δράση στην αντιμετώπιση αυτού του νεοπλασματος. Μικρές τροποποιήσεις της δομής του μορίου των αλκαλοειδών της νίνσα μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο φάσμα δραστηριότητας αυτών, αλλά και να περιορίσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες από τους φυσιολογικούς ιστούς.

Στην προσπάθειά μας να προσδιορίσουμε νέες ουσίες με πιθανή ανασταλτική δράση στο πολλαπλασιασμό του μελανώματος, μελετήσαμε την αντνεοπλασματική δράση του S12363 σε 6 κυτταρικές σειρές ανθρωπίνου μελανώματος. Το S12363 είναι ένα νέο παράγωγο των αλκαλοειδών της νίνσα που δημιουργήθηκε με την μόσχευση ενός αμινοφωσφονικού (ένας βιοεστέρας της βαλίνης) στο μόριο της βινπλαστίνης. Αυτή η προσθήκη έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τόσο την διαμεμβρανική διείσδυση όσο και την ενδοκυττάρια κατακράτηση του φαρμάκου.

Στην εργασία αυτή μελετήσαμε την αντνεοπλασματική δράση του S12363 και την συγκρίναμε με την δράση της βινκριστίνης, της βινπλαστίνης και της βιντεσίνης έναντι κυτταρικών σειρών ανθρωπίνου μελανώματος με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και δείκτες πολλαπλασιασμού εφαρμόζοντας την μέθοδο MTT. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν χρονο- και δόσο-εξαρτώμενη. Συνολικά, οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 24 έως 6770 nM και από 4.6 έως 11.6 nM για τα αλκαλοειδή αναφοράς και το S12363 αντιστοίχως, μετά από 1 ώρα έκθεση στο φάρμακο. Όλα τα αλκαλοειδή ήταν πιο δραστικά μετά από συνεχή για 72 ώρες έκθεση στα φάρμακα, και το S12363 ήταν το πιο ισχυρό από αυτά. Η δράση του S12363 και της βιντεσίνης συγκρίθηκε και με την μέθοδο κλωνογενούς ανάπτυξης. Οι τιμές IC_{50} κυμαίνονταν από 17 έως 75 nM και από 45 έως 500 nM για τα δύο φάρμακα αντίστοιχα. Οι καμπύλες επιβίωσης που αποκτήθηκαν με το S12363 ήταν εκθετικού τύπου, ενώ της βιντεσίνης ήταν τύπου εκθετικού-plateau. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι τόσο η βιντεσίνη όσο και το S12363 ανέστειλαν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M, όταν εκτέθηκαν στις IC_{50} τιμές για 1 ώρα.

Συμπερασματικά, το S12363 απεδείχθη 18-83 φορές πιο δραστικό από αλκαλοειδή αναφοράς με την μέθοδο MTT και 3-11 φορές πιο ισχυρό από την βιντεσίνη με την μέθοδο της κλωνογενούς ανάπτυξης. Η ιδιαίτερα ισχυρή του δράση καθώς και το ξεχωριστό προφίλ κυτταρικής επιβίωσης δηλώνουν ότι το S12363 έχει διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες από τα γνωστά αλκαλοειδή της νίνσα, και για τον λόγο αυτό αξίζει περαιτέρω in vivo μελέτη.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS



Malignant melanoma is a very aggressive tumor and patients with disseminated disease have a very poor prognosis. Systemic chemotherapy in metastatic malignant melanoma has shown some response and vinca alkaloids provide some benefit when used for the treatment of this disease. The clinical activity and the toxicity profile of vinca alkaloids can be modified by introducing small changes in the molecules.

A new vinca alkaloid derivative, S12363, has shown significant antitumor activity against leukemia cell lines. This molecule was developed by adding an aminophosphonate (a bioester of valine), onto the vindoline moiety of O4-deacetyl vinblastine. This addition has been shown to enhance cell membrane penetration and intracellular accumulation of the drug, circumventing multidrug resistance.

In our attempt to determine new compounds with potential growth inhibitory activity on melanoma, we have evaluated the antitumor activity of S12363 on six human melanoma cell lines. In this study, the antiproliferative activity of S12363 was compared to the vinca alkaloids vincristine, vinblastine and vindesine against an extensive panel of human melanoma cell lines with different phenotypic characteristics and growth rates using the MTT assay. Inhibition was time- and dose-dependent. Overall, IC_{50} values ranged from 24 to 6770 nM and from 4.6 to 11.6 nM for the reference drugs and for S12363 respectively, after exposure for 1 hour. All the vinca alkaloids were more active when cells were exposed continuously to the drugs and S12363 was more active than the reference drugs. The activities of vindesine and S12363 were also compared using the clonogenic assay. IC_{50} values ranged from 45 to 500 nM and from 17 to 75 nM respectively. The shape of the cell survival curve obtained with S12363 was exponential, whereas that of vindesine was of the exponential-plateau type. Cell cycle analysis showed these compounds to block cells in G_2/M after exposure to their respective IC_{50} concentrations for 1 hour.

In summary, S12363 proved to be 18-83 times more active than the reference compounds in the MTT assay and 3-11 times more active than vindesine in the clonogenic assay.

Despite its high potency and dissimilar cell survival profiles which indicate that S12363 possesses different biological properties to vincristine, vindesine and vinblastine two small phase II studies could not demonstrate any significant clinical activity against malignant melanoma and breast cancer.

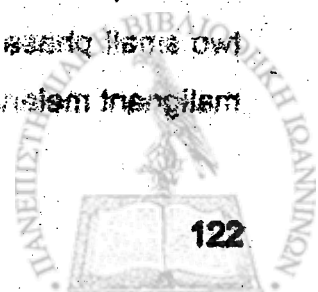
Malignant melanoma is a highly aggressive tumor and patients with disseminated disease have a very poor survival. The development of a new drug with cytotoxic activity against melanoma cells would be a significant advance. The development of a new drug with cytotoxic activity against melanoma cells would be a significant advance. The development of a new drug with cytotoxic activity against melanoma cells would be a significant advance.

A new vinyl alkaloid derivative, 21363, has shown significant antitumor activity against melanoma cell lines. This molecule was developed by adding an aminophosphonate (a bioactive moiety) onto the vinyl moiety of 04-decylphosphonate. This addition has been shown to enhance cell membrane penetration and intracellular accumulation of the drug, overcoming drug resistance.

In our attempt to determine new compounds with growth inhibitory activity on melanoma cells, we have evaluated the antitumor activity of 21363 on several melanoma cell lines. In this study, the antitumor activity of 21363 was compared to the vinyl alkaloid derivative, 04-decylphosphonate, and the growth rates of human melanoma cell lines were determined phenotypically. Growth rates using the MTT assay (inhibition was time- and dose-dependent). IC₅₀ values ranged from 4.6 to 11.6 μ M for the reference drugs and for 21363 respectively after exposure for 1 hour. All the vinyl alkaloids were more active when cells were exposed continuously to the drug and 21363 was more active than the reference drugs. The activities of vinorelbine and 21363 were also compared using the clonogenic assay. IC₅₀ values ranged from 4.6 to 11.6 μ M and from 7.5 to 15 μ M respectively. The activity of the cell survival assay obtained with 21363 was also compared. The activity of the cell survival assay obtained with 21363 was also compared. The activity of the cell survival assay obtained with 21363 was also compared.

In summary, 21363 showed a 10-40 times more active than the reference compounds in the MTT assay and 2-11 times more active than vinorelbine in the clonogenic assay.

Despite its high potency and dissimilar cell survival curves which indicate that 21363 possesses different biological properties to vinorelbine and vinorelbine, two small phase I studies could not demonstrate any significant clinical activity against malignant melanoma and breast cancer.



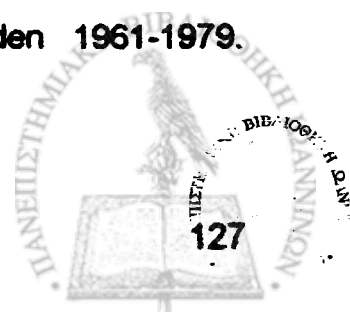
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



1. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J.Natl.Cancer Inst.* 1981; 66:1191-1308.
2. Urteaga O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer* 1966; 19:607-610.
3. Micozzi MS. Disease in antiquity. The case of cancer. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 1991; 115:838-844.
4. Norris W. Case of fungoid disease. *Edinb Med Surg J* 1820; 16:562-565.
5. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA.Cancer J Clin* 1994; 44:7-26.
6. Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF. Recent incidence trends for breast cancer in women and the relevance of early detection: an update [see comments]. *CA.Cancer J.Clin.* 1993; 43:27-41.
7. Rigel DS, Kopf AW, Friedman RJ. The rate of malignant melanoma in the United States: are we making an impact? *J.Am.Acad.Dermatol.* 1987; 17:1050-1053.
8. Retsas S. Malignant Melanoma. *Hosp Update* 8, 1139-1146. 1982. (GENERIC)
Ref Type: Generic
9. Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ, McCarthy WH, et al. Changing trends in cutaneous melanoma over a quarter century in Alabama, USA, and New South Wales, Australia. *Cancer* 1983; 52:1748-1753.
10. Feinstein AR, Esdaile JM. Incidence, prevalence, and evidence. Scientific problems in epidemiologic statistics for the occurrence of cancer. *Am.J.Med.* 1987; 82:113-123.
11. Garbe C, Wiebelt H, Orfanos CE. Change of epidemiological characteristics of malignant melanoma during the years 1962-1972 and 1983-1986 in the Federal Republic of Germany. *Dermatologica* 1989; 178:131-135.
12. Aase A, Bentham G. Gender, geography and socio-economic status in the diffusion of malignant melanoma risk. *Soc.Sci.Med.* 1996; 42:1621-1637.

13. Autier P, Dore JF, Gefeller O, Cesarini JP, Lejeune F, Koelmel KF, et al. Melanoma risk and residence in sunny areas. EORTC Melanoma Co-operative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Br.J.Cancer 1997; 76:1521-1524.
14. Kolmel KF, Pfahlberg A, Mastrangelo G, Niin M, Botev IN, Seebacher C, et al. Infections and melanoma risk: results of a multicentre EORTC case- control study. European Organization for Research and Treatment of Cancer. Melanoma Res. 1999; 9:511-519.
15. Nelemans PJ, Groenendal H, Kiemeney LA, Rampen FH, Ruiter DJ, Verbeek AL. Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun-sensitive individuals. Environ.Health Perspect. 1993; 101:252-255.
16. van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W, Hille ET, Frants RR, Gruis NA. A locus linked to p16 modifies melanoma risk in Dutch familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome families. Genome Res. 1999; 9:575-580.
17. Lee JA. Melanoma and exposure to sunlight. Epidemiol.Rev. 1982; 4:110-136.
18. Berkelhammer J, Oxenhandler RW. Evaluation of premalignant and malignant lesions during the induction of mouse melanomas. Cancer Res. 1987; 47:1251-1254.
19. Pawlowski A, Haberman HF, Menon IA. Junctional and compound pigmented nevi induced by 9, 10-dimethyl-1,2- benzanthrane in skin of albino guinea pigs. Cancer Res. 1976; 36:2813-2821.
20. Elwood JM, Gallagher RP, Hill GB, Pearson JC. Cutaneous melanoma in relation to intermittent and constant sun exposure--the Western Canada Melanoma Study. Int.J.Cancer 1985; 35:427-433.
21. Holman CD, Armstrong BK, Heenan PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight- exposure habits. J.Natl.Cancer Inst. 1986; 76:403-414.

22. Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of UV-light exposure. *Int.J.Cancer* 1988; 42:319-324.
23. Elwood JM, Gallagher RP, Davison J, Hill GB. Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma—The Western Canada Melanoma Study. *Br.J.Cancer* 1985; 51:543-549.
24. Green A, Bain C, McLennan R, Siskind V. Risk factors for cutaneous melanoma in Queensland. *Recent Results Cancer Res.* 1986; 102:76-97.
25. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int.J.Cancer* 1997; 73:198-203.
26. Autier P, Dore JF, Schiffiers E, Cesarini JP, Bollaerts A, Koelmel KF, et al. Melanoma and use of sunscreens: an EORTC case-control study in Germany, Belgium and France. The EORTC Melanoma Cooperative Group. *Int.J.Cancer* 1995; 61:749-755.
27. Montagna W. Black skin structure and function. In: Anonymous London:Academic press, 1993:55-60.
28. Bentham G, Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int.J.Epidemiol.* 1996; 25:1132-1138.
29. Gallagher RP, Elwood JM, Threlfall WJ, Spinelli JJ, Fincham S, Hill GB. Socioeconomic status, sunlight exposure, and risk of malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *J.Natl.Cancer Inst.* 1987; 79:647-652.
30. Pion IA, Rigel DS, Garfinkel L, Silverman MK, Kopf AW. Occupation and the risk of malignant melanoma. *Cancer* 1995; 75:637-644.
31. Vagero D, Ringback G, Kiviranta H. Melanoma and other tumors of the skin among office, other indoor and outdoor workers in Sweden 1961-1979. *Br.J.Cancer* 1986; 53:507-512.



32. Evans RD, Kopf AW, Lew RA, Rigel DS, Bart RS, Friedman RJ, et al. Risk factors for the development of malignant melanoma--I: Review of case-control studies. *J.Dermatol.Surg.Oncol.* 1988; 14:393-408.
33. Williams RR, Horm JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl.Cancer Inst.* 1977; 58:525-547.
34. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13- p22 [see comments]. *Science* 1992; 258:1148-1152.
35. Cawley EP. Genetic aspects of malignant melanoma. *Arch Dermatol Syphilis* 1952; 65:440-450.
36. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [see comments]. *Science* 1994; 264:436-440.
37. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368:753-756.
38. Goldstein AM, Falk RT, Fraser MC, Dracopoli NC, Sikorski RS, Clark WHJ, et al. Sun-related risk factors in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *J.Natl.Cancer Inst.* 1998; 90:709-711.
39. Haluska FG, Hodi FS. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16:670-682.
40. Armstrong BK. Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun? *J.Dermatol.Surg.Oncol.* 1988; 14:835-849.
41. Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, et al. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br.Med J (Clin Res.Ed.)* 1986; 292:1555-1559.

42. Grob JJ, Gouvenet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, et al. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990; 66:387-395.
43. Harrison SL, MacLennan R, Speare R, Wronski I. Sun exposure and melanocytic naevi in young Australian children. *Lancet* 1994; 344:1529-1532.
44. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Neuhausen S, Gruis NA, Anderson DE, Lewis CM, et al. Localization of the 9p melanoma susceptibility locus (MLM) to a 2-cM region between D9S736 and D9S171. *Genomics* 1994; 23:265-268.
45. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl.Cancer Inst.* 1999; 91:429-433.
46. Altshuler JH. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma [letter, comment] [published erratum appears in *J Am Acad Dermatol* 1997 Jun;36(6 Pt 1):913]. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1996; 35:1016-1017.
47. Ghussen F, Kruger I, Groth W. The value of current staging systems for melanoma of the extremities. *Cancer* 1990; 66:396-401.
48. McMasters KM, Sondak VK, Lotze MT, Ross MI. Recent advances in melanoma staging and therapy. *Ann.Surg.Oncol.* 1999; 6:467-475.
49. Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI. Classification and staging of melanoma. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 1998; 12:737-765.
50. Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma: Support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer* 2000; 88:589-595.
51. Temple CF, Huchcroft SA, Hurlbut DJ, Davidson JS. Histologic staging in malignant melanoma: cross-sectional area revisited. *J.Surg.Oncol.* 1998; 69:83-87.

52. Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, Soong S, McCarthy WH, Tinoco L, et al. Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system [see comments]. *J.Clin.Oncol.* 1997; 15:1039-1051.
53. Wong CK. A study of melanocytes in the normal skin surrounding malignant melanomata. *Dermatologica* 1970; 141:215-225.
54. Cochran AJ. Studies of the melanocytes of the epidermis adjacent to tumors. *J Invest.Dermatol* 1971; 57:38-43.
55. Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, Balch C, Bandiera D, Barchuk A, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm [published erratum appears in *N Engl J Med* 1991 Jul 25;325(4):292]. *N.Engl.J Med* 1988; 318:1159-1162.
56. Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surg* 1991; 126:438-441.
57. Kelly JW, Sagebiel RW, Calderon W, Murillo L, Dakin RL, Blois MS. The frequency of local recurrence and microsatellites as a guide to reexcision margins for cutaneous malignant melanoma. *Ann.Surg* 1984; 200:759-763.
58. Holmstrom H. Surgical management of primary melanoma. *Semin.Surg Oncol.* 1992; 8:366-369.
59. Kenady DE, Brown BW, McBride CM. Excision of underlying fascia with a primary malignant melanoma: effect on recurrence and survival rates. *Surgery* 1982; 92:615-618.
60. Drepper H, Kohler CO, Bastian B, Breuninger H, Brocker EB, Gohl J, et al. Benefit of elective lymph node dissection in subgroups of melanoma patients. Results of a multicenter study of 3616 patients. *Cancer* 1993; 72:741-749.
61. Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes.

Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann.Surg* 1991; 214:491-499.

62. Karakousis CP, Goumas W, Rao U, Driscoll DL. Axillary node dissection in malignant melanoma. *Am.J Surg* 1991; 162:202-207.
63. McCarthy WH, Shaw HM, Cascinelli N, Santinami M, Belli F. Elective lymph node dissection for melanoma: two perspectives. *World J Surg* 1992; 16:203-213.
64. Coit DG. Hyperthermic isolation limb perfusion for malignant melanoma: a review. *Cancer Invest.* 1992; 10:277-284.
65. Duran GE, Santolaya R, Requena T. Treatment of malignant melanoma. *Ann.Pharmacother.* 1999; 33:730-738.
66. Eton O, East M, Legha SS, Bedikian A, Buzaid AC, Papadopoulos N, et al. Pilot study of intra-arterial cisplatin and intravenous vinblastine and dacarbazine in patients with melanoma in-transit metastases. *Melanoma Res.* 1999; 9:483-489.
67. Fraker DL. Surgical issues in the management of melanoma [see comments]. *Curr.Opin.Oncol.* 1997; 9:183-188.
68. Stadelmann WK, Reintgen DS. Prognosis in malignant melanoma. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 1998; 12:767-96, vi.
69. Photiou A, Shah P, Leong LK, Moss J, Retsas S. In vitro synergy of paclitaxel (Taxol) and vinorelbine (navelbine) against human melanoma cell lines. *Eur.J.Cancer* 1997; 33:463-470.
70. Hanauske AR, Catimel G, Aamdal S, ten BH, Paridaens R, Pavlidis N, et al. Phase II clinical trials with rhizoxin in breast cancer and melanoma. The EORTC Early Clinical Trials Group. *Br.J.Cancer* 1996; 73:397-399.
71. Garbe C. Chemotherapy and chemoimmunotherapy in disseminated malignant melanoma. *Melanoma.Res.* 1993; 3:291-299.

72. Atassi G, Berlion M, el OY, Bizzari JP. Characterization of the pharmacological antitumor effects of S 12363, a new vinca alkaloid. *Anticancer Res.* 1991; 11:975-980.
73. Nelimark RA, Peterson BA, Vosika GJ, Conroy JA. Vindesine for metastatic malignant melanoma. A phase II trial. *Am.J.Clin.Oncol.* 1983; 6:561-564.
74. Espinosa AJ, Sanchez HJ, Bravo FP, Gonzalez-Baron M, Zamora AP, Espinosa AE, et al. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure in Spain [In Process Citation]. *Melanoma.Res.* 1999; 9:199-205.
75. Koops HS, Vaglini M, Suci S, Kroon BB, Thompson JF, Gohl J, et al. Prophylactic isolated limb perfusion for localized, high-risk limb melanoma: results of a multicenter randomized phase III trial. European Organization for Research and Treatment of Cancer Malignant Melanoma Cooperative Group Protocol 18832, the World Health Organization Melanoma Program Trial 15, and the North American Perfusion Group Southwest Oncology Group-8593. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16:2906-2912.
76. Tsao H, Sober AJ. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Clin.Dermatol.* 1998; 16:67-73.
77. Retsas S. Sun beds and melanoma [letter]. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed.)* 1983; 286:892
78. Griffiths AP, Fairney A. Fluorescent lights, ultraviolet lamps, and cutaneous melanoma [letter]. *BMJ.* 1988; 297:1041
79. Fitzpatrick TB. The skin cancer cascade: from ozone depletion to melanoma--some definitions and some new interpretation, 1996. *J.Dermatol.* 1996; 23:816-820.
80. Cersosimo RJ, Bromer R, Licciardello JT, Hong WK. Pharmacology, clinical efficacy and adverse effects of vindesine sulfate, a new vinca alkaloid. *Pharmacotherapy.* 1983; 3:259-274.



81. Masback A, Westerdahl J, Ingvar C, Olsson H, Jonsson N. Clinical and histopathological characteristics in relation to aetiological risk factors in cutaneous melanoma: a population-based study [In Process Citation]. *Melanoma Res.* 1999; 9:189-197.
82. Stanley AJ, Kaprielian R, Retsas S. Evaluation of S12363, a novel vinca alkaloid drug in the treatment of advanced malignant melanoma. A phase II study. *Anticancer Res.* 1993; 13:31-32.
83. Bayssas M, Gouveia J, de VF, Misset JL, Schwarzenberg L, Ribaud P, et al. Vindesine: a new vinca alkaloid. *Recent Results Cancer Res.* 1980; 74:91-97.
84. Amino N, Ohse T, Koyano T, Umezawa K. Inhibition of cellular chemotactic invasion by a vinca alkaloid, conophylline. *Anticancer Res.* 1996; 16:55-59.
85. Eggermont AM. Strategy of the EORTC-MCG trial programme for adjuvant treatment of moderate-risk and high-risk melanoma. *Eur.J.Cancer* 1998; 34 Suppl 3:S22-S26
86. Hendriks HR, Langdon S, Berger DP, Breistol K, Fiebig HH, Fodstad O, et al. Comparative antitumour activity of vinblastine-isoleucinate and related vinca alkaloids in human tumour xenografts. *Eur.J.Cancer* 1992; 28A:767-773.
87. Pierre A, Kraus-Berthier L, Atassi G, Cros S, Poupon MF, Lavielle G, et al. Preclinical antitumor activity of a new Vinca alkaloid derivative, S 12363. *Cancer Res.* 1991; 51:2312-2318.
88. Lemontt JF, Azzaria M, Gros P. Increased mdr gene expression and decreased drug accumulation in multidrug-resistant human melanoma cells. *Cancer Res.* 1988; 48:6348-6353.
89. Gooderham MJ, Guenther L. Sun and the skin: evaluation of a sun awareness program for elementary school students. *J.Cutan.Med.Surg.* 1999; 3:230-235.
90. MacKie RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur.J.Cancer* 1998; 34 Suppl 3:S3-S6

91. Kruczynski A, Colpaert F, Tarayre JP, Mouillard P, Fahy J, Hill BT. Preclinical in vivo antitumor activity of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1998; 41:437-447.
92. Bezwoda WR. The treatment of disseminated malignant melanoma with special reference to the role of interferons, vinca alkaloids and tamoxifen. *Cancer Treat.Rev.* 1997; 23:17-34.
93. Agarwala SS, Ferri W, Gooding W, Kirkwood JM. A phase III randomized trial of dacarbazine and carboplatin with and without tamoxifen in the treatment of patients with metastatic melanoma. *Cancer* 1999; 85:1979-1984.
94. Hoffmann R, Muller I, Neuber K, Lassmann S, Buer J, Probst M, et al. Risk and outcome in metastatic malignant melanoma patients receiving DTIC, cisplatin, BCNU and tamoxifen followed by immunotherapy with interleukin 2 and interferon alpha2a. *Br.J.Cancer* 1998; 78:1076-1080.
95. Photiou A, Sheikh MN, Bafaloukos D, Retsas S. Antiproliferative activity of vinorelbine (Navelbine) against six human melanoma cell lines. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 1992; 118:249-254.
96. Tolis C, Photiou A, Camplejohn RS, Retsas S. Growth inhibitory activity of S12363, a novel vinca alkaloid derivative on human melanoma cell lines. *Anticancer Res.* 1993; 13:161-166.
97. Retsas S, Newton KA, Westbury G. Vindesine as a single agent in the treatment of advanced malignant melanoma. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1979; 2:257-260.
98. Smith IE, Hedley DW, Powles TJ, McElwain TJ. Vindesine: a phase II study in the treatment of breast carcinoma, malignant melanoma, and other tumors. *Cancer Treat.Rep.* 1978; 62:1427-1433.
99. Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, et al. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin,

vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16:1752-1759.

100. Johnston SR, Constenla DO, Moore J, Atkinson H, A'Hern RP, Dadian G, et al. Randomized phase II trial of BCDT [carmustine (BCNU), cisplatin, dacarbazine (DTIC) and tamoxifen] with or without interferon alpha (IFN- alpha) and interleukin (IL-2) in patients with metastatic melanoma. *Br.J.Cancer* 1998; 77:1280-1286.
101. Kirkwood JM, Bryant J, Schiller JH, Oken MM, Borden EC, Whiteside TL. Immunomodulatory function of interferon-gamma in patients with metastatic melanoma: results of a phase II-B trial in subjects with metastatic melanoma, ECOG study E 4987. Eastern Cooperative Oncology Group. *J.Immunother.* 1997; 20:146-157.
102. Gerard B, Aamdal S, Lee SM, Leyvraz S, Lucas C, D'Incalci M, et al. Activity and unexpected lung toxicity of the sequential administration of two alkylating agents—dacarbazine and fotemustine—in patients with melanoma. *Eur.J.Cancer* 1993; 29A:711-719.
103. Richard MA, Grob JJ, Zarrou H, Basseres N, Bizzari JP, Gerard B, et al. Combined treatment with dacarbazine, cisplatin, fotemustine and tamoxifen in metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1998; 8:170-174.
104. Seeber A, Binder M, Steiner A, Wolff K, Pehamberger H. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus fotemustine. *Eur.J.Cancer* 1998; 34:2129-2131.
105. Semb KA, Aamdal S, Bohmann T, Lucas C, Gerard B. Clinical experience of fotemustine, cisplatin and high dose tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1998; 8:565-572.
106. Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. *Cancer* 1993; 71:3737-3743.

107. Buzaid AC, Colome M, Bedikian A, Eton O, Legha SS, Papadopoulos N, et al. Phase II study of neoadjuvant concurrent biochemotherapy in melanoma patients with local-regional metastases. *Melanoma.Res.* 1998; 8:549-556.
108. Morton DL. Cancer immunology and the surgeon. *Surgery* 1970; 67:396-398.
109. Morton DL, Eilber FR, Holmes EC, Hunt JS, Ketcham AS, Silverstein MJ, et al. BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. *Ann.Surg* 1974; 180:635-643.
110. Tan JK, Ho VC. Pooled analysis of the efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy in malignant melanoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993; 19:985-990.
111. Czarnetzki BM, Macher E, Suci S, Thomas D, Steerenberg PA, Rumke P. Long-term adjuvant immunotherapy in stage I high risk malignant melanoma, comparing two BCG preparations versus non-treatment in a randomised multicentre study (EORTC Protocol 18781). *Eur.J Cancer* 1993; 29A:1237-1242.
112. Paterson AH, Willans DJ, Jerry LM, Hanson J, McPherson TA. Adjuvant BCG immunotherapy for malignant melanoma. *Can.Med Assoc.J* 1984; 131:744-748.
113. Sterchi JM, Wells HB, Case LD, Spurr CL, White DR, Richards F, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in Stage I and Stage II cutaneous melanoma. An interim report. *Cancer* 1985; 55:707-712.
114. Fisher RI, Terry WD, Hodes RJ, Rosenberg SA, Makuch R, Gordon HG, et al. Adjuvant immunotherapy or chemotherapy for malignant melanoma. Preliminary report of the National Cancer Institute randomized clinical trial. *Surg Clin.North Am.* 1981; 61:1267-1277.
115. Brocker EB, Suter L, Czarnetzki BM, Macher E. BCG immunotherapy in stage I melanoma patients. Does it influence prognosis determined by HLA-DR expression in high-risk primary tumors? *Cancer Immunol.Immunother.* 1986; 23:155-157.

116. Aranha GV, McKhann CF, Grage TB, Gunnarsson A, Simmons RL. Adjuvant immunotherapy of malignant melanoma. *Cancer* 1979; 43:1297-1303.
117. Ariyan S, Kirkwood JM, Mitchell MS, Nordlund JJ, Lerner AB, Papac RJ. Intralymphatic and regional surgical adjuvant immunotherapy in high-risk melanoma of the extremities. *Surgery* 1982; 92:459-463.
118. Morton DL, Eilber FR, Joseph WL, Wood WC, Trahan E, Ketcham AS. Immunological factors in human sarcomas and melanomas: a rational basis for immunotherapy. *Ann.Surg* 1970; 172:740-749.
119. Veronesi U, Adamus J, Aubert C, Bajetta E, Beretta G, Bonadonna G, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy and immunotherapy in cutaneous melanoma. *N.Engl.J Med* 1982; 307:913-916.
120. Lipton A, Harvey HA, Lawrence B, Gottlieb R, Kukrika M, Dixon R, et al. - *Corynebacterium parvum* versus BCG adjuvant immunotherapy in human malignant melanoma. *Cancer* 1983; 51:57-60.
121. Balch CM, Smalley RV, Bartolucci AA, Burns D, Presant CA, Durant JR. A randomized prospective clinical trial of adjuvant *C. parvum* immunotherapy in 260 patients with clinically localized melanoma (Stage I): prognostic factors analysis and preliminary results of immunotherapy. *Cancer* 1982; 49:1079-1084.
122. Thatcher N, Mene A, Banerjee SS, Craig P, Gleave N, Orton C. Randomized study of *Corynebacterium parvum* adjuvant therapy following surgery for (stage II) malignant melanoma. *Br.J Surg* 1986; 73:111-115.
123. Thatcher N, Wagstaff J, Mene A, Smith D, Orton C, Craig P. *Corynebacterium parvum* followed by chemotherapy (actinomycin D and DTIC) compared with chemotherapy alone for metastatic malignant melanoma. *Eur.J Cancer Clin.Oncol.* 1986; 22:1009-1014.
124. Quirt IC, Shelley WE, Pater JL, Bodurtha AJ, McCulloch PB, McPherson TA, et al. Improved survival in patients with poor-prognosis malignant melanoma treated

with adjuvant levamisole: a phase III study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [see comments]. *J Clin.Oncol.* 1991; 9:729-735.

125. Spitler LE. A randomized trial of levamisole versus placebo as adjuvant therapy in malignant melanoma. *J Clin.Oncol.* 1991; 9:736-740.
126. Loutfi A, Shakr A, Jerry M, Hanley J, Shibata HR. Double blind randomized prospective trial of levamisole/placebo in stage I cutaneous malignant melanoma. *Clin.Invest.Med* 1987; 10:325-328.
127. Irie RF, Irie K, Morton DL. A membrane antigen common to human cancer and fetal brain tissues. *Cancer Res.* 1976; 36:3510-3517.
128. Tai T, Paulson JC, Cahan LD, Irie RF. Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I-1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1983; 80:5392-5396.
129. Morton DL, Malmgren RA, Holmes EC, Ketcham AS. Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. *Surgery* 1968; 64:233-240.
130. Berd D, Maguire HCJ, McCue P, Mastrangelo MJ. Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *J Clin.Oncol.* 1990; 8:1858-1867.
131. Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, et al. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA- A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp.Med* 1993; 177:989-998.
132. Brichard V, Van PA, Wolfel T, Wolfel C, De PE, Lethe B, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp.Med* 1993; 178:489-495.
133. Gaugler B, Van dE, van dB, Romero P, Gaforio JJ, De PE, et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp.Med* 1994; 179:921-930.

134. Karakousis CP, Didolkar MS, Lopez R, Baffi R, Moore R, Holyoke ED. Chemoimmunotherapy (DTIC and *Corynebacterium parvum*) as adjuvant treatment in malignant melanoma. *Cancer Treat.Rep.* 1979; 63:1739-1743.
135. Trantum BL, Dixon D, Quagliana J, Neidhart J, Balcerzak SP, Costanzi JH, et al. Lack of benefit of adjunctive chemotherapy in stage I malignant melanoma: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer Treat.Rep.* 1987; 71:643-644.
136. Hill GJ, Moss SE, Golomb FM, Grage TB, Fletcher WS, Minton JP, et al. DTIC and combination therapy for melanoma: III. DTIC (NSC 45388) Surgical Adjuvant Study COG PROTOCOL 7040. *Cancer* 1981; 47:2556-2562.
137. McClay E, Lusch CJ, Mastrangelo MJ. Allergy-induced hepatic toxicity associated with dacarbazine. *Cancer Treat.Rep.* 1987; 71:219-220.
138. Shetty MR. Methyl CCNU therapy linked leukemia [letter]. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1981; 6:199
139. Retsas S. The treatment of advanced malignant melanoma. *Practitioner.* 1980; 224:1019-1021.
140. Carmichael J, Atkinson RJ, Calman KC, MacKie RM, Naysmith AM, Smyth JF. A multicentre phase II trial of vindesine in malignant melanoma. *Eur.J Cancer Clin Oncol.* 1982; 18:1293-1295.
141. Retsas S, Quigley M, Pectasides D, Macrae K, Henry K. Clinical and histologic involvement of regional lymph nodes in malignant melanoma. Adjuvant vindesine improves survival. *Cancer* 1994; 73:2119-2130.
142. Kirkwood JM. Studies of interferons in the therapy of melanoma. *Semin.Oncol.* 1991; 18:83-90.
143. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684 [see comments]. *J Clin Oncol.* 1996; 14:7-17.

144. Cole BF, Gelber RD, Kirkwood JM, Goldhirsch A, Barylak E, Borden E. Quality-of-life-adjusted survival analysis of interferon alfa-2b adjuvant treatment of high-risk resected cutaneous melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study [see comments]. *J Clin Oncol.* 1996; 14:2666-2673.
145. Grob JJ, Dreno B, de la SP, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, et al. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. [see comments]. *Lancet* 1998; 351:1905-1910.
146. Creagan ET, Dalton RJ, Ahmann DL, Jung SH, Morton RF, Langdon RMJ, et al. Randomized, surgical adjuvant clinical trial of recombinant interferon alfa-2a in selected patients with malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 1995; 13:2776-2783.
147. Meyskens FLJ, Kopecky KJ, Taylor CW, Noyes RD, Tuthill RJ, Hersh EM, et al. Randomized trial of adjuvant human interferon gamma versus observation in high-risk cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study [see comments]. *J Natl.Cancer Inst.* 1995; 87:1710-1713.
148. Creagan ET, Ingle JN, Schutt AJ, Schaid DJ. A prospective, randomized controlled trial of megestrol acetate among high-risk patients with resected malignant melanoma. *Am.J Clin Oncol.* 1989; 12:152-155.
149. Livingston PO, Wong GY, Adluri S, Tao Y, Padavan M, Parente R, et al. Improved survival in stage III melanoma patients with GM2 antibodies: a randomized trial of adjuvant vaccination with GM2 ganglioside. *J Clin.Oncol.* 1994; 12:1036-1044.
150. Livingston P. Ganglioside vaccines with emphasis on GM2. *Semin.Oncol.* 1998; 25:636-645.
151. Schultz N, Oratz R, Chen D, Zeleniuch-Jacquotte A, Abeles G, Bystryr JC. Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. *Vaccine* 1995; 13:503-508.

152. Agarwala SS, Kirkwood JM. Adjuvant interferon treatment for melanoma. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 1998; 12:823-833.
153. Creagan ET, Rowland KMJ, Suman VJ, Kardinal CG, Marschke RFJ, Marks RS, et al. Phase II study of combined levamisole with recombinant interleukin-2 in patients with advanced malignant melanoma. *Am.J Clin.Oncol.* 1997; 20:490-492.
154. Naglieri E, Procacci A, Galetta D, Abbate I, Dell 'L, Colucci G. Cisplatin, interleukin-2, interferon-alpha and tamoxifen in metastatic melanoma. A phase II study. *J.Chemother.* 1999; 11:150-155.
155. Richards JM, Gale D, Mehta N, Lestingi T. Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon alfa for the treatment of metastatic melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1999; 17:651-657.
- 156.- Gamero AM, Ussery D, Reintgen DS, Puleo CA, Djeu JY. Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res.* 1995; 55:4988-4994.
157. Palmer K, Moore J, Everard M, Harris JD, Rodgers S, Rees RC, et al. Gene therapy with autologous, interleukin 2-secreting tumor cells in patients with malignant melanoma [In Process Citation]. *Hum.Gene Ther.* 1999; 10:1261-1268.
158. Noble RL BCaCJ. Further biological activities of vincaleukoblastine - an alkaloid isolated from *Vinca rosea* (L.). *Biochem.Pharmacol.* 1958; 1:347-348.
159. Noble RL. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosae*. *Ann NY Acad Sci* 1958; 76:882-894.
160. Noble RL. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem.Cell Biol.* 1990; 68:1344-1351.



161. Bleyer WA, Frisby SA, Oliverio VT. Uptake and binding of vincristine by murine leukemia cells. *Biochem.Pharmacol.* 1975; 24:633-639.
162. Beck WT, Cirtain MC, Lefko JL. Energy-dependent reduced drug binding as a mechanism of Vinca alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Mol.Pharmacol.* 1983; 24:485-492.
163. Warren RD, Nichols AP, Bender RA. Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res.* 1978; 38:668-671.
164. Bender RA, Castle MC, Margileth DA, Oliverio VT. The pharmacokinetics of [3H]-vincristine in man. *Clin Pharmacol.Ther.* 1977; 22:430-435.
165. Sirotnak FM, Yang CH, Mines LS, Oribe E, Biedler JL. Markedly altered membrane transport and intracellular binding of vincristine in multidrug-resistant Chinese hamster cells selected for resistance to vinca alkaloids. *J Cell Physiol.* 1986; 126:266-274.
166. Rahmani R, Martin M, Barbet J, Cano JP. Radioimmunoassay and preliminary pharmacokinetic studies in rats of 5'-noranhydrovinblastine (navelbine). *Cancer Res.* 1984; 44:5609-5613.
167. Rahmani-Jourdheuil D, Coloma F, Placidi M, Rahmani R. Human hepatic uptake of two vinca alkaloids: navelbine and vincristine. *J Pharm.Sci* 1994; 83:468-471.
168. Beck WT. Increase by vinblastine of oxidized glutathione in cultured mammalian cells. *Biochem.Pharmacol.* 1980; 29:2333-2337.
169. Cline MJ. Effect of vincristine on synthesis of ribonucleic acid and protein in leukaemic leucocytes. *Br.J Haematol.* 1968; 14:21-29.
170. Kotani M, Koizumi Y, Yamada T, Kawasaki A, Akabane T. Increase of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate concentration in transplantable lymphoma cells by vinca alkaloids. *Cancer Res.* 1978; 38:3094-3099.

171. Schroeder F, Fontaine RN, Feller DJ, Weston KG. Drug-induced surface membrane phospholipid composition in murine fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta* 1981; 643:76-88.
172. Kirschner MW. Microtubule assembly and nucleation. *Int.Rev.Cytol.* 1978; 54:1-71.
173. Llanos R, Chevrier V, Ronjat M, Meurer-Grob P, Martinez P, Frank R, et al. Tubulin binding sites on gamma-tubulin: identification and molecular characterization. *Biochemistry* 1999; 38:15712-15720.
174. Zheng Y, Jung MK, Oakley BR. Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 1991; 65:817-823.
175. Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ. Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell* 1996; 86:287-296.
176. Lewis SA, Lee MG, Cowan NJ. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol.* 1985; 101:852-861.
177. Lewis SA, Gilmartin ME, Hall JL, Cowan NJ. Three expressed sequences within the human beta-tubulin multigene family each define a distinct isotype. *J Mol.Biol.* 1985; 182:11-20.
178. Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis SA, Cowan NJ. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis- specific expression of two sister genes. *Mol.Cell Biol.* 1986; 6:2409-2419.
179. Wilde CD, Crowther CE, Cowan NJ. Diverse mechanisms in the generation of human beta-tubulin pseudogenes. *Science* 1982; 217:549
180. Wilde CD, Crowther CE, Cripe TP, Gwo-Shu LM, Cowan NJ. Evidence that a human beta-tubulin pseudogene is derived from its corresponding mRNA. *Nature* 1982; 297:83-84.

181. Lopata MA, Cleveland DW. In vivo microtubules are copolymers of available beta-tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate beta-tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens. *J Cell Biol.* 1987; 105:1707-1720.
182. Gard DL, Kirschner MW. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol.* 1985; 100:764-774.
183. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int.Rev.Cytol.* 1998; 178:207-275.
184. McNally FJ. Microtubule dynamics: Controlling split ends. *Curr.Biol.* 1999; 9:R274-R276
185. Itoh TJ, Hotani H. Microtubule-stabilizing activity of microtubule-associated proteins (MAPs) is due to increase in frequency of rescue in dynamic instability: shortening length decreases with binding of MAPs onto microtubules. *Cell Struct.Funct.* 1994; 19:279-290.
186. Gonzalez M, Cambiazo V, Maccioni RB. Identification of a new microtubule-interacting protein Mip-90. *Eur.J Cell Biol.* 1995; 67:158-169.
187. Fellous A, Prasad V, Ohayon R, Jordan MA, Luduena RF. Removal of the projection domain of microtubule-associated protein 2 alters its interaction with tubulin. *J Protein Chem.* 1994; 13:381-391.
188. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol.Biol.* 1977; 116:207-225.
189. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol.Biol.* 1977; 116:227-247.

190. Nguyen HL, Chari S, Gruber D, Lue CM, Chapin SJ, Bulinski JC. Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J Cell Sci* 1997; 110:281-294.
191. Binet S, Chaineau E, Fellous A, Lataste H, Krikorian A, Couzinier JP, et al. Immunofluorescence study of the action of navelbine, vincristine and vinblastine on mitotic and axonal microtubules. *Int.J.Cancer* 1990; 46:262-266.
192. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* 1991; 51:2212-2222.
193. Rao S, He L, Chakravarty S, Ojima I, Orr GA, Horwitz SB. Characterization of the taxol binding site on the microtubule. Identification Of arg(282) in beta-tubulin as the site of photoincorporation of a 7-benzophenone analogue of taxol [In Process Citation]. *J.Biol.Chem.* 1999; 274:37990-37994.
194. Spencer W, Kwon H, Crepieux P, Leclerc N, Lin R, Hiscott J. Taxol selectively blocks microtubule dependent NF-kappaB activation by phorbol ester via inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *Oncogene* 1999; 18:495-505.
195. Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med.Res.Rev.* 1998; 18:259-296.
196. Zhou XJ, Rahmani R. Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs* 1992; 44 Suppl 4:1-16.
197. Lobert S, Vulevic B, Correia JJ. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* 1996; 35:6806-6814.
198. Rai SS, Wolff J. Dissociation of tubulin assembly-inhibiting and aggregation-promoting activities by a vinblastine derivative. *FEBS Lett.* 1997; 416:251-253.

199. Verdier-Pinard P, Gares M, Wright M. Differential in vitro association of vinca alkaloid-induced tubulin spiral filaments into aggregated spirals. *Biochem.Pharmacol.* 1999; 58:959-971.
200. Himes RH. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol.Ther.* 1991; 51:257-267.
201. Williams JA. Catharanthine: a novel stimulator of pancreatic enzyme release. *Cell Tissue Res.* 1978; 192:277-284.
202. Wilson L, Bamburg JR, Mizel SB, Grisham LM, Creswell KM. Interaction of drugs with microtubule proteins. *Fed.Proc.* 1974; 33:158-166.
203. Howard SM, Theologides A, Sheppard JR. Comparative effects of vindesine, vinblastine, and vincristine on mitotic arrest and hormonal response of L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* 1980; 40:2695-2700.
204. Gonzalez-Cid M, Cuello MT, Larripa I. Mitotic arrest and anaphase aberrations induced by vinorelbine in hamster cells in vitro. *Anticancer Drugs* 1997; 8:529-532.
205. Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin.Oncol.* 1999; 17:1061-1070.
206. Kuhl JS, Krajewski S, Duran GE, Reed JC, Sikic BI. Spontaneous overexpression of the long form of the Bcl-X protein in a highly resistant P388 leukaemia. *Br.J.Cancer* 1997; 75:268-274.
207. Sorger PK, Dobles M, Tournebize R, Hyman AA. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1997; 9:807-814.
208. Gorlick R, Bertino JR. Drug resistance in colon cancer. *Semin.Oncol.* 1999; 26:606-611.

209. Grem JL. Recent insights into the molecular basis of intrinsic resistance of colorectal cancer: new challenges for systemic therapeutic approaches. *Cancer Treat.Res.* 1998; 98:293-338.
210. Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* 1999; 9:51-58.
211. Kaye SB. Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention. *Curr.Opin.Oncol.* 1998; 10 Suppl 1:S15-S19
212. Loo TW, Clarke DM. Merck Frosst Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem.Cell Biol.* 1999; 77:11-23.
213. Parekh H, Wiesen K, Simpkins H. Acquisition of taxol resistance via P-glycopro. *Biochem.Pharmacol.* 1997; 53:461-470.
214. Jackson DV, Jr., Sethi VS, Long TR, Muss HB, Spurr CL. Pharmacokinetics of vindesine bolus and infusion. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1984; 13:114-119.
215. Borden EC, Sidky YA, Hatcher JF, Bryan GT. Schedule-dependent variations in the response of murine P388 leukemia to cyclophosphamide in combination with interferons-alpha/beta. *Cancer Res.* 1988; 48:2329-2334.
216. Cheng MF, Chatterjee S, Berger NA. Schedule-dependent cytotoxicity of topotecan alone and in combination chemotherapy regimens. *Oncol.Res.* 1994; 6:269-279.
217. Demetri GD. High-dose ifosfamide in the treatment of sarcomas of soft tissues and bone. *Semin.Oncol.* 1996; 23:22-26.
218. Teicher BA, Holden SA, Jones SM, Eder JP, Herman TS. Influence of scheduling on two-drug combinations of alkylating agents in vivo. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1989; 25:161-166.

219. Fischel JL, Berlion M, Formento P, Bizzari JP, Milano G. Evaluation of the time-schedule dependency for the cytotoxic activity of the new vinca alkaloid derivative, S 12363 (vinfosiltine). *Eur.J.Cancer* 1993; 29A:1890-1894.
220. Furuse K, Fukuoka M, Kuba M, Yamori S, Nakai Y, Negoro S, et al. Randomized study of vinorelbine (VRB) versus vindesine (VDS) in previously untreated stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer (NSCLC). The Japan Vinorelbine Lung Cancer Cooperative Study Group. *Ann.Oncol.* 1996; 7:815-820.
221. Coleman CN. Hypoxia in tumors: a paradigm for the approach to biochemical and physiologic heterogeneity. *J Natl.Cancer Inst.* 1988; 80:310-317.
222. May-Manke A, Kroemer H, Hempel G, Bohnenstengel F, Hohenlocher B, Blaschke G, et al. Investigation of the major human hepatic cytochrome P450 involved in 4- hydroxylation and N-dechloroethylation of trofosfamide. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1999; 44:327-334.
223. Waxman DJ, Chen L, Hecht JE, Jounaidi Y. Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev.* 1999; 31:503-522.
224. Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur.J Cancer* 1996; 32A:912-920.
225. Boh-Seng Y. The curability of advanced cancers with chemotherapy. *Ann.Acad.Med.Singapore* 1981; 10:364-367.
226. Anonymous. Platinum complexes in cancer chemotherapy. *Antibiot.Chemother.* 1978; 23:99-112.
227. Lippard SJ. New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Science* 1982; 218:1075-1082.
228. Glyn J. The discovery and early use of cortisone. *J.R.Soc.Med.* 1998; 91:513-517.

229. Labrie F. Endocrine therapy for prostate cancer. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 1991; 20:845-872.
230. Jordan VC. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res.Treat.* 1988; 11:197-209.
231. Lerner LJ, Jordan VC. Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990; 50:4177-4189.
232. Connors T. Anticancer Drug Development: The Way Forward. *Oncologist.* 1996; 1:180-181.
233. Curt GA. Cancer Drug Development: New Targets for Cancer Treatment. *Oncologist.* 1996; 1:II-III
234. Krul MR. The NCI-EORTC Symposia on New Drugs in Cancer Therapy: A Brief History. *Oncologist.* 1998; 3:269-270.
235. Lobbezoo MW, Krul MR, Pinedo HM. Discovery of new anti-cancer agents. *Forum (Genova.)* 1999; 9:47-53.
236. Monks A, Scudiero DA, Johnson GS, Paull KD, Sausville EA. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des.* 1997; 12:533-541.
237. Scudiero DA, Monks A, Sausville EA. Cell line designation change: multidrug-resistant cell line in the NCI anticancer screen [letter]. *J Natl.Cancer Inst.* 1998; 90:862
238. Wuonola MA, Palfreyman MG, Motohashi N, Kawase M, Gabay S, Gupta RR, et al. The primary in vitro anticancer activity of "half-mustard type" phenothiazines in NCI's revised anticancer screening paradigm. *Anticancer Res.* 1998; 18:337-348.
239. Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA, Rubinstein L, et al. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human

tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. J Natl.Cancer Inst. 1989; 81:1088-1092.

240. Bai RL, Paull KD, Herald CL, Malspeis L, Pettit GR, Hamel E. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. J Biol.Chem. 1991; 266:15882-15889.
241. Paull KD, Lin CM, Malspeis L, Hamel E. Identification of novel antimitotic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. Cancer Res. 1992; 52:3892-3900.
242. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJJ, Kohn KW, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. Science 1997; 275:343-349.
243. Schwartzmann G, Workman P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. Eur.J Cancer 1992; 29A:3-14.
244. Sikic BI. Anticancer drug discovery [editorial]. J Natl.Cancer Inst. 1991; 83:738-740.
245. Wall ME. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. Med.Res.Rev. 1998; 18:299-314.
246. Mattern MR, Hofmann GA, Polsky RM, Funk LR, McCabe FL, Johnson RK. In vitro and in vivo effects of clinically important camptothecin analogues on multidrug-resistant cells. Oncol.Res. 1993; 5:467-474.
247. Abrams JS, Moore TD, Friedman M. New chemotherapeutic agents for breast cancer. Cancer 1994; 74:1164-1176.
248. Yarchoan R. Therapy for Kaposi's sarcoma: recent advances and experimental approaches. J.Acquir.Immune.Defic.Syndr. 1999; 21 Suppl 1:S66-S73

249. Seynaeve CM, Kazanietz MG, Blumberg PM, Sausville EA, Worland PJ. Differential inhibition of protein kinase C isozymes by UCN-01, a staurosporine analogue. *Mol.Pharmacol.* 1994; 45:1207-1214.
250. Burger AM, Kaur G, Hollingshead M, Fischer RT, Nagashima K, Malspeis L, et al. Antiproliferative activity in vitro and in vivo of the spicamycin analogue KRN5500 with altered glycoprotein expression in vitro. *Clin Cancer Res.* 1997; 3:455-463.
251. Khayat D, Lokiec F, Bizzari JP, Weil M, Meeus L, Sellami M, et al. Phase I clinical study of the new amino acid-linked nitrosourea, S 10036, administered on a weekly schedule. *Cancer Res.* 1987; 47:6782-6785.
252. Armstrong JG, Dyke RW, Fouts PJ, Hawthorne JJ, Jansen CJJ, Peabody AM. Initial clinical experience with vinglycinatate sulfate, a molecular modification of vinblastine. *Cancer Res.* 1967; 27:221-227.
253. Bhushana RK, Collard MP, Dejonghe JP, Atassi G, Hannart JA, Trouet A. Vinblastin-23-oyl amino acid derivatives: chemistry, physicochemical data, toxicity, and antitumor activities against P388 and L1210 leukemias. *J Med Chem.* 1985; 28:1079-1088.
254. Iqbal Z, Ochs S. Uptake of Vinca alkaloids into mammalian nerve and its subcellular components. *J Neurochem.* 1980; 34:59-68.
255. Lavielle G, Hautefaye P, Schaeffer C, Boutin JA, Cudennec CA, Pierre A. New alpha-amino phosphonic acid derivatives of vinblastine: chemistry and antitumor activity. *J Med Chem.* 1991; 34:1998-2003.
256. Pierre A, Lavielle G, Hautefaye P, Seurre G, Leonce S, Saint-Dizier D, et al. Pharmacological properties of a new alpha-aminophosphonic acid derivative of vinblastine. *Anticancer Res.* 1990; 10:139-144.
257. Zouboulis C, Garbe C, Orfanos CE. [Growth inhibition of melanoma cells by interferons in vitro. Similar antiproliferative effects of 100-1000 times lower concentrations of nIFN-beta in comparison with rIFN-alpha-2a] Wachstumshemmung von Melanomzellen durch Interferone in vitro. *Gleiche*

antiproliferative Effekte von 100-1,000fach niedrigeren Konzentrationen rIFN-beta im Vergleich zu rIFN-alpha-2a. *Hautarzt*. 1989; 40:65-69.

258. Zouboulis CC, Schroder K, Garbe C, Krasagakis K, Kruger S, Orfanos CE. Cytostatic and cytotoxic effects of recombinant tumor necrosis factor- alpha on sensitive human melanoma cells in vitro may result in selection of cells with enhanced markers of malignancy. *J Invest.Dermatol* 1990; 95:223S-230S.
259. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol.Methods* 1983; 65:55-63.
260. Slater TF, Sawyer B, Strauli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim.Biophys.Acta* 1963; 77:383
261. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988; 48:589-601.
262. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br.J Cancer* 1987; 56:279-285.
263. Berger DP, Henss H, Winterhalter BR, Fiebig HH. The clonogenic assay with human tumor xenografts: evaluation, predictive value and application for drug screening. *Ann.Oncol*. 1990; 1:333-341.
264. Fricker SP, Buckley RG. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res*. 1996; 16:3755-3760.
265. Ludwig R, Alberts DS, Miller TP, Salmon SE. Evaluation of anticancer drug schedule dependency using an in vitro human tumor clonogenic assay. *Cancer Chemother.Pharmacol*. 1984; 12:135-141.

266. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48:4827-4833.
267. Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl.Cancer Inst.* 1990; 82:1113-1118.
268. Gupta V, Krishan A, Zubrod CG. Correlation of in vitro clonogenic assay data with in vivo growth delays and cell cycle changes of a human melanoma xenograft. *Cancer Res.* 1983; 43:2560-2564.
269. Hill BT. Use of continuous human tumor cells to evaluate drugs by clonogenic assay. In: Denby P, Hill BT, editors. *Human tumour drug sensitivity testing in vitro: Techniques & clinical applications.* London: Academic Press, 1983:
270. Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur.J Cancer* 1993; 29A:395-399.
271. Brown JM. NCI's anticancer drug screening program may not be selecting for clinically active compounds. *Oncol.Res.* 1997; 9:213-215.
272. Wilson AP, Ford CH, Newman CE, Howell A. A comparison of three assays used for the in vitro chemosensitivity testing of human tumours. *Br.J Cancer* 1984; 49:57-63.
273. Pierre A, Perez V, Leonce S, Boutin JA, Saint-Dizier D, Hautefaye P, et al. Relationship between the cellular accumulation and the cytotoxicity of S12363, a new Vinca alkaloid derivative. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1992; 29:367-374.

274. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 1994; 54:357-361.
275. Slapak CA, Fracasso PM, Martell RL, Toppmeyer DL, Lecerf JM, Levy SB. Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in vincristine but not doxorubicin-selected multidrug-resistant murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 1994; 54:5607-5613.
276. Guerry D, Schuchter LM. Disseminated melanoma--is there a new standard therapy? [editorial; comment]. *N.Engl.J Med* 1992; 327:560-561.
277. Berger W, Elbling L, Minai-Pour M, Vetterlein M, Pirker R, Kokoschka EM, et al. Intrinsic MDR-1 gene and P-glycoprotein expression in human melanoma cell lines. *Int.J.Cancer* 1994; 59:717-723.
278. Levine EA, Holzmayer TA, Robinson IB, Das GT. MDR-1 expression in metastatic malignant melanoma. *J.Surg.Res.* 1993; 54:621-624.
279. Ramachandran C, Yuan ZK, Huang XL, Krishan A. Doxorubicin resistance in human melanoma cells: MDR-1 and glutathione S- transferase pi gene expression. *Biochem.Pharmacol.* 1993; 45:743-751.
280. Schadendorf D, Makki A, Stahr C, van DA, Wanner R, Scheffer GL, et al. Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. *Am.J.Pathol.* 1995; 147:1545-1552.
281. Berger W, Hauptmann E, Elbling L, Vetterlein M, Kokoschka EM, Micksche M. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells. *Int.J.Cancer* 1997; 71:108-115.