



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ
ΤΗΣ ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΟΛΑΡΥΓΓΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ»**

**ΠΟΛΙΤΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ
ΓΝΑΘΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ
ΤΗΣ ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΟΛΑΡΥΓΓΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ»**

**ΠΟΛΙΤΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πολίτη Αναστασίας: 5-11-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 786^α/29-3-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ράγκος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ασπρούδης Ιωάννης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-12-2016

«Διερεύνηση της συνδυασμένης απορρύθμισης των μορίων EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα της Στοματοφαρυγγολαρυγγικής χώρας και του Δέρματος»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 929^α/29-6-2020

Ασπρούδης Ιωάννης	Καθηγητής Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καστανιουδάκης Ιωάννης	Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ράγκος Βασίλειος	Αναπληρωτής Καθηγητής Γναθοπροσωπικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αλεξίου Γεώργιος	Αλεξίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητή Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σιόκα Χρύσα	Σιόκα Χρύσα, Επίκουρη Καθηγήτρια Πυρηνικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-7-2020

Ιωάννινα 27-8-2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατιστάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Στη Μελίνα, στον Άγγελο

και στους γονείς μου

Πρόλογος

«Υγεία και τους εσθλά τω βιω δύο»

Μένανδρος, αρχαίος Έλληνας ποιητής του 4 αιώνα π.Χ

Υγεία και μυαλό είναι δύο θαυμαστά πράγματα στη ζωή. Το πιο πολύτιμο αγαθό στην ανθρώπινη ζωή είναι η υγεία και η διατήρησή της είναι ο πρώτιστος σκοπός του ανθρώπου. Αποτελεί το θεμέλιο πάνω στο οποίο στηρίζεται όλο το οικοδόμημα των ανθρώπινων προσπαθειών. Ωστόσο, στην εποχή της ευμάρειας και της τεχνικό-επιστημονικής προόδου, η υγεία εξακολουθεί να βάλλεται, με αποτέλεσμα ο άνθρωπος να αγρυπνά για την περιφρούρησή της, αλλά και να δίνει μάχες ανώδυνες ή επώδυνες για την επανόρθωση ή την απόκτησή της. Η συνήθης νόσος που ταλανίζει την παγκόσμια κοινότητα είναι ο καρκίνος, «επάρατη» τη χαρακτηρίζουν, αφού συχνά σημαίνει την αρχή του τέλους, γκρεμίζει όνειρα, πόθους, ακυρώνει προσπάθειες και αγώνες χρόνων, καταρρακώνει την ανθρώπινη αξιοπρέπεια, κατατρώνει σαν σαράκι το ανθρώπινο σώμα.

Πολυπαραγοντική η αιτιολογία του, λέμε οι ιατροί - επιστήμονες και πολλαπλές οι έρευνες στο ατέρμονο ταξίδι της γνώσης για να νικήσουμε τον καρκίνο - εχθρό. Το περιβάλλον που όζει, τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα διατροφής, η αλόγιστη χρήση των νέων τεχνολογιών με την υπέρμετρη εκπομπή ακτινοβολίας, οι ασθματικοί, φρενήρεις ρυθμοί ζωής, το αστείρευτο άγχος, οι στρεσογόνες συνθήκες, η καθιστική ζωή, οι εξαρτήσεις, το γενετικό υλικό έχουν μερίδιο ευθύνης στη γέννηση του καρκίνου. Το εναρκτήριο λάκτισμα για την έρευνά μου αποτέλεσε η βίωση των συνθηκών ζωής των καρκινοπαθών στα γκρίζα δωμάτια των νοσοκομείων και οι ανθρώπινες τραγωδίες που καθημερινά ζούμε στις ογκολογικές μονάδες προσπαθώντας να κερδίσουμε το διακύβευμα της ζωής.

Με τούτη εδώ την έρευνα και με τις λιγοστές μου δυνάμεις προσπάθησα να βάλω τη δική μου ψηφίδα στο πολύχρωμο μωσαϊκό της επιστήμης και να επιτελέσω το χρέος μου ως επιστήμονας και ως άνθρωπος, με πυξίδα την αγάπη για τον Άνθρωπο. «Αγάπα τον άνθρωπο, γιατί είσαι συ», μας δίδαξε ο Νίκος Καζαντζάκης. Αγαπάμε τον πάσχοντα συνάνθρωπο σημαίνει κάνουμε τα αδύνατα δυνατά, σμίγοντας φωτιά και νερό, κλειδί και κλείθρο, σώμα και ψυχή...

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και σε άρτια συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον κ. Ράγκο Βασίλειο, Αναπληρωτή Καθηγητή Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής και επιβλέποντα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την καθοριστική συμβολή του κατά την διάρκεια της έρευνας και συγγραφής του πονήματος αυτού. Χωρίς την ορθή του καθοδήγηση και τη συσσωρευμένη γνώση και εμπειρία της μακράς του σταδιοδρομίας στην Ιατρική, την έρευνα και τη διδασκαλία, η εκπόνηση της παρούσης διατριβής θα ήταν αδύνατη.

Θα ήταν παράλειψη από μέρους μου εάν δεν ευχαριστούσα για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή του τον κ. Ασπρούδη Ιωάννη, Καθηγητή Οφθαλμολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας διατριβής. Οι εύστοχες υποδείξεις του και η συνεχή του ενθάρρυνση με βοήθησαν να ανταποκριθώ στο ρόλο του νέου ερευνητή.

Οφείλω ακόμη θερμές ευχαριστίες στην κα Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την παροχή του υλικού από το παθολογοανατομικό εργαστήριο του ΠΓΝ Ιωαννίνων, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις πολύτιμες υποδείξεις της και τις εύστοχες επισημάνσεις της για τη διαχείριση του υλικού και του συνόλου της ερευνητικής διαδικασίας. Η εμπειρία και η γνώση της που επιστρατεύτηκαν υπήρξαν αναντικατάστατες, προσδίδοντας κύρος και αξιοπιστία στα ευρήματα της παρούσας έρευνας.

Στο δύσκολο και χρονοβόρο κομμάτι της διαλογής των ιστολογικών πλακιδίων, της συμβατικής και ψηφιακής εκτίμησης των ανοσοχρώσεων και εν γένη στη διεκπεραίωση της παρούσας έρευνας, καθοριστική υπήρξε επίσης η συμβολή του κ. Τσιάμπα Ευάγγελου, Στρατιωτικού Ιατρού – Κυτταρολόγου, επιστημονικού συνεργάτη Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, τον οποίο και ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Παρά ταύτα, χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή που επέδειξε η οικογένειά μου όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, η υλοποίησή της θα παρέμενε ένα ανεκπλήρωτο όνειρο. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	9
ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΟΛΑΡΥΓΓΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ	13
ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΛΑΡΥΓΓΑ (LSCC).....	19
ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ (CSCC)	23
ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR).....	27
ΚΙΝΑΣΗ ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟΥ ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ (ALK).....	33
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	46
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ EGFR ΚΑΙ ALK	46
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΡΩΣΕΩΝ.....	48
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	49
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	51
<i>Φύλλο του ασθενούς.....</i>	<i>54</i>
<i>Εντόπιση του καρκινώματος.....</i>	<i>56</i>
<i>Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης.....</i>	<i>59</i>
<i>Στάδιο της νόσου</i>	<i>60</i>
2. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	62
3. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΗΣ-ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC)	63
<i>Φύλλο του ασθενούς.....</i>	<i>67</i>
<i>Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης.....</i>	<i>68</i>
<i>Στάδιο της νόσου</i>	<i>70</i>
4. ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ EGFR ΚΑΙ ALK ΣΤΑ ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΚΕΦΑΛΗΣ-ΤΡΑΧΗΛΟΥ (HNSCC).....	72
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	85
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	89
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ	91
ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΙ ΟΡΟΙ	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η απορρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες κομβικές στη διαδικασία καρκινογένεσης απαντάται στα επιθήλια ενός ευρέως φάσματος οργάνων. Η νεοπλασματική εκτροπή και η καρκινική εξαλλαγή επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί μια προοδευτική διαδικασία, στην οποία ενσωματώνονται χρωμοσωμικές και ειδικές γονιδιακές αστάθειες, τόσο δομικού, όσο και αριθμητικού τύπου. Ιδιαίτερα στη σύγχρονη μοριακή ιατρική, η ανίχνευση συγκεκριμένων τύπων γενετικών συμβάντων (σημειακές μεταλλάξεις, ενισχύσεις ή διαγραφές γονιδίων, πολυσωμία ή ανευπλοειδία χρωμοσωμάτων) οδηγεί σε στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Προσεγγίζοντας τα καρκινώματα του πνεύμονα για παράδειγμα, η σημασία της απορρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων και το αποτέλεσμα της - δηλαδή η πρωτεϊνική έκφραση - αποτελεί στόχο ενδεδειγμένης μελέτης σε παγκόσμιο επίπεδο, ώστε να οδηγήσει σε ασφαλή κλινικοεργαστηριακά δεδομένα για προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς - όπως λόγου χάρη ο βαθμός ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία - ή σε νέες στοχευμένες θεραπείες.

Ο διαμεμβρανικός υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ή EGFR, έχει αναγνωριστεί τα τελευταία χρόνια ως ένας πολύ σημαντικός παράγοντας στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών αλληλουχιών, σε πολλές κυτταρικές βιολογικές διεργασίες, τόσο σε υγιή, όσο και σε νεοπλασματικά κακοήθη κύτταρα. Οι κύριες βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχει, περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αποφυγή της απόπτωσης και τη μετάσταση του όγκου(1,2). Υπερέκφραση του EGFR έχει διαπιστωθεί στις περισσότερες περιπτώσεις πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου και μάλιστα έχει συσχετιστεί με τη συνολική επιβίωση στα πρώιμα καρκινώματα(2). Επιπρόσθετα, σε πολλά είδη καρκινωμάτων, η χρήση αναστολέων του EGFR καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και οδηγεί σε απόπτωση τα κακοήθη κύτταρα(1). Παρά τα οφέλη της χρήσης των αναστολέων του EGFR, ένα μεγάλο μέρος των ασθενών είτε έχει, είτε αποκτά πολύ γρήγορα ανοχή στη στοχευμένη αυτή θεραπεία. Ένας από τους τρόπους απόκτησης ανοχής των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει και την παράκαμψη της σηματοδοτικής οδού του EGFR, μέσω ενεργοποίησης μιας άλλης, παρόμοιας και παράλληλης σηματοδοτικής οδού(1)

Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (Anaplastic Lymphoma Kinase ή ALK ή CD246), είναι επίσης ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με δράση κινάσης της τυροσίνης που ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων της ινσουλίνης. Αναδιατάξεις του γονιδίου της ALK έχουν αναφερθεί σε κακοήθειες τόσο του αιμοποιητικού συστήματος, όσο και των συμπαγών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων του αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα (ALCL) και του μη – μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC). Η ενεργοποίηση του γονιδίου της ALK συμβαίνει συνήθως ύστερα από χρωμοσωμική αντιμετάθεση, οδηγώντας στο σχηματισμό και υπερέκφραση μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης της ALK.

Σε ασθενείς που πάσχουν από NSCLC λόγω χάρη, ανακαλύφθηκε το 2009 μια αναδιάταξη του γονιδίου της ALK με το γονίδιο της EML4 (Εχινοδερμική πρωτεΐνη 4 που συνδέεται στους μικροσωληνίσκους) με ιδιότητες ογκογονιδίου που οδηγούσαν στην απρόσφορη ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών της ALK(3). Μελέτες που ακολούθησαν την ανακάλυψη αυτή, οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός αναστολέα της ALK (crizotinib) ως στοχευμένη θεραπεία σε ασθενείς με NSCLC με υπερέκφραση της ALK με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Δυστυχώς, αναπόφευκτα όμως, η χρήση της crizotinib οδηγεί αργά ή γρήγορα στην ανάπτυξη ανοχής από τα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα(3).

Το πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος (cSCC) είναι η δεύτερη σε συχνότητα κακοήθεια του δέρματος μετά το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC). Το cSCC αποτελεί έναν όγκο αυξημένης επιθετικότητας σε σχέση με το BCC, καθώς σε 12% των περιπτώσεων μεθίσταται ειδικά στους επιχώριους λεμφαδένες. Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται ολοένα και αυξανόμενη επίπτωση, η οποία εν μέρη οφείλεται στο γηρασμό του πληθυσμού και στις συνήθειες που σχετίζονται με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία(4). Η θεραπεία εκλογής του cSCC είναι η ευρεία εκτομή του όγκου, ενώ η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται σε προχωρημένη ή υποτροπιάζουσα νόσο όπου η χειρουργική εξαίρεση είναι αδύνατη ή αντενδείκνυται. Η χημειοθεραπεία όμως, σχετίζεται με σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες που περιορίζουν τη χρήση της, ειδικά σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας με συμπαρομαρτούντα νοσήματα και μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τη ποιότητα ζωής τους(5). Συνεπώς, θεωρείται επιβεβλημένη η ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών με ελαττωμένη τοξικότητα για την αντιμετώπιση του τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού cSCC.

Όσον αφορά στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου, η 5ετής επιβίωση παραμένει σταθερή σε χαμηλά επίπεδα τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ σημειώθηκε μείωση των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών με υποτροπή ή μεταστατική νόσο. Ένα από τα πιθανά αίτια των σημερινών, όχι και τόσο ευνοϊκών αυτών ποσοστών επιβίωσης - και κυρίως του γλωττιδικού πλακώδους καρκινώματος - πιθανά να αποτελεί και ο ανεπαρκής ή ελλιπής χαρακτηρισμός του όγκου με τις συμβατικές ιστοπαθολογικές μεθόδους. Έτσι, θεωρείται πια απαραίτητο να διαλευκανθεί η μοριακή βάση των καρκινωμάτων κεφαλής/τραχήλου και να εντοπιστούν νέοι προγνωστικοί βιοδείκτες που θα επιτρέψουν τη βελτίωση της διαχείρισης και αντιμετώπισης των ασθενών και ειδικότερα εκείνων με προχωρημένη νόσο(6).

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στη συνδυασμένη απορρύθμιση της έκφρασης των μορίων EGFR και ALK είναι περιορισμένα στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου και του δέρματος. Έτσι, στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ταυτόχρονης, συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, αναγνωρίζοντας έτσι τυχόν απορρύθμιση των αντίστοιχων γονιδίων σε αυτού του είδους τα καρκινώματα.

Η μελέτη της εν δυνάμει ταυτόχρονης απορρύθμισης των υποδοχέων EGFR και ALK θα συνεισφέρει στη περαιτέρω διαλεύκανση των μοριακών βιολογικών μηχανισμών που αξιοποιούνται από τα νεοπλασματικά κακοήθη κύτταρα προκειμένου να μετασχηματιστούν, αποφεύγοντας τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφεύγοντας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Η τυχόν ταυτόχρονη υπερέκφραση των δύο πρωτεϊνών θα μπορούσε υπό προϋποθέσεις να αναγνωρίσει υποομάδες ασθενών, οι οποίοι δυνητικά θα μπορούσαν να επωφεληθούν θεραπευτικά με τη ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέων του EGFR και της ALK, καθώς και εκείνους που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα έμφυτης ανοχής στη στοχευμένη μονοθεραπεία έναντι μόνο του ALK ή του EGFR, λόγω ταυτόχρονης ενεργοποίησης παράλληλων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών.

ΠΛΑΚΩΔΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΟΛΑΡΥΓΓΙΚΗΣ ΧΩΡΑΣ

Τα πλακώδη καρκινώματα τα οποία εντοπίζονται κυρίως στη στοματική κοιλότητα, το φάρυγγα και το λάρυγγα ταξινομούνται και συχνά αναφέρονται με τον γενικότερο όρο καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC). Τα HNSCC συχνότερα εμφανίζονται στους βλεννογόνους που καλύπτουν τη στοματική κοιλότητα, το φάρυγγα και το λάρυγγα(7,8). Τα πλακώδη καρκινώματα του φάρυγγα ταξινομούνται περαιτέρω με βάση την ανατομική θέση σε ρινοφαρυγγικά, στοματοφαρυγγικά και υποφαρυγγικά(7).

Τα καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου αποτελούν την έκτη συχνότερη μορφή κακοήθειας στον κόσμο, με το 90% αυτών να προέρχονται από πλακώδη κύτταρα(9). Ως παράγοντες κινδύνου έχουν αναγνωριστεί το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, διάφοροι ερεθιστικοί παράγοντες της στοματοφαρυγγικής χώρας – λόγου χάρη κακή στοματική υγιεινή ή σήψη, χρόνιοι ερεθισμοί ή τραυματισμοί από μηχανικά ή άλλα αίτια, η λοίμωξη με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) ή με τον Epstein – Barr και οι ιονίζουσες ακτινοβολίες (Roentgen, υπεριώδεις, ραδιοϊσότοπα). Επίσης, ενοχοποιούνται τοπικές νοσολογικές καταστάσεις (λευκοπλακία, ερυθροπλακία, ομαλός λειχήνας, πολυθηλωμάτωση), συστηματικές καταστάσεις (σύνδρομο Plummer – Vinson, σύφιλη, αβιταμίνωση Β, κίρρωση του ήπατος, κληρονομικότητα)(10). Μοριακά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα καρκινογόνα που ανευρίσκονται σε αυτές τις ουσίες (καπνός και αλκοόλ) ενέχουν έναν αιτιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη του πλακώδους καρκινώματος κεφαλής/τραχήλου και ότι η επίπτωση των μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 – μια μετάλλαξη στα HNSCC που ουσιαστικά σηματοδοτεί την μεταλλαγή από προδιηθητική σε διηθητική βλάβη - είναι σημαντικά πιο αυξημένη σε κύτταρα καρκινωμάτων ασθενών που κάνουν χρήση καπνού και αλκοόλ, σε σύγκριση με εκείνους που απέχουν από αυτές τις ουσίες. Επιπροσθέτως, καρκινώματα λάρυγγα, υποφάρυγγα και εδάφους της στοματικής κοιλότητας σπάνια αναπτύσσονται σε μη καπνιστές ασθενείς(11).

Τα HNSCC αποτελούν μια βιολογικά πολύπλοκη νοσογόνο διαδικασία που περιλαμβάνει έναν ετερογενή πληθυσμό καρκινωμάτων και την απορρύθμιση πολλαπλών βιολογικών μονοπατιών. Ως εκ τούτου, οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ανάπτυξη της νόσου δεν έχουν ακόμη πλήρως διαλευκανθεί(9,12).

Η πρώιμη νόσος αντιμετωπίζεται τυπικά με χειρουργική εξαίρεση ή ακτινοθεραπεία, ενώ στη τοπικά και περιοχικά προχωρημένη νόσο χρησιμοποιούνται συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση ακολουθούμενη από επικουρική ακτινοθεραπεία, την οριστική χημειο- και ακτινοθεραπεία και την στοχευμένη μοριακή θεραπεία(12). Τα ποσοστά επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης της πρώιμης νόσου ξεπερνούν το 90% και το 70% για τα καρκινώματα σταδίου I και II αντίστοιχα. Για την επιλογή του θεραπευτικού πλάνου με συνδυασμό θεραπευτικών μεθόδων στα καρκινώματα σταδίου III και IV, θα πρέπει να συνεκτιμηθούν και οι παράγοντες κινδύνου για υποτροπή της νόσου που περιλαμβάνουν: τα αμφίβολα όρια εκτομής, τη κακή διαφοροποίηση του καρκινώματος (G3 ή χειρότερο), την τοπικά προχωρημένη νόσο (pT4) και την παρουσία μεταστάσεων στους περιοχικούς λεμφαδένες(13). Στα στάδια νόσου III και IV μπορεί να επιλεγεί θεραπεία διάσωσης σημαντικών δομών και οργάνων της περιοχής, όπως συνδυασμός χημειο- και ακτινοθεραπείας ή στοχευμένη μοριακή θεραπεία χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία(13). Τα στάδια των καρκινωμάτων της κεφαλής/τραχήλου (στοματικής κοιλότητας, στοματοφάρυγγα, υποφάρυγγα και λάρυγγα) φαίνονται στους πίνακες 1 έως και 4.

Όμως, παρά την πρόοδο στις θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση των HNSCC, η πλειοψηφία των ασθενών με τοπικά προχωρημένο πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής / τραχήλου θα αναπτύξει απομακρυσμένες μεταστάσεις ή θα υποτροπιάσει, οδηγώντας σε 5ετή επιβίωση μικρότερη του 30%. Οι ασθενείς εκείνοι με περιοχικά προχωρημένη νόσο ή μεταστατική νόσο η οποία δε μπορεί να αντιμετωπιστεί χειρουργικά ή με ακτινοθεραπεία έχουν κακή πρόγνωση και με επιβίωση που δε ξεπερνά τους 6 έως 10 μήνες(9).

Συνεπώς, δεδομένων και των πρόσφατων επιτευγμάτων της μοριακής βιολογίας και της γενετικής θεωρείται πια επιβεβλημένη η αναζήτηση νέων θεραπευτικών επιλογών οι οποίες και θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη εξατομικευμένων, θεραπευτικών προσεγγίσεων των πλακωδών καρκινωμάτων της κεφαλής και του τραχήλου. Τέτοιες θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη καταπολέμηση άλλων τύπων καρκίνων συμπαγών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου και του πνεύμονα(13).

Καρκίνος στοματικής κοιλότητας

Το πρόσθιο όριο είναι η συμβολή δέρματος και βλεννογόνου του χείλους (vermilion line). Το οπίσθιο όριο σχηματίζεται από τη συμβολή της σκληρής και μαλακής υπερώας άνωθεν, των περιχαρακωμένων θηλών κάτωθεν και των πρόσθιων αμυγδαλικών καμάρων πλευρικά. Οι διάφορες εντοπίσεις εντός της στοματικής κοιλότητας περιλαμβάνουν τα χείλη, τα ούλα, τη σκληρή υπερώα, το στοματικό βλεννογόνο, το έδαφος του στόματος, τα πρόσθια δύο τρίτα της γλώσσας και το οπισθογόμφιο τρίγωνο.

Tx Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor 2 cm or less in greatest dimension

T2 Tumor more than 2 cm but not greater than 4 cm in greatest dimension

T3 Tumor more than 4 cm in greatest dimension

T4a Moderately advanced local disease

- Tumor invades through cortical bone, inferior alveolar nerve, floor of mouth, or skin of face—that is, chin or nose (oral cavity).
- Tumor invades adjacent structures (e.g., through cortical bone, into deep [extrinsic] muscle of tongue [genioglossus, hypoglossus, palatoglossus, and styloglossus], maxillary sinus, skin of face)

T4b Very advanced local disease

- Tumor invades masticator space, pterygoid plates, or skull base and/or encases internal carotid artery

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας κατά TNM (Ορατή η κατάταξη μόνο κατά το T)(14)

Καρκίνος του στοματοφάρυγγα

Ο στοματοφάρυγγος περιλαμβάνει τη βάση της γλώσσας, την κατώτερη επιφάνεια της μαλακής υπερώας και τη σταφυλή, τις πρόσθιες και οπίσθιες αμυγδαλικές καμάρες, τις γλωσσοαμυγδαλικές αύλακες, τις φαρυγγικές αμυγδαλές και τα πλευρικά και οπίσθια τοιχώματα του φάρυγγα

Tx	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension
T2	Tumor more than 2 cm but not greater than 4 cm in greatest dimension
T3	Tumor more than 4 cm in greatest dimension or extension to lingual surface of epiglottis
T4a	Moderately advanced local disease <ul style="list-style-type: none"> • Tumor invades the larynx, deep/extrinsic muscle of the tongue, medial pterygoid, hard palate, or mandible
T4b	Very advanced local disease <ul style="list-style-type: none"> • Tumor invades the lateral pterygoid muscle, pterygoid plates, lateral nasopharynx, or skull base, or encases the carotid artery

Πίνακας 2: Σταδιοποίηση του καρκίνου του στοματοφάρυγγα κατά TNM (Ορατή η κατάταξη μόνο κατά το T)(14)

Καρκίνος του υποφάρυγγα

Ο υποφάρυγγας περιλαμβάνει τους απιοειδείς κόλπους, τα πλευρικά και οπίσθια υποφαρυγγικά τοιχώματα και τη μετακρικοειδική περιοχή

Tx	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor limited to one subsite of the hypopharynx and is 2 cm or less in greatest dimension
T2	Tumor invades more than one subsite of the hypopharynx or an adjacent site, or measures more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension without fixation of the hemilarynx or extension to the esophagus
T3	Tumor more than 4 cm in greatest dimension or with fixation of the hemilarynx or extension to the esophagus
T4a	Moderately advanced local disease <ul style="list-style-type: none"> • Tumor invades thyroid/cricoid cartilage, hyoid bone, thyroid gland, esophagus, or central compartment soft tissue
T4b	Very advanced local disease <ul style="list-style-type: none"> • Tumor invades prevertebral fascia, encases carotid artery, or involves mediastinal structures

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση του καρκίνου του υποφάρυγγα κατά TNM (Ορατή η κατάταξη μόνο κατά το T)(14)

ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΛΑΡΥΓΓΑ (LSCC)

Περισσότεροι από μισό εκατομμύριο ασθενείς διαγιγνώσκονται παγκοσμίως κάθε χρόνο με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής – τραχήλου (HNSCC), με το ένα τέταρτο από αυτά τα καρκινώματα να εντοπίζονται στο λάρυγγα, καθιστώντας το πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα (LSCC) ένα από τα συνηθέστερα καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου(15). Στις Η.Π.Α αντιστοιχεί στο 2% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου, ενώ σε παγκόσμια κλίμακα αντιστοιχεί στο 10% των κακοήθων νόσων στους άνδρες και στο 4% στις γυναίκες(16,17).

Η επίπτωση των HNSCC αυξάνεται με την ηλικία και εμφανίζονται κυρίως στις ηλικίες 40 με 60, ενώ επίσης αυξημένη ανευρίσκεται ανά περιοχές, όπως για παράδειγμα στη λεκάνη της Μεσογείου(18,19). Μόλις το 40% των περιπτώσεων πλακώδους καρκινώματος κεφαλής – τραχήλου διαγιγνώσκονται με πρώιμη νόσο σταδίου I ή II, ενώ ποσοστό μεγαλύτερο του 50% έχουν νόσο σταδίου III ή μεγαλύτερο κατά τη διάγνωση. Τοπική υποτροπή της νόσου εμφανίζεται στο 60% των ασθενών με τοπικά προχωρημένη νόσο, ενώ απομακρυσμένες μεταστάσεις εμφανίζονται περίπου στο 30%(19).

Το πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα προέρχεται από το επιθήλιο της ανώτερης αναπνευστικής οδού, αποτελώντας το 95% του συνόλου των καρκινωμάτων που εμφανίζονται στο λάρυγγα(17,20). Το LSCC έχει την ισχυρότερη επιδημιολογική σχέση με το κάπνισμα και τη μεγαλύτερη αναλογία αρρένων προς θηλέων πασχόντων 6:1(21).

Ως κύριοι προδιαθεσικοί παράγοντες ανάπτυξης LSCC θεωρούνται η χρήση καπνού και η κατανάλωση αλκοόλ, αλλά αιτιολογικό ρόλο διαδραματίζει και η μόλυνση με υψηλού κινδύνου στελέχη του ιού HPV (hrHPV) στους μη καπνιστές και μη πότες. Αν και τα LSCC που προκαλούνται από τον HPV τείνουν να εμφανίζονται σε νεαρότερες ηλικίες και σχετίζονται με ευνοϊκότερη πρόγνωση, τα προχωρημένου σταδίου καρκινώματα εμφανίζουν υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα(22). Παρά όμως τη μείωση των καπνιστών παγκοσμίως που οδηγεί και στη μείωση της επίπτωσης του LSCC, η 5ετής επιβίωση δεν έχει αλλάξει αισθητά τα τελευταία 30 χρόνια και παραμένει περίπου στο 60%(15).

Η εμφάνιση των πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής – τραχήλου αλλά και του λάρυγγα δεν προκύπτει ξαφνικά, είναι αποτέλεσμα εξελικτικής διαδικασίας

αποτελούμενη από προοδευτικά και καλά κλινικώς και ιστολογικώς προσδιοριζόμενα βήματα που περιλαμβάνουν τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών για τη μετάβαση από τη δυσπλασία προς το διηθητικό καρκίνωμα. Χαρακτηριστικά, σε μια μελέτη 87 ιστολογικών δειγμάτων διαφόρων αλλοιώσεων κεφαλής – τραχήλου, ο μέσος αριθμός γενετικών ανωμαλιών αυξήθηκε από 0,7 σε 3,6 κατά τη μετάβαση από υπερπλαστικές αλλοιώσεις σε διηθητικό καρκίνωμα(11,22).

Η αντιμετώπιση του LSCC είναι ιδιαιτέρως απαιτητική λόγω της σημαντικής λειτουργικής νοσηρότητας στη περιοχή που αναπτύσσεται το καρκίνωμα και των ψυχοκοινωνικών επιδράσεων που σχετίζονται με τη λαρυγγεκτομή(15). Κύριοι θεραπευτικοί στόχοι είναι η βελτίωση της επιβίωσης και η διατήρηση της φώνησης, του λόγου και της αναπνευστικής λειτουργίας.

Οι θεραπευτικοί μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία – μόνες ή σε συνδυασμούς – και η επιλογή της καταλληλότερης εξαρτάται σε κάθε περίπτωση από το στάδιο του όγκου (Πίνακας 1). Τέλος, νέες μοριακές θεραπευτικές προσεγγίσεις των τελευταίων ετών σε συνδυασμό με προσεκτικά επιλεγμένες ομάδες ασθενών, οδήγησαν στην έγκριση στοχευμένων μοριακών θεραπειών όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (cetuximab) έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)(22).

Θεραπεία εκλογής της πρώιμης νόσου είναι είτε η ακτινοθεραπεία, είτε η χειρουργική επέμβαση με διατήρηση του λάρυγγα με παρόμοιες, καλές πιθανότητες τοπικού ελέγχου της νόσου(15,20). Οι ασθενείς οι οποίοι θα υποτροπιάσουν μετά από την αρχική ακτινοθεραπεία, αντιμετωπίζονται συνήθως με χειρουργική επέμβαση διάσωσης, με ολική λαρυγγεκτομή. Αντίθετα, η χειρουργική επέμβαση ή η ακτινοθεραπεία ως μονοθεραπεία σε προχωρημένη νόσο (στάδιο III και IV) αντιμετωπίζει επιτυχώς μόνο το 10 – 65% των ασθενών(20).

Για την επιλογή της στρατηγικής αντιμετώπισης της νόσου απαραίτητη είναι η κλινική εκτίμηση του λεμφαδενικού «status», καθώς η συμμετοχή ή όχι των τραχηλικών λεμφαδένων υπαγορεύει σε μεγάλο βαθμό το είδος της θεραπείας(20). Επιπροσθέτως, η ακριβής εντόπιση του καρκινώματος – μαζί με το μέγεθος, το στάδιο, τη διαφοροποίηση, την ύπαρξη ή μη νευρικής διήθησης και το πρότυπο ανάπτυξης του όγκου (εξωφυτικό ή ενδοφυτικό) - καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη πιθανότητα μετάστασης της νόσου στους

λεμφαδένες του τραχήλου. Έτσι, τα υπεργλωττιδικά καρκινώματα του λάρυγγα μεθίστανται συχνότερα στους επιχώριους λεμφαδένες με αποτέλεσμα την αποτυχία της θεραπείας(20,23).

Υπεργλωττιδικά Καρκινώματα Λάρυγγα

T1 limited to one subsite of supraglottis, with normal vocal cord mobility:

- suprahyoid epiglottis
- aryepiglottic folds, laryngeal aspect
- infrahyoid epiglottis
- false vocal cords (ventricular folds/bands)
- arytenoids

T2 invades mucosa of more than one adjacent area, with normal vocal cord mobility:

- subsite of supraglottis
- glottis
- region outside supraglottis, e.g., base of tongue, vallecula, medial wall of pyriform sinus

T3 limited to larynx with vocal cord fixation and/or invasion of any of the following:

- inner cortex of thyroid cartilage
 - paraglottic space
 - preepiglottic space
 - postcricoid area
-

Γλωττιδικά Καρκινώματα Λάρυγγα

T1 • limited to vocal cord(s) with normal vocal cord mobility (may involve anterior or posterior commissure)

- **T1a:** limited to one vocal cord
- **T1b:** involves both vocal cords

T2 extends to supraglottis and/or subglottis, and/or with impaired vocal cord mobility

T3 limited to larynx with vocal cord fixation and/or invasion of paraglottic space and/or inner cortex of thyroid cartilage

Υπογλωττιδικά Καρκινώματα Λάρυγγα

T1 limited to subglottis

T2 extends to vocal cord(s) with normal or impaired vocal cord mobility (no cord fixation)

T3 limited to larynx with vocal cord fixation and/or invasion of paraglottic space and/or inner cortex of thyroid cartilage

T4 is the same for all three sites of the larynx:

- **T4:** moderately or very advanced
 - **T4a:** moderately advanced local disease:
 - invades through outer cortex of thyroid cartilage
 - invades cricoid cartilage
 - invades tissues beyond the larynx (e.g., trachea, deep extrinsic muscles of the tongue, strap muscles, thyroid gland, esophagus)
 - **T4b:** very advanced local disease:
 - invades the mediastinum
 - invades the prevertebral space
 - encases the carotid artery

ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ (CSCC)

Το πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος (cutaneous Squamous Cell Carcinoma) είναι ένα καρκίνωμα προερχόμενο από τα κερατινοκύτταρα με επίπτωση που αυξάνεται παγκοσμίως(25). Το cSCC προκύπτει από πρόδρομες δερματικές αλλοιώσεις, όπως η ακτινική κεράτωση (AK) ή η νόσος του Bowen, αλλά μπορεί να προκύψει και *de novo* ή μετά από χρόνιες φλεγμονώδεις δερματικές αντιδράσεις(26).

Θεωρείται το δεύτερο σε συχνότητα καρκίνωμα του δέρματος μετά το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC) και ο συχνότερος τύπος καρκίνου δέρματος με μεταστατικό δυναμικό, αν και πρόσφατα δεδομένα εκτιμούν ότι η αναλογία cSCC προς BCC ανέρχεται στο 1:1(25,27). Το συνολικό ποσοστό του μεταστατικού πρωτογενούς cSCC ανέρχεται στο 1 έως 4%, με τους ανοσοκατεσταλμένους και τους μεταμοσχευθέντες να κινδυνεύουν περισσότερο. Παρά το σχετικά μικρό ποσοστό, η πρόγνωση του μεταστατικού πλακώδους καρκινώματος δέρματος είναι δυσμενής με μέση επιβίωση μικρότερη των 2 ετών(25,26). Συνολικά η επίπτωση του cSCC εκτιμάται ως διπλάσια εκείνης του μελανώματος στον Ευρωπαϊκό χώρο και έως και δεκαπλάσια σε περιοχές με μεγαλύτερη ηλιοφάνεια (Αυστραλία)(26).

Οι αλλοιώσεις του cSCC εμφανίζονται τυπικά σε περιοχές του σώματος με μεγάλη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία όπως η κεφαλή, ο τράχηλος και η ραχιαία επιφάνεια των άνω άκρων(25). Στους παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνονται – εκτός από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UVR) και ειδικά στην UVB – η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία και χημικά καρκινογόνα, το άρρεν φύλλο, η μεγάλη ηλικία, το ανοιχτόχρωμο δέρμα, η HPV λοίμωξη, η παρουσία χρόνιων πληγών ή ελκών και διάφορες γενετικές καταστάσεις που επηρεάζουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA(25,26,28).

Όπως τα περισσότερα καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου, το πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος ακολουθεί το μοντέλο των πολλαπλών σταδίων κατά τη καρκινογένεση. Η αρχή γίνεται με την ανάπτυξη ενός κλώνου κυττάρων της επιδερμίδας που έχουν συσσωρεύσει έναν αριθμό μεταλλάξεων, οδηγώντας σε τοπική διαταραχή της αρχιτεκτονικής και κυτταρική ατυπία, με αποτέλεσμα την τοπική διαταραχή της κερατινοποίησης, η οποία κλινικά γίνεται αντιληπτή ως «ακτινική κεράτωση»(25,26,28). Εν συνεχεία, ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός των άτυπων κυττάρων που καταλαμβάνουν

όλο το πάχος της επιδερμίδας, οδηγεί στην ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ή *in situ* νεοπλασία, η οποία συχνά εμφανίζεται ως νόσος του Bowen. Η περαιτέρω συσσώρευση μεταλλάξεων – με συχνότερη την ενωρίς στη πορεία της καρκινογένεσης μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 - οδηγεί τελικά στη διήθηση της βασικής στιβάδας και την ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος(25,26,29). Μέχρι στιγμής δεν έχει καθοριστεί πότε ακριβώς ένα ενδοεπιθηλιακό νεόπλασμα καταφέρνει να διηθήσει τη βασική μεμβράνη, να εισέλθει στο χόριο και τελικά να δώσει μεταστάσεις(29).

Η κλινική εικόνα του cSCC ποικίλει από εξωφυτικούς όγκους, έως ομαλές πλάκες και ελκωτικές ή σκληρυντικές αλλοιώσεις. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται πάντα με ιστοπαθολογική εξέταση βιοπτικού υλικού(25). Η συχνότερη εμφάνιση ενός διηθητικού cSCC είναι μια αλλοίωση ακτινικής κεράτωσης (AK), η οποία γίνεται υπερκερατωσική ή διηθείται η βάση της ή μετατρέπεται σε ελκωτική και επώδυνη. Όταν το καρκίνωμα αναπτύσσεται *de novo* χωρίς να προϋπάρχουν αλλοιώσεις AK, μπορεί να έχει τη μορφή μικρής πλάκας ή οζιδίου, το οποίο αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου(26).

Αν και στη πλειονότητά τους τα cSCC έχουν μια ήπια βιολογική συμπεριφορά και μπορούν να αντιμετωπιστούν με τοπικές καταστροφικές μεθόδους ή τοπική εξαίρεση, ένα μικρό ποσοστό μεθίσταται και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα και συχνά αναφέρεται ως υψηλού κινδύνου cSCC (High Risk cSCC ή HRcSCC). Τα χαρακτηριστικά εκείνα που κατατάσσουν ένα καρκίνωμα δέρματος στη κατηγορία αυτή είναι το μεγάλο μέγεθος του όγκου, η υποτροπή του, το βάθος ≥ 2 mm, η κακή ιστολογική διαφοροποίηση, η περινευρική ή λεμφαγγειακή διήθηση, η εντόπιση στο πρόσωπο, τα άνω και κάτω άκρα ή τα γεννητικά όργανα και η εμφάνισή του σε έδαφος χρόνιων ελκών(28). Πάντως, το πλακώδες καρκίνωμα δέρματος που εντοπίζεται εγγύς ή πέριξ βλεννογόνων, όπως το cSCC των χειλιών, της γεννητικής και της περιπρωκτικής χώρας, έχει επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό(29).

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, το πλακώδες καρκίνωμα δέρματος που εντοπίζεται στη κεφαλή και τον τράχηλο (cSCCHN) τείνει να θεωρηθεί ξεχωριστή ομάδα καρκινωμάτων, αντιπροσωπεύοντας το 25% του συνόλου των μη - μελανωματικών καρκινωμάτων του δέρματος(30). Στους περισσότερους ασθενείς η πρόγνωση είναι καλή με δυνατότητα πλήρους εξαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου στο 95% των περιπτώσεων περίπου. Σε ένα μικρό όμως ποσοστό των ασθενών με τοπικά προχωρημένη νόσο και με

χαρακτηριστικά καρκινώματος που το κατατάσσουν ως υψηλού κινδύνου, το ποσοστό μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες μπορεί να ξεπεράσει το 20%, με 5ετή επιβίωση να κυμαίνεται από 46 έως 70%(30). Στον Πίνακα 2 φαίνεται η σταδιοποίηση του cSCCHN σύμφωνα με την 8^η έκδοση της American Joint Committee on Cancer(27).

AJCC 8 (Head and Neck Only)	
T1	Tumor diameter <2 cm
T2	Tumor diameter 2 cm but <4 cm
T3	Tumor diameter ≥4 cm or tumor any size with any 1 high-risk feature
T4	T4a: gross cortical bone or marrow invasion T4b: skull base invasion or skull base foramen involvement
High-risk features	<ul style="list-style-type: none"> • Deep invasion (beyond subcutaneous fat or >6 mm) • Minor bone erosion • Perineural invasion: tumor cells within the nerve sheath of a nerve <ul style="list-style-type: none"> ◦ Deeper than the dermis, or ◦ Measuring ≥0.1 mm, or ◦ Clinical or radiographic involvement of named nerves without skull base invasion

Πίνακας 5: Σταδιοποίηση του cSCCHN σύμφωνα με την AJCC, 8th edition(27)

Η ανοσοκαταστολή διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη πρόγνωση του πλακώδους καρκινώματος δέρματος. Στη πραγματικότητα, σε μεταμοσχευθέντες, το πλακώδες είναι το συχνότερο καρκίνωμα δέρματος με συχνότητα εμφάνισης τρεις φορές μεγαλύτερη της αντίστοιχης του βασικοκυτταρικού καρκινώματος και με ολικό κίνδυνο ανάπτυξης cSCC 65 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Μάλιστα, ο κίνδυνος φαίνεται ότι αυξάνει ευθέως ανάλογα με τη διάρκεια της ανοσοκατασταλτικής φαρμακευτικής θεραπείας. Τέλος, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς εμφανίζουν χειρότερα ποσοστά υποτροπών και μετάστασης σε σχέση με τους μη ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς(4).

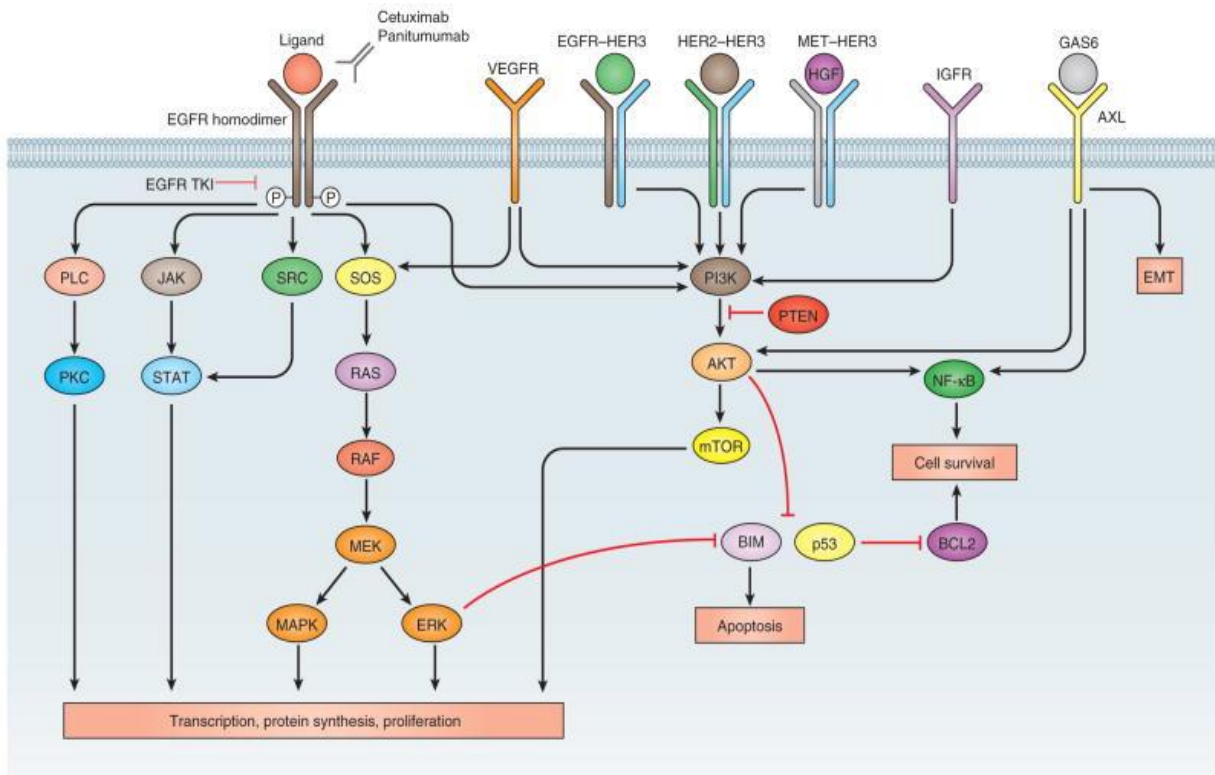
Η επικρατούσα αντίληψη στην αντιμετώπιση της τοπικά περιοριζόμενης αρχόμενης νόσου περιλαμβάνει τη χειρουργική εξαίρεση με ευρεία εκτομή, τη χειρουργική εξαίρεση με τη τεχνική κατά Mohs σε περιπτώσεις υποτροπών ή σε ειδικές εντοπίσεις και την ακτινοθεραπεία. Ο ρόλος της χημειοθεραπείας, αλλά και των νεότερων στοχευμένων θεραπειών περιορίζεται στην αντιμετώπιση προχωρημένης νόσου όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι εφικτή ή αντενδείκνυται και σε μεταστατική νόσο(25,27,28,31)

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) – επίσης γνωστός ως ErbB1 ή HER1 - είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων ErbB και αποτελεί έναν τύπου I υποδοχέα τυροσινικής κινάσης(1,32). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον EGFR εδράζεται στο χρωμόσωμα 7p12 και το προϊόν του είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 170 kDa με τρεις κύριες λειτουργικές πρωτεϊνικές περιοχές: μια εξωκυττάρια στην οποία συνδέονται οι προσδέτες, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια με δράση τυροσινικής κινάσης(33–36). Η πρόσδεση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) στον EGFR επάγει τον ομο- ή ετερο-διμερισμό του υποδοχέα με άλλους της οικογένειας ErbB (κυρίως τον HER2), τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών που εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου(1).

Εκτός από τον EGF, στον υποδοχέα EGFR προσδένονται ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας α (TGF-α), η αμφιρεγκουλίνη (AREG), το επιθηλιακό μιτογόνο ή επιγέννη (EPN), η βητασελουλίνη (betacellulin), ο επιδερμικός παράγοντας που προσδέεται στην ηπαρίνη (heparin-binding EGF) και η επιρεγκουλίνη (epiregulin)(1,35–37).

Ο EGFR εκφράζεται φυσιολογικά στα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου, όπως τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας και των θυλάκων των τριχών, στους ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα(1,19,36,38). Επίσης, ανευρίσκεται σε αφθονία στο επιθήλιο του βρογχικού δένδρου, της γαστρεντερικής οδού και του αναπαραγωγικού συστήματος της γυναίκας(19). Η σύνδεση του προσδέτη με τον υποδοχέα EGFR οδηγεί στην ενεργοποίηση διάφορων ενδοκυττάρων, αντιαποπτωτικών, βιολογικών μονοπατιών που ενέχονται στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, όπως τα PI3/AKT/mTOR, JAK-STAT, PLC/PKC, του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) και ERK/MAPK(1,21,32,37–39). Έτσι, η ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει σαν τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επαγωγή ή την παρεμπόδιση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Ακόμη, επάγει την κυτταρική μετανάστευση, οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση των κυττάρων, αντίσταση στους αποπτωτικούς μηχανισμούς και εμμέσως διεγείρει την αγγειογένεση(17,21,40).



Εικόνα 1: Ενδοκυττάρια βιολογικά μονοπάτια του υποδοχέα EGFR(1)

Η - με διάφορους μηχανισμούς - υπερέκφραση του EGFR όμως, έχει συσχετιστεί με πληθώρα καρκινωμάτων του δέρματος και των βλεννογόνων, όπως τα καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου, τα καρκινώματα του μαστού, του παγκρέατος, του ουροποιητικού, τα ορθοκολικά κακοήθη νεοπλάσματα, τα γλοιώματα, τα καρκινώματα ουροδόχου κύστης, προστάτη και νεφρών καθώς και με τα μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα(19,32,40,41). Στη βιβλιογραφία, η υπερέκφραση του EGFR ανευρίσκεται σε 34 έως 93% των διαφόρων τύπων καρκινωμάτων του ανθρώπου(32). Χαρακτηριστικό είναι ότι στα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα ανευρίσκεται 50-πλάσια δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης, επιτρέποντας την κακοήθη εξαλλαγή ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα(1). Παρόλα αυτά, η πρωτεϊνική υπερέκφραση του EGFR ανευρίσκεται συχνότερα στα καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου (60-83%) και σε μικρότερο βαθμό στα αδενοκαρκινώματα και τα μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα (~50%)(42).

Αφ' ενός, η υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον EGFR αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς ογκογένεσης για αρκετά κακοήθη νεοπλάσματα, αφετέρου έχει διαπιστωθεί η συχνή εμφάνιση μεταλλάξεων στη πρωτεϊνική περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα EGFR στα καρκινώματα του πνεύμονα και στα γλοιοβλαστώματα. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις οδηγούν στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων αντιαποπτωτικών βιολογικών μονοπατιών και ευνοούν την κακοήθη εξαλλαγή(38). Η παρουσία μεταλλάξεων φαίνεται ότι αποτελεί παράγοντα που ευνοεί την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα(43). Σε άλλους επιθετικούς όγκους, όπως τα γλοιοβλαστώματα, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενίσχυση του γονιδίου του EGFR συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση και ανοχή στην ακτινοθεραπεία(35).

Άλλοι μηχανισμοί καρκινογένεσης περιλαμβάνουν τις παραλλαγές του διμερισμού του υποδοχέα, την παθολογική ανεπάρκεια ορισμένων φωσφατασών, τη συνεχή ενεργοποίηση του EGFR με την εγκατάσταση ενός αυτοκρινούς μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης και την αυξημένη σταθερότητα του υποδοχέα μέσω της ελάττωσης της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα και την επακόλουθη διάσπασή του(32,35,44–46). Επιπροσθέτως, πυρηνική έκφραση του EGFR έχει ανευρεθεί σε πλήθος καρκινωμάτων περιλαμβανομένων εκείνων του δέρματος, του στήθους, της ουροδόχου κύστεως, του τραχήλου της μήτρας, του θυρεοειδούς και της στοματικής κοιλότητας. Η πυρηνική αυτή έκφραση του υποδοχέα έχει συσχετιστεί με αύξηση του σταδίου του όγκου, του αριθμού των μιτώσεων και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού(47). Έτσι, αναγνωρίστηκε ότι μια από τις κύριες λειτουργίες του πυρηνικού EGFR είναι η δράση του ως μεταγραφικός συμπαράγοντας για επτά διαφορετικά ογκογονίδια(38,47). Μάλιστα, σε αρκετούς συμπαγείς όγκους, η μικρή ή καθόλου ανταπόκριση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες έχει συσχετιστεί με υπερέκφραση του EGFR στον πυρήνα των κακόηθων νεοπλασματικών κυττάρων(38). Εξάλλου, ο *Chou και συνεργάτες* έδειξαν ότι στα πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα, η υπερέκφραση του EGFR έχει την ικανότητα να διεγείρει την έκφραση του μη κωδικοποιητικού RNA 7 ή αλλιώς μικρο – RNA 7 (miR-7) μέσω του βιολογικού μονοπατιού του Ras/ERK/Myc, οδηγώντας σε καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα ERF και τελικά ευοδώνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό του όγκου(48).

Έκφραση EGFR στα καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα HNSCC αποτελούνται από μια ετερογενή ομάδα καρκινωμάτων, με το 80 έως το 100% αυτών των όγκων να εμφανίζουν υπερέκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Η υπερέκφραση του EGFR έχει συσχετιστεί με ελαττωμένη επιβίωση, αντίσταση στην ακτινοθεραπεία, με αυξημένες πιθανότητες αποτυχίας της τοπικής θεραπείας και απομακρυσμένων μεταστάσεων(49).

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη σημαντικά αυξημένη έκφραση του EGFR σε δυσπλαστικές αλλοιώσεις και κύτταρα καρκινωμάτων κεφαλής τραχήλου καθώς και σε πλακώδη καρκινώματα του λάρυγγα (LSCC), σε σχέση με κύτταρα του φυσιολογικού επιθηλίου, ευρήματα που συνηγορούν υπέρ μιας ρυθμιστικής αύξησης του υποδοχέα ήδη σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης(16,37,44,50–53). Σε ορισμένες μελέτες μάλιστα, υπερέκφραση του υποδοχέα του EGF ανευρίσκεται σε ποσοστό 49 - 90% των διαφόρων τύπων καρκινωμάτων κεφαλής – τραχήλου εκ πλακωδών κυττάρων και σε 47 – 88% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς πλακώδους καρκινώματος λάρυγγα(6,33,39,54).

Στη βιβλιογραφία, η ενίσχυση του γονιδίου του EGFR ή/και η υπερέκφρασή του στα καρκινώματα κεφαλής τραχήλου, αναφέρεται συχνά αλλά όχι καθολικά, όχι μόνο ως αρνητικός προγνωστικός δείκτης, αλλά σαν πιθανός προβλεπτικός παράγοντας αντίστασης στη χημειοθεραπεία και συσχετίζεται με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος(17,21,53). Αναλυτικότερα, συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του EGFR και μειωμένης επιβίωσης έχει διαπιστωθεί σε καρκινώματα στοματικής κοιλότητας, γλωττίδας, λάρυγγα και ιγμόρειων άντρων. Σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες, τα επίπεδα του συγκεκριμένου υποδοχέα συσχετίζονται με μικρότερη περίοδο επιβίωσης ελεύθερης υποτροπών και συνολικής επιβίωσης, καθώς και με κακή πρόγνωση(51).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών καταδεικνύουν ότι, η έκφραση του EGFR μπορεί να προσδιορίσει την επιθετικότητα του όγκου με βάση παθολογικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με απορρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της κακοήθους κυτταρικής διεύθυνσης στα καρκινώματα του λάρυγγα, καθιστώντας την μια σημαντικότερη παράμετρο που εμπλέκεται στην εξέλιξη και την πρόγνωση της συγκεκριμένης κακοήθειας(54).

Παρά τα παραπάνω αποτελέσματα διαφόρων ερευνητικών ομάδων, σύνολο άλλων ερευνητικών μελετών – που πάντως μειοψηφούν - δεν κατόρθωσαν να αποδείξουν σαφή στατιστικώς σημαντική σχέση της έκφρασης του EGFR με τη συνολική επιβίωση, με κλινικομορφολογικά χαρακτηριστικά και τη πρόγνωση στα HNSCC και απαιτείται περαιτέρω έρευνα και μελέτη, γιατί υπάρχει σαφής συσχέτιση, αρκεί να αποδειχθεί με περισσότερη ερευνητική επεξεργασία(17). Ενδεικτικά αναφέρονται οι μελέτες του *Kong A. και συν.* (55), *Jiang και συν.* (37), *Krecicki και συν.* (56) καθώς και *Resnick και συν.* (57).

Η αναντιστοιχία αυτή στα αποτελέσματα προέρχεται πιθανώς λόγω της ετερογένειας των ασθενών με διαφορετικές εντοπίσεις και τύπους καρκινωμάτων, του αριθμού των περιστατικών που στρατολογήθηκαν σε κάθε μελέτη, καθώς και των διαφορετικών μεθόδων που αυτές χρησιμοποίησαν(6,21,54). Πάντως, η μεγάλη πλειοψηφία των ερευνητών συμφωνούν ομόφωνα για την αξία του EGFR ως ανεξάρτητου παράγοντα για την επιβίωση, την υποτροπή και την ανταπόκριση στη θεραπεία στα καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου(54). Τέλος, πιστεύεται σήμερα ότι ο έλεγχος της έκφρασης του υποδοχέα EGFR κατά τη διάγνωση βοηθάει στην αναγνώριση εκείνων των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα λάρυγγα που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης μεταστάσεων στους τραχηλικούς λεμφαδένες και μπορεί να έχει κάποια αξία για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη χημειο- και ακτινοθεραπεία(51,53).

[Έκφραση EGFR στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος \(cSCC\)](#)

Η ενεργοποίηση του EGFR στα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα επάγει τον κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό, αυξάνοντας τη κυτταροβρίθεια και το πάχος της επιδερμίδας(58). Σχεδόν σε όλα τα πλακώδη καρκινώματα του δέρματος έχει διαπιστωθεί η έκφραση του υποδοχέα EGFR. Σε μεταστατικά καρκινώματα όμως, η έκφραση του EGFR ανευρίσκεται αυξημένη και αγγίζει το 100% (31,38,40,58,59). Μάλιστα, η υπερέκφραση του EGFR διαπιστώνεται σε όλες τις στιβάδες του δέρματος και ανεξάρτητα από την κυτταρική τους διαφοροποίηση, ενώ στο παρακείμενο υγιές δέρμα υπερέκφραση του EGFR εντοπίζεται μόνο στα κύτταρα της βασικής στιβάδας(40).

Αν και η θεραπεία εκλογής των πρωτοπαθών καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων δέρματος είναι χειρουργική, εν τούτοις σε προχωρημένα ανεγχείρητα cSCC και υποτροπιάζοντα cSCC υψηλού κινδύνου, η μη χειρουργική, στοχευμένη θεραπεία έναντι

του EGFR που υπερέκφράζεται αποτελεί πια επιλογή(31,38). Η σετουξιμάμπη (cetuximab) είναι ένα χειμερινό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του EGFR και έχει αδειοδοτηθεί από τον FDA για χρήση έναντι των πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής – τραχήλου και ορθοσιγμοειδούς σε συνδυασμό ή όχι με ακτινοθεραπεία(31,38,40), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί «off label» με καλά αποτελέσματα για τη βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος ασθενών με μη μελανωματικό καρκίνο δέρματος και αποδεκτή και διαχειρίσιμη τοξικότητα, αν και απαιτούνται τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες για την αποσαφήνιση του θεραπευτικού αποτελέσματος(5,27).

Όπως στους περισσότερους κακοήθεις όγκους, έτσι και στα πλακώδη καρκινώματα του δέρματος, τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση του EGFR περιλαμβάνουν τα RAS-RAF-MEK-MAPK, PLC-gamma/PKC, PI-3K/AKT, STAT και NF κ-β με ορατές φαινοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα ανάλογα με τον τύπο και τη κατάσταση διαφοροποίησής τους(29). Ειδικότερα, στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του EGFR εμφανίζεται πρώιμα στην εξέλιξη της καρκινογένεσης, ευνοεί την εξέλιξη του όγκου και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση(26,29). Επίσης, στα πλακώδη καρκινώματα του δέρματος η υπερέκφραση του EGFR φαίνεται να συμμετέχει στην υιοθέτηση ενός επιθετικότερου φαινοτύπου από πλευράς του καρκινώματος(29,40). Ακόμη, σε παρόμοιες μελέτες έχει διαπιστωθεί ανώμαλη κυτταροπλασματική έκφραση του EGFR στα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα προερχόμενα από cSCC με ταυτόχρονη απώλεια της μεμβρανικής έκφρασης(29,36)

ΚΙΝΑΣΗ ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟΥ ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ (ALK)

Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) είναι μια πρωτεΐνη υποδοχέας με δράση τυροσινικής κινάσης και ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1994 σε κύτταρα αναπλαστικού μεγαλοκυτταρικού λεμφώματος (ALCL). Ανήκει στην υπερικογένεια των τυροσινικών κινασών του υποδοχέα της ινσουλίνης, ενώ σχετίζεται στενά με την λευκοκυτταρική τυροσινική κινάση (Ltk)(60–62). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ALK εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 στη περιοχή 2p23.2-p23.1, περιλαμβάνει 26 εξώνια και περιέχει τη γενετική πληροφορία για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης ALK, αποτελούμενη από 1620 αμινοξέα(61–63).

Δομικά, ο υποδοχέας ALK αποτελείται από 3 πρωτεϊνικές περιοχές: μια εξωκυττάρια (1020 αμινοξέα) όπου συνδέεται ο προσδέτης, μια διαμεμβρανική (21 αμινοξέα) και μια ενδοκυττάρια (561 αμινοξέα) (60,63,64). Η ενδοκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή του υποδοχέα έχει ενζυμική δράση, καταλύοντας τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) σε ένα υπόλειμμα τυροσίνης της πρωτεΐνης του υποστρώματος(63). Αν και υπό αμφισβήτηση, δύο πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί ως προσδέτες – αν και μη ειδικοί - του υποδοχέα ALK στα θηλαστικά: η μεσοκίνη (midkine) και η πλειοτροφίνη (pleiotrophin)(60,62,65). Αυτοί οι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες έχουν την ιδιότητα να διμερίζονται και να προσδέονται με την ηπαρίνη σχηματίζοντας σύμπλοκα, ενώ εμπλέκονται σε μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως η νευρωνική ανάπτυξη, η μετανάστευση κυττάρων και η αγγειογένεση(60). Άλλοι πιθανοί προσδέτες του υποδοχέα ALK περιλαμβάνουν τον ειδικό οστεοβλαστικό παράγοντα 1 (osteoblast – specific factor 1 or OSF-1), το ρυθμιστικό πεπτίδιο με συγγένεια στην ηπαρίνη (Heparin Affinity Regulatory Peptide or HARP) και τον νευροτροφικό παράγοντα που προσδέεται στην ηπαρίνη (Heparin – Binding Neurotrophic Factor or HBNF), αν και το δυναμικό ενεργοποίησης του υποδοχέα των ανωτέρω πεπτιδίων παραμένει αμφιλεγόμενο(64). Τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι μικρές πρωτεΐνες FAM150A και FAM150B που αποτελούν προσδέτες της λευκοκυτταρικής τυροσινικής κινάσης και εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα επινεφρίδια, μπορούν και συνδέονται με την εξωκυττάρια περιοχή του ALK ενεργοποιώντας τον(63,65).

Ο ρόλος του ALK στην ανθρώπινη φυσιολογία και ανάπτυξη δεν έχει γίνει ακόμη πλήρως κατανοητός και τα στοιχεία που έχουμε μέχρι σήμερα σχετικά με τη φυσιολογική του λειτουργία προέρχονται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Ο υποδοχέας ALK των θηλαστικών φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ενώ τα επίπεδα της έκφρασής του στο νευρικό ιστό μειώνονται μετά τη γέννηση(60,63,65). Στον άνθρωπο, έκφραση της ALK έχει εντοπιστεί σε εγκεφαλικό ιστό ενήλικα (νευρικά, ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα), στο λεπτό έντερο, στους όρχεις, τον προστάτη και το παχύ έντερο, όχι όμως σε φυσιολογικά λεμφικά κύτταρα, σε κύτταρα σπληνός, θύμου, ωοθήκης, πνεύμονα, πλακούντα, ήπατος, νεφρού, παγκρέατος, καρδιακά και σκελετικά μυϊκά κύτταρα(60,61).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης του υποδοχέα ALK δεν είναι πλήρως διαλευκαμένος, εικάζεται ότι είναι παρόμοιος με τον γενικό μηχανισμό ενεργοποίησης των υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης. Η σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή του υποδοχέα προκαλεί τον ομο- ή ετεροδιμερισμό του, ο οποίος με τη σειρά του καταλήγει στην τρανς – φωσφορυλίωση συγκεκριμένων τυροσινικών κατάλοιπων στην ενδοκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή του υποδοχέα, ενεργοποιώντας διάφορα ενδοκυττάρια βιολογικά μονοπάτια που είτε διασυνδέονται, είτε επικαλύπτονται μεταξύ τους (60,63). Σε αυτά περιλαμβάνονται τα μονοπάτια Ras/Raf/MEK/ERK1/2, το JAK/STAT, το PI3K/Akt και το PLC-γ που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη κυτταρική επιβίωση(60,61,65,66).

Για λόγους που δεν είναι μέχρι σήμερα κατανοητοί, ο γενετικός τόπος της ALK φαίνεται ότι αποτελεί το επίκεντρο γενετικών μετατοπίσεων, με 22 διαφορετικές μετατοπίσεις να έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία ανώμαλων μορφών της ALK - συνήθως μέσω συγχώνευσης με τμήμα άλλης πρωτεΐνης - και εμπλέκονται στη παθογένεση διάφορων τύπων καρκινωμάτων(60,65). Επιπρόσθετα, πολλές πρωτεΐνες – χίμαιρες με την ALK έχουν ανευρεθεί σε επιθηλιακές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος πνεύμονα, το πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, του παχέος εντέρου και του μαστού(67). Ανώμαλες μορφές ALK προκύπτουν και με άλλους μηχανισμούς εκτός από τις μετατοπίσεις: με μεταλλάξεις του γονιδίου της ALK που οδηγούν σε απρόσφορη ενεργοποίησή της, με εναλλακτικό μάτισμα κατά τη μετάφραση, μέσω μικρών απαλείψεων γενετικής πληροφορίας και μέσω

ενίσχυσης του γονιδίου που την κωδικοποιεί(63–65). Σε ορισμένα καρκινώματα μάλιστα, όπως στο μη – μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα και στο αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα, η παραγωγή ανώμαλων χιμαιρικών πρωτεϊνικών μορφών της ALK, αποτελεί κρίσιμη καμπή στη πορεία της καρκινογένεσης. Πρωτεϊνικές παραλλαγές της ALK προκύπτουν συνήθως μετά από μετατόπιση γονιδίων, μέσω χιμαιρισμού τμήματός της με πεπτίδια ή τμήματα πεπτιδίων, όπως το NPM (νουκλεοφωσμίνη) – στο αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα - και το EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) – στο μη – μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα(63). Στα ALCL για παράδειγμα, χιμαιρικές πρωτεΐνες της ALK ανευρίσκονται σε περισσότερες από το 50% των περιπτώσεων, ενώ η χιμαιρική πρωτεΐνη NPM – ALK είναι η πιο συχνή μορφή(63).

Χρωμοσωμική αναδιάταξη	Πρωτεΐνη που συμμετέχει	Συχνότητα (%)	Χιμαιρική Πρωτεΐνη (kDa)	Κυτταρική Εντόπιση	Τύπος Κακοήθειας
t(2;5)(p23;q35)	Nucleophosmin (NPM)	75–80	NPM–ALK (80)	Nucleus, nucleolus and cytoplasm	ALK ⁺ ALCL and ALK ⁺ DLBCL
t(1;2)(q25;p23)	Tropomyosin 3 (TPM3)	12–18	TPM3–ALK (104)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL and IMT
t(2;3)(p23;q21)	TRK-fused gene (TFG)	2	TFG–ALK (113, 97, 85)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL
inv(2)(p23;q35)	ATIC	2	ATIC–ALK (96)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL and IMT
t(2;17)(p23;q23)	Clathrin heavy chain-like 1 (CLTC1)	2	CLTC1–ALK (250)	Granular cytoplasmic	ALK ⁺ ALCL, IMT and ALK ⁺ DLBCL
t(2;X)(p23;q11–12)	Moesin (MSN)	<1	MSN–ALK (125)	Cell-membrane associated	ALK ⁺ ALCL
t(2;19)(p23;p13)	Tropomyosin 4 (TPM4)	<1	TPM4–ALK (95–105)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL and IMT
t(2;17)(p23;q25)	ALO17	<1	ALO17–ALK (ND)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL
t(2;2)(p23;q13) or inv(2)(p23;q11–13)	RAN binding protein 2 (RANBP2)	<1	RANBP2–ALK (160)	Periphery of the nucleus	IMT
t(2;22)(p23;q11.2)	Non-muscle myosin heavy chain (MYH9)	<1	MYH9–ALK (220)	Cytoplasm	ALK ⁺ ALCL
t(2;11;2)(p23;p15;q31)	Cysteinyl-tRNA synthetase (CARS)	<1	CARS–ALK (130)	Unknown	IMT
ins(3' ALK)(4q22–24)	Unknown	<1	Unknown	Granular cytoplasmic	ALK ⁺ DLBCL
t(2;4)(p23;q21)	SEC31 homologue A (<i>S. cerevisiae</i>) (SEC31LI)	<1	SEC31LI–ALK (ND)	Cytoplasm	IMT
inv(2)(p21;p23)	Echinoderm microtubule-associated protein-like4 (EML4)	6	EML4–ALK (ND)	Unknown	NSCLC

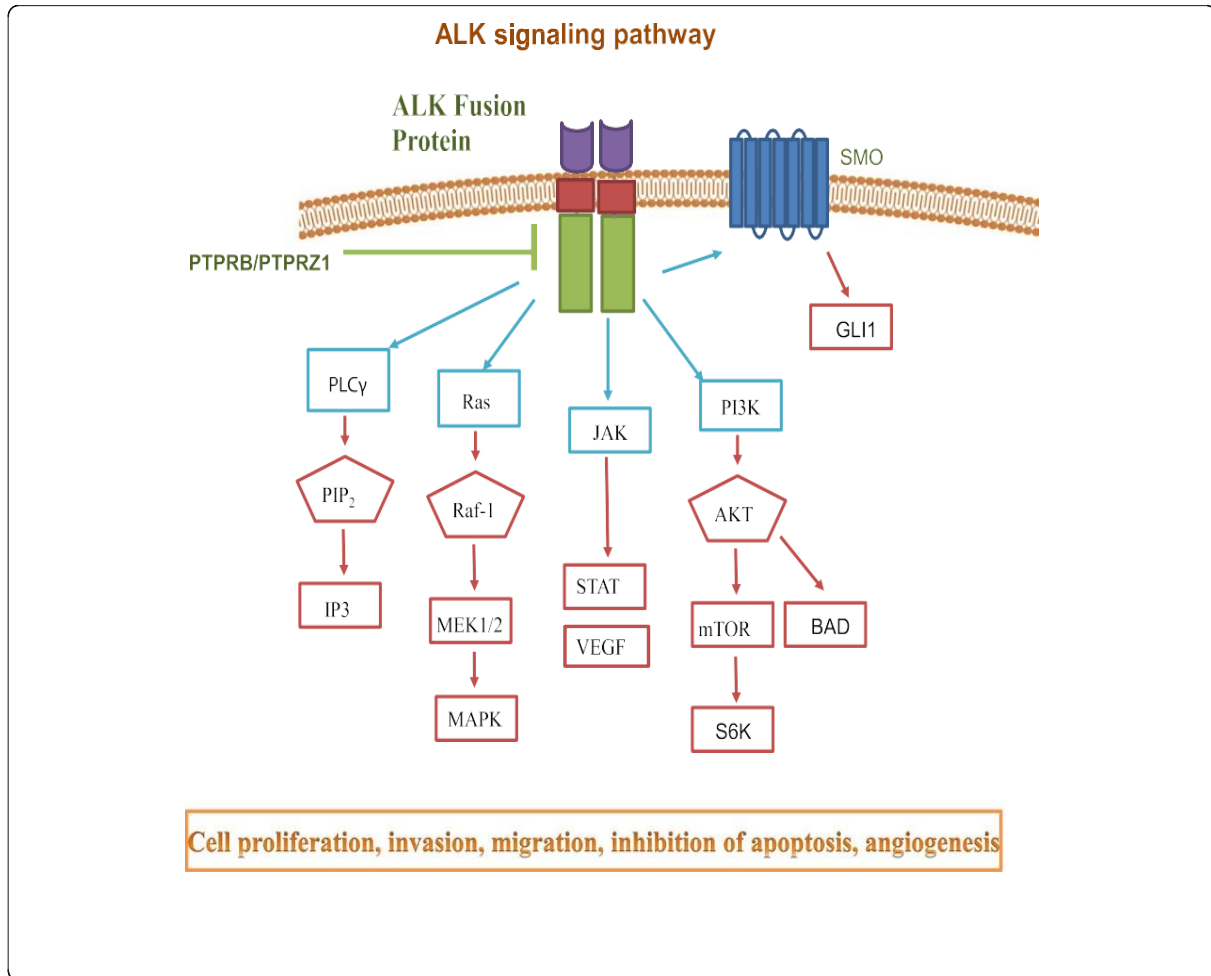
Εικόνα 2: Επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις που περιλαμβάνουν ALK σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων (68).

Παρά τη μεγάλη ποικιλία των πρωτεϊνών χιμαιρών της ALK που έχουν ανευρεθεί, υπάρχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά τους. Όταν προκύπτει συγχώνευση της ALK, έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής περιοχής της που έχει τη δράση πρωτεϊνικής κινάσης και οδηγεί τελικά προς την ογκογένεση. Το δεύτερο πεπτιδικό τμήμα της χίμαιρας, αποτελεί το C τελικό άκρο της πρωτεΐνης και ελέγχει τη βιολογική συμπεριφορά της, όπως την ενεργοποίηση και το επίπεδο έκφρασής της(61,62).

Αυτές οι πρωτεΐνες – χίμαιρες, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν απρόσφορα τα ενδοκυττάρια βιολογικά μονοπάτια που συνδέονται με τον υποδοχέα ALK- με το μονοπάτι του STAT3 να διαδραματίζει προεξέχοντα ρόλο - χωρίς να είναι απαραίτητη η σύνδεση του προσδέτη, προωθώντας έτσι την πορεία προς την καρκινογένεση(63,66). Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα στόχοι επαναπρογραμματίζονται ώστε να αποκτήσουν χαρακτηριστικές ιδιότητες κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων, όπως η αέναη και διεισδυτική κυτταρική ανάπτυξη – εν μέρη μέσω γενετικής αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και μέσω απόκτησης χαρακτηριστικών βλαστοκυττάρων – η αποφυγή της ανοσιακής απόκρισης, η προσαρμογή στην υποξία και η δυσλειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA(66).

Όσον αφορά στην ενίσχυση του γενετικού τύπου της ALK, αυτή οδηγεί μοιραία στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης ALK και έχει ανευρεθεί σε διάφορα είδη καρκινωμάτων όπως το μελάνωμα, το NSCLC, το γλοιβλάστωμα, το νευροβλάστωμα, το ραβδομυοσάρκωμα, το αστροκύττωμα, το καρκίνωμα της ωοθήκης και του μαστού, το καρκίνωμα του Ewing, καθώς και στο ρετινοβλάστωμα. Ανεξάρτητα από την ενίσχυση του γονιδίου, υπερέκφραση της ALK έχει ευρέως παρατηρηθεί σχεδόν στο 100% των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων και σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις νευροβλαστώματος(62).

Τέλος, οι μεταλλάξεις της ALK ανευρίσκονται στο 7% των σποραδικών νευροβλαστωμάτων και στο 50% των οικογενών. Οι περισσότερες από αυτές που έχουν περιγραφεί, επισυμβαίνουν στη πρωτεϊνική περιοχή με τη δράση κινάσης και δρουν ογκογενετικά τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Σημειακές μεταλλάξεις της ALK έχουν ανευρεθεί εκτός από το νευροβλάστωμα, στο NSCLC και στο αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς(62).



Εικόνα 3: Σηματοδοτικό μονοπάτι του ALK. Ο ALK ενεργοποιεί πολλαπλά βιολογικά μονοπάτια, περιλαμβανομένων της Φωσφολιπάσης C γ, της κινάσης JAK/STAT, του PI3K-AKT, mTOR, των SMO και GLI, και της MAPK, τα οποία επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό μετασχηματισμό και τα αντι-αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Η αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα από τις πρωτεϊνικές τυροσινικές από-φωσφατάσες των συμπλεγμάτων B και Z, οδηγούν στην απενεργοποίησή του(40).

Δεδομένης της κρίσιμης ογκογονικής ενεργοποίησης της δραστηριότητας κινάσης του υποδοχέα ALK από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις και μετατοπίσεις, προτάθηκε η αναστολή της για την καταπολέμηση διαφόρων τύπων καρκινωμάτων. Έτσι, αναπτύχθηκαν διάφοροι αναστολείς της δράσης της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα ALK, κάποιιοι από τους οποίους μάλιστα έχουν εγκριθεί από τον FDA για την καταπολέμηση ορισμένων τύπων καρκινωμάτων (ceritinib, crizotinib, alectinib, και brigatinib) με την εμφάνιση ανοχής στους αναστολείς αυτούς να αποτελεί ακόμη ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα για τους ερευνητές(60,63).

Έκφραση ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου

Αν και όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ALK εμπλέκεται στις βιολογικές διεργασίες πολλών τύπων καρκινωμάτων, ο ρόλος του στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου (HNSCC) δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, λόγω αφενός της μειωμένης του έκφρασης και αφετέρου της σπάνιας εμφάνισης μεταλλάξεων και χιμαιρισμού του σε πρώιμους κακοήθεις όγκους κεφαλής και τραχήλου εκ πλακωδών κυττάρων(69). Πάντως, μελέτες σε HNSCC έχουν δείξει ότι ο ALK υπερεκφράζεται σε προχωρημένη νόσο σε σχέση με πρώιμους όγκους, καθώς και ότι η «χειραγώγηση» του ALK από αυτά τα καρκινώματα ρυθμίζει τη διεισδυτικότητα των κακοήθων κυττάρων και το μεταστατικό τους δυναμικό(69).

Επιπροσθέτως, μελέτες σε πλακώδη καρκινώματα στοματικής κοιλότητας τελικού σταδίου έχουν δείξει ότι η έκφραση του ALK είναι επιγενετικά απορρυθμισμένη και ότι πιθανά ενέχεται στη διεισδυτικότητα της συγκεκριμένης κακοήθους νόσου(63). Μάλιστα, σε πλακώδη καρκινώματα στοματικής κοιλότητας (OSCC) έχει παρατηρηθεί επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου του ALK μέσω μεθυλίωσης αλληλουχιών CpG του DNA του εκκινητή. Ο ρόλος βέβαια αυτού του γενετικού μηχανισμού στη βιολογική συμπεριφορά του πλακώδους καρκινώματος στόματος διαφεύγει μέχρι στιγμής. Πάντως, σε μια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η μεθυλίωση του εκκινητή της ALK λάμβανε χώρα κατά προτίμηση σε εκείνα τα στοματικά καρκινώματα, τα οποία ήταν αρνητικά για μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες, ενώ αντίθετα μικρότερα επίπεδα μεθυλίωσης ανευρέθηκαν σε μεταστατικούς όγκους(70,71).

Προς την ίδια κατεύθυνση κρίνονται και τα ευρήματα μιας άλλης ερευνητικής ομάδας, η οποία έδειξε σε μοριακό επίπεδο ότι η υπερέκφραση του micro-RNA 1271 (miR-1271) καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ικανότητα δημιουργίας αποικιών, τη μετανάστευση και την ικανότητα διείσδυσης των νεοπλασματικών κακοήθων κυττάρων του OSCC, ενώ ταυτόχρονα ο ALK αναγνωρίστηκε ως μοριακός «στόχος» του miR-1271 με τα επίπεδα του υποδοχέα στα καρκινώματα αυτά να σχετίζονται αντιστρόφως με τα επίπεδα του miR-1271(72).

Τέλος, μελέτες σε κύτταρα πλακώδους καρκινώματος κεφαλής - τραχήλου που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα EGFR, εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης του ALK σε επίπεδο RNA ύστερα από θεραπεία με αναστολείς του EGFR, αποκαλύπτοντας έτσι έναν

πιθανό μηχανισμό ανάπτυξης ανοχής στη θεραπεία με αναστολείς EGFR, δεδομένης μιας αντισταθμιστικής αλληλεπικοινωνίας μεταξύ των κινασών. Στην ίδια μελέτη, προτάθηκε ακόμη η πιθανή δράση του EGFR ως συμμεταγραφικός παράγοντας του ALK ύστερα από τη μετατόπισή του στο πυρήνα των νεοπλασματικών κυττάρων, μια υπόθεση που χρήζει περαιτέρω μελέτης(69).

Σχετικά με την έκφραση του ALK στα σαρκωματοειδή (ή ατρακτοκυτταρικά) πλακώδη καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα μελετών στη βιβλιογραφία. Τα σαρκωματοειδή καρκινώματα αποτελούν μια παραλλαγή των τυπικών καρκινωμάτων από πλακώδη κύτταρα που εμφανίζουν ταυτόχρονα ιστολογικούς χαρακτήρες σαρκωματούδους (μεσεγχυματικής) προέλευσης με συχνότερες εντοπίσεις στη κεφαλή, στο λάρυγγα και στον υποφάρυγγα με δυσμενή πρόγνωση. Σε μια μικρή σειρά δέκα ασθενών με τη συγκεκριμένη κακοήθεια, ο *Kim και συνεργάτες* ανέφεραν τον εντοπισμό γονιδιακής αναδιάταξης του ALK στο 20% των περιπτώσεων(73).

Αντίθετα, ο *Perrone και συνεργάτες* σε παρόμοιες μελέτες σε 23 ασθενείς με πρωτογενή σαρκωματοειδή καρκινώματα κεφαλής – τραχήλου, εκ των οποίων τα 9 αφορούσαν το λάρυγγα δεν εντόπισε σε καμία από τις περιπτώσεις κάποια γονιδιακή αναδιάταξη του ALK. Μάλιστα, αν και 4 από τις 23 περιπτώσεις εμφάνιζαν πρότυπο συμβατό με γονιδιακή ενίσχυση του ALK, εντούτοις μόνο σε μία τελικά περίπτωση εντοπίστηκε έκφραση του ALK με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Τα ευρήματα αυτά εναρμονίζονται πλήρως με ευρήματα προηγούμενων μελετών σε ατρακτοκυτταρικά πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα(74).

[Έκφραση ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος](#)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τις δύο τελευταίες δεκαετίες η ανακάλυψη νέων γενετικών και κυτταρογενετικών ανωμαλιών του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ALK, τον έχουν εμπλέξει στις βιολογικές διεργασίες της καρκινογένεσης αρκετών κακοήθων νεοπλασμάτων. Όσον αφορά τα δερματικά κακοήθη νοσήματα, έχει βρεθεί ότι οι μεταλλάξεις του ALK διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στο πρωτογενές και στο δευτερογενές δερματικό συστηματικό αναπλαστικό λέμφωμα εκ μεγάλων κυττάρων (ALCL), στο μελάνωμα, στους σπιτσοειδείς όγκους, στο επιθηλιοειδές ινώδες ιστιοκύττωμα, στο καρκίνωμα Merkel και στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC)(65).

Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του ALK έχει εντοπιστεί σε 30 - 60% των περιστατικών συστηματικού ALCL, ενώ οι δερματικές του εκδηλώσεις εμφανίζονται σε δύο μορφές: ως δευτερογενείς εκδηλώσεις συστηματικής νόσου (20 - 30% των περιπτώσεων συστηματικού ALCL) ή ως πρωτογενές δερματικό λέμφωμα με εκδηλώσεις που περιορίζονται στο δέρμα(65). Στο δευτερογενές δερματικό ALCL, η θετική έκφραση του ALK έχει συσχετιστεί με προχωρημένη νόσο, ενώ στο 70 - 80% των περιπτώσεων υπεύθυνη βλάβη είναι ο χιμαιρισμός της ALK μέσω αυτόλογης μετατόπισης με το γονίδιο της νουκλεοφωσμίνης. Ακόμη, τα κύτταρα του λεμφώματος που είναι θετικά στον ALK, εκκρίνουν τη προφλεγμονώδη κυτοκίνη πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας ομάδας 1 (HMGB-1), η οποία πιστεύεται ότι προάγει τη δημιουργία «προμεταστατικής κόγχης» στο δέρμα. Ακόμη, η HMGB-1 προάγει με τη σειρά της την έκκριση της IL-8 και της MMP-9 από τα κερατινοκύτταρα, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη φλεγμονώδη αντίδραση της επιδερμίδας και τη διεισδυτικότητα των ALK θετικών κυττάρων λεμφώματος(65). Σε αντίθεση με το δευτερογενές, η έκφραση της ALK στο πρωτογενές δερματικό ALCL είναι συνήθως αρνητική. Σε εκείνες τις ελάχιστες περιπτώσεις που ανευρίσκεται έκφραση του υποδοχέα ALK, αυτή είναι υπέρ της τελικής εξέλιξης προς συστηματική νόσο, με εξαίρεση τους παιδιατρικούς ασθενείς(65).

Επίσης, υπερέκφραση του ALK έχει ανευρεθεί σε κακοήθη κύτταρα βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Η έκφραση του υποδοχέα αυτού ήταν μάλιστα έως και 250 φορές μεγαλύτερη σε εντοπισμένη νόσο και έως και 1000 φορές μεγαλύτερη σε διεισδυτική νόσο, σε σχέση με εκείνη των φυσιολογικών κερατινοκυττάρων, η οποία και συσχετίστηκε με το υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του καρκινώματος(75). Τέλος, η χορήγηση κριζοτινίμπης (crizotinib) in vitro σε BCCs, ανέστειλε μερικώς τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, καθιστώντας τον υποδοχέα ALK έναν δυνητικό στόχο της αντικαρκινικής θεραπείας στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα(65).

Γενετικές μετατοπίσεις του γονιδίου της ALK, καθώς και παρανοηματικές μεταλλάξεις έχουν ανευρεθεί σε περιπτώσεις μελανώματος των άκρων (acral melanoma) και κυρίως οζώδους μελανώματος αντίστοιχα. Προσφάτως ανευρέθηκε μια ισομορφή του υποδοχέα ALK σε μια υποκατηγορία πρωτοπαθών και μεταστατικών μελανωμάτων, η οποία και ονομάστηκε ALK^{AT1}. Η ALK^{AT1} αποτελεί προϊόν de novo εναλλακτικού ματίσματος του ιντρονίου 19 του γονιδίου της ALK και οδηγεί στην αυξημένη έκφραση μέρους του

υποδοχέα ALK που αποτελείται μόνο από την ενδοκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η πρωτεϊνική περιοχή έχει την ικανότητα να διεγείρει τον ανεξάρτητο από παράγοντες ανάπτυξης κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* και την ογκογένεση *in vivo*, ευρήματα που υποστηρίζουν τον αναδυόμενο ρόλο του ALK στη παθογένεση του μελανώματος(65).

Υπερέκφραση του ALK έχει επίσης ανευρεθεί στα καρκινώματα από κύτταρα Merkel (MCC), ένα νευροενδοκρινικό καρκίνωμα δέρματος με επιθετική βιολογική συμπεριφορά που εμφανίζεται κυρίως σε μεγαλύτερες ηλικίες. Η υπερέκφραση αυτή έχει διαπιστωθεί σε μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων MCC, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο και επίπεδο mRNA(76), όσο και με τη χρήση μεθόδων ανοσοϊστοχημείας(77,78). Μάλιστα, οι συγγραφείς δε βρήκαν ενδείξεις χμαιορισμού του ALK ή ενίσχυσης του γονιδίου του, αυξάνοντας την πιθανότητα γενετικά ή επιγενετικά γεγονότα να έχουν οδηγήσει στην υπερέκφραση του ALK στα MCC(76).

Παρά ταύτα, μέχρι σήμερα, η μοριακή βάση της εξέλιξης του πλακώδους καρκινώματος του δέρματος (cSCC) δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Το cSCC είναι ένα από τα καρκινώματα με τους μεγαλύτερους ρυθμούς συσσώρευσης μεταλλάξεων, ενώ η απενεργοποίηση του TP53 στα κερατινοκύτταρα του δέρματος, αποτελεί γεγονός που επισυμβαίνει στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του cSCC και η οποία εντοπίζεται στο 90% των περιπτώσεων. Ακόμη, μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση του βιολογικού μονοπατιού RAS/RTK/PI3K έχουν εντοπιστεί στο 45% των περιπτώσεων cSCC και έχουν συσχετιστεί με χειρότερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, αν και παρόμοιες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί και σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα με βλάβες λόγω χρόνιας έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία(25).

Βιβλιογραφικά δεν κατέστη δυνατό να εντοπιστούν μελέτες της έκφρασης του υποδοχέα ALK στα cSCC. Ενδείξεις βέβαια της παραπάνω έκφρασης υπάρχουν, για παράδειγμα στη μελέτη των *Ning και συνεργατών*, όπου μελετήθηκε η έκφραση της ALK σε μια μικρή σειρά περιστατικών βασικοκυτταρικού καρκινώματος δέρματος (BCC). Στην εν λόγω μελέτη διαπιστώθηκε η έκφραση της ALK, τόσο σε δείγματα SCC, όσο και σε δείγματα BCC, με την έκφραση στα BCC να διαπιστώνεται στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη(75).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για τη συλλογή των προς μελέτη ιστολογικών υλικών πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στα ηλεκτρονικά αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα κριτήρια αναζήτησης περιλάμβαναν τα ιστολογικά δείγματα λάρυγγα και δέρματος (βιοψίες και εκτομές) ασθενών όλων των ηλικιακών ομάδων που διαγνώσθηκαν το χρονικό διάστημα 2014 - 2016. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν εκείνες οι περιπτώσεις, οι οποίες είχαν διαγνωσθεί ως πλακώδες καρκίνωμα της στοματοφαρυγγολαρυγγικής χώρας και πλακώδες καρκίνωμα δέρματος.

Η επιλογή έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκές υλικό, ώστε να πραγματοποιηθεί η ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Συνολικά, από τη βάση δεδομένων αξιοποιήθηκαν 50 περιπτώσεις, εκ των οποίων 25 περιπτώσεις αφορούσαν σε cSCC και 25 σε HNSCC.

Από τους εγκλεισμένους σε κύβους παραφίνης ιστούς παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές πάχους 4 μm με τη χρήση περιστροφικού μικροτόμου, οι οποίες προωθήθηκαν προς ανοσοϊστοχημική μελέτη.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση των δειγμάτων για τα αντισώματα EGFR και ALK πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αυτόματο σύστημα ανοσοϊστοχημικής χρώσης I-6000 Biogenex (San Ramon, CA, USA).

Τα έτοιμα προς χρήση πρωτοταγή μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Anti-EGFR, clone 31G7 – Zymed, η προμήθεια του οποίου έγινε από την InVitrogen, San Francisco, CA, USA
- Anti-ALK (CD246), clone ALK-1, η προμήθεια του οποίου έγινε από την Dako, Glostrup, Denmark

Υπό μελέτη πληθυσμός

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 25 περιπτώσεις με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πρωτογενές πλακώδες καρκίνωμα της στοματοφαρυγγολαρυγγικής χώρας (HNSCC) και 25 περιπτώσεις με ιστολογικά επιβεβαιωμένο πρωτογενές πλακώδες καρκίνωμα δέρματος (cSCC)

Όσον αφορά τις περιπτώσεις HNSCC, αυτές προέρχονταν από 21 άνδρες και 4 γυναίκες ασθενείς, όλοι με θετικό ιστορικό καπνίσματος και χωρίς θετικό HPV DNA test ή αρνητικό ιστορικό HPV εμμένουσας λοίμωξης. Όσον αφορά τις περιπτώσεις cSCC, αυτές προέρχονταν από 17 άνδρες και 8 γυναίκες ασθενείς, ενώ τα καρκινώματα εντοπίζονταν στη περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου.

Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής χρώσης EGFR και ALK

Η αποπαραφίνωση των ιστολογικών τομών πραγματοποιήθηκε επωάζοντάς τες στους 60°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια εμβαπτίζοντάς τες δις σε ξυλόλη για 10 λεπτά την κάθε φορά. Η ενυδάτωση των τομών πραγματοποιήθηκε με εμβάπτισή τους διαδοχικά σε:

- Κρύα ξυλόλη για 2 λεπτά
- Διάλυμα αλκοόλης 100% και ξυλόλης, σε αναλογία 1:1, για 2 λεπτά
- 100% αλκοόλη για 1 λεπτό
- 96% αλκοόλη για 1 λεπτό

Μετά την ενυδάτωσή τους, οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (TBST wash buffer solution, code S3006, Dako). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάκτηση των αντιγονικών επιτόπων με τη χρήση του πρωτεολυτικού ενζύμου πεψίνη (Pepsin, Code S3002, DAKO), για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C, σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής χρώσης EnVisionTM+, Dako που περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Πραγματοποιήθηκε αποκλεισμός των ενδογενών υπεροξειδασών μέσω εμβάπτισης των δειγμάτων στο παρεχόμενο διάλυμα του ανιχνευτικού συστήματος ανοσοχρώσης EnVisionTM+, Dako, για 5 λεπτά.
- Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά με κάθε ένα από τα πρωτογενή αντισώματα στους 25°C και εν συνεχεία για άλλα 10 λεπτά με το δευτερογενές σημασμένο με υπεροξειδάση πολυμερές (Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-rabbit immunoglobulins, code K4002, Dako).
- Μετά από διαδοχικά ξεπλύματα, ακολούθησε εφαρμογή του χρωμογόνου DAB 0,03% που περιείχε 0,1% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 5 λεπτά.
- Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη 10%, ακολούθησε αφυδάτωση (εμβάπτιση σε ανιόντα διαλύματα αλκοόλης 95%, 95%, 100% και 100%) και κατόπιν κάλυψη των αντικειμενοφόρων πλακών με καλυπτρίδες.

Οι ανοσοχρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:100 και για τα δύο αντισώματα. Στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και σε κάθε running, χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Ως θετικοί μάρτυρες για την εκτίμηση των ανοσοχρώσεων χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές δύο περιστατικών αδενοκαρκινώματος πνεύμονα με θετική ανοσοχρώση για τις δύο πρωτεΐνες, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές δέρματος χωρίς αλλοιώσεις.

Όσον αφορά στην ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του EGFR, θεωρήθηκαν αποδεκτά μεμβρανικά και υπομεμβρανικά πρότυπα ανοσοχρώσης, ενώ όσον αφορά στην ανοσοχρώση έναντι του ALK, ελήφθησαν υπόψη κυτταροπλασματικά και περιπυρηνικά πρότυπα ανοσοχρώσης.

Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Πυκνομετρικής Ανάλυσης Ψηφιακής εικόνας (Digital Image Analysis ή DIA). Η ψηφιοποίηση των εικόνων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ημιαυτόματο τρόπο χρησιμοποιώντας το εξής υλικό: ηλεκτρονικός υπολογιστής desktop Intel Pentium IV, MATROX II Card Frame Grabber, Digital Camera Sony, Tokyo, Japan και διοφθάλμιο μικροσκόπιο παρατήρησης CX-31, Olympus, Melville, NY, USA. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε τα εξής: Windows XP, NIS – Elements Software AR v3.0, Nikon Corp., Tokyo, Japan. Οι περιοχές ενδιαφέροντος σε κάθε δείγμα εντοπίστηκαν (πέντε οπτικά πεδία ανά περιστατικό και σε μεγέθυνση 400x) και αποθηκεύτηκαν σε μια ψηφιακή βάση δεδομένων. Οι μετρήσεις της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας τον εξής αλγόριθμο: Η ένταση της ανοσοχρώσης δειγμάτων φυσιολογικού ιστού (μαρτύρων) μετρήθηκε ξεχωριστά και συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες τιμές έντασης των ιστικών δειγμάτων των καρκινωμάτων. Η ερμηνεία της έντασης της ανοσοχρώσης λάμβανε τιμές από 0 έως και 255 (κλίμακα του γκριζου στο πρότυπο RGB) και χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης των δύο υποδοχέων, EGFR και ALK. Μειούμενες προς το μηδέν τιμές έντασης ανοσοχρώσης, αντιπροσωπεύουν υπερέκφραση του δείκτη, ενώ αυξανόμενες τιμές που τείνουν προς το 255 αντιπροσωπεύουν την απώλεια έντασης ανοσοχρώσης.

Σε κάθε δείγμα, αξιολογήθηκαν η ένταση της ανοσοχρώσης ως: **0** = αρνητική ανοσοχρώση ή μεμβρανική/κυτταροπλασματική ανοσοχρώση σε <10% των κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων, **1+** = ασθενής μεμβρανική/κυτταροπλασματική ανοσοχρώση σε >10% των κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων, **2+** = ασθενής προς μέτρια πλήρης μεμβρανική/κυτταροπλασματική ανοσοχρώση σε >10% των κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων και **3+** = έντονη και πλήρης μεμβρανική/κυτταροπλασματική χρωστική αντίδραση σε >10% των κακοήθων νεοπλασματικών κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση, η εκτίμηση των ανοσοχρώσεων πραγματοποιήθηκε σε καλά διατηρημένο ιστό, χωρίς artifacts ή νέκρωση.

Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το διαδεδομένο στατιστικό λογισμικό SPSS έκδοση 20 (IBM SPSS version 20, Armonk, NY, USA), όπως αυτό διατίθεται από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Υπολογίστηκαν τα περιγραφικά στατιστικά των ανοσοϊστοχημικών σκορ των ιστολογικών δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία χ^2 του Pearson (ή δοκιμασία της ανεξαρτησίας), εξετάστηκε η πιθανή σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών EGFR και ALK με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Για όλες τις παραπάνω αναλύσεις, ως όριο στατιστικής σημαντικότητας επιλέχθηκε το $p < .05$ (two - tailed).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που συλλέχθηκαν κατά την αξιολόγηση των ανοσοχρώσεων, διερευνήθηκε η πιθανή σχέση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στα ιστολογικά δείγματα καρκινωμάτων για κάθε μια από τις δύο πρωτεΐνες EGFR και ALK, με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως το φύλλο, το στάδιο της νόσου του ασθενούς και της ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος.

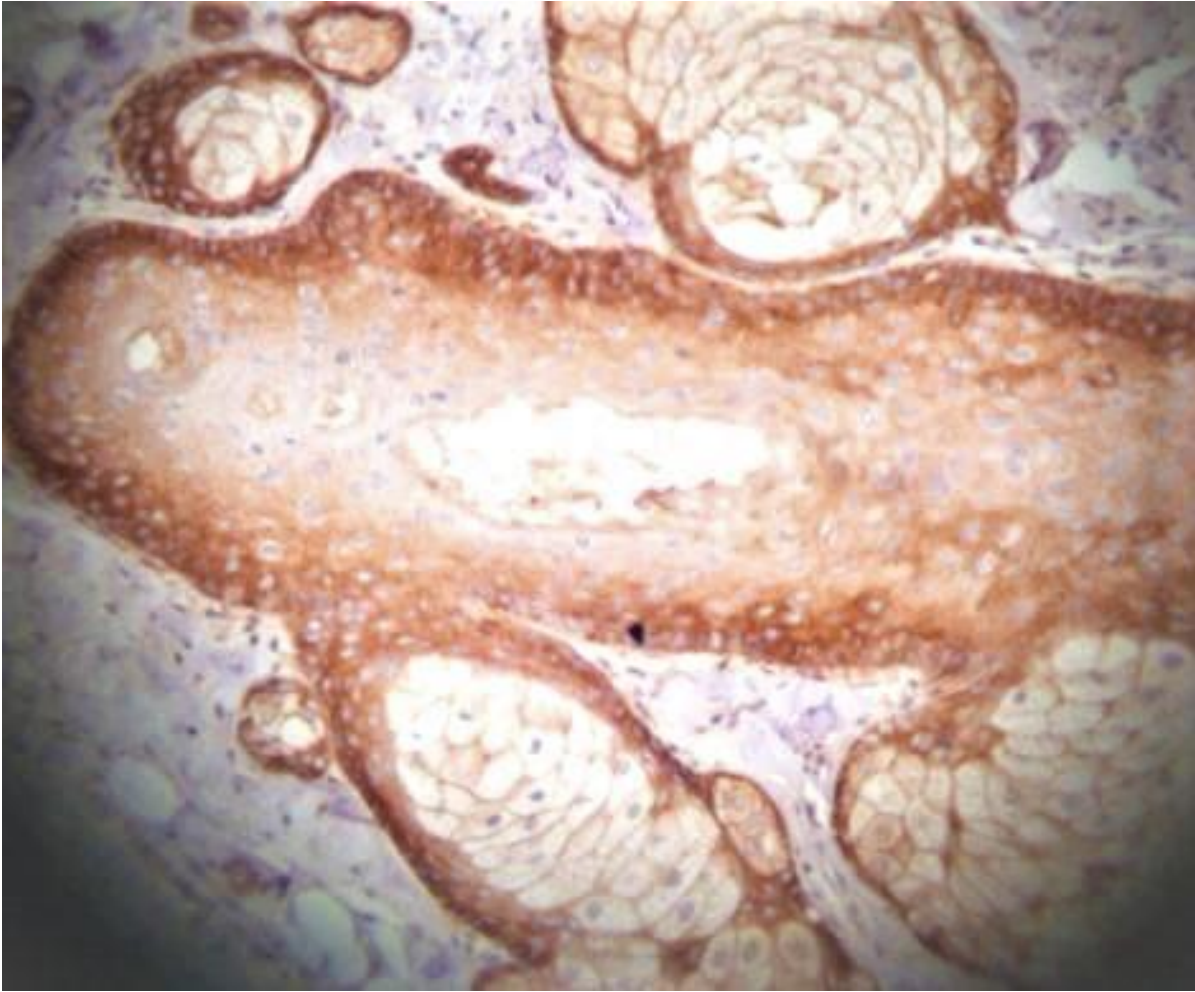
Στον πίνακα 6 που ακολουθεί φαίνονται τα πρωτογενή δεδομένα μετά τη βαθμονόμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, ενώ στις εικόνες 4 και 5 διακρίνονται δύο χαρακτηριστικά ιστολογικά δείγματα cSCC, στα οποία παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημικά υπερέκφραση της EGFR και της ALK αντίστοιχα.

A/A	ID	ΤΥΠΟΣ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	GRADE	pT-STAGE	max ΔΙΑΜ	EGFR	ALK	EGFR	ALK
1	NV*	SCC	ΠΡΟΣΩΠΟ	M	69	2	2	1	1	2	139,67	127,51
2	NV*	SCC	ΚΡΟΤΑΦΟΣ	M	82	2	3	1,5	2	1	131,34	141,56
3	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	79	3	2	1	1	1	167,41	147,26
4	NV*	SCC	ΠΑΡΕΙΑ	F	81	1	2	1,5	2	1	129,58	159,03
5	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	68	1	2	4,5	3	0	110,98	171,23
6	NV*	SCC	ΠΑΡΕΙΑ	F	74	1	2	1	1	0	132,56	183,44
7	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	85	1	2	5	2	1	129,87	144,16
8	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	87	1	1	2,5	3	2	121,06	127,59
9	NV*	SCC	ΚΡΟΤΑΦΟΣ	M	89	3	1	2	1	1	144,29	159,21
10	NV*	SCC	ΚΡΟΤΑΦΟΣ	M	77	2	1	6	3	0	98,91	198,99
11	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	95	2	1	3,5	1	2	128,73	134,77
12	NV*	SCC	ΚΡΟΤΑΦΟΣ	M	77	2	1	1,2	2	2	129,1	178,88
13	NV*	SCC	ΠΡΟΣΩΠΟ	M	74	2	1	1	1	0	127,41	167,75
14	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	90	2	1	4	3	0	109,43	126,88
15	NV*	SCC	ΡΙΝΑ	F	71	1	2	1,1	2	1	126,34	138,06
16	NV*	SCC	ΤΡΑΧΗΛΟΣ	F	90	1	1	1	3	0	100,35	191,11
17	NV*	SCC	ΡΙΝΑ	M	58	1	1	3	3	1	116,1	156,66
18	NV*	SCC	ΜΕΤΩΠΟ	M	64	2	2	0,5	3	1	121,66	140,32
19	NV*	SCC	ΡΙΝΑ	F	86	3	3	2,5	3	0	103,67	174,98
20	NV*	SCC	ΠΡΟΣΩΠΟ	F	71	3	1	0,5	3	0	111,67	161,54
21	NV*	SCC	ΠΑΡΕΙΑ	F	91	1	1	2	2	1	121,38	149,13
22	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	85	2	1	2	3	0	118,89	160,81
23	NV*	SCC	ΚΕΦΑΛΗ	M	84	2	1	2	3	0	97,67	182,35
24	NV*	SCC	ΡΙΝΑ	F	86	1	1	2	3	0	116,56	169,03
25	NV*	SCC	ΠΩΓΩΝΑΣ	M	78	1	1	3	3	1	97,09	147,11

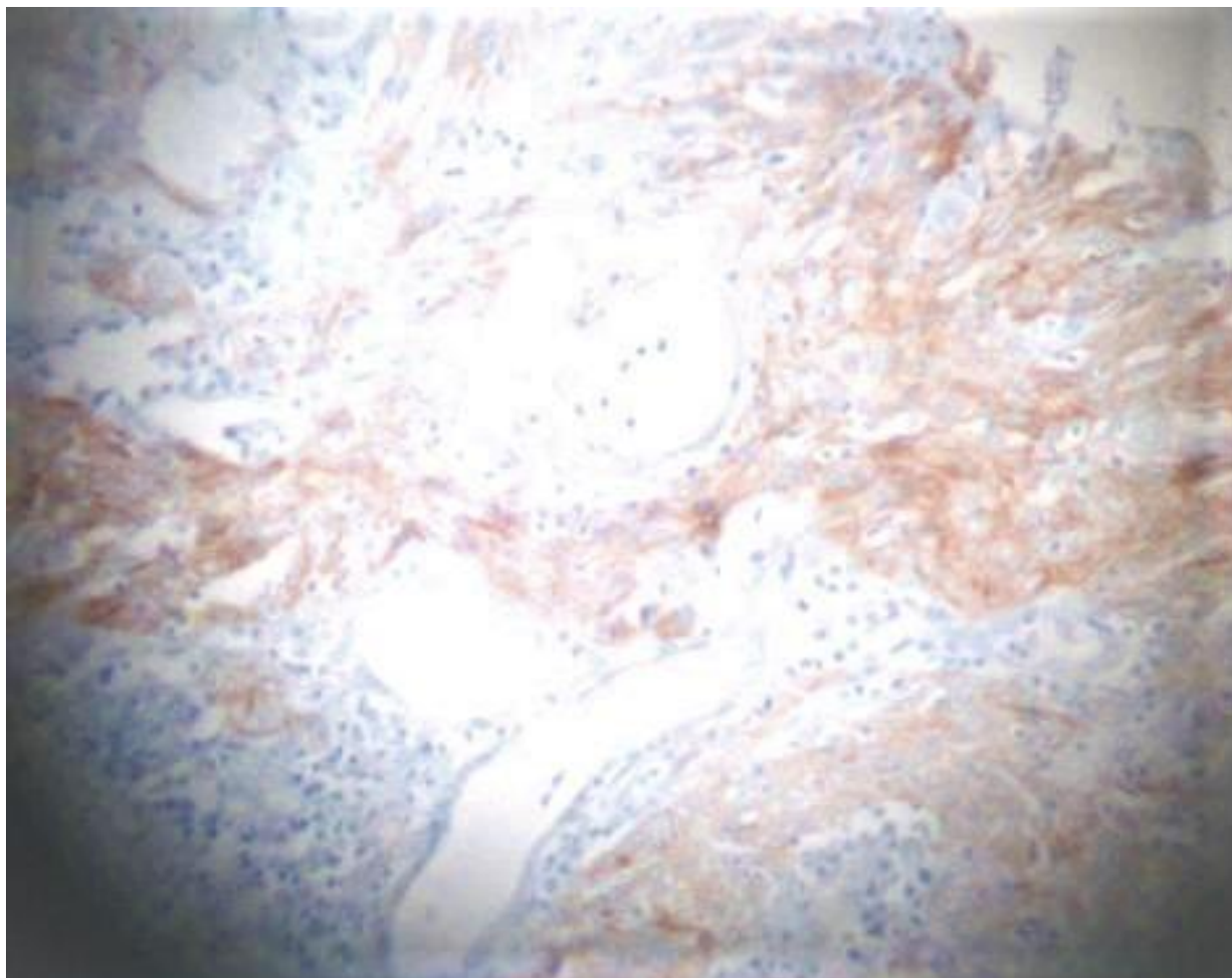
Πίνακας 6: Πρωτογενή δεδομένα βαθμονόμησης της ανοσοχρώσης έναντι EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος

NV: Non visualized μη εμφανιζόμενο λόγω GDPR 2016EU, SCC: Squamous Cell Carcinoma*

Συνολικά, υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFR (2+ και 3+) διαπιστώθηκε σε 19/25 (76%) των ιστολογικών δειγμάτων, ενώ στα υπόλοιπα 6/25 (24%) η ανοσοχρώση αξιολογήθηκε ως αρνητική (0 και 1+). Αντίστοιχα, για την πρωτεΐνη ALK, υπερέκφραση διαπιστώθηκε μόλις σε 4/25 (16%) από τα ιστολογικά δείγματα LSCC, ενώ η ανοσοχρώση ήταν αρνητική ή ασθενής σε 21/25, ή στο 84% των δειγμάτων.



Εικόνα 4: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος δέρματος. Παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFR



Εικόνα 5: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος δέρματος. Παρατηρείται μέτριας έντασης σήμα ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της πρωτεΐνης ALK

Φύλλο του ασθενούς

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 8 (32%) ιστολογικά δείγματα cSCC που προέρχονταν από γυναίκες και 17 (68%) από άνδρες. Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης EGFR σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς (Πίνακας 7), το στατιστικό τεστ χ^2 της ανεξαρτησίας απέτυχε να εντοπίσει κάποια σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών χ^2 (2, N=25) = 1.55, **p = .461** (Πίνακας 8).

			Φύλλο		
			Θήλυ	Άρρεν	Σύνολο
EGFR	1+	Πλήθος	1	5	6
		Αναμενόμενο πλήθος	1.9	4.1	6.0
	2+	Πλήθος	3	3	6
		Αναμενόμενο πλήθος	1.9	4.1	6.0
	3+	Πλήθος	4	9	13
		Αναμενόμενο πλήθος	4.2	8.8	13.0
Σύνολα	Πλήθος	8	17	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	8.0	17.0	25.0	

Πίνακας 7: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης του EGFR ανάλογα με το φύλλο του ασθενούς

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	1.551 ^a	2	.461
Likelihood Ratio	1.571	2	.456
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 8: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση του EGFR σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς

Ομοίως για την έκφραση της πρωτεΐνης ALK στα καρκινώματα του δέρματος (Πίνακας 9), το στατιστικό τεστ χ^2 της ανεξαρτησίας, απέτυχε να εντοπίσει κάποια σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών $\chi^2 (2, N=25) = 2.82, p = .245$ (Πίνακας 10).

			Φύλλο		
			Θήλυ	Άρρεν	Σύνολο
ALK	0	Πλήθος	5	6	11
		Αναμενόμενο πλήθος	3.5	7.5	11.0
	1+	Πλήθος	3	7	10
		Αναμενόμενο πλήθος	3.2	6.8	10.0
	2+	Πλήθος	0	4	4
		Αναμενόμενο πλήθος	1.3	2.7	4.0
Σύνολα	Πλήθος	8	17	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	8.0	17.0	25.0	

Πίνακας 9: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το φύλλο του ασθενούς

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.816 ^a	2	.245
Likelihood Ratio	3.968	2	.138
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 10: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς

Συνεπώς, η παραπάνω στατιστική ανάλυση οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση τόσο της EGFR, όσο και της ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος δεν εξαρτάται από το φύλλο του ασθενούς.

Εντόπιση του καρκινώματος

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή εξάρτηση του βαθμού της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των EGFR και ALK με την εντόπιση του καρκινώματος σε διάφορα σημεία της κεφαλής και του τραχήλου. Συνολικά, η ανοσοχρώση έναντι της EGFR σε 6 (24%) από τα δείγματα αξιολογήθηκε ως 1+, σε άλλα 6 ως 2+ και στα υπόλοιπα 13 (52%) ως 3+ (Πίνακας 11 & 12).

Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 , συμπεραίνουμε ότι δε μπορεί να αποκλειστεί η μηδενική υπόθεση, ότι δηλαδή η ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGFR είναι ανεξάρτητη της εντόπισης του πλακώδους καρκινώματος δέρματος στη κεφαλή και τον τράχηλο: $\chi^2(14, N=25) = 13.58, p = .481$ (Πίνακας 13).

		Τράχηλος	Παρειά	Πόγωνα	Πρόσωπο	Μέτωπο
EGFR 1+	Πλήθος	0	1	0	2	0
	Αναμενόμενο πλήθος	.2	.7	.2	.7	.2
2+	Πλήθος	0	2	0	0	0
	Αναμενόμενο πλήθος	.2	.7	.2	.7	.2
3+	Πλήθος	1	0	1	1	1
	Αναμενόμενο πλήθος	.5	1.6	.5	1.6	.5
Σύνολα	Πλήθος	1	3	1	3	1
	Αναμενόμενο πλήθος	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0

Πίνακας 11: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με την εντόπιση του καρκινώματος

		Τριχωτό κεφαλής	Ρίνα	Κρόταφος	Σύνολα
EGFR	1⁺ Πλήθος	2	0	1	6
	Αναμενόμενο πλήθος	1.9	1.0	1.0	6.0
	2⁺ Πλήθος	1	1	2	6
	Αναμενόμενο πλήθος	1.9	1.0	1.0	6.0
	3⁺ Πλήθος	5	3	1	13
	Αναμενόμενο πλήθος	4.2	2.1	2.1	13.0
Σύνολα	Πλήθος	8	4	4	25
	Αναμενόμενο πλήθος	8.0	4.0	4.0	25.0

Πίνακας 12: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με την εντόπιση του καρκινώματος

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	13.582 ^a	14	.481
Likelihood Ratio	16.394	14	.290
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 13: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με την εντόπιση του καρκινώματος στην κεφαλή και στον τράχηλο

Παρόμοια στατιστική ανάλυση των δεδομένων και για τον υποδοχέα ALK - όπου σε 10 (40%) από τα δείγματα η ανοσοχρώση αξιολογήθηκε ως 1+, ως 2+ σε 4 (16%) και στα υπόλοιπα 11 (44%) ήταν αρνητική (Πίνακας 14 & 15) - απέτυχε να εντοπίσει στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ της εντόπισης του καρκινώματος και την έκφραση του υποδοχέα όπως αυτή αποτυπώθηκε στην ανοσοϊστοχημική χρώση: χ^2 (14, N=25) = 9.8, **p = .777** (Πίνακας 16).

		Τράχηλος	Παρειά	Πώγωνας	Πρόσωπο	Μέτωπο
ALK 0	Πλήθος	1	1	0	2	0
	Αναμενόμενο πλήθος	.4	1.3	.4	1.3	.4
1+	Πλήθος	0	2	1	0	1
	Αναμενόμενο πλήθος	.4	1.2	.4	1.2	.4
2+	Πλήθος	0	0	0	1	0
	Αναμενόμενο πλήθος	.2	.5	.2	.5	.2
Σύνολα	Πλήθος	1	3	1	3	1
	Αναμενόμενο πλήθος	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0

Πίνακας 14: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με την εντόπιση του καρκινώματος

		Τριχωτό κεφαλής	Ρίνα	Κρόταφος	Σύνολα
ALK 0	Πλήθος	4	2	1	11
	Αναμενόμενο πλήθος	3.5	1.8	1.8	11.0
1+	Πλήθος	2	2	2	10
	Αναμενόμενο πλήθος	3.2	1.6	1.6	10.0
2+	Πλήθος	2	0	1	4
	Αναμενόμενο πλήθος	1.3	.6	.6	4.0
Σύνολα	Πλήθος	8	4	4	25
	Αναμενόμενο πλήθος	8.0	4.0	4.0	25.0

Πίνακας 15: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με την εντόπιση του καρκινώματος

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	9.801 ^a	14	.777
Likelihood Ratio	12.911	14	.534
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 16: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με την εντόπιση του καρκινώματος στην κεφαλή και στον τράχηλο

Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης

Στη συνέχεια ελέγχθηκε, εάν η έκφραση των δύο εν λόγω υποδοχέων εξαρτάται από το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος. Συνολικά, το δείγμα πλακωδών καρκινωμάτων δέρματος της παρούσας μελέτης περιλάμβανε 11 (44%) καρκινώματα Grade 1, 10 (40%) Grade 2 και μόνο 4 (16%) με βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης Grade 3 (Πίνακας 17 & 19). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν εντόπισε κάποια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των δύο παραπάνω μεταβλητών, τόσο για την πρωτεΐνη EGFR: $\chi^2 (4, N=25) = 4,05$ $p = .4$ (Πίνακας 18), όσο και για την ALK: $\chi^2 (4, N=25) = 4,14$ $p = .388$ (Πίνακας 20)

		Grade			Σύνολο	
		1	2	3		
EGFR	1+	Πλήθος	1	3	2	6
		Αναμενόμενο πλήθος	2.6	2.4	1.0	6.0
	2+	Πλήθος	4	2	0	6
		Αναμενόμενο πλήθος	2.6	2.4	1.0	6.0
	3+	Πλήθος	6	5	2	13
		Αναμενόμενο πλήθος	5.7	5.2	2.1	13.0
Σύνολα	Πλήθος	11	10	4	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	11.0	10.0	4.0	25.0	

Πίνακας 17: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	4.047 ^a	4	.400
Likelihood Ratio	4.952	4	.292
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 18: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

			Grade			
			1	2	3	Σύνολο
ALK	0 ⁺	Πλήθος	4	5	2	11
		Αναμενόμενο πλήθος	4.8	4.4	1.8	11.0
	1 ⁺	Πλήθος	6	2	2	10
		Αναμενόμενο πλήθος	4.4	4.0	1.6	10.0
	2 ⁺	Πλήθος	1	3	0	4
		Αναμενόμενο πλήθος	1.8	1.6	.6	4.0
Σύνολα		Πλήθος	11	10	4	25
		Αναμενόμενο πλήθος	11.0	10.0	4.0	25.0

Πίνακας 19: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	4.135 ^a	4	.388
Likelihood Ratio	4.748	4	.314
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 20: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

Στάδιο της νόσου

Εν συνεχεία, στη παρούσα μελέτη ελέγχθηκε εάν η έκφραση των υποδοχέων EGFR και ALK εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Συνολικά, το δείγμα πλακωδών καρκινωμάτων δέρματος της παρούσας μελέτης προέρχονταν από 15 (60%) ασθενείς με νόσο σταδίου 1, 8 (32%) ασθενείς σταδίου 2 και 2 (8%) ασθενείς με νόσο σταδίου 3 (Πίνακας 21 & 23). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν εντόπισε κάποια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των δύο παραπάνω μεταβλητών, τόσο για την πρωτεΐνη EGFR: χ^2 (4, N=25) = 4,81 $p = .307$ (Πίνακας 22), όσο και για την ALK: χ^2 (4, N=25) = 3,23 $p = .52$ (Πίνακας 24).

			Στάδιο ασθενούς			
			1	2	3	Σύνολο
EGFR	1+	Πλήθος	3	3	0	6
		Αναμενόμενο πλήθος	3.6	1.9	.5	6.0
	2+	Πλήθος	2	3	1	6
		Αναμενόμενο πλήθος	3.6	1.9	.5	6.0
	3+	Πλήθος	10	2	1	13
		Αναμενόμενο πλήθος	7.8	4.2	1.0	13.0
Σύνολα	Πλήθος	15	8	2	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	15.0	8.0	2.0	25.0	

Πίνακας 21: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με το στάδιο του ασθενούς

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.813 ^a	4	.307
Likelihood Ratio	5.340	4	.254
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 22: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με το στάδιο του ασθενούς

			Στάδιο ασθενούς			
			1	2	3	Σύνολο
ALK	0	Πλήθος	8	2	1	11
		Αναμενόμενο πλήθος	6.6	3.5	.9	11.0
	1+	Πλήθος	4	5	1	10
		Αναμενόμενο πλήθος	6.0	3.2	.8	10.0
	2+	Πλήθος	3	1	0	4
		Αναμενόμενο πλήθος	2.4	1.3	.3	4.0
Σύνολα	Πλήθος	15	8	2	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	15.0	8.0	2.0	25.0	

Πίνακας 23: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το στάδιο του καρκινώματος

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.230 ^a	4	.520
Likelihood Ratio	3.583	4	.465
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 24: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το στάδιο του ασθενούς

2. Συνδυασμένη ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος

Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε στα ιστολογικά δείγματα καρκινωμάτων δέρματος του πλακώδους επιθηλίου ήταν η συνδυασμένη, ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK, κατά πόσο δηλαδή η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ALK εξαρτάται από την αντίστοιχη της EGFR.

Αναλύοντας στατιστικά τα δεδομένα (Πίνακας 25) και χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 , παρατηρήθηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα EGFR και του υποδοχέα ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος χ^2 (4, N=25) = 10.18, $p = .038$ (Πίνακας 26).

		ALK			Σύνολο	
		0	1+	2+		
EGFR	1+	Πλήθος	2	2	2	6
		Αναμενόμενο πλήθος	2.6	2.4	1.0	6.0
	2+	Πλήθος	0	5	1	6
		Αναμενόμενο πλήθος	2.6	2.4	1.0	6.0
	3+	Πλήθος	9	3	1	13
		Αναμενόμενο πλήθος	5.7	5.2	2.1	13.0
Σύνολο	Πλήθος	11	10	4	25	
	Αναμενόμενο πλήθος	11.0	10.0	4.0	25.0	

Πίνακας 25: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το επίπεδο της έκφρασης της EGFR

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	10.179 ^a	4	.038
Likelihood Ratio	11.911	4	.018
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 26: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με την έκφραση του EGFR στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος κεφαλής/τραχήλου

3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου (HNSCC)

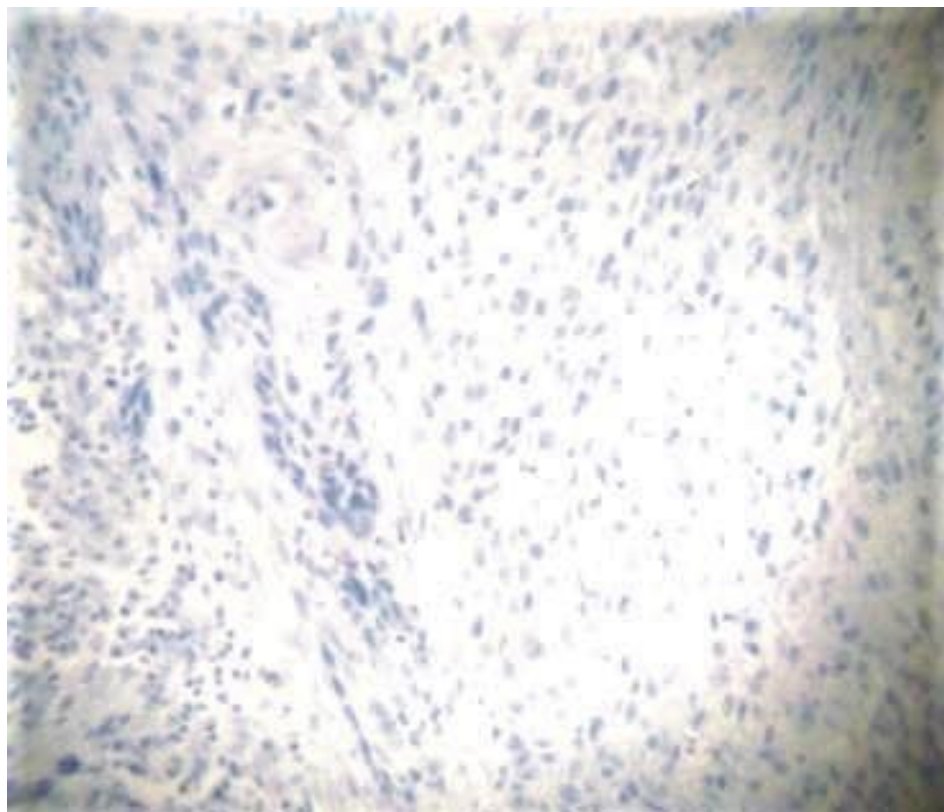
Ομοίως, και για τα δεδομένα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των ανοσοχρώσεων έναντι των EGFR και ALK των ιστολογικών δειγμάτων πλακώδους καρκινώματος κεφαλής τραχήλου, πραγματοποιήθηκε η στατιστική τους ανάλυση για τη διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών και διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των καρκινωμάτων. Συνολικά, υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFR (2⁺ και 3⁺) διαπιστώθηκε σε 17/25 (68%) των ιστολογικών δειγμάτων, ενώ στα υπόλοιπα 8/25 (32%) η ανοσοχρώση αξιολογήθηκε ως αρνητική (0 και 1⁺). Αντίστοιχα, για την πρωτεΐνη ALK, υπερέκφραση διαπιστώθηκε μόλις σε 1/25 (4%) από τα ιστολογικά δείγματα LSCC, ενώ αρνητική ήταν η ανοσοχρώση σε 24/25, ή στο 96% των δειγμάτων.

Στον πίνακα 27 που ακολουθεί φαίνονται τα πρωτογενή δεδομένα μετά τη βαθμονόμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, ενώ στις εικόνες **6** έως και **10** που ακολουθούν, διακρίνονται χαρακτηριστικές εικόνες ιστολογικών δειγμάτων HNSCCs, στα οποία μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK.

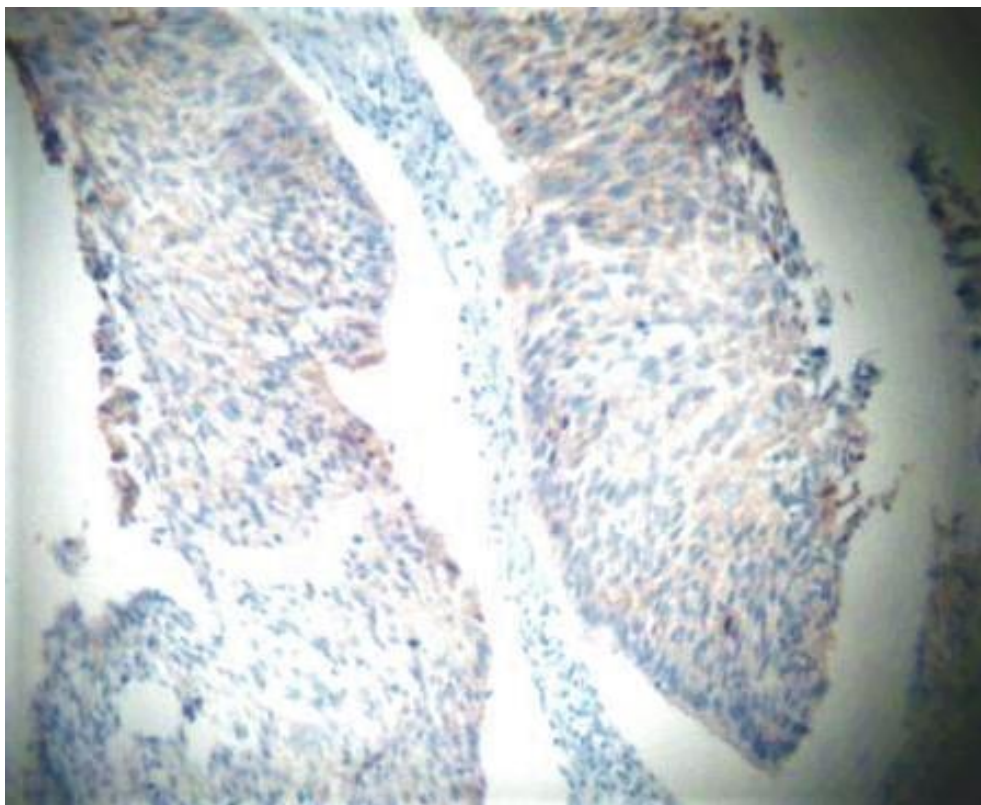
A/A	ID	ΤΥΠΟΣ	ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΦΥΛΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	GRADE	pT-STAGE	max ΔΙΑΜ	EGFR	ALK	EGFR	ALK
1	NV*	SCC	H&N pharynx	A	71	2	1	1,5	3	0	126,67	178,92
2	NV*	SCC	H&N larynx	A	57	2	2	0,5	3	0	122,31	166,67
3	NV*	SCC	H&N oropharynx	A	67	2	2	1,5	3	0	110,78	183,03
4	NV*	SCC	H&N pharynx	A	69	1	1	0,5	3	0	108,76	161,09
5	NV*	SCC	H&N oropharynx	A	62	1	1	2	2	0	129,63	191,76
6	NV*	SCC	H&N larynx	A	55	2	2	3,5	1	0	150,28	182,33
7	NV*	SCC	H&N pharynx	A	62	2	2	3	1	0	149,71	180,06
8	NV*	SCC	H&N oropharynx	Θ	67	2	3	4	1	0	161,87	169,99
9	NV*	SCC	H&N pharynx	A	59	2	2	3	1	0	152,08	176,02
10	NV*	SCC	H&N larynx	A	67	2	1	2,5	2	1	119,04	149,89
11	NV*	SCC	H&N larynx	A	60	2	2	5,5	2	0	124	161,88
12	NV*	SCC	H&N pharynx	A	66	2	2	4	2	0	128,73	171,04
13	NV*	SCC	H&N pharynx	A	58	2	1	1,5	2	0	129,1	163,04
14	NV*	SCC	H&N larynx	A	67	1	1	2	2	0	127,41	177,86
15	NV*	SCC	H&N oropharynx	A	63	2	3	4,5	3	0	108,78	182,67
16	NV*	SCC	H&N larynx	A	68	2	1	3,5	2	1	103,71	143,22
17	NV*	SCC	H&N larynx	Θ	57	1	2	2	0	0	189,35	160,77
18	NV*	SCC	H&N pharynx	A	49	3	2	5,5	1	0	146,31	189,95
19	NV*	SCC	H&N oropharynx	A	55	2	1	4	1	0	160,76	176,05
20	NV*	SCC	H&N larynx	Θ	62	2	2	3	0	0	195,78	171,56
21	NV*	SCC	H&N oropharynx	A	64	2	3	4	3	0	121,67	167,32
22	NV*	SCC	H&N pharynx	A	69	2	1	2,5	3	2	105,42	127,12
23	NV*	SCC	H&N larynx	A	51	2	2	3	3	0	129,08	169,92
24	NV*	SCC	H&N pharynx	Θ	69	1	2	3,5	2	0	121,25	178,01
25	NV*	SCC	H&N larynx	A	55	2	2	5	2	0	127,3	183,24

Πίνακας 27: Πρωτογενή δεδομένα βαθμονόμησης της ανοσοχρώσης έναντι EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής τραχήλου

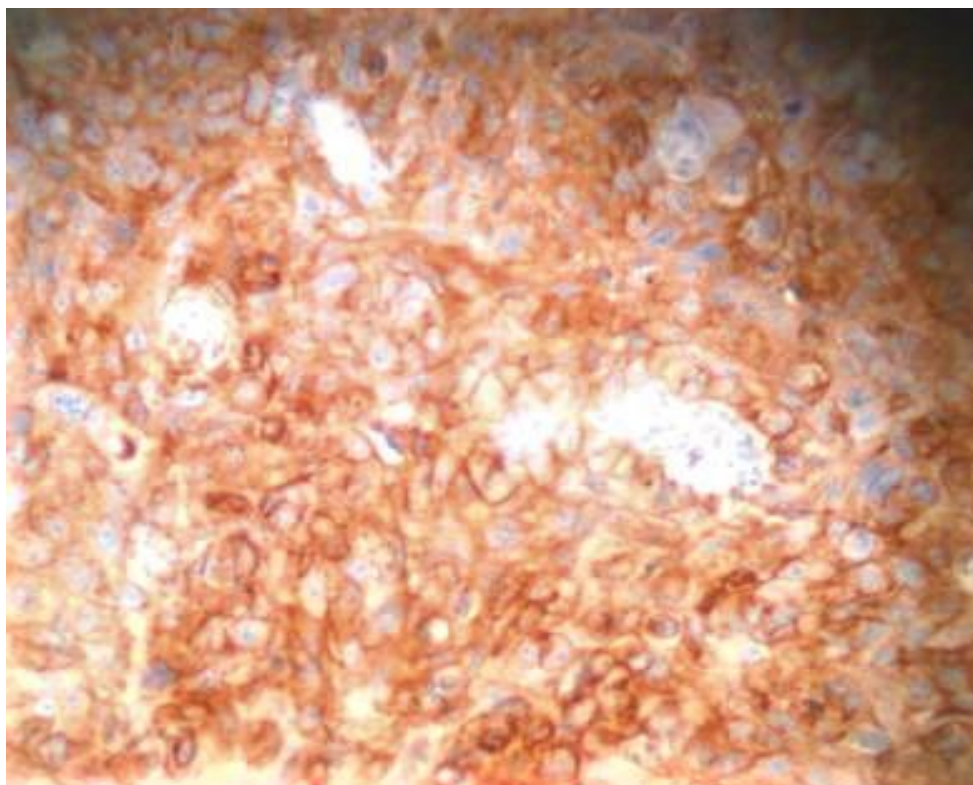
NV: Non visualized μη εμφανιζόμενο λόγω GDPR 2016EU, SCC: Squamous Cell Carcinoma, H&N: Head and Neck*



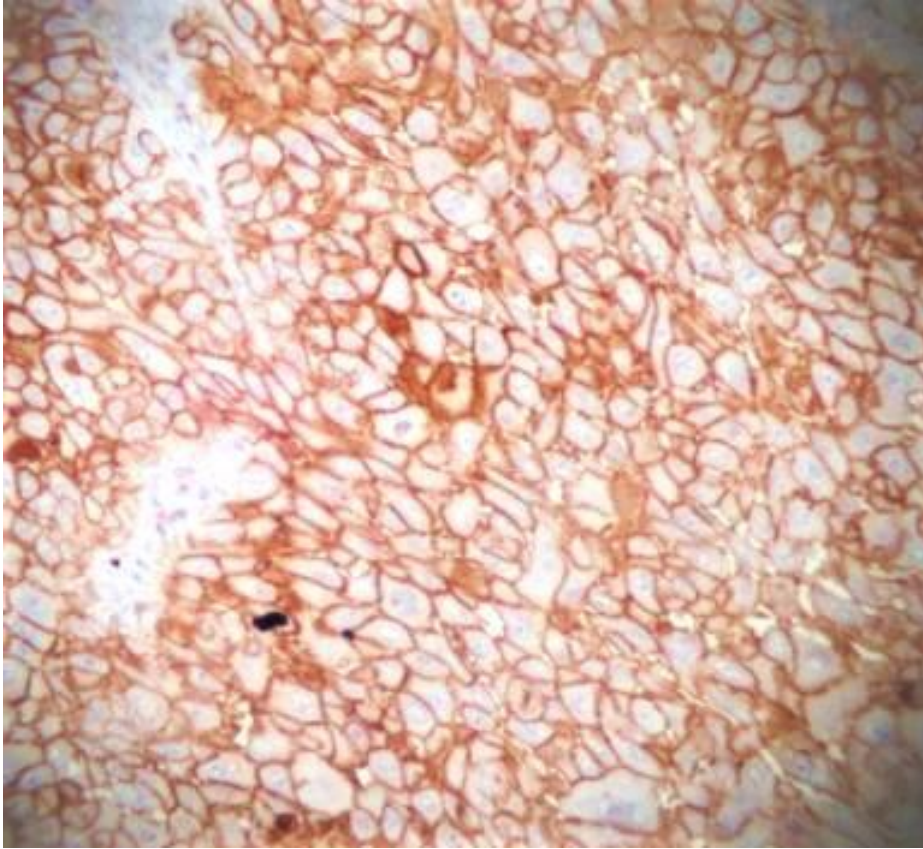
Εικόνα 6: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος της περιοχής κεφαλής/τραχήλου. Παρατηρείται αρνητική



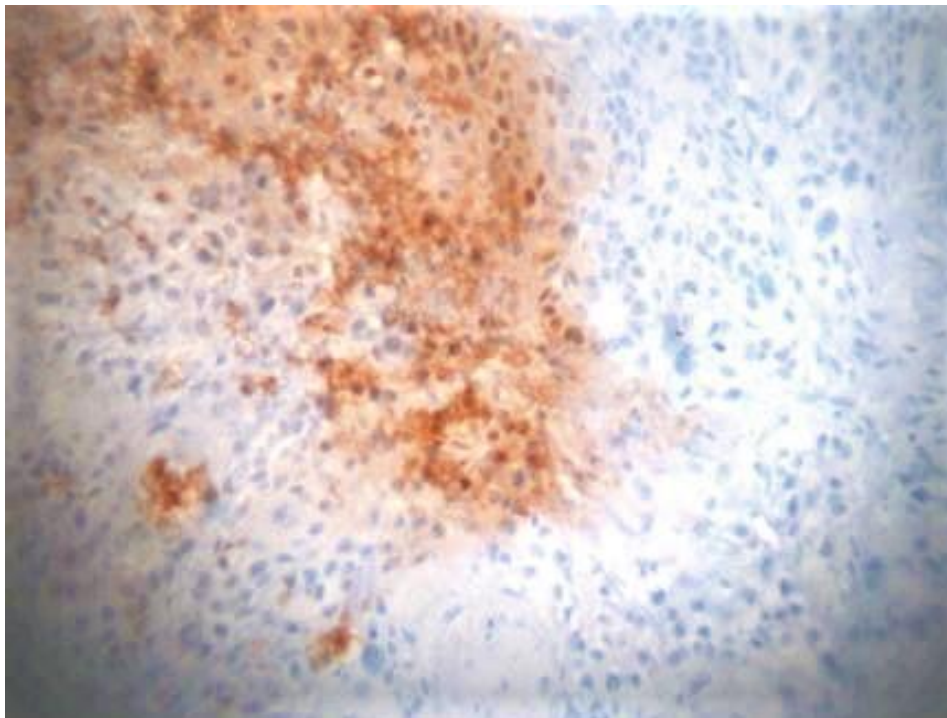
Εικόνα 7: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος της περιοχής κεφαλής/τραχήλου. Παρατηρείται μέτριας έντασης σήμα ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι του υποδοχέα EGFR



Εικόνα 8: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος της περιοχής κεφαλής/τραχήλου. Παρατηρείται έντονη ανοσοχρώση έναντι του υποδοχέα EGFR



Εικόνα 9: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος της περιοχής κεφαλής/τραχήλου. Επίσης στο παρόν δείγμα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR



Εικόνα 10: Ιστολογικό δείγμα πλακώδους καρκινώματος της περιοχής κεφαλής/τραχήλου. Στο παρόν δείγμα διακρίνεται το μέτριας έντασης σήμα ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της πρωτεΐνης ALK

Φύλλο του ασθενούς

Το δείγμα μελέτης των περιστατικών πλακώδους καρκινώματος κεφαλής τραχήλου στη παρούσα μελέτη προέρχονταν από 4 (16%) γυναίκες και 21 (84%) άνδρες (Πίνακας 28).

Για τον έλεγχο της πιθανής σχέσης της έκφρασης του EGFR με το φύλλο του ασθενή στα HNSCC, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 , η οποία έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών: $\chi^2 (3, N=25) = 12.19, p = .007$ (Πίνακας 29).

			Φύλλο		Σύνολο
			Θήλυ	Άρρεν	
EGFR	0 ⁺	Πλήθος	2	0	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.3	1.7	2.0
	1 ⁺	Πλήθος	1	5	6
		Αναμενόμενο πλήθος	1.0	5.0	6.0
	2 ⁺	Πλήθος	1	8	9
		Αναμενόμενο πλήθος	1.4	7.6	9.0
	3 ⁺	Πλήθος	0	8	8
		Αναμενόμενο πλήθος	1.3	6.7	8.0
Σύνολα		Πλήθος	4	21	25
		Αναμενόμενο πλήθος	4.0	21.0	25.0

Πίνακας 28: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με φύλλο του ασθενούς

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	12.186 ^a	3	.007
Likelihood Ratio	10.298	3	.016
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 29: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς

Αντίθετα, αναφορικά με την έκφραση της ALK (Πίνακας 30), η εφαρμογή της ίδιας στατιστικής δοκιμασίας δεν εντόπισε κάποια εξάρτηση της έκφρασης της ALK από το φύλλο του ασθενούς: $\chi^2 (2, N=25) = 0.649, p = .723$ (Πίνακας 31).

		Φύλλο			
		Θήλυ	Άρρεν	Σύνολο	
ALK	0+	Πλήθος	4	18	22
		Αναμενόμενο πλήθος	3.5	18.5	22.0
	1+	Πλήθος	0	2	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.3	1.7	2.0
	2+	Πλήθος	0	1	1
		Αναμενόμενο πλήθος	.2	.8	1.0
Σύνολα		Πλήθος	4	21	25
		Αναμενόμενο πλήθος	4.0	21.0	25.0

Πίνακας 30: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με φύλλο του ασθενούς

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	.649 ^a	2	.723
Likelihood Ratio	1.121	2	.571
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 31: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς

Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης

Κατόπιν, μελετήθηκε εάν η έκφραση των δύο υποδοχέων εξαρτάται από το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος. Συνολικά, το δείγμα πλακωδών καρκινωμάτων της περιοχής κεφαλής και τραχήλου της παρούσας μελέτης περιλάμβανε 5 (20%) καρκινώματα Grade 1, 19 (76%) Grade 2 και μόνο 1 (4%) με βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης Grade 3 (Πίνακας 32 & 34). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν εντόπισε κάποια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των δύο παραπάνω μεταβλητών, τόσο για την πρωτεΐνη EGFR ($p = .885$) (Πίνακας 33), όσο και για την ALK ($p = .559$) (Πίνακας 35). Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη συγκεκριμένη στατιστική δοκιμασία αξιολογήθηκε το “Linear-by-Linear Association” καθώς και οι δύο μεταβλητές είναι τακτικές και διατάξιμες.

		Grade			Σύνολο	
		1	2	3		
EGFR	0+	Πλήθος	1	1	0	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.4	1.5	.1	2.0
	1+	Πλήθος	0	5	1	6
		Αναμενόμενο πλήθος	1.2	4.6	.2	6.0
	2+	Πλήθος	3	6	0	9
		Αναμενόμενο πλήθος	1.8	6.8	.4	9.0
	3+	Πλήθος	1	7	0	8
		Αναμενόμενο πλήθος	1.6	6.1	.3	8.0
Σύνολα		Πλήθος	5	19	1	25
		Αναμενόμενο πλήθος	5.0	19.0	1.0	25.0

Πίνακας 32: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	6.754 ^a	6	.344
Likelihood Ratio	7.296	6	.294
Linear-by-Linear Association	0.21	1	.885
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 33: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

		Grade			Σύνολο	
		1	2	3		
ALK	0+	Πλήθος	5	16	1	22
		Αναμενόμενο πλήθος	4.4	16.7	.9	22.0
	1+	Πλήθος	0	2	0	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.4	1.5	.1	2.0
	2+	Πλήθος	0	1	0	1
		Αναμενόμενο πλήθος	.2	.8	.0	1.0
Σύνολα		Πλήθος	5	19	1	25
		Αναμενόμενο πλήθος	5.0	19.0	1.0	25.0

Πίνακας 34: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	1.077 ^a	4	.898
Likelihood Ratio	1.772	4	.778
Linear-by-Linear Association	0.342	1	.559
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 35: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος

Στάδιο της νόσου

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε εάν η έκφραση των υποδοχέων EGFR και ALK εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Συνολικά, το δείγμα πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής τραχήλου της παρούσας μελέτης προέρχονταν από 9 (36%) ασθενείς με νόσο σταδίου 1, 13 (52%) ασθενείς σταδίου 2 και 3 (12%) ασθενείς με νόσο σταδίου 3 (Πίνακας 36 & 38). Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν εντόπισε κάποια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ των δύο παραπάνω μεταβλητών για την πρωτεΐνη EGFR ($p = .633$) (Πίνακας 37). Αντιθέτως, ο ίδιος στατιστικός έλεγχος για την ALK, έδειξε οριακή στατιστική σημαντικότητα ($p = .048$), με την ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ALK να τείνει να αυξάνεται με την αύξηση του σταδίου του ασθενούς (Πίνακας 39). Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη συγκεκριμένη στατιστική δοκιμασία αξιολογήθηκε επίσης το “Linear-by-Linear Association” καθώς και οι δύο μεταβλητές είναι τακτικές και διατάξιμες.

		Στάδιο ασθενούς			Σύνολο	
		1	2	3		
EGFR	0 ⁺	Πλήθος	0	2	0	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.7	1.0	.2	2.0
	1 ⁺	Πλήθος	1	4	1	6
		Αναμενόμενο πλήθος	2.2	3.1	.7	6.0
	2 ⁺	Πλήθος	5	4	0	9
		Αναμενόμενο πλήθος	3.2	4.7	1.1	9.0
	3 ⁺	Πλήθος	3	3	2	8
		Αναμενόμενο πλήθος	2.9	4.2	1.0	8.0
Σύνολα		Πλήθος	9	13	3	25
		Αναμενόμενο πλήθος	9.0	13.0	3.0	25.0

Πίνακας 36: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της EGFR ανάλογα με το στάδιο της νόσου

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.416 ^a	6	.378
Likelihood Ratio	8.022	6	.236
Linear-by-Linear Association	.228	1	.633
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 37: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της EGFR σε σχέση με το στάδιο της νόσου

			Στάδιο ασθενούς			
			1	2	3	Σύνολο
ALK	0⁺	Πλήθος	6	13	3	22
		Αναμενόμενο πλήθος	7.9	11.4	2.6	22.0
	1⁺	Πλήθος	2	0	0	2
		Αναμενόμενο πλήθος	.7	1.0	.2	2.0
	2⁺	Πλήθος	1	0	0	1
		Αναμενόμενο πλήθος	.4	.5	.1	1.0
Σύνολα		Πλήθος	9	13	3	25
		Αναμενόμενο πλήθος	9.0	13.0	3.0	25.0

Πίνακας 38: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με το στάδιο της νόσου

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.061 ^a	4	.195
Likelihood Ratio	6.889	4	.142
Linear-by-Linear Association	3.919	1	.048
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 39: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με το στάδιο της νόσου

4. Συνδυασμένη ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου (HNSCC)

Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε στα ιστολογικά δείγματα καρκινωμάτων κεφαλής τραχήλου προερχόμενα από το πλακώδες επιθήλιο ήταν η συνδυασμένη έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK, κατά πόσο δηλαδή η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ALK εξαρτάται από την αντίστοιχη της EGFR.

Αναλύοντας στατιστικά τα δεδομένα (Πίνακας 40) και χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία χ^2 , δεν παρατηρήθηκε κάποια σχέση μεταξύ της έκφρασης του υποδοχέα EGFR και του υποδοχέα ALK στα πλακώδη καρκινώματα ($p = .133$) (Πίνακας 41).

		ALK			
		0+	1+	2+	Σύνολο
EGFR 0+	Πλήθος	2	0	0	2
	Αναμενόμενο πλήθος	1.8	.2	.1	2.0
1+	Πλήθος	6	0	0	6
	Αναμενόμενο πλήθος	5.3	.5	.2	6.0
2+	Πλήθος	8	1	0	9
	Αναμενόμενο πλήθος	7.9	.7	.4	9.0
3+	Πλήθος	6	1	1	8
	Αναμενόμενο πλήθος	7.0	.6	.3	8.0
Σύνολα	Πλήθος	22	2	1	25
	Αναμενόμενο πλήθος	22.0	2.0	1.0	25.0

Πίνακας 40: Περιγραφικά στατιστικά δεδομένα. Επίπεδο της έκφρασης της ALK ανάλογα με την έκφραση του EGFR

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	3.362 ^a	6	.762
Likelihood Ratio	4.116	6	.661
Linear-by-Linear Association	2.260	1	.133
N of Valid Cases	25		

Πίνακας 41: Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμασίας χ^2 : Έκφραση της ALK σε σχέση με την έκφραση του EGFR

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πορεία του μετασχηματισμού ενός φυσιολογικού ιστού προς ένα κακόηθες νεόπλασμα στις περισσότερες περιπτώσεις – συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων κεφαλής/τραχήλου και του δέρματος εκ πλακωδών κυττάρων - διέρχεται από πολλά στάδια κατά το οποία συσσωρεύονται γενετικές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του κυττάρου. Ειδικότερα, η απορρύθμιση και η απρόσφορη υπερπαραγωγή ή υπερλειτουργία διαφόρων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων δρα αποσταθεροποιητικά στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον, ενεργοποιώντας ενδοκυττάριους σηματοδοτικούς καταρράκτες από την κυτταρική μεμβράνη προς τον πυρήνα(79). Μεταξύ αυτών των παραγόντων ο EGFR διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη πορεία της καρκινογένεσης.

Επιπροσθέτως, τη τελευταία δεκαετία υπάρχει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον στο θέμα της εξεύρεσης νέων θεραπευτικών στόχων στη μάχη έναντι του καρκίνου με ενθαρρυντικά αποτελέσματα έως τώρα. Αυτοί οι νέοι «βιοδείκτες» μπορούν να εντοπίσουν υποσύνολα καρκινοπαθών ανάλογα με το γενετικό «στίγμα» του καρκινώματος, οι οποίοι δυνητικά μπορούν να ωφεληθούν από στοχευμένες θεραπείες έναντι μοριακών στόχων, σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπείες ή και ως μονοθεραπεία. Παραδείγματα τέτοιων στοχευμένων θεραπειών στο μη – μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) αποτελούν οι μικρομοριακοί αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης (TKIs) Erlotinib και Gefitinib ή τα αντισώματα έναντι του EGFR Cetuximab, Matuzumab και Panitumumab, με τη πρώτη κατηγορία να χρησιμοποιείται πιο συχνά στη κλινική πράξη λόγω μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας(80). Ομοίως, στην ίδια μορφή καρκινώματος, το screening έναντι του συνήθους χιμαιρισμού της ALK, της πρωτεΐνης EML4-ALK έχει βαρύνουσα σημασία στη προχωρημένη νόσο, καθώς οι θετικοί όγκοι εμφανίζουν ευαισθησία στη θεραπεία με ALK TKIs, όπως η Crizotinib(80).

Όσον αφορά τα πλακώδη καρκινώματα λάρυγγα (LSCC), ένας υποπληθυσμός ασθενών (περίπου 10 έως 30%) εμφανίζει μεταλλάξεις ενεργοποιητικές της EGFR καθώς και γονιδιακή ενίσχυση της ίδιας πρωτεΐνης (περίπου 10 έως 35%), οδηγώντας σε υπερέκφραση(81,82). Ομοίως, η απορρύθμιση του υποδοχέα ALK φαίνεται ότι αποτελεί ένα νέο βιοδείκτη στο χειρισμό των ασθενών με LSCC και υπερέκφραση της EGFR. Σε αντίθεση με τα NSCLC, η υπερέκφραση της ALK, λόγω ενεργοποιητικών μεταλλάξεων ή χιμαιρισμού κυρίως δεν είναι σύνηθες φαινόμενο στα LSCC(83,84). Εντούτοις, έχει βρεθεί ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση EGFR και ALK – ως χιμαιρική πρωτεΐνη EML4-ALK – στα NSCLC σχετίζεται δυνητικά με αυξημένη αντίσταση στους EGFR TKIs(3). Επίσης, ένας υποπληθυσμός ασθενών NSCLC που εκφράζουν την EML4-ALK και ανταποκρίνονται αρχικά στη θεραπεία με το μικρομοριακό αναστολέα της ALK Crizotinib, αναπτύσσουν τελικά αντοχή στη θεραπεία μέσω επαγωγής του σηματοδοτικού μονοπατιού της EGFR(85). Παρά τις παραπάνω βιβλιογραφικές ενδείξεις, δεν έχει μέχρι σήμερα διερευνηθεί η ταυτόχρονη έκφραση EGFR και ALK στα HNSCC.

Στα cSCCs, η αυξημένη έκφραση του EGFR διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη καρκινογένεση επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα ποσοστά επιβίωσης, αφού σχετίζεται με την υιοθέτηση από πλευράς καρκινικών κυττάρων ενός πιο επιθετικού φαινοτύπου(29) Έχει αναφερθεί, ότι έως και το 43% των προχωρημένων πλακωδών καρκινωμάτων δέρματος εμφανίζουν υπερέκφραση του EGFR(86), καθώς και ότι η υπερέκφραση αυτή σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα τοπικής μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες(29).

Για τους λόγους αυτούς, η έκφραση της EGFR έχει μπει στο στόχαστρο της αντικαρκινικής θεραπείας και στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος, χρησιμοποιώντας τόσο τα αντι – EGFR αντισώματα, όσο και τους μικρομοριακούς αναστολείς της. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Cetuximab έχει εγκριθεί από τον FDA ήδη από το 2006 για την αντιμετώπιση του πλακώδους καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου όπου έχει επιφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα(4). Ωστόσο, υπάρχουν λίγα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη χρήση του στη θεραπεία του προχωρημένου πλακώδους καρκινώματος δέρματος με απάντηση στη θεραπεία να σημειώνει έως και το 69% των ασθενών, με τους περισσότερους να επιτυγχάνουν μερική ή και πλήρη ύφεση της νόσου που διαρκεί από 6 μήνες έως και 3 χρόνια(4). Τα αποτελέσματα των μικρομοριακών TKIs (Gefitinib, Erlotinib)

στη θεραπεία του cSCC είναι μάλλον συγκεχυμένα και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διαπίστωση ή όχι θεραπευτικού οφέλους για τους πάσχοντες από cSCC κεφαλής - τραχήλου(4). Πάντως, η χρήση της Gefitinib σε ασθενείς με προχωρημένο πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου εμφάνισε συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης στο 11%, καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου στο 53%, ενώ – σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία – βελτίωσε σημαντικά τα ποσοστά τοπικού και περιοχικού ελέγχου της νόσου καθώς και της συνολικής επιβίωσης, σε σχέση με την ακτινοθεραπεία μόνο(29).

Η πρωτεΐνη ALK εμπλέκεται στη παθογένεση του δερματικού αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα, των σπιτσοειδών όγκων, του καρκινώματος από κύτταρα Merkel, του επιθηλιακού ινώδους ιστιοκυττώματος και του μελανώματος. Ειδικότερα, στα καρκινώματα από κύτταρα Merkel έχει αναφερθεί ανοσοϊστοχημική έκφραση της ALK σε ποσοστό ~94% και 88% στα επιθηλιακά ινώδη ιστιοκυττώματα, ενώ οι ALK-θετικοί σπιτσοειδείς όγκοι τείνουν να εμφανίζουν διακριτά κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τους αντίστοιχους ALK-αρνητικούς όγκους(65). Ο αναστολέας της ALK crizotinib έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την αυτό-φωσφορυλίωση των παθολογικών υποδοχέων – χιμαιρών της ALK στους σπιτσοειδείς όγκους και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στα βασικοκυτταρικά καρκινώματα. Παρά τον ανερχόμενο ρόλο της ALK στα καρκινώματα του δέρματος δεν έχει μέχρι σήμερα διερευνηθεί η έκφρασή της στα πλακώδη καρκινώματα του δέρματος της κεφαλής και του τραχήλου. Εξ' όσων γνωρίζουμε, στη παρούσα μελέτη μελετάται για πρώτη φορά η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ALK στα cSCCHN και διερευνάται ο συσχετισμός της με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, καθώς και με τη παράλληλη έκφραση του EGFR.

Παρά τη σχετικά ισχνή υπάρχουσα βιβλιογραφία, συχνά εντοπίζονται αντικρουόμενα αποτελέσματα μελετών σχετικά με την έκφραση των υποδοχέων EGFR και ALK στους διάφορους τύπους καρκινωμάτων, καθιστώντας δύσκολο τον εντοπισμό των υποσυνόλων των ασθενών που θα μπορούσαν υπό συνθήκες να αποκομίσουν κάποιο όφελος από τη δυνητική τροποποίηση της λειτουργίας τους.

Ένας από τους λόγους της ανομοιογένειας αυτής των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών είναι και η χρήση από κάθε διαφορετική ερευνητική ομάδα διαφορετικής μεθοδολογίας ανοσοϊστοχημικής χρώσης, αλλά και η χρήση διαφορετικού πρωτοταγούς

αντισώματος. Για παράδειγμα, τα δύο συχνότερα αντισώματα που χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν αναγνωρισθεί από τον FDA για τον εντοπισμό της EGFR, είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα της Zymed (κλώνος 31G7) και το Dako EGFR pharmDx kit (κλώνος 2-18C9). Στη παρούσα ερευνητική μελέτη επιλέχθηκε η χρήση του αντισώματος της Zymed, καθώς μελέτες σύγκρισης μεταξύ διαφόρων anti-EGFR αντισωμάτων έχουν δείξει παρόμοια(42,87) ή και καλύτερη(88) ευαισθησία του Zymed σε σχέση με την αντίστοιχη του Dako pharmDx κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα. Ομοίως, κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, ο *Bhargava και συν.* διαπίστωσαν παρόμοια ευαισθησία μεταξύ των δύο αντισωμάτων(89), ενώ ο *Penault-Llorca και συν.* ανέφερε μεγαλύτερη ευαισθησία του Zymed(90).

Φυσικά, η ευαισθησία κάθε αντισώματος ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον προσδιορισμό του επιτόπου που εντοπίζεται ως αντιγόνο. Έτσι, ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από τα δύο προαναφερθέντα αντισώματα – σε αντίθεση με τον επίτοπο που αναγνωρίζουν άλλα, διαθέσιμα στην αγορά αντισώματα - είναι η εξωκυττάρια πρωτεϊνική περιοχή του EGFR, αναγνωρίζοντας με αυτό τον τρόπο, τόσο τον «φυσικό», χωρίς μεταλλάξεις υποδοχέα EGFR, όσο και τον φέροντα τη μετάλλαξη που απαντάται συχνά στο γλοιοβλάστωμα, τον EGFRvIII(42).

Όσον αφορά το αντίσωμα έναντι της ALK χρησιμοποιήθηκε το anti-ALK CD246 (κλώνος ALK-1), το οποίο παραδοσιακά έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην ανίχνευση ALK θετικών ασθενών αναπλαστικού λεμφώματος εκ μεγάλων κυττάρων. Προτιμήθηκε σε σχέση με το νεότερο αντίσωμα anti-ALK (κλώνος D5F3), καθώς τα δύο αντισώματα έχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα κατά τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό των ALK - θετικών ασθενών με ALCL. Αντιθέτως, ο κλώνος D5F3 έχει βρεθεί ανώτερος του ALK-1 στον εντοπισμό της έκφρασης της ALK σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με αντιμετάθεση του γονιδίου της ALK(91). Πάντως, το αντίσωμα ALK-1 που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει τη φυσιολογική πρωτεΐνη ALK καθώς και τη πρωτεΐνη χίμαιρα NPM-ALK χωρίς να μπορεί να εντοπίσει τη χιμαιρική πρωτεΐνη EML4-ALK σε αντίθεση με τον κλώνο D5F3(92,93). Δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τον κλώνο ALK-1, προτιμήθηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα για λόγους σύγκρισης.

Αξίζει να επισημανθεί στο σημείο αυτό, ότι οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι ανίχνευσης ανιχνεύουν την ALK στο επίπεδο της πρωτεϊνικής έκφρασης. Ωστόσο, για παράδειγμα στα NSCLC που είναι θετικά για αναδιάταξη του γονιδίου της ALK, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ALK ανευρίσκονται σχετικά χαμηλά και μετά βίας ανιχνεύσιμα ανοσοϊστοχημικά. Είναι συνεπώς, κατά τη γνώμη μου, αναγκαία η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της ALK τα οποία θα έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, ώστε να μπορέσουν να διευρυνθούν και οι κλινικές εφαρμογές της ανοσοϊστοχημικής της εντόπισης, καθώς τα διαθέσιμα αντισώματα δε μπορούν να εντοπίσουν όλες τις πρωτεΐνες που είναι προϊόντα χιμαιρισμού της ALK με κάποια άλλη πρωτεΐνη(61). Αποτέλεσμα αυτού, είναι το ειδικό αντίσωμα έναντι της ALK να αποτυγχάνει πολλές φορές στην αναγνώριση της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής, ενώ πιθανά να υπερεκφράζεται κάποια χιμαιρική ισομορφή της, οδηγώντας σε σφάλματα τις εκάστοτε μελέτες.

Στη παρούσα ανάλυση, διερευνήθηκε ακόμη η έκφραση των πρωτεϊνών EGFR και ALK σε σχέση με το φύλλο του ασθενούς, την εντόπιση, το στάδιο και τη διαφοροποίηση των πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής/τραχήλου και δέρματος κεφαλής/τραχήλου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι, η έκφραση του EGFR στα HNSCC εξαρτάται από το φύλλο του ασθενούς και μάλιστα ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης αυτής τείνει να είναι μεγαλύτερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών του *Satoshi Fujii και συν.* όπου διαπιστώθηκε σε 205 δείγματα ασθενών μια οριακή συσχέτιση μεταξύ του φύλλου του ασθενούς και της θετικότητας, αλλά όχι και της έντασης της ανοσοχρώσης έναντι EGFR κυρίως στα δείγματα με διάγνωση υποφαρυγγικού SCC(19). Πάντως, η πλειοψηφία των υπάρχουσών μελετών δεν εντόπισε κάποια σχέση μεταξύ του φύλλου και της έκφρασης της EGFR(6,33,51,52,94). Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι, το δείγμα της παρούσας μελέτης είναι μικρό και μάλιστα τα διαθέσιμα προς μελέτη δείγματα HNSCC που προέρχονταν από γυναίκες αντιστοιχούσαν μόλις στο 16% του συνόλου (4/25). Συνεπώς, η παραπάνω συσχέτιση, αν και στατιστικώς σημαντική, μάλλον πρέπει να θεωρηθεί ως ενδεικτική, καθώς απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δείγματος και για τα δύο φύλλα, ώστε να αποδειχτεί η παρουσία συσχέτισης ή μη.

Επίσης, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της EGFR βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη του βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος στα HNSCC. Το εύρημα αυτό είναι σε

αντιδιαστολή με παρόμοιες μελέτες, όπως λόγου χάρη του *Kontic και συνεργατών*, ο οποίος μελετώντας μια κοόρτη 185 ασθενών διαπίστωσε παρόμοια σχέση μεταξύ της EGFR και του βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος, καθώς επίσης και με άλλα γενικότερα χαρακτηριστικά προχωρημένης νόσου, συμπεριλαμβανομένων του σταδίου και του μεταστατικού δυναμικού του καρκινώματος, οδηγώντας συνολικά σε χειρότερη πρόγνωση(53). Αντίθετα, ο *Almadori και συνεργάτες*, σε παρόμοιες μελέτες σε 140 ασθενείς με πρωτοπαθές LSCC δε διαπίστωσαν κάποια σχέση μεταξύ της έκφρασης της EGFR και του βαθμού διαφοροποίησης του πλακώδους καρκινώματος λάρυγγα ή κάποιας άλλης κλινικοπαθολογικής παραμέτρου(51,52). Αξίζει επίσης να αναφερθεί, ότι η ταυτόχρονη υπερέκφραση της EGFR και του πρωτογονιδίου του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων - ή πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης Met (c-Met) – σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση, ειδικά σε ασθενείς με γλωττιδικό LSCC(6). Μάλιστα, η ταυτόχρονη αναστολή της EGFR και της Met σε μια άλλη μελέτη οδήγησε σε σημαντική καταστολή του διηθητικού και αναπτυξιακού δυναμικού του LSCC, τόσο in vitro όσο και in vivo και οδήγησε τους συγγραφείς ώστε να προτείνουν ως πιθανή νέα θεραπευτική προσέγγιση του LSCC την ταυτόχρονη αναστολή των δύο βιολογικών μονοπατιών(95).

Πάντως, σε άλλες δημοσιεύσεις έχει αναφερθεί στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης της EGFR και με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως είναι η πιθανότητα υποτροπής νόσου(6), το στάδιο του ασθενούς - αλλά όχι ο βαθμός διαφοροποίησης του καρκινώματος(37,54) ή το φύλλο του ασθενούς(33). Πιθανά, αυτές οι μεγάλες ασυμφωνίες που διαπιστώνονται στη βιβλιογραφία, ίσως να έχουν τη ρίζα τους στη χρήση διαφορετικών κλινικοπαθολογικών μεθόδων, στη μεγάλη ετερογένεια των υπό μελέτη πληθυσμών, με διαφορετική πρωτοπαθή εντόπιση και τύπο του καρκινώματος, καθώς και στο μικρό μέγεθος του δείγματος. Πάντως, οι περισσότεροι ερευνητές καταλήγουν πως η πρωτεΐνη EGFR, παρά τις διαπιστούμενες αντιθέσεις, αποτελεί τον πιο αξιόπιστο μοριακό προγνωστικό βιοδείκτη μέχρι σήμερα για την επιβίωση, την πιθανή υποτροπή και την ανταπόκριση στη θεραπεία στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου(23,54).

Όσον αφορά στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος κεφαλής και τραχήλου, αυξημένη έκφραση της EGFR έχει ανευρεθεί σε καρκινώματα με επιχώριες μεταστάσεις, σε σχέση με

προχωρημένα μεν, αλλά μη μεταστατικά καρκινώματα (29,96). Μάλιστα, υπερέκφραση της EGFR έχει διαπιστωθεί σε έως και 43% των προχωρημένων SCC(86), ενώ σε άλλες μικρότερες σειρές έχει συσχετιστεί με την υιοθέτηση επιθετικότερης βιολογικής συμπεριφοράς του καρκινώματος (97,98). Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία παρατηρούνται και αρκετές ασυμφωνίες, με την έκφραση του EGFR να ανευρίσκεται ελαττωμένη σε cSCC με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά(99).

Στη παρούσα μελέτη, υπερέκφραση του EGFR (2+/3+) διαπιστώθηκε σε 19/25 (76%) των καρκινωμάτων cSCC, εύρημα που είναι σύμφωνο με παρόμοιες μελέτες, όπως λόγω χάρη του *Uribe και συνεργατών* (73%)(29). Η υπερέκφραση του EGFR δε φάνηκε να σχετίζεται με κάποια από τις κλινοπαθολογικές παραμέτρους οι οποίες εξετάστηκαν και περιλάμβαναν το φύλλο και το στάδιο του ασθενούς, καθώς και την εντόπιση και το βαθμό διαφοροποίησης του καρκινώματος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη μελέτη του *Lanrijzen και συν.*, οι οποίοι δεν εντόπισαν στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του βαθμού διαφοροποίησης του cSCC και της έντασης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGFR(100). Αντίθετα, ο *Canueto και συνεργάτες*, ανακοίνωσε ότι σε μια σειρά αναδρομικής μελέτης 94 ασθενών με cSCC, η υπερέκφραση του EGFR συσχετίστηκε με μέτριο βαθμό διαφοροποίησης και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα(101). Αυτές οι ασυμφωνίες στη βιβλιογραφία πιθανά να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Δεδομένου ότι το cetuximab έχει λάβει άδεια για τη θεραπεία του μεταστατικού SCCHN και ότι τα περισσότερα cSCC εντοπίζονται στη κεφαλή και τον τράχηλο, στη βιβλιογραφία ανευρίσκονται αρκετά περιστατικά χρήσης αναστολέων του υποδοχέα EGFR έναντι cSCC, είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία. Τα αποτελέσματα της μονοθεραπείας είναι ενθαρρυντικά, με 18,5% των ασθενών να επιτυγχάνουν πλήρη και 29,6% μερική ύφεση σε μια σειρά 54 cSCC, ενώ ο συνδυασμός cetuximab με ακτινοθεραπεία οδήγησε σε πλήρη ύφεση τους 4 στους 8 ασθενείς(38). Παρά ταύτα, τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν συχνά βραχύβια με ύφεση της νόσου διάρκειας μερικών μόνο μηνών στις περισσότερες περιπτώσεις(102). Επιπρόσθετα, η χρήση του cetuximab ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε 36 ασθενείς με τοπικά προχωρημένα cSCC διερευνήθηκε από τον *Maubec και συν.* Έλεγχος της νόσου επιτεύχθηκε στο 69% των ασθενών, με το ποσοστό απόκρισης στη θεραπεία να είναι 28%

την έκτη εβδομάδα της παρακολούθησης(4). Όμως, σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, ένα ποσοστό των ασθενών που λαμβάνουν cetuximab θα αναπτύξουν τελικά αντίσταση στη θεραπεία, παρακάμπτοντας πιθανά - σύμφωνα με μια από τις πολλές θεωρίες - το ενδοκυττάριο μονοπάτι της EGFR ή ενεργοποιώντας κάποιο εναλλακτικό, υποδεικνύοντας πιθανό θεραπευτικό όφελος από τη ταυτόχρονη αναστολή του μονοπατιού της EGFR μαζί με κάποιον άλλο – ως σήμερα άγνωστο – παράλληλο θεραπευτικό στόχο.

Έχοντας ως αφετηρία τα πλακώδη καρκινώματα πνεύματος και δεδομένων των λειτουργικών ομοιοτήτων που εμφανίζουν οι υποδοχείς EGFR και ALK κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η έκφραση της ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου και δέρματος.

Εξ' όσων γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία διερεύνησε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της ALK, τόσο στα HNSCC, όσο και στα cSCCHN και η υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι ελάχιστη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα η υπερέκφραση της ALK λόγω μεταλλάξεων ή χιμαιρισμού δεν είναι ασυνήθης(83,84). Αντίθετα, στα HNSCC – και συνεπώς και στα cSCC - η έκφραση της ALK είναι συνήθως περιορισμένη(69,103). Στη παρούσα μελέτη, η ανοσοχρώση στη πλειοψηφία των ιστολογικών δειγμάτων HNSCC (96%), ήταν αρνητική ή ασθενής για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά, η υπερέκφραση της ALK βρέθηκε ότι σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την αύξηση του σταδίου της κακοήθους νόσου ($p = .048$), σε συμφωνία με τις μελέτες της *Gonzales C. και συν.* καθώς και του *Huang και συν.* στα πλακώδη καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας(70,85). Καμία άλλη σχέση μεταξύ της έκφρασης της ALK και των λοιπών κλινικοπαθολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν δεν έφτασε το όριο της στατιστικής σημαντικότητας. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε όσα εκ των δειγμάτων παρατηρήθηκε υπερέκφραση της ALK υπήρχε ταυτόχρονα υπερέκφραση της EGFR.

Η μελέτη της έκφρασης της ALK στα πλακώδη καρκινώματα του δέρματος κεφαλής/τραχήλου είχε συγκρίσιμα αποτελέσματα με τα ιστολογικά δείγματα HNSCC: 21/25 (84%) των cSCC παρουσίασαν ασθενή ή αρνητική ανοσοχρώση και μόνο το υπόλοιπο 16% μέτριας έντασης ανοσοχρώση. Τέλος, η έκφραση της ALK δε συσχετίστηκε με κάποια από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που μελετήθηκαν.

Αν και το δείγμα της μελέτης αυτής είναι σχετικά μικρό, διαφαίνεται ότι σε ορισμένα προχωρημένα πλακώδη καρκινώματα υπάρχει απορρύθμιση της έκφρασης της ALK, αν και αυτή δε φαίνεται ότι αποτελεί την οδηγό μετάλλαξη γι' αυτού του είδους τα καρκινώματα. Πιθανά η απορρύθμιση αυτή να παρατηρείται καθώς επισυμβαίνει συνεχής συσσώρευση μεταλλάξεων και απορρύθμιση βιολογικών μονοπατιών στα κακοήθη νεοπλασματικά κύτταρα όσο το στάδιο της νόσου εξελίσσεται. Πάντως, σε μια μελέτη η οποία ανέλυε την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της υπερέκφρασης της EGFR και της ALK in vitro σε μοντέλα πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου βρέθηκε ότι η απρόσφορη υπερέκφραση της δεύτερης δρα ως ένας εκ των μηχανισμών ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς της EGFR(69). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ταυτόχρονη χορήγηση της gefitinib (EGFR αναστολέας) με τις αδειοδοτημένες από τον FDA ceritinib και brigatinib (ALK αναστολείς) οδηγώντας σε βελτιωμένο και συνεργικό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε κυτταρικές καλλιέργειες HNSCC. Μάλιστα, φάνηκε ότι η χορήγηση gefitinib οδηγούσε σε επαγωγή της έκφρασης της ALK, δρώντας ως ένας μηχανισμός αντίστασης στην αντι-EGFR θεραπεία, προάγοντας και ενισχύοντας ένα παράλληλο βιολογικό μονοπάτι, αυτό της ALK(69). Γίνεται έτσι σαφές, ότι αν και η έκφραση της ALK παρουσιάζεται στις πλείστες των περιπτώσεων που ελέγχθηκαν ασθενής/αρνητική, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών συνθέτει ένα μηχανισμό που οδηγεί στην τροποποίηση της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε στοχευμένες θεραπείες ενάντια του υποδοχέα EGFR.

Τέλος, ένας από τους κύριους ερευνητικούς στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί εάν υπάρχει κάποια εξάρτηση της έκφρασης της ALK σε σχέση με την έκφραση της EGFR στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής τραχήλου και δέρματος. Ήδη, μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της ALK απορρυθμίζεται σε πλακώδη καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας (OSCC) και πιθανά διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο δυναμικό διήθησης αυτού του τύπου καρκίνου(70). Ομοίως, η ALK έχει αναγνωρισθεί ως ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στο NSCLC, όταν αναγνωρίστηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη EML4-ALK από τον Soda και συν.(104). Αν και τα EML4-ALK θετικά NSCLC ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με αναστολείς της ALK, όπως η crizotinib, εντούτοις κάποιο ποσοστό από αυτά τα καρκινώματα θα αναπτύξει τελικά ανθεκτικότητα στη θεραπεία μέσω επαγωγής του παράλληλου βιολογικού μονοπατιού τυροσινικής κινάσης που δρα μέσω σηματοδότησης των AKT, RAS και STAT3: του υποδοχέα EGFR(85).

Δεδομένης της σε μεγάλο ποσοστό υπερέκφρασης της EGFR - έως και 90% σε ορισμένες μελέτες - στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου, καθώς και της σχετικά μικρής αποτελεσματικότητας των αναστολέων της EGFR στις σχετικές κλινικές δοκιμές(44,105), υποθέσαμε ότι ενισχύεται ταυτόχρονα κάποιο παράλληλο βιολογικό μονοπάτι. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία διερεύνησε την ταυτόχρονη έκφραση των EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου και δέρματος.

Όσον αφορά στα ιστολογικά δείγματα των HNSCC και δεδομένης της εν γένει ασθενούς χρώσης σχεδόν του συνόλου των ιστολογικών δειγμάτων, δεν εντοπίστηκε κάποια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών. Αντιθέτως, στα ιστολογικά δείγματα πλακωδών καρκινωμάτων δέρματος, η έκφραση της ALK συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με την αντίστοιχη της EGFR (**p = .038**): Ενώ μόνο 6/25 (24%) των cSCC με ασθενή ανοσοχρώση έναντι EGFR εμφάνισαν ταυτόχρονα έκφραση της ALK, τα υπόλοιπα 19/25 (76%) με υπερέκφραση της EGFR, εμφάνισαν ταυτόχρονα έκφραση της πρωτεΐνης ALK.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι δηλωτικά μιας τάσης αύξησης της έκφρασης του υποδοχέα ALK από τα νεοπλασματικά κακοήθη κύτταρα του δέρματος, καθώς αυξάνεται η έκφραση του υποδοχέα του EGF. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει εν μέρη τη παράλληλη ενεργοποίηση της οδού της ALK και της EGFR στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος κεφαλής/τραχήλου. Αν και στατιστικώς σημαντικά, τα αποτελέσματα αυτά οφείλουμε να τα λάβουμε υπόψη με σκεπτικισμό, λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος που εξετάστηκε. Παρόλα αυτά, σίγουρα η τάση που διαφαίνεται οφείλει να μελετηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ιστολογικών δειγμάτων. Επιπροσθέτως, δεδομένης της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζουν μεταξύ τους τα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου ως προς τη βιολογική τους συμπεριφορά, καθώς και των ασυμφωνιών που παρατηρούνται στις εκάστοτε μελέτες σχετικά με την έκφραση των διαφόρων βιοδεικτών που μελετώνται κάθε φορά, ίσως έχει φτάσει η ώρα να εξετάσει η διεθνής επιστημονική κοινότητα το ενδεχόμενο της κατάτμησης αυτής της μεγάλης κατηγορίας καρκινωμάτων και την εκ νέου κατηγοριοποίησή τους.

Ακόμη, μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε η περαιτέρω μελέτη της αποτελεσματικότητας μιας πολυτροπικής θεραπείας με αναστολείς των υποδοχέων ALK και EGFR έναντι των προχωρημένων cSCC, καθώς οι ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές ενδείξεις, όπως επίσης και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν το ενδεχόμενο μιας πιθανής συνεργικής δράσης των δύο αναστολέων. Σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες η *Gonzales C. και συν.* έδειξαν ότι αν και οι μονοθεραπείες έναντι ALK και EGFR είχαν ποικίλα αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές πλακωδών καρκινωμάτων στοματικής κοιλότητας, η συνδυασμένη θεραπεία έναντι ALK και EGFR ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Ανέφερε μάλιστα, ότι πιθανά η ρύθμιση του AKT είναι το κοινό σηματοδοτικό μόριο που στοχοποιείται στη συνδυασμένη αναστολή των δύο βιολογικών ενδοκυττάρων μονοπατιών επιφέροντας το δυνητικό θεραπευτικό όφελος(85). Αυτή την υπόθεση της συγγραφέως υποστηρίζουν και τα ευρήματα άλλων μελετών, όπως για παράδειγμα εκείνες του *Li και συν.* καθώς και του *Knowles και συν.* Στη πρώτη μελέτη φάνηκε ότι η φωσφορυλίωση του AKT σχετίζεται με δυσμενή κλινική έκβαση στο OSCC και σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με τοπική υποτροπή και χαμηλό ποσοστό 5ετούς επιβίωσης(106). Επίσης, στη δεύτερη μελέτη η ενεργοποίηση του AKT φάνηκε ότι αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη των HNSCC καρκινωμάτων με λεμφαδενικές μεταστάσεις(107). Παρά τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, ότι η φαρμακευτική αναστολή του AKT θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτική στρατηγική εναντίων - ορισμένων έστω τύπων - πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής και τραχήλου, απαιτούνται περισσότερες μελέτες που δυνητικά θα οδηγήσουν σε αποτελεσματικότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις και πιθανά θα περιλαμβάνουν και συνδυασμούς ταυτόχρονης αναστολής των EGFR και ALK.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας με την αναζήτηση και την επιτυχή αναγνώριση νέων βιοδεικτών έχει επιτρέψει στην ιατρική επιστήμη την περαιτέρω κατηγοριοποίηση των καρκινωμάτων ανάλογα με το γενετικό τους αποτύπωμα και τον εντοπισμό υποσυνόλων καρκινοπαθών που μπορούν πια να ωφελούνται από τη στοχευμένη μοριακή θεραπεία των κακόηθων νεοπλασματικών κυττάρων.
- Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία διερεύνησε την έκφραση της ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου και δέρματος, την πιθανή συσχέτισή της με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, καθώς και με τη παράλληλη έκφραση της EGFR στα καρκινώματα αυτά.
- Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία εντοπίζονται συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα μελετών σχετικά με την έκφραση των δύο πρωτεϊνών EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου και δέρματος, καθώς και με τη σημασία της στη βιολογική συμπεριφορά των καρκινωμάτων. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στη διαφορετική μεθοδολογία, στην υποκειμενική εκτίμηση της έντασης των ανοσοχρώσεων, καθώς και στη χρήση από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες πρωτοταγών αντισωμάτων με διαφορετικές ιδιότητες. Ίσως θα ήταν σκόπιμο να τυποποιηθούν οι μέθοδοι εντοπισμού της έκφρασης των διαφόρων πρωτεϊνών και βιοδεικτών, ώστε τα αποτελέσματα των μελλοντικών μελετών να είναι άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους.
- Η έκφραση της EGFR στα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου σχετίζεται με το φύλλο του ασθενούς: Στους άρρενες ασθενείς η πρωτεΐνη EGFR τείνει να υπερεκφράζεται σε σχέση με τις γυναίκες. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι η σχέση αυτή οφείλει να διερευνηθεί περαιτέρω σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, με μεγαλύτερη εκπροσώπηση ιστολογικών δειγμάτων προερχόμενα από γυναίκες ασθενείς.

- Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε επίσης υπερέκφραση της EGFR στη πλειοψηφία των πλακωδών καρκινωμάτων δέρματος της περιοχής της κεφαλής και του τραχήλου (76%). Η έκφραση αυτή δε φάνηκε να σχετίζεται με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που αναλύθηκαν (εντόπιση, φύλλο, στάδιο και βαθμός διαφοροποίησης).
- Η έκφραση της ALK βρέθηκε ασθενής ή και αρνητική στη πλειοψηφία των ιστολογικών δειγμάτων πλακώδους καρκινώματος κεφαλής/τραχήλου. Ωστόσο, βρέθηκε ότι η έκφρασή της σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την αύξηση του σταδίου της κακοήθους νόσου. Μάλιστα, σε εκείνα τα καρκινώματα που παρατηρήθηκε υπερέκφραση της ALK εντοπίστηκε ταυτόχρονα υπερέκφραση της EGFR.
- Ομοίως, στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος κεφαλής/τραχήλου το 84% των ιστολογικών δειγμάτων παρουσίασε ασθενή ή αρνητική ανοσοχρώση έναντι της ALK, ενώ η έκφραση του υποδοχέα αυτού δε σχετίστηκε με κάποια κλινικοπαθολογική παράμετρο.
- Αν και λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματός μας δεν είναι εφικτό να εξαγάγουμε ασφαλές συμπέρασμα, διαφαίνεται ότι η απορρύθμιση της έκφρασης της ALK είναι ένα γεγονός το οποίο επισυμβαίνει αργά κατά τη διεργασία της καρκινογένεσης και σε προχωρημένη νόσο, καθώς τα κακοήθη κύτταρα συσσωρεύουν ολοένα και περισσότερες μεταλλάξεις. Ίσως η απορρύθμιση αυτή να αποτελεί και έναν από τους μηχανισμούς ανάπτυξης αντίστασης των πλακωδών καρκινωμάτων κεφαλής/τραχήλου στη θεραπεία με αναστολείς της EGFR, όπως έχει προταθεί από ορισμένες ερευνητικές ομάδες στο παρελθόν.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση της ALK σχετίζεται με την ταυτόχρονη υπερέκφραση της EGFR στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος στη περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου. Συγκεκριμένα, η έκφραση του υποδοχέα ALK στα cSCC αυξάνεται, όσο αυξάνεται η έκφραση του υποδοχέα EGFR. Παρόμοια σχέση δεν επαληθεύεται όσον αφορά στα λοιπά πλακώδη καρκινώματα κεφαλής/τραχήλου.

- Από τη παρούσα μελέτη και την έρευνα της σχετικής βιβλιογραφίας, συμπεραίνουμε ότι ενισχύεται το ενδεχόμενο μιας πιθανής συνεργικής θεραπευτικής δράσης της ταυτόχρονης χορήγησης αναστολέων των EGFR και ALK στα cSCC και δικαιολογείται ο σχεδιασμός περαιτέρω μελετών στις οποίες θα αξιολογείται η αποτελεσματικότητα της προαναφερθείσας πολυτροπικής θεραπείας, καθώς και το δυνητικό θεραπευτικό της όφελος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Θέμα διδακτορικής διατριβής:

«Διερεύνηση της συνδυασμένης απορρύθμισης των μορίων EGFR και ALK στα πλακώδη καρκινώματα της στοματοφαρυγγολαρυγγικής χώρας και του δέρματος»

Συγγραφέας:

Πολίτη Αναστασία, Ιατρός

Περίληψη:

Σκοπός: Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ενέχει τη λειτουργία ογκογονιδίου σε διάφορους τύπους καρκινωμάτων. Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε το ρόλο της συνδυασμένης έκφρασης των EGFR και της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) ως πιθανοί βιοδείκτες σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου και δέρματος κεφαλής/τραχήλου.

Υλικά και μέθοδοι: Πενήντα ιστολογικά δείγματα (n=50) - προερχόμενα από εικοσιπέντε ασθενείς (n=25) με διάγνωση πρωτοπαθούς πλακώδους καρκινώματος κεφαλής/τραχήλου (HNSCC) και εικοσιπέντε (n=25) με διάγνωση πρωτοπαθούς πλακώδους καρκινώματος δέρματος στη περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου (cSCCHN) – εξετάστηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους της ανοσοϊστοχημείας.

Αποτελέσματα: Υπερέκφραση της EGFR διαπιστώθηκε σε 17/25 (68%) ιστολογικά δείγματα HNSCC και σε 19/25 (76%) cSCCHN αντίστοιχα. Όσον αφορά στην έκφραση της ALK, 23/25 (92%) και 21/25 (84%) των ιστολογικών δειγμάτων εμφάνισαν χαμηλή έκφραση στις περιπτώσεις HNSCC και cSCCHN αντίστοιχα. Στα δείγματα καρκινωμάτων της στοματοφαρυγγολαρυγγικής χώρας, η έκφραση της EGFR συσχετίστηκε με το άρρεν φύλλο του ασθενούς (p=.007), ενώ η έκφραση της ALK με το στάδιο της κακοήθους νόσου (p=.048). Αύξηση της έκφρασης της ALK διαπιστώθηκε στα EGFR-θετικά δείγματα με προχωρημένη νόσο. Όσον αφορά στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος δε διαπιστώθηκε σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των EGFR ή ALK με τις διάφορες

κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Τέλος, είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι η έκφραση της ALK – αν και στη πλειοψηφία των περιπτώσεων ασθενής – συσχετίστηκε με την υπερέκφραση της EGFR ($p=.038$).

Συμπεράσματα: Υπερέκφραση της EGFR παρατηρείται συχνά στα πλακώδη καρκινώματα τόσο της κεφαλής και του τραχήλου, όσο και του δέρματος, σε συνδυασμό με χαμηλή έκφραση του υποδοχέα ALK. Η έκφραση της ALK στα πλακώδη καρκινώματα δέρματος κεφαλής και τραχήλου τείνει να αυξάνεται και να γίνεται περισσότερο έκδηλη σε προχωρημένα καρκινώματα που εμφανίζουν υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Thesis Title:

“Study of the combined expression of EGFR and ALK in squamous cell carcinomas of the oropharyngolaryngeal region and in cutaneous squamous cell carcinomas”.

Author:

Politi Anastasia M.D.

Abstract:

Background/Aim: Epidermal growth factor receptor (EGFR) acts as an oncogene in malignancies. Our aim was to examine the role of combined EGFR/ anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression as molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and cutaneous squamous cell carcinomas of the head and neck (cSCCHN) patients.

Materials and Methods: Fifty (n=50) tissue sections derived from twenty-five (n=25) primary HNSCCs and twenty-five (n=25) primary cSCCHN, were analyzed by immunohistochemistry (IHC).

Results: EGFR overexpression was observed in 17/25 (68%) in HNSCC and in 19/25 (76%) in cSCCHN cases. Concerning ALK, 23/25 (92%) and 21/25 (84%) demonstrated low expression in HNSCC and cSCCHN cases respectively. In HNSCCs, EGFR expression was associated with patient's gender (p=.007), whereas ALK expression was marginally correlated with stage (p=.048). ALK overexpression was detected at advanced-stage EGFR-positive cases. Concerning cSCCHN, we found no relation between EGFR or ALK expression and various clinicopathological parameters. Interestingly enough, ALK expression – although weak in the majority of cases - was significantly correlated with EGFR overexpression (p=.038).

Conclusion: EGFR overexpression is frequently observed in HNSCC and cSCCHNs combined with low ALK expression. ALK expression in cSCCHNs tends to become more evident in late carcinomas which overexpress EGF receptor.

ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΙ ΟΡΟΙ

Πίνακας 42: Αρκτικόλεξα, συντμήσεις και επιστημονικοί όροι που συναντώνται στο παρόν πόνημα

AK	<i>Actinic Keratosis / Ακτινική Κεράτωση</i>
Akt	<i>Protein kinase B / Πρωτεϊνική κινάση B</i>
ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma / Αναπλαστικό Μεγαλοκυτταρικό Λέμφωμα</i>
ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma / Αναπλαστικό Λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase / Κινάση Αναπλαστικού Λεμφώματος</i>
AREG	<i>Amphiregulin / αμφιρεγκουλίνη</i>
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate / Τριφωσφορική Αδενοσίνη</i>
BCC	<i>Basal Cell Carcinoma / Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα</i>
CD246	<i>Cluster of Differentiation 246 / Αντιγόνο διαφοροποίησης 246</i>
cSCC	<i>Cutaneous Squamous Cell Carcinoma / Πλακώδες καρκίνωμα δέρματος</i>
cSCCHN	<i>Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck / πλακώδες καρκίνωμα δέρματος που εντοπίζεται στη κεφαλή και τον τράχηλο</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor / επιδερμικός αυξητικός παράγοντας</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor / Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα</i>
EML4	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 / Εχινοδερμική πρωτεΐνη 4 που συνδέεται στους μικροσωληνίσκους</i>
EPN	<i>Erigon or epithelial mitogen / Επιγένη ή επιθηλιακό μιτογόνο</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration / Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων Αμερικής</i>
HARP	<i>Heparin Affinity Regulatory Peptide / Ρυθμιστικό πεπτίδιο με συγγένεια στην ηπαρίνη</i>
HBNF	<i>Heparin – Binding Neurotrophic Factor / Νευροτροφικός Παράγων που προσδέεται στην Ηπαρίνη</i>
HMGB-1	<i>High Mobility Group Box 1 / Κουτί ομάδας 1 Υψηλής κινητικότητας</i>

HNSCC or SCCHN	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinomas / Πλακώδη Καρκινώματα Κεφαλής και Τραχήλου</i>
HRcSCC	<i>High Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma / Υψηλού κινδύνου πλακώδες καρκίνωμα δέρματος</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry / ανοσοϊστοχημεία</i>
LSCC	<i>Laryngeal Squamous Cell Carcinoma / Πλακώδες καρκίνωμα του λάρυγγα</i>
Ltk	<i>Leucocyte tyrosine kinase / Λευκοκυτταρική τυροσινική κινάση</i>
MCC	<i>Merkel Cell Carcinoma / Καρκίνωμα από κύτταρα Merkel</i>
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase 9 / Μεταλλοπεπτιδάση Εξωκυττάριας Ουσίας 9</i>
NPM	<i>Nucleophosmin / Νουκλεοφωσμίνη</i>
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinomas / Πλακώδη καρκινώματα στόματος</i>
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma / Πλακώδες καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας</i>
OSF - 1	<i>Osteoblast – Specific Factor 1 / Ειδικός οστεοβλαστικός παράγων 1</i>
TGF-α	<i>Transforming Growth Factor – α / μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας α</i>
TKIs	<i>Tyrosine Kinase Inhibitors / Αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης</i>
UVR	<i>Ultra-Violet Radiation / Υπεριώδης Ακτινοβολία</i>

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chong CR, Jänne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1389–400.
2. Yu C-H, Xing F-Y, Zhang J-Y, Xu J-Q, Li Y-C. A combination of mRNA expression profile and miRNA expression profile identifies detection biomarkers in different tumor stages of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(21):7296–304.
3. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev*. 2014 Mar;40(2):300–6.
4. Soura E, Chasapi V, Stratigos AJ. Pharmacologic treatment options for advanced epithelial skin cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2015 Jul 3;16(10):1479–93.
5. Wollina U. Update of cetuximab for non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2014 Feb;14(2):271–6.
6. Jiang M, Zhang H, Xiao H, Zhang Z, Que D, Luo J, et al. High expression of c-Met and EGFR is associated with poor survival of patients with glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Nov 8 [cited 2020 Jan 20]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7356>
7. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Oral Cavity, Pharyngeal, and Laryngeal Cancer Screening (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cited 2020 Apr 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65776/>
8. Alfieri S, Carenzo A, Platini F, Serafini MS, Perrone F, Galbiati D, et al. Tumor Biomarkers for the Prediction of Distant Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2020 Apr 9;12(4).
9. Li L, Wang X-L, Lei Q, Sun C-Z, Xi Y, Chen R, et al. Comprehensive immunogenomic landscape analysis of prognosis-related genes in head and neck cancer. *Sci Rep*. 2020 Apr 14;10(1):6395.
10. Μάρτης Χ, Μάρτης Κ. Στοματογναθοπροσωπική Χειρουργική. Vol. Α. Αθήνα: Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις; 2003.
11. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 27;345(26):1890–900.
12. Hutchinson M-KND, Mierzwa M, D’Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*. 2020 Mar 10;

13. Kozakiewicz P, Grzybowska-Szatkowska L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Mar 20 [cited 2020 Apr 18]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8300>
14. Deschler D, Moore M, Smith R. QUICK REFERENCE GUIDE TO TNM Staging of Head and Neck Cancer and Neck Dissection Classification. 4th ed. American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation; 2014.
15. Fong PY, Tan SH, Lim DWT, Tan EH, Ng QS, Sommat K, et al. Association of clinical factors with survival outcomes in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). Hsieh JC-H, editor. *PLOS ONE*. 2019 Nov 20;14(11):e0224665.
16. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):3988–93.
17. Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2012 Jun;132(6):574–82.
18. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2003 Jan;442(1):1–7.
19. Fujii S, Uryu H, Akashi K, Suzuki K, Yamazaki M, Tahara M, et al. Clinical significance of KRAS gene mutation and epidermal growth factor receptor expression in Japanese patients with squamous cell carcinoma of the larynx, oropharynx and hypopharynx. *Int J Clin Oncol*. 2013 Jun;18(3):454–63.
20. Devlin JG, Langer CJ. Combined modality treatment of laryngeal squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007 Mar;7(3):331–50.
21. Dionysopoulos D, Pavlakis K, Kotoula V, Fountzilas E, Markou K, Karasmanis I, et al. Cyclin D1, EGFR, and Akt/mTOR pathway: Potential prognostic markers in localized laryngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol*. 2013 Mar;189(3):202–15.
22. Mäkitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009 Sep;9(9):1251–60.
23. Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Predictive factors of neck metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. Towards an integrated clinico-molecular classification. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-facc*. 2006 Dec;26(6):326–34.
24. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93–9.

25. Riihilä P, Nissinen L, Knuutila J, Rahmati Nezhad P, Viiklepp K, Kähäri V-M. Complement System in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 19;20(14):3550.
26. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvey J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2015 Sep;51(14):1989–2007.
27. Bander TS, Nehal KS, Lee EH. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Dermatol Clin*. 2019 Jul;37(3):241–51.
28. Fu T, Aasi SZ, Hollmig ST. Management of High-Risk Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Curr Treat Options Oncol*. 2016 Jul;17(7):34.
29. Uribe P, Gonzalez S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract*. 2011 Jun 15;207(6):337–42.
30. D'Souza J, Clark J. Management of the neck in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Apr;19(2):99–105.
31. Wollina U, Tchernev G, Lotti T. Chimeric Monoclonal Antibody Cetuximab Targeting Epidermal Growth Factor-Receptor in Advanced Non-Melanoma Skin Cancer. *Open Access Maced J Med Sci*. 2017 Dec 31;6(1):152–5.
32. Starska. Impact of EGFR immunoexpression on STAT3 activation and association with proinflammatory/regulatory cytokine pattern in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep [Internet]*. 2009 Jul 6 [cited 2020 Jan 19]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/or/21/2/539>
33. Tsiambas E, Stavrakis I, Lazaris AC, Karameris A, Patsouris E. Evaluation of epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 alterations in squamous cell carcinoma of the larynx, using chromogenic in situ hybridization on tissue microarrays. *J Laryngol Otol*. 2007 Jun;121(6):563–70.
34. Braut T, Krstulja M, Rukavina KM, Jonjić N, Kujundžić M, Manestar ID, et al. Cytoplasmic EGFR Staining and Gene Amplification in Glottic Cancer: A Better Indicator of EGFR-driven Signaling? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Oct;22(9):674–80.
35. Tsiambas E, Stamatelopoulos A, Karameris A, Panagiotou I, Rigopoulos D, Chatzimichalis A, et al. Simultaneous EGFR and VEGF alterations in non-small cell lung carcinoma based on tissue microarrays. *Cancer Inform*. 2007 Jan 12;3:275–84.
36. Khan MH, Alam M, Yoo S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2011 Sep;37(9):1199–209.

37. Jiang H, Yang B-B. p53, epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in laryngeal squamous cell carcinoma are not predictive markers for the effect of adjuvant radiotherapy. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2009 Jan;129(1):101–7.
38. Wollina U. Cetuximab in non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Jul;12(7):949–56.
39. Cassell A, Grandis JR. Investigational EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Jun;19(6):709–22.
40. Yin VT, Pfeiffer ML, Esmaeli B. Targeted Therapy for Orbital and Periocular Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2013;29(2):87–92.
41. Liu F, Du J, Xian J, Liu Y, Liu S, Lin Y. Improved therapeutic effectiveness by combining recombinant p14ARF with antisense complementary DNA of EGFR in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2015 Nov;36(6):763–71.
42. Lee HJ, Xu X, Choe G, Chung DH, Seo J-W, Lee JH, et al. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer*. 2010 Jun;68(3):375–82.
43. Krawczyk P, Nicoś M, Ramlau R, Powrózek T, Wojas-Krawczyk K, Sura S, et al. The Incidence of EGFR-Activating Mutations in Bone Metastases of Lung Adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2014 Jan;20(1):107–12.
44. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Exp Biol Med*. 2010 Aug;235(8):907–20.
45. Shang C, Guo Y, Fu S, Fu W, Sun K. SH3GL2 gene participates in MEK-ERK signal pathway partly by regulating EGFR in the laryngeal carcinoma cell line Hep2. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2010 Jun;16(6):BR168-173.
46. Starska K, Brys M, Forma E, Glowacka E, Lewy-Trenda I, Stasikowska O, et al. Impact of EGFR immunoexpression on STAT3 activation and association with proinflammatory/regulatory cytokine pattern in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2009 Feb;21(2):539–48.
47. Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med*. 2011 Nov;12(66):419–32.
48. Chou Y-T, Lin H-H, Lien Y-C, Wang Y-H, Hong C-F, Kao Y-R, et al. EGFR Promotes Lung Tumorigenesis by Activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc Pathway That Targets the Ets2 Transcriptional Repressor ERF. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8822–31.

49. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med*. 2019 16;51(1):1–14.
50. Cao S, Xia M, Mao Y, Zhang Q, Donkor PO, Qiu F, et al. Combined oridonin with cetuximab treatment shows synergistic anticancer effects on laryngeal squamous cell carcinoma: involvement of inhibition of EGFR and activation of reactive oxygen species-mediated JNK pathway. *Int J Oncol*. 2016 Nov;49(5):2075–87.
51. Almadori G, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Exarchakos G, et al. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer*. 1999 Apr 20;84(2):188–91.
52. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996 Oct;74(8):1253–7.
53. Kontić M, Milovanović J, Čolović Z, Poljak NK, Šundov Ž, Sučić A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015 Feb;272(2):401–5.
54. Starska K, Głowacka E, Lewy-Trenda I, Stasikowska O, Łukomski M. EGFR immunoexpression and peripheral blood cytokine secretion as potential biomarkers of tumor behavior in laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2009 Oct;15(10):CR518-527.
55. Kong A, Leboucher P, Leek R, Calleja V, Winter S, Harris A, et al. Prognostic value of an activation state marker for epidermal growth factor receptor in tissue microarrays of head and neck cancer. *Cancer Res*. 2006 Mar 1;66(5):2834–43.
56. Krecicki T, Jeleń M, Zalesska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jeleń-Krzeszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol*. 1999 Mar;35(2):180–6.
57. Resnick JM, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995 Sep;104(9 Pt 1):685–94.
58. Chen L, Aria AB, Silapunt S, Migden MR. Emerging Nonsurgical Therapies for Locally Advanced and Metastatic Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2019;45(1):1–16.
59. Bumpous J. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma to the parotid and cervical lymph nodes: treatment and outcomes. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Apr;17(2):122–5.
60. Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol Res*. 2013 Feb;68(1):68–94.

61. Zhao Z, Verma V, Zhang M. Anaplastic lymphoma kinase: Role in cancer and therapy perspective. *Cancer Biol Ther*. 2015 Dec 2;16(12):1691–701.
62. Della Corte CM, Viscardi G, Di Liello R, Fasano M, Martinelli E, Troiani T, et al. Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. *Mol Cancer*. 2018 Dec;17(1):30.
63. Huang H. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Receptor Tyrosine Kinase: A Catalytic Receptor with Many Faces. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 2;19(11):3448.
64. Pizzi M, Gaudiano M, Todaro M, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase: activating mechanisms and signaling pathways. *Front Biosci Sch Ed*. 2015 Jun 1;7:283–305.
65. Cao S, Nambudiri V. Anaplastic Lymphoma Kinase in Cutaneous Malignancies. *Cancers*. 2017 Sep 12;9(12):123.
66. Werner MT, Zhao C, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase: the ultimate oncogene and therapeutic target. *Blood*. 2017 16;129(7):823–31.
67. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol*. 2011 Aug;47(1):R11–23.
68. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8(1):11–23.
69. Ouyang X, Barling A, Lesch A, Tyner JW, Choonoo G, Zheng C, et al. Induction of anaplastic lymphoma kinase (ALK) as a novel mechanism of EGFR inhibitor resistance in head and neck squamous cell carcinoma patient-derived models. *Cancer Biol Ther*. 2018 Oct 3;19(10):921–33.
70. Huang T-T, Gonzales CB, Gu F, Hsu Y-T, Jadhav RR, Wang C-M, et al. Epigenetic deregulation of the anaplastic lymphoma kinase gene modulates mesenchymal characteristics of oral squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2013 Aug;34(8):1717–27.
71. Tsiambas E, Athanasiou AE, Fotiades PP, Ragos V. Impact of EGFR and ALK deregulation in oral squamous cell carcinomas: a significant molecular landscape. *J BUON Off J Balk Union Oncol*. 2017 Feb;22(1):278–9.
72. Kong D, Zhang G, Ma H, Jiang G. miR-1271 inhibits OSCC cell growth and metastasis by targeting ALK. *Neoplasma*. 2015;62(4):559–66.
73. Kim SM, Kim MJ, Jung HA, Sun J-M, Choi Y-L, Ko Y-H, et al. Presence of anaplastic lymphoma kinase translocation in sarcomatoid carcinoma of head and neck and treatment effect of crizotinib: A case series. *Head Neck*. 2015 May;37(5):E66-69.

74. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, Dagrada GP, Paielli N, Licitra L, et al. Absence of ALK and MET alterations in head and neck sarcomatoid carcinoma. *Oral Oncol*. 2016 Jul;58:e4–5.
75. Ning H, Mitsui H, Wang CQF, Suárez-Fariñas M, Gonzalez J, Shah KR, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a potential therapeutic target in Basal Cell Carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2013 Dec 26 [cited 2020 Feb 19];4(12). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/1357>
76. Veija T, Koljonen V, Bohling T, Kero M, Knuutila S, Sarhadi VK. Aberrant expression of ALK and EZH2 in Merkel cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2017 Dec;17(1):236.
77. Filtenborg-Barnkob BE, Bzorek M. Expression of anaplastic lymphoma kinase in Merkel cell carcinomas. *Hum Pathol*. 2013 Aug;44(8):1656–64.
78. Veija T, Kero M, Koljonen V, Böhling T. ALK and EGFR expression by immunohistochemistry are associated with Merkel cell polyomavirus status in Merkel cell carcinoma. *Histopathology*. 2019 May;74(6):829–35.
79. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18 Suppl):32S-40S.
80. Shroff GS, Benveniste MF, de Groot PM, Wu CC, Viswanathan C, Papadimitrakopoulou VA, et al. Targeted Therapy and Imaging Findings: *J Thorac Imaging*. 2017 Sep;32(5):313–22.
81. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang H-Z, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7350–6.
82. Boeckx C, Weyn C, Vanden Bempt I, Deschoolmeester V, Wouters A, Specenier P, et al. Mutation analysis of genes in the EGFR pathway in Head and Neck cancer patients: implications for anti-EGFR treatment response. *BMC Res Notes*. 2014 Jun 4;7:337.
83. Skoulidis F, Papadimitrakopoulou VA. Personalized Medicine Tackles Clinical Resistance: Alectinib in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Progressing on First-Generation ALK Inhibitor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Nov 1;22(21):5177–82.
84. Zenali MJ, Weissferdt A, Solis LM, Ali S, Tang X, Mehran RJ, et al. An update on clinicopathological, immunohistochemical, and molecular profiles of colloid carcinoma of the lung. *Hum Pathol*. 2015 Jun;46(6):836–42.
85. Gonzales CB, De La Chapa JJ, Saikumar P, Singha PK, Dybdal-Hargreaves NF, Chavez J, et al. Co-targeting ALK and EGFR parallel signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2016 Aug;59:12–9.

86. Fogarty GB, Conus NM, Chu J, McArthur G. Characterization of the expression and activation of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*. 2007 Jan;156(1):92–8.
87. Gaber R, Watermann I, Kugler C, Reinmuth N, Huber RM, Schnabel PA, et al. Correlation of EGFR expression, gene copy number and clinicopathological status in NSCLC. *Diagn Pathol*. 2014 Sep 17;9:165.
88. Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Watkins C, Parums DV, et al. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: Comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*. 2008 Mar;112(5):1114–21.
89. Bhargava R, Chen B, Klimstra DS, Saltz LB, Hedvat C, Tang LH, et al. Comparison of two antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in colorectal carcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1857–62.
90. Penault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, Bibeau F, Bralet M-P, Rochaix P, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncol Rep*. 2006 Dec;16(6):1173–9.
91. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A Novel, Highly Sensitive Antibody Allows for the Routine Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 1;16(5):1561–71.
92. Taheri D, Zahavi DJ, Del Carmen Rodriguez M, Meliti A, Rezaee N, Yonescu R, et al. For staining of ALK protein, the novel D5F3 antibody demonstrates superior overall performance in terms of intensity and extent of staining in comparison to the currently used ALK1 antibody. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2016 Sep;469(3):345–50.
93. Papalas JA, Kulbacki E, Wang E. Anaplastic lymphoma kinase (ALK1) immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology; an update. *Am J Dermatopathol*. 2013 Jun;35(4):403–8; quiz 409–11.
94. Carballeira A, Ginarte M, Diniz-Freitas D, Fernández-Campos I. Immunohistochemical evaluation of EGFR expression in lip squamous cell carcinoma. Correlation with clinicopathological characteristics. *Histol Histopathol*. 2014 Mar 31;(29):641–8.
95. Lee B-S, Kim H-J, Hwang J-W, Cheong KH, Kim K-A, Cha H-Y, et al. The Dual Inhibition of Met and EGFR by ME22S, a Novel Met/EGFR Bispecific Monoclonal Antibody, Suppresses the Proliferation and Invasion of Laryngeal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(6):2046–53.
96. Ch'ng S, Low I, Ng D, Brasch H, Sullivan M, Davis P, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2008 Mar;39(3):344–9.

97. Shimizu T, Izumi H, Oga A, Furumoto H, Murakami T, Ofuji R, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatol Basel Switz.* 2001;202(3):203–6.
98. Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Crickx B, Avril M-F. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer Res.* 2005 Apr;25(2B):1205–10.
99. Nazmi MN, Dykes PJ, Marks R. Epidermal growth factor receptors in human epidermal tumours. *Br J Dermatol.* 1990 Aug;123(2):153–61.
100. Lavrijsen AP, Tieben LM, Ponc M, van der Schroeff JG, van Muijen GN. Expression of EGF receptor, involucrin, and cytokeratins in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of the skin. *Arch Dermatol Res.* 1989;281(2):83–8.
101. Cañueto J, Cardeñoso E, García JL, Santos-Briz Á, Castellanos-Martín A, Fernández-López E, et al. Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2017 May;176(5):1279–87.
102. Alter M, Satzger I, Mattern A, Kapp A, Gutzmer R. Treatment of Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinomas with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Dermatology.* 2013;227(4):289–94.
103. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401–4.
104. Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Sep 10;27(26):4232–5.
105. Petrelli F, Coinu A, Riboldi V, Borgonovo K, Ghilardi M, Cabiddu M, et al. Concomitant platinum-based chemotherapy or cetuximab with radiotherapy for locally advanced head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of published studies. *Oral Oncol.* 2014 Nov;50(11):1041–8.
106. Li Y, Wang J, Wang F, Wang H, Wang J, Zeng X, et al. Tissue microarray analysis reveals the expression and prognostic significance of phosphorylated AktThr³⁰⁸ in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Nov;116(5):591–7.
107. Knowles JA, Golden B, Yan L, Carroll WR, Helman EE, Rosenthal EL. Disruption of the AKT pathway inhibits metastasis in an orthotopic model of head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope.* 2011 Nov;121(11):2359–65.

