



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**Διϋδρυσματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
**«Μοριακή - Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία»**

**« ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΤΑΤΟΜΗ (προφίλ) ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**  
**ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΕΣΤΙΑ »**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΤΣΟΥΚΑΛΑ ΜΑΡΙΑ-ANNA**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2021**



**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**  
**Σχολή Επιστημών Υγείας - Τμήμα Ιατρικής**  
**Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής**

**Διϋδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
**«Μοριακή - Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία»**

**Τμήματα Ιατρικής, Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Χημείας**  
**Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας**

**« ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΤΑΤΟΜΗ (προφίλ) ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**  
**ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗ ΕΣΤΙΑ »**

**ΤΣΟΥΚΑΛΑ ΜΑΡΙΑ-ANNA**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:**

**Μπατιστάτου Άννα**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής/Συνεπιβλέποντες:**

**Φριλίγγος Ευστάθιος**, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Τμήματος Ιατρικής & Διευθυντής του Δ.Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία & Βιοτεχνολογία», Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Παπαμαρκάκη Θωμαΐς**, Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Τμήματος Ιατρικής & Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Δ.Δ.Π.Μ.Σ. «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία & Βιοτεχνολογία», Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Γούσια Άννα**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ιωάννινα, 2021**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου και του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Με την ολοκλήρωσή της, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου **Κα Άννα Μπατιστάτου**, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την πολύτιμη καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Απέκτησα νέες γνώσεις δίπλα της και θα συνεχίζω να διδάσκομαι από εκείνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Δ.Δ.Π.Μ.Σ., Κον **Ευστάθιο Φριλίγγο**, για όλα όσα διδάχθηκα από εκείνον κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών για τις επικοδομητικές συμβουλές και τη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά, την Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, και Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Δ.Δ.Π.Μ.Σ., **Κα Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη**, για όλα όσα διδάχθηκα από εκείνη κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και για την τιμητική για εμένα παρουσία της στην Εξεταστική Επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, **Κα Άννα Γούσια**, για την τιμητική για εμένα παρουσία της στην Εξεταστική Επιτροπή και την πολύτιμη στήριξή της σε όλα τα έως τώρα βήματα μου κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών αλλά και προπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ θερμά, την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, **Κα Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη**, για την πολύτιμη στήριξή της, τις συμβουλές της και για την τιμητική για εμένα παρουσία της στην Εξεταστική Επιτροπή αξιολόγησής της.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό, εργαστηριακό και μη, του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής που με μεγάλη προθυμία μου συμπαραστάθηκαν σε ό,τι χρειάστηκα κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω τη Βιολόγο **Κα Κωνσταντίνα Γκρέπη** καθώς και το μέλος Ε.Τ.Ε.Π. **Κα Αντιγόνη Χριστοδούλου**, για τη σημαντική συμβολή τους στη διενέργεια του πειραματικού μέρους της εργασίας και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ευχαριστώ επίσης, την τεχνολόγο **Κα Κορομηλιά Κωνσταντίνα**, για την προθυμία που επέδειξε να επεξεργασθεί τεχνικά το υπό μελέτη υλικό και να παρασκευάσει τις ιστολογικές τομές. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη γιατρό **Κα Ζωή Ευαγγέλου**, για την πολύτιμη βοήθειά της.

Αφήνω για το τέλος, τους πιο σημαντικούς ανθρώπους για εμένα, τους γονείς μου Νικόλαο και Ευθυμία, που χωρίς την πολύτιμη και διαρκή συμπαράστασή τους, τη στήριξη και υπομονή τους δε θα πετύχαινα τους στόχους μου.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	1
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	3
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	6
1.1 Στοιχεία Ανατομίας, Ιστολογίας & Φυσιολογίας του Δέρματος	6
1.1.1 Το μελανοκύτταρο	9
1.2 Παθήσεις του Δέρματος	13
1.2.1 Φλεγμονώδεις Παθήσεις	13
1.2.2 Νεοπλάσματα του Δέρματος	13
1.3 Νεοπλάσματα μελανοκυττάρων	14
1.3.1 Κυτταρικοί (μελανοκυτταρικοί) σπίλοι	14
1.3.2 Κακήθες Μελάνωμα	15
1.4 Κακήθες Μελάνωμα-Γενικά Χαρακτηριστικά	16
1.4.1 Ορισμός	16
1.4.2 Επίπτωση και θνησιμότητα	16
1.4.3 Ηλικία & φύλο	17
1.4.4 Εντόπιση	17
1.4.5 Αιτιοπαθογένεια	17
1.4.6 Γεωγραφική μεταβολή	18
1.4.7 Κλινική συμπεριφορά – Διάγνωση	18
1.4.8 Ιστολογικοί Τύποι	19
1.4.9 Μικροσκοπική εικόνα	23
1.4.10 Εξέλιξη, Σταδιοποίηση, Προγνωστικοί Παράγοντες	23
1.4.11 Το σύστημα σταδιοποίησης TNM	27
1.4.12 Εργαστηριακές δοκιμές/Οι εργαστηριακές παράμετροι	30
1.5 Μοριακή ταξινόμηση του μελανώματος	33
1.6 Μοριακές-Γενετικές Διαταραχές στο μελάνωμα	34
1.6.1 Οδός <i>RAS/RAF/MAPK</i>	34
1.6.2 Οδός <i>PI3K/PTEN/AKT/mTOR</i>	39

1.6.3	Οδός <i>P53/MDM2/p14ARF</i>	41
1.6.4	Οδός <i>p16INK4a/CDK4/RB1</i>	42
1.6.5	Άλλες γενετικές διαταραχές	43
1.6.6	Χρωμοσωμικές μεταβολές	49
1.7	Θεραπεία – Πρόγνωση	49
1.8	Ετερογένεια στη μοριακή κατατομή (προφίλ) του μελανώματος	59
1.9	Επιγενετικές τροποποιήσεις και εξέλιξη του μελανώματος	62
1.10	Ανάγκη προσδιορισμού βιοδεικτών	64
1.11	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ</b>	67
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	68
2.1	Συλλογή ιστικών δειγμάτων	68
2.2	Κλινικά Χαρακτηριστικά των ασθενών	68
2.3	Εργαστηριακός εξοπλισμός	73
2.4	Ανοσοϊστοχημεία (IHC)	76
2.4.1	Μέθοδος	76
2.4.2	Πειραματικό μέρος	79
2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)	84
2.5.1	Μέθοδος	84
	Μοριακή ανάλυση ( <i>Cobas 4800 BRAF 600E Mutation Test</i> )	
2.5.2	Πειραματικό μέρος	85
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	90
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	115
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	122

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

*AJCC*, (American Joint Committee on Cancer): Αμερικανική Μικτή Επιτροπή για τον Καρκίνο

*BRAF*, (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase): πρωτο-ογκογονίδιο, κινάση σερίνης/θρεονίνης

*CDK*, (cyclin-dependent kinase): κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση

*ERK*, (extracellular signal-regulated kinases): εξωκυτταρικές σήματο-ρυθμιζόμενες κινάσες

*IDH*, (isocitrate dehydrogenase): ισοκιτρική αφυδρογονάση

*IHC*, (Immunohistochemistry): ανοσοϊστοχημεία

*MAPK*, (mitogen-activated protein kinase): κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

*MGMT*, (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase): O<sup>6</sup>-μεθυλογουανίνο- DNA μεθυλοτρανσφεράση

*mTOR*, (mammalian target of rapamycin;serine/threonine kinase): στόχος της ραπαμυκίνης

*PI3K/AKT*, (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B): 3-κινάση της φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης/ πρωτεϊνική κινάση B

*PTEN*, (phosphatase and tensin homolog): φωσφατάση και ομόλογο τενσίνης

*RB*, (retinoblastoma): ρετινοβλάστωμα

*RTK*, (receptor tyrosine kinase): υποδοχέας τυροσινικής κινάσης

*SLNB*, (Sentinel lymph node biopsy): βιοψία λεμφαδένα-φρουρού

*TCGA*, (The Cancer Genome Atlas): Άτλας Γονιδιωματικής του Καρκίνου

*TERT*, (telomerase reverse transcriptase): τελομεράση (με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης)

*WHO*, (World Health Organization): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μελάνωμα είναι ένα κακόηθες νεόπλασμα των μελανοκυττάρων, και συνιστά την πιο επιθετική μορφή καρκίνου του δέρματος. Οι βασικοί άξονες θεραπευτικής προσέγγισης για το μεταστατικό μελάνωμα είναι η ανοσοθεραπεία και η στοχεύουσα θεραπεία. Η πιο σημαντική για θεραπευτικούς σκοπούς μοριακή διαταραχή είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF*. Από την βιβλιογραφία διαφαίνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει μοριακή ετερογένεια, τόσο μεταξύ διαφορετικών περιοχών της πρωτοπαθούς εστίας, όσο μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των μεταστάσεων σε λεμφαδένες ή/και συμπαγή όργανα, είτε αυτές είναι σύγχρονες είτε μετάχρονες. Για την διερεύνηση αυτής της ετερογένειας χρησιμοποιήθηκαν 49 ιστικά υλικά μελανώματος (πρωτοπαθείς ή/και μεταστατικές εστίες) από 22 ασθενείς. Διενεργήθηκε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για τους δείκτες Melan-A, HMB45 και S100 σε όλους τους ασθενείς και επίσης τόσο μοριακός (Cobas Z 4800 Real Time PCR) όσο και ανοσοϊστοχημικός έλεγχος του γονιδίου *BRAF* στους 14 εκ των 22 ασθενών. Μελετήθηκε ιστικό υλικό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης (FFPE) από ασθενείς με μελάνωμα δέρματος και λεμφαδενικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις, από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του ΠΓΝΙ. Εκ των 14 διαφορετικών περιπτώσεων μελανώματος, σε δύο ασθενείς ανευρέθηκε ασύμφωνο αποτέλεσμα μεταξύ των δύο μεθόδων σχετικά με την παρουσία μετάλλαξης *BRAF*. Επιπλέον, ανευρέθηκε μοριακή ετερογένεια μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας ή/και των μεταστάσεων σε τέσσερις από τις 14 συνολικά περιπτώσεις. Δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση στον ανοσοφαινότυπο μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας. Συμπερασματικά, είναι δυνατόν να υπάρχει ετερογένεια στην μοριακή κατατομή των μελανωμάτων, που μπορεί να επηρεάσει τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με δερματικό μελάνωμα. Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια ευαίσθητη και ειδική μέθοδο για την ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF V600E*.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Μελάνωμα, Πρωτοπαθής/Δευτεροπαθής Εστία, Μοριακό προφίλ-κατατομή, Ετερογένεια, Ανοσοϊστοχημεία, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, Μοριακοί Δείκτες, Μετάλλαξη, *BRAF*, Θεραπεία, Πρόγνωση



## **ABSTRACT**

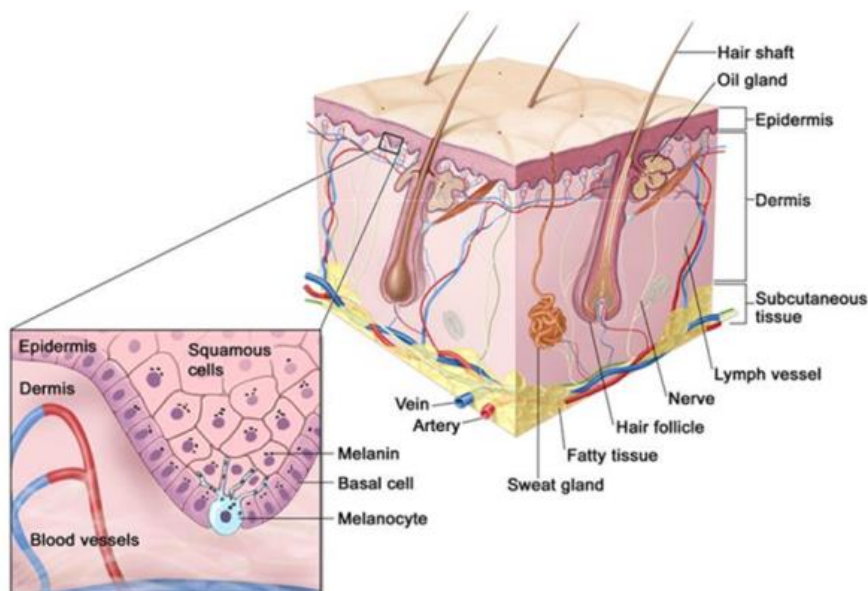
Melanoma is a malignant neoplasm of melanocytes and is the most aggressive form of skin cancer. The mainstays of the therapeutic approach for metastatic melanoma are immunotherapy and targeted therapy. The most important for therapeutic purposes molecular disorder are mutations in the BRAF gene. The literature shows that in some cases there is molecular heterogeneity, both between different areas of the primary focus and between the primary focus and metastases to lymph nodes and / or solid organs, whether they are synchronous or metachronous. 49 tissue melanoma materials (primary and / or metastatic foci) from 22 patients were used to investigate this heterogeneity. Immunohistochemistry was performed for Melan-A, HMB45 and S100 markers in all patients. Also, both molecular (Cobas Z 4800 Real Time PCR) and immunohistochemical testing of the BRAF gene in 14 of the 22 patients. Tissue material fixed in formalin and encapsulated in paraffin cubes (FFPE) was studied from patients with skin melanoma and lymph node or distant metastases, from the archive of the PNI Pathological Laboratory. Of the 14 different cases of melanoma, in two patients a discrepancy was found between the two methods regarding the presence of a BRAF mutation. In addition, molecular heterogeneity was found between the primary focus and / or metastases in four of the 14 cases. There was no significant differentiation in the immunophenotype between primary and secondary foci. In conclusion, it is possible that there is heterogeneity in the molecular profile of melanoma, which may affect the treatment of patients with cutaneous melanoma. Immunohistochemistry is a sensitive and specific method for detecting the BRAF V600E mutation.

**Keywords:** Melanoma; Primary/Secondary; Molecular Profile, Heterogeneity, Immunohistochemistry; Polymerase Chain Reaction; Molecular Markers; Mutation; Gene; BRAF; Treatment; Prognosis

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Στοιχεία Ανατομίας, Ιστολογίας & Φυσιολογίας του Δέρματος

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο ενιαίο όργανο του σώματος (**Εικόνα 1.1**) - αποτελώντας τυπικά το 15-20% του συνολικού σωματικού βάρους - και στους ενήλικες, κατέχει μια επιφάνεια 1,5-2 m<sup>2</sup> που βρίσκεται σε σχέση με το εξωτερικό περιβάλλον. Το δέρμα αποτελείται από την επιδερμίδα, μια επιθηλιακή μοίρα εξωδερμικής προέλευσης και τη δερμίδα ή χόριο, μια μοίρα συνδετικού ιστού μεσοδερμικής προέλευσης. Η συμβολή μεταξύ του χορίου και της επιδερμίδας είναι ακανόνιστη, με προσεκβολές του χορίου που ονομάζονται θηλές, οι οποίες αλληλοεισέχουν με καταδύσεις της επιδερμίδας, τις επιδερμικές ακρολοφίες, για να ενισχύσουν την προσκόλληση των δύο στιβάδων. Τα εξαρτήματα του δέρματος περιλαμβάνουν τους τριχοθυλάκους, τους σμηγματογόνους και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Κάτω από το χόριο βρίσκεται ο υποδόριος ιστός ή υποδερμίδα, μια στιβάδα χαλαρού συνδετικού ιστού που συνήθως περιέχει αθροίσεις λιποκυττάρων. Ο υποδόριος ιστός συνδέει χαλαρά το δέρμα στους υποκείμενους ιστούς και αντιστοιχεί στην επιπολής περιτονία της μακροσκοπικής ανατομίας.



**Εικόνα 1.1.** Σχηματική παράσταση του φυσιολογικού δέρματος (Ανατύπωση από National Cancer Institute “Terese winslow”, 2008).

Το πάχος του δέρματος ποικίλλει από άτομο σε άτομο και για το ίδιο το άτομο ανάλογα με τη μοίρα του σώματος του από την οποία προέρχεται. Είναι λεπτό στα βλέφαρα, τα αυτιά, την πύξη και παχύ στον αυχένα, στις παλάμες, τα πέλματα, τους γλουτούς και το εφήβαιο. Επίσης, ποικίλλει ανάλογα με το φύλο και την ηλικία. Είναι λεπτότερο στις γυναίκες, τα παιδιά και τους γέροντες και παχύτερο στους ενήλικες άνδρες. Το χρώμα του δέρματος οφείλεται στη φυσιολογική χρωστική, τη μελανίνη, στο πάχος της κερατίνης στιβάδας της επιδερμίδας και στην αγγειοβρίθεια και την ανατομική θέση των επιφανειακών αγγείων. Το χρώμα του δέρματος διαφέρει από φυλή σε φυλή ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, το επάγγελμα, τον τρόπο διαβίωσης και ακόμη μπορεί να διαφέρει και στο ίδιο το άτομο ανάλογα με τη θέση όπως π.χ. η θηλαία άλω ή και τα γεννητικά όργανα (Mescher, 2015).

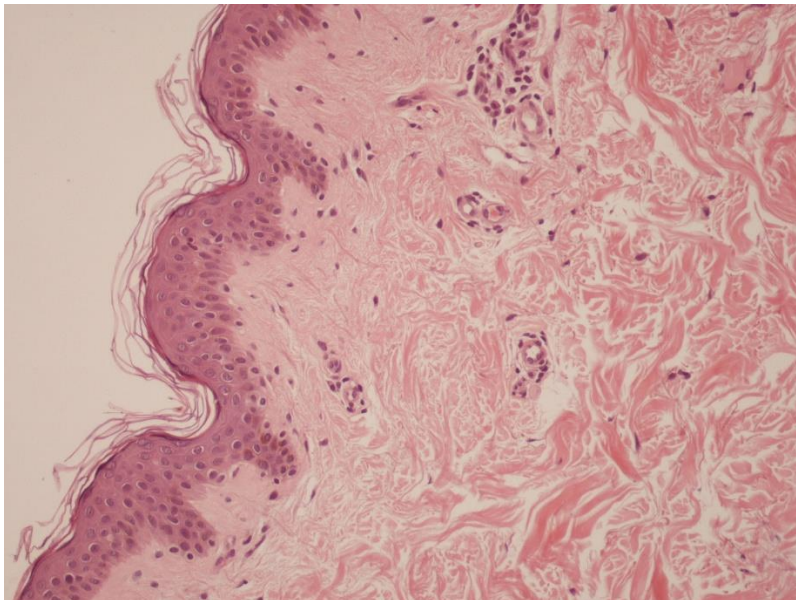
Το δέρμα δεν αποτελεί απλό περίβλημα του σώματος αλλά αποτελεί πολύτιμο όργανο επιτελώντας πολλές φυσιολογικές λειτουργίες:

- ✓ **Προστασία:** Το δέρμα παρέχει μια φυσική άμυνα του οργανισμού έναντι θερμικών και μηχανικών διαδικασιών (τριβή), έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, χημικών προσβολών και της ηλιακής ακτινοβολίας.
- ✓ **Απεκκριτική** (ιδρώτας και σμήγμα) και **απορροφητική λειτουργία**
- ✓ **Αίσθηση:** Πολλοί τύποι αισθητηρίων υποδοχέων επιτρέπουν στο δέρμα να ελέγχει συνεχώς το περιβάλλον και διάφοροι μηχανικοί υποδοχείς του δέρματος βοηθούν στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων του σώματος με τα φυσικά αντικείμενα.
- ✓ **Κερατινοποίηση:** Προστατεύει από το εξωτερικό περιβάλλον
- ✓ **Θερμορρύθμιση:** Μια σταθερή θερμοκρασία σώματος φυσιολογικά διατηρείται εύκολα, λόγω των μονωτικών συστατικών του δέρματος και των μηχανισμών του για την επιταχυνόμενη απώλεια θερμότητας (ιδρώτας και επιπολής μικροκυκλοφορία).
- ✓ **Μεταβολικές λειτουργίες:** Τα κύτταρα του δέρματος συνθέτουν τη βιταμίνη D3. Η περίσσεια των ηλεκτρολυτών μπορεί να απομακρυνθεί με τον ιδρώτα και η υποδόρια στιβάδα αποθηκεύει ένα σημαντικό ποσό ενέργειας υπό μορφή λίπους.
- ✓ **Μελανογένεση:** Προστατεύει από την ηλιακή ακτινοβολία

Η επιδερμίδα αποτελείται κυρίως από πολύστιβο πλακώδες κερατινοποιούμενο επιθήλιο, αποτελούμενο από κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα ή πλακώδη κύτταρα. Τα τελευταία, υφίστανται μια τελική διαδικασία διαφοροποίησης που ονομάζεται κερατινοποίηση με μια σειρά βημάτων που

αποτυπώνεται ευδιάκριτα στις στιβάδες της επιδερμίδας. Η επιδερμίδα αποτελείται από τέσσερις στιβάδες κερατινοκυττάρων, ποικίλου πάχους (**Εικόνα 1.2**).

Η βασική στιβάδα είναι μια σειρά από βασεόφιλα, μιτωτικά ενεργά κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα που στηρίζονται στη βασική μεμβράνη στην χοριοεπιδερμική συμβολή. Η βασική στιβάδα περιέχει μαζί με το βαθύτερο τμήμα της επόμενης στιβάδας, προγονικά κύτταρα για όλες τις επιδερμικές στιβάδες. Η ακανθωτή στιβάδα, είναι φυσιολογικά η παχύτερη στιβάδα, ειδικά στις επιδερμικές ακρολοφίες, και αποτελείται γενικά από πολυεδρικά κύτταρα με κεντρικά τοποθετημένο πυρήνα, εμφανή πυρηνίσκο και κυτταρόπλασμα, στο οποίο συνθέτουν ενεργά τις κερατίνες. Η κοκκιώδης στιβάδα αποτελείται από 3-5 σειρές πεπλατυσμένων κυττάρων, που τώρα υφίστανται την τελική διαδικασία διαφοροποίησης, την κερατινοποίηση. Το κυτταρόπλασμά τους είναι γεμάτο από έντονα βασεόφιλες μάζες που ονομάζονται κοκκία κερατοϋαλίνης. Επιπλέον, χαρακτηριστικό γνώρισμα στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας είναι τα μεμβρανώδη πεταλιώδη κοκκία. Η διαυγής στιβάδα που βρίσκεται μόνο στο παχύ δέρμα, αποτελείται από ένα λεπτό, διαφανές στρώμα πεπλατυσμένων ηωσινόφιλων κερατινοκυττάρων που διατηρούν τη συνοχή τους, μέσω δεσμοσωμάτων. Η επιφανειακή κερατίνη στιβάδα αποτελείται από 15-20 σειρές από πλακώδη κερατινοποιημένα κύτταρα. Πρόκειται για τη στιβάδα που προστατεύει από την απώλεια ύδατος, την τριβή και τη μικροβιακή εισβολή και αποτελείται από τα επίπεδα, τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα ή φολίδες (Mescher, 2015).



**Εικόνα 1.2.** Ιστολογική εικόνα φυσιολογικού δέρματος. Χρώση Η/Ε Μεγέθυνση x 200. Παρουσία της βασικής στιβάδας των μελανοκυττάρων στο όριο επιδερμίδος και θηλώδους χορίου (φωτογραφικό υλικό από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΙ).

Επιπλέον, υπάρχουν τρεις ακόμα τύποι κυττάρων στην επιδερμίδα σε μικρότερη αναλογία: τα μελανοκύτταρα που παράγουν μελανίνη, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα Langerhans και τα αισθητικά επιθηλιακά κύτταρα ή κύτταρα Merkel. Τα κύτταρα Langerhans παρατηρούνται καλύτερα στην ακανθωτή στιβάδα και αντιπροσωπεύουν το 2-8% των επιδερμικών κυττάρων. Μαζί με τα περισσότερα διεσπαρμένα επιδερμικά λεμφοκύτταρα και άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στο χόριο, αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό της επίκτητης ανοσίας του δέρματος. Τα κύτταρα Merkel είναι ευαίσθητοι μηχανικοί υποδοχείς του δέρματος, απαραίτητοι για την ελαφρά αίσθηση της αφής. Αφθονούν στα άκρα των δακτύλων και στις βάσεις μερικών τριχοθυλακίων (Mescher, 2015).

### 1.1.1 Το μελανοκύτταρο

Τη 13<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, κατά προσέγγιση, κύτταρα προερχόμενα από τη νευρική ακρολοφία μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στη συμβολή της επιδερμίδας με το χόριο. Τα κύτταρα αυτά εξελίσσονται στα κεχρωσμένα μελανοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας (stratum basale) (**Εικόνα 1.3**) και σε μεσαίες στιβάδες στον οφθαλμό. Σπάνια, τέτοια κύτταρα έχουν ανευρεθεί επίσης στο εσωτερικό των αυτιών, στις μήνιγγες, στα οστά, και στην καρδιά. Ο αριθμός τους είναι σχετικά σταθερός στους ανθρώπους, περίπου 1000 με 2000 ανά τετραγωνικό χιλιοστό δέρματος και αποτελούν ποσοστό 5-10% των κυττάρων της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας (Cramer et al., 1991).

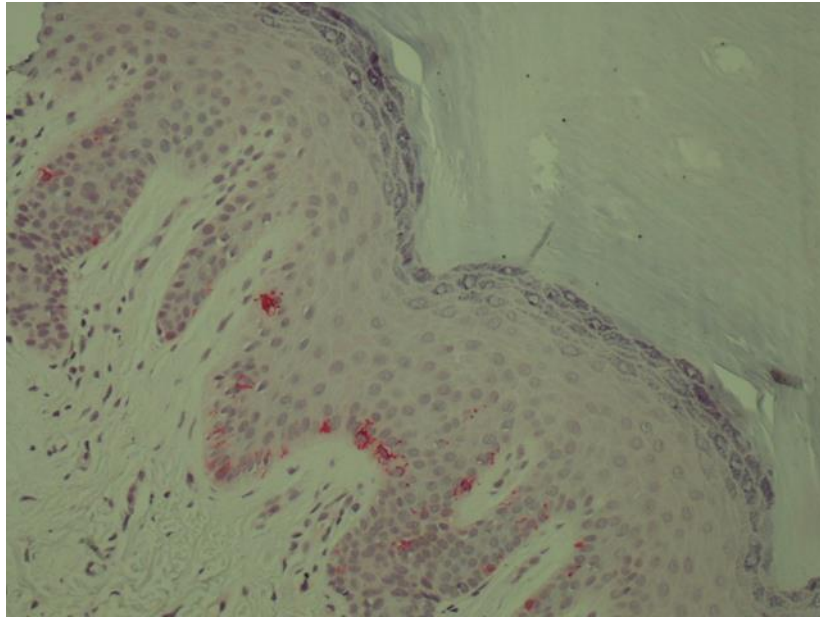
Τα μελανοκύτταρα έχουν αραιοχρωματικά, στρογγυλά κυτταρικά σώματα που συνδέονται με ημιδεσμοσώματα με το βασικό υμένα, αλλά στερούνται συνδέσεων με τα γειτονικά κερατινοκύτταρα. Αρκετές μακρές, ανώμαλες κυτταροπλασματικές αποφυάδες από κάθε μελανοκύτταρο διακλαδίζονται στην επιδερμίδα, διατρέχοντας μεταξύ των κυττάρων της βασικής και ακανθωτής στιβάδας και καταλήγοντας στις εγκοιλώσεις 5-10 κερατινοκυττάρων. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ένα μελανοκύτταρο έχει πολυάριθμα μικρά μιτοχόνδρια, μικρές δεξαμενές αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και μια καλά ανεπτυγμένη συσκευή Golgi (**Εικόνα 1.4**).

Τα μελανοκύτταρα παράγουν μια ουσία, τη μελανίνη, που είναι η χρωστική που ευθύνεται για το χρώμα του δέρματος, των ματιών και των μαλλιών. Η μελανίνη μπορεί να ταξινομηθεί σε τουλάχιστον τρεις βασικούς τύπους, την ευμελανίνη, τη φαιομελανίνη και νευρομελανίνη. Η λειτουργία της νευρομελανίνης, η οποία βρίσκεται στον εγκέφαλο, παραμένει άγνωστη. Η ευμελανίνη, είναι

διαδεδομένη σε άτομα με μαύρα και καστανά μαλλιά, ενώ η φαιομελανίνη (κίτρινη-κοκκινωπή), σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα, γαλάζια μάτια, κόκκινα μαλλιά και με φακίδες. Και οι δύο μελανίνες έχουν μια κοινή οργάνωση επαναλαμβανόμενων μονάδων που συνδέονται με δεσμούς άνθρακα. Ωστόσο, οι χρωστικές διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά τις χημικές, δομικές και φυσικές ιδιότητες (Nasti and Timares, 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση της ευμελανίνης απαιτεί υψηλότερη κατανάλωση  $O_2$  από τη φαιομελανίνη (**Εικόνα 1.5**).

Το μελανοκύτταρο παράγει τη μελανίνη μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μελανογένεση. Η μελανογένεση συμβαίνει συνεχώς σε κάποιο βαθμό και αυξάνεται με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η λειτουργία της μελανίνης είναι να προστατεύει τα κύτταρα της επιδερμίδας και του χορίου από βλάβες στο DNA τους που προκαλούνται από την έκθεση στην ακτινοβολία UV, μέσω απορρόφησής της. Η μελανογένεση παράγει μίγματα ευμελανίνης και φαιομελανίνης σε διαφορετικές αναλογίες. Η αναλογία καθορίζεται από τη δραστηριότητα της τυροσινάσης και τις συγκεντρώσεις υποστρώματος της τυροσίνης και της κυστεΐνης.

Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο βήμα στη σύνθεση μελανίνης καταλύεται από την τυροσινάση, ένα διαμεμβρανικό ένζυμο παραγόμενο στις συσκευές Golgi. Η δραστηριότητα της τυροσινάσης μετατρέπει την τυροσίνη πρώτα στην 3,4 διϋδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA), η οποία περαιτέρω μετασχηματίζεται και πολυμερίζεται στις διαφορετικές μορφές μελανίνης. Η χρωστική ουσία μελανίνη συνδέεται με μια ουσία από δομικές πρωτεΐνες και συσσωρεύεται σε κυστίδια έως ότου αυτά σχηματίσουν τα ώριμα ελλειψοειδούς σχήματος κοκκία, που λέγονται μελανοσώματα. Τα τελευταία, μεταφέρονται στα άκρα των κυτταροπλασματικών αποφυάδων του μελανοκυττάρου και από εκεί στα γειτονικά κερατινοκύτταρα της βασικής και ακανθωτής στιβάδας. Στα κερατινοκύτταρα, τα κοκκία μελανίνης μεταφέρονται σε μια περιοχή κοντά στον πυρήνα, όπου συσσωρεύονται ως ένα υπερπυρηνικό κάλυμμα που προστατεύει το DNA από τις επιβλαβείς επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας (Mescher, 2015).

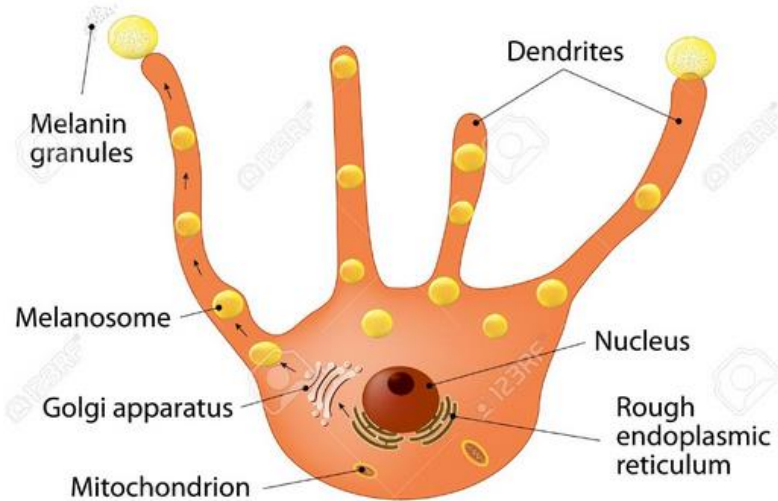


**Εικόνα 1.3.** Ιστολογική εικόνα δέρματος. Σχέση κερατινοκυττάρου-μελανοκυττάρου σε μεγέθυνση, Χρώση ανοσοϊστοχημείας για Melan A (X 400) (φωτογραφικό υλικό από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΙ).

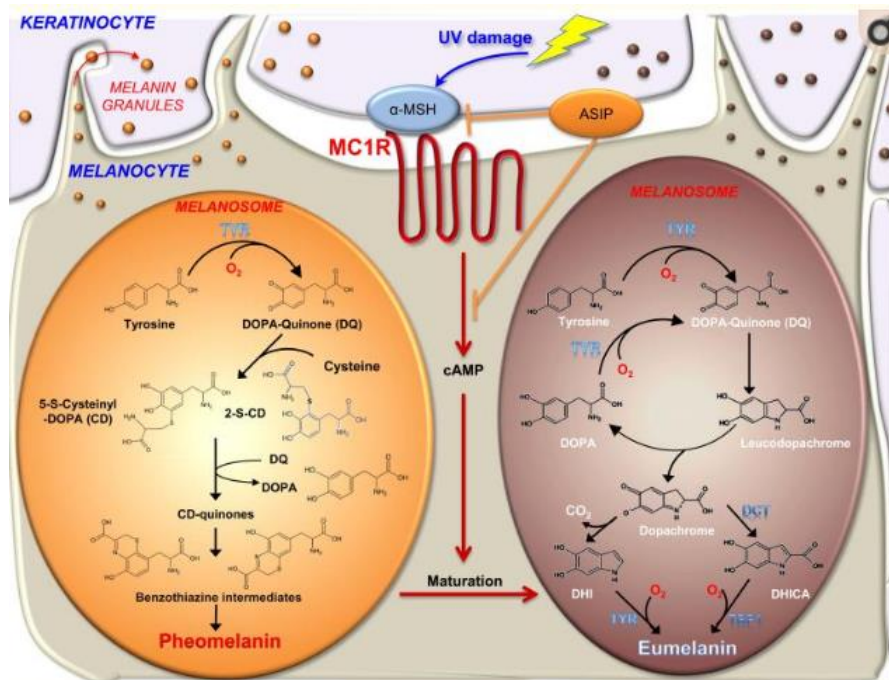
Συνεπώς, τα κερατινοκύτταρα είναι η αποθήκη μελανίνης και περιέχουν περισσότερη χρωστική ουσία από τα κύτταρα που την παράγουν. Ένα μελανοκύτταρο μαζί με τα κερατινοκύτταρα στα οποία μεταφέρει μελανοσώματα αποτελεί μια μονάδα επιδερμικής μελανίνης. Η πυκνότητα αυτών των μονάδων είναι παρόμοια σε όλα τα άτομα. Ωστόσο, τα μελανοκύτταρα των ανθρώπων κοντά στον Ισημερινό παράγουν κοκκία μελανίνης ταχύτερα και τα συσσωρεύουν στα κερατινοκύτταρα σε μεγαλύτερη ποσότητα (Mescher, 2015).

Η αλλαγή της απόχρωσης του δέρματος σε πιο σκούρη, ή το μαύρισμα, μετά από έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία οφείλεται σε μια φυσικοχημική αντίδραση που σκουραίνει και αυξάνει την προϋπάρχουσα μελανίνη. Συγχρόνως, παρακρινείς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κερατινοκύτταρα, δοκιμάζοντας την αυξανόμενη UV ακτινοβολία επιταχύνουν τη σύνθεση μελανίνης και τη συσσώρευσή της στην επιδερμίδα (Mescher, 2015).





**Εικόνα 1.4.** Εικόνα μελανοκυττάρου σε Η/Μ. Απεικονίζεται έγχρωμο για να γίνουν διακριτά τα συστατικά του (Ανατύπωση από Costin & Menon, 2018).



**Εικόνα 1.5.** Ευμελανίνη και Φαιομελανίνη - βιοσυνθετικό μονοπάτι (Ανατύπωση από Nasti & Timares, 2015).



## 1.2 Παθήσεις Δέρματος

Το δέρμα μπορεί να παρουσιάσει πολύ μεγάλο αριθμό νοσημάτων. Αυτά μπορεί να είναι πρωτοπαθή, δευτεροπαθή (συστηματικά), κληρονομικά ή μεταβολικά. Επίσης, μεγάλη ποικιλία και αφθονία παρουσιάζουν και τα νεοπλάσματα του δέρματος.

### 1.2.1 Φλεγμονώδεις Παθήσεις

Από τις φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος αξίζει να αναφερθούν τα ιογενή νοσήματα (μυρμηγκιές, έρπητας ζωστήρας), τα λοιμώδη βακτηριακά και άλλα νοσήματα (μολυσματικό κηρίο, φυματίωση, λέπρα), τα σπειροχαιτικά νοσήματα (σύφιλη, νόσος Lyme), οι μυκητιάσεις του δέρματος (επιπολής και βαθύτερες) και άλλες κοκκιοματώδεις νόσοι (σαρκοείδωση και αντίδραση ξένου σώματος) καθώς και φλεγμονές άγνωστης αιτιολογίας όπως η ψωρίαση και ο ομαλός λειχήνας.

Διάφορα φάρμακα κινητοποιούν παθολογικούς ανοσομηχανισμούς και προκαλούν ποικίλες εκδηλώσεις από διάφορους ιστούς μεταξύ των οποίων και το δέρμα (πχ φαρμακευτική δερματίτιδα). Τέλος, οι πέμφυγες και τα πεμφυγοειδή αποτελούν ανοσολογικής-αυτοάνοσης αρχής δερματοπάθειες.

### 1.2.2 Νεοπλάσματα του Δέρματος

Στο δέρμα αναπτύσσεται μεγάλη ποικιλία νεοπλασμάτων, τα οποία δυνατόν να προέρχονται από: 1) τα κύτταρα της επιδερμίδας, 2) τα επιθηλιακά κύτταρα των εξαρτημάτων του δέρματος, 3) τα μελανοκύτταρα, 4) τα νευροενδοκρινικά κύτταρα, 5) τα μεσεγχυματικά κύτταρα του χορίου και του υποδορίου ιστού. Από τα νεοπλάσματα αυτά, συχνότερα απαντώνται στην κλινική πράξη τα καρκινώματα της επιδερμίδας και τα μελανώματα. Από τα νεοπλάσματα της επιδερμίδας αξίζει να σημειωθεί η ακτινική κεράτωση. Ακόμη, η νόσος Bowen (πλακώδες καρκίνωμα *in situ*) και το πλακώδες (ακανθοκυτταρικό) καρκίνωμα (παλαιότερα γνωστό και ως μαλπιγιακό καρκίνωμα).

Η αιτιοπαθογένεια του πλακώδους καρκινώματος του δέρματος σχετίζεται: 1) Κατά κύριο λόγο με την ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία, γι' αυτό και εντοπίζεται συχνότερα στα ακάλυπτα μέρη του σώματος. Γενικά, είναι συχνότερο στους λευκούς και αγροτικούς πληθυσμούς. Ο πιθανότερος παθογενετικός μηχανισμός είναι η πρόκληση μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53* από την υπεριώδη ακτινοβολία. 2) Με κληρονομικότητα. Η μελαγχρωματική ξηροδερμία είναι μια κληρονομική διαταραχή επιδιόρθωσης του DNA μετά από βλάβες που προκαλούνται από υπεριώδη

ακτινοβολία. Οι ασθενείς αυτοί μπορούν να εμφανίσουν, εκτός από πλακώδες, και βασικοκυτταρικό καρκίνωμα και μελάνωμα. 3) Με ιογενείς φλεγμονές από τους ιούς HPV και HIV. 4) Με χρόνιους ερεθισμούς 5) Με χρόνιους χημικούς ερεθισμούς, όπως μετά από έκθεση σε αρσενικό, πίσσες και ορυκτέλαια. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, του οποίου η αιτιοπαθογένεια είναι σχεδόν ίδια με αυτήν του πλακώδους αλλά πρόκειται για νεόπλασμα με άριστη πρόγνωση, καθώς σχεδόν ποτέ δε δίνει μεταστάσεις. Τέλος, το καρκίνωμα από κύτταρα Merkel, ένα πολύ επιθετικό νεόπλασμα, σπάνιο, που προσβάλλει ενήλικες και ηλικιωμένα άτομα με εντόπιση τοπικά στο πρόσωπο και στα άκρα.

### 1.3 Νεοπλάσματα μελανοκυττάρων

#### 1.3.1 Κυτταρικοί (μελανοκυτταρικοί) σπίλοι

Με τον όρο κυτταρικός σπίλος νοείται μια ομάδα καλοήθων νεοπλασμάτων των μελανοκυττάρων. Οι κοινοί επίκτητοι σπίλοι εμφανίζονται κλινικά συνήθως μετά την πρώτη δεκαετία της ζωής, ενώ σχεδόν όλοι παρουσιάζονται έως το 20<sup>ο</sup> έτος. Υπολογίζεται ότι κάθε Καυκάσιος έχει στο σώμα του κατά μέσο όρο 20-30 σπίλους με κυρίαρχη εντόπιση στο δέρμα της κεφαλής, του τραχήλου και του κορμού. Σπίλοι είναι δυνατόν να αναπτυχθούν και σε βλεννογόνους που επενδύονται από πλακώδες επιθήλιο. Οι κοινοί επίκτητοι σπίλοι εμφανίζονται συνήθως ως καστανόφαιες στρογγυλές έως ωοειδείς βλάβες, με διάμετρο από 2 έως 6 χιλιοστά και φαίνονται συμμετρικοί, με ομαλά και σαφώς περιγεγραμμένα όρια.

Κλασσικά, οι κοινοί σπίλοι διακρίνονται ανάλογα με την ιστολογική εντόπιση των σπιλοκυττάρων σε τρεις τύπους:

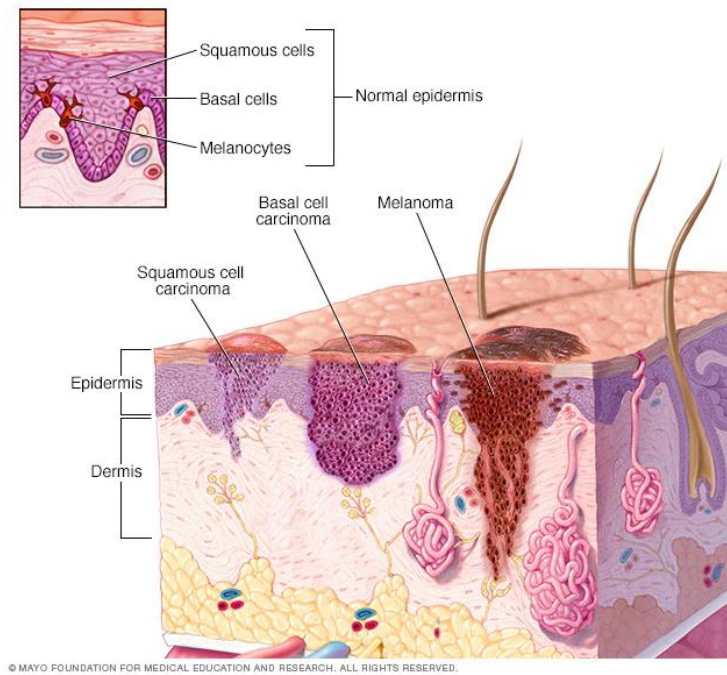
- **Συνδεσμικός** σπίλος. Μακροσκοπικά είναι επίπεδος και μικροσκοπικά οι φωλεές των σπιλοκυττάρων περιορίζονται στο βασικό τμήμα της επιδερμίδας, κοντά στη χοριοεπιδερμική συμβολή.
- **Χοριακός** (ενδοδερμικός) σπίλος. Μακροσκοπικά, είναι πολυποδοειδής ή θηλωματώδης ή επίπεδος, και συχνά φέρει τρίχες. Μικροσκοπικά αναγνωρίζονται φωλεές σπιλοκυττάρων στο χόριο και όχι στην επιδερμίδα.
- **Σύνθετος** σπίλος. Συνδυάζει τις δύο παραπάνω ιστολογικές μορφές.

Σπανιότερα, παρατηρούνται ο κυανούς σπίλος, ο σπίλος Spitz, ο σπίλος Reed, ο σπίλος με άλω, ο σπίλος με φυσαλιδώδη κύτταρα και οι δυσπλαστικοί κυτταρικοί σπίλοι. Οι δυσπλαστικοί σπίλοι είναι συνήθως συνδεσμικοί ή σύνθετοι και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων ενδοεπιδερμικών φωλεών που συρρέουν και από κυτταρική ατυπία. Θωρούνται δυνητικοί πρόδρομοι του κακοήθους μελανώματος.

Οι συγγενείς σπίλοι υπάρχουν κατά τη γέννηση. Κυτταρολογικά, ομοιάζουν με τους κοινούς επίκτητους σπίλους, ενώ αρχιτεκτονικά χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη στο εν τω βάθει χόριο, γύρω από εξαρτήματα και αγγεία. Ταξινομούνται σε μικρούς (<1.5 εκατοστά), μεσαίους (1.5 μέχρι 20 εκατοστά) και γιγάντιους (>20 εκατοστά). Οι μικρού και μεσαίου μεγέθους σπίλοι είναι συνήθως εφικτό να εξαιρεθούν χειρουργικά, ενώ οι γιγάντιοι σπίλοι απαιτούν συχνά εκτομή σε στάδια ή πολύπλοκες επεμβάσεις πλαστικής χειρουργικής (δερματικά μοσχεύματα κ.λπ.). Παρόλο που όλοι οι συγγενείς μελανοκυτταρικοί σπίλοι είναι επιρρεπείς σε κακοήθη εξαλλαγή, ο πιθανός κίνδυνος συνδέεται με το μέγεθος του σπίλου και είναι χαμηλός, μεταξύ 3% και 10%.

### **1.3.2 Κακόηθες μελάνωμα**

Το μελάνωμα, ή αλλιώς κακόηθες μελάνωμα, είναι ένα νεόπλασμα που προέρχεται από τα μελανοκύτταρα, συνήθως του δέρματος (**Εικόνα 1.6**) (National Cancer Institute, 2015). Πρόκειται για έναν από τους δύο κύριους τύπους καρκίνου του δέρματος μαζί με τα μη μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα. Αν και το μελάνωμα αντιστοιχεί σε μικρό ποσοστό των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου του δέρματος (ποσοστό περίπου 4%), έχει με διαφορά το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων (περίπου 50%) (Guy et al., 2002-2006 & 2007-2011; Skin Cancer Foundation, 2015; The American Cancer Society, 2016). Συχνότερα αναπτύσσεται στο δέρμα, παρατηρείται όμως ως πρωτοπαθές και σε βλεννογόνους που επενδύονται από πλακώδες επιθήλιο και σε άλλα όργανα/συστήματα όπως οι οφθαλμοί, το αναπνευστικό (ρινική κοιλότητα), το ουροποιογεννητικό και το γαστρεντερικό. Τα μελανώματα των βλεννογόνων είναι πολύ επιθετικά νεοπλάσματα με χειρότερη πρόγνωση από τα δερματικά μελανώματα, καθώς δεν δίνουν κλινικά συμπτώματα και διαγιγνώσκονται πολύ αργότερα σε δευτεροπαθείς εστίες.



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

**Εικόνα 1.6.** Το δερματικό μελάνωμα (Ανατύπωση από Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER), 1998-2020.

## 1.4 Κακήθες μελάνωμα – Γενικά Χαρακτηριστικά

### 1.4.1 Ορισμός

Το δερματικό μελάνωμα ορίζεται ως το κακήθες νεόπλασμα που προέρχεται από κακοήθη εξαλλαγή των μελανοκυττάρων της επιδερμίδας.

### 1.4.2 Επίπτωση και θνησιμότητα

Το μελάνωμα αποτελεί το 4% του συνόλου των καρκίνων του δέρματος. Τις τελευταίες δεκαετίες, ο ρυθμός εμφάνισης μελανώματος έχει αυξηθεί ραγδαία και εξακολουθεί να αυξάνεται. Σε πληθυσμούς που έχουν υποστεί σοβαρή εκδορά σε ολόκληρο τον κόσμο, έχει σημειωθεί αύξηση κατά τουλάχιστον 4 έως 6% ετησίως στα πρότυπα ηλικιακών επιπτώσεων. Έχει αυξηθεί ταχύτερα από οποιοδήποτε άλλο είδος καρκίνου και είναι σήμερα ο έκτος πιο διαγνωσμένος τύπος καρκίνου στις ΗΠΑ τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Στην Αυστραλία, το μελάνωμα είναι ο τρίτος συνηθέστερος καρκίνος και η συχνότερη αιτία θανάτου σε νεαρούς ενήλικες ηλικίας 25-29 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης είναι

γενικά υψηλότερη σε άτομα με βαριά δερματίτιδα και σε όχι σκουρόχρωμα δέρματα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα σκουρόχρωμα άτομα αναπτύσσουν μελάνωμα στα λιγότερο χρωματισμένα σημεία του σώματός τους, που είναι οι παλάμες και τα πέλματα (The American Cancer Society, 2016). Με βάση τα αρχεία της Ελληνικής Εταιρείας Παθολογικής Ανατομικής, την πενταετία 2009-2013 διαγνώστηκαν στην Ελλάδα 4068 μελανώματα (Virchows Archiv <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2287-8>).

### **1.4.3 Ηλικία & φύλο**

Τα άτομα που πάσχουν από μελάνωμα είναι κυρίως μέσης ηλικίας. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 52 έτη, ενώ τα δύο φύλα προσβάλλονται εξίσου. Σύμφωνα με τους Liu et al., υπάρχει μια σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης μελανώματος μεταξύ ανδρών και γυναικών σε σχέση με την ηλικία. Έχει αποδειχθεί ότι μέχρι την ηλικία των 44 ετών, οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς στο δερματικό μελάνωμα, ενώ σε ηλικίες άνω των 44 ετών, οι άνδρες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (Liu et al., 2007).

### **1.4.4 Εντόπιση**

Ένας μεγάλος αριθμός μελανωμάτων αναπτύσσεται επί εδάφους απλού μελαγχρωματικού σπίλου. Μελάνωμα όμως, μπορεί να παρουσιαστεί και *de novo*, σε σημείο όπου δεν υπήρχε προηγουμένως κανένας σπίλος αλλά φυσιολογικό μέχρι πρότινος δέρμα. Στους άνδρες, εντοπίζεται συχνότερα στη ράχη, ενώ στις γυναίκες στα κάτω άκρα.

Το μελάνωμα είναι μια πάρα πολύ σοβαρή νόσος γιατί δίνει εύκολα μεταστάσεις σε άλλα όργανα του σώματος, μέσω κυρίως του λεμφικού συστήματος, αλλά και της αιματικής κυκλοφορίας. Τα καρκινικά κύτταρα, αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και δια μέσου της λεμφικής οδού, φτάνουν στους λεμφαδένες.

### **1.4.5 Αιτιοπαθογένεια**

Αιτιοπαθογενετικά, τα κακοήγη μελανώματα σχετίζονται κυρίως με την ηλιακή ακτινοβολία. Τα σοβαρά ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία και η χρόνια έκθεση στον ήλιο (αγροτικοί πληθυσμοί) και το τεχνητό μαύρισμα (solarium) αποτελούν έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου. Ο πιο σημαντικός ενδογενής παράγοντας που προδιαθέτει στην ανάπτυξη μελανώματος είναι ο μεγάλος αριθμός σπύλων και κυρίως δυσπλαστικών. Επίσης, προδιαθέτουν η λευκή φυλή, το ανοιχτό χρώμα

μαλλιών και ίριδας, η αδυναμία μαυρίσματος μετά από έκθεση στον ήλιο, η ύπαρξη εφελίδων και το οικογενειακό ιστορικό μελανώματος, παίζει ρόλο σε αρκετές περιπτώσεις (Meyskens et al., 2004). Το κακόηθες μελάνωμα, σχετίζεται επίσης με κληρονομικότητα. Έχει περιγραφεί σε οικογένειες ένα σύνδρομο όπου τα μέλη τους εμφανίζουν πολλούς σπίλους, συνήθως πάνω από 50, μεταξύ των οποίων κάποιοι είναι δυσπλαστικοί, ενώ υπάρχει οικογενειακό ιστορικό μελανώματος (συγγενείς πρώτου και δευτέρου βαθμού). Το σύνδρομο αυτό ονομάζεται οικογενές σύνδρομο πολλαπλών άτυπων σπίλων και μελανώματος (familial atypical multiple mole melanoma syndrome, FAMMM) και σχετίζεται στενά με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKN2A*. Είναι επίσης γνωστό και ως σύνδρομο άτυπων σπίλων ή σύνδρομο δυσπλαστικών σπίλων ή σύνδρομο B-K σπίλων. Η πιθανότητα ανάπτυξης μελανώματος στα άτομα που πληρούν τα κριτήρια για ένταξη στο σύνδρομο FAMMM είναι πάνω από 50%, ενώ μερικοί από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν παγκρεατικό καρκίνο. Το σύνδρομο FAMMM είναι υπεύθυνο για ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των δερματικών μελανωμάτων (Eckerle et al., 2009).

#### 1.4.6 Γεωγραφική μεταβολή

Σύμφωνα με μια μελέτη του Crombie, ο ρυθμός εμφάνισης μελανώματος αυξάνεται καθώς μειώνεται το γεωγραφικό πλάτος, γεγονός που εξηγείται από τη μείωση της υπερϊώδους ακτινοβολίας σε υψηλότερα γεωγραφικά πλάτη. Η υπόθεση του γεωγραφικού πλάτους αντιστρέφεται στην Ευρώπη, γεγονός που εξηγείται από το σκουρότερο χρώμα δέρματος στους πληθυσμούς που ζουν στη νότια Ευρώπη, καθώς η ισχυρότερη χρώση δρα ως προστατευτικός παράγοντας στην ανάπτυξη μελανώματος (Crombie, 1979).

#### 1.4.7 Κλινική συμπεριφορά – Διάγνωση

Η κλινική εξέλιξη των περισσότερων κακοήθων μελανωμάτων στον άνθρωπο είναι αποτέλεσμα μίας μακράς διαδικασίας εξέλιξης της νόσου (Ward et al., 2017). Ως εκ τούτου, η πρόωπη κλινική αναγνώριση μίας ύποπτης δερματικής αλλοίωσης είναι θεμελιώδους σημασίας τόσο για την έγκαιρη διάγνωση, όσο και την επιτυχή θεραπευτική αντιμετώπιση. Ο συνδυασμός ιδιαίτερων χαρακτηριστικών μίας μελανοκυτταρικής αλλοίωσης που θέτουν την υποψία μελανώματος συμπεριλαμβάνεται στο αγγλικό ακρωνύμιο **ABCDE** (Εικόνα 1.7):

- ❖ **A**symmetry. Ασυμμετρία της βλάβης
- ❖ **B**order irregularity. Ανώμαλα όρια της βλάβης
- ❖ **C**olor variegation. Παρουσία ποικιλοχρωμίας.

- ❖ **Diameter.** Αυξημένη διάμετρος της βλάβης (> 6 mm).
- ❖ **Evolution.** Ταχέως εξελισσόμενη βλάβη που αλλάζει χαρακτήρες (E και για Elevation=υπέγερση)

Ωστόσο, η εφαρμογή των ανωτέρω κλινικών κριτηρίων δεν είναι πάντα αξιόπιστη καθώς εξετάζουν κυρίως την οριζόντια φάση εξέλιξης μίας αλλοίωσης, ενώ δεν έχουν θέση στην αξιολόγηση αμελανωτικών μορφών της νόσου, όπως είναι τα δεσμοπλαστικά μελανώματα. Η χρήση τους σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, όπως η δερμοσκόπηση, επιτρέπει την πιο αποτελεσματική και έγκαιρη διάγνωση.

Η οριστική διάγνωση του μελανώματος τίθεται με την εξαίρεση, την μακροσκοπική και την μικροσκοπική εκτίμηση της δερματικής βλάβης. Αν και διάφορες τεχνικές έχουν προταθεί, η βιοψία εκτομής με συναφαίρεση 1-2 mm φυσιολογικού δέρματος πέριξ της βλάβης, αποτελεί την επιλογή εκλογής στη διαγνωστική προσπέλαση δερματικών αλλοιώσεων ύποπτων για μελάνωμα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ολική αφαίρεση της βλάβης προσφέροντας σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες για τη σταδιοποίηση της νόσου.



**Εικόνα 1.7.** Τα ABCDE του μελανώματος (Ανατύπωση από Conte, 2020).

### 1.4.8 Ιστολογικοί Τύποι

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τέσσερις είναι οι βασικοί τύποι με τους οποίους εμφανίζεται το δερματικό μελάνωμα:

Το επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα (Superficial spreading melanoma), είναι η συχνότερη μορφή μελανώματος. Μακροσκοπικά (**Εικόνα 1.8**), είναι μια ελαφρά επηρμένη ασύμμετρη αλλοίωση με ανώμαλα όρια, μεγέθους άνω των 6 χιλιοστών με ποικιλία στη χροιά (καστανόφαιο έως μαύρο, κυανό έως λευκό χρώμα). Η διηθητική του ανάπτυξη συνήθως ακολουθείται από την εμφάνιση ενός όζου στην επιφάνεια. Οι λευκές περιοχές συνήθως αντιστοιχούν σε θέσεις αυτόματης υποστροφής. Μικροσκοπικά, το μη διηθητικό στοιχείο συνίσταται από άτυπα μελανοκύτταρα, μεμονωμένα ή σε φωλεές και ‘παζετοειδή’ διασπορά στην επιδερμίδα.



**Εικόνα 1.8.** Μακροσκοπική εικόνα του επιπολής επεκτεινόμενου μελανώματος (Ανατύπωση από Oakley & Hamilton, 2011).

Το οζώδες μελάνωμα (Nodular melanoma), είναι ο πιο επιθετικός τύπος μελανώματος αποτελώντας το 20% των μελανωμάτων, συνήθως ήδη διηθητικό τη στιγμή της διάγνωσης. Πρόκειται για μια οζοειδή ή πολυποδοειδή προβάλλουσα και συχνά εξελκωμένη αλλοίωση ποικίλης χροιάς στην επιφάνεια του δέρματος. Εμφανίζεται συνήθως σε νεαρά άτομα (**Εικόνες 1.9 και 1.10**).

Το εφηλιδοειδές κακόηθες μελάνωμα αναπτυχθέν σε μελανωτική κηλίδα Hutchinson ή κακοήθης κηλίδα, αναπτύσσεται κυρίως στο πρόσωπο ή στα ακάλυπτα μέρη του σώματος, ηλικιωμένων λευκών ατόμων επί εδάφους κηλίδας Hutchinson με συχνότητα μόλις 10%. Μακροσκοπικά, η κηλίδα εμφανίζεται σαν επίπεδη με ποικίλης έντασης καστανόφαιη χροιά, εξαπλούμενη βραδέως κατά τρόπο ακανόνιστα κυκλικό (**Εικόνα 1.11**). Μικροσκοπικά, χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό άτυπων μελανοκυττάρων που περιορίζονται φυσιολογικά στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Όταν το νεόπλασμα διηθήσει το χόριο και βαθύτερα αυτού στον υποδόριο ιστό ονομάζεται Lentigo maligna melanoma.





**Εικόνα 1.9.** Μακροσκοπική εικόνα του οζώδους μελανώματος (Ανατύπωση από Garrick, 2020).



**Εικόνα 1.10.** Μακροσκοπική εικόνα του αμελανωτικού οζώδους μελανώματος (Ανατύπωση από Cunliffe, 2015).



**Εικόνα 1.11.** Μακροσκοπική εικόνα του εφηλιδοειδούς κακοήθους μελανώματος (Ανατύπωση από National Health Service, UK).

Τέλος, το ακρικό εφηλιδοειδές μελάνωμα ή Παλαμοπελματιαίο-υπονύχιο μελάνωμα (Acral lentiginous melanoma) απαντάται κυρίως στις παλάμες και στα πέλματα. Είναι πιο συχνό στους Αφροαμερικανούς και στα άτομα της Ανατολής. Μακροσκοπικά, διαφέρει από τους λοιπούς τύπους, καθώς εμφανίζεται ως μελαγχρωματικές σκούρες κηλίδες στα πέλματα, τις παλάμες και υπονύχια (Εικόνα 1.12).



**Εικόνα 1.12.** Μελάνωμα άκρου ποδός (Φωτογραφικό υλικό από Κουζανίδης Ν.)

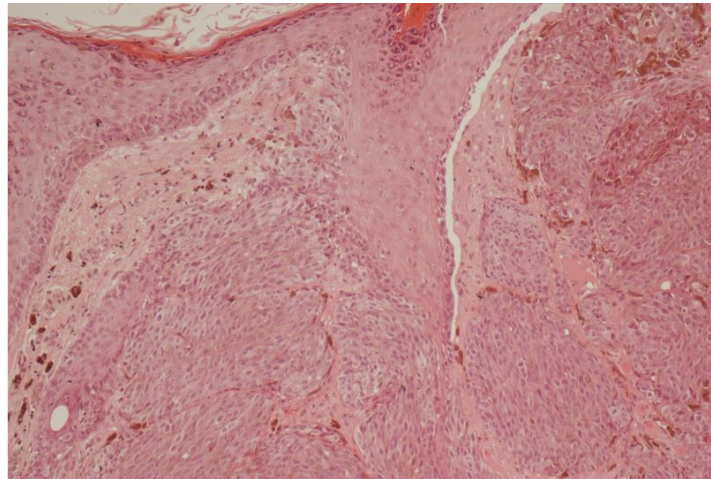
Άλλοι τύποι είναι το βλεννογόνιο-εφηλιδοειδές, το δεσμοπλαστικό/νευροτρόπο, το μελάνωμα της παιδικής ηλικίας και το μελάνωμα επί εδάφους γιγάντιου συγγενούς σπίλου, κ.α. (Εικόνα 1.13).

Subtype	Frequency	Characteristic
Superficial spreading	70%	Arises from existing nevus.
Nodular	5%	Absence of a radial growth phase, variable presentation, and robust vertical invasion.
Lentigo Maligna	4–15%	Typically demonstrates slow progression, and frequently appears in sun-exposed areas (i.e., face, head, etc.)
Acral lentiginous	5%	Has higher incidence in patients with darker skin pigmentation and frequently occur on the palms, soles, and subungual spaces.
Amelanotic	4%	Characteristic absence of pigmentation and are considered rare.
Desmoplastic	Less than 4%	Rare melanoma seen in older adults that is characterized by scant spindle cells and minimal cellular atypia.

**Εικόνα 1.13.** Υπότυποι μελανώματος. (Ανατύπωση από Chapter 6, Clinical Presentation and Staging of Melanoma Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy. Ward & Farma Brisbane. Codon Publications; 2017).

#### 1.4.9 Μικροσκοπική εικόνα

Μικροσκοπικά (Εικόνα 1.14), τα κακοήγη μελανώματα εμφανίζουν δύο τύπους κυττάρων, τα επιθηλιόμορφα και τα ατρακτοειδή. Γενικά, τα νεοπλασματικά μελανοκύτταρα εμφανίζουν σαφή ατυπία, είναι μεγάλα με ευμεγέθεις πυρήνες και έντονα, ηωσινόφιλα πυρήνια. Οι πυρηνοκινήσιες είναι άφθονες. Οι εναποθέσεις μελανίνης ποικίλλουν (μελανωτικό και αμελανωτικό μελάνωμα).

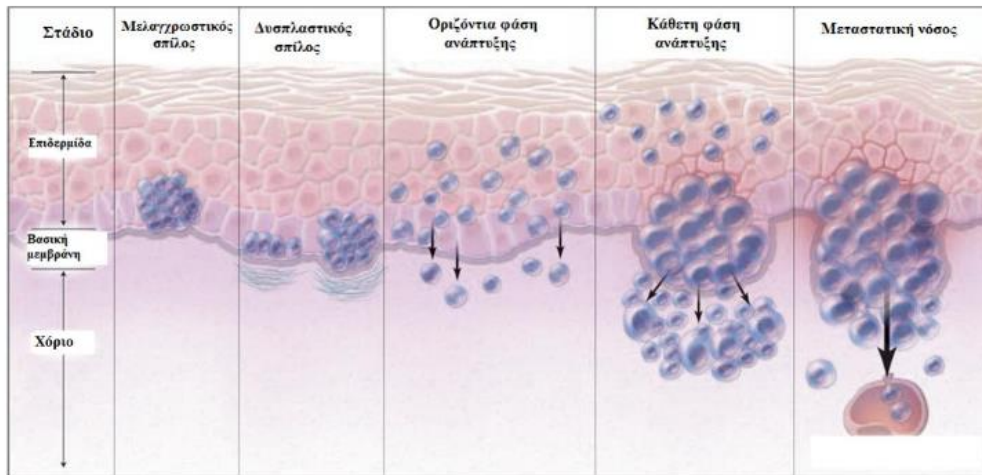


**Εικόνα 1.14.** Ιστολογική τομή δέρματος σε μεγέθυνση X 400, χρώση Η/Ε (φωτογραφικό υλικό από το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΙ).

#### 1.4.10 Εξέλιξη, Σταδιοποίηση, Προγνωστικοί Παράγοντες

Στην επιδερμίδα, τα καλοήγη, ενδιάμεσα και πλήρως κακοήγη στάδια της εξέλιξης μιας μελανοκυτταρικής αλλοίωσης έχουν αναγνωριστεί από καιρό, ίσως επειδή είναι ορατά στο δέρμα και είναι εύκολη η λήψη βιοψίας. Τα κακοήγη μελανώματα επεκτείνονται αφενός οριζόντια και ακτινωτά, αφετέρου διηθητικά κατά βάθος προς τον υποδόριο ιστό (οριζόντια και κάθετη φάση ανάπτυξης) (Εικόνα 1.15).

Από τους ιστοπαθολογικούς δείκτες οι πιο ισχυροί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες στο εντοπισμένο μελάνωμα είναι το πάχος διήθησης και η εξέλκωση (TNM σταδιοποίηση) (Gershenwald & Scolyer, 2018).



**Εικόνα 1.15.** Στάδια εξέλιξης ενός καλοήθους σπίλου σε μελάνωμα (Ανατύπωση από N Eng J Med., 2006).

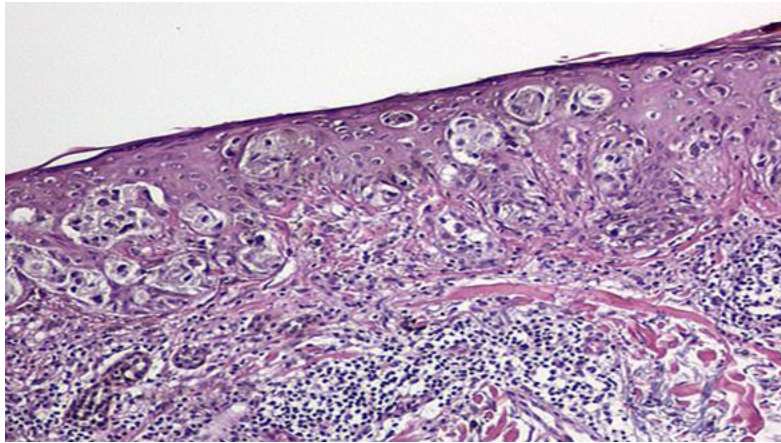
Το πάχος διήθησης κατά Breslow, μετράται με οπτικό μικροσκόπιο σε ευθεία γωνία με το παρακείμενο φυσιολογικό δέρμα, από την κορυφή της κοκκιώδους στιβάδας της επιδερμίδας (ή τη βάση του έλκους στην περίπτωση εξέλκωσης) ως το βαθύτερο διηθητικό κύτταρο μελανώματος. Το πάχος διήθησης αποτελεί το σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη στην πιο πρόσφατη σταδιοποίηση κατά AJCC (8<sup>η</sup> έκδοση). Συγκεκριμένα, σταδιοποιείται ανά 1 mm: pT1 μελάνωμα πάχους μικρότερου ή ίσου με 1 mm, pT2 μελάνωμα πάχους 1,01-2 mm, pT3 μελάνωμα πάχους 2,01-4 mm, pT4 μελάνωμα πάχους μεγαλύτερο από 4 mm.

Το ανατομικό επίπεδο διήθησης κατά Clark αποτελεί υποκατηγορία στην pT σταδιοποίηση. Συγκεκριμένα, ο Clark περιέγραψε πέντε στάδια εξέλιξης του μελανώματος σε σχέση με την ιστολογία του δέρματος.

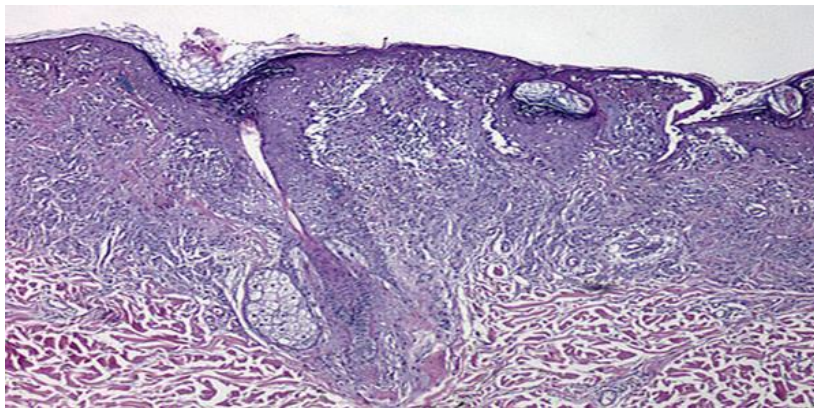
- Επίπεδο I (in situ): Το μελάνωμα βρίσκεται στη θέση της προέλευσής του, στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας (οριζόντια φάση ανάπτυξης) (**Εικόνα 1.16**).
- Επίπεδο II: Διήθηση στο θηλώδες χόριο, χωρίς σχηματισμό όγκου (συνήθως οριζόντια φάση ανάπτυξης) (**Εικόνα 1.17**).
- Επίπεδο III: Διήθηση στο θηλώδες χόριο, με σχηματισμό ογκιδίου και πίεση στο υποκείμενο δικτυωτό χόριο (κάθετη φάση ανάπτυξης).
- Επίπεδο IV: Διήθηση στο δικτυωτό χόριο (κάθετη φάση ανάπτυξης).
- Επίπεδο V: Διήθηση του υποδόριου λιπώδους ιστού.



Ωστόσο, με περαιτέρω μελέτη, το μοντέλο του Clark έχει αποδειχθεί σήμερα περιορισμένης προγνωστικής αξίας, λιγότερο αναπαραγώγιμο και πιο υποκειμενικό σε σχέση με το μοντέλο του Breslow (Balch et al., 2001).



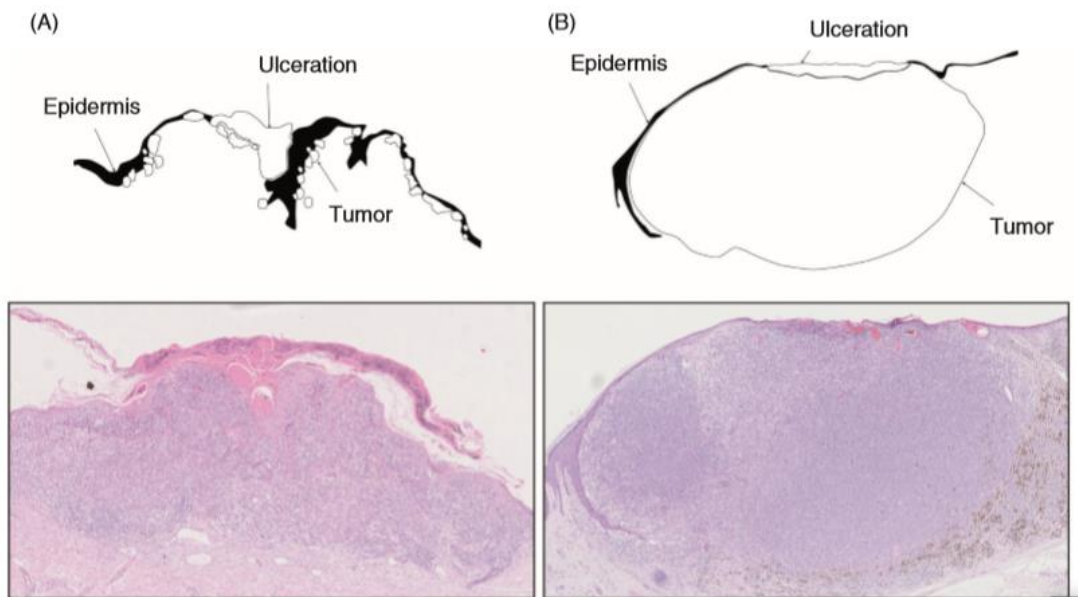
**Εικόνα 1.16.** Ιστολογική εικόνα επιφανειακού κακοήθους μελανώματος σε μικρή μεγέθυνση (στάδιο I κατά Clark, in situ MM) (Ανατύπωση από Elder, 2016).



**Εικόνα 1.17.** Ιστολογική εικόνα διηθητικού επιφανειακού μελανώματος σε μικρή μεγέθυνση (στάδιο II κατά Clark) (Ανατύπωση από Elder, 2016).

Η εξέλκωση (**Εικόνα 1.18**) εκτιμάται μικροσκοπικά ως απουσία άθικτης επιδερμίδας υπερκείμενης οποιουδήποτε μέρους του πρωτοπαθούς μελανώματος. Αποτελεί κυρίαρχο προγνωστικό παράγοντα για το δερματικό μελάνωμα χωρίς μεταστάσεις και ένα σημαντικό τροποποιητικό παράγοντα του

σταδίου κατά την AJCC σταδιοποίηση. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ εξέλκωσης και πάχους. Η εξέλκωση εκτός από το δεύτερο καθοριστικό προγνωστικό παράγοντα, αποτελεί και το μόνο παράγοντα του πρωτοπαθούς όγκου που τροποποιεί την πρόγνωση σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (Εικόνα 1.19).

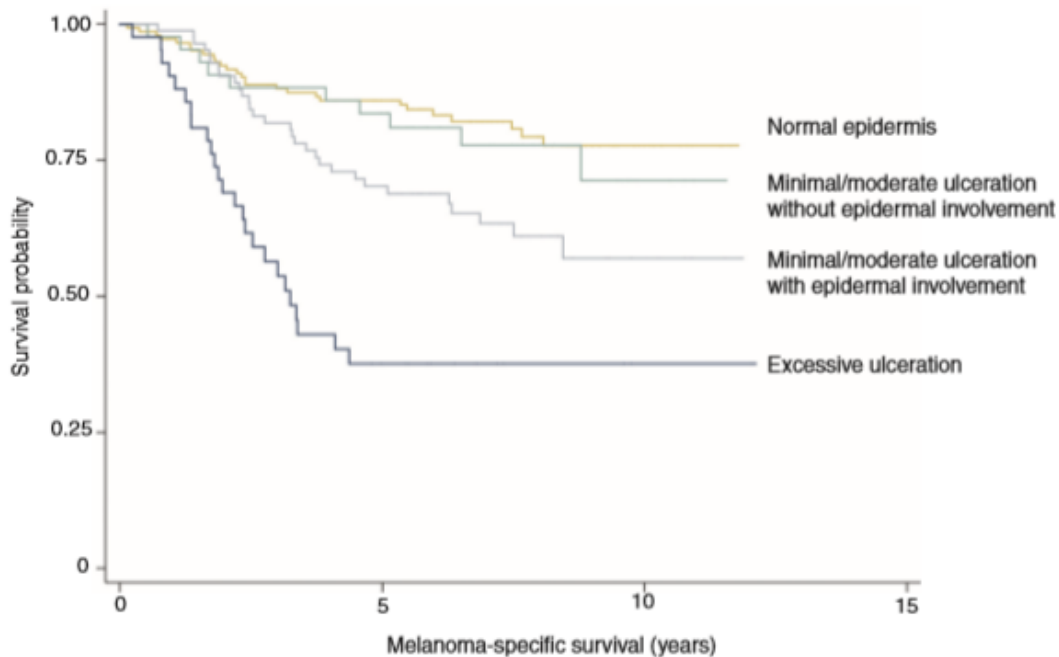


**Εικόνα 1.18.** (A) Διθητικό έλκος με κύτταρα μελανώματος που διεισδύουν και διαβρώνουν την επιδερμική στιβάδα. (B) Επιφανειακό έλκος όπου εκτείνεται η οζώδης ανάπτυξη και τελικά διαταράσσει την επιδερμική στιβάδα, με ελάχιστη επιδερμική διήθηση (Ανατύπωση από Am J Clin Pathol., 2014).

Ο υψηλός μιτωτικός δείκτης αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TILs) αποτελούν ευνοϊκή προγνωστική παράμετρο, αν είναι άφθονα. Η παρουσία υποστροφής που καταλαμβάνει >75% του διθητικού μελανώματος προλέγει δυσμενή πρόγνωση. Η παρουσία διήθησης αγγείων δεν επηρεάζει την T σταδιοποίηση, αλλά πρέπει να αναφέρεται. Η παρουσία περινευρικής διήθησης σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα τοπικής υποτροπής. Με κακή πρόγνωση σχετίζεται και η παρουσία δορυφορικών εστιών μελανώματος. Περιορισμένης προγνωστικής αξίας είναι ο ιστολογικός υπότυπος, η μορφολογία των κυττάρων και η παρουσία παρακείμενου σπίλου.

Όσον αφορά το μεταστατικό μελάνωμα, υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ θετικού λεμφαδένα και επιβίωσης. Η μικροανατομική εντόπιση των μεταστάσεων στο λεμφαδένα φρουρό

σχετίζεται με την πρόβλεψη ύπαρξης μεταστάσεων στους λοιπούς λεμφαδένες. Σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις η εντόπιση και τα επίπεδα της γαλακτικής δεϋδρογενάσης είναι προγνωστικής σημασίας.



**Εικόνα 1.19.** Καμπύλες επιβίωσης Kaplan – Meier, που απεικονίζουν τον προγνωστικό αντίκτυπο της έκτασης του έλκους και τη συμμετοχή της γύρω επιδερμίδας (Ανατύπωση από Am J Clin Pathol., 2014).

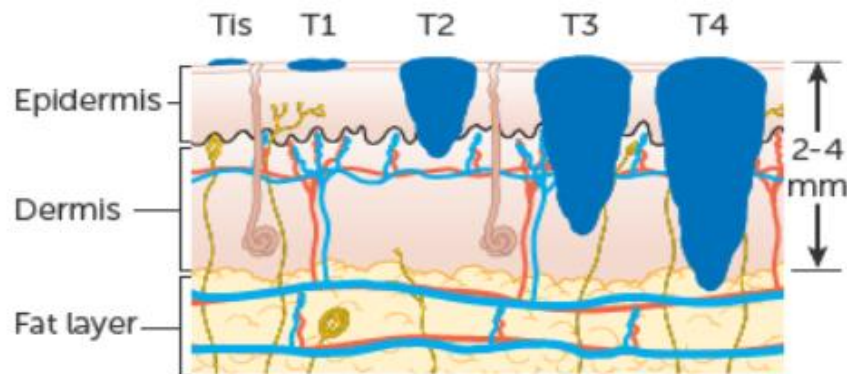
Από τους κλινικούς παράγοντες, οι ακόλουθοι συνδέονται με ευνοϊκότερη πρόγνωση: ηλικία <60 έτη, γυναικείο φύλο, εντόπιση στα άκρα (εξαιρούνται τα μελανώματα παλαμών και πελμάτων), απουσία θετικών λεμφαδένων, απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, φυσιολογικά επίπεδα γαλακτικής δεϋδρογενάσης στον ορό.

#### 1.4.11 Το σύστημα σταδιοποίησης TNM

Το TNM σύστημα σταδιοποίησης του μελανώματος είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα συστήματα. Το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε και διατηρείται από την American Joint Committee on Cancer (AJCC) και υιοθετήθηκε από τη Διεθνή Ένωση για τον Καρκίνο (Union for International Cancer Control, UICC). Το σύστημα σταδιοποίησης TNM αναπτύχθηκε ως εργαλείο στη θεραπευτική

προσέγγιση των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με μελάνωμα, ώστε να υπάρχει κοινή γλώσσα στη σταδιοποίηση. Το κάθε στάδιο καθορίζεται από το μέγεθος, την τοπική διήθηση και τη μεταστατική επέκταση ή όχι του κακοήθους νεοπλασματος.

Το (T) αντιστοιχεί στον όγκο (Tumor), και ειδικότερα στο βάθος διήθησης (πάχος) του μελανώματος. Υπάρχουν 5 κύρια στάδια του πάχους όγκου στο μελάνωμα-Tis σε T4 (Εικόνα 1.20).



**Εικόνα 1.20.** Σταδιοποίηση με βάση το πάχος διήθησης (Ανατύπωση από Cancer Research, United Kingdom).

Η κατηγορία **T** διαιρείται σε 2 υποομάδες a και b, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία εξέλκωσης στην πρωτοπαθή εστία, δηλαδή αν υπάρχει άθικτη επιδερμίδα πάνω από τον όγκο. Συνίσταται η μικροσκοπική αξιολόγηση έπειτα από ολική εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου.

Το **N** αντιπροσωπεύει τη μετάσταση των κακοήθων μελανοκυττάρων στους λεμφαδένες (N0-N3). Η κατηγορία **N** χωρίζεται περαιτέρω σε ομάδες a, b και c. Οι περιφερικοί λεμφαδένες είναι οι πιο συνηθισμένες θέσεις μετάστασης. Η ευρεία χρήση της δερματικής λεμφοσκόπησης, της λεμφικής χαρτογράφησης και των βιοψιών λεμφαδένων φρουρού έχει ενισχύσει σημαντικά την ικανότητα αναγνώρισης της παρουσίας της μετάστασης σε λεμφαδένες. Εάν παρουσιαστεί προφανής λεμφαδενοπάθεια, η μεταστατική λεμφαδενική διήθηση πρέπει να επιβεβαιωθεί μέσω αναρρόφησης δια λεπτής βελόνης με καθοδήγηση από υπερήχους. Εάν δεν υπάρχει κλινική ένδειξη εμπλοκής του λεμφαδένα προεγχειρητικά, η βιοψία λεμφαδένα-φρουρού (SLNB) θα πρέπει να εκτελείται κατά τη χειρουργική επέμβαση για όλες τις βλάβες σε πάχος  $> 1$  mm. Επιπλέον, το SLNB θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για βλάβες πάχους 0,76 έως 1,0 mm όταν υπάρχουν χαρακτηριστικά υψηλού



κινδύνου (λεμφαγγειακή διήθηση, υψηλός μιτωτικός αριθμός, έλκος). Οι τρέχουσες οδηγίες δεν συνιστούν SLNB για βλάβες πάχους μικρότερου του 0,75 mm.

Το **M** αντιστοιχεί στη μετάσταση και περιγράφει αν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε διαφορετικό μέρος του σώματος (M0 και M1). Το στάδιο M ταξινομείται περαιτέρω από την εντόπιση της μεταστατικής εστίας (δέρμα, λεμφαδένες, σπλάχνα, πνεύμονες ή αυξημένη στον ορό γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)).

Η πιο πρόσφατη αναθεώρηση του εγχειριδίου σταδιοποίησης AJCC (8η έκδοση) κυκλοφόρησε το 2016 και εφαρμόστηκε το έτος 2018 (**Εικόνα 1.21**). Το πάχος και η εξέλκωση του όγκου παραμένουν τα βασικά κριτήρια της κατηγορίας T. Τα μελανώματα T1b επαναπροσδιορίστηκαν είτε ως εξελκωμένα μελανώματα < 1,0 mm πάχους είτε ως μη εξελκωμένα μελανώματα πάχους 0,8-1,0 mm. Επίσης, συστήθηκε ότι το πάχος του όγκου πρέπει να καταγράφεται με ακρίβεια 0,1 mm αντί για το πλησιέστερο 0,01 mm (Scolyer et al., 2020).

Stage	Classification	5-year survival
Stage 0	Tis: Melanoma <i>in situ</i>	>98%
Stage I (A/B)	T1a: <0.8 mm and nonulcerated	97–92%
	T1b: ≥0.8 mm or <0.8 mm with ulceration	
	T2a: >1.0–2.0 mm without ulceration	
Stage II (A, B, C)	T2b: >1.0–2.0 mm with ulceration	81–53%
	T3a: >2.0–4.0 mm without ulceration	
	T3b: >2.0–4.0 mm with ulceration	
	T4a: >4.0 mm without ulceration	
	T4b: >4.0 mm with ulceration	
Stage III (A, B, C, D)	N1a: 1 clinically occult (in SLN biopsy)	78–40%
	N1b: 1 clinically detected	
	N1c: Presence of in-transit, satellite, and/or microsatellite mets	
	N2a: 2–3 clinically occult (in SLN biopsy)	
	N2b: 2–3, at least 1 clinically detected	
	N2c: 1 clinically occult or detected, with in-transit, satellite, and/or microsatellite mets	
	N3a: 4 or more clinically occult (in SLN biopsy)	
	N3b: 4 or more, at least 1 of which clinically detected, or presence of any number of matted nodes	
	N3c: 2 or more clinically occult or clinically detected with in-transit, satellite, and/or microsatellite mets	
Stage IV	M1a: Distant metastasis to skin, soft tissue including muscle, and/or nonregional lymph nodes. LDH not recorded or unspecified	20–15%
	M1a(0): LDH not elevated	
	M1a(1): LDH elevated	
	M1b: Distant metastasis to lung with or without M1a sites of disease. LDH not recorded or unspecified	
	M1b(0): LDH not elevated	
	M1b(1): LDH elevated	
	M1c: Distant metastasis to non-CNS visceral sites with or without M1a or M1b sites of disease. LDH not recorded or unspecified	
	M1c(0): LDH not elevated	
	M1c(1): LDH elevated	
	M1d: Distant metastasis to CNS with or without M1a, M1b, or M1c sites of disease. LDH not recorded or unspecified	
	M1d(0): LDH not elevated	
	M1d(1): LDH elevated	

**Εικόνα 1.21.** Η πρόσφατη σταδιοποίηση του μελανώματος (Ανατύπωση από Gershenwald, J.E. et al. American Joint Committee on Cancer staging manual. 8th ed. Amin, M.B. editors. Chicago, 2017. p. 563).

#### 1.4.12 Εργαστηριακές δοκιμές / Οι εργαστηριακές παράμετροι

Εάν η διάγνωση δερματικού μελανώματος είναι αβέβαιη ή για επιλογή κατάλληλης θεραπείας, το ιστοικό υλικό του μελανώματος μπορεί να υποβληθεί σε επιπλέον εργαστηριακές εξετάσεις με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες. Οι πιο χρήσιμοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες για τις μελανοκυτταρικές βλάβες είναι η πρωτεΐνη S100 ή και τα αντιγόνα HMB45, Melan-A (MART-1) και η τυροσινάση. Αυτοί οι δείκτες χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση (Εικόνα 1.22).

Το γονίδιο *S100* εδράζεται στο χρωμόσωμα 1q21. Η *S100* είναι μια πολυγονιδιακή οικογένεια πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους (M.B. μεταξύ 9000 και 13000), οι οποίες δεσμεύουν  $Ca^{2+}$ . Η οικογένεια περιλαμβάνει 19 μέλη, τα οποία εκφράζονται σε πλήθος κυτταρικών σειρών. Έτσι, η *S100B* (πρώην *S100β*) εκφράζεται περισσότερο στα κύτταρα της γλοίας του Κεντρικού και Περιφερικού Νευρικού Συστήματος, στα μελανοκύτταρα, στα χονδροκύτταρα και στα λιποκύτταρα, ενώ η *S100A1* (πρώην *S100A/S100α*) στα κύτταρα του μυοκαρδίου, στις σκελετικές μυϊκές ίνες βραδείας σύσπασης, στα επιθηλιακά κύτταρα των σιελογόνων αδένων και στα νεφρικά κύτταρα. Η *S100A6* εκφράζεται από τους ινοβλάστες και τις λείες και καρδιακές μυϊκές ίνες. Μέλη της οικογένειας *S100* συμμετέχουν στην εξαρτώμενη από το  $Ca^{2+}$  ρύθμιση διαφόρων ενδοκυτταρικών διεργασιών, όπως η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (που συμπεριλαμβάνει το νεοπλασματικό μετασχηματισμό) και η διαφοροποίηση (Orchard, 2000). Η πρωτεΐνη *S100* παραμένει ο πιο ευαίσθητος δείκτης μελανοκυτταρικής διαφοροποίησης τόσο σε καλοήθεις όσο και σε κακοήθεις μελανοκυτταρικές βλάβες αλλά έχει χαμηλότερη ειδικότητα (75-87%) σε σύγκριση με τα αντιγόνα διαφοροποίησης *Melan-A* και τυροσινάση (Blessing et al., 1998; Shinohara et al., 2009).

Το *HMB45* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q13.2. Η παρουσία του κυτταροπλασματικού αντιγόνου *HMB45* υποδηλώνει ενεργό σχηματισμό μελανοσωμάτων και επομένως ένδειξη ότι συντελείται μελανοκυτταρική διαφοροποίηση. Το αντιγόνο εκφράζεται επίσης σε φυσιολογικά εμβρυϊκά μελανοκύτταρα, αλλά όχι ή ασθενώς σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα ενηλίκων, ασχέτως του βαθμού μελάγχρωσης. Έχει διαπιστωθεί ότι ο κλώνος *HMB45* αντιδρά με ένα τμήμα 10 kDa ενός σιαλυλιωμένου γλυκοσυζεύγματος ευαίσθητου στη νευραμινιδάση, της κυτταροπλασματικής γλυκοπρωτεΐνης *GP100* που απαντά στα πρόδρομα (άωρα) μελανοκύτταρα. Ποικιλία ερεθισμάτων μπορεί να πυροδοτήσει την έκφραση εκ νέου του αντιγόνου *HMB45* από τα ενεργοποιημένα πλέον μελανοκύτταρα ενηλίκων. Για παράδειγμα, τα θετικά στον κλώνο *HMB45* κύτταρα έχουν εντοπιστεί σε ιστούς που επικαλύπτουν ή γειτνιάζουν με κοκκιωματώδεις ιστούς, σε αιμαγγειώματα, σε στρώμα όγκων πλούσιο σε αγγεία και σε βασικοκυτταρικό καρκίνωμα. Με το αντίσωμα *HMB45* γενικά δεν αντιδρούν οι μη μελανοκυτταρικοί φυσιολογικοί ιστοί (Skelton et al., 1991; Smoller et al., 1991; Karur et al., 1992; Blessing et al., 1998). Λόγω της μικρότερης ευαισθησίας του, ο δείκτης *HMB45* χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την *S100* ως τυπικό πάνελ για τη διάγνωση του κακοήθους μελανώματος.

Το γονίδιο *MELANA* (9p13-22) κλωνοποιήθηκε από μια ανθρώπινη μελανοκυτταρική σειρά και η έκφρασή του στα μελανώματα αναγνωρίζεται από αυτόλογα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Το

Melan-A (Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1, MART-1) είναι ένα αντιγόνο διαφοροποίησης ειδικό για το μελάνωμα. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική (κυτταροπλασματική) πρωτεΐνη αποτελούμενη από 118 αμινοξέα (20-22 kDa), η οποία εκφράζεται στο δέρμα, στον αμφιβληστροειδή και στην πλειονότητα των καλλιεργημένων σειρών μελανοκυττάρων, ενώ πλήθος άλλων ιστών και νεοπλασμάτων που μελετήθηκαν δεν την εκφράζουν όπως το δεσμοπλαστικό μελάνωμα. Εντούτοις, η Melan-A εκφράζεται και στα αγγειομυολιπόματα και σε λίγα άλλα νεοπλάσματα. Το Melan-A χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το S100 ως τυπικό πάνελ για την αξιολόγηση των διηθημένων λεμφαδένων και είναι αποδεδειγμένα πιο ευαίσθητος δείκτης από το HMB45 στη διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος και πιο ειδικός από την πρωτεΐνη S100 με εξαίρεση το δεσμοπλαστικό μελάνωμα (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994; Chen et al., 1996; Blessing et al., 1998).

Η τυροσινάση είναι ένας αναδυόμενος δείκτης στη διάγνωση του μελανώματος. Πρόκειται για ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, το γονίδιο του οποίου εδράζεται στο χρωμόσωμα 11q14-21, ενεργοποιημένο στην διαδικασία βιοσύνθεσης της μελανίνης (Clarkson et al., 2001). Περίπου 80-90% των μελανωμάτων εκφράζουν αυτόν το δείκτη. Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό (~6%) των δεσμοπλαστικών μελανωμάτων είναι θετικό. Η ειδικότητα της τυροσινάσης είναι υψηλή (97-100%) αν και τα περισσότερα σαρκώματα και νευροϊνώματα εκφράζουν επίσης αυτόν τον δείκτη (Biernacka et al., 2016).

Λόγω του γεγονότος ότι περίπου το 50% όλων των μελανωμάτων φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF*, από τα οποία το 70-90% είναι θετικό για τη μετάλλαξη *BRAFV600E* και υπάρχει συγκεκριμένη στοχεύουσα θεραπεία διαθέσιμη εάν αποδειχθεί θετικότητα, εκτομές μελανώματος εξετάζονται συνήθως για αυτή τη μετάλλαξη (Busam et al., 2013; Saroufim et al., 2014; Orchard et al., 2019). Διαφορετικές μέθοδοι για τη δοκιμή αυτής της μετάλλαξης είναι διαθέσιμες για κλινική θεραπευτική χρήση, μεταξύ των οποίων μπορεί να βρεθεί η κατευθυντική αλληλούχιση των προϊόντων PCR με τη μέθοδο Sanger, και η αλληλούχιση επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing) (Bradish & Cheng, 2014; O'Brien et al., 2017; Cheng et al., 2018). Επίσης, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αρχίζει να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη στα Παθολογοανατομικά Εργαστήρια.

Marker	Staining pattern	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Other positive tumors
S-100	Nuclear and cytoplasmic	96-99	75-87	Malignant peripheral nerve sheath tumors (focal except the epithelioid variant) Malignant melanotic schwannoma Benign nerve sheath tumors Clear cell sarcoma Minority of breast and salivary gland carcinomas Langerhans cell histiocytosis and other rare hematolymphoid tumors
Melan-A (melanoma antigen recognized by T cells-1)	Cytoplasmic	75-92	95-100	PEComas Clear cell sarcomas Adrenal cortical and sex-cord tumors (clone A103)
HMB-45	Cytoplasmic	70-90	95-100	Clear cell sarcomas PEComas Malignant melanotic schwannomas Meningeal melanocytomas Angiomyolipomas Some ovarian steroid tumors Renal cell carcinomas with t (6;11) (p29;q12) translocation
Microphthalmia transcription factor	Nuclear	81-100	88-100	Clear cell sarcomas Angiomyolipomas Lymphangiomyomas Certain carcinomas of the kidney, pancreas, ovary, and breast
Tyrosinase	Cytoplasmic	80-90	97-100	Most clear cell sarcomas Pigmented neurofibromas Small percentage of angiomyolipomas
SOX-10	Nuclear	97-100	>90	Clear cell sarcomas Peripheral nerve sheath tumors Some triple negative metaplastic breast carcinomas Myoepithelial tumors

**Εικόνα 1.22.** Οι πιο χρήσιμοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες για τη διάγνωση του κακοήθους μελανώματος (Ανατύπωση από Biernacka et al., 2016).

## 1.5 Μοριακή ταξινόμηση του μελανώματος

Το κακόηθες μελάνωμα είναι ένα από τα πιο επιθετικά και ετερογενή νεοπλάσματα του ανθρώπου. Οι πρόσφατα ανακαλυφθείσες μοριακές μεταβολές που σχετίζονται με την παθογένεια του μελανώματος χρησιμοποιούνται σήμερα για τον καθορισμό διακριτών ομάδων (Cancer Genome Atlas, 2015; Hayward et al., 2017). Η επιτυχία πρωτοποριακών μοριακών θεραπειών που στοχεύουν σε συχνά μεταλλαγμένα ογκογονίδια, υπογραμμίζει την κλινική σημασία της ενσωμάτωσης σημαντικών μοριακών χαρακτηριστικών στη διάγνωση και στον καθορισμό προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών του μελανώματος, ώστε να είναι δυνατή η εξατομικευμένη θεραπεία (Sosman et al., 2012; Long et al., 2014). Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα διαφορετικά πρότυπα έκθεσης στον ήλιο, συμπεριλαμβανομένου του τρόπου και της διάρκειας της έκθεσης, συνδυάζονται με διαφορετικές μεταλλάξεις γονιδίων-οδηγών στο μελάνωμα και, ενδεχομένως, με διαφορετικά ποσοστά

επιβίωσης (Whiteman et al., 2011; Robertson et al., 2017). Τα αποτελέσματα του TCGA και άλλων (Curtin et al., 2005; Hayward et al., 2017) συνηγορούν ότι το μελάνωμα μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις ευρείς-ετερογενείς μοριακούς υποτύπους (BRAFmut, RASmut, NF1mut και τριπλό wt) που βασίζονται στο πρότυπο των πλέον συχνά μεταλλαγμένων γονιδίων: *VRAF*, *BRAF*, *NRAS* & *NF1* (Hayward et al., 2017). Οι υπότυποι του μελανώματος διαφέρουν ως προς την προέλευση, τη θέση και το προφίλ μετάλλαξης. Από αυτές τις υποομάδες, ο πληθυσμός με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF* είναι ο πλέον διαδεδομένος, ακολουθούμενος από αυτόν με *NRAS* μεταλλαγή.

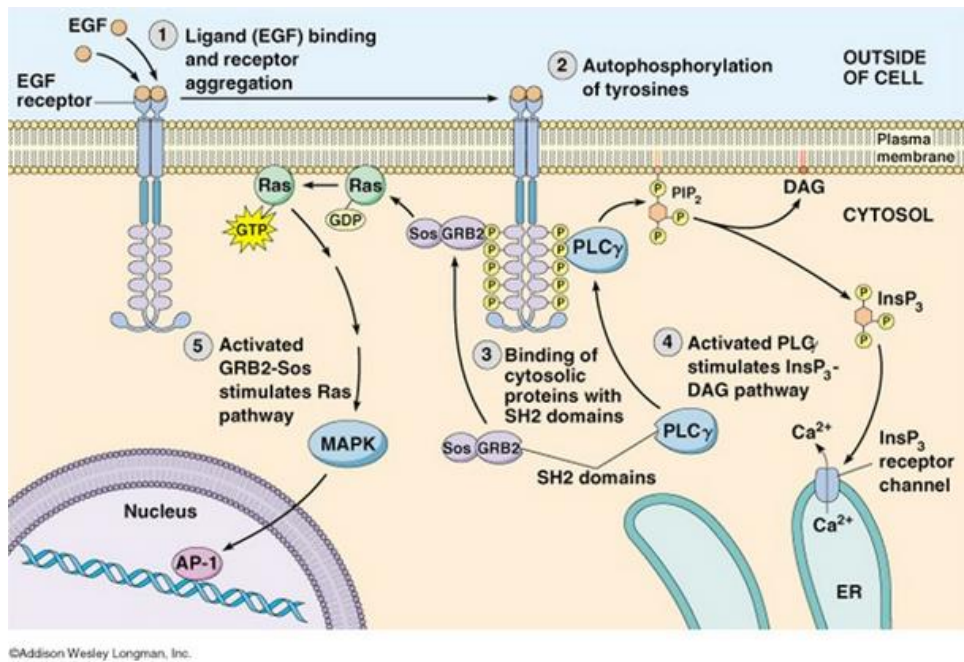
## 1.6 Μοριακές-Γενετικές Διαταραχές στο μελάνωμα

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν βρεθεί να είναι ισχυρά αποδιοργανωμένα στο μελάνωμα είναι:

- ❖ Το **σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών** (mitogen-activated protein kinase-MAPK) (**Εικόνα 1.23**), ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα *RAS*, *RAF* και *KIT*.
- ❖ Το **PI3K/AKT μονοπάτι**, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο *RAS*, μεταλλάξεων ή πλήρους έλλειψης του *PTEN* και απορρυθμισμένης έκφρασης της AKT.
- ❖ Τα **μονοπάτια Rb** και **p53** ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στους γενετικούς τόπους *CDKN2A/p14ARF/p16INK4A* και *p53*.

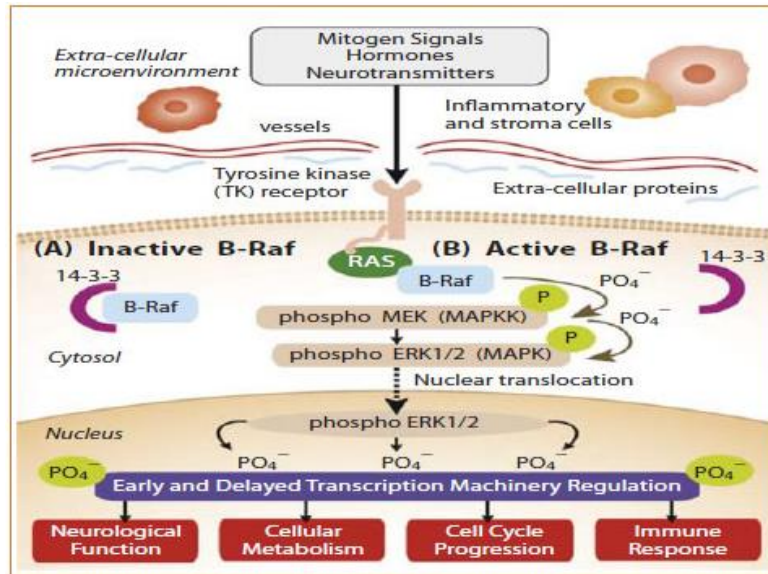
### 1.6.1 Οδός RAS/RAF/MAPK

Η οδός RAS/RAF/MAPK (**Εικόνα 1.24**) επάγεται από την ενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, RTKs. Το MAPK, είναι ένα υψηλά διατηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση. Μπορεί να ενεργοποιηθεί από ερεθίσματα από σηματοδοτικά μόρια, όπως υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνη (Wellbrock et al., 2004a; Gray-Schopfer et al., 2007).



Εικόνα 1.23. RTK σηματοδότηση (Ανατύπωση από Addison Wesley Longman, Inc).

Το μονοπάτι των MAPK είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο ογκογόνο μονοπάτι στο δερματικό μελάνωμα. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι υπάρχει αύξηση της ενεργότητας της οδού MAPK στο 98% των δειγμάτων μελανώματος που μελετήθηκαν (Hayward et al., 2017). Η απορρύθμιση του MAPK μονοπατιού είναι συχνά αποτέλεσμα ενεργοποιητικών μεταλλάξεων κυρίως στα ογκογονίδια *RAF* και *RAS* (15–30%) (Colombino et al., 2012). Αυτό οδηγεί σε υπερφωσφορυλίωση των ακόλουθων πρωτεϊνών MEK και ERK που προκαλούν και πάλι την απελευθέρωση μιας μεγάλης ποσότητας παραγόντων μεταγραφής (MITF), οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις στα *RAS* και *RAF* είναι αμοιβαία αποκλειόμενες στους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος (Brose et al., 2002; Hodis et al., 2012).



Εικόνα 1.24. Η οδός RAS/RAF/MAPK (Ανατύπωση από researchgate.net).

#### ▪ Το γονίδιο *RAS*

Οι *RAS* πρωτεΐνες (H, K και N-*RAS*) είναι μικρές GTPάσες εντοπισμένες στην εσωτερική μεριά της πλασματικής μεμβράνης, όπου δρουν σαν σημαντικοί μεσολαβητές της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Lowy et al., 1993). Η ενεργότητα της *RAS* ελέγχεται από την κυκλική εναλλαγή σύνδεσης σε αυτή GDP (απενεργοποίηση) και GTP (ενεργοποίηση) (Scheffzek et al., 1997).

Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο *RAS* έχει δειχθεί ότι σχετίζονται με την έκθεση στη UV ακτινοβολία. Οι μεταλλάξεις οδηγούν σε συστατική δέσμευση του GTP και στην μόνιμη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης *RAS*. Το τελευταίο έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχονται από αυτή. Αυτή η δυσλειτουργία προωθεί τον ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση, την αναστολή της απόπτωσης και τη χημειοαντίσταση.

Μεταλλάξεις *RAS* τυπικά συμβαίνουν στα κωδικόνια Q61, G12 ή G13. Το N-*RAS*, είναι η ισομορφή του *RAS* που βρίσκεται συχνότερα μεταλλαγμένη στο ανθρώπινο μελάνωμα με τις συχνότερες μεταλλάξεις να συμβαίνουν στο κωδικόνιο Q61. Αναλύσεις έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο *RAS* ανευρίσκονται σε ποσοστό περίπου 56% σε συγγενείς σπύλους, συγκριτικά με ποσοστό 33% στο πρωτοπαθές και 26% στο μεταστατικό μελάνωμα (Demunter et al., 2001). Μεταλλάξεις στα άλλα δύο μέλη της οικογένειας *RAS*, *HRAS* και *KRAS*, είναι λιγότερο συχνές (1-2%). Σε ζωικά μοντέλα, η



ογκογονικότητα του μεταλλαγμένου *H-RASG12V* έχει δειχθεί να είναι αυξημένη σε ποντίκια με έλλειψη του *p16Ink4a*, μεταλλάξεις στο *P53* (Bardeesy et al., 2001) και εκτεθειμένα σε UV ακτινοβολία (Hacker et al., 2005).

#### ▪ Το γονίδιο *BRAF*

Το ανθρώπινο γονίδιο *BRAF*, που εδράζεται στο 7q34 χρωμόσωμα, κωδικοποιεί μια κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης που ανήκει στην οικογένεια των Raf κινασών. Παρόμοια με τα γονίδια *RAS*, η *RAF* αναγνωρίστηκε αρχικά ως το κυτταρικό ομόλογο του *v-raf*, ενός γονιδίου που βρίσκεται σε ένα μετασχηματισμένο ρετροϊό ποντικού (Rapp et al., 1983). Η πρώτη ισομορφή που εντοπίστηκε ήταν η *CRAF*. Τα σπονδυλωτά φέρουν δύο άλλες ισόμορφες, *ARAF* και *BRAF* (Wellbrock et al., 2004). Η *BRAF*, σε σύγκριση με τις άλλες δύο λειτουργικές Raf κινάσες, έχει την υψηλότερη βασική δραστηριότητα κινάσης και είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK (Johnson & Lapadat, 2002).

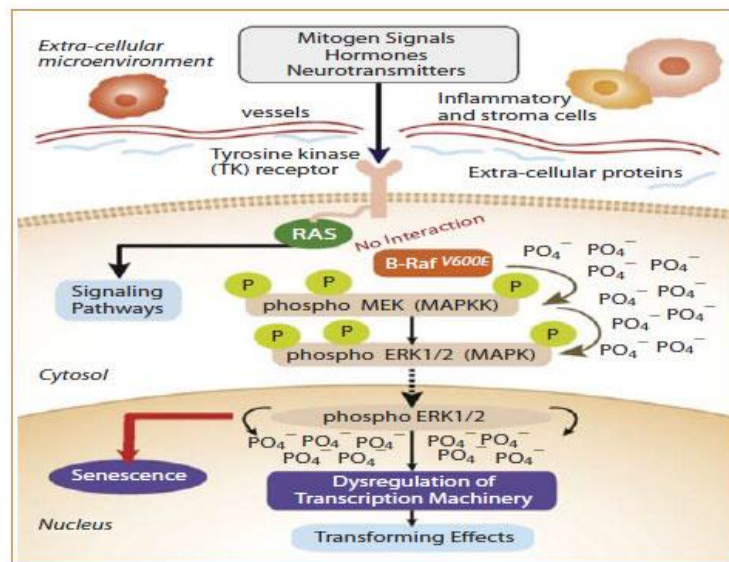
Τα τελευταία 20 χρόνια, η μετάλλαξη *BRAF* αποτέλεσε αντικείμενο πολλών ερευνών. Μεταλλάξεις στο *BRAF* είναι πολύ συχνές στον ανθρώπινο καρκίνο (7%) με πιο συχνή εμφάνιση στο κακοήθες μελάνωμα (27-70%), στον καρκίνο του θυρεοειδή (36-53%), του παχέος εντέρου (5-22%) και στον καρκίνο των ωοθηκών (30%). Σε αντίθεση με άλλους τύπους καρκίνου, έχει δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις *BRAF* στο μελάνωμα είναι πιο διαδεδομένες σε νεαρούς ασθενείς με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 33 έτη και κυρίως γυναίκες (Botton et al., 2019). Έχουν βρεθεί πάνω από 40 ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *BRAF*, με την *BRAFV600E* την πιο κοινή, που απαντά στο 92% των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του *BRAF* στο σποραδικό μελάνωμα και στο 82% στους καλοήθεις σπίλους (Davies et al., 2002; Kumar et al., 2003; Pollock et al., 2003a). Η μετάλλαξη *BRAF* προτείνεται ως ένα πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη του μελανώματος, καθώς υπάρχει σε σημαντικό αριθμό καλοήθων σπίλων.

Η *BRAFV600E*, μια μεταλλαγμένη μορφή, προκύπτει γενετικά από μια μεταστροφή T1799A του κωδικονίου 600 του εξωνίου 15 που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από γλουταμικό οξύ. Η μετάλλαξη αυτή αποσταθεροποιεί την ανενεργή διαμόρφωση της πρωτεΐνης προκαλώντας την συνεχή της ενεργοποίηση, και τελικά την ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK (Εικόνα 1.25), γεγονός που έχει ογκογενετικές συνέπειες (Davies et al., 2002; Wan et al., 2004). Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη *BRAFV600E* βρέθηκε να μετασχηματίζει τους NIH3T3 ινοβλάστες και τα μελανοκύτταρα ποντικού με αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού τους *in vitro*, ενεργοποίηση της ERK και καρκινογένεση *in vivo* (Wan et al., 2004; Wellbrock et al., 2004a). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι καλοήθεις σπίλοι με μεταλλαγμένο το *BRAF*

μπορεί να αποφύγουν τη γήρανση/senescence και να εξελιχθούν σε μελάνωμα, γεγονός που μπορεί να εξηγεί τα αυξημένα ποσοστά μεταλλάξεων στο σποραδικό μελάνωμα (Wellbrock et al., 2004b; Dhomen et al., 2009).

Η *BRAFV600E* ανευρίσκεται σε ποσοστό 40-60% των μελανωμάτων. Τα αποτελέσματα άλλων λιγότερο συχνών μεταλλάξεων στο BRAF έχουν επίσης μελετηθεί. Ανάμεσα σε αυτές είναι η *BRAFV600K* που βρίσκεται σε ποσοστό ~12% και οι *BRAFV600R* & *BRAFV600D* που και οι δύο βρίσκονται στο ~5% (Lovly et al., 2012). Η παρουσία *BRAF* μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί σε κάποιες μελέτες με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με μελάνωμα (Mann et al., 2013). Ωστόσο, η προγνωστική αξία των μεταλλάξεων βρίσκεται ακόμα υπό συζήτηση.

Μέχρι σήμερα, η άμεση ανάλυση της πρωτεΐνης BRAF σε μελανώματα έχει επιτευχθεί με ανοσοϊστοχημεία (Anwar et al., 2016). Συγκριτικά με τις γενετικές αναλύσεις, οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των μεταλλαγμάτων *BRAF*. Σήμερα, ωστόσο, οι κύριοι περιορισμοί της ανοσοϊστοχημικής προσέγγισης σχετίζονται με την πιθανότητα ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων εξαιτίας του υψηλού βαθμού ετερογένειας και της εμφανούς μεταβλητότητας των μεταλλαγών *BRAF* (Nielsen et al., 2018).



**Εικόνα 1.25.** Διαταραχή του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK στο μελάνωμα-*BRAFV600E* (Ανατύπωση από researchgate.net).

## 1.6.2 Οδός PI3K/PTEN/AKT/mTOR

Η οδός PI3K/PTEN/AKT/mTOR επάγεται από την ενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης-RTKs. Το μονοπάτι RTK/Ras/PI3K συνολικά είναι υπεύθυνο για τη μεταβίβαση σημάτων ανάπτυξης και διαίρεσης από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου. Η δραστηριότητα της κινάσης PI3K ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN*, το οποίο εδράζεται στο χρωμοσωμικό βραχίονα 10q. Στο μελάνωμα, η απώλεια *PTEN* και η ενίσχυση της *AKT* είναι κοινά γεγονότα και έχουν τεκμηριωθεί σε μεγάλο βαθμό (Ohgaki & Kleihues, 2009).

### ▪ Το γονίδιο *PTEN*

Ένα γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο χρωμόσωμα 10, το *PTEN* δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της οδού σηματοδότησης της κινάσης PI3K και εμπλέκεται σε πλήθος καρκίνων. Το PIP3 είναι ένα μόριο-κλειδί σηματοδότησης του κυττάρου που καταλύεται από το PIP2 μέσω της PI3K (Salmena et al., 2008). Το PTEN υδρολύει το PIP3 για να δημιουργήσει PIP2 και DAG (Carracedo et al., 2008).

Στο μελάνωμα, η απώλεια του *PTEN* θεωρείται ότι εμφανίζεται νωρίς στην καρκινογένεση, όπως φαίνεται στις πρωτογενείς βλάβες που φέρουν απώλεια ενός αλληλομόρφου του *PTEN* ή ολόκληρου του χρωμοσώματος 10 (Wu et al., 2003). Διάφορες μεταβολές στο *PTEN* έχουν ταυτοποιηθεί και περιλαμβάνουν απώλεια αλληλομόρφου σε ποσοστό 20%, αλλοιωμένη έκφραση σε 40% των μελανωμάτων και ημιζυγωτικής διαγραφής και αδρανοποίηση σε 57-60% των κυτταρικών σειρών μελανώματος. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει απώλειες στο 63-70% των μελανωμάτων (Gast et al., 2010) και συγκεκριμένα στο 4-25% των μελανωμάτων των βλεννογόνων (Rabbie et al., 2019).

Η εξάλειψη, η μετάλλαξη ή η απενεργοποίηση του *PTEN* οδηγεί σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση των τελεστών της οδού PI3K (Suzuki et al., 1998). Η έλλειψη του λειτουργικού *PTEN* φαίνεται να ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση αυξάνοντας την έκφραση του BCL-2 και μειώνοντας την ευαισθησία/ αυξάνοντας στην αντίσταση σε χημειοθεραπευτικούς/λοιπούς θεραπευτικούς παράγοντες (Stahl et al., 2004; Madhunapantula et al., 2007). Η έκτοπη έκφραση του *PTEN* σε κύτταρα μελανώματος που στερούνται λειτουργικές πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της AKT, αυξάνει την απόπτωση και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η μείωση του PTEN αγρίου τύπου με χρήση siRNA έχει αποδείξει ότι έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT3, πράγμα που ενισχύει τη συμμετοχή της στην παθογένεση του μελανώματος (Stahl et al., 2004).

Επιπλέον, άλλες μελέτες έχουν εντοπίσει το λειτουργικό πλεονασμό μεταξύ της απώλειας *PTEN* και της μετάλλαξης *RAS* και έχουν δείξει ότι αυτά τα δύο γονίδια είναι αμοιβαία αποκλειόμενα στην ανάπτυξη μελανώματος. Δε νομο μεταλλάξεις του *RAS* έχουν παρατηρηθεί σε ένα μοντέλο ποντικών *PTEN* *+/+* ενώ τα μελανώματα *PTEN* *+/-* έδειξαν μειωμένη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων *Ras*, ενώ οι ποντικοί *PTEN* *-/-* δεν παρουσίασαν καθόλου μεταλλάξεις στο *RAS* (Mao et al., 2004). Περαιτέρω, οι Tsao et al, παρατηρούσαν παρόμοια αποτελέσματα σε ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές μελανώματος όπου κύτταρα με απώλεια *PTEN* δεν είχαν μεταλλάξεις *RAS* (Tsao et al., 2004). Στη μελέτη αυτή, επίσης διαπιστώθηκε ότι μία κυτταρική σειρά είχε ταυτόχρονη απώλεια *PTEN* με μετάλλαξη *NRAS*. Επιπλέον, οι Nogueira et al, διαπίστωσαν ότι περίπου το 14% των ανθρώπινων μελανωμάτων που αναλύθηκαν σε μια μελέτη είχαν μετάλλαξη *NRAS* εκτός από την απώλεια του *PTEN* (Stahl et al., 2004).

#### ▪ **Γονίδιο *AKT***

Η συσσωρευμένη *PIP3*, συνδέεται απευθείας με την *PDK1*, η οποία μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την κινάση σερίνης/θρεονίνης *AKT*. Η *AKT* έχει τρεις ισομορφές *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*. Αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην πρόληψη της απόπτωσης και στην ενεργοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης (Manning et al., 2007).

Η έκφραση αυτών των τριών ισομορφών έχειδειχθεί ότι είναι διαφορετική μεταξύ των ιστών. Και οι τρεις ισομορφές έχουν συνδεθεί με καρκίνους του στομάχου, του μαστού, του παγκρέατος και των ωοθηκών. Οι *AKT2* και *AKT3* εμφανίστηκαν ως οι κυρίαρχες μορφές που απορρυθμίζονται στο μελάνωμα. Η ενεργοποιημένη *AKT3* έχει ανιχνευθεί στο 43-60% του σποραδικού μεταστατικού μελανώματος. Επιπλέον, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης *AKT3* βρέθηκαν να συσχετίζονται με την εξέλιξη του μελανώματος, υποδηλώνοντας ότι η *AKT3* μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στην επιθετικότητα των μελανωμάτων. Εκτός από την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων που οδηγεί σε ακατάλληλη ενεργοποίηση της *AKT3*, έχει αποδειχθεί ότι και η απώλεια του *PTEN* συμβάλλει στην αύξηση της ενεργοποίησης της *AKT3*. Η μείωση των επιπέδων της *AKT3* με *siRNA* οδηγεί στη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και της ανάπτυξης του μελανώματος (Tran et al., 2008).

Η *AKT3* έχει επίσης αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην αντοχή των κυττάρων σε αναστολείς *BRAF* και η καταστολή της *AKT3* μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένες κλινικές αποκρίσεις με αναστολείς *BRAF* (Shao et al., 2010). Η υπερενεργοποίηση της *AKT2* έχει επίσης εντοπιστεί στο μελάνωμα, στο

καρκίνωμα του μαστού και των ωοθηκών. Η έκφραση του AKT2 στο μελάνωμα έχει καθιερωθεί σε πολλά διαφορετικά μοντέλα μελανώματος, με υπόβαθρο μεταλλαγμένου *RAS*. Οι Nogueira et al, έχουν επίσης δείξει ότι η απώλεια PTEN σε ένα υπόβαθρο μετάλλαξης του *RAS* μπορεί να οδηγήσει σε επιλεκτική ενεργοποίηση της AKT2 (Nogueira et al., 2010). Συμπερασματικά, ανεξάρτητα από το ποια ισόμορφη της AKT εμπλέκεται στο μελάνωμα, η οδός PI3K / AKT είναι ένας σημαντικός θεραπευτικός στόχος στο μελάνωμα.

### 1.6.3 Οδός P53/MDM2/p14<sup>ARF</sup>

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 στη θέση 13 (17p13) και κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 53 kDa, η οποία αποτελείται από 393 αμινοξέα. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 (wild type) παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας επί βλάβης του DNA τη μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση, στην έναρξη της επιδιόρθωσης και στην αντιγραφή του DNA, στην επαγωγή της απόπτωσης κάτω από ορισμένες συνθήκες και τέλος στην επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης (Hall & Lane, 1994).

Οι διαταραχές του γονιδίου *TP53* αποτελούν τις συχνότερες μοριακές μεταβολές στα κακοήθη νεοπλάσματα (Hall, 1996). Αποτέλεσμα των γονιδιακών μεταλλαγών είναι η παραγωγή μιας τροποποιημένης, ως προς τη δομή και λειτουργία, πρωτεΐνης, η οποία δρα τελικά ως ογκογονίδιο. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* συνήθως ταυτοποιούνται με αλληλούχιση του γονιδίου και οδηγούν σε συσσώρευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στον πυρήνα. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 έχει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής, με αποτέλεσμα την ανοσοϊστοχημική της ανίχνευση. Παρότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση δεν ταυτίζεται απόλυτα με την παρουσία μετάλλαξης, η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανοσοϊστοχημείας προσεγγίζουν το 90% και 98% αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* (missense mutations) στα περισσότερα νεοπλάσματα, παρατηρούνται συχνότερα στα εξώνια 5-8. Η δυσλειτουργία της πρωτεΐνης p53 διαταράσσει την οδό p14<sup>ARF</sup>, καθυστερεί την απόπτωση και επάγει περαιτέρω την αστάθεια του γονιδιώματος (Krakstad & Chekenya, 2010).

Εκτός από την παρουσία των μεταλλάξεων, η λειτουργία της πρωτεΐνης p53 διαταράσσεται και από μία άλλη πρωτεΐνη, την MDM2. Η τελευταία, αποτελεί προϊόν του ογκογονιδίου *MDM2* που βρίσκεται στο 12q14.3-q15. Η πρωτεΐνη MDM2 δεσμεύει τη φυσιολογική μορφή της p53, αναστέλλει τη ρυθμιστική μεταγραφική δραστηριότητά της, ενώ παράλληλα ευοδώνει την αποικοδόμησή της από το σύστημα της ουβικιτίνης. Επί βλάβης του γενετικού υλικού, ενεργοποιείται μια ειδική κινάση, η

πρωτεϊνική κινάση Atm, η οποία παρεμποδίζει τη δέσμευση της MDM2 με την p53, μέσω φωσφορυλίωσης της τελευταίας σε θέσεις σερίνης από την CDK2. Η πρωτεΐνη p14ARF προσδένεται απευθείας στο MDM2 και αναστέλλει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53.

Η συσχέτισή του γονιδίου *TP53* με το μελάνωμα είναι τόσο αμφιλεγόμενη όσο και σπάνια. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις γαμετικών κυττάρων στην *TP53* σε ασθενείς με πολλαπλά πρωτοπαθή μελανώματα (Kollipara et al., 2014).

#### **1.6.4 Οδός p16INK4a/CDK4/RB1**

Η οδός p16/CDK4/RB1 καθορίζει την αρχή του κυτταρικού κύκλου καθώς εμπλέκεται στον έλεγχο της μετάβασης του κυττάρου από τη G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F συνδέεται με την πρωτεΐνη Rb, η οποία φυσιολογικά δεν φωσφορυλιώνεται. Το σύμπλοκο Rb-E2F περιορίζει την πρόσβαση σε μεταγραφικούς παράγοντες. Το γονίδιο *RB* ρυθμίζεται αρνητικά από το σύμπλεγμα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) και συγκεκριμένα των CDK4, CDK2 και CDK6. Η φωσφορυλίωση-απενεργοποίηση της Rb από το σύμπλεγμα CDK4/κυκλίνη D1, οδηγεί στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς απελευθερώνεται ο παράγοντας E2F, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που προάγουν τη σύνθεση DNA (Goldhoff et al., 2012). Η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RB* και σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η πρωτεΐνη p16 αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου CDK4/κυκλίνη D1.

#### **▪ Ο γονιδιακός τύπος CDKN2A**

Μεταλλάξεις στο *CDKN2A*, οδηγούν στην απώλεια των *p16INK4a* και *p14ARF* και στη διαταραχή των μονοπατιών των RB και p53, αντίστοιχα. Περίπου το 30-40% των συγγενών μελανωμάτων έχει βρεθεί ότι φιλοξενούν μεταλλάξεις στο *CDKN2A*, τη συνηθέστερη γονιδιακή μετάλλαξη που παρατηρείται σε οικογένειες μελανώματος (Goldstein et al., 2007). Οι περισσότερες μεταλλάξεις συμβαίνουν στα εξόνια 1α και 2, αν και έχουν αναφερθεί επίσης πολλαπλές διαφορετικές μεταλλάξεις, οι οποίες είναι μοναδικές για συγκεκριμένους πληθυσμούς και τη γεωγραφική τους προέλευση. Το *CDKN2A* είναι επίσης το πιο συχνά επηρεασμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο σποραδικό μελάνωμα (Curtin et al., 2005). Απώλειες του *CDKN2A*, συχνά διαλληλικές, εντοπίζονται στο 50-80% των σποραδικών μελανωμάτων (Gast et al., 2010) και η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου έχει περιγραφεί στο 9-28% των όγκων (Bennett et al., 2008).

### 1.6.5 Άλλες γενετικές διαταραχές

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο *CDC48* είναι ικανό να προάγει την κακοήγη εξέλιξη του δερματικού μελανώματος και σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Ci et al., 2019). Η κωδικοποιημένη από *CDKN2B* πρωτεΐνη p15 έχει μελετηθεί λιγότερο καλά αλλά έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μελανοκυτταρικούς όγκους και η απώλειά της προάγει τη μελανογένεση (Mc Neal et al., 2015). Οι αλλαγές που επηρεάζουν πολλά άλλα γονίδια είναι επίσης συχνές, ιδιαίτερα σε προχωρημένο μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένων των *ARID2*, *RAC1* και *SF3B1*. Αναλύσεις ανθρωπίνων μελανωμάτων έχουν επίσης δείξει χαμηλή επίπτωση (3-8%) σωματικών μεταλλάξεων στο *MEK* (Murugan, et al., 2009). Το *KIT* είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης τύπου III. Η συχνότητα των μεταλλάξεων του *KIT* ποικίλλει (2% -21%) ανάλογα με τον υπότυπο μελανώματος. Συχνότερες μεταλλάξεις (ενισχύσεις) του γονιδίου έχουν καταγραφεί στο 7-25% των μελανωμάτων των βλεννογόνων (Rabbie et al., 2019) και συγκεκριμένα στα εξώνια 9 και 11. Μελέτες σε ασθενείς με ήδη ανιχνευμένες αλλοιώσεις στο *KIT* έδειξαν αποκρίσεις στη θεραπεία, κυρίως σε εκείνες τις περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο εξώνιο 11 (L576P) και το εξώνιο 13 (K642E) (Hodi et al., 2013).

#### ▪ Γονίδιο *NF1*

Το *NF1* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο απενεργοποιείται με γαμετικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με νευροϊνωμάτωση τύπου 1 (Cawthon, et al., 1990). Αδρανοποιείται σε έναν αριθμό κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένων των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα, των νευροβλαστωμάτων και των γλοιοβλαστωμάτων (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Το *NF1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, τη νευροφιομπρομίνη 1, η οποία αλληλοεπιδρά με τη RAS και ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία της προάγοντας την υδρόλυση του συνδεδεμένου με RAS GTP σε GDP. Η λειτουργική απενεργοποίηση του *NF1* οδηγεί έτσι στην ενεργοποίηση του RAS και των καθοδικών οδών σηματοδότησης. Δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το *NF1* μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των μελανωμάτων με μετάλλαξη στο *BRAF*, καθώς και σε όγκους ανθεκτικούς σε αναστολείς *BRAF* (Maertens, et al., 2013). Αν και η απώλεια *NF1* σε *BRAF* μεταλλαγμένους όγκους οδήγησε σε αντίσταση σε ορισμένους αναστολείς *BRAF* (PLX4720) και αναστολείς *MEK*, οι όγκοι εξακολουθούσαν να ανταποκρίνονται στη θεραπεία είτε με συνδυασμό αναστολέα *MEK* και mTOR, μη αναστρέψιμου αναστολέα *RAF* (AZ628), και έναν αναστολέα *ERK*. Επομένως, ο προσδιορισμός της κατάστασης του *NF1* στα μελανώματα μπορεί να είναι σημαντικός για τη λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία.

## ▪ Γονίδιο *TERT*

Το γονίδιο της τελομεράσης *TERT* εντοπίζεται στη θέση 5p15.33 και κωδικοποιεί τον ενζυμικό πυρήνα της τελομεράσης. Τα τελομερή, είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, καθώς το κύτταρο διαιρείται, τα τελομερή γίνονται προοδευτικά μικρότερα. Η τελομεράση εξουδετερώνει τη μείωση των τελομερών με την προσθήκη μικρών τμημάτων DNA στο τέλος του χρωμοσώματος μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Η ενισχυμένη δραστηριότητα της τελομεράσης διευκολύνει την κυτταρική αθανασία και επάγει την ογκογένεση. Οι μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *TERT* αποκαλύπτουν θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμίζουν εκ των προτέρων την έκφραση του γονιδίου *TERT* και την δραστηριότητα της κυτταρικής τελομεράσης (Huang et al., 2013).

Οι μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή του *TERT* έχουν ταυτοποιηθεί σε έναν αριθμό πρωτοπαθών καρκίνων (Tapper et al, 2015). Οι μεταλλάξεις του υποκινητή του *TERT* στο οικογενειακό μελάνωμα έχουν εντοπιστεί, αλλά είναι εξαιρετικά σπάνιες. Σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών του Ηνωμένου Βασιλείου, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TERT* αντιπροσώπευαν λιγότερο από 1% των περιπτώσεων οικογενειακού μελανώματος. Οι μεταλλάξεις του υποκινητή *TERT* ανιχνεύονται σε ποσοστό έως και 80% των σποραδικών δερματικών μελανωμάτων (Jacket & Scolyer, 2019).

## ▪ Γονίδιο *MYC*

Ένα ακόμη καλά μελετημένο γονίδιο στο μελάνωμα είναι το *c-MYC*, το οποίο εμπλέκεται σε πιο επιθετικά μελανώματα κάθετης φάσης ανάπτυξης και οδηγεί στην εξέλιξη τους σε μεταστατικό μελάνωμα. Το *c-Myc* είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που επάγει τον κυτταρικό μετασχηματισμό και ρυθμίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Πρόσφατα, το γονίδιο *c-Myc* αναφέρθηκε ότι προάγει την ογκογένεση του μελανώματος με την προαγωγή της αγγειογενετικής μίμησης μέσω της οδού σηματοδότησης BAX. Υπάρχουν λίγες αναφορές που δείχνουν ότι η αυξητική ρύθμιση της οικογένειας γονιδίων *CALM* (*CALM1*, *CALM2* και *CALM3*) στο μελάνωμα συσχετίστηκε με κακή πρόγνωση. Η έκφραση του γονιδίου *BAX* συνδέεται με τη βραχύτερη επιβίωση του ασθενούς, τη χημειοαντοχή και την επανεμφάνιση του μελανώματος. Η έκφραση του *MYC* μπορεί να κατασταλεί με θεραπεία με αναστολείς BRAF/MEK. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι η ανάκτηση της υπερέκφρασης του *MYC* έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην αντίσταση σε αυτές τις θεραπείες. Η κατανόηση των κλινικών και βιολογικών επιπτώσεων της υπερέκφρασης του *c-Myc* στο μελάνωμα υπογραμμίζει το *c-Myc* μπορεί να είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στο μελάνωμα (Lin et al., 2017).



### ▪ Γονίδιο *BRCA2*

Το γονίδιο του καρκίνου του μαστού 2 (*BRCA2*) είναι ένα ογκοκασταλτικό γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και είναι σημαντικό στην επιδιόρθωση του DNA ρυθμίζοντας τη χρωμοσωμική σταθερότητα μέσω της αλληλεπίδρασης του με το RAD51 (Davies et al., 2002). Οι μεταλλάξεις στο *BRCA2* συνδέονται σαφώς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλών τύπων καρκίνου. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί επίσης να επηρεάσουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη και του μελανώματος. Το Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) εξέτασε 3278 άτομα με επιβεβαιωμένες ή υποψιαζόμενες μεταλλάξεις στο *BRCA2* και διαπίστωσε ότι οι φορείς είχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (Journal of the National Cancer Institute, 1999). Οι μετέπειτα μελέτες επιβεβαίωσαν, αλλά ούτε κατάφεραν να καταρρίψουν αυτήν την πληροφορία. Επιπλέον, δεν έχουν αναφερθεί μελέτες για αυξημένο κίνδυνο για μελάνωμα που να σχετίζεται με το *BRCA1*.

### ▪ Γονίδιο *MGMT*

Η μεθυλτρανσφεράση O-6-μεθυλγουανίνης-DNA (*MGMT*) είναι ένα ένζυμο που παίζει προστατευτικό ρόλο στην επιδιόρθωση DNA με την απομάκρυνση αλκυλομάδων. Το γονίδιο *MGMT* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 και οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο είναι σπάνιες.

Μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε μόνο μία οικογένεια με μεταλλαγμένη *MGMT* από 64 οικογένειες με αυξημένη προδιάθεση για μελάνωμα (Appelqvist et al., 2014). Το επίπεδο δραστηριότητας αυτού του γονιδίου έχει επίσης μελετηθεί ως δείκτης ευαισθησίας στα αλκυλιωτικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, με υψηλότερα επίπεδα που συσχετίζονται με την αντοχή στα φάρμακα (Erice et al., 2015). Επομένως, ο προσδιορισμός του επιπέδου αυτού του γονιδίου σε ασθενείς με μελάνωμα που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία μπορεί να έχει κάποια προγνωστική αξία.

### ▪ Γονίδιο *BAP1*

Η *BAP1* (πρωτεΐνη σχετιζόμενη με *BRCA1*) είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, της οποίας το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3. Οι μεταλλάξεις των γαμετικών κυττάρων στην πρωτεΐνη προδιαθέτουν την ανάπτυξη διαφόρων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος (Wiesner et al., 2012).

### ▪ Γονίδια *CDK4/6*

Οι μεταλλάξεις βλαστικής σειράς στα *CDK4* και *CDK6* επιτρέπουν στα κύτταρα να προχωρήσουν μέσω του κυτταρικού κύκλου πιο γρήγορα παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται με μεταλλάξεις στο *CDKN2A*. Οι μεταλλάξεις στο *CDK4* είναι πολύ σπάνιες, ανιχνεύονται κυρίως στα μελάνωματα των βλεννογόνων, αλλά έχουν περιγραφεί σε μικρό αριθμό οικογενειών με μελάνωμα αρνητικό κατά *CDKN2A* (Punternvoll et al., 2013).

### ▪ Γονίδιο *MC1R*

Τοποθετημένο στο χρωμόσωμα 16, το γονίδιο του υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (*MC1R*) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες που δεσμεύει την ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων άλφα ( $\alpha$ -MSH) και στη συνέχεια παράγει cAMP μέσω της αδενυλικής κυκλάσης. Αυτή η αύξηση του cAMP προάγει την παραγωγή της καφέ/μαύρης ευμελανίνης έναντι της κόκκινης / κίτρινης χρωστικής φαιομελανίνης. Οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *MC1R* είναι συνήθεις στο γενικό πληθυσμό. Ειδικές παραλλαγές του *MC1R* διαταράσσουν τη σηματοδότηση και την έκφραση του υποδοχέα του  $\alpha$ -MSH στην κυτταρική επιφάνεια, που έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αναλογία παραγωγής φαιομελανίνης. Οι παραλλαγές του γονιδίου *MC1R* είναι παρούσες σε περισσότερο από 80% των ατόμων με ανοιχτό χρώμα δέρματος ή/και με τον φαινότυπο του κόκκινου χρώματος των μαλλιών (Valverde et al., 1995).

Οι Valverde et al., ήταν οι πρώτοι που περιγράφουν συσχέτιση μεταξύ μη-συνώνυμων ή παρανοηματικών μεταλλάξεων του *MC1R* και του αυξημένου κινδύνου για το μελάνωμα. Η αυξημένη επικράτηση των παραλλαγών του *MC1R* σε περιπτώσεις μελάνωματος συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες μετέπειτα μελέτες (Pasquali et al., 2015). Οι παραλλαγές του *MC1R* εμφανίζουν περίπου διπλάσια έως τετραπλάσια αύξηση του κινδύνου μελάνωματος και αυτός ο κίνδυνος φαίνεται να είναι πρόσθετος σε άτομα που μεταφέρουν περισσότερες από μία. Είναι ενδιαφέρον ότι η σύγκριση μεταξύ των παραλλαγών του *MC1R* και της ευαισθησίας στο μελάνωμα φαίνεται να είναι ισχυρότερη σε άτομα με σκούρο χρώμα δέρματος, υποδηλώνοντας ότι οι παραλλαγές του *MC1R* μπορεί να προάγουν την ανάπτυξη μελάνωματος μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος είναι τουλάχιστον εν μέρει ανεξάρτητος από τη δερματική χρώση.

Οι παραλλαγές του *MC1R* αλληλεπιδρούν επίσης με τον κίνδυνο άλλων γονιδίων, όπως του *CDKN2A*, για να αυξήσουν τον κίνδυνο μελάνωματος. Μια μελέτη εξέτασε 815 μεταλλάξεις του *CDKN2A* από 186 οικογένειες και διαπίστωσε ότι η παρουσία μιας από τις τέσσερις πιο συνήθεις

παραλλαγές του MC1R (V60L, V92M, R151C και R160W) διπλασίασε τον κίνδυνο μελανώματος ενός ατόμου και η παρουσία δύο ή περισσότερων παραλλαγών αύξησε τον κίνδυνο μελανώματος σχεδόν έξι φορές (Demenaïs, et al., 2012).

#### ▪ Γονίδιο *MITF*

Ο μεταγραφικός παράγοντας που σχετίζεται με τη μικροφθαλμία (*MITF*) έχει σημαντικές λειτουργίες στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων. Ενεργοποιείται επίσης καθοδικά της οδού σηματοδότησης MC1R/ cAMP για την παραγωγή της ευμελανίνης. Η ταυτοποίηση της παραλλαγής του *MITF* E318K βρέθηκε τόσο σε οικογενειακά όσο και σε σποραδικά μελανώματα. Η παραλλαγή E318K προσδίδει μια κατά προσέγγιση διπλάσια αύξηση του κινδύνου μελανώματος και σχετίζεται με συγκεκριμένους φαινοτύπους, συμπεριλαμβανομένου του μη-μπλε χρώματος των ματιών, του αυξημένου αριθμού σπίλων και των πολλαπλών πρωτογενών μελανωμάτων (Berwick et al., 2014).

#### ▪ Γονίδιο *POT1*

Το γονίδιο προστασίας των τελομερών 1 (*POT1*) είναι ένα εξαιρετικά διεισδυτικό γονίδιο ευαισθησίας στο μελάνωμα που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Δύο πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει εννέα γαμετικές παραλλαγές αυτό το γονίδιο σε 13 οικογένειες επιρρεπείς σε μελάνωμα, παρόλο που οι μεταλλάξεις *POT1* παρατηρήθηκαν συχνότερα σε σποραδικά μελάνωμα (Shi et al., 2014).

#### ▪ Γονίδιο *IDH1*

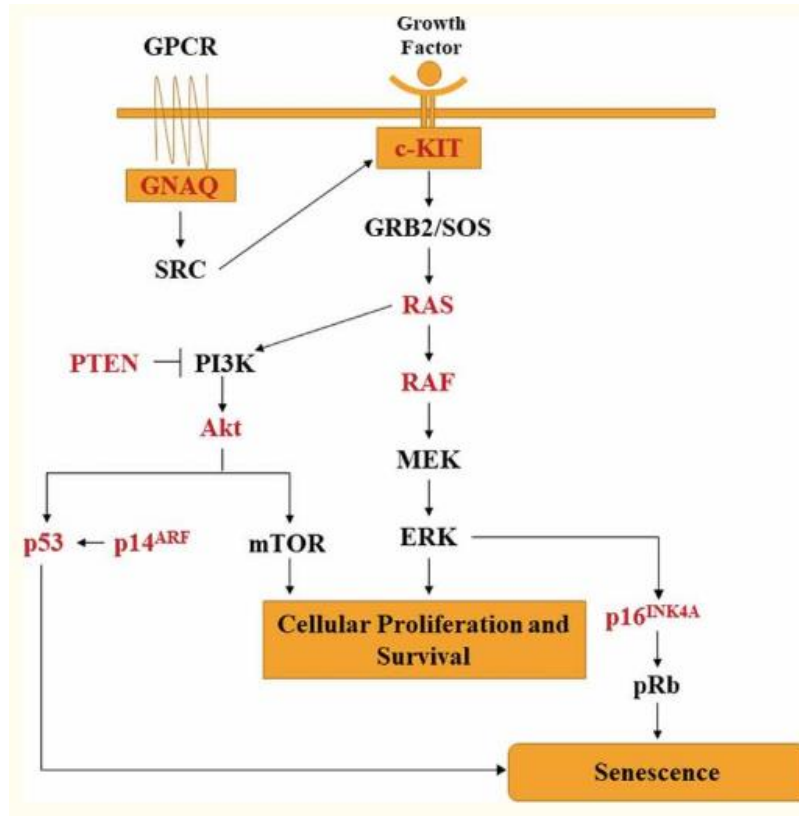
Η ισοκιτρική αφυδρογονάση *IDH* είναι ένα ένζυμο που συναντάται σε τρεις ισομορφές: *IDH1*, *IDH2* και *IDH3*, οι οποίες κωδικοποιούνται από πέντε γονίδια (Nørgaarde et al., 2016). Η πρωτεΐνη *IDH1* είναι κυρίαρχα κυτταροπλασματική ενώ οι *IDH2* και *IDH3* βρίσκονται κυρίως στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η πρωτεΐνη *IDH3* καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού οξέος σε άλφα-κετογλουταρικό άλας (α-KG), μια διεργασία κατά την οποία παράγεται *NADH* στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Krebs's cycle). Οι άλλες δύο ισομορφές, *IDH1* και *IDH2*, καταλύουν μεν την ίδια αντίδραση, αλλά εκτός του κύκλου κιτρικού οξέος, και χρησιμοποιούν *NADP<sup>+</sup>* ως συμπαραγόνα (Miller et al., 2017). Τα παράγωγα *NADPH* και α-KG συμμετέχουν στις διαδικασίες κυτταρικής αποτοξίνωσης σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, το α-KG έχει δειχθεί ότι χρησιμεύει ως

συμπαράγοντας για αρκετές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των τροποποιήσεων της ιστόνης, της ανίχνευσης υποξίας και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων.

Το γονίδιο *IDH1* κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη, την IDH1, η οποία στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (2q33.3) (Montgomery et al., 2015). Η πρωτεΐνη IDH1 συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης (Dimitrov et al., 2015) και αποτελεί την πρωταρχική πηγή του NADPH στους περισσότερους ιστούς και ιδιαίτερα στον εγκέφαλο. Αποτελεί επίσης, το “κλειδί” για την β-οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα ηπατικά κύτταρα (Xu et al., 2004). Σχετικά συχνές (ποσοστό 4,9%) μεταλλάξεις *IDH1* ανιχνεύθηκαν επίσης στο μεταστατικό μελάνωμα που σχετίζεται με μετάλλαξη *NRAS* (Ticha et al., 2019).

#### ▪ **Γονίδια *XP***

Η μελαγχρωματική ξηροδερμία (*XP*) είναι μια σπάνια ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις γονιδίων επιδιόρθωσης DNA, *XPA*, *XPB*, *XPD*, *XPE*, *XPF*, *XPG* ή *XP-V*. Αν και οι μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από αυτές τις οκτώ νουκλεάσες καταλήγουν σε *XP*, *XPA* και *XPC* είναι οι συχνότερα μεταλλαγμένες και αντιπροσωπεύουν τις μισές περιπτώσεις του *XP*. Τα άτομα με *XP* δεν είναι σε θέση να επιδιορθώσουν αποτελεσματικά τις βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία και συνεπώς έχουν εξαιρετικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνων του δέρματος. Ο κίνδυνος μελανώματος που σχετίζεται με αυτούς τους ασθενείς εκτιμάται ότι είναι σχεδόν 1.000 φορές μεγαλύτερος από τον γενικό πληθυσμό (Kraemer et al., 1994). Υπάρχουν επίσης, στοιχεία που υποδηλώνουν ότι συγκεκριμένες παραλλαγές της νόσου *XP* μπορούν να προσδώσουν υψηλότερο κίνδυνο μελανώματος από άλλες λιγότερο συνήθεις παραλλαγές (Paszowska-Szczur et al., 2013). Αυτή η συγκεκριμένη γενετική ασθένεια υπογραμμίζει επίσης τη σημασία της έκθεσης σε UV ακτινοβολία για την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και μελανώματος.



Εικόνα 1.26. Οι γενετικές διαταραχές στο μελάνωμα (Ανατύπωση από Davis et al., 2019).

### 1.6.6 Χρωμοσωμικές μεταβολές

Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις ουσιαστικά απουσιάζουν από τους σπίλους, αλλά είναι συχνές στο μελάνωμα. Περιλαμβάνουν απώλειες των χρωμοσωμάτων 9p (81%) και 10q (63%), σημειακές απώλειες σε χρωμοσώματα 6q και 8p και ενισχύσεις στα χρωμοσώματα 1q, 2, 4q, 6p, 7, 8, 11q, 17 και 20 (Bastian, et al., 1998). Τα πρότυπα των χρωμοσωμικών ενισχύσεων ή/και απώλειες διαφέρουν μεταξύ των κλινικοπαθολογικών υποτύπων του μελανώματος (Curtin, et al., 2005).

### 1.7 Θεραπεία-Πρόγνωση

Το μεταστατικό μελάνωμα εξακολουθεί να αποτελεί μια δύσκολα αντιμετωπίσιμη νόσο με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς με όγκο σταδίου 1a (σύμφωνα με το σύστημα TNM) έχουν 5ετή επιβίωση 97%, ενώ οι ασθενείς με όγκο σταδίου 4 έχουν 5ετή επιβίωση μόλις 15-20%.

## ✓ Χειρουργική επέμβαση

Η αρχική θεραπεία του δερματικού μελανώματος είναι η χειρουργική εξαίρεση του όγκου και η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάγνωση του όγκου σε πρώιμο στάδιο. Ανάλογα με το πάχος του όγκου, εφαρμόζονται διαφορετικά περιθώρια εκτομής. Οι βιοψίες εκτομής μπορεί να απομακρύνουν τον όγκο, αλλά συχνά απαιτείται ευρύτερη εκτομή για τη μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης και εκτίμηση της παρουσίας ανιχνεύσιμης μεταστατικής νόσου μαζί με βραχυπρόθεσμη ή/και μακροπρόθεσμη παρακολούθηση. Συχνά, αυτό γίνεται με ευρεία τοπική εκτομή (WLE) με περιθώρια 1 έως 2 cm. Τα *in situ* και εφηλιδοειδή μελανώματα αντιμετωπίζονται με στενότερα χειρουργικά περιθώρια, συνήθως 0,2 έως 0,5 cm (Clark et al., 2008). Η ευρεία εκτομή στοχεύει στη μείωση της πιθανότητας τοπικής υποτροπής του όγκου στη θέση της αρχικής αλλοίωσης.

Στην περίπτωση μεταστατικού μελανώματος, οι προσπάθειες βελτίωσης της επιβίωσης με την απομάκρυνση των λεμφαδένων χειρουργικά (λεμφαδενεκτομή) συσχετίστηκαν με πολλές επιπλοκές, και συχνά χωρίς οφέλη γενικής επιβίωσης. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε η τεχνική της βιοψίας «λεμφαδένα-φρουρού» για τη μείωση των επιπλοκών της χειρουργικής επέμβασης των λεμφαδένων, επιτρέποντας παράλληλα την αξιολόγηση της προσβολής λεμφαδένων (The Screening and Surveillance of Ultrasound in Melanoma trial, 2009). Η βιοψία του «λεμφαδένα-φρουρού» είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία κατά τη θεραπεία του δερματικού μελανώματος > 8 mm (Ross et al., 2013). Εάν ένας λεμφαδένας είναι θετικός, ανάλογα με την έκταση της νεοπλασματικής διήθησης μπορεί να ακολουθήσει ριζική αφαίρεση των λεμφαδένων και ο ασθενής στη συνέχεια να ακολουθήσει επικουρική θεραπεία.

## ✓ Επικουρική θεραπεία

Τα υψηλού κινδύνου μελανώματα μπορεί να απαιτούν επικουρική θεραπεία, με τις απόψεις να δίστανται.. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι περισσότεροι ασθενείς θα αρχίσουν έως και ένα χρόνο θεραπείας με ιντερφερόνη υψηλής δόσης, η οποία βέβαια έχει σοβαρές παρενέργειες, αλλά μπορεί να βελτιώσει ελαφρώς την πρόγνωση του ασθενούς. Ωστόσο, οι οδηγίες του Βρετανικού Συνδέσμου Δερματολόγων αναφέρουν ότι η ιντερφερόνη δεν συνιστάται ως τυπική ανοσοενισχυτική θεραπεία για το μελάνωμα. Μετανάλυση το έτος 2011 έδειξε ότι, η ιντερφερόνη θα μπορούσε να επιμηκύνει το χρόνο πριν επανεμφανιστεί ένα μελάνωμα, αλλά αύξησε την επιβίωση μόνο κατά 3% σε διάστημα 5 ετών. Επιπλέον, οι δυσάρεστες παρενέργειες μειώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς (Wheatley et al., 2007).

<b>TABLE 2</b>		<b>Current Guidelines for Performing SLNB</b>	
<b>Guideline</b>			<b>Year</b>
<b>National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines (NCCN) (3):</b> "In general, SLNB is not recommended for primary melanoma <0.75 mm thick. For melanomas 0.76–1.00 mm, SLNB may be considered in the appropriate clinical context"			2017
<b>National Institute of Clinical Excellence (NICE) (11):</b> "Do not offer imaging or sentinel lymph node biopsy to people who have stage IA melanoma or those who have stage IB melanoma with a Breslow thickness of 1 mm or less"			2015
<b>American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Joint Clinical Practice Guideline (ASCO/SSO) (12):</b> "Available evidence does not support routine SLN biopsy for patients with melanomas that are T1 or <1mm Breslow thickness although it may be considered in selected high-risk cases" Such high-risk factors may include Breslow thickness >0.75 mm, ulceration, or mitoses $\geq 1/\text{mm}^2$			2012
<b>European Society for Medical Oncology (ESMO) (13):</b> "SLN biopsy should be performed for tumour thickness of >1mm and/or ulceration"			2012

**Εικόνα 1.27.** Κατευθυντήριες οδηγίες για τη βιοψία λεμφαδένα-φρουρού (Ανατύπωση από Gershenwald, J.E. et al. American Joint Committee on Cancer staging manual. 8th ed. Joyce, K.M. editors. Chicago, 2017. p. 94).

### ✓ **Ακτινοθεραπεία**

Η εξωτερική ακτινοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανακουφίσει από τα συμπτώματα και τον πόνο που προκαλούν οι εγκεφαλικές και οστικές μεταστάσεις. Η πρόσφατα εισαγόμενη τεχνολογία ψηφιακού ανιχνευτή PET σε PET/CT και PET/MRI αποδίδει υψηλότερη εγγενή ευαισθησία ανίχνευσης σε σύγκριση με την αναλογική τεχνολογία τελευταίας γενιάς, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ μικρών βλαβών με πιθανή επίπτωση στην έκβαση της νόσου (Laudicella et al., 2019).

### ✓ **Χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία**

Στη δεκαετία του 1990 οι ερευνητές ξεκίνησαν επίσης την ανάπτυξη εμβολίων κατά του καρκίνου. Τα εμβόλια του καρκίνου, σε αντίθεση με τα προφυλακτικά εμβόλια που χορηγούνται σε υγιείς ανθρώπους για την πρόληψη ασθένειας, είναι θεραπευτικά εμβόλια που χορηγούνται σε ασθενείς στα τελευταία στάδια του καρκίνου για να προσπαθήσουν να ευαισθητοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε αντιγόνα του καρκίνου. Ωστόσο, η δημιουργία αποτελεσματικών θεραπευτικών εμβολίων κατά του καρκίνου συναντά προκλήσεις λόγω των προσαρμογών που επιτρέπουν στα καρκινικά

κύτταρα να κρύβονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Πολλά εμβόλια μελανώματος αναπτύχθηκαν και δοκιμάστηκαν στη δεκαετία του 1990 και στις αρχές του 2000, ωστόσο, κανένα από τα πρώιμα εμβόλια που αναπτύχθηκαν δεν ήταν αποτελεσματικό και κανένα εμβόλιο μελανώματος δεν έχει εγκριθεί για κλινική χρήση (Berd et al., 1990).

Διάφορες χημειοθεραπευτικές ουσίες, όπως η τεμοζολαμίδη και η ντακαρβαζίνη (επίσης ονομαζόμενη DTIC), και η ανοσοθεραπεία με ιντερλευκίνη-2 (IL-2) ή ιντερφερόνη (IFN), χρησιμοποιούνται. Η ανοσοθεραπεία είναι μια εναλλακτική μέθοδος θεραπείας που εκμεταλλεύεται τη δύναμη του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή ενισχύοντας τις δικές του δυνατότητες ανοσολογικής παρακολούθησης. Η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το ποσό των μεταλλάξεων που συσσωρεύονται στα κύτταρα της επιδερμίδας. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με μελανώματα που έχουν πολλές μεταλλάξεις είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν σε νέες ανοσοθεραπείες (Snyder et al., 2014; Riaz et al., 2017). Αυτή η αυξημένη θεραπευτική απόκριση στο δερματικό μελάνωμα με υψηλό φορτίο μεταλλάξεων που προκαλείται από UV ακτινοβολία σχετίζεται πιθανώς με τη μεγαλύτερη πιθανότητα που έχουν αυτές οι νέες μεταλλάξεις να κωδικοποιούν ισχυρούς αντιγονικούς επιτόπους.

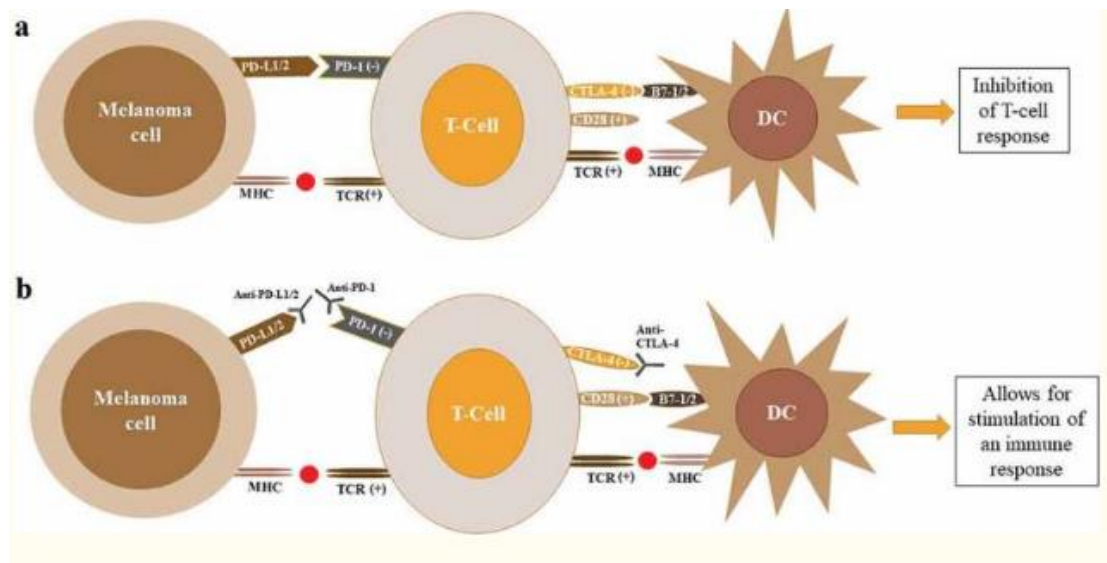
Η IL-2 (Proleukin) ήταν η πρώτη εγκριθείσα θεραπεία (1990 Ευρώπη, 1992 ΗΠΑ) για τη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος αλλά η ευρεία χρήση της περιορίστηκε από σημαντική τοξικότητα (Marabondo & Kaufman, 2017). Πρόσφατα, έχει εισαχθεί ένας αριθμός παραγόντων που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και αυξάνουν τις αντί-νεοπλασματικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Η αρχική επιτυχία ήταν με το αντίσωμα CTLA-4 Ipilimumab, το οποίο οδήγησε σε μακροχρόνιες αποκρίσεις σε ένα μικρό ποσοστό (περίπου 20%) ασθενών με μελάνωμα (Griewank et al., 2013). Η ιπιλιμουάμπη είναι ένα αντίσωμα το οποίο όταν χορηγηθεί στον οργανισμό βοηθά τα λευκά αιμοσφαίρια να αναγνωρίσουν και να επιτεθούν στα καρκινικά κύτταρα. Στην Ευρώπη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μη χειρουργήσιμο, προχωρημένου σταδίου μελάνωμα, εφόσον έχει αποτύχει η πρώτη γραμμής χημειοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία.

Τα αντισώματα PD-1 και PDL-1 (π.χ. τα BMS-936558 και BMS-936559, αντίστοιχα) έχουν επίσης βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικά στο μελάνωμα και άλλους καρκίνους (Topalian et al., 2012). Αυτή η θεραπεία έχει μεταφραστεί σε σημαντικά κλινικά αποτελέσματα με υποχώρηση του νεοπλάσματος και βελτιωμένη επιβίωση που εμφανίζεται στο 30-40% των ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα (Wolchok et al., 2017; Amaria et al., 2018). Τα πρώτα δημοσιευμένα αποτελέσματα του MK-3475 (PD-1, επίσης παλαιότερα γνωστό ως lambrolizumab) ανέφεραν αντικειμενικές αποκρίσεις στο 38,5% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία για το μελάνωμα (Topalian, et al, 2012). Ένας συνδυασμός



Nivolumab (anti-PD-1, πρώην BMS-936558) και Ipilimumab (anti-CTLA-4) προκάλεσε αντικειμενικές ανταποκρίσεις στο 53% των ασθενών (Gomes et al., 2018) (Εικόνα 1.28).

Ωστόσο, παρά τις πολλά υποσχόμενες αρχικές απαντήσεις, αναπτύσσεται αναπόφευκτα αντίσταση στις ανοσοθεραπείες. Ο συνδυασμός της ανοσοθεραπείας με τη στοχεύουσα θεραπεία μπορεί να βελτιώσει τις αποκρίσεις αλλά μπορεί να σχετίζεται με μη αποδεκτή τοξικότητα (Yu et al., 2019).



**Εικόνα 1.28.** Ρύθμιση απόκρισης T-κυττάρων από CTLA4 και PD1 στο μελάνωμα (Ανατύπωση από Yu et al., 2019).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες όλων αυτών των ανοσορρυθμιστικών παραγόντων είναι πρωτίστως φλεγμονώδεις νόσοι (π.χ. κολίτιδα, θυρεοειδίτιδα, πνευμονίτιδα). Τα αρχικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η έκταση αυτών των ανεπιθύμητων ενεργειών είναι λιγότερο σοβαρή για τη μονοθεραπεία PD-1 (Wolchok et al., 2017). Σήμερα εφαρμόζονται ανοσοθεραπείες χωρίς καμία διαστρωμάτωση. Επίσης, αναπτύχθηκαν επιπρόσθετοι υποδοχείς-στόχοι που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των κυττάρων T και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι πιθανών στόχων όπως τα TIGIT, TIM-3 και LAG-3 (Bhandaru & Rotte, 2019).

Επιπλέον, είναι σε εξέλιξη μελέτες για τον εντοπισμό μεθόδων που θα επιτρέψουν την ταυτοποίηση των ασθενών που είναι πιθανότερο να ανταποκριθούν καλά σε αυτές τις θεραπείες με τη χρήση γονιδιακών υπογραφών που προβλέπουν την ανταπόκριση των ασθενών στην ανοσοθεραπεία. Μια τέτοια υπογραφή παρουσιάστηκε πρόσφατα για ασθενείς που έλαβαν MAGE-A3 ανοσοθεραπεία (Ulloa-Montoya et al., 2013). Οι ογκογονιδιακές (BRAF, NRAS) υποδεικνυόμενες

υπογραφές θα μπορούσαν επίσης να συσχετιστούν με αποκρίσεις σε ανοσοθεραπείες. Αυτό θα μπορούσε να αποδειχτεί σημαντικό, υπό το φως πρόσφατων δεδομένων που δείχνουν ότι οι μεταλλαγμένοι όγκοι NRAS ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με ιντερλευκίνη (Joseph et al., 2012). Αν και τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι πολύ περιορισμένα, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η αναγνώριση των υπογραφών γονιδίων ή άλλων βιολογικών δεικτών που προβλέπουν αποκρίσεις σε ανοσοθεραπείες θα μπορούσε να έχει τεράστια αξία στην κλινική διαχείριση των ασθενών με μελάνωμα. Τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, τόσο όσον αφορά στα ποσοστά ανταπόκρισης όσο και στις ανεπιθύμητες ενέργειες, δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί για πολλές ανοσοθεραπείες. Στη θεραπεία αντισωμάτων CTLA-4 (ipilimumab), οι απαντήσεις μακράς διάρκειας (για περισσότερο από 2 χρόνια) μπορούν να επιτευχθούν σε μικρό ποσοστό (10-20%) των ασθενών (Gao et al., 2016).

### ✓ Στοχεύουσες θεραπείες - Εξατομικευμένη Ιατρική

Η εξατομικευμένη γενετική ανάλυση των όγκων και η εξατομικευμένη επιλογή θεραπευτικών μορφών είναι ήδη πραγματικότητα. Η στοχεύουσα θεραπεία κατά της παρεκκλίνουσας σηματοδότησης του μονοπατιού MAPK προανήγγειλε μια επαναστατική εποχή στο μελάνωμα που είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά καλύτερη αντινεοπλασματική αποτελεσματικότητα και επιβίωση σε σύγκριση με την παραδοσιακή χημειοθεραπεία. Η μετάλλαξη *BRAF-V600* είναι ένας ισχυρός προγνωστικός βιοδείκτης για την ανταπόκριση σε εκλεκτικούς αναστολείς κινάσης, οι οποίοι μπορούν να αναστείλουν τον κυτταρικό κύκλο και να οδηγήσουν σε μειωμένη ανάπτυξη του όγκου. Οι νέες θεραπείες για το μεταστατικό μελάνωμα περιλαμβάνουν τους βιολογικούς ανοσοθεραπευτικούς παράγοντες ipilimumab, pembrolizumab και nivolumab (Syn, et al., 2017, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω), BRAF αναστολείς, όπως vemurafenib και dabrafenib και αναστολείς MEK, όπως το trametinib (Maverakis et al., 2015).

#### ▪ Αναστολείς BRAF

Μεταξύ άλλων νέων θεραπειών, η στοχεύουσα θεραπεία με αναστολείς BRAF έχει βελτιώσει τις επιλογές θεραπείας για ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα, λόγω του υψηλού ποσοστού ανταπόκρισης και του γρήγορου τρόπου δράσης. Οι αναστολείς BRAF έχουν αποδειχθεί ότι παρέχουν ένα υψηλό και γρήγορο ποσοστό ανταπόκρισης όγκου σε ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη V600E και για να παρατείνουν ουσιαστικά την ελεύθερη νόσου και τη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τη

δακαρβαζίνη. Αν και η κλινική ανταπόκριση στους αναστολείς BRAF είναι αρχικά ευνοϊκή, η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών αναπτύσσει αντοχή στα φάρμακα και υποτροπή σε λιγότερο από ένα έτος. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, οι ασθενείς εμφάνισαν σχεδόν καθολικά αντοχή στη θεραπεία με BRAF, συνήθως κατά τους πρώτους 12 μήνες θεραπείας (Lim et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, το Vemurafenib είναι μια στοχεύουσα θεραπεία, η οποία επιλεκτικά αναστέλλει τη BRAF. Η κλινική αποτελεσματικότητα της ένωσης αναφέρθηκε το 2010 (Bollag, et al, 2010), μόλις 8 χρόνια μετά την αναγνώριση των BRAF μεταλλάξεων στο μελάνωμα. Αυτό το μόριο προκάλεσε επιτυχή απόκριση σε περισσότερο από το 50% των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα με *BRAF V600E* και όφελος από την άποψη της αύξησης της συνολικής επιβίωσης (Sosman et al., 2012; McArthur et al., 2014). Ο αναστολέας Vemurafenib λαμβάνεται από το στόμα, και πρόσφατα έλαβε έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το έτος 2011.

Το Dabrafenib είναι ένας άλλος εκλεκτικός αναστολέας της μετάλλαξης BRAF V600, που έχει επίσης εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία του BRAF V600 μεταλλαγμένου μελανώματος (Falchook et al, 2012). Μια δοκιμή φάσης III του dabrafenib στο μελάνωμα ανέφερε θεραπευτικές αποκρίσεις παρόμοιες με τη δοκιμή του vemurafenib, με διάμεση PFS 5,1 μηνών στην ομάδα που έλαβε dabrafenib και 2,7 μήνες στην ομάδα που έλαβε dacarbazine (Hauschild et al., 2012).

Οι παρενέργειες και των δύο αυτών αναστολέων BRAF είναι παρόμοιες, αν και η φωτοευαισθησία φαίνεται να είναι πιο σοβαρή με το vemurafenib. Ένα συχνό γεγονός είναι η ανάπτυξη καλόηθων υπερκερατώσεων (μέχρι 49%) και νεοπλασμάτων από επιθηλιακά κύτταρα, ιδιαίτερα του τύπου του κερατοακανθώματος ~25% (Charman et al., 2011). Περίπου στο 50% των ασθενών που έλαβαν dabrafenib ή vemurafenib το μελάνωμα εξελίχθηκε σε 6-7 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας (Hauschild et al., 2013). Επιπρόσθετα, μπορεί να εμφανιστεί κνησμός, εξανθήματα ακμής και υπερκεράτωση στα άκρα (συνολικά περίπου 31%). Οι μη δερματικές ανεπιθύμητες παρενέργειες που έχουν αναφερθεί είναι η αρθραλγία (περίπου 21%), η αύξηση των ηπατικών ενζύμων (περίπου 6%) και η ναυτία (περίπου 8%) (Charman et al., 2011; Sosman et al., 2012).

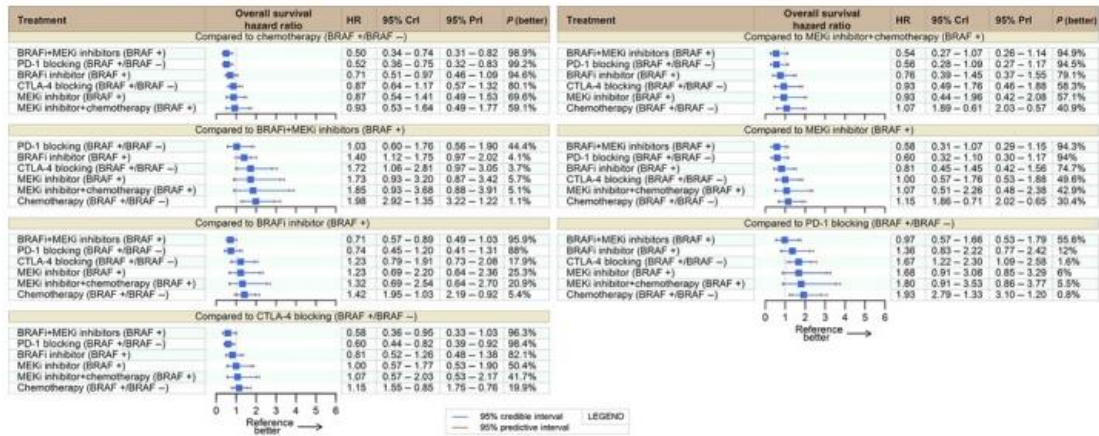
#### ▪ **Αναστολείς MEK**

Η MEK βρίσκεται καθοδικά του BRAF και του RAS και έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός αναστολέων που εμποδίζουν την ενεργοποίηση της MEK. Ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο είναι το trametinib (Falchook et al, 2012; Kim et al., 2013). Μια δοκιμή φάσης III σε ασθενείς μεταστατικού μελανώματος με μετάλλαξη BRAF εμφάνισε διάμεσο PFS 4,8 μηνών στην ομάδα του trametinib σε

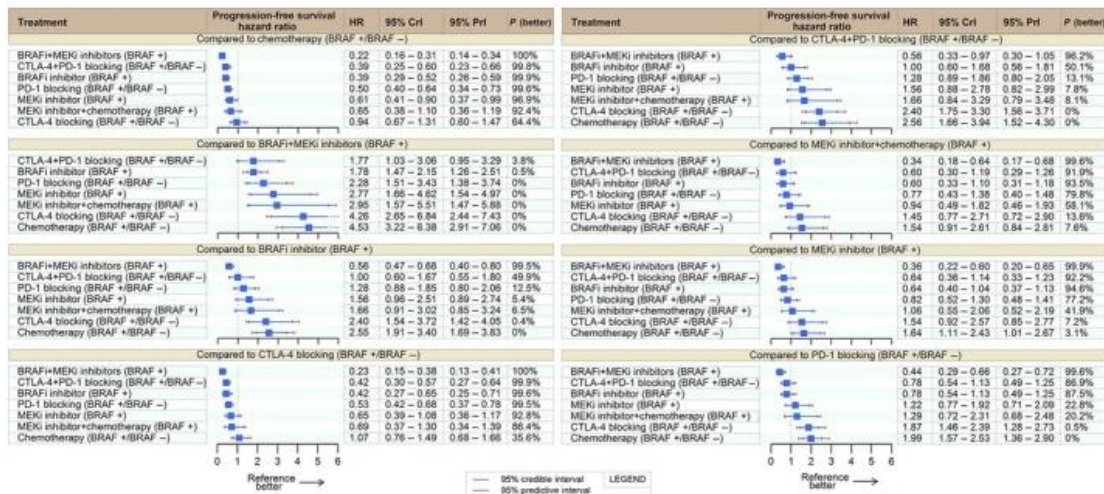
σύγκριση με 1,5 μήνες για χημειοθεραπεία (paclitaxel/dacarbazine) (Si et al., 2012). Έχει αναφερθεί πλήθος παρενεργειών μεταξύ αυτών: διάρροια, δερματικά εξανθήματα και οφθαλμική τοξικότητα, ιδιαίτερα ορώδης αμφιβληστροειδοπάθεια (Falchook et al., 2012). Με βάση αυτά τα ευρήματα, ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε το trametinib για μεταστατικό μελάνωμα που δεν έχει προηγουμένως λάβει θεραπεία με αναστολέα BRAF (Flaherty et al., 2012).

Η συνδυασμένη θεραπεία, που συνδυάζει το trametinib με τον αναστολέα BRAF dabrafenib, έχει αποδειχθεί ακόμη πιο ελπιδοφόρα με βάση τη βελτιωμένη αποτελεσματικότητα καθώς και την καταστολή ορισμένων φαινομένων που σχετίζονται με αναστολέα BRAF. Το διάμεσο PFS για ασθενείς που λάμβαναν και dabrafenib και trametinib ήταν 9,4 μήνες σε σύγκριση με 5,8 μήνες για το dabrafenib μόνο. Μια πλήρης ή μερική απόκριση παρατηρήθηκε στο 76% των ασθενών που λάμβαναν αμφοτέρους τους παράγοντες, σε σύγκριση με το 54% για εκείνους που λάμβαναν μόνο dabrafenib. Αυτό αντιπροσωπεύει το καλύτερο αποτέλεσμα για στοχεύουσες θεραπείες στο μελάνωμα μέχρι σήμερα. Η ομάδα θεραπείας συνδυασμού εμφάνισε συχνότερες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ο πυρετός (71%), ρίγη (58%), κόπωση (53%) και έμετο (40%) (26%, 17% και 15%, αντίστοιχα), αλλά οι δερματικές παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένης της υπερκεράτωσης, της αλωπεκίας και του καρκίνου του δέρματος από πλακώδη κύτταρα, ήταν λιγότερο συχνές (9% έναντι 30%, 5% έναντι 34% και 7% έναντι 19% αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα μιας δοκιμής φάσης II ενός άλλου MEK αναστολέα, του MEK162 δημοσιεύθηκαν πρόσφατα. Η διάμεση τιμή PFS ήταν 3,7 μήνες για την ομάδα μεταλλάξεων NRAS και 3,6 μήνες για την ομάδα μετάλλαξης BRAF, αλλά και στις δύο ομάδες επιτεύχθηκε μερική απόκριση (PR) στο 20% των ασθενών. Στο μελάνωμα με μετάλλαξη στο BRAF, οι αναστολείς MEK εμφανίζουν κάπως μικρότερα αποτελέσματα σε σχέση με εκείνα για τους αναστολείς BRAF. Ωστόσο, η μελέτη MEK162 έδειξε επίσης την αποτελεσματικότητα ενός αναστολέα MEK σε όγκους με μεταλλάξεις στο NRAS (Ascierto et al., 2013).

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη των αναστολέων BRAF και MEK (BRAFi / MEKi) οδήγησε σε σημαντικές προόδους στη θεραπεία μελανώματος. Ωστόσο, η εμφάνιση μηχανισμών αντίστασης περιορίζει τη διάρκεια της ωφέλειας και εμφανίζεται πλήρης ανταπόκριση σε λιγότερο από το 20% των ασθενών που λαμβάνουν BRAFi ± MEKi. Ωστόσο, οι αναστολείς MEK αντιπροσωπεύουν επί του παρόντος τους πρώτους στοχεύοντες θεραπευτικούς παράγοντες που δείχνουν όφελος σε όγκους με μεταλλάξεις NRAS (Dummer et al., 2017).

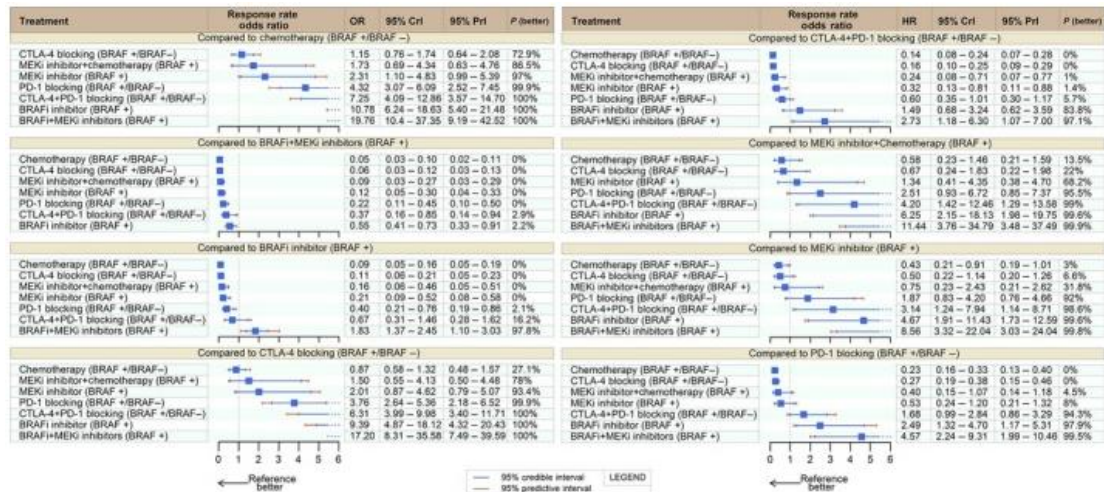


Εικόνα 1.29. Συνολική μετα-ανάλυση επιβίωσης. HR: λόγος κινδύνου, CrI: αξιόπιστο διάστημα, PrI: προγνωστικό διάστημα, BRAF + patients: μεταλλαγμένοι ασθενείς BRAF -: Ασθενείς BRAF άγριου τύπου (Ανατύπωση από da Silveira Nogueira Lima et al., 2017).



Εικόνα 1.30. Μετα-ανάλυση επιβίωσης. HR: λόγος κινδύνων, CrI: αξιόπιστο διάστημα, PrI: προγνωστικό διάστημα, BRAF + patients: μεταλλαγμένοι ασθενείς BRAF - patients: ασθενείς BRAF άγριου τύπου (Ανατύπωση από da Silveira Nogueira Lima et al., 2017).





**Εικόνα 1.31.** Μετα-ανάλυση ρυθμού απόκρισης. HR, λόγος κινδύνου; CrI, αξιόπιστο διάστημα. PrI, προγνωστικό διάστημα; BRAF + patients: μεταλλαγμένοι ασθενείς BRAF - patients: Ασθενείς άγριου τύπου BRAF (Ανατύπωση από da Silveira Nogueira Lima et al., 2017).

### ■ Αναστολείς KIT

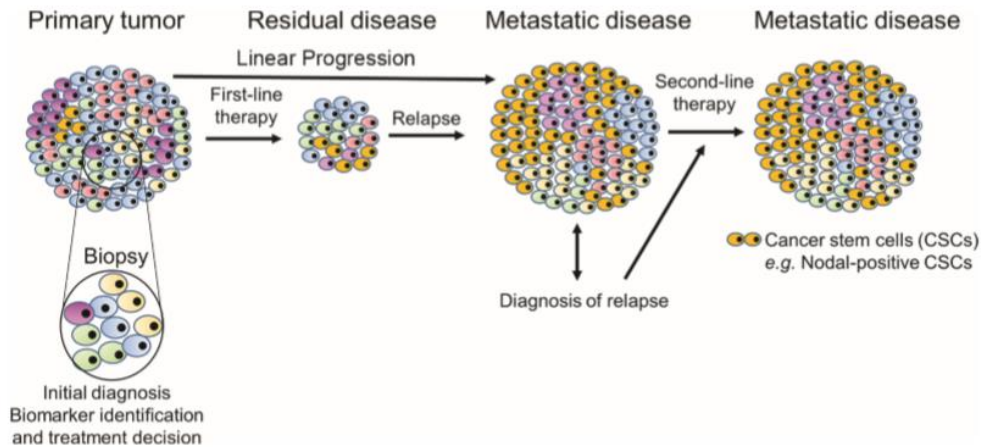
Οι αρχικές δοκιμές με αναστολείς KIT σε επιλεγμένους πληθυσμούς ασθενών, έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα (Ugurel et al., 2005; Kluger et al., 2011). Ωστόσο, μελέτες που στόχευαν επιλεκτικά σε ασθενείς με μελάνωμα βλεννογόνων και χαρακτηριστική μεταλλαγή στο γονίδιο *c-KIT*, φάνηκαν περισσότερο υποσχόμενες. Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας για τη θεραπεία μελανώματος με αλλοιώσεις του KIT ήταν το imatinib. Αν και οι αρχικές μελέτες ανέφεραν δραματικές απαντήσεις στο imatinib (Lutzky et al., 2008), οι μεγαλύτερες μελέτες έχουν δείξει λιγότερο ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Τρεις δοκιμές φάσης II έδειξαν διάμεση PFS περίπου 3 μηνών (Guo et al., 2011), 3,7 μηνών (Hodi et al., 2013) και 12 εβδομάδων (Carvajal et al., 2011). Σε όλες τις μελέτες, η πλειονότητα των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία είχαν όγκους που χαρακτηρίστηκαν από μεταλλάξεις εξονίων 11 και 13 (δηλαδή L576P και K642E). Άλλοι αναστολείς που στοχεύουν το KIT έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το sorafenib, το sunitinib (Minor et al., 2012), το dasatinib (Woodman et al., 2009; Kalinsky et al., 2017) και το nilotinib (Guo et al., 2017). Όλες οι μελέτες μέχρι σήμερα έχουν παρουσιάσει περιορισμένη επιτυχία, με θεραπευτικά οφέλη μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις. Ωστόσο, βάσει και της ανασκόπησης των Goldemberg et al., η στοχεύουσα θεραπεία έναντι cKIT παραμένει ως ένας πολλά υποσχόμενος κλάδος στη θεραπεία των τόσο επιθετικών μελανωμάτων των βλεννογόνων (Goldemberg et al., 2019).

## ✓ Μελλοντικές προοπτικές

Συμπερασματικά, υπάρχουν πολλά διαφορετικά φάρμακα που στοχεύουν το μονοπάτι MAPK, αλλά λόγω αντίστασης που προκύπτει οι Arkenau et al. υποδηλώνουν ότι ένας συνδυασμός θεραπειών που στοχεύουν σε διαφορετικές οδούς μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός στο μέλλον συγκριτικά με τις μονοθεραπείες (Arkenau et al., 2011). Η κατανόηση του ρόλου των πρόσφατα αναγνωρισμένων γενετικών γεγονότων στη μελανοκυτταρική νεοπλασία θα είναι σημαντική για την ανάπτυξη ικανοποιητικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ως συνέπεια των προαναφερθέντων εξελίξεων, υπάρχει μεγάλη αισιοδοξία για τις μελλοντικές προοπτικές των ασθενών με μελάνωμα. Οι νέοι δυνητικοί στόχοι θεραπείας, όπως οι αναστολείς των CDK4/6, MDM2/p53, c-KIT, PI3K/Akt/mTOR, ERK ή IDH1, έχουν επίσης ληφθεί υπόψη για τη θεραπεία μελανώματος (Karachaliou et al., 2015; Wu et al., 2018). Οι μελλοντικές κατευθύνσεις επιπλέον, περιλαμβάνουν την ανάπτυξη έξυπνων συστημάτων νανοσωματιδίων για προσεγγίσεις επιλεκτικής γονιδιακής θεραπείας ως καινοτόμους τρόπους θεραπείας (Mannavola et al., 2019). Η νανοσωματιδιακή πακλιταξέλη δεσμευμένη με αλβουμίνη, είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας που έχει δείξει υποσχόμενη δράση σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα. Πρόκληση επίσης παραμένει η στόχευση-αναστολή με miRNAs της πρωτεΐνης RAS με σκοπό τον καθολικό έλεγχο της τόσο σημαντικής για την παθογένεια του μελανώματος MAPK σηματοδότησης.

## 1.8 Ετερογένεια στη μοριακή κατατομή (προφίλ) του μελανώματος

Το μελάνωμα είναι ένα ετερογενές νεόπλασμα σε ιστομορφολογικό, ανοσοφαινοτυπικό και μοριακό επίπεδο. Το μελάνωμα μπορεί να εμφανίσει τέτοια ποικιλία στην μορφολογική ιστολογική εικόνα, που μπορεί να αποτελέσει μια διαγνωστική πρόκληση, και τότε η διάγνωση μπορεί να βασίζεται κατά κύριο λόγο στο ανοσοφαινοτυπικό της προφίλ (Mejbel et al., 2019). Ωστόσο, η επιβίωση του ασθενούς και η ανταπόκριση στη θεραπεία συνδέονται με τη γενετική ετερογένεια του όγκου και όχι με τη μορφολογία. Επομένως, η ανίχνευση των μοριακών χαρακτηριστικών τέτοιων μελανωμάτων καθίσταται απαραίτητη (**Εικόνα 1.32**).



**Εικόνα 1.32.** Ετερογένεια στον πληθυσμό των μελανοκυττάρων στο μελάνωμα (Ανατύπωση από Hendrix et al., 2017).

Στο μελάνωμα, η γενετική ετερογένεια των υποτύπων παραμένει ένας από τους συνηθέστερους λόγους ανθεκτικότητας στη θεραπεία (Reuben et al., 2017), καθώς ορισμένες μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε αντίσταση στη στοχεύουσα θεραπεία (**Εικόνα 1.33**). Επιπροσθέτως, η υψηλή ετερογένεια όγκου μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλούς υποπληθυσμούς νεοπλασματικών κυττάρων, που φέρουν ετερογενείς μεταλλάξεις, προάγοντας την επιβίωση του όγκου και τη δυσμενή πρόοδο τελικά της νόσου (Anaka et al., 2013).

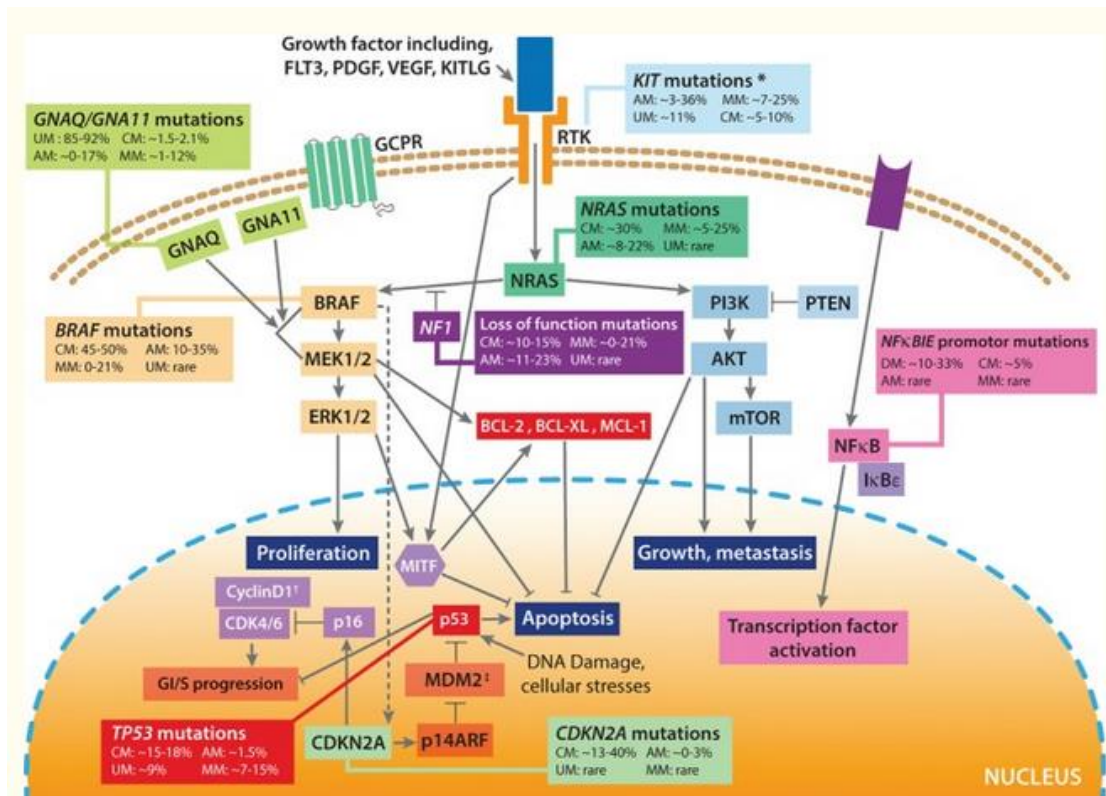
Biological pathways	Genes	DM-				MM
		CM	subtype	AM	UM	
MAPK genomicsubtypes	~Total%mut*	~90-95%	~73%	~50-60%	~100%	~50-60%
	<i>BRAF</i>	~45-50% <a href="#">3, 4</a>	~0-5% <a href="#">13, 43</a>	~10-35% <a href="#">3, 44, 45, 46, 47</a>	rarely seen <a href="#">48, 49</a>	~0-21% <a href="#">3, 45, 50, 51</a>
	<i>RAS</i> (mainly <i>NRAS</i> )	~30% <a href="#">3, 4</a>	~0-6% <a href="#">13, 43</a>	~8-22% <a href="#">3, 44, 45, 46, 47</a>	rarely seen <a href="#">48, 49</a>	~5-25% <a href="#">3, 45, 51</a>
	<i>NF1</i>	~10-15% <a href="#">3, 4</a>	~52-93% <a href="#">13, 43</a>	~11-23% <a href="#">3, 44, 47</a>	rarely seen <a href="#">48, 49</a>	~0-18% <a href="#">3, 51</a>
	TWT	~5-10% <a href="#">3, 4</a>	~7-48% <a href="#">13, 43</a>	~45-58% <a href="#">3, 44</a>	~100% <a href="#">48, 49</a>	~65-75% <a href="#">3, 51</a>
	<i>KIT</i> (mut orgain)	~5-10% <a href="#">3, 4</a>	rarely seen <a href="#">13, 43</a>	~3-36% <a href="#">44, 46, 47, 52</a>	~11% <a href="#">53</a>	~7-25% <a href="#">3, 51, 54</a>
	<i>GNAQ</i>	~1.5-2.1% <a href="#">3, 55</a>	rarely seen <a href="#">13, 43</a>	~0-17% <a href="#">3, 47</a>	~43-57% <a href="#">48, 49, 56, 57</a>	~1-12% <a href="#">3, 51</a>
	<i>GNAI1</i>	rarely seen <a href="#">3, 55</a>	rarely seen <a href="#">13, 43</a>	rarely seen <a href="#">3</a>	~41-49% <a href="#">48, 49, 56</a>	~1% <a href="#">51</a>
	<i>MAP2K1 &amp; 2</i>	~4% <a href="#">3</a>	~7% <a href="#">13</a>	~8% <a href="#">3</a>	~9% <a href="#">48</a>	~0-11% <a href="#">3, 50</a>



<b>Cell Cycle</b>	<b>~Total%mut*</b>	~57% <a href="#">3</a>	~70-75%	~90%	~85%	~36-75%
	<i>CDKN2A</i> (mut)	~13-40% <a href="#">3, 4</a> <a href="#">13, 58</a>	~20-29%	~0-3% <a href="#">3, 44</a>	rarely seen, methylated in ~50% <a href="#">59</a>	rarely seen <a href="#">3, 50, 51, 54</a>
	<i>CDKN2A</i> (loss)	~45% <a href="#">3</a>	~18% <a href="#">13</a>	~35% <a href="#">44</a>	~12% <a href="#">48</a>	~10-38% <a href="#">3, 50</a>
	<i>CDK4</i> (mutor gain)	~5-6% <a href="#">3, 4</a>	~5% <a href="#">13</a>	~9% <a href="#">3, 44</a>	~3% <a href="#">48</a>	~5-25% <a href="#">3, 50</a>
	<i>RBI</i>	~4-15% <a href="#">3, 4</a>	~15% <a href="#">13</a>	~9-17% <a href="#">3, 44</a>	~3% <a href="#">48</a>	~0-21% <a href="#">3, 50</a>
	<i>TP53</i>	~15-18% <a href="#">3, 4</a> <a href="#">13, 43, 58</a>	~40-60%	~6-54% <a href="#">3, 44</a>	~9% <a href="#">48</a>	~7-15% <a href="#">3, 50</a>
	<i>CCND1</i>	~5-13% <a href="#">3, 4</a>	~2% <a href="#">13</a>	~6-54% <a href="#">3, 44</a>	~6% <a href="#">48</a>	~25% <a href="#">3</a>
	<i>BAP1</i> (mut or loss)	rarely seen <a href="#">3</a>	rarely seen <a href="#">13</a>	rarely seen <a href="#">3</a>	~70-83% (but the great majority of metastatic UM) <a href="#">48, 49</a>	rarely seen <a href="#">3, 50, 51, 54</a>
<b>PI3K/AKT</b>	<i>PTEN</i> (mut or loss)	~8.5-40% <a href="#">3, 4</a> <a href="#">13</a>	rarely seen <a href="#">13</a>	~26-28% <a href="#">3, 44</a>	~6-11%, up to 76% with LOH <a href="#">48, 60</a>	4-25% <a href="#">3, 50, 51, 54</a>
<b>Number of mutations</b>	★★★★	★★★★★	★★	★	★★	
<b>Chromosomal aberrations</b>	~	~	****	***	****	
<b>Transcription factors</b>	<i>NFKB1</i> promoter	~5% <a href="#">3</a>	~15-33% <a href="#">3, 13</a>	not seen <a href="#">3</a>	NA	rarely seen <a href="#">3</a>
	<i>MITF</i>	~10-20% <a href="#">3, 18</a>	rarely seen <a href="#">13</a>	~15% <a href="#">3</a>	~63% samples are reported to include deletions or amplifications in MITF <a href="#">48</a>	~5-25% <a href="#">3, 51</a>
<b>Telomerase pathway</b>	<i>TERT</i> (mut or gain)	~85% <a href="#">3</a>	~85% <a href="#">13</a>	~9-45% <a href="#">3, 44, 46</a>	~2-9% <a href="#">48, 61</a>	~5-13% <a href="#">3, 50, 51</a>

**Εικόνα 1.33.** Το γενετικό προφίλ των υποτύπων του μελανώματος - CM: επιπολής επεκτεινόμενο μελάνωμα εξαρτώμενο από την υπερϊώδη ακτινοβολία DM: δεσμοπλαστικό μελάνωμα AM: ακρικό μελάνωμα UM: μελάνωμα των οφθαλμών MM: μελάνωμα των βλεννογόνων (Ανατύπωση από Rabbie et al., 2019).

Για την ανίχνευση της ετερογένειας του όγκου, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι, η ανάλυση με βάση το NGS θεωρείται ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την ανίχνευση μεταλλάξεων που εξηγούν την ετερογένεια του όγκου, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της που μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε ένα μικρό ποσοστό καρκινικών κυττάρων. Εκτός από την ακρίβεια οι μέθοδοι NGS είναι σχετικά οικονομικά αποδοτικές σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως η PCR σε πραγματικό χρόνο και η αλληλούχιση Sanger (de Unamuno et al., 2017).



Εικόνα 1.34. Ετερογένεια του μελανώματος σε μοριακό επίπεδο (Ανατύπωση από Rabbie et al., 2019).

## 1.9 Επιγενετικές τροποποιήσεις και εξέλιξη του μελανώματος

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του μελανώματος έχουν αποδοθεί σε ανεξάρτητα ή συνδυασμένα γενετικά αλλά και επιγενετικά γεγονότα. Η επιγενετική - που ορίζεται ως οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τις κληρονομικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση χωρίς να προκαλούν αλλαγές στην ακολουθία DNA- παρέχει σημαντική πληροφορία για τη διελεύκανση των φαινοτυπικών, μορφολογικών και παθολογικών διαφορών. Μεταβάλλοντας τη δομή της χρωματίνης μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης βάσεων DNA ή πρωτεϊνών των ιστονών ή ρυθμίζοντας τη μετάφραση του mRNA μέσω κωδικοποιητικών RNAs, η επιγενετική ρυθμίζει σε τελευταίο στάδιο ποια γονίδια θα εκφραστούν.

Μια βασική διαφορά μεταξύ γονιδιώματος και επιγονιδιώματος είναι ότι το τελευταίο μπορεί δυνητικά να είναι περισσότερο θεραπευτικά αναστρέψιμο από τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν το γενετικό κώδικα. Έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας του μελανώματος όσον αφορά τις γενετικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει μια πολύπλοκη συμμετοχή επιγενετικών μηχανισμών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης,

συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης, της τροποποίησης ή/και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, και των ποικίλων δραστηριοτήτων των μη-κωδικοποιούμενων RNAs. Ο ρόλος των επιγενετικών παραγόντων στην παθογένεση του μελανώματος δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως.

Οι μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν την υπομεθυλίωση, οδηγώντας σε αποκλίνουσα γονιδιακή έκφραση και την εστιακή υπερμεθυλίωση των νησιδίων CpG (Rubinstein et al., 2010). Τα μη κωδικοποιούμενα RNAs (π.χ., microRNAs), είναι γνωστό ότι δεν εκφράζονται σωστά στο μελάνωμα και παίζουν καθορισμένους ρόλους στην παθογένεση. Η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική σηματοδότηση και την απόπτωση, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για το μελάνωμα (**Εικόνα 1.35**) (Guo et al., 2019).

Με αυτό τον τρόπο, επηρεάζεται συνολικά η λειτουργία σηματοδοτικών μονοπατιών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, διασταυρώνονται και σχηματίζουν δίκτυα στα οποία οι τοπικές διαταραχές διαταράσσουν τη δραστηριότητα ολόκληρου του συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι, οι χαρακτηριστικές επιγενετικές αλλαγές που ξεκινούν/προάγουν την ανάπτυξη του ανθρώπινου μελανώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την πρόληψη, την έγκαιρη ανίχνευση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση της εξέλιξης του νεοπλασματος (Lin et al., 2019).

Συμπερασματικά, οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμβαίνουν στο μελάνωμα και επάγουν το μεταστατικό δυναμικό που διεγείρει έναν κρίσιμο μηχανισμό, ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζει την εξάπλωση των κυττάρων μελανώματος από την πρωτοπαθή στη δευτεροπαθή εστία. Θεραπευτικές στρατηγικές που αποσκοπούν στη συγκράτηση του επιγενετικού ελαττώματος σε συνδυασμό με στοχευόμενους παράγοντες ή/και ανοσοθεραπεία θα μπορούσαν να σχεδιαστούν σε μελλοντικές κλινικές δοκιμές διερεύνησης. Σε αυτό το πλαίσιο, επιγονιδιακά φάρμακα που συμπεριλαμβάνουν DHAs έχουν διερευνηθεί σε προκλινικά μοντέλα που αποδεικνύουν την ικανότητά τους να ενισχύουν την ανοσολογική αναγνώριση μέσω της ανοδικής ρύθμισης της τάξης I ανθρώπινου αντιγόνου ιστοσυμβατότητας (HLA) και βοηθητικών/συνδιεγερτικών μορίων, τη ρύθμιση του Th1, την πόλωση και την προώθηση της ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των CD8 + T κυττάρων. Τα DHAs επόμενης γενεάς απέδειξαν πολλά υποσχόμενη ανοσορυθμιστική και αντικαρκινική δραστηριότητα σε κλινικές δοκιμές Σε αυτό το συνεχώς εξελισσόμενο σενάριο, η μελέτη NIBIT-M4 της φάσης 1b επιβεβαίωσε πρόσφατα την ανοχή και την ασφάλεια της γουαδεκιταμπίνης που σχετίζεται με την ipilimumab σε μη αναστρέψιμο μελάνωμα σταδίου III/IV με ένα μοναδικό ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης 26% (Di Giacomo et al., 2019).

Gene	Gene Description	Relevance to melanoma
<i>APC</i> <sup>c</sup>	Adenomatous Polyposis Coli	Reduced expression increases cell proliferation without compromising invasive capacity
<i>ASC/PYCARD</i> <sup>d</sup>	PYD, an N terminal PYRIN-domain, and CARD, a C-terminal caspase-recruitment domain	Expression inhibits tumorigenesis by reducing IKK $\alpha$ / $\beta$ phosphorylation and inhibiting NF- $\kappa$ B activity
<i>AS3MT</i>	Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase	Unknown
<i>ADCY4</i>	Adenylate Cyclase 4	Unknown
<i>AKR7L</i>	Aldo-Keto Reductase Family 7-Like	Unknown
<i>AK3</i>	Adenylate Kinase 3	Unknown
<i>BRF1</i>	BRF1, RNA Polymerase III Transcription Initiation Factor 90 KDa subunit	Unknown
<i>BST2</i>	Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2	Unknown
<i>COL11A1</i> <sup>f</sup>	Collagen, Type XI, Alpha 1	Promotes tumor aggressiveness via TGF- $\beta$ 1-MMP3; part of a 12 gene signature for melanoma diagnosis; associated with focal adhesion
<i>CMTM2</i>	CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 2	Unknown
<i>CCKBR</i>	Cholecystokinin B Receptor	Unknown
<i>Caspase 8</i> <sup>a</sup>	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	Linked to cadmium-stimulated cell growth and inhibition of cell death pathways
<i>CDH1</i> <sup>a</sup>	E-Cadherin	A cell adhesion molecule; loss correlates with high tumor grade and poor prognosis
<i>CDKN2A</i> <sup>a</sup>	p16	Arrests cell cycle in G1 by inhibiting CDK4 and CKD6 and activating pRB
<i>CDKN2B</i>	p15	Unknown
<i>CDKN1C</i> <sup>d</sup>	p57	Arrests cell cycle in G1 by inhibiting G1 cyclin-CDK complexes; expressed in proliferative melanocytes; possible role in melanomagenesis
<i>CDH8</i>	Cadherin 8	Unknown
<i>CIITA-PIV</i>	Class II, Major Histocompatibility Complex Transactivator, Promoter IV	Acts on IFN $\gamma$ pathway
<i>COL1A2</i> <sup>f</sup>	Collagen, Type I, Alpha 2	Loss may compromise tissue integrity
<i>CYP1B1</i>	Cytochrome P450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1	Unknown
<i>CXCR4</i>	Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4	Unknown
<i>DLL3</i>	Delta-Like 3	Unknown
<i>DDIT4L</i> <sup>f</sup>	DNA-Damage-Inducible Transcript 4-like	Loss results in depression of cell growth
<i>DAL1</i>	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-like 3	Unknown
<i>DAPK</i> <sup>f</sup>	Death Associated Protein Kinase	Methylation higher in metastases
<i>DNAJC15</i>	DNAJ (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 15	Unknown
<i>DPP1V</i> <sup>f</sup>	DiPeptidyl Peptidase IV	Serine protease involved in cancer progression; decline in serum activity in melanoma patients compared to controls
<i>FRZB</i> <sup>a</sup>	Frizzled-Related Protein	A metastasis suppressor; inhibits Wnt5a signaling

**Εικόνα 1.35.** Τα συχνότερα υπερμεθυλιωμένα γονίδια στο μελάνωμα (Ανατύπωση από Sarkar et al., 2015).

## 1.10 Ανάγκη προσδιορισμού βιοδεικτών

Τα τελευταία 20 χρόνια, αυξήθηκε η χρήση της ανοσοϊστοχημείας (IHC) ως επικουρικής μεθόδου στη διάγνωση του μελανώματος. Η ανάπτυξη ισχυρών ευαίσθητων και ειδικών βιολογικών δεικτών καρκίνου στον τομέα της ανοσοϊστοχημείας των ιστών παραμένει το επίκεντρο της έρευνας. Η γνώση της μοριακής παθογένειας του μελανώματος δημιουργεί την τάση εύρεσης βιοδεικτών με σκοπό την ακριβή διάγνωση και την έγκαιρη ανίχνευση πιθανής υποτροπιάζουσας ή μεταστατικής νόσου. Επιπλέον, σημαντική είναι η σημασία αναγνώρισης προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών, που παρέχουν πληροφορίες για την πρόγνωση και την πρόβλεψη της απάντησης σε συγκεκριμένη θεραπεία, αντίστοιχα.

Οι μεταλλάξεις του υποκινητή TERT σχετίζονται με φτωχότερα αποτελέσματα σε υποσύνολα ασθενών με μελάνωμα με μεταλλάξεις BRAF / NRAS και αυτό μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός μελλοντικός βιοδείκτης. Δεδομένου ότι είναι επίσης ένα πρώιμο γεγονός στην εξαλλαγή σε μελάνωμα, μπορούν επίσης να αποτελέσουν πολύτιμο διαγνωστικό βιολογικό δείκτη για το μελάνωμα (Nagore et al., 2019).

Η υγρή βιοψία αναδύεται ως χρήσιμη εναλλακτική λύση στη συμβατική βιοψία ιστού, η οποία παρέχει μια μη επεμβατική προσέγγιση για την ανίχνευση και τη μέτρηση σε πραγματικό χρόνο των βιολογικών δεικτών του καρκίνου με απλή λήψη αίματος καθώς και άλλων βιολογικών υγρών, συμπεριλαμβανομένων των ούρων και του σάλιου. Είναι χρήσιμη, μετά την αρχική διάγνωση σε ιστικό υλικό, για την παρακολούθηση της απάντησης στη θεραπεία, την πρώιμη αναγνώριση υποτροπής της νόσου και σε περιπτώσεις μεταστατικής νόσου σε θέσεις που δεν είναι δυνατή η λήψη βιοψίας. Σε αυτό το πλαίσιο, μετρήθηκαν αυξημένα επίπεδα εξωσωματικών miR-17, miR-19a, miR-21, miR-126 και miR-149 στο πλάσμα ασθενών με σποραδικό μεταστατικό μελάνωμα και προτάθηκαν ως πιθανοί βιοδείκτες στην κλινική διάγνωση.

Η αξιολόγηση των αναλύσεων DNA/RNA του κυκλοφορούντος όγκου (ctDNA/RNA) είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία και φαίνεται να δίνει περισσότερες πληροφορίες από την ακτινολογική παρακολούθηση σε ασθενείς με εξωκρανιακή νόσο σταδίου IV (Lee et al., 2017; Lee et al., 2019). Οι προκλήσεις σε αυτόν τον τομέα περιλαμβάνουν τη σημαντική ετερογένεια μεταξύ των υποτύπων μελανώματος, για παράδειγμα τις μοριακές διαφορές μεταξύ συνδεδεμένων με υπεριώδη ακτινοβολία δερματικών μελανωμάτων, των BRAF μη μεταλλαγμένων μελανωμάτων κ.α. Αυτό υπονοεί ότι οι δοκιμασίες ctDNA μπορεί να χρειαστεί να είναι εξατομικευμένες και να στοχεύουν στο προφίλ μετάλλαξης του μελανώματος ενός ατόμου. Το κυκλοφορούν DNA του όγκου δεν φαίνεται να είναι τόσο χρήσιμο στην προγνωστική μοντελοποίηση σε ασθένεια πρώιμης φάσης με τις τρέχουσες ευαίσθητες προσδιορισμού, αλλά μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο όταν χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητες τεχνικές για την ανίχνευσή του.

Με βάση τις πρόσφατες Οδηγίες Κλινικής Πρακτικής ESMO, ο έλεγχος BRAF μετάλλαξης είναι υποχρεωτικός σε ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III ή σταδίου IV που μπορεί να αντιμετωπιστεί ή δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί και συνιστάται ιδιαίτερα σε ασθενείς σταδίου IIC (Michielin et al., 2019). Στη μεταστατική νόσο, συνιστάται η διενέργεια μοριακών αναλύσεων σε μεταστατικό δείγμα, εάν υπάρχει, επειδή αντιπροσωπεύει την πιο πρόσφατη βλάβη. Όταν δείγμα μεταστατικού ιστού δεν είναι διαθέσιμο, οι αναλύσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε δείγματα που λαμβάνονται από μεταστάσεις λεμφαδένων ή πρωτογενή όγκο, καθώς έχει αποδειχθεί σχετικά υψηλή συμφωνία

της κατάστασης *BRAF* μεταξύ πρωτοπαθών μελανωμάτων και των μεταστατικών εστιών τους, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα ίδια (Colombino et al., 2012; Valachis and Ullenhag, 2017; Cormican et al., 2019; Pellegrini et al., 2020). Επιπλέον, οι οδηγίες κλινικής πρακτικής NCCN συνιστούν έλεγχο για *BRAF* μεταλλάξεις σε ασθενείς με χειρουργική αφαίρεση αλλά όχι ίαση και σε μεταστατικό μελάνωμα για να καθοδηγήσουν τις αποφάσεις θεραπείας (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology).

Η επιλογή των μεθόδων που χρησιμοποιείται στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ειδική ευαισθησία, την αναπαραγωγιμότητα, την ακρίβεια, τον απαραίτητο χρόνο και το κόστος της εξέτασης. Επιπλέον, η επιλογή και η χρήση τεχνικών ικανών να ποσοτικοποιήσουν τη συχνότητα μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του γονιδίου *BRAF* είναι σημαντική αφού αναφέρεται ότι επηρεάζει την κλινική αποτελεσματικότητα των θεραπειών αναστολέων BRAF/MEK. Έτσι, η ποσοτική ανάλυση του γονιδίου *BRAF* θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την επιλογή ασθενών με μελάνωμα που είναι πιο πιθανό να επωφεληθούν από την στοχεύουσα θεραπεία ( Stagni et al., 2018). Επιπλέον, η ενδοογκική ετερογένεια θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρερμηνεία της κατατομής των μεταλλάξεων του *BRAF*. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν η δοκιμή πραγματοποιείται στα πρωτογενή δείγματα ή σε μεταστάσεις, όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμες άφθονες μεταστατικές βλάβες. Σε αυτό το πλαίσιο, ο χαρακτηρισμός της μοριακής ετερογένειας σε προχωρημένους ασθενείς με μελάνωμα θα μπορούσε να ξεπεραστεί με την ανάλυση της υγρής βιοψίας που αντιπροσωπεύει ένα αποτελεσματικό μη επεμβατικό εργαλείο για την παρακολούθηση (και όχι την αρχική διάγνωση) του ασθενούς (Vanni et al., 2020).

## 1.11 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Το πρωτοπαθές μελάνωμα δέρματος δίνει λεμφογενείς και αιματογενείς μεταστάσεις. Με βάση τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, μετά την αρχική εξαίρεση και παθολογοανατομική διάγνωση του μελανώματος, σε όσες περιπτώσεις ενδείκνυται, ακολουθεί εξαίρεση και μικροσκοπική εξέταση του «λεμφαδένα-φρουρού». Στις περιπτώσεις που ανακαλύπτεται σε αυτόν μεταστατική εστία, ακολουθεί λεμφαδενικός καθαρισμός. Επιπλέον, για τη διάγνωση, ιδίως όταν η ανακάλυψη της μεταστατικής εστίας προηγείται της πρωτοπαθούς, χρησιμοποιούνται μελανοκυτταρικοί και λοιποί μοριακοί δείκτες. Τα δεδομένα από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι έως τώρα περιορισμένα, και διαφαίνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει σημαντική ετερογένεια ως προς το προφίλ έκφρασης ορισμένων γονιδίων όπως το γονίδιο *BRAF*, καθώς και ως προς τον ανοσοφαινότυπο σε σχέση με τους δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100, HMB45. Ετερογένεια τόσο μεταξύ διαφορετικών περιοχών της ίδιας πρωτοπαθούς εστίας μελανώματος, όσο και μεταξύ πρωτοπαθούς εστίας και των αντίστοιχων μεταστάσεων σε λεμφαδένες ή συμπαγή όργανα, είτε αυτές είναι σύγχρονες είτε μετάχρονες. Η ετερογένεια αυτή έχει επιπτώσεις τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπευτική αντιμετώπιση του μελανώματος.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η ετερογένεια του μελανώματος τόσο μεταξύ διαφορετικών θέσεων της πρωτοπαθούς εστίας όσο και μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των αντίστοιχων μεταστάσεων, καθώς και μεταξύ των μεταστάσεων. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε ιστικό υλικό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης (FFPE) από ασθενείς με μελάνωμα δέρματος και λεμφαδενικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τους δείκτες S100, Melan-A, HMB45 και *BRAF*, καθώς και μοριακή ανάλυση της μετάλλαξης *BRAF* V600E με τη μέθοδο αλυσιδωτής πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Συλλογή ιστοικών δειγμάτων**

Το υλικό αποτέλεσαν 22 περιπτώσεις διαγνωσμένου δερματικού μελανώματος, με διαθέσιμη τόσο την πρωτοπαθή εστία όσο και τις μεταστάσεις (14), ή με διαθέσιμες πάνω από μια διαφορετικές μεταστατικές εστίες (3), ή με διαθέσιμη μόνο την πρωτοπαθή εστία (5) οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) και διαγνώστηκαν το χρονικό διάστημα 2012-2020. Τα ιστοικά δείγματα προέρχονταν από χειρουργικό υλικό εκτομής ή από ευρεία εκτομή δέρματος καθώς και από συνακόλουθο συνοδό λεμφαδενικό καθαρισμό στην περίπτωση μεταστατικού λεμφαδένα-φρουρού, ή μεταστατικών λεμφαδένων, ή από απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές, οι οποίες προωθήθηκαν προς ανοσοϊστοχημική και μοριακή ανάλυση, με απαραίτητη προϋπόθεση την παρουσία επαρκούς υλικού.

### **2.2 Κλινικά Χαρακτηριστικά Ασθενών**

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 25 έως 82 ετών (μέση ηλικία διάγνωσης 59 ετών) και η αναλογία ανδρών/γυναικών ήταν 1:1.



**Πίνακας 2.1.** Ο μελετώμενος πληθυσμός.

# Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία	Έτος	Πρωτοπαθής εστία	Πρωτοπαθής εστία		Μετάσταση/ Μεταστάσεις	
					Ιστολογικός τύπος	μ.δ. (εκ)	Λεμφαδέναις	Συμπαγή όργανα
1	♀	27	2012/ 2017	Μελάνωμα τραχήλου	προβάλλον- οζώδες	1,4	✓	
2	♂	69	2018	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	
3	♀	39	2015/ 2019	Υπονύχιο μελάνωμα	Ευρύτερη εκτομή	-		Δέρμα Πνεύμονας
4	♀	58	2019	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	
5	♂	75	2019	Μελάνωμα δεξιάς πτέρνας	ακρικό	5	✓	
6	♀	25	2016/ 2019	Μελάνωμα ράχης	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	Μαστός

7	♂	38	2014-2019	Μελάνωμα θώρακα	Ευρύτερη εκτομή	-	Μελάνωμα δεξιού μαστού  Συμπληρωματική εκτομή  Μελάνωμα επι ουλής  Πρόσθιο τοίχωμα  Ράχη  Ωμοπλάτη
8	♂	82	2016	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής  Ευρύτερη εκτομή	οζώδες	0,5	
9	♂	63	2017	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής	οζώδες	3	

10	♂	37	2017	Μελάνωμα δεξιού μηρού	Επιφανειακά επεκτεινόμενο	1,7		
11	♂	64	2019	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής	οζώδες	1,7		
12	♂	65	2018	Μελάνωμα δεξιάς πτέρνας	οζώδες	7		
13	♂	78	2018	Μελάνωμα αριστερής κνήμης (αλλαχού)	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	
14	♀	50	2017/ 2018	Μελάνωμα κάτω άκρων (αλλαχού)	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	Τοπική υποτροπή
15	♂	58	2019	Μελάνωμα μετώπου	Επιφανειακά επεκτεινόμενο	1,3	✓	
16	♀	79	2019	Μελάνωμα άκρας χειρός	Επιφανειακά επεκτεινόμενο	1,2	✓	

17	♀	70	2015	Μελάνωμα τριχωτού κεφαλής	οζώδες	0,8	✓	
18	♀	68	2015	Οπισθοωτιαίο Μελάνωμα Ευρύτερη εκτομή	οζώδες	1,6	✓	Τράχηλος Παρειά
19	♀	78	2016	Μελάνωμα γόνατος		3		Τοπική υποτροπή κνήμη και ιγνυακή περιοχή
20	♀	49	2017	Μελάνωμα πτέρνας	προβάλλον εν μέρει πολυποειδές με ευρύ μίσχο	3,4	✓	
21	♀	69	2018	Μελάνωμα	ακρικό	1,3	✓	
22	♂	52	2015	Μελάνωμα παρειάς (αλλαχού)	Ευρύτερη εκτομή	-	✓	

## 2.3 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- **Συσκευές και όργανα**

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν το αυτοματοποιημένο μηχάνημα Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA), ηλεκτρονικός υπολογιστής, αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες, αυτόματες πιπέτες των 20-1000 μl, ρύγχη πιπετών (tips), πιπέτες Pasteur 1ml, δοκιμαστικοί σωλήνες, σωληνάκια erpendorf, υδροβολέας 500 ml, κωνικές φιάλες 100, 250 ml, ογκομετρικοί κύλινδροι 50, 500 και 1000 ml, ογκομετρικές φιάλες των 500 ml, σιφώνι μέτρησης, γυάλινες φιάλες αντιδραστηρίων 1L, κλίβανος για την επώαση των δειγμάτων, απαγωγός αερίων, αναδευτήρας Vortex, φούρνος μικροκυμάτων ισχύος 1500 Watt και διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης για την εκτίμηση των ανοσοχρώσεων.

- **Αντιδραστήρια**

Στη διάρκεια διενέργειας της ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα και kits:

- ανιόντα οιοπνεύματα (96% και 100%)
- διάλυμα ξυλόλης
- διάλυμα Antibody Diluent (Dako)
- διάλυμα αποκλεισμού υπεροξειδάσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Wash Buffer
- Kit EnVision™ FLEX, High pH (Dako)
- Kit I VIEW DAB DETECTION (Ventana)
- το χρωμογόνο διάλυμα EnVision™ FLEX HRP MAGENTA CHROMOGEN (Dako)

Η συγκέντρωση του αντισώματος, ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία είναι παράμετροι σε στενή σχέση μεταξύ τους. Τα πρωτογενή μονοκλωνικά αντισώματα (mouse monoclonal) και το πολυκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η προέλευση, ο κλώνος, ο χρόνος επώασης και η αραίωσή τους παρατίθενται στον **Πίνακα 2.2**. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε, παρέχεται από το kit και είναι έτοιμο προς χρήση (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, ready to use).

**Πίνακας 2.2.** Πρωτογενή αντισώματα της μελέτης.

<b>Αντίσωμα</b>	<b>Προέλευση</b>	<b>Κλώνος</b>	<b>Χρόνος επώασης</b>	<b>Αραίωση</b>
<b>BRAF V600E</b>	Ventana	VE1	32 min	Ready to use
<b>B-Raf V600E</b>	Novus Biologicals	K21-F	32 min	1:100
<b>HMB45</b>	Dako	HMB45	30 min	1:50
<b>S100</b>	Dako	Polyclonal	30 min	Ready to use
<b>Melan-A</b>	Dako	A103	30 min	1:50

**Πρότυπο χρώσης:** Τα κύτταρα που σημαίνονται από το αντίσωμα Anti-S100 εμφανίζουν ερυθρή πυρηνική και κυτταροπλασματική χρώση. Τα κύτταρα που επισημαίνονται από τα αντισώματα Anti-HMB45, Anti-Melan-A (με χρωμογόνο την αλκαλική φωσφατάση) εμφανίζουν ερυθρή κυτταροπλασματική χρώση, ενώ από Anti-BRAF εκφράζουν καφέ κυτταροπλασματική χρώση (με χρωμογόνο το DAB (3,3-διαμινοβενζιδίνη)).

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF*, στην παρούσα μελέτη είχαν προηγηθεί πολλαπλές δοκιμές με το διαθέσιμο μονοκλωνικό αντίσωμα της εταιρείας Novus Biologicals B-Raf V600E (κλώνος K21-F). Βάσει της βιβλιογραφίας, προτείνεται η χρήση του και στο μελάνωμα αλλά αποκλειστικά για ερευνητικούς σκοπούς. Το αντίσωμα αυτό χρησιμοποιείται από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο στην ρουτίνα κλινικής διάγνωσης λεμφωμάτων. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν ως μάρτυρες τρία διαφορετικά ιστικά υλικά λεμφαδενικών μεταστάσεων μελανώματος. Ωστόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα δεν ήταν ανάλογη των προσδοκιών και ακολούθησε η αναζήτηση ενός νέου και καταλληλότερου για την μελέτη αντίσωμα. Για την τελική επιλογή, βάσει της βιβλιογραφίας, το πλέον συχνά προτεινόμενο και χρησιμοποιούμενο αντίσωμα είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα BRAF V600E (κλώνος VE1) της εταιρείας Ventana, το οποίο έχει αποδεδειγμένα μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα στο μελάνωμα (Anwar et al., 2016; Cheng et al., 2017; Cornican et al., 2018; Orchard et al.,

2019; Vanni et al., 2020). Αρχικά, ως μάρτυρας του αντισώματος αναφέρεται στη βιβλιογραφία να έχει χρησιμοποιηθεί FFPE από ορθοκολικό καρκίνο. Μετέπειτα, είχε διευρυνθεί η χρήση του για ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου σε περιπτώσεις μελανώματος και καρκινώματος θυρεοειδούς. Προς το παρόν, το αντίσωμα χρησιμοποιείται ερευνητικά, αλλά προβλέπεται να εγκριθεί μελλοντικά για κλινική χρήση στα Παθολογοανατομικά Εργαστήρια, και είναι το μόνο διαθέσιμο στην αγορά με αυτήν την προοπτική.

Για τη μοριακή ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το κλειστό σύστημα Cobas Z4800 Real Time PCR (CE-IVD). Επιπλέον: το cobas DNA Sample Preparation Kit, 180 μL DNA TLB (DNA Tissue Lysis Buffer), το Kit αποδιάταξης [ 70 μL PK (Proteinase K λυοφιλοποιημένη), 500 μL WBI (DNA Wash Buffer I), 500 μL WBII ], 200 μL DNA PBB (DNA Paraffin Binding Buffer), 100 μL DNA EB (DNA Elution Buffer), 25 σωληνάκια FT και CT 550 μL, RXNMIX (Reaction Mix), MGAC (Magnesium acetate 3x0.15 mL) BRAF OM (Oligo Mix 3x 0.13mL), οι μάρτυρες BRAF MUT και BRAF WT, DNA SD (Specimen Diluent) 2x 0.13 mL.

- **Σύσταση διαλυμάτων** (παρέχονται στο κλειστό σύστημα ανάλυσης)

DNA Tissue Lysis Buffer: Tris-HCl buffer, Potassium Chloride, 0.04% EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.09% Sodium azide

DNA Paraffin Binding Buffer: Tris-HCl buffer, 49.6% w/w Guanidine hydrochloride, 0.05% Urea, 17.3% Triton X-100)

DNA Wash Buffer I: Tris-HCl buffer, 64% w/w Guanidine hydrochloride

DNA Wash Buffer II: Tris-HCl buffer, Sodium chloride

DNA Elution Buffer: Tris-HCl buffer, 0.09% Sodium azide

Magnesium acetate: Magnesium acetate, 0.09% Sodium azide

DNA SD (Specimen Diluent): Tris-HCl buffer, 0.09% Sodium azide

BRAF Mutant Control: Tris-HCl buffer, EDTA, 0.09% Sodium azide, < 0.001% plasmid DNA (microbial) containing mutant sequence, < 0.001% plasmid DNA (microbial) containing wild type sequence

BRAF Wild Type Control: Tris-HCl buffer, EDTA, 0.09% Sodium azide, < 0.001% plasmid DNA (microbial) containing wild type sequence

BRAF Oligo Mix: Tris-HCl buffer, EDTA, 0.09% Sodium azide, Poly rA RNA, < 0.01% Upstream and downstream BRAF primers, < 0.01% Fluorescent-labeled BRAF probes

RXNMIX: Tricine buffer, Potassium acetate, Potassium hydroxide, Glycerol, Tween 20, EDTA, 5% Dimethyl sulfoxide, <0.09% dNTPs, <0.10% Z05 DNA polymerase (microbial), <0.10% AmpErase enzyme, <0.003% Oligonucleotide aptamer, 0.08% Sodium azide

Στα υλικά-αντιδραστήρια που δεν παρέχονται από το κλειστό σύστημα Cobas:

- Διάλυμα ξυλόλης (> 98.5%)
- Διάλυμα αιθανόλης και ισοπροπανόλης
- αυτόματες πιπέτες των 20-1000 µL
- Cobas 4800 System Microwell Plate (AD Plate)
- Sealing Film
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 1.5 mL
- NanoDrop UV-Vis Φασματοφωτόμετρο
- ρύγχη πιπετών (tips)
- σωληνάκια erpendorf
- αναδευτήρας Vortex

## **2.4 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)**

### **2.4.1 Μέθοδος**

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική μελέτης των ιστών για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς (Jaiswal, 2016), η οποία εισήχθη για πρώτη φορά το 1941 (Coons et al., 1941). Στην IHC, χρησιμοποιούνται αντισώματα έναντι αντιγόνων, που εκφράζονται

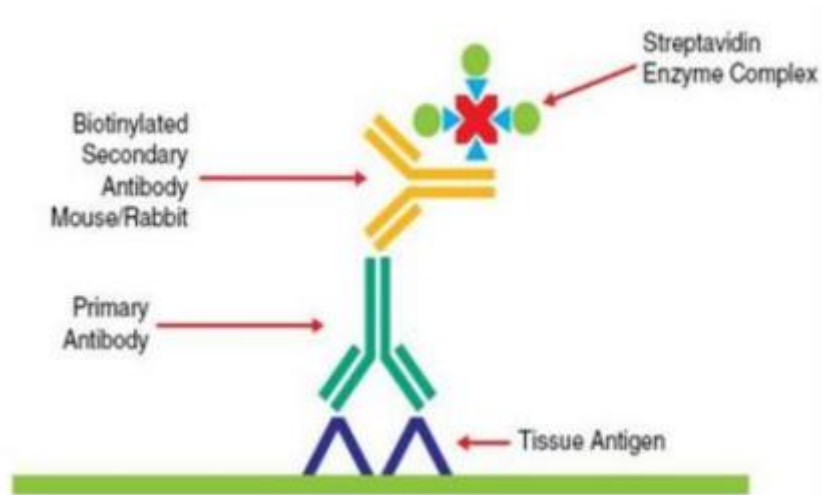


στον ιστό ενδιαφέροντος. Τα αντιγόνα αποτελούνται από διάφορους επίτοπους. Ένας επίτοπος είναι μια αλληλουχία αμινοξέων που αποτελεί μια συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή για να προσαρμοστεί ένα αντίσωμα. Αυτοί οι επίτοποι μπορούν να βρεθούν στην κυτταρική επιφάνεια, στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Η κύρια ουσία της μεθόδου είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αντιγόνου και ενός αντισώματος σύμφωνα με το μοντέλο «κλειδιού-κλειδαριάς». Στην ιδανική περίπτωση λαμβάνει χώρα μία ειδική και ισχυρή σύνδεση μεταξύ του αντισώματος και του επιτόπου. Το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος γίνεται ορατό με άμεσες και έμμεσες μεθόδους ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, ένα σύστημα ανίχνευσης συνδέεται με το αντίσωμα, προκειμένου να το καταστήσει ορατό.

Στις άμεσες μεθόδους ανίχνευσης, το πρωτογενές αντίσωμα σημαίνεται με έναν κατάλληλο δείκτη, όπως φθορίζουσα χρωστική, ένζυμο, ραδιενεργό στοιχείο ή σωματίδια κολλοειδούς χρυσού. Συνήθως, χρησιμοποιείται η ανοσοενζυμική τεχνική με δείκτη-ένζυμο την υπεροξειδάση (HRP), και βασίζεται στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό και οξυγόνο. Σε αυτή την αντίδραση, οξειδώνονται ουσίες που παράγουν χρώμα και για το λόγο αυτό ονομάζονται χρωμογόνα. Το ευρέως χρησιμοποιούμενο χρωμογόνο είναι η 3,3 διαμινοβενζιδίνη (DAB).

Στις έμμεσες μεθόδους ανίχνευσης, χρησιμοποιείται και δεύτερο αντίσωμα, το οποίο διαθέτει το μόριο σήμανσης. Το δευτερογενές αντίσωμα προκύπτει με ανοσοποίηση ενός οργανισμού διαφορετικού από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πρωτογενούς. Η έμμεση μέθοδος που βασίζεται στο σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης ως σύστημα ανίχνευσης, έχει δύο διαφορετικές παραλλαγές, τη μέθοδο LSAB και τη μέθοδο ABC.

Η βιοτίνη είναι βιταμίνη χαμηλού μοριακού βάρους που μπορεί να συνδεθεί με αντισώματα (Chen et al., 2010). Η αβιδίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη, η οποία μπορεί να σημανθεί με υπεροξειδάση και έχει, όπως και η στρεπταβιδίνη, μεγάλη συγγένεια για τη βιοτίνη. Η μέθοδος της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAvidin Biotin) είναι η πλέον ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική και είναι σχετικά παρόμοια με την ABC, από την οποία διαφέρει στο ότι αντί της αβιδίνης χρησιμοποιείται η στρεπταβιδίνη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ένα συνδεδεμένο με βιοτίνη δευτερογενές αντίσωμα που συνδέει πρωτογενή αντισώματα με σύζευγμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1. Μέθοδος LSAB (Ανατύπωση από Key, 2001).

- **Μέθοδος Υπεροξειδάσης-Αντι-Υπεροξειδάσης (PAP method)**

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ένα δεύτερο αντίσωμα-γέφυρα, για την ένωση του πρωτοταγούς αντισώματος με το αντιδραστήριο PAP. Το αντιδραστήριο PAP, έχει τη μορφή ενός σταθερού ανοσοσυμπλέγματος, αποτελούμενου από το αντιγόνο υπεροξειδάση του φυτού *Armoracia rusticana* (horseradish, γνωστό ως Αρμοράκια ή Χρένο) και από το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου αυτού. Το αντιδραστήριο PAP και το πρωτοταγές αντίσωμα είναι αναγκαίο να έχουν παραχθεί στο ίδιο είδος ζώου, ενώ το αντίσωμα-γέφυρα παράγεται σε διαφορετικό είδος ζώου. Το τελευταίο έχει ειδικότητα έναντι του πρωτοταγούς αντισώματος και έναντι της ανοσοσφαιρίνης του PAP ανοσοσυμπλέγματος, με αποτέλεσμα τη σταθερή διασύνδεσή τους. Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως σε τομές παραφίνης με πολύ καλά αποτελέσματα λόγω της υψηλής ευαισθησίας, ειδικότητας και σταθερότητας των αντιδραστηρίων. Περιορισμό της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το αντίσωμα του αντιδραστηρίου PAP και το πρωτοταγές αντίσωμα πρέπει να παράγονται στο ίδιο είδος ζώου. Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα αντιδραστήρια PAP που έχουν παραχθεί σε όλα τα είδη ζώων που παράγονται και τα πρωτογενή αντισώματα. Ανάλογες με τις παραπάνω είναι και οι αρχές της τεχνικής αλκαλικής φωσφατάσης-αντι-αλκαλικής φωσφατάσης (τεχνική APAAP) στην οποία, στη θέση του συμπλόκου PAP χρησιμοποιείται το σύμπλοκο APAAP. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όταν στους υπό εξέταση ιστούς υπάρχουν υψηλά επίπεδα ενδογενούς υπεροξειδάσης, όταν χρειάζεται να ανιχνευθούν ειδικά κύτταρα που ευνοούνται από το έντονο κόκκινο χρώμα των υποστρωμάτων της

αλκαλικής φωσφατάσης και σε περιπτώσεις διπλής ανοσοχρώσης σε συνδυασμό με μέθοδο υπεροξειδάσης.

### **Αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία (Αυτοματοποιημένο Μηχάνημα Ventana BenchMark XT)**

Το αυτοματοποιημένο μηχάνημα Ventana BenchMark XT αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό εργαλείο νέας γενιάς για την αυτοματοποιημένη προετοιμασία των ιστών που προορίζονται για ανοσοϊστοχημική χρώση. Η χρήση του συστήματος Ventana αυξάνει την ευελιξία με τη δυνατότητα βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων για τις τεχνικές που πραγματοποιούνται σε αυτό (IHC, ISH, FISH, SISH και FITC), την ποιότητα ως προς την αντίδραση χρώσης των δειγμάτων και την παραγωγικότητα καθώς η αυτοματοποίηση της συνολικής διαδικασίας δίνει έως και 25% αύξηση στην ταχύτητα της προετοιμασίας της δοκιμής.

Το μηχάνημα αποτελείται από μια μονάδα χρώσης, μια μονάδα ρευστών και τέλος μια μονάδα αποβλήτων. Η μονάδα χρωματισμού διαθέτει 35 θέσεις για τα αντιδραστήρια και 30 πλήρως ανεξάρτητες θέσεις για την τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών (slides). Η μονάδα ρευστών χρησιμοποιείται για την τοποθέτηση των αντιδραστηρίων του συστήματος (έλεγχος μέσω αισθητήρων) και τη διανομή τους αυτόματα στη μονάδα χρώσης. Η μονάδα αποβλήτων αποτελείται από δύο δεξαμενές στις οποίες υπάρχουν αισθητήρες που αποτρέπουν την ενδεχόμενη υπερχειλίση στην περίπτωση απουσίας του εργαστηριακού προσωπικού. Μέρος του συστήματος αποτελεί επίσης ένα κάλυμμα με ειδικό λάδι που προστατεύει το ιστικό δείγμα από την ξήρανση, επιτρέποντας τη σταθερότητα του καθώς και ένα μίξερ αέρα-Vortex (Vortex Mixer) που επιτρέπει την ισότιμη κατανομή του αντιδραστηρίου και την πλήρη κάλυψη του πλακιδίου που προορίζεται για χρώση. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται φέρουν έναν γραμμοκώδικα (barcode) με τη μορφή αυτοκόλλητης ταινίας, προκειμένου αυτά να αναγνωρίζονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας που πρόκειται να ακολουθήσει. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να ελέγχεται η πορεία της διαδικασίας κάθε χρονική στιγμή.

#### **2.4.2 Πειραματικό μέρος**

Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση της

έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BRAF και των πρωτεϊνών Melan-A, S100 και HMB45. Τα αντισώματα για την πρωτεΐνη BRAF εφαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο μηχάνημα ανοσοχρώσεων της Ventana, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες που το συνοδεύουν. Για τις Melan-A, S100 και HMB45 χρησιμοποιήθηκε η διπλή ανοσοχρώση σε συνδυασμό με μέθοδο υπεροξειδάσης (τεχνική APAAP).

Η επιλογή των ιστικών δειγμάτων έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκές υλικό, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 3 χιλιοστών, οι οποίες προωθήθηκαν προς ανοσοϊστοχημική μελέτη.

- **Μέθοδος APAAP**

Για τις ανοσοχρώσεις των Melan-A, S100, HMB45 που πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο υπεροξειδάσης, ακολουθήθηκε η κάτωθι διαδικασία:

1. Αποπαραφίνωση των ιστικών τομών σε κλίβανο στους 60°C για 18 h
3. Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης και τοποθέτηση σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60 ° C για 30 min
4. Μεταφορά των πλακιδίων σε διάλυμα ξυλόλης για χρόνο 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
5. Ενυδάτωση των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης ελαττούμενης συγκέντρωσης (2x100%, 2x96%) για 30 sec σε κάθε διάλυμα
6. Έκπλυση των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό
7. Τοποθέτηση των τομών σε buffer για τουλάχιστον 5 min
8. Προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέος 10% σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 min

9. Ανάκτηση αντιγονικών επιτόπων με εφαρμογή 2 κύκλων θέρμανσης εντός του φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 1500 Watt επί 6 min για κάθε κύκλο
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για χρόνο 10 min
12. Έκπλυση για 3 φορές σε απεσταγμένο νερό και Wash Buffer
13. Αποκλεισμός ενδογενών υπεροξειδασών με τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε διάλυμα 10% αποκλεισμού υπεροξειδάσης (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) για 15 min (ανάμιξη 500μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με 50ml αιθανόλη)
14. Τοποθέτηση των πλακιδίων σε αναδευτήρα
15. Έκπλυση 2 φορές για 5 min σε διάλυμα Wash Buffer
16. Blocking (δέσμευση) των μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων. Ενστάλλαξη 2-3 σταγόνων Power Block από το Kit και ακολούθως επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
17. Έκπλυση για 5 min σε διάλυμα Wash Buffer
18. Τοποθέτηση του πρωτογενούς αντισώματος (100 μl κατάλληλα αραιωμένου πρωτογενούς αντισώματος στα πλακίδια)
19. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min
20. Έκπλυση των πλακιδίων με Wash Buffer για 5 min
21. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 30 sec
22. Ξέπλυμα με 3 αλλαγές Wash Buffer, 3 min επώασης ανά στάδιο
23. Τοποθέτηση χρωμογόνου διαλύματος της αλκαλικής φωσφατάσης, EnVision FLEX MAGENTA πρόσφατα παρασκευασμένο 1700 μl λίγο πριν τη χρήση σε 300μl Buffer
24. Επώαση των δειγμάτων περίπου για 7-10 min μέχρι να αναπτυχθεί η επιθυμητή χρωστική αντίδραση

25. Έκπλυση με Wash Buffer
26. Χρώση με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10ml αιματοξυλίνης 100% σε 90ml απεσταγμένου νερού) για 2 min
27. Έκπλυση με Wash Buffer
28. Αφυδάτωση των ιστών με εμβάπτιση σε ανιούσα σειρά οινόπνευμάτων (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη
29. Κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδες (Immunoselect, dianova)
30. Μικροσκόπηση και αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στο οπτικό μικροσκόπιο

- **Αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία**

Για την αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Ventana Benchmark®XT και ακολουθήθηκε η κάτωθι διαδικασία:

1. Θερμική προεπεξεργασία των αντικειμενοφόρων πλακιδίων σε κλίβανο (ξήρανση στους 80°C για 15 min)
2. Χορήγηση και τοποθέτηση, με τη μορφή αυτοκόλλητης ταινίας, ενός γραμμοκώδικα (barcode), πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες
3. Αραίωση των πρωτογενών αντισωμάτων
4. 'Κλειστή' λειτουργία του μηχανήματος
  - ❖ Θέρμανση και αποπαραφίνωση του ιστού (διαδικασία διάρκειας 60 min)
  - ❖ Αποκάλυψη του αντιγονικού επιτόπου με τη χρήση κατάλληλου κυτταρικού διαλύματος (CC2) για 60 min
  - ❖ Επώαση των πρωτογενών αντισωμάτων (θ 37°C)
  - ❖ Εξωγενής προσθήκη 100 μl του πρωτογενούς αντισώματος [PREP KIT 101]
  - ❖ Επώαση για 32 min

- ❖ Πρότυπη ενίσχυση Ventana
- ❖ Πλύση
- ❖ Επίχρωση των τομών με μία σταγόνα αιματοξυλίνης [HEMATOXYLIN]
- ❖ Επώαση για 4 min
- ❖ Εφαρμογή μίας σταγόνας αντιδραστηρίου μπλε LCS
- ❖ Επώαση για 4 min
- ❖ Χρήση του UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana) για χρωμογόνο αντίχενυση

5. Αφαίρεση των αντικειμενοφόρων πλακών από το μηχάνημα

6. Έκπλυση σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 min με μια σταγόνα απορρυπαντικού πιάτων

7. Επαναλαμβανόμενες πλύσεις σε απεσταγμένο νερό

8. Κάλυψη των πλακιδίων με καλυπτρίδες

9. Στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 3h

10. Μικροσκόπηση και αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στο οπτικό μικροσκόπιο

- **Μάρτυρες (Controls)**

Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και σε κάθε runnig, χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστοί, για τους οποίους ήταν εκ των προτέρων γνωστό ότι εξέφραζαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές με παράλειψη της προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος.

- **Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων**

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε σε διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο, διπλής συμπαρατήρησης. Σε κάθε περίπτωση, η εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε σε βιώσιμο, καλά διατηρημένο νεοπλασματικό ιστό, χωρίς νέκρωση και τεχνητά σφάλματα (artifacts).

## 2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

### 2.5.1 Μέθοδος

Η έννοια της PCR βασίζεται σε μια σειρά διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, αρχική θέρμανση 94°C, έπειτα 45-60 °C θερμοκρασία δράσης εκκινητών, ακόλουθη άνοδος της θερμοκρασίας στους 72 °C - βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης Taq. Αρχικά, το δείγμα DNA αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα, εκκινητές, Taq-πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), βεταΐνη (διάλυμα ενισχυτή) και νερό.

Η δοκιμή Cobas 4800 BRAF V600E mutation test είναι μια ανάλυση βασισμένη σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο. Πρόκειται για μια εγκεκριμένη από το FDA διαγνωστική μέθοδο που δίνει τη δυνατότητα της *in vitro* ποιοτικής ανίχνευσης της μετάλλαξης του πρωτοογκογονιδίου *BRAF V600E* σε απομονωμένο DNA (1799 T>A) από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και σταθεροποιημένο σε κύβους παραφίνης (FPPE) υλικό. Η δοκιμή επικυρώθηκε στο HistoGeneX για την ανίχνευση των μεταλλάξεων *BRAF V600* στο μελάνωμα, στο ορθοκολικό καρκίνωμα και στο καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC).

Η μέθοδος real-time PCR χρησιμοποιεί ένα φθορίζον-σημασμένο ανιχνευτή-στόχο που επιτρέπει την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων PCR σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος εμφανίζει ευαισθησία 95% για την ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF V600E* και 70% της μετάλλαξης *BRAF V600K* (Anderson et al., 2012).

Το πρωτόκολλο περιέχει συνολικά τα γνωστά πέντε βήματα:

1. Αποδιάταξη (Denaturation): αποδιάταξη δείγματος και ενεργοποίηση ενζύμων
2. Πολλαπλασιασμός (Amplification): PCR-πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου
3. Κυκλοποίηση (Cycling): ειδικός πολλαπλασιασμός του μεταλλαγμένου DNA
4. Τήξη (Melting): ανάλυση καμπύλης τήξης για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που προέρχεται από το DNA-στόχο
5. Ψύξη (Cooling): ψύξη του θερμοκυκλοποιητή



Το Cobas test 4800E βασίζεται σε:

- ❖ Γονιδιωματικό DNA από τομές του όγκου μονιμοποιημένου σε FFPE με συγκέντρωση DNA stock τα 5-35 ng/ml (αποδεκτό όριο > 2 ng/ml). Συνιστώμενη είσοδος ποσότητας DNA συνολικά τα 125 ng (25μL of a 5ng/μL dilution of DNA stock). Πρόκειται για χειροκίνητη εκχύλιση για τη λήψη γονιδιωματικού DNA, ξεκινώντας από μία ή δύο τομές πάχους 5 μm ιστού FFPE που περιέχουν τουλάχιστον 50% καρκινικά κύτταρα με ποσοστιαία μετάλλαξη > 5%.
- ❖ PCR ενίσχυση και ανίχνευση DNA στόχου με χρήση συμπληρωματικών ζευγών-εκκινητών (primers) και δύο ολιγονουκλεοτιδικούς σημασμένους ανιχνευτές (probes) με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές. Το ένα probe χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της wt BRAF V600 αλληλουχίας (sequence), ενώ το δεύτερο για τη μεταλλαγμένη V600E γονιδιωματικής περιοχής. Επιπλέον, για τη διενέργεια του τεστ χρησιμοποιούνται δύο εξωτερικά run controls και ένα φυσιολογικό αλληλίο εσωτερικά.

Καθώς το DNA συντίθεται με κάθε κύκλο, η ποσότητα του φωτός αυξάνεται σε σχέση με την αφθονία του προϊόντος DNA, το οποίο καθορίζεται από τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την ένταση του εκπεμπόμενου φωτός να υπερβεί ένα αυθαίρετο όριο. Η σχετική αφθονία *BRAF* V600E προσδιορίζεται συγκρίνοντας αυτό το κατώφλι με τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση του “wild type” *BRAF*.

### 2.5.2 Πειραματικό μέρος

Αρχικά, στο σετ δειγμάτων επιλέχθηκαν ιστολογικές τομές με επαρκές νεοπλασματικό υλικό (τουλάχιστον 50% καρκινικά κύτταρα) στη χρώση αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H/E) προκειμένου να επιτευχθεί η απομόνωση του DNA.

#### ❖ Απομόνωση- Εκχύλιση DNA από δείγματα ιστού FFPE

Ο ιστός που περιείχε καρκινικά κύτταρα αποπαραφινώθηκε (με λεπίδα ξύνονται μία ή δύο τομές μέγιστου πάχους 5 μm ιστού FFPE) και συλλέχθηκε σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα 1,5 mL. Στη συνέχεια το πρωτόκολλο εκτελέστηκε σύμφωνα με το kit Macherey-Nagel.

- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  ξυλόλης
- Ανάδευση στο Vortex 10 sec
- Επώαση για χρόνο 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (διάλυση παραφίνης)
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  απόλυτης αιθανόλης και ανάδευση στο Vortex 10 sec
- Επώαση για χρόνο 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρωση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα (16000 x g) και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προσοχή να μην αποσπαστεί το σφαιρίδιο
- Προσθήκη 1 ml απόλυτης αιθανόλης και ανάδευση στο Vortex 10 sec
- Φυγοκέντρωση για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα (16000 x g) και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προσοχή να μην αποσπαστεί το σφαιρίδιο
- Σκούπισμα ελαφρώς του σωληναρίου με διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης. Ξήρανση του σφαιριδίου του ιστού για 10 min στους  $+56\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αν χρειαστεί, ξήρανση μέχρι το μέγιστο των 20 min.
- Ανάδευση

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται το πρώτο βήμα του πρωτοκόλλου της απομόνωσης του DNA.

- Σε σφαιρίδιο ιστού (αποπαραφινωμένο όπως έχει περιγραφεί), προστίθεται 180  $\mu\text{L}$  διαλύματος “Tissue Lysis Buffer” (προκαλεί λύση του ιστού) και 70  $\mu\text{L}$  διαλύματος “Proteinase K” (πέπτει τις ιστόνες στις οποίες είναι τυλιγμένο το DNA), αφού το ξεπαγώσει ομαλά.
- Ανάδευση στο Vortex για 30 sec.
- Επώαση για 60 min στους  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αναδεύοντας στα 600 rpm.
- Το λύμα θα πρέπει να είναι καθαρό. Αν μόρια είναι ακόμα ορατά, παρατείνεται ο χρόνος επώασης για μία επιπλέον ώρα
- Επώαση για 60 min στους  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ανάδευση στα 600 rpm.
- Αφήνεται να κρυώσει στους  $+15$  με  $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Προσθήκη στο λυμένο ιστό 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος “DNA Binding Buffer” (το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και θα προσδέσει στο θετικό φορτίο των ρητίνων του σωληναρίου)
- Ανάμιξη πιπετάροντας πάνω-κάτω 3 φορές για να ομογενοποιηθεί το διάλυμα
- Επώαση για 10 min στους  $15$  με  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης (ως αλκοόλη προκαλεί μείωση της υδατοδιαλυτότητας)
- Ανάμιξη πιπετάροντας 3 φορές

- Τοποθέτηση του High Pure filter Tube πάνω στο High Pure Collection Tube, που έχει όγκο σχεδόν 550  $\mu\text{L}$
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 x g
- Τοποθέτηση του High Pure filter Tube πάνω σε ένα νέο High Pure Collection Tube
- Απόρριψη του προηγούμενου High Pure Collection Tube με ό,τι αυτό εμπεριέχει
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος “Wash Buffer I”
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 x g
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος “Wash Buffer II”
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 x g
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 16000 x g για να στεγνώσει εντελώς
- Τοποθέτηση του High Pure Filter Tube μέσα σε σωληνάκι αντίδρασης 1,5 ml
- Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  “Elution Buffer” (ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης του DNA) στο κέντρο του φίλτρου, χωρίς να ακουμπάει το φίλτρο
- Επώαση για 5 min στους 15 με 30 °C
- Φυγοκέντρηση για 1 min στα 8000 x g

Ο Σωλήνας μικροφυγοκέντρησης τώρα περιέχει το εκλουσμένο DNA.

Το εκλουσμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ή να αποθηκευθεί στους +2 με +8 °C για βραχυπρόθεσμη χρήση ή στους -115 με -25 °C για μακρόχρονη χρήση. Είναι καλό να φυγοκεντρηθεί για τελευταία φορά το έκλουσμα για 2 min στη μέγιστη ταχύτητα.

- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα αντίδρασης 1,5 mL

Το απομονωμένο DNA είναι λιγότερο ευαίσθητο σε σχέση με το RNA, το οποίο πρέπει να διατηρείται σε πάγο μέχρι το επόμενο βήμα του πειράματος, διότι μπορεί να αποικοδομηθεί από τις νουκλεάσες (RNAάσες).

### ❖ Προετοιμασία του Working Master Mix (MMX)

Η αναλογία των όγκων που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 50 µL RXN MIX, 40 µL BRAF OM, 35 µL MGAC

Σύνολο: 125 µL

**Σημείωση:** Φυγοκέντρωση για 5 sec πριν από κάθε χρήση.

### ❖ Ποσοτικοποίηση του DNA

Σημείωση: Φυγοκέντρωση κάθε δείγματος DNA για 5 δευτερόλεπτα πριν από την ποσοτικοποίηση.

Στο σύστημα θα εμφανιστεί ένα από τα τέσσερα αποτελέσματα:

Ανίχνευση μετάλλαξης	Στο κωδικόνιο 600 εξώνιο 15
Μη ανίχνευση μετάλλαξης	Στο κωδικόνιο 600 εξώνιο 15
Μη αξιόπιστο αποτέλεσμα	Απαιτείται επανάληψη
Απέτυχε	Αποτυχημένο run

### ❖ Μάρτυρες

Σε κάθε κύκλο (run) απαιτείται η παρουσία των μαρτύρων (controls) BRAF MUT στη θέση A01 και BRAF WT στη θέση B01 σε ποσότητα 25 µL με απαραίτητη την ένδειξη “Valid” και στους δύο μάρτυρες.

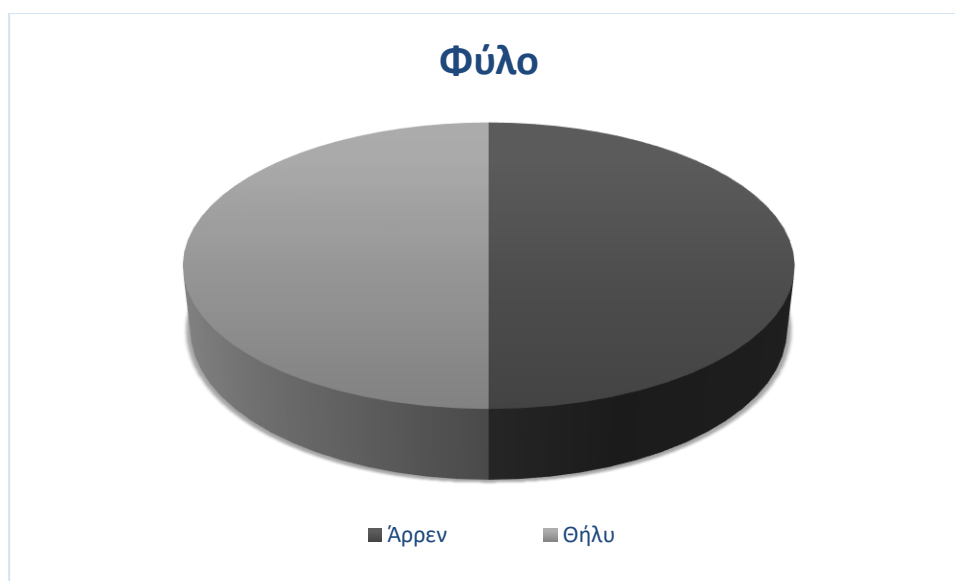
Η προς ανάλυση πλακέτα 24 θέσεων έχει την ακόλουθη μορφή (Εισάγονται από το ελάχιστο 3 έως το μέγιστο 24 δείγματα προς εξέταση):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRAF MUT	Sample 7	Sample 15	Sample 23								
B	BRAF WT	Sample 8	Sample 16	Sample 24								
C	Sample 1	Sample 9	Sample 17									
D	Sample 2	Sample 10	Sample 18									
E	Sample 3	Sample 11	Sample 19									
F	Sample 4	Sample 12	Sample 20									
G	Sample 5	Sample 13	Sample 21									
H	Sample 6	Sample 14	Sample 22									

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Τα γενικά χαρακτηριστικά που αφορούν την ομάδα των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη συνοψίζονται στο **Γράφημα 3.1** και στον **Πίνακα 3.1**. Η αναλογία ανδρών/γυναικών ήταν 1:1. Ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης ήταν 59 ετών.



**Γράφημα 3.1.** Κατανομή του φύλου στο μελετώμενο πληθυσμό. Επρόκειτο για 11 άνδρες και 11 γυναίκες.

**Πίνακας 3.1.** Κατανομή της ηλικίας στο μελετώμενο πληθυσμό.

# Ασθενής	Φύλο	Ηλικία
1	♀	27
2	♂	69
3	♀	39
4	♀	58
5	♂	75
6	♀	25
7	♂	38
8	♂	82
9	♂	63
10	♂	37
11	♂	64
12	♂	65
13	♂	78
14	♀	50
15	♂	58
16	♀	79
17	♀	70
18	♀	68
19	♀	78
20	♀	49
21	♀	69
22	♂	52

### 3.2 Προφίλ έκφρασης του γονιδίου- προβλεπτικού δείκτη BRAF μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας καθώς και σε διαφορετικές περιοχές της πρωτοπαθούς ή αποκλειστικά στο υλικό της μετάστασης

**Πίνακας 3.2.** Συγκριτικά αποτελέσματα των 29 αναλυθέντων διαφορετικών ιστικών δειγμάτων των 14 συνολικά ασθενών σε πρωτοπαθή ή/και μεταστατική εστία για παρουσία/απουσία μετάλλαξης BRAF με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Ασθενής	Έτος	Φύλο	Ηλικία	Πρωτοπαθής εστία		Μετάσταση/ Διηθημένος λεμφαδένας- φρουρός	Μεταστατική εστία/ Διηθημένος λεμφαδένας	
				Cobas test	IHC		Cobas test	IHC
1	2012/ 2017	♀	27	-	-	Λεμφαδένας	ανεπαρκές υλικό	-
2	2018	♂	69	-	-	Λεμφαδένας	+	+
3	2015/ 2019	♀	39	ανεπαρκές υλικό	-	Δέρμα	-	-
						Πνεύμονας	-	-
4	2019	♀	58	ανεπαρκές υλικό	-	Λεμφαδένας	-	-
5	2019	♂	75	-	-	Λεμφαδένας	-	-
6	2016/ 2019	♀	25	ανεπαρκές υλικό	ανεπαρκές υλικό	Λεμφαδένας	-	+
						Μαστός	-	+



7	2014 -2019	♂	38			Δεξιός μαστός		-
						Συμπληρωματική εκτομή		-
						Μελάνωμα επί ουλής		-
						Διήθηση στο πρόσθιο τοίχωμα	-	+
						Μεταστατικό μελάνωμα ράχης		-
						Μεταστατικό μελάνωμα αριστερής ωμοπλάτης	+	+
8	2016	♂	82	Πρωτοπαθής εστία: +	+			
				Ευρύτερη εκτομή: -	-			
9	2017	♂	63	-	-			

10	2017	♂	37	+	+			
11	2019	♂	64	-	-			
12	2018	♂	65	-	-			
13	2018	♂	78			Λεμφαδένας	-	-
14	2017/ 2018	♀	50			Τοπική υποτροπή Λεμφαδένας	+ -	+ -

**Σημείωση:** Τα υλικά των ασθενών # 15-22 του Πίνακα 2.1 δεν αξιολογήθηκαν για το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *BRAF*.

Από το σύνολο των 14 ασθενών, των οποίων τα υλικά τους εξετάστηκαν τόσο μοριακά όσο και ανοσοϊστοχημικά για το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *BRAF*, σημειώθηκε:

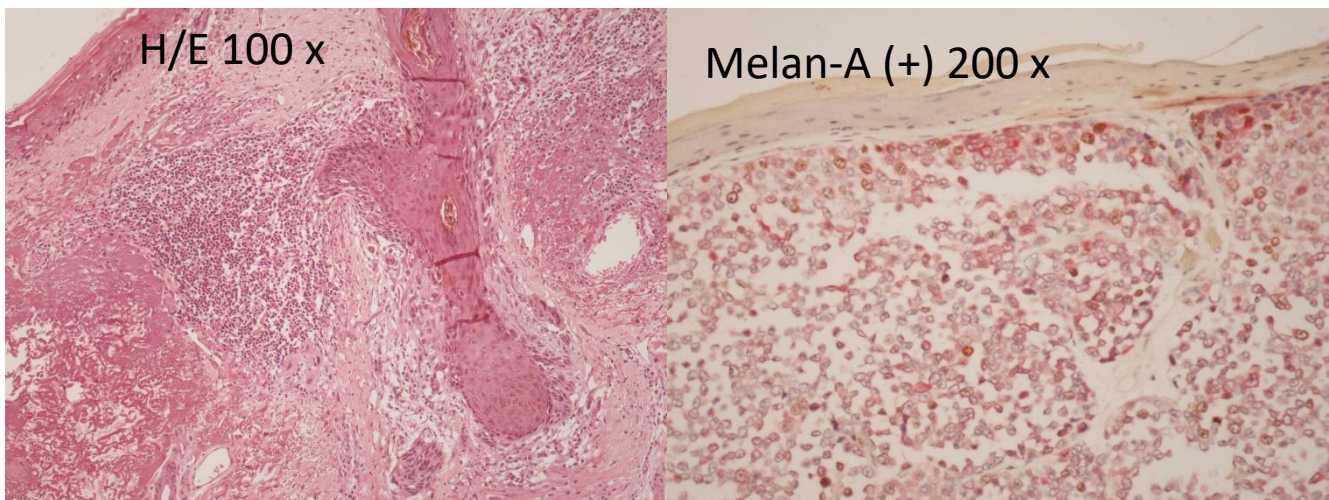
- ❖ Σε ένα περιστατικό ετερογένεια ως προς το προφίλ έκφρασης *BRAF* μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας (**Ασθενής # 2**),
- ❖ ενώ σε έναν ασθενή εντοπίστηκε ετερογένεια σε διαφορετικές περιοχές της πρωτοπαθούς εστίας (**Ασθενής # 8**)
- ❖ και σε δύο ακόμα ασθενείς ετερογένεια μεταξύ των μεταστάσεων (**Ασθενείς # 7 και 14**)

### 3.3 Παρουσίαση ορισμένων αξιοσημείωτων περιστατικών με ετερογένεια μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και των αντίστοιχων μεταστάσεων σε λεμφαδένες ή/και συμπαγή όργανα, μεταξύ διαφορετικών περιοχών της πρωτοπαθούς εστίας και μεταξύ των υλικών μετάστασης

Ο έλεγχος διενεργήθηκε τόσο στη δερματική εστία όσο και στο λεμφαδένα-φρουρό, ενώ σε έναν από τους ασθενείς ελέγχθηκε το υλικό από την αρχική βιοψία και από την πλήρη εξαίρεση που ακολούθησε.

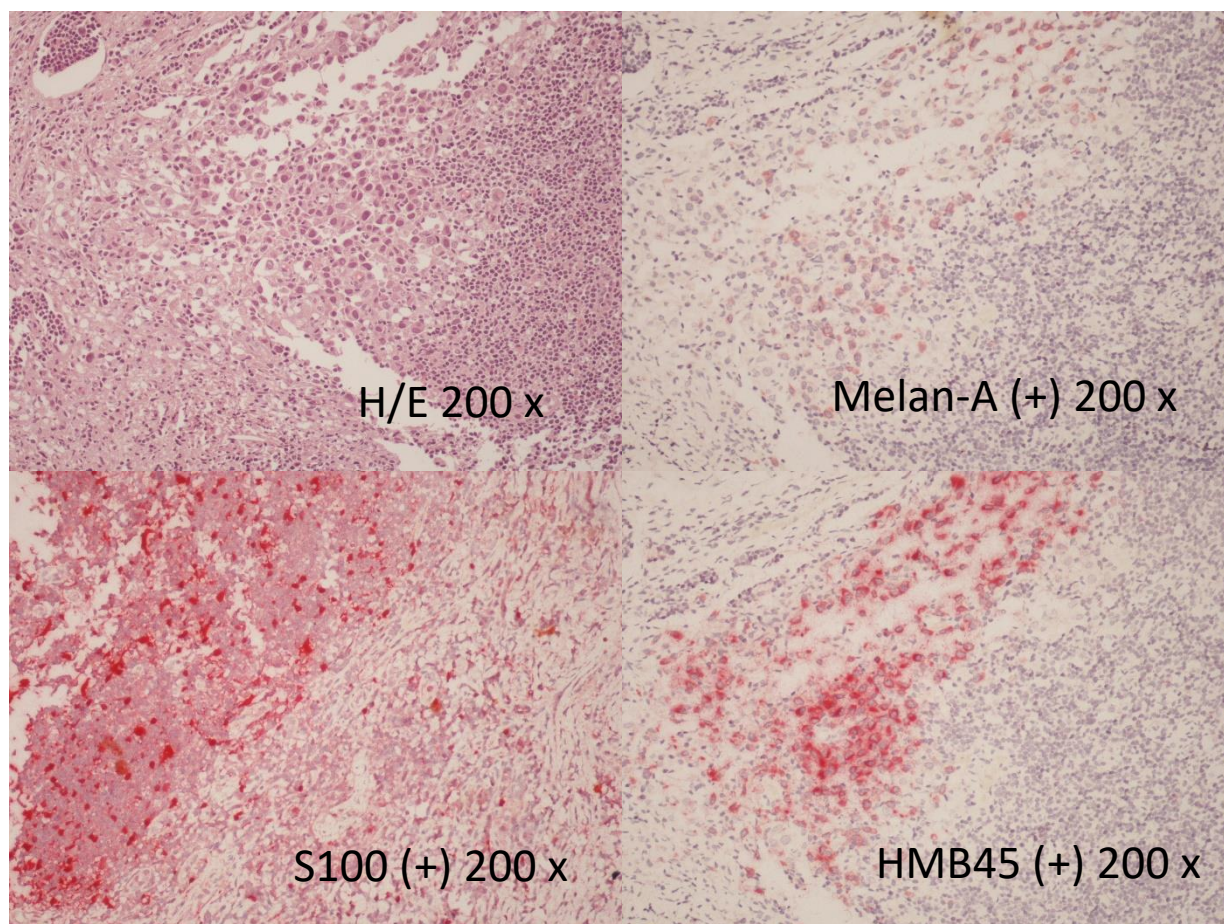
#### ▪ Ασθενής # 2 (Πίνακας 3.2)

Άνδρας ηλικίας 69 ετών, με διαγνωσθέν μελάνωμα τριχωτού κεφαλής (*BRAF*<sup>-</sup>) και θετικό λεμφαδένα-φρουρό δεξιά οπισθοωτιαία (*BRAF*<sup>+</sup>).

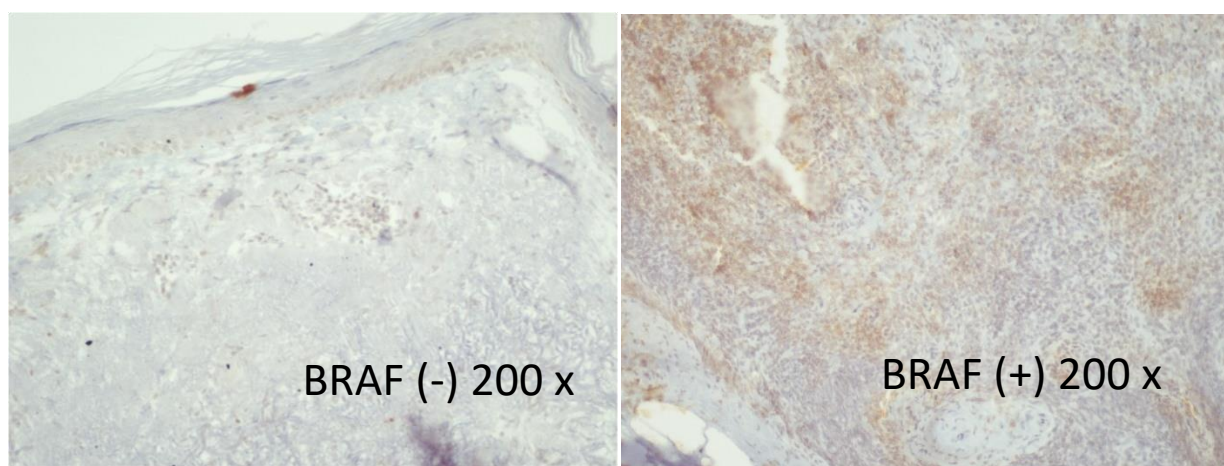


**Εικόνα 3.1.** Ευρύτερη εκτομή. Χρώση H/E. Μεγέθυνση x 100 (**αριστερά**). Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον μελανοκυτταρικό δείκτη Melan-A με αλκαλική φωσφατάση (κόκκινο χρώμα). Μεγέθυνση x 200 (**δεξιά**).





**Εικόνα 3.2.** Λεμφαδένας-φρουρός. Χρώση H/E και ανοσοϊστοχημικό προφίλ για τους δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100, HMB45.

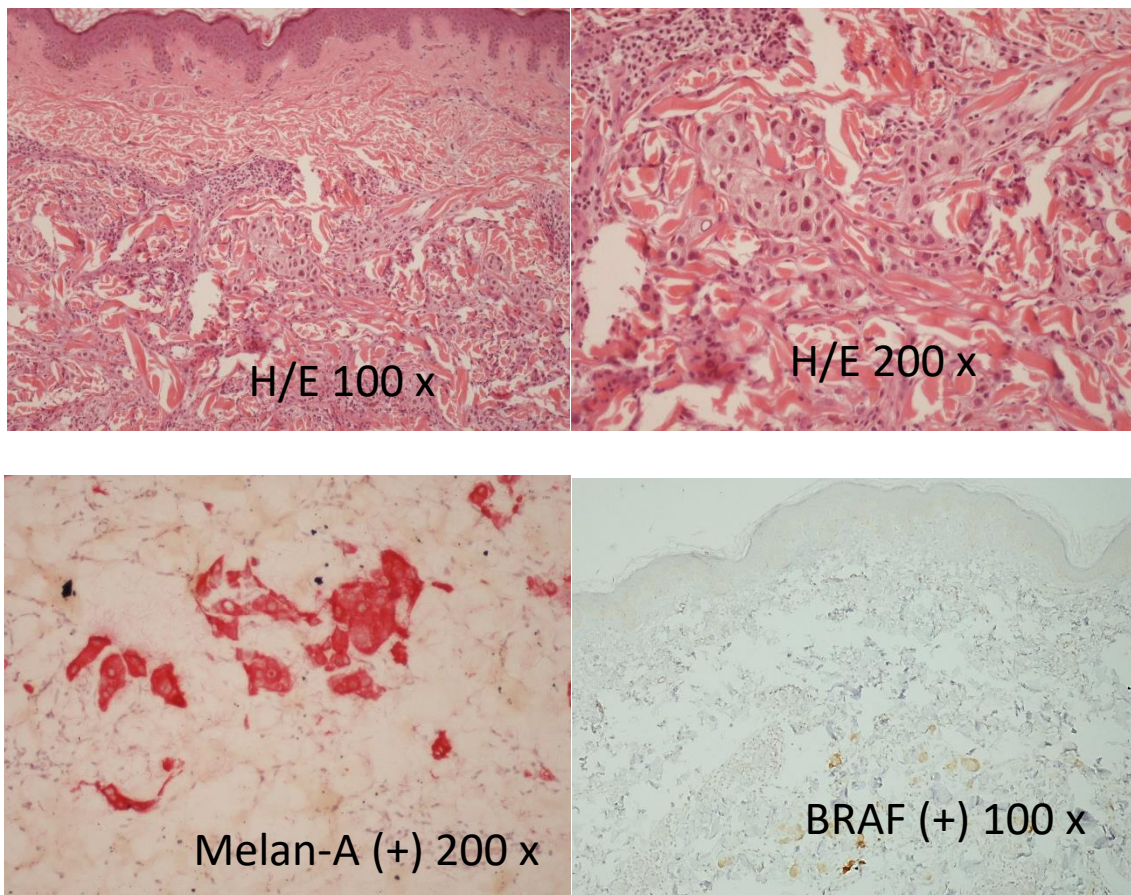


**Εικόνα 3.3.** Προφίλ BRAF μεταξύ πρωτοπαθούς (αριστερά) και δευτεροπαθούς εστίας (δεξιά).

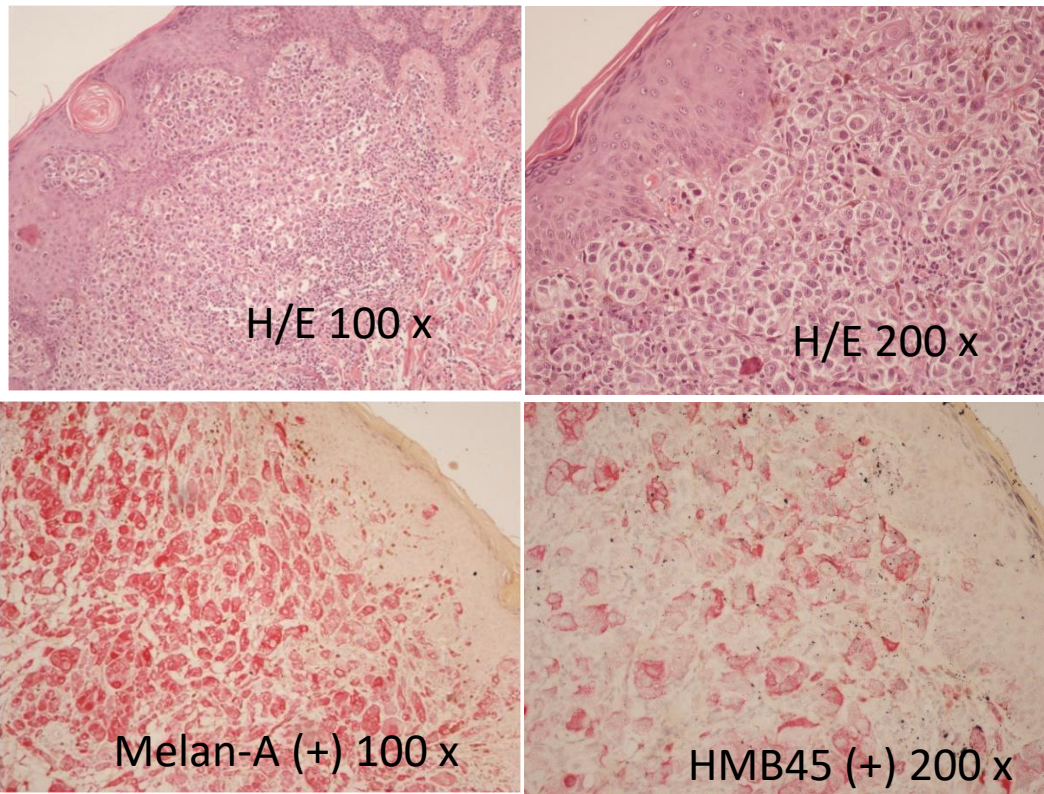


▪ Ασθενής # 7 (Πίνακας 3.2)

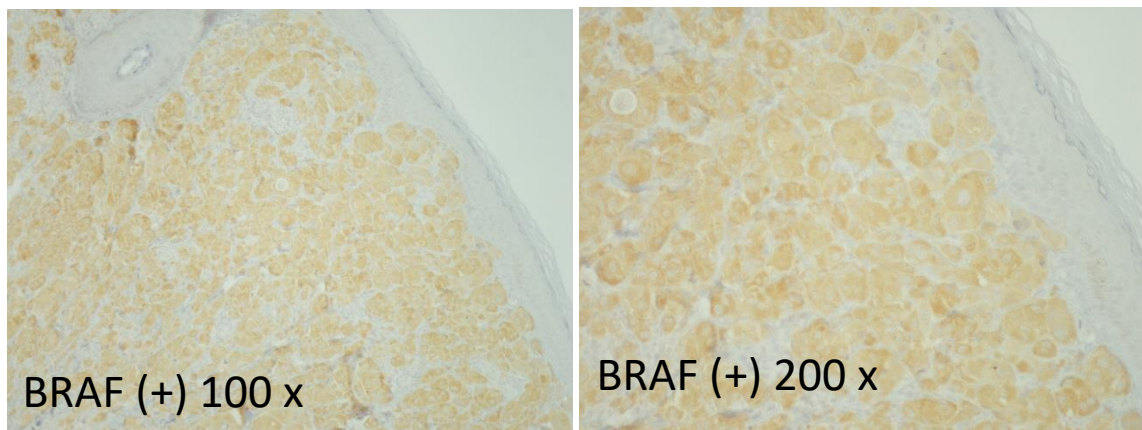
Ασθενής με πολλαπλές μεταστατικές εστίες στον οποίο προηγήθηκε η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έξι διαφορετικών δειγμάτων και σε όσα ανευρέθηκε θετικότητα ακολούθησε η μοριακή ανάλυση με σκοπό να συγκριθεί το αποτέλεσμα των δύο μεθόδων (Πίνακας 3.3).



**Εικόνα 3.4.** Διήθηση στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα.



**Εικόνα 3.5.** Κακόηθες μελάνωμα- μετάσταση ράχη.



**Εικόνα 3.6.** Προφίλ BRAF. Μελαγχρωματική βλάβη αριστερής ωμοπλάτης-μελάνωμα.

**Πίνακας 3.3.** Συγκριτικά αποτελέσματα διαδοχικών βιοψιών ανά έτος για μετάλλαξη του γονιδίου *BRAF* στον ίδιο ασθενή με δερματικό μελάνωμα με πολλαπλές μεταστατικές εστίες.

	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>Cobas test</b>				-		+
<b>IHC</b>	-	-	-	+	-	+

\* Ο ασθενής είχε πολλές μεταστατικές εστίες σε έδαφος χειρουργηθέντος μελανώματος:

2014: Δερματικό μελάνωμα δεξιού μαστού

2015: Συμπληρωματική εκτομή σε μελάνωμα

2016: Μελάνωμα επί ουλής

2017: Διήθηση στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα

2018: Σπίλος ράχης- κακώθες μελάνωμα

2019: Μελαγχρωματική βλάβη αριστερής ωμοπλάτης- μελάνωμα

**Αποτέλεσμα:** Ασυμφωνία στο αποτέλεσμα των δύο μεθόδων σε ένα εκ των δύο υλικών του ίδιου ασθενή (**Cobas - , IHC +**).

**Συμπέρασμα:** Επισημαίνεται η παρουσία ετερογένειας μεταξύ των μεταστάσεων στον συγκεκριμένο ασθενή.

#### ▪ Ασθενής # 8 (Πίνακας 3.2)

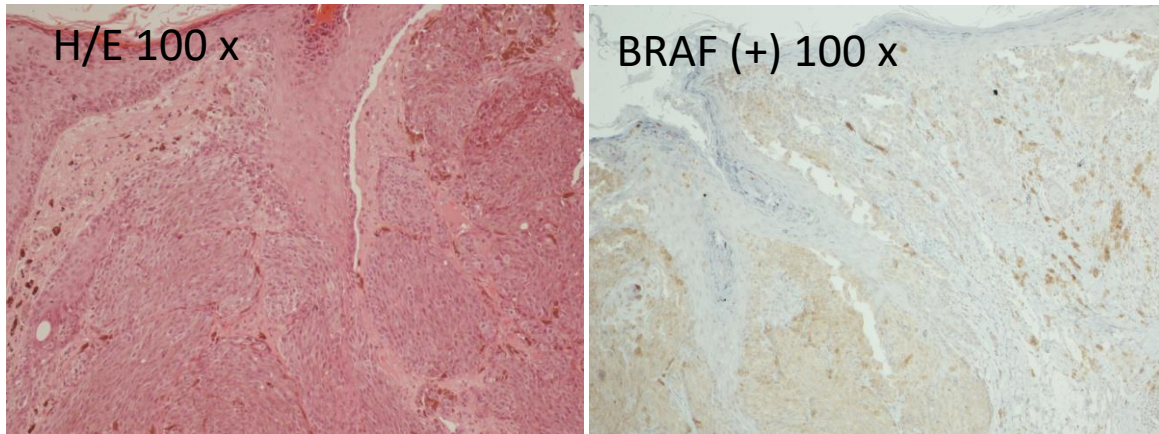
Άνδρας ηλικίας 82 ετών, για τον οποίο υπήρχε διαθέσιμο το υλικό της αρχικής βιοψίας για δερματική αλλοίωση που αποδείχθηκε κακώθες μελάνωμα και ακολούθησε η πλήρης εξαίρεση της αλλοίωσης.

**Αποτέλεσμα:**

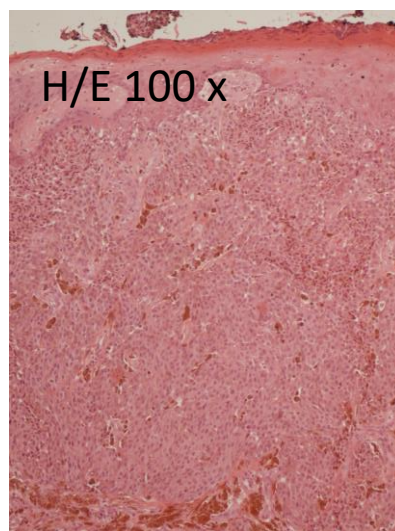
✓ ανίχνευση μετάλλαξης του γονιδίου *BRAF* μόνο στο υλικό της αρχικής βιοψίας και όχι στο υλικό της πλήρους εξαίρεσης

✗ αρνητικός ο λεμφαδένας-φρουρός

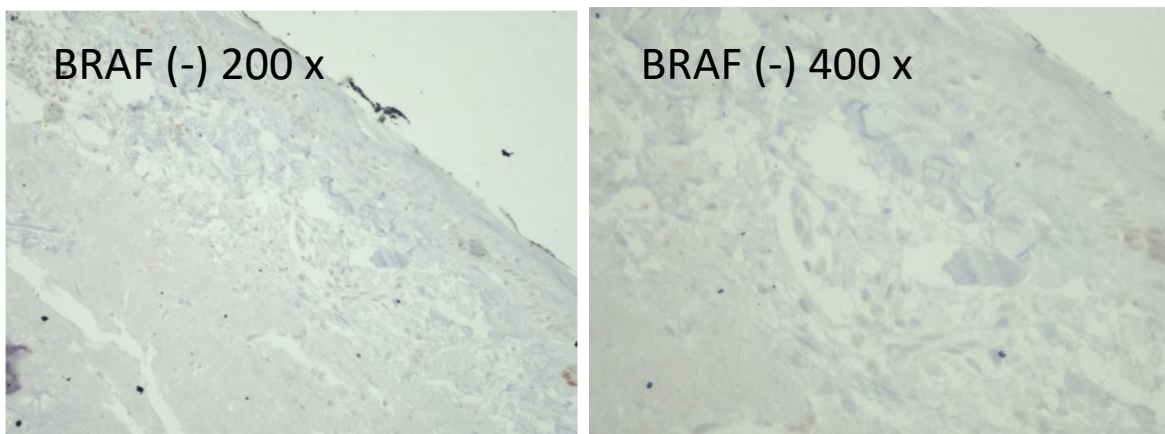




**Εικόνα 3.7.** Υλικό της αρχικής βιοψίας. Χρώση H/E X 100 (αριστερά). Προφίλ BRAF (δεξιά).



**Εικόνα 3.8.** Χρώση H/E στο υλικό της πλήρους εξαίρεσης.



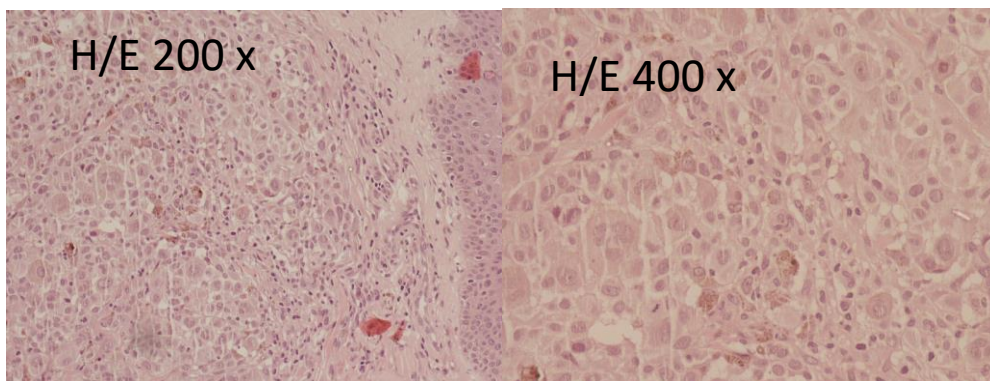
**Εικόνα 3.9.** Προφίλ BRAF στο υλικό της πλήρους εξαίρεσης.



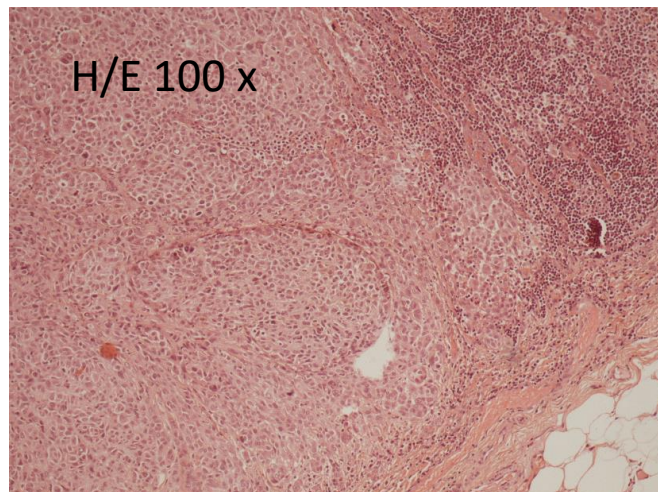
▪ **Ασθενής # 14 (Πίνακας 3.2)**

Άνδρας ασθενής, ηλικίας 50 ετών με διαγνωσθέν μελάνωμα κάτω άκρου και μεταστατική διήθηση στο λεμφαδένα-φρουρό και ακολούθως υποτροπή στο δέρμα της ιγνυακής περιοχής. Ο λεμφαδενικός καθαρισμός που ακολούθησε ήταν αρνητικός. Ακολουθούν αντίστοιχες εικόνες (**Εικόνες 3.10 - 3.14**).

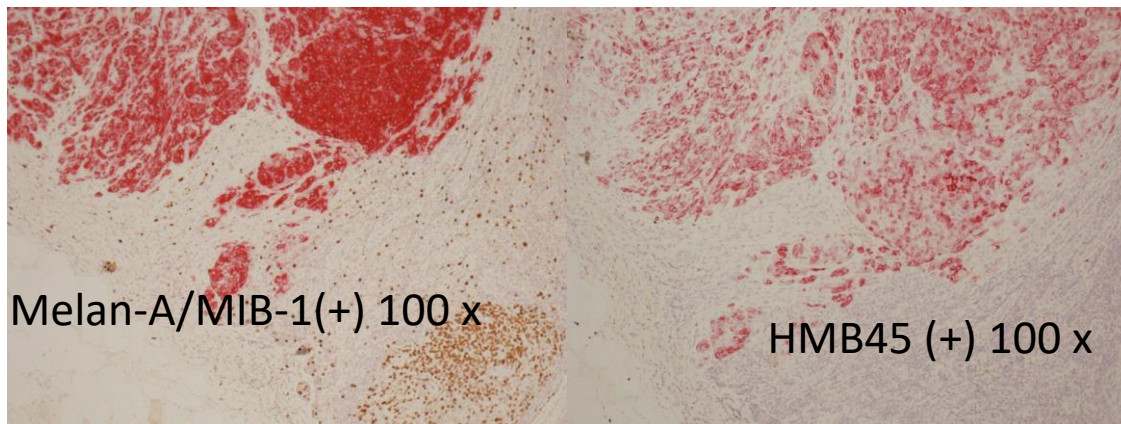
- ✓ Ανίχνευση μετάλλαξης του *BRAF* στο υλικό από την υποτροπή του δέρματος
- ✗ Ανίχνευση μετάλλαξης του *BRAF* στο λεμφαδένα-φρουρό



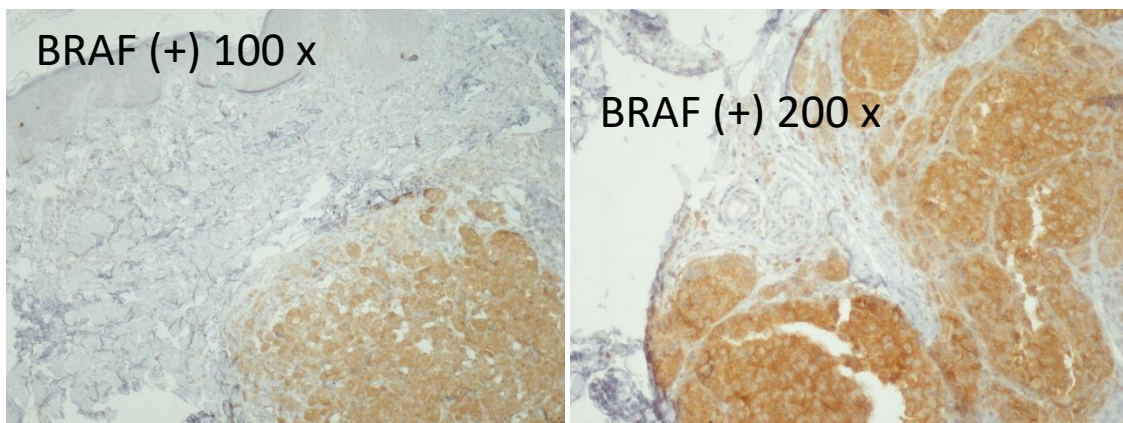
**Εικόνα 3.10.** Χρώση H/E. Μελάνωμα δέρματος από την υποτροπή στην ιγνυακή περιοχή. Μεγέθυνση X 200 (**αριστερά**) X 400 (**δεξιά**).



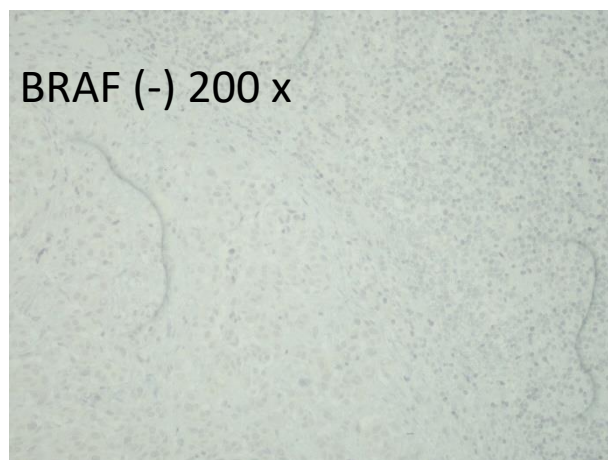
**Εικόνα 3.11.** Χρώση H/E. Μεταστατική διήθηση στο λεμφαδένα-φρουρό.



**Εικόνα 3.12.** Ανοσοϊστοχημική χρώση στον λεμφαδένα-φρουρό. **Δεξιά** για το δείκτη κακοήθων μελανοκυττάρων HMB45 με αλκαλική φωσφατάση (κόκκινο χρώμα) και **αριστερά** η διπλή χρώση για τον πυρηνικό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 με χρωμογόνο DAB (καφέ χρώμα) και για τον μελανοκυτταρικό δείκτη Melan-A με αλκαλική φωσφατάση (κόκκινο χρώμα).



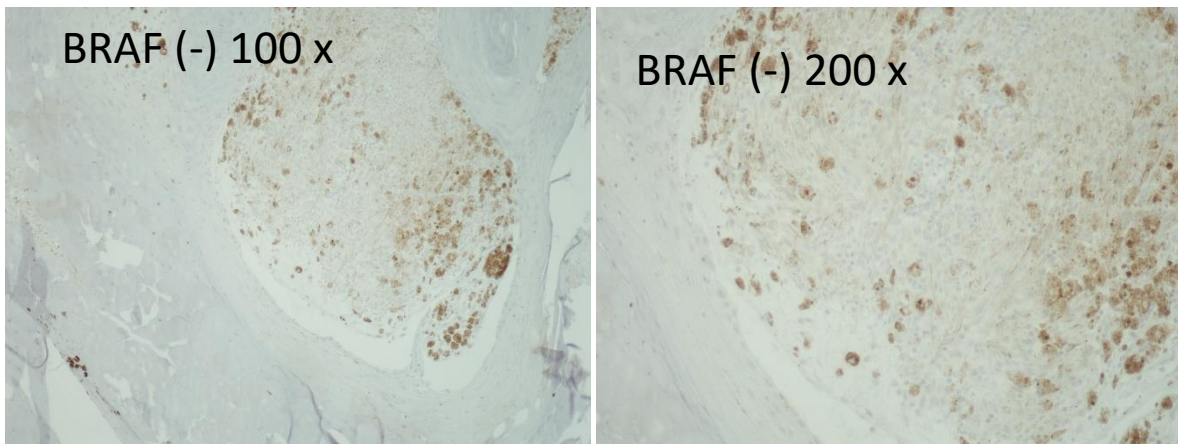
**Εικόνα 3.13.** Ανίχνευση μετάλλαξης του *BRAF* στο υλικό από την υποτροπή του δέρματος.



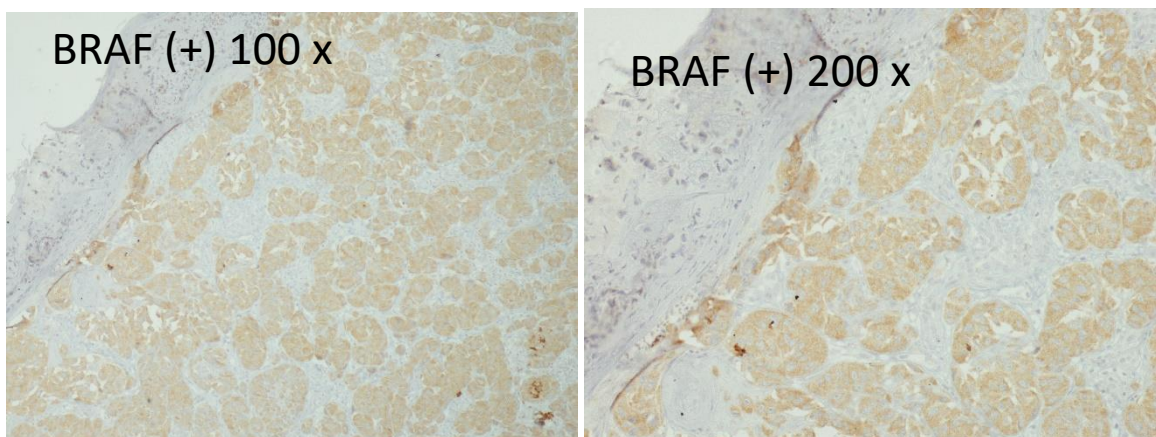
**Εικόνα 3.14.** Μη ανίχνευση μετάλλαξης του *BRAF* στο λεμφαδένα-φρουρό.



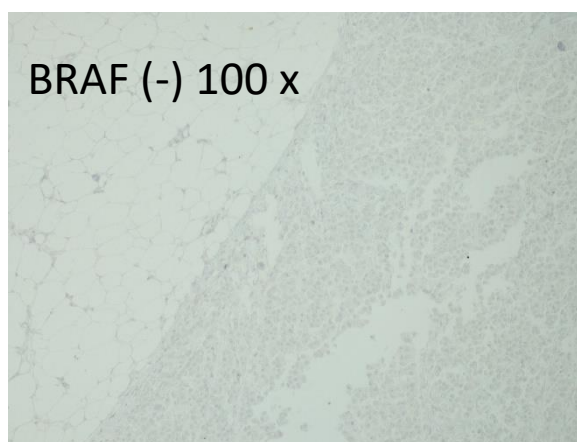
**3.4 Προφίλ του μοριακού δείκτη BRAF σε ασθενείς με διαθέσιμη μόνο την πρωτοπαθή εστία**



**Εικόνα 3.15.** Ασθενής # 9.

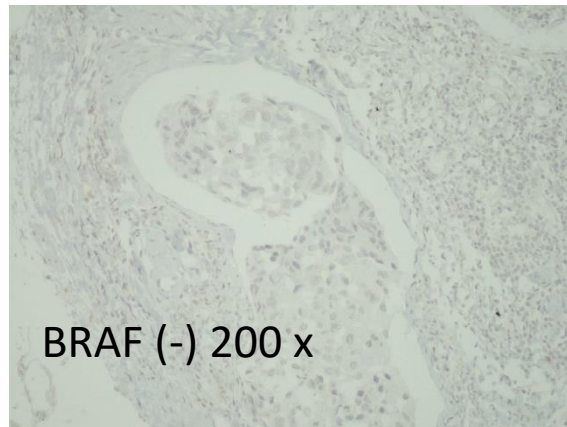


**Εικόνα 3.16.** Ασθενής # 10.



**Εικόνα 3.17.** Ασθενής # 12.

### 3.5 Προφίλ του μοριακού δείκτη BRAF σε ασθενείς με διαθέσιμη μόνο τη μετάσταση



**Εικόνα 3.18.** Ασθενής # 13. Προφίλ BRAF με διαθέσιμη μόνο τη μετάσταση, τον λεμφαδένα-φρουρό.

### 3.6 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των διενεργούμενων τεχνικών, της μοριακής μεθόδου και της ανοσοϊστοχημείας

Από το σύνολο των 21 διαφορετικών υλικών των 14 ασθενών που εξετάστηκαν επιτυχώς και με τις δύο μεθόδους για μετάλλαξη *BRAF* σε τρία υλικά εντοπίστηκε διαφορά ως προς το αποτέλεσμα των δυο τεχνικών. Συγκεκριμένα, δεν ανευρέθηκε μοριακά μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF*, αντίθετα ανευρέθηκε ανοσοϊστοχημικά (**Cobas - , IHC +**). Τα δύο διαφορετικά υλικά (διηθημένος λεμφαδένας-φρουρός και μετάσταση μελανώματος στο μαστό) αντιστοιχούσαν στην ίδια ασθενή # 6 (**Πίνακας 3.2**). Το ένα εκ των τριών υλικών αφορούσε τον **Ασθενή # 7** (**Πίνακας 3.2 και 3.3**).

### 3.7 Διαγνωστική συμφωνία ως προς το ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δεικτών διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 τόσο μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας όσο και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της πρωτοπαθούς εστίας ή αποκλειστικά στο υλικό της μετάστασης

**Πίνακας 3.4.** Ανοσοϊστοχημικό προφίλ για τους δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 των 14 ασθενών του Πίνακα 2.1 που μελετήθηκαν και για παρουσία μετάλλαξης *BRAF*.

# Ασθενής	Έτος	Υλικό	Φύλο	Ηλικία	Melan-A (MART-1)	S100	HMB45
1	2012 /2017	Πρωτοπαθής εστία	♀	27	+	+	+
		Διηθημένος Λεμφαδένας			+	+	+
2	2018	Πρωτοπαθής εστία	♂	69	+	+	+
		Διηθημένος Λεμφαδένας			+	+	+
3	2015 /2019	Πρωτοπαθής εστία	♀	39	+	+	+
		Μετάσταση- Δέρμα			+	+	+
		Μετάσταση- Πνεύμονας			+	+	+
4	2019	Πρωτοπαθής εστία	♀	58	+	+	+
		Λεμφαδένας			+	+	+
5	2019	Πρωτοπαθής εστία	♂	75	-	-	-
		Λεμφαδένας			-	-	-
6	2016/ 2019	Πρωτοπαθής εστία	♀	25	+	+	+

		Λεμφαδένας			+	+	+
		Μετάσταση- μαστός			+	+	+
7	2014 -2019	Πολλαπλές μεταστατικές εστίες	♂	38	<b>2014:</b> + <b>2015:</b> + <b>2016:</b> + <b>2017:</b> + <b>2018:</b> + <b>2019:</b> +	+	+
8	2016	Πρωτοπαθής εστία  Ευρύτερη εκτομή	♂	82	+	+	+
9	2017	Πρωτοπαθής εστία	♂	63	+	+	+
10	2017	Πρωτοπαθής εστία	♂	37	+	+	+
11	2019	Πρωτοπαθής εστία	♂	64	-	+	-
12	2018	Πρωτοπαθής εστία	♂	65	+	+	+

13	2018	Διηθημένος Λεμφαδένας	♂	78	+	+	-
14	2017/ 2018	Τοπική υποτροπή	♀	50	+	+	+
		Λεμφαδένας			+	+	+

Σε διαφορετικές περιοχές της πρωτοπαθούς εστίας που ελέγχθηκαν ανοσοϊστοχημικά, δεν υπήρξε διαφοροποίηση στο αποτέλεσμα και για τους τρεις δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στους ασθενείς # 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12.

Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, δεν εντοπίστηκε ετερογένεια ως προς το ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δεικτών διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στην πλειοψηφία των ασθενών.

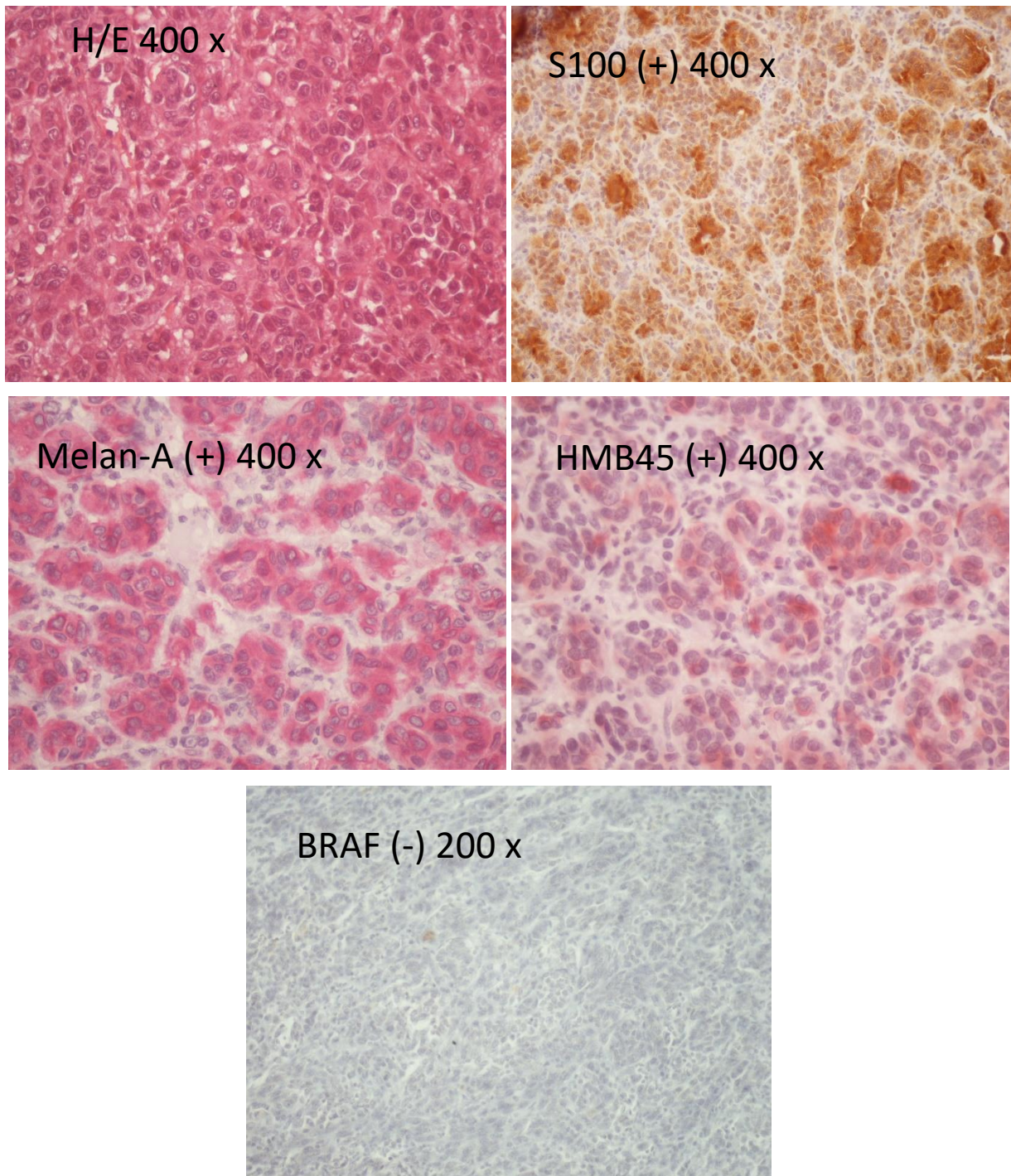
Στον ασθενή # 5 απώλεια έκφρασης εντοπίστηκε και στους τρεις δείκτες Melan-A, S100 και HMB45 τόσο στο υλικό της πρωτοπαθούς όσο και στο υλικό της μετάστασης.

Στον ασθενή # 7 εντοπίστηκε ετερογένεια στο υλικό της τοπικής υποτροπής αποκλειστικά ως προς την έκφραση του δείκτη HMB45.

Στον ασθενή # 8 δεν υπήρξε ποικιλία ως προς την έκφραση των δεικτών Melan-A, S100 και HMB45 μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και της ευρύτερης εκτομής.

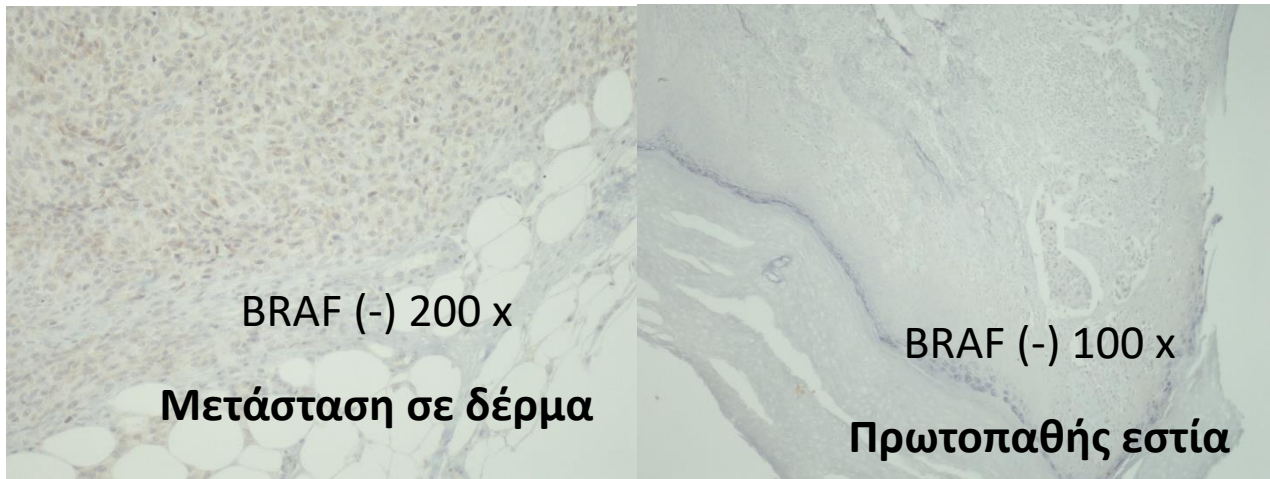
Στον ασθενή # 11 στο υλικό της πρωτοπαθούς εστίας διαφοροποιήθηκε το αποτέλεσμα μεταξύ των δεικτών: **Melan-A - , S100 + , HMB45 -**.



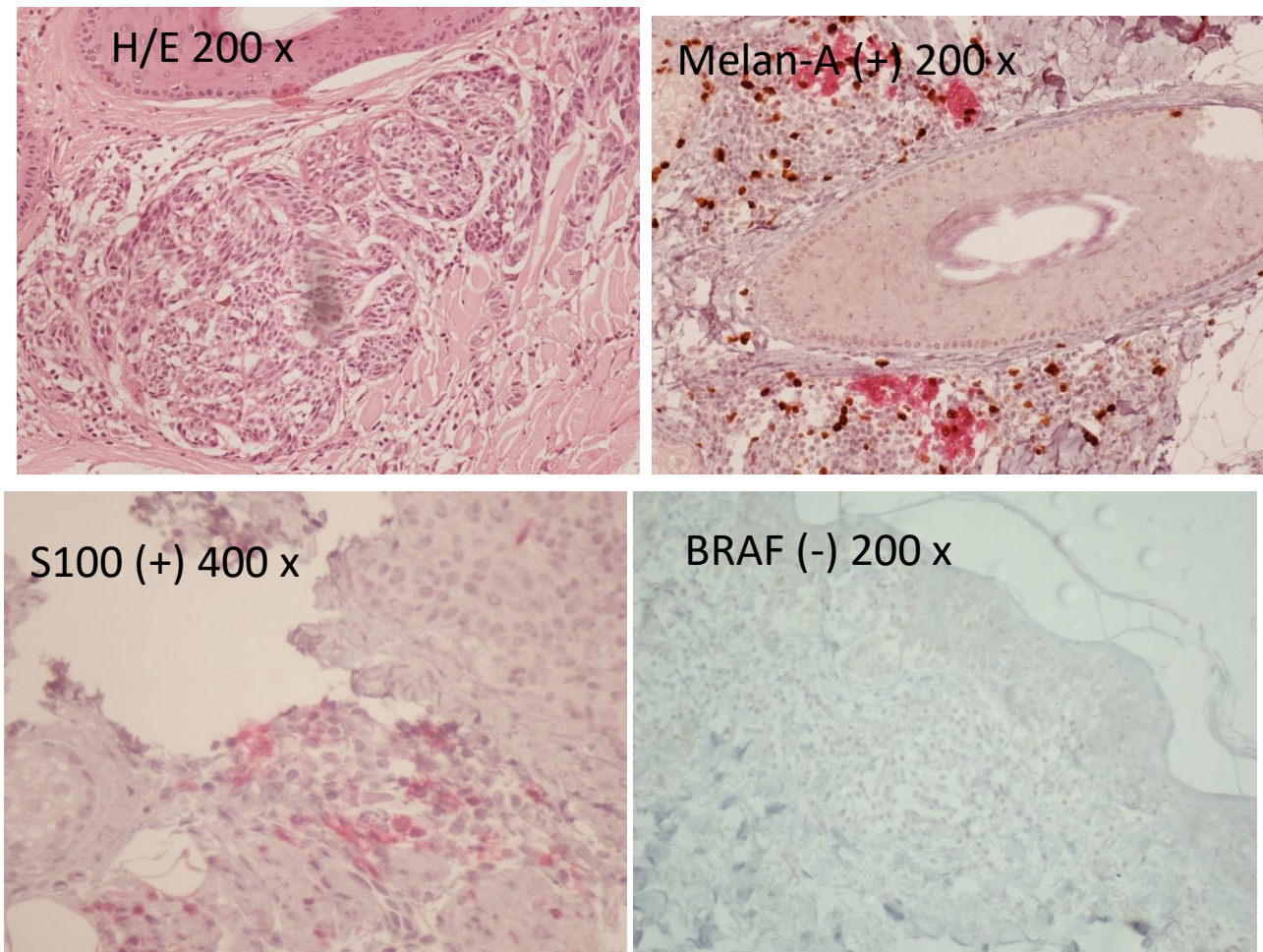


**Εικόνα 3.19.** Ασθενής # 3. Μοριακό και ανοσοϊστοχημικό προφίλ μελανώματος-μετάσταση στον πνεύμονα.



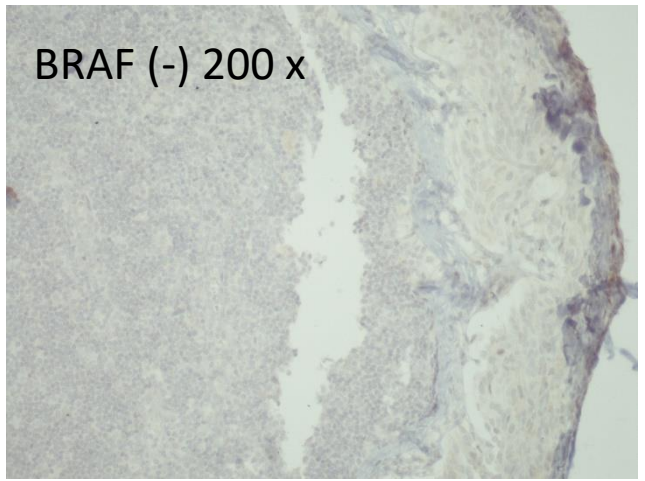
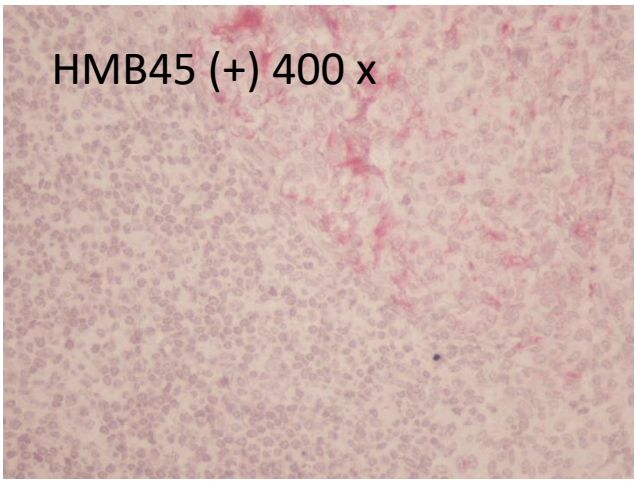
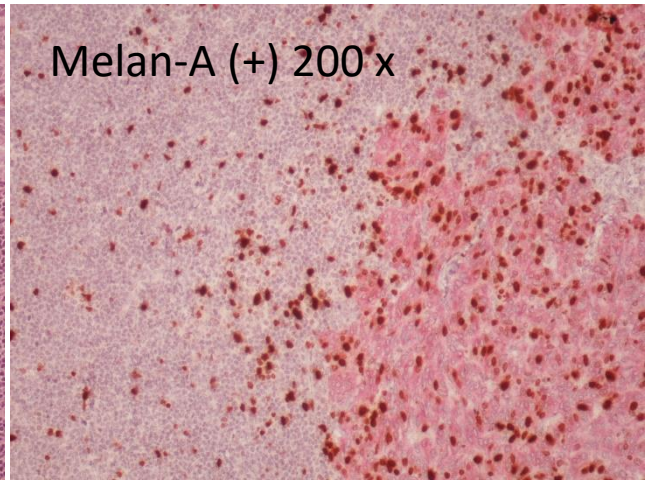
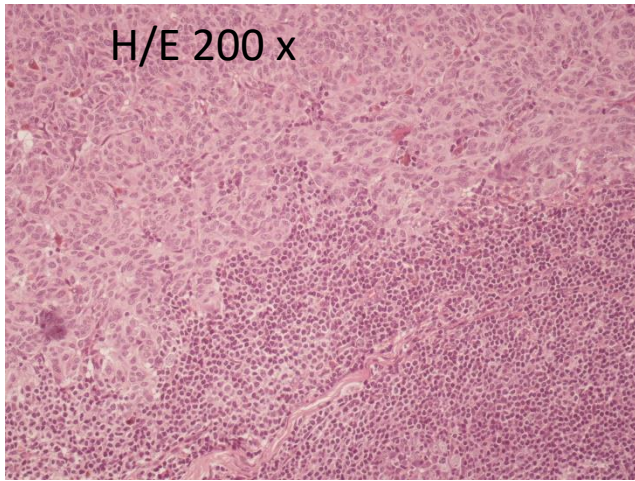


**Εικόνα 3.20.** Ασθενής # 3. Μοριακό προφίλ *BRAF*.

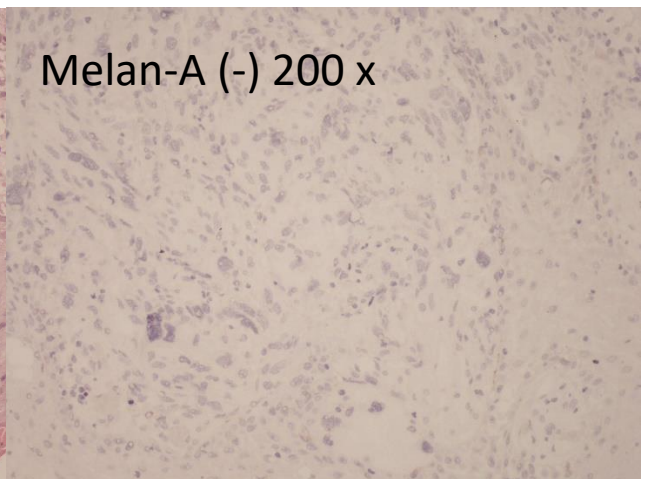
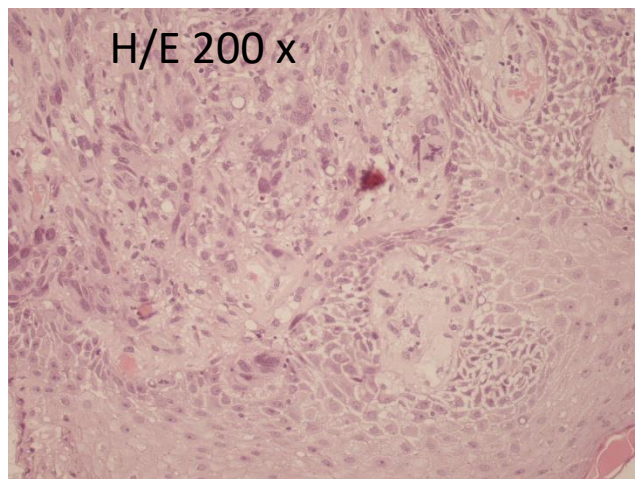


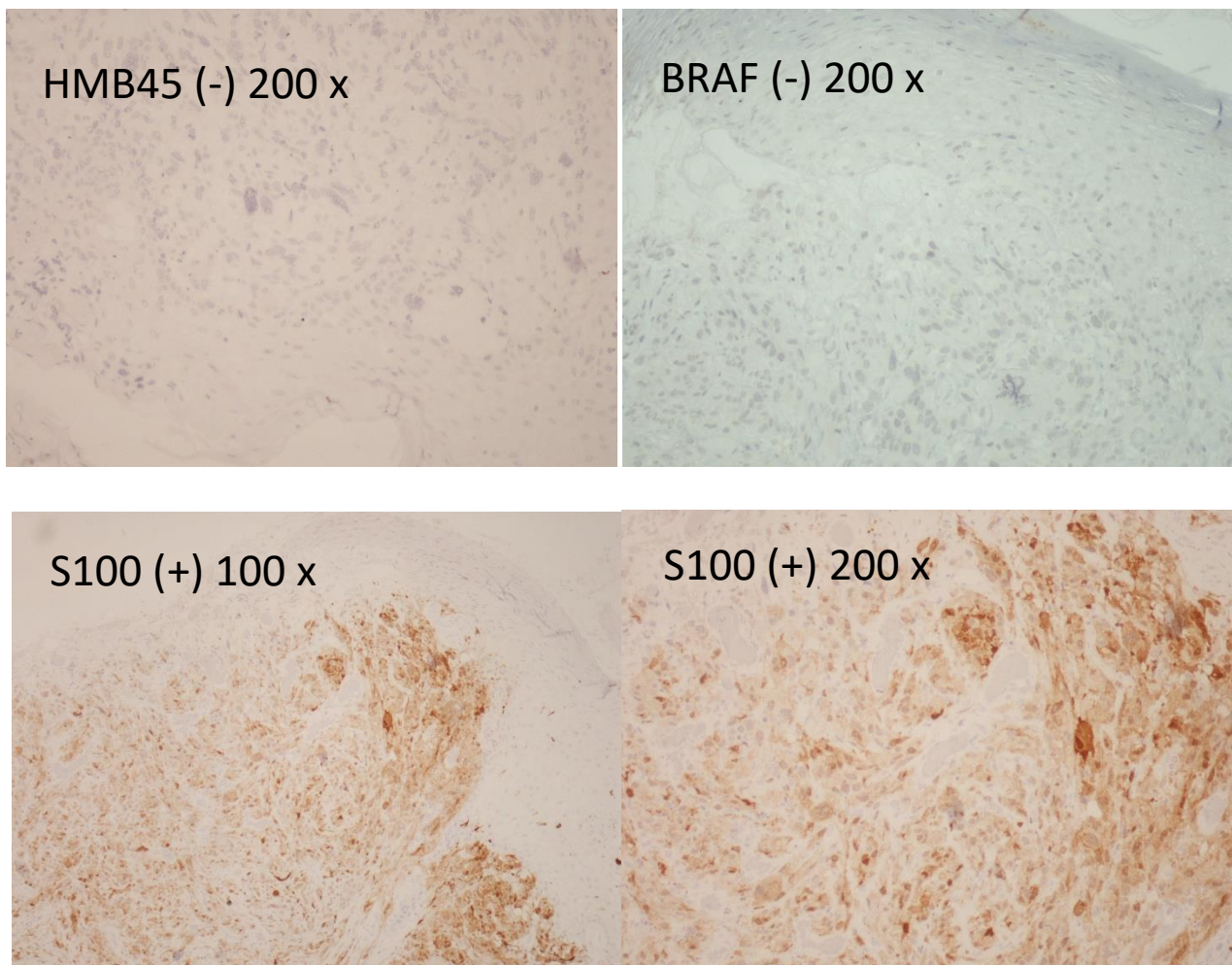
**Εικόνα 3.21.** Ασθενής # 4. Ανοσοϊστοχημικό και μοριακό προφίλ στην πρωτοπαθή εστία.





**Εικόνα 3.22.** Ασθενής # 4. Ανοσοϊστοχημικό και μοριακό προφίλ στον λεμφαδένα-φρουρό.



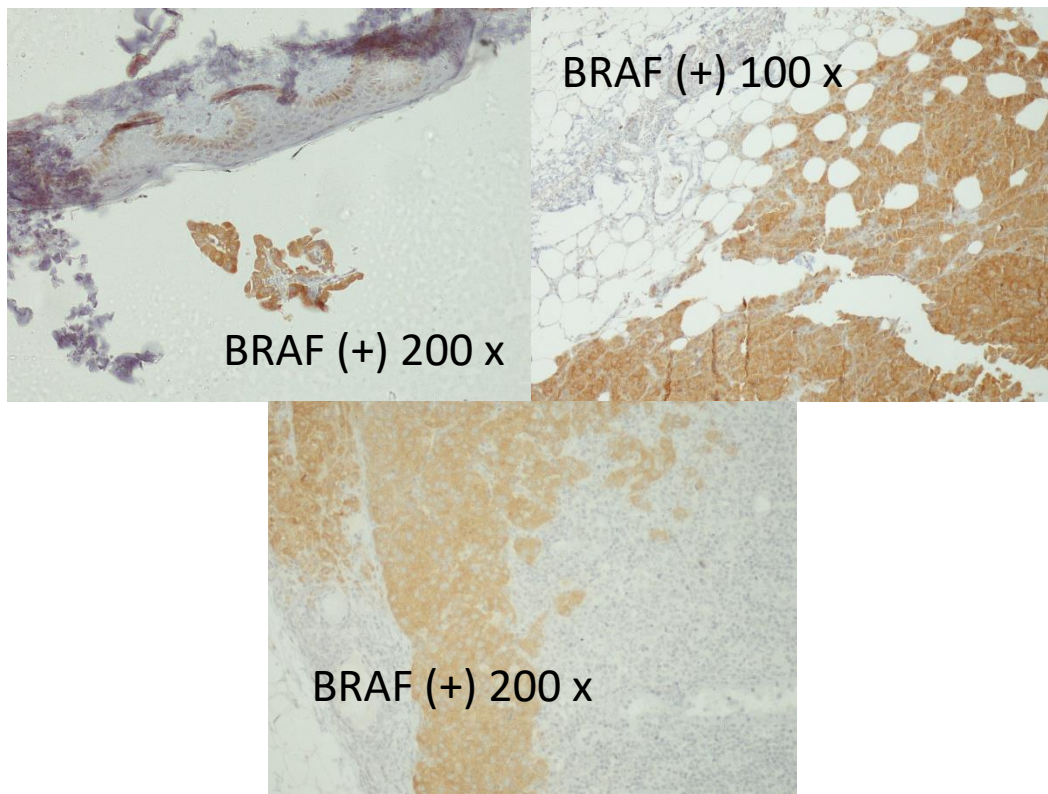


**Εικόνα 3.23.** Ασθενής # 11. Μοριακό και ανοσοϊστοχημικό προφίλ.

Στον ασθενή # 13 στο λεμφαδενικό υλικό δεν εκφράστηκε ο δείκτης HMB45.

Στον ασθενή # 14 δεν υπήρξε ποικιλία ως προς την έκφραση των δεικτών Melan-A, S100 και HMB45 μεταξύ των μεταστάσεων. Συγκεκριμένα, εκφράστηκαν και οι τρεις δείκτες τόσο στο υλικό της τοπικής υποτροπής όσο και στο λεμφαδένα-φρουρό.





**Εικόνα 3.24.** Προφίλ BRAF στην ασθενή # 6, στην πρωτοπαθή εστία (**επάνω αριστερά**), στο διηθημένο λεμφαδένα-φρουρό (**κάτω**) και στη μετάσταση σε συμπαγές όργανο-μαστός (**επάνω δεξιά**).

**Πίνακας 3.5.** Ανοσοϊστοχημικό προφίλ για τους δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 των 8 εκ των 22 ασθενών του **Πίνακα 2.1** που δεν μελετήθηκαν για παρουσία μετάλλαξης *BRAF*.

# Ασθενής	Έτος	Υλικό	Φύλο	Ηλικία	Melan-A (MART-1)	S100	HMB45
15	2019	Πρωτοπαθής εστία	♂	58	+	+	+
		Λεμφαδένας			+	+	+
16	2019	Πρωτοπαθής εστία	♀	79	+	+	+
		Λεμφαδένας			+	+	+

17	2015	Πρωτοπαθής εστία Λεμφαδένας	♀	70	+	+	+
18	2015	Πρωτοπαθής εστία Ευρύτερη εκτομή Λεμφαδένας Τράχηλος Παρεία	♀	68	+	+	+
19	2016	Πρωτοπαθής εστία  Τοπική Υποτροπή 1  Τοπική Υποτροπή 2	♀	78	+	+	-  -
20	2017	Πρωτοπαθής εστία Λεμφαδένας	♀	49	+	+	+
21	2018	Πρωτοπαθής εστία Λεμφαδένας	♀	69	+	+	+
22	2015	Πρωτοπαθής εστία Λεμφαδένας	♂	52	+	+	+

Σε διαφορετικές περιοχές της πρωτοπαθούς εστίας που ελέγχθηκαν ανοσοϊστοχημικά, δεν υπήρξε διαφοροποίηση στο αποτέλεσμα και για τους τρεις δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στους ασθενείς # 15, 16, 17, 18, 19, 20 21, 22.

Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, δεν εντοπίστηκε ετερογένεια ως προς το ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δεικτών διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στην πλειοψηφία των δειγμάτων.

Στον ασθενή # 19 παρατηρήθηκε απώλεια έκφρασης στο δείκτη HMB45 τόσο στο υλικό της πρωτοπαθούς όσο και στο υλικό της τοπικής υποτροπής. Διαφοροποίηση μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας παρατηρήθηκε επίσης στον ασθενή # 22, του οποίου στο λεμφαδενικό υλικό δεν εκφράστηκε ο δείκτης HMB45.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μοριακό προφίλ του μελανώματος έχει δείξει ότι το φορτίο μετάλλαξης αυξάνεται με την εξέλιξη του όγκου και ότι μπορούν να εμφανιστούν μοναδικά πρότυπα (μοτίβα) γενετικών αλλαγών για τους διάφορους υποτύπους. Το μελάνωμα με μετάλλαξη *BRAF* τείνει να εμφανίζει διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά και χαρακτηρίζεται από μια πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά από το μελάνωμα “αγρίου τύπου” (wild type (wt)) *BRAF*. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με μετάλλαξη στο *BRAF* είναι συχνά νεότεροι σε ηλικία, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη (μέση ηλικία διάγνωσης 59 ετών) (Cheng et al., 2018). Επιπλέον, το μελάνωμα με τη μετάλλαξη *BRAF* έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση και βραχύτερη συνολική επιβίωση.

Δεδομένων αυτών των χαρακτηριστικών και των διαθέσιμων αποτελεσματικών θεραπειών (αναστολείς *BRAF*), είναι ζωτικής σημασίας να προσδιοριστεί εάν οι ασθενείς με μελάνωμα έχουν όγκους που φέρουν σχετική μετάλλαξη, προκειμένου να επιλεγεί η βέλτιστη θεραπεία. Η παρουσία ετερογένειας είναι ένα θέμα μεγάλης συζήτησης τα τελευταία έτη. Ασυμφωνία στο προφίλ *BRAF* είναι γνωστό ότι υπάρχει, τόσο μεταξύ πρωτοπαθών και μεταστατικών εστιών όσο και ενδοογκική ετερογένεια (Long et al., 2013; Uguen et al., 2015). Δεδομένου ότι ο διαθέσιμος μεταστατικός ιστός είναι συχνά περιορισμένος, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί εάν η μετάλλαξη στην ογκοπρωτεΐνη *BRAF* ποικίλλει σε διάφορες θέσεις του πρωτογενούς όγκου. Οι επιστήμονες σημειώνουν ότι η χρήση πρωτοπαθούς εστίας μελανώματος είναι εξίσου ασφαλής με τη χρήση μεταστατικού ιστού για ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF V600E*, καθώς η ενδογενής ετερογένεια είναι περιορισμένη. Επιπλέον, τονίζουν ότι ο χρόνος μεταξύ της διάγνωσης του πρωτοπαθούς όγκου και της αντίστοιχης μετάστασης δεν φαίνεται να επηρεάζει τον κίνδυνο ενδογενούς ετερογένειας.

Στην παρούσα αναδρομική μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ετερογένειας στο προφίλ έκφρασης *BRAF* σε 14 ασθενείς με μελάνωμα. Διαπιστώθηκε ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF V600E* και ότι *BRAF* μεταλλάξεις υπάρχουν εξίσου στους πρωτοπαθείς όγκους και στις αντίστοιχες μεταστάσεις τους, εκτός από πολύ σπάνιες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε μία από τις 14 περιπτώσεις (ποσοστό ~7 %) με ασυμφωνία στο προφίλ του όγκου στην πρωτοπαθή και δευτεροπαθή εστία. Η πρωτοπαθής εστία ήταν ελεύθερη μετάλλαξης με ανίχνευση της μετάλλαξης *BRAF V600E* στο λεμφαδένα-φρουρό. Επιπλέον, εντοπίστηκε ένας ασθενής με ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών περιοχών της πρωτοπαθούς εστίας. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε μετάλλαξη του γονιδίου *BRAF* μόνο στο υλικό της αρχικής βιοψίας και όχι στο υλικό της πλήρους εξαίρεσης. Τέλος, σε δύο ακόμα ασθενείς σημειώθηκε μοριακή ετερογένεια

μεταξύ των μεταστάσεων, με ανίχνευση *BRAF* μετάλλαξης μόνο στο υλικό της τοπικής υποτροπής και όχι στον λεμφαδένα-φρουρό στην πρώτη περίπτωση και ανίχνευση μετάλλαξης *BRAF* σε δύο εκ των έξι υλικών του δεύτερου ασθενούς με πολλαπλές μεταστατικές εστίες.

Σύμφωνα με τους Heinzerling et al., δέκα από τους 53 ασθενείς (ποσοστό 19%) έφεραν wt *BRAF* στην πρωτοπαθή εστία, ενώ μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF* στις αντίστοιχες μεταστάσεις. Οι Shain et al., έδειξαν ενδοογκική ετερογένεια υποδηλώνοντας την εμφάνιση *de novo* *BRAF* μεταλλάξεων στις μεταστάσεις ορισμένων ασθενών (Shain et al., 2015). Στη μελέτη των Nielsen et al., σε μία μόνο από τις 305 διαφορετικές περιπτώσεις 81 ασθενών, ο πρωτογενής όγκος ήταν θετικός στη *BRAF* V600E και η μετάσταση ήταν αρνητική για τη μετάλλαξη αλλά θετική για τη μετάλλαξη *BRAF* V600K. Τέλος, σε ελάχιστους ασθενείς οι επιστήμονες ανέφεραν ενδοογκική ετερογένεια (Heinzerling et al., 2013; Nielsen et al., 2018). Επιπλέον, σημείωσαν ότι το προφίλ έκφρασης του γονιδίου μπορεί να μεταβληθεί στην πορεία του χρόνου με μετάλλαξη σε διαφορετικό κωδικόνιο από αυτό της πρωτοπαθούς εστίας. Επίσης, οι ερευνητές εισήγαγαν στη συζήτησή τους και το τεχνικό ζήτημα, δηλαδή το γεγονός να προκαλεί η εφαρμοζόμενη μοριακή μέθοδος μια ψευδώς θετική ετερογένεια δεδομένου του μειονεκτήματος της να μην ανιχνεύει τη μετάλλαξη σε δείγμα με λίγα ή μη καρκινικά μελανοκύτταρα (π.χ. δείγμα διηθημένου λεμφαδένα ή δείγμα με έντονη παρουσία κερατινοκυττάρων).

Η μετάσταση είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας στο μελάνωμα και ως εκ τούτου ο πραγματικός θεραπευτικός στόχος, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα. Στη μελέτη των Colombino et al., το ποσοστό *BRAF* μεταλλάξεων στις μεταστάσεις ήταν 5% μεγαλύτερο, σύμφωνα με τη θεωρία συσσώρευσης γενετικών ανωμαλιών *de novo* καθώς αναπτύσσεται το μελάνωμα (Colombino et al., 2012). Οι Bradish et al., σημείωσαν επίσης ασυμφωνία στους όγκους τεσσάρων από 25 συνολικά ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα (ποσοστό 16%). Συγκεκριμένα, στις δύο περιπτώσεις προέκυψε το πρότυπο: wt *BRAF* πρωτοπαθείς βλάβες με *BRAF* V600 μεταστατικές αλλοιώσεις ενώ στις άλλες δύο: *BRAF* μετάλλαξη αποκλειστικά στην πρωτοπαθή εστία. Επιπλέον, σημειώθηκε ότι το ποσοστό ασυμφωνίας ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με πολλαπλές δερματικές μεταστάσεις (δύο από τις έξι περιπτώσεις (ποσοστό επί του συνόλου 33%)) συγκριτικά με ασθενείς με μία μόνο μετάσταση [δύο από τις 19 περιπτώσεις (ποσοστό 11%)]. Συνεπώς, η ανίχνευση μιας αρνητικής μετάλλαξης *BRAF* στον πρωτογενή όγκο μπορεί να μην αντικατοπτρίζει απαραίτητα το προφίλ του όγκου στη μεταστατική εστία.

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκαν επίσης ανοσοϊστοχημικά τα ιστικά δείγματα μελανώματος και ως προς τους σημαντικούς διαγνωστικούς δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 για να αναδειχθεί η παρουσία ή απουσία ετερογένειας στον ανοσοφαινότυπο. Η ανοσοϊστοχημική



επιβεβαίωση είναι συχνά ζωτικής σημασίας για τη διάγνωση τόσο της πρωτοπαθούς εστίας όσο και του μεταστατικού μελανώματος λόγω της ιστολογικής ετερογένειας που εμφανίζει αυτός ο όγκος. Οι επιστήμονες ερευνούν την πιθανότητα να υποκρύπτεται κάποια προγνωστική αξία στον τυχόν διαφοροποιημένο ανοσοφαινότυπο του όγκου.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, απώλεια έκφρασης του δείκτη HMB45 μπορεί να παρατηρηθεί ιδιαίτερα στο μεταστατικό μελάνωμα. Ήδη από τη μελέτη των Blessing et al., σημειώθηκε μεταβλητότητα στο πρότυπο χρώσης του δείκτη HMB45 στη δευτεροπαθή εστία (Blessing et al., 1998). Απώλεια έκφρασης του HMB45 διαπιστώθηκε και στη μελέτη των Rocha-Rodriguez et al. (Rocha-Rodriguez et al., 2019). Η πρωτεΐνη S100 εμφανίζει ένα ισχυρό και ιδιαίτερα διάχυτο πρότυπο χρώσης με πυρηνική και συχνά εν μέρει κυτταροπλασματική εντόπιση. Ο δείκτης S100 επισημαίνει κύτταρα και άλλα εκτός των μελανοκυττάρων ιστικά στοιχεία όπως τα κύτταρα Langerhans, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης S100 είναι λιγότερο συχνή σε σύγκριση με τα πιο ειδικά αντιγόνα (Melan-A, HMB45). Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης σε ποσοστό που ανέρχεται έως και 4% μεταξύ των μεταστατικών μελανωμάτων με θετική την πρωτοπαθή εστία (Aisner et al., 2005; Shinohara et al., 2009; Biernacka et al., 2016). Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι ότι καθώς εξελίσσεται ο όγκος ένας άγνωστος έως τώρα μηχανισμός μεταβάλλει τον ανοσοφαινότυπο πυροδοτώντας την απουσία ανοσοαντιδραστικότητας για τον δείκτη S100.

Απώλεια έκφρασης της S100 έχει αναφερθεί και σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις της πρωτοπαθούς εστίας του μελανώματος όπως επίσης και σε περιοχές εκτεταμένης νέκρωσης. Στη μελέτη των Viray et al., έξι εκ των 27 συνολικά S100 αρνητικών μελανωμάτων σημειώθηκαν στην πρωτοπαθή εστία με τα υπόλοιπα 21 να εμφανίζονται στις μεταστάσεις. Σύμφωνα με τους Sheth et al., τεχνικά προβλήματα όπως η μη βέλτιστη στερέωση του ιστού, η κακή συντήρηση του ιστοικού υλικού, οι ανεπαρκείς χρόνοι επώασης των αντισωμάτων και οι εφαρμοζόμενες αραιώσεις είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς αρνητική αντίδραση για το S100. Επιπλέον, σημειώνεται ότι η συνολική αναλογία αρνητικών S100 μελανωμάτων είναι δυσανάλογα υψηλή στο οφθαλμικό και στο ακρικό μελάνωμα (Sheth et al., 2011).

Στη μελέτη των Viray et al. μελετήθηκε ο ανοσοφαινότυπος σε 322 συνολικά μελανώματα για τους δείκτες S100, HMB45 και Melan-A. Εκ των 322 τα 295 (ποσοστό 91,6%) ήταν S100 θετικά, τα 203 (ποσοστό 63,0%) HMB45 θετικά και τα 236 (ποσοστό 73,3%) Melan-A / MART-1 θετικά. Η συνέκφραση και των τριών αντισωμάτων παρατηρήθηκε στα 160 περιστατικά (ποσοστό 49,7%). Οι επιστήμονες απέδωσαν αυτή τη μεταβολή στον ανοσοφαινότυπο στο γεγονός ότι μπορεί να

υποκρύπτονται γενετικοί ή επιγενετικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν την έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης. Επιπλέον, οι ερευνητές αποδίδουν αυτή την ετερογένεια του ανοσοφαινότυπου στο γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις ελέγχθηκε ανοσοϊστοχημικά συγκεκριμένη περιοχή του όγκου και όχι όλη η αλλοίωση λόγω του μεγάλου μεγέθους του όγκου (Viray et al., 2013).

Σύμφωνα με τους Shinohara et al., είναι δυνατόν να παρεκκλίνει ο ανοσοφαινότυπος και να εντοπιστεί απώλεια έκφρασης και των τριών δεικτών διαφοροποίησης S100, HMB-45 και Melan-A με αποκλειστική θετικότητα στην τυροσινάση ιδιαίτερα στο μεταστατικό μελάνωμα (Shinohara et al., 2009). Οι Zhenqiang et al., ανέφεραν περιστατικό μεταστατικού μελανώματος με ταυτόχρονη απώλεια των δεικτών διαφοροποίησης Melan-A, S100, HMB-45 και της τυροσινάσης (CD56 +), με θετική και στους τέσσερις αυτούς δείκτες την πρωτοπαθή εστία (Zhenqiang et al., 2007). Οι επιστήμονες σημειώνουν ότι η απώλεια στο Melan-A μπορεί να σχετίζεται άμεσα με τη διαγραφή του γονιδίου που την κωδικοποιεί, αλλά η απώλεια της έκφρασης των άλλων τριών δεικτών είναι πιθανότατα συνέπεια άγνωστων ρυθμιστικών μηχανισμών, οι οποίοι φαίνεται πολύ συσχετισμένοι με την απώλεια 9p24.3-q13 και του χρωμοσώματος 4, όπως ανιχνεύεται στο μεταστατικό μελάνωμα (Guo et al., 2014). Επιπλέον, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία διαφοροποίηση στον ανοσοφαινότυπο με το πρότυπο: απώλεια έκφρασης στην πρωτοπαθή εστία και αναδυόμενη θετικότητα στην έκφραση στο λεμφαδένα-φρουρό ή στο συμπαγές όργανο.

Στην παρούσα μελέτη, σε διαφορετικές περιοχές της πρωτοπαθούς εστίας που ελέγχθηκαν ανοσοϊστοχημικά, δεν υπήρξε διαφοροποίηση στο αποτέλεσμα και για τους τρεις δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στην πλειοψηφία των ασθενών, όπως αναμενόταν. Εξάιρεση αποτέλεσε μία ενδιαφέρουσα περίπτωση ασθενούς, του οποίου διαφοροποιήθηκε το αποτέλεσμα μεταξύ των δεικτών στο υλικό της πρωτοπαθούς εστίας: Melan-A +, S100 +, HMB45 -. Επίσης, δεν καταγράφηκε διαφοροποίηση ως προς την έκφραση των δεικτών Melan-A, S100 και HMB45 μεταξύ των μεταστάσεων στην πλειοψηφία των ασθενών.

Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, δεν εντοπίστηκε επίσης ετερογένεια ως προς το ανοσοϊστοχημικό προφίλ των δεικτών διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 στην πλειοψηφία των μελετούμενων δειγμάτων. Σε μία μόνο περίπτωση εντοπίστηκε απώλεια έκφρασης και στους τρεις δείκτες διαφοροποίησης Melan-A, S100 και HMB45 τόσο στο υλικό της πρωτοπαθούς όσο και στο υλικό της μετάστασης, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία. Επίσης, σε έναν ασθενή διαφοροποιήθηκε το αποτέλεσμα ως προς τον ανοσοφαινότυπο αποκλειστικά ως προς τον δείκτη HMB45. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε απώλεια έκφρασης τόσο στο υλικό της πρωτοπαθούς όσο και στο υλικό της τοπικής υποτροπής. Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα

μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εστίας, σε έναν ακόμα ασθενή εντοπίστηκε ετερογένεια στο υλικό της τοπικής υποτροπής αποκλειστικά ως προς την έκφραση του δείκτη HMB45. Ωστόσο, μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και της συμπληρωματικής εκτομής αξίζει να σημειωθεί ότι δεν διαφοροποιήθηκε το αποτέλεσμα στον ανοσοφαινότυπο. Διαφοροποίηση μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας παρατηρήθηκε σε δύο ακόμα ασθενείς στους οποίους ο δείκτης HMB45 δεν εκφράστηκε στον διηθημένο λεμφαδένα-φρουρό, γεγονός αναμενόμενο βάσει της βιβλιογραφίας.

Απόρροια αυτής μελέτης ήταν η σύγκριση ως προς το αποτέλεσμα και την αξιοπιστία τους των δύο πιο συχνά εφαρμοζόμενων τεχνικών: της ανοσοϊστοχημείας IHC και της μοριακής μεθόδου Real-time PCR (Cobas mutation test). Η μοριακή εξέταση ήταν προηγουμένως και παραμένει το "χρυσό" πρότυπο (gold standard) ιδιαίτερα στο μεταστατικό μελάνωμα. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την κύρια μέθοδο ανίχνευσης και παρακολούθησης δερματικών μελανωμάτων με μετάλλαξη *BRAF V600E*. Εμφανίζει την υψηλότερη ευαισθησία (93-99,5%) και χαμηλότερη ειδικότητα (~98 %). Η ειδικότητα της μεθόδου χαρακτηρίζεται χαμηλή δεδομένου ότι μπορεί να ανιχνεύει και τις *BRAF V600K*, *BRAF V600D*, *BRAF V600E2* (ευαισθησία 66-78%). Η υψηλή ευαισθησία επιτρέπει τη διερεύνηση της ετερογένειας της μετάλλαξης των καρκινικών κυττάρων και των αλλαγών αυτής κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου με έναν πιο λεπτομερή τρόπο από τις άλλες μεθόδους (IHC). Ωστόσο, η ανάλυση IHC είναι μια απλή in situ μέθοδος. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η IHC απαιτεί ελάχιστη ποσότητα ιστού και με ικανότητα να ανιχνεύει την ετερογένεια των μεταλλάξεων σε διάφορα σημεία της ίδιας διατομής του όγκου, σε αντίθεση με τις μοριακές εξετάσεις (O'Brien et al., 2017). Πλεονεκτεί στο γεγονός ότι δίνει άμεσα, έγκυρα αποτελέσματα με σαφώς χαμηλότερο κόστος συγκριτικά με τη μοριακή εξέταση. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιτρέπει την απεικόνιση μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων που φέρουν το αντιγόνο ενδιαφέροντος δηλαδή την πρωτεΐνη BRAF στο ιστικό δείγμα, σε αντίθεση με τη PCR που μελετά το εκχυλισμένο DNA πολλών καρκινικών κυττάρων. Ένας περιορισμός της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι δεν ανιχνεύει το αντιγόνο σε περιοχές νέκρωσης του όγκου. Επιπλέον, ένα από τα μειονεκτήματα της IHC είναι η ειδικότητα της μεθόδου να ανιχνεύει τη *BRAF V600E* και η αδυναμία ανίχνευσης *BRAF V600K*, καθώς οι ασθενείς με αυτή τη μετάλλαξη μπορούν επίσης να επωφεληθούν από τη θεραπεία με αναστολέα BRAF. Επομένως, σε αρνητικό για τη μετάλλαξη *BRAF* αποτέλεσμα, μια μοριακή δοκιμή (PCR, αλληλούχιση Sanger) είναι απαραίτητη για την ανίχνευση άλλων μεταλλάξεων *BRAF* με σκοπό να αποκλειστούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή να ανακαλυφθεί άλλος τύπος μετάλλαξης (Bisschop et al., 2018; Nielsen et al., 2018; Vanni et al., 2020).

Σύμφωνα με τους Nielsen et al, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος εκλογής στα πλαίσια ρουτίνας, ιδιαίτερα σε προ-θεραπείας ασθενείς με μεταλλαγμένο *BRAF*, χωρίς να

απαιτείται πρόσθετη δοκιμή όταν η χρώση είναι θετική. Είναι θέμα χρόνου να καθιερωθεί η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος BRAF VE1 στα διαγνωστικά πρωτόκολλα. Είναι εξέχουσα η μελέτη των Rapisuwon et al., που επιβεβαιώνουν την αναγκαιότητα της χρήσης του αντισώματος BRAF VE1 στην κλινική πρακτική. Συγκεκριμένα, οι επιστήμονες ανέδειξαν ένα περιστατικό γυναίκας ασθενούς με μεταστατικό μελάνωμα στο μυελό των οστών. Το δείγμα της δευτεροπαθούς εστίας είχε ελεγχθεί προηγουμένως μοριακά και είχε βρεθεί αρνητικό ως προς τη μετάλλαξη *BRAF V600E*. Ωστόσο, εφαρμόστηκε η ιδέα να ελεγχθεί το ίδιο δείγμα και ανοσοϊστοχημικά. Οι ερευνητές σημείωσαν τη θετικότητα του αποτελέσματος της IHC και η ασθενής έλαβε θεραπεία με αναστολέα BRAF, με σημαντική ανάκαμψη στο χρόνο της συνολικής επιβίωσης (Rapisuwon et al., 2016).

Η συμφωνία των δύο μεθόδων ήταν ιδιαίτερα υψηλή στην παρούσα έρευνα (18/21 – ποσοστό συμφωνίας 85,7%). Ωστόσο, διαπιστώθηκε διαφωνία σε τρία από τα 21 υλικά, στις οποίες η χρώση IHC ήταν θετική και το τεστ Cobas ήταν αρνητικό. Στην υποθετική περίπτωση που προέκυπτε θετικό το αποτέλεσμα της PCR και αρνητική η IHC, η διαφορά θα αποδιδόταν στη διασταυρούμενη αντίδραση της μοριακής μεθόδου να ανιχνεύει επιπλέον μεταλλάξεις *BRAF V600K*, *BRAF V600D*, *BRAF V600E2*. Στην περίπτωση αυτή, το διαφορετικό αποτέλεσμα αποδίδεται στο πλεονέκτημα της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας (IHC) να ανιχνεύει ειδικότερα την ογκοπρωτεΐνη BRAF V600Ec. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Schirosi et al., 2016; Nielsen et al., 2018). Συγκεκριμένα, οι Nielsen et al., στη μελέτη τους επίσης διαπίστωσαν τέσσερις περιπτώσεις με το συγκεκριμένο πρότυπο (θετικό για μετάλλαξη στην IHC, αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμή Cobas). Επιπλέον, οι Schirosi et al., σημείωσαν συμφωνία στα αποτελέσματα των δύο τεχνικών σε 58/63 (ποσοστό συμφωνίας 92,1%) εξεταζόμενα δείγματα εκ των οποίων 3/5 εμφάνισαν θετικότητα στο αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας και αρνητικό μοριακό αποτέλεσμα. Στην παρούσα μελέτη, εκπλήσσει ιδιαίτερα το γεγονός ότι οι δύο ασύμφωνες περιπτώσεις ανήκουν στην ίδια ασθενή, σημείο που αξίζει σχολιασμό. Με άλλα λόγια, έρχεται το ερώτημα στην επιφάνεια μήπως η συγκεκριμένη ασθενής εκφράζει ένα μοναδικό υπότυπο του γονιδίου, γεγονός που ξεπερνά τους στόχους αυτής της εργασίας και δεν μελετήθηκε περαιτέρω. Η ευαισθησία και ειδικότητα της IHC σε αυτή τη μελέτη ήταν 97% και 98% αντίστοιχα επιβεβαιώνοντας τη βιβλιογραφία (85–100% και 93–100%, αντίστοιχα) (Long et al., 2014; Schirosi et al., 2016; Nielsen et al., 2018).

Αξιοσημείωτη ήταν επίσης η περίπτωση ασθενούς με πολλαπλές μεταστατικές εστίες στον οποίο προηγήθηκε η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των έξι διαφορετικών δειγμάτων (μεταστάσεις, μη διαθέσιμη πρωτοπαθή εστία) ως προς το μοριακό δείκτη BRAF και σε όσα ανευρέθηκε θετικότητα ακολούθησε η μοριακή ανάλυση με σκοπό να συγκριθεί το αποτέλεσμα των δύο εφαρμοζόμενων στην παρούσα μελέτη μεθόδων. Ασυμφωνία στο αποτέλεσμα των δύο μεθόδων ανευρέθηκε σε ένα εκ των

δύο διαφορετικών υλικών του ίδιου ασθενή με το ακόλουθο πρότυπο: Cobas αρνητικό για μετάλλαξη, IHC θετικό για μετάλλαξη. Επισημαίνεται η παρουσία μοριακής ετερογένειας στο συγκεκριμένο ασθενή. Ωστόσο, σαφέστερα συμπεράσματα θα προέκυπταν αν υπήρχε μεγαλύτερος διαθέσιμος αριθμός δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτοπαθούς εστίας, προς ανάλυση και σύγκριση.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μελετήθηκαν περιπτώσεις αποκλειστικά δερματικού μελανώματος. Μελλοντικός στόχος της έρευνας είναι να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός δερματικών μελανωμάτων, καθώς και το μοριακό προφίλ μελανωμάτων των βλεννογόνων ως προς τη μετάλλαξη *BRAF*.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amaria, R.N., Reddy, S.M., Hanna, E., et al. (2018). Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma. *Nat. Med.* 24, 1649–1654.
- Anaka, M., Hudson, C., Behren, A., et al. (2013). Intratumoral genetic heterogeneity in metastatic melanoma is accompanied by variation in malignant behaviors. *BMC medical genomics*, 6, 40.
- Anwar, M.A., Murad, F., Dawson, E., et al. (2016). Immunohistochemistry as a reliable method for detection of BRAF-V600E mutation in melanoma: a systematic review and meta-analysis of current published literature. *Journal of Surgical Research*, 203(2), 407 – 415.
- Appelqvist, F., Yhr, M., Erlandson, A. et al. (2014). Deletion of the MGMT gene in familial melanoma. *Genes, chromosomes & cancer*, 53(8):703-711.
- Arkenau, H.T., Kefford, R. & Long, G.V. (2011). Taargeting BRAF for patients with melanoma. *British Journal of Cancer*, 104, 392-398.
- Ascierto, P.A., Schadendorf, D., Berking, C., et al. (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol.* 14(3):249-256.
- Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E. et al. (2001). Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncology*, 2001 19(16):3622-3634.
- Bardeesy, N., Bastia, B.C., Hezel, A. (2001). Dual Inactivation of RB and p53 Pathways in RAS-Induced Melanomas. *Molecular and Cellular Biology*, 21(6):2144-53.
- Bennett, D.C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(1):27–38.
- Berd, D., Maguire Jr, H.C., McCue, P. & Mastrangelo, M.J. (1990). Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients. *Journal of Clinical Oncology* 8(11):1858-1867.
- Berwick, M., MacArthur, J., Orlow, I., et al. (2014). MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment cell & melanoma research*, 27(3):485-488.

- Bhandaru, M., & Rotte, A. (2019). Monoclonal Antibodies for the Treatment of Melanoma: Present and Future Strategies. *Methods Mol Biol.* 1904:83-108.
- Biernacka, A., Linos, K., Liu, X., (2016). A case of S-100 negative melanoma: A diagnostic pitfall in the workup of a poorly differentiated metastatic tumor of unknown origin. *Cytojournal*, 13: 21.
- Blessing, K., Sanders, D.S., & Giant, J.J. (1998). Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology*, 32 (2): 139-146.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467(7315): 596–599.
- Botton, T., Talevich, E., Mishra, V.K., et al. (2019). Genetic eterogeneity of BRAF fusion kinases in melanoma affects drug responses. *Article*, 29(3): 573-588.
- Bradish, J.R., Cheng, L. (2014). Molecular pathology of malignant melanoma: changing the clinical practice paradigm toward a personalized approach. *Hum Pathol.*45: 1315–1326.
- Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., et al. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62, 6997–7000.
- Busam, K.J., Hedvat, C., Puitzer, M., et al. (2013). Immunohistochemical analysis of BRAF (V600E) expression of primary and metastatic melanoma and comparison with mutation status and melanocyte differentiation antigens of metastatic lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*, 37(3): 413–420.
- Carracedo, A., & Pandolfi, P.P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and crosstalks. *Oncogene*, 27: 5527–5541.
- Carvajal, R.D., Antonescu, C.R., Wolchok, J.D., et al. (2011). KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*, 305(22): 2327–2334.
- Cawthon, R.M., Weiss, R., Xu, G.F., et al. (1990). A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell*, 62(1): 193– 201.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., et al, BRIM-3 Study Group (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*, 364(26): 2507–2516.
- Chen, Y.T, Stockert, E., Scanlan, M.J., et al. (1996). Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci.* 93:5915–9.

- Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F. et al. (2018). Molecular testing for *BRAF* mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol.* 31, 24–38.
- Ci, C., Tang, B., Lyu, D., et al. (2019). Overexpression of CDCA8 promotes the malignant progression of cutaneous melanoma and leads to poor prognosis. *International journal of molecular medicine*, 43(1): 404–412.
- Clark, G.S., Pappas-Politis, E.C., Cherpelis, B.S., et al. (2008). "Surgical management of melanoma in situ on chronically sun-damaged skin". *Cancer Control*, 15(3): 216–24.
- Clarkson, K.S., Sturdgess, I.C., & Molyneux, A.J. (2001). The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol.* 54: 196–200.
- Colombino, M., Capone, M., Lissia A, et al. (2012). *BRAF/NRAS* mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol.* 30(20): 2522-2529.
- Cormican, D., Kennedy, C., Murphy, S., et al. (2019). High concordance of BRAF mutational status in matched primary and metastatic melanoma, *Journal of Cutaneous Pathology*, 46(2): 117-122.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Traversari, C., et al. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 180:35–42.
- Cramer, S.F. (1991). The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas. *Arch Pathol Lab Med.* 115(2):115-119.
- Crombie, I.K. (1979). Racial differences in melanoma incidence. *British journal of cancer*, 40(2), 185–193.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., et al. (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 353(20): 2135-2147.
- da Silveira Nogueira Lima, J.P., Georgieva, M., Haaland, B., et al. (2017). A systematic review and network meta-analysis of immunotherapy and targeted therapy for advanced melanoma. *Cancer Med.* 6(6): 1143-1153.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892): 949-954.
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer biology & therapy*, 20(11): 1366–1379.
- Deménais, F., Mohamdi, H., Chaudru, V., et al. (2012). Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenOMEL study. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(20): 1568-1583.



- Demunter, A., Ahmadian, M.R., Libbrecht, L., et al. (2001). A novel N-ras mutation in malignant melanoma is associated with excellent prognosis. *Cancer Res* 61: 4916–4922.
- de Unamuno B.B., Murria E. R., Botella E.R., et al. (2017). Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel. *Scientific reports*, 7(1): 495.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., DaRocha Dias, S., et al. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*, 15: 294–303.
- Di Giacomo, A.M., Covre, A., Maio, M., et al. (2019). Guadecitabine Plus Ipilimumab in Unresectable Melanoma: The NIBIT-M4 Clinical Trial. *Clinical Cancer Research*, 25(24): 7351-7362.
- Dimitrov, L., Hong, C.S., Yang, C. et al. (2015). New Developments in the Pathogenesis and Therapeutic Targeting of the IDH1 Mutation in Glioma. *International Journal of Medical Sciences*, 12(3): 201–213.
- Dummer, R., Schadendorf, D., Ascierto, P.A., et al. (2017). Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18(4):435-445.
- Eckerle, M.D., Bishop, M., Resse, E., et al. Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome. In: Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Hefferon T, et al., editors. Cancer Syndromes [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2009.
- Erice, O., Smith, M.P., White, R., et al. (2015). MGMT Expression Predicts PARP-Mediated Resistance to Temozolomide. *Molecular cancer therapeutics*, 14(5): 1236-1246.
- Falchook, G. S., Long, G. V., Kurzrock, R., et al. (2012). Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England)*, 379(9829), 1893–1901.
- Feller, J.K., Yang, S., Mahalingam, M. (2013). Immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody as a screening tool for the BRAFV600E mutational status in primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* 26, 414–420.
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., et al. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 367(2): 107-114.
- Gao, Z., Albert, S., & Sheng, C., (2007). A Metastatic Melanoma with an Unusual Immunophenotypic Profile, *The American Journal of Dermatopathology*, 29(2): 169-171.
- Gao, J.; Shi, L.Z., Woodman, S.E., et al. (2016). Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167, 397–404.

- Gast, A., Scherer, D., Chen, B., et al. (2010). Somatic alterations in the melanoma genome: a high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 49(8): 733–745.
- Gershenwald, J.E. & Scolyer, R.A. (2018). Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol.* 25, 2105–2110.
- Goldemberg, D.C., Thuler, L.C.S., de Melo, A.C. (2019). An Update on Mucosal Melanoma: Future Directions. *Acta Dermatovenerol Croat.* 27(1): 11-15.
- Goldhoff, P., Clarke, J., Smirnov, I., et al. (2012). Clinical Stratification of Glioblastoma Based on Alterations in Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein (RB1) and Association with the Proneural Subtype. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71(1): 83–89.
- Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., et al. (2007). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 44(2): 99–106.
- Gomes, F., Serra-Bellver, P., Lorigan, P. (2018). The role of nivolumab in melanoma. *Future Oncol.* 14(13): 1241-1252.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851–857.
- Griewank, K.G., Murali, R., Schilling, B., et al. (2013). TERT promoter mutations in ocular melanoma distinguish between conjunctival and uveal tumours. *Br J Cancer*, 109(2): 497– 501.
- Guo, J., Si, L., Kong, Y., et al., (2011). Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29(21): 2904–2909.
- Guo, R., Wang, X., Chen, J. et al., (2014). Comparative genomic hybridization in a case of melanoma that loses expression of S100, HMB45, Melan A and tyrosinase in metastasis. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(1): 468-473.
- Guo, J., Carvajal, R.D., Dummer, R., et al. (2017). Efficacy and safety of nilotinib in patients with KIT-mutated metastatic or inoperable melanoma: results from the global, single-arm, phase II TEAM trial. *Ann Oncol.* 28(6): 1380-1387.
- Guo, Y., Long, J., & Lei, S. (2019). Promoter methylation as biomarkers for diagnosis of melanoma: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Physiol.* 234(5): 7356-7367.
- Guy, G.P., Jr, Machlin, S. R., Ekwueme, D. U., & Yabroff, K. R. (2015). Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. *American journal of preventive medicine*, 48(2): 183–187.

- Hacker, E., Irwin, N., Muller, H.K., et al. (2005). Neonatal ultraviolet radiation exposure is critical for malignant melanoma induction in pigmented T pras transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 125: 1074–1077.
- Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 380(9839): 358-365.
- Hauschild, A., Grob, J.J., Kaempgen, E., et al. (2013). An update on BREAK-3, a phase III, randomized trial: Dabrafenib (DAB) versus dacarbazine (DTIC) in patients with BRAF V600E-positive mutation metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol*, 31, 9013.
- Hayward, N.K, Wilmott, J.S., Waddell, N., et al. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*, 545(7653):175-180.
- Hodi, F.S., Corless, C.L., Giobbie-Hurder, A., et al. (2013). Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol.* 31(26): 3182–3190.
- Hodis, E., Watson, I. R., Chin, L. et al. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2): 251–263.
- Huang, F.W., Hodis, E., Xu, M.J., et al. (2013). Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*, 339(6122): 957–959.
- Jackett, L., & Scolyer, R.A. (2019). A review of key biological and molecular events underpinning transformation of melanocytes to primary and metastatic melanoma. *Cancers*, 11(12), 2041.
- Johnson, G.J., & Lapadat (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 1911-1912.
- Joseph, R.W., Sullivan, R.J., Harrell, R., et al. (2012). Correlation of NRAS mutations with clinical response to high-dose IL-2 in patients with advanced melanoma. *J Immunother*, 35(1): 66–72.
- Kalinsky, K., Lee, S., Rubin, K.M., et al. (2017). A phase 2 trial of dasatinib in patients with locally advanced or stage IV mucosal, acral, or vulvovaginal melanoma: A trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2607). *Cancer.* 123(14): 2688-2697.
- Kapur, R.P., Bigler, S.A., Skelly, M., Gown, A.M. (1992). Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. *J Histochem Cytochem* 40(2): 207.
- Karachaliou, N., Pilotto, S., Rosell, R., et al. (2015). Melanoma: oncogenic drivers and the immune system. *Annals of translational medicine*, 3(18), 265.

- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., et al. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci.* 91:3515–9.
- Kim, K.B., Kefford, R., Pavlick, A.C., et al. (2013). Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol.* 31(4): 482–489.
- Kluger, H.M., Dudek, A.Z., McCann, C., et al. (2011). A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer,* 117(10): 2202–2208.
- Kollipara, R., Cooley, L.D., Horii, K.A., et al. (2014). Spitzoid melanoma in a child with LiFraumeni syndrome. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 17(1): 64-69.
- Kraemer, K.H, Lee, M.M., Andrews, A.D., & Lambert WC (1994). The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of dermatology,* 130(8): 1018- 1021.
- Krakstad, C., & Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer,* 9, 135.
- Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., et al. (2003). BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin CancerRes.* 9: 3362– 3368.
- Laudicella, R., Baratto, L., Minutoli, F., et al. (2019). Malignant Cutaneous Melanoma: Updates in PET Imaging. *Curr Radiopharm,* 12,1.
- Lee, J.H., Long, G.V., Mann, G.J., et al. (2017). Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol,* 28, 1130–1136.
- Lee, J.H., Saw, R.P., Carlino, M.S., et al. (2019). Pre-operative ctDNA predicts survival in high-risk stage III cutaneous melanoma patients. *Ann Oncol,* 30, 815–822.
- Lim, S.Y., Menzies, A.M., & Rizos, H. (2017). Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer,* 123, 2118–2129.
- Lin, X., Sun, R., Zhao, X., et al. (2017). C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med,* 95(1): 53-67.
- Lin, G., Yin, G., Yan, Y., & Lin, B. (2019). Identification of prognostic biomarkers for malignant melanoma using microarray datasets. *Oncology letters,* 18(5): 5243–5254.

Liu, W., Kelly, J.W., Trivett, M., et al. (2007). Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol.* 127(4): 900-905.

Long, G.V., Wilmott, J.S., Capper, D. et al. (2014). Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol.*, 37, 61–65.

Lovly, C.M., Dahlman, K.B., Fohn, L.E., et al. (2012). Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS ONE*, 7:e35309.

Lowy, D.R., & Willumsen, B.M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 62: 851–891.

Lutzky, J., Bauer, J., & Bastian, B.C., (2008). Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(4): 492–493.

Mahmood, M.N., Lee, M.W., Zarbo, R.J., et al., (2002). Diagnostic value of HMB-45 and Anti-Melan A staining of sentinel lymph nodes with isolated positive cells. *The United States and Canadian Academy of Pathology*, 15 (12): 1288.

Madhunapantula, S.V., Sharma, A. & Robertson, G.P. (2007). PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer Res.* 67, 3626– 3636.

Maertens, O., Johnson, B., Hollstein, P., et al. (2013). Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov.* 3(3): 338–349.

Mann, G.J., Pupo, G.M., Scolyer, R.A. et al. (2013). BRAF mutation, NRAS mutation, and the absence of an immune-related expressed gene profile predict poor outcome in patients with stage III melanoma. *J Invest Dermatol* 133: 509–517.

Mannavola, F., D’Oronzo, S., Cives, M., et al. (2019). Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications are Hallmarks of Melanoma Progression. *Int J Mol Sci*, 21(1), 52.

Manning, B.D. & Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling navigating downstream. *Cell*, 129:1261– 1274.

Marabondo, S., & Kaufman, H.L. (2017). High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions. *Expert Opin Drug Saf.* 16(12): 1347-1357.

Maverakis, E., Cornelius, L.A., Bowen, G.M., et al. (2015). Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 95(5): 516-524.

McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., et al. (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 15(3): 323-332.

- McNeal, A.S., Liu, K., Seykora, J.T., et al. (2015). CDKN2B Loss Promotes Progression from Benign Melanocytic Nevus to Melanoma. *Cancer Discov.* 5, 1072–1085.
- Mejbel, H.A., Arudra, S., Pradhan, D., et al. (2019). Immunohistochemical and Molecular Features of Melanomas Exhibiting Intratumor and Intertumor Histomorphologic Heterogeneity. *Cancers*, 11(11), 1714.
- Mescher, A.L. (2013). *Jungueira's Βασική Ιστολογία*. Μτφρ. Λ. Ανδριοπούλου-Οικονόμου. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 6<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, 2015.
- Meyskens, F.L., Farmer, P.J. & Hoda, A.C. (2004). Etiologic Pathogenesis of Melanoma. *Clin Cancer Res.* 10(8): 2581-2583.
- Michielin, O., van Akkooi, A.C.J., Ascierto, P.A., et al. (2019). Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.*30(12): 1884-1901.
- Miller, J.J., Shih, H.A., Andronesi, O. C., & Cahill, D. P. (2017). Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*, 123(23), 4535-4546.
- Minor, D.R., Kashani-Sabet, M., Garrido, M. et al. (2012). Sunitinib therapy for melanoma patients with KIT mutations. *Clin Cancer Res.*18(5):1457-1463.
- Montgomery, B.D, Sadler, G.M. (2009). "Punch biopsy of pigmented lesions is potentially hazardous". *Can Fam Physician* 55(1): 24.PMC 2628830.
- Murugan, A.K., Dong, J., Xie, J. & Xing, M. (2009). MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell Cycle*, 8: 2122–2124.
- Nagore, E., Rachakonda, S., & Kumar, R., (2019). TERT promoter mutations in melanoma survival. *Oncotarget*,10, 1546–1548.
- Nasti, T.H., & Timares, L. (2015). MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol.* 91(1): 188-200.
- Nielsen, L.B., Dabrosin, N., Sloth, K., et al. (2018). Concordance in BRAF V600E status over time in malignant melanoma and corresponding metastases. *Histopathology*, 72, 814– 825.
- Nogueira, C., Kim, K.H., Sung, H. et al. (2010). Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene*, 29: 6222–6232.
- Nørøxe, D.S., Poulsen, H.S., Lassen, U. (2016). Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open*, 1(6), e000144.

O'Brien, O., Lyons, T., Murphy, S., et al. (2017). BRAF V600 mutation detection in melanoma: a comparison of two laboratory testing methods. *Journal of Clinical Pathology*, 70, 935-940.

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100(12): 2235-2241.

Orchard, G.E. (2000). Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem.* 32: 475-81.

Orchard, G.E., Wojcik, K., Rickaby, W., Martin, B., et al. (2019). Immunohistochemical detection of V600E BRAF mutation is a useful primary screening tool for malignant melanoma. *British Journal of Biomedical Science*, 76(2), 77-82.

Pasquali, E., Garcia-Borron, J.C., Fagnoli, M.C., et al. (2015). MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: a pooled-analysis from the M-SKIP project. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 136(3): 618-631.

Paszowska-Szczur, K., Scott, R.J., Serrano-Fernandez, P. et al. (2013). Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 133(5): 1094-1100.

Pellegrini, C., Di Nardo, L., Cipolloni, G., et al. (2018). Heterogeneity of BRAF, NRAS, and TERT promoter mutational status in multiple melanomas and association with MC1R genotype: findings from molecular and immunohistochemical analysis. *J. Mol. Diagn.* 20, 110–122.

Pollock, P., Harper, U., Hansen, K., et al. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 33:19–20.

Puntervoll, H.E., Yang, X.R., Vetti, H.H., et al. (2013). Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *Journal of medical genetics*, 50(4): 264-270.

Rabbie, R., Ferguson, P., Molina-Aguilar, C., et al. (2019). Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *The Journal of pathology*, 247(5): 539–551.

Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., et al. (1983). Structure and biological activity of vraf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci.* 80(14): 4218– 4222.

Reuben, A., Spencer, C. N., Wargo, J. A., et al. (2017). Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *NPJ genomic medicine*, 2, 10.

Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., et al. (2017). Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell*, 171: 934–949.e15.



- Robertson, A.G., Shih, J., Woodman, S.E. et al. (2017). Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer cell*, 32(2): 204–220.e15.
- Rocha-Rodriguez, L.G., Rocha-Aguirre, J.E., Correa-Vellez, N., & Ariza, S. (2019). Diagnostic validity of immunohistochemical markers S100, HMB-45, MITF, tyrosinase, Melan-A/MART-1, PNL2, NKI/ C3 for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Dermatol Rev Mex*.63(3): 278-292.
- Ross, M.I., & Gershenwald, J.E. (2013). "Sentinel lymph node biopsy for melanoma: a critical update for dermatologists after two decades of experience". *Clinics in dermatology*, 31(3): 298– 310.
- Rubinstein, J. C., Tran, N., Ma, S., Halaban, R., & Krauthammer, M. (2010). Genome-wide methylation and expression profiling identifies promoter characteristics affecting demethylation-induced gene up-regulation in melanoma. *BMC medical genomics*, 3, 4.
- Salmena, L., Carracedo, A. & Pandolfi, P.P. (2008). Tenetsof PTEN tumorsuppression. *Cell*, 133:403–414.
- Saroufim, M., Habib, R., Gerges, H., et al. (2014). Comparing BRAF mutation status in matched primary and metastatic cutaneous melanomas: Implications on optimized targeted therapy. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3):315-320.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., et al. (1997). The Ras– RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenicRasmutants. *Science* 277:333–338.
- Scheier, B., Amaria, R., Lewis, K., & Gonzalez, R. (2011). Novel therapies in melanoma. *Immunotherapy*, 3(12): 1461-9.
- Scolyer, R.A., Rawson, R.V., Gershenwald, J.E. et al. (2020). Melanoma pathology reporting and staging. *Mod Pathol*. 33, 15–24.
- Shao, Y. & Aplin, A.E. (2010). Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res*. 70: 6670–6681.
- Shi, J., Yang, X.R., Ballew, B., et al. (2014). Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nature genetics*, 46(5): 482-486.
- Shinohara, M., Deubner, H., & Argenyi, Z.B. (2009). S100, HMB-45, and Melan-A negative primary melanoma. *Dermatology Online Journal*, 15(9).
- Si, L. Kong, Y., Xu, X. et al. (2012). Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: Large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *European Journal of Cancer*, 48(1): 94-100.

Skelton, H.G., Smith, K.J., Graham, J.H. et al. (1991). HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. A reflection of cellular activation. *Am J Dermatopathol.* 13(6): 543-50.

Smoller, B.R., Hsu, A., Krueger, J. (1991). HMB-45 monoclonal antibody recognizes an inducible and reversible melanocyte cytoplasmic protein. *J Cutan Pathol* 18: 315.

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., et al. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA- 4 blockade in melanoma. *New Engl J Med.* 371: 2189–2199.

Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., et al. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 366(8): 707-714.

Spagnolo, F., & Queirolo, P. (2012). Upcoming strategies for the treatment of metastatic melanoma. *Arch Dermatol Res.* 304(3):177-84.

Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., et al. (2004). Deregulated Akt 3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 64: 7002– 7010.

Suzuki, A., DeLaPompa, J.L., Del BarcoBarrantes, I., et al. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol.* 8: 1169–1178.

Syn, N.L., Teng, M.W., Mok, T.S.K. et al. (2017). "De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting". *The Lancet Oncology* 18(12): e731–41.

Tapper, W., Jones, A.V., Kralovics, R., et al. (2015). Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nature communications* 6:6691.

Ticha, I., Hojny, J., Michalkova, R., et al. (2019). A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Scientific reports*, 9(1), 17050.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 366(26): 2443–2454.

Tran, M.A., Gowda, R., Sharma, A. et al. (2008). Targeting V600EBRaf and Akt3 using nanoliposomal- small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Res.* 68: 7638–7649.

Tsao, H., Goel, V., Wu, H., et al. (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 122:337–341.

Ugurel, S., Hildenbrand, R., Zimpfer, A., et al. (2005). Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer*, 92(8): 1398–1405.

- Ulloa-Montoya, F., Louahed, J., Dizier, B., et al. (2013). Predictive gene signature in MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapy. *J Clin Oncol.* 31(19):2388–2395.
- Valachis, A. & Ullenhag, G. (2017). Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 81, 106-115.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., et al. (1995). Variants of the melanocytstimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature genetics*, 11(3): 328-330.
- Vanni, I., Tanda E.T., Spagnolo, F. et al. (2020). The Current State of Molecular Testing in the BRAF-Mutated Melanoma Landscape . *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7:113.
- Viray, H., Bradley, W.R., Schalper, K.A., et al. (2013). Marginal and joint distributions of S100, HMB45 and Melan-A across a large series of cutaneous melanomas. *Arch Pathol Lab Med.* 137(8): 1063–1073.
- Wan, P.T, Garnett, M.J, Roe, S.M, et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116:855–867.
- Ward, W.H., Lambreton, F., Goel, N., et al. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications, 2017, Chapter 6.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11): 875–885.
- Wheatley, K., Ives, A., Eggermont, J., et al. (2007). Interferon- $\alpha$  as adjuvant therapy for melanoma: An individual patient data meta-analysis of randomised trials. *Journal of Clinical Oncology*, 25:18\_suppl, 8526-8526.
- Whiteman, D.C., Pavan, W.J., & Bastian, B.C. (2011). The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment cell & melanoma research*, 24(5): 879–897.
- Wiesner, T., Murali, R., Fried, I., et al. (2012). A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol.* 36(6): 818–830.
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Ferrucci, P.F., et al. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1345–1356.
- Woodman, S. E., Trent, J. C., Stemke-Hale, K., et al. (2009). Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. *Molecular cancer therapeutics*, 8(8): 2079–2085.

Wu, H., Goel, V., & Haluska, F.G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*, 22(20):3113-3122.

Wu, C. E., Esfandiari, A., Lunec, J., et al. (2018). Targeting negative regulation of p53 by MDM2 and WIP1 as a therapeutic strategy in cutaneous melanoma. *British journal of cancer*, 118(4): 495–508.

Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., et al., (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32): 33946–33957.

Yu, C.; Liu, X., Shi, H., et al. (2019). Combination of Immunotherapy With Targeted Therapy: Theory and Practice in Metastatic Melanoma. *Front. Immunol.* 10.

### **Διαδικτυακές συνδέσεις**

[www.oncolink.org](http://www.oncolink.org) (accessed 13/11/2020)