



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Μελέτη κλινικοπαθολογοανατομικών και
ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων με προβλεπτική
και προγνωστική αξία στο Καρκίνωμα Αγνώστου
Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) και ανάπτυξη
Προγνωστικού Αλγόριθμου**

Πετράκης Δημήτριος
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Μελέτη κλινικοπαθολογοανατομικών και
ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων με προβλεπτική
και προγνωστική αξία στο Καρκίνωμα Αγνώστου
Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) και ανάπτυξη
Προγνωστικού Αλγόριθμου**

Πετράκης Δημήτριος
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«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 του κ. Πετράκη Δημητρίου: 4-10-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 695^α/2-11-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Πενθερουδάκης Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας

Μέλη

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-1-2011

«Μελέτη κλινικοπαθολογοανατομικών και ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων με προβλεπτική και προγνωστική αξία στο Καρκίνωμα Αγνώστων Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) και ανάπτυξη Προγνωστικού Αλγόριθμου».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 773^α/16-12-2014

1. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Γούσια Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Πενθερουδάκης Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Τσιλίδης Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μαγκλάρα Αγγελική Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-2-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Αισθάνομαι την ανάγκη στο τέλος αυτής της διαδρομής να εκφράσω:

Προς τον καθηγητή κ Νικόλαο Παυλίδη την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου για τα όσα μου προσέφερε, τόσο στα στενά πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής όσο και έξω από αυτά, και τα οποία συνοψίζονται στην φράση «ευ ζην».

Στην καθηγήτρια κ. Βασιλική Μαλάμου –Μήτση για την βοήθεια στην περαίωση της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα μου κ. Γεώργιο Πενθερουδάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση στήριξη και βοήθεια σε όλα τα στάδια της διδακτορικής διατριβής.

Την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Άννα Γούσια για την ανεξάντλητη δύναμη με την οποία καθοδήγησε την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των δειγμάτων.

Όλους εκείνους που βοήθησαν στη δημιουργία αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	9
Περιεχόμενα πινάκων	11

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	15
Επιδημιολογία.....	17
Κλινική εικόνα- Φυσική ιστορία.....	19
Παθολογοανατομικά στοιχεία- Οπτικό μικροσκόπιο- Ανοσοϊστοχημεία.....	22
Βιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου.....	28
Διαγνωστική προσέγγιση	34
Θεραπεία.....	37
Προγνωστικοί και Προβλεπτικοί παράγοντες	44
Στόχοι της μελέτης	50

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Ανάπτυξη προγνωστικού αλγόριθμου

Εισαγωγή.....	55
Μέθοδοι και χαρακτηριστικά ασθενών.....	58
Αποτελέσματα	59
Δημογραφικά ασθενών και χαρακτηριστικά όγκου	59
Θεραπευτική προσέγγιση και έκβαση.....	59
Μονοπαραγοντική ανάλυση.....	61
Πολυπαραγοντική ανάλυση και ανάλυση CART.....	65

B. Μελέτη μοριακών δεικτών

Εισαγωγή.....	71
Ασθενείς και μέθοδοι.....	74
Ασθενείς	74
Ιστικές μικροσυστοιχίες	74

Ανοσοϊστοχημεία	76
Ανοσοϊστοχημικά σημεία θετικότητας (cut offs)	77
Στατιστική ανάλυση.....	79
Αποτελέσματα.....	80
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	109
ABSTRACT.....	113
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Πίνακας 1.** Συχνότητα και επίπτωση των ασθενών με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές του κόσμου.
- Πίνακας 2.** Κλινικο-παθολογικός διαχωρισμός των ασθενών με ΚΑΠΕ.
- Πίνακας 3.** Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες στη βοήθεια διαφοροδιάγνωσης όγκων αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.
- Πίνακας 4.** Ποσοστά έκφρασης κυτταροκινών στα διάφορα καρκινικά κύτταρα
- Πίνακας 5.** Επικύρωση αποτελεσμάτων ανίχνευσης γονιδιακού προτύπου με κλινικοπαθολογοανατομικό έλεγχο ή/και μεταγενέστερή ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας.
- Πίνακας 6.** Απαραίτητος έλεγχος για τη διάγνωση καρκίνου αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.
- Πίνακας 7.** Επιβίωση ασθενών με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας πτωχής πρόγνωσης σε μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, φάσης 2.
- Πίνακας 8.** Επιλεγμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα χαμηλής τοξικότητας για την παρηγορητική αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.
- Πίνακας 9.** Ανακεφαλαίωση της διάγνωσης και θεραπείας των ασθενών με ΚΑΠΕ.
- Πίνακας 10.** Παράμετροι με προγνωστική αξία σε παλαιότερες μελέτες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. Ανάπτυξη προγνωστικού αλγόριθμου

- Πίνακας 11.** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και χαρακτηριστικά όγκων
- Πίνακας 12.** Θεραπεία και έκβαση
- Πίνακας 13.** Διάμεση ολική επιβίωση για κάθε κλινικοπαθολογοανατομική υποομάδα ΚΑΠΕ.
- Πίνακας 14.** Προγνωστικοί παράγοντες μετά από μονοπαραγοντική ανάλυση

Πίνακας 15. Εργαστηριακά ευρήματα με προγνωστική αξία στην μονοπαραγοντική ανάλυση

Πίνακας 16. Ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες σε πολυπαραγοντική ανάλυση

B. Μελέτη μοριακών δεικτών

Πίνακας 17. Χαρακτηριστικά των ασθενών.

Πίνακας 18. Αθροιστικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υπό μελέτη βιομορίων

Πίνακας 19. Συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των βιομορίων με κλινικά, παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 20. Συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των διαφόρων βιομορίων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 21. Προγνωστική επίδραση των βιομορίων στην ολική επιβίωση σε ασθενείς με ΚΑΠΕ

Πίνακας 22. Προγνωστική επίδραση των βιομορίων στην ολική επιβίωση στις κλινικές υποομάδες των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 23. Προβλεπτική αξία διαφόρων βιομορίων ασθενών με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 24. Πολυπαραγοντική ανάλυση βιομορίων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Το καρκίνωμα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελεί μια ετερογενή οντότητα χαρακτηριζόμενη από την παρουσία μονήρους ή πολλαπλών μεταστατικών εστιών χωρίς να μπορεί να καθοριστεί η πρωτοπαθής εστία, ακόμη και μετά από εκτενή διαγνωστικό έλεγχο. Η ετερογένεια της νόσου, οφείλεται στην παθολογική δυνατότητα που έχει κάθε ανθρώπινο κύτταρο να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα καθιστώντας το κατά συνέπεια πιθανή πρωτοπαθή εστία κάθε μεταστατικής βλάβης.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν το φαινόμενο αυτό. Το μικρό μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας που διαφεύγει του ελέγχου, η παρουσία νεοπλασίας με πρόωμη ικανότητα μετάστασης που στη συνέχεια υποστρέφει ή παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στην αρχική εστία χωρίς να δίνει άλλη συμπτωματολογία, βιολογικά φαινόμενα που προκαλούν όχι τόσο την τοπική ανάπτυξη του όγκου αλλά την μεταστατική ανάπτυξη του, αλλά και η συμμετοχή ανοσολογικών μηχανισμών που επιτίθενται στον όγκο καταστρέφοντάς τον, ενώ διαφεύγουν οι μεταστάσεις, είναι κάποιες από αυτές. [1]

Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, αν πρόκειται για τεχνητή οντότητα μεταστατικών όγκων, στους οποίους απλά δεν ανευρίσκεται κάποια πρωτοπαθής εστία λόγω ατελούς ιατρικής απεικόνισης/διαγνωστικής προσπέλασης ή αν πρόκειται για μία διακριτή κλινική οντότητα με γενετικές/φαινοτυπικές εκτροπές, οι οποίες της προσδίδουν μία ιδιαίτερη συμπεριφορά. [2] Οι μελέτες εκείνες που ασχολήθηκαν με τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, την ανευπλοειδία και την υπερέκφραση γονιδίων δεν έχουν καταφέρει να δείξουν αυξημένο ποσοστό παρουσίας ενός εκ των αναφερόμενων ανωμαλιών μη στηρίζοντας τουλάχιστον προς το παρόν, την άποψη ότι ίσως πρόκειται για μία ξεχωριστή κλινική οντότητα. [3-7] Υπάρχει παρόλα αυτά η κοινή πεποίθηση ότι η ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας θα επιφέρει και την καλύτερη πρόγνωση, χωρίς αυτό να έχει αποδειχτεί.

Οι τελευταίες τέσσερις δεκαετίες έδωσαν βήμα- βήμα μια ώθηση στην κατανόηση του ΚΑΠΕ. Αρχικά στις πρώτες δεκαετίες η βελτίωση των απεικονιστικών κυρίως τεχνικών επέφερε την καλύτερη αντίληψη αλλά και τον ορισμό της νόσου ως ΚΑΠΕ. Στη συνέχεια επετεύχθη ο διαχωρισμός, σε ευνοϊκής και πτωχής πρόγνωσης ομάδες ασθενών μέσα από παθολογοανατομικά, κλινικά ευρήματα. Μετέπειτα η χρήση

της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης αλλά και η μελέτη του γονιδιακού προφίλ εξέλιξαν και βελτίωσαν την διάγνωση, την κατηγοριοποίηση αλλά και τη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών. Τέλος η πρωτεομική και γενομική ανάλυση έφτασαν πλέον σε εκείνα τα ερευνητικά επίπεδα που θα μας δίνουν συνεχώς νέα στοιχεία για την ακόμη καλύτερη αντίληψη της νόσου. [8]

Παρά την εξέλιξη τόσο των εργαστηριακών τεχνικών (βιοχημικοί δείκτες, απεικονιστικές τεχνικές, ανοσοϊστοχημεία και μοριακές τεχνικές) η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΚΑΠΕ παραμένει ένα στοίχημα στην καθ' ημέρα κλινική πράξη.

Επιδημιολογία

Το 2-5% των νεοδιαγνωσθέντων με κακοήθεια περιστατικών, ετησίως, χαρακτηρίζονται ως ΚΑΠΕ. Στις Ην. Πολιτείες της Αμερικής σύμφωνα με τα δεδομένα της στατιστικής υπηρεσίας καταγραφής της χώρας (SEER- Surveillance, epidemiology and end results) αποτελεί το 2% [9] αν και όπως πιστεύετε από τους ειδικούς, λόγω πιθανόν κακής εκτίμησης της νόσου από το ιατρικό περιβάλλον, το ποσοστό αυτό πιθανόν να αγγίζει το 4-5 % όλων των κακοηθειών, [10] περίπου δηλαδή 80.000 με 90.000 ασθενείς κάθε χρόνο στις Ην. Πολιτείες Αμερικής. Στην Ευρώπη διαγιγνώσκονται 5,3 έως 6,7 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους ετησίως. [11]

Ο **πίνακας 1** παρουσιάζει την συχνότητα και την επίπτωση με την οποία παρουσιάζεται το ΚΑΠΕ σε χώρες του κόσμου όπου υπάρχει καταγραφή δεδομένων.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, στις χώρες εκείνες στις οποίες υπάρχει καταγραφή δεδομένων φαίνεται να υπάρχει μείωση της επίπτωσης. Τελευταίες αναφορές από τις Ην. Πολιτείες της Αμερικής καταδεικνύουν μείωση της τάξης του 0,7%, από 3,9 σε 3,2% σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του SEER cancer Statistics Review. Η ίδια πηγή αποδίδει την μείωση της επίπτωσης στην ευκολότερη και εγκυρότερη ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας λόγω της εξέλιξης- βελτίωσης των διαγνωστικών μέσων (απεικονιστικών και μη).

Τα δύο φύλα προσβάλλονται σχεδόν εξίσου, με μικρές διαφοροποιήσεις στις υπάρχουσες μελέτες υπέρ του ενός ή του άλλου φύλου. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 60 περίπου έτη, [12-13] ενώ στα παιδιά απαντάται σε ποσοστό μικρότερο του 1%. [14] Το ΚΑΠΕ αποτελεί τον 7ο πιο συχνό τύπο καρκίνου όμως η θνητότητα του είναι τέτοια που τον κατατάσσει στη 4^η θέση. [15]

Είναι δύσκολο να ανιχνευθούν αιτιολογικοί παράγοντες ή παράγοντες κινδύνου σε έναν τόσο ετερογενή τύπο καρκίνου. Παρόλα αυτά νέες σχετικά μελέτες φαίνεται να αποδίδουν στο κάπνισμα, αλλά και στην αυξημένη περιφέρεια μέσης την αύξηση κινδύνου εμφάνισης της νόσου αλλά και την αύξηση του κινδύνου θανάτου. Πιο συγκεκριμένα οι βαρείς καπνιστές (πάνω από 26 τσιγάρα την ημέρα) έχουν αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου και του κινδύνου θανάτου κατά 3,66 και 5,66 αντίστοιχα, ενώ και η αύξηση της περιφέρειας μέσης αυξάνει κατά 30 % τον κίνδυνο εμφάνισης. [16] Σε πρόσφατη ανάλυση της Σουηδικής υπηρεσίας καταγραφής ανιχνεύτηκε ποσοστό 2,8% σχετιζόμενο με οικογενή ΚΑΠΕ [17] Σε συγκεκριμένες

υποομάδες του ΚΑΠΕ ανιχνεύονται παράγοντες ρίσκου όμοιοι με εκείνους που παρατηρούνται στην κακοήθεια της πιθανής πρωτοπαθούς εστίας, όπως για παράδειγμα ο ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Human papillomavirus -HPV) για το καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου. [18-19]

Πίνακας 1. Συχνότητα και επίπτωση των ασθενών με ΚΑΠΕ στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές του κόσμου.

Γεωγραφική περιοχή	Αρχή έρευνας	Συχνότητα* (%)	Επίπτωση (ανά 100.000)	Περίοδος
Σκωτία-[20]	Scottish Cancer Registry	3,9	-	1961-2010
Ολλανδία [11]	Eindhoven Cancer Registry	4	-	1984-1992
Ην. Πολιτείες Αμερικής [9]	SEER	3.6	4,1	1973-2010
Αυστραλία[21]	AGC	2,5	10,7-12,7	2010
Ρωσία- (Σοβ. Ένωση) [22]	-	3.6	-	-
Γερμανία [23]	-	7,8	-	1968-1984
Ελβετία [24]	-	2,3	-	1984-1993
Φινλανδία[25]	IARC	2,5	-	
Σουηδία [26]	SFCD		6,0-6,98	1987-2008
Ην. Βασίλειο [27]	Cancer Research UK	3,0	-	2011
Ιαπωνία [28]	IARC	3.0	-	-

IARC: International Agency for Research into Cancer, SEER: Surveillance epidemiology End-Results, SFCD: Swedish Family Cancer Database, AGC: Australian Government-Cancer

*Συχνότητα: Ποσοστό επί των κακοηθειών που διαγιγνώσκονται ετησίως

Κλινική εικόνα- Φυσική ιστορία

Η φυσική ιστορία του ΚΑΠΕ διαφέρει από εκείνων που εκδηλώνονται με συμπτωματολογία από τον πρωτοπαθή όγκο. Ουσιαστική ειδοποιό διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι εκδηλώνονται αρχικά με μεταστάσεις οι οποίες στο 50% των περιπτώσεων είναι πολυεστιακές [27-32] κυρίως σε ήπαρ, πνεύμονες, οστά και λεμφαδένες. [30-31] Στο 20-50% των ασθενών ακόμη και μετά από αυτοψία δεν ανευρέθηκε η πρωτοπαθής εστία, [32-34] ενώ σε εκείνους που ανευρέθηκε, η πρωτοπαθής εστία ήταν κυρίως το πάγκρεας, ο πνεύμονας και το παχύ έντερο στο 60%.

Οι περισσότεροι ασθενείς, κατά 80% ανήκουν στην υποομάδα εκείνη που έχει πτωχή πρόγνωση. Πρόκειται δηλαδή για ασθενείς που χαρακτηρίζονται από γενικευμένη και συστηματική νόσο με πολλές σπλαγχνικές μεταστάσεις. Σε αυτούς προεξάρχουν γενικά συμπτώματα όπως αδυναμία, καταβολή, ανορεξία, πυρετική κίνηση, απώλεια βάρους αλλά και σημεία όπως ασκίτης, ηπατομεγαλία και διόγκωση λεμφαδένων. Η χορήγηση εμπειρικής χημειοθεραπείας που συνήθως επιλέγεται για αυτούς επιτυγχάνει μικρή διάμεση επιβίωση περίπου 12 μήνες.

Αντιθέτως το υπόλοιπο 20% των ασθενών που ανήκει στην υποομάδα των ευνοϊκής πρόγνωσης ΚΑΠΕ, παρουσιάζει συμπτώματα ή σημεία που έχουν να κάνουν με την τοπικό-περιοχική ανάπτυξη του όγκου όπως για παράδειγμα η παρουσία λεμφαδενικής μάζας σε ασθενείς με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς του τραχήλου ή της μασχάλης. Οι ασθενείς αυτής της υποομάδας έχουν σαφώς καλύτερη επιβίωση και μεγαλύτερο όφελος από την λήψη θεραπείας. Πιο αναλυτικά:

1. Γυναίκες με ορώδες θηλώδες περιτοναϊκό αδενοκαρκίνωμα-πρωτοπαθές καρκίνωμα του περιτοναίου

Οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν κλινικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των γυναικών που πάσχουν από καρκίνο ωοθηκών σταδίου III ή IV, αν και η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου (55-65 έτη) είναι κατά 7 έτη μεγαλύτερη.

Πιο συγκεκριμένα οι ασθενείς εμφανίζουν διάταση της κοιλιακής χώρας, ασκίτη, κοιλιακό άλγος, ατελή ειλέο, ψηλαφητές ενδοκοιλιακές μάζες. Στον εργαστηριακό έλεγχο αυτών των ασθενών θα πρέπει να αναζητήσει κανείς την αύξηση του Ca125, η οποία παρατηρείται σε ποσοστό 70-90%. [35]

2. Γυναίκες με αδenoκαρκίνωμα μασχαλιαίων λεμφαδένων

Αποτελεί το 0,7% των ασθενών με ΚΑΠΕ. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 52 έτη. Η νόσος σε αυτή την υποομάδα εμφανίζεται με συμπτώματα και σημεία παρόμοια με εκείνα των ασθενών με καρκίνο μαστού σταδίου II ή III. Η πρωτοπαθής εστία είναι ανιχνεύσιμη μέσω μαστογραφίας, μαγνητικής τομογραφίας ή μαστεκτομή σε ποσοστά 20%, 40-60% και 70%. [36-39]

3. Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής

Είχε αρχικά θεωρηθεί ως καρκίνωμα εξωγοναδικό εκ γεννητικών κυττάρων, όμως η αύξηση της α-εμβρυικής πρωτεΐνης και της β ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης, καθώς και η ανίχνευση στον καρύοτυπο του ισοχρωμοσώματος 12 απαντάται μόνο στο 20%.

Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 56 έτη, αρκετά πιο μεγάλη από εκείνη των ασθενών με εξωγοναδικό όγκο. [40]

4. Νευροενδοκρινές καρκίνωμα αγνώστου πρωτοπαθούς

Αποτελούν το 5% των ΚΑΠΕ και το 13% των νευροενδοκρινών όγκων. Κατηγοριοποιούνται σε χαμηλής και καλής διαφοροποίησης, με τα μεν πρώτα (διάμεση επιβίωση 12-15,5 μήνες) να έχουν μια επιθετική συμπεριφορά τα δε δεύτερα με καλύτερη επιβίωση (διάμεση επιβίωση 40 μήνες) και συμπτώματα που σχετίζονται περισσότερο στην έκκριση πεπτιδίων. [41-42]

5. Πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων κεφαλής τραχήλου

Εμφανίζεται κυρίως με την μονόπλευρη διόγκωση λεμφαδένων της άνω και μέσης τραχηλικής περιοχής. Αποτελούν το 5% των ΚΑΠΕ. [19, 43]

6. Αδenoκαρκίνωμα με ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά καρκίνου παχέως εντέρου, CDX2 (+), CK20(+) και CK7(-)

Εμφανίζεται σε ηλικία 42-75 έτη, συνήθως με γενικά συμπτώματα και τους περισσότερους από τους ασθενείς να έχουν περιτοναϊκές ή/και σπλαχνικές μεταστάσεις (κυρίως στο ήπαρ). Η κολonosκόπηση είναι φυσιολογική. [44-45]

7. Ασθενείς με μονήρη μετάσταση

Παρουσιάζουν μονήρη μετάσταση σε λεμφαδένες, οστά, εγκέφαλο ή επινεφρίδια. [46]

8. Ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων βουβωνικής χώρας

Εμφανίζονται συνήθως με διόγκωση των λεμφαδένων της περιοχής χωρίς άλλο συνοδό σύμπτωμα.

9. Ασθενείς με βλαστικές μεταστάσεις οστών και αυξημένο προστατικό αντιγόνο (PSA)

Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζονται με οστικά κυρίως άλγη ενώ ο εργαστηριακός τους έλεγχος επιβεβαιώνει την παρουσία οστεοβλαστικών μεταστάσεων και αυξημένου PSA στον ορό ή ανοσοιστοχημική έκφραση στον όγκο. [46-48]

Η ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας είναι προγνωστική για την διάμεση επιβίωση αφού ο κίνδυνος θανάτου είναι κατά 30% περίπου μικρότερος για τους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο και γνωστή πρωτοπαθή εστία που έλαβαν χημειοθεραπεία έναντι των ασθενών με ΚΑΠΕ. [49] Δεν είναι όμως σαφές αν η διαφορά έκβασης οφείλεται σε διαφορετική βιολογία όγκου, σε διαφορετικά χαρακτηριστικά ασθενών (ηλικία, γενική κατάσταση, φορτίο νόσου) ή σε διαφορετικές χορηγηθείσες θεραπείες.

Παθολογοανατομικά στοιχεία

Οπτικό μικροσκόπιο- Ανοσοϊστοχημεία

Η ιστολογική εξέταση παραμένει ακόμα και στις μέρες μας η εξέταση εκλογής για τη διάγνωση της κακοήθειας. Η παθολογοανατομική εξέταση βασιζόμενη στο οπτικό μικροσκόπιο διαφοροποιεί και διαγιγνώσκει 5 διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους:

- Καλής ή μέσης διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα στο 60% των περιπτώσεων
- Πτωχά διαφοροποιημένο καρκίνωμα στο 30%
- Πλακώδες καρκίνωμα στο 5%
- Πτωχά διαφοροποιημένο νεόπλασμα απαντάται περίπου στο 4% των περιπτώσεων
- Νευροενδοκρινές καρκίνωμα στο υπολειπόμενο 1%

Αυτός ο πρώτος ιστολογικός διαχωρισμός δεν βοήθησε αρκετά την κλινική ιατρική ώστε να μπορέσει να διακρίνει τους ασθενείς εκείνους που θα μπορούσαν να βοηθηθούν από τα υπάρχοντα θεραπευτικά μέσα εκείνης της περιόδου. Έτσι λοιπόν τα επόμενα χρόνια με τη σύγχρονη βοήθεια της κλινικής ιατρικής, των καρκινικών δεκτών και της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης επετεύχθη ο διαχωρισμός των ασθενών σε ασθενείς ευνοϊκής και πτωχής πρόγνωσης όπως περιγράφεται στον **πίνακα 2**. [50-51]

Αν και η πλειονότητα των ασθενών ανήκει στην ομάδα πτωχής πρόγνωσης, το 20-30% των ασθενών συγκαταλέγονται σε εκείνη με ευνοϊκή πρόγνωση και κατά συνέπεια μπορούν να ανταποκριθούν σε εξατομικευμένη τοπικό-περιοχική ή και συστηματική θεραπεία, παρουσιάζοντας αύξηση της διάμεσης επιβίωσής τους. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με παρουσία της νόσου μόνο σε λεμφαδενικό ιστό φθάνει τους 6-9 μήνες ενώ όταν υπάρχει και εξωλεμφαδενική παρουσία της νόσου τότε η επιβίωση πέφτει στους 2-4 μήνες. [52-55] Οι ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης παρουσιάζουν διάμεση επιβίωση από 12 έως 36 μήνες. [52]

Όπως αναδεικνύεται και από τον **πίνακα 2** η εξέλιξη της ανοσοϊστοχημείας ήταν εκείνη που κατάφερε ακόμη περισσότερο να συνταιριάζει την μεταστατική βλάβη με μια πιθανή πρωτοπαθή εστία. Πιο συγκεκριμένα η εκμετάλλευση της ανοσοϊστοχημείας μαζί με την ιστολογική ανάγνωση και την κλινική εξέταση καταφέρνει την ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας σε μεγαλύτερο ποσοστό

Πίνακας 2. Κλινικο-παθολογικός διαχωρισμός των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης	Ομάδα πτωχής πρόγνωσης
Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής	Μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα σε ήπαρ ή άλλα όργανα
Γυναίκες με ορώδες θηλώδες περιτοναϊκό αδενοκαρκίνωμα	Κακοήθης ασκίτης από μη θηλώδες αδενοκαρκίνωμα
Χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινές καρκίνωμα	Πολλαπλές εγκεφαλικές μεταστάσεις από αδενοκαρκίνωμα ή πλακώδες καρκίνωμα
Πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων κεφαλής τραχήλου	Πολλαπλές πνευμονικές ή πλευριτικές μεταστάσεις από αδενοκαρκίνωμα ή καρκίνωμα
Γυναίκες με αδενοκαρκίνωμα μασχαλιαίων μόνο λεμφαδένων	Πολλαπλές μη βλαστικές οστικές μεταστάσεις από αδενοκαρκίνωμα που δεν εκφράζει ή παράγει PSA
Αδενοκαρκίνωμα με ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά καρκίνου παχέως εντέρου, CDX2 (+), CK20(+) και CK7(-)	
Ασθενείς με μονήρη μετάσταση	
Ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων βουβωνικής χώρας	
Ασθενείς με βλαστικές μεταστάσεις οστών και αυξημένο προστατικό αντιγόνο (PSA) σε ιστό ή ορό	

περιστατικών που κυμαίνεται από 30% και αγγίζει το 70% σε κάποιες μελέτες. [56-66] Επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο σε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό ασθενών η ανίχνευση πρωτοπαθούς εστίας, η κατηγοριοποίησή του και η εξατομίκευση της θεραπευτικής προσέγγισης του ασθενούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ομάδα των ασθενών η οποία παρουσιάζει ανοσοϊστοχημικό πρότυπο CK7(-), CK20(+), CDX2(+),- **πίνακας 3-** παρόμοιο με εκείνο των όγκων παχέως εντέρου, στους οποίους η χορήγηση ίδιας θεραπείας με εκείνη των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο παχέως εντέρου επιφέρει και την ίδια διάμεση επιβίωση των 30 μηνών περίπου. [58]

Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες στη βοήθεια διαφοροδιάγνωσης όγκων αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΟΓΚΟΥ
Pan-cytokeratin AE1/3(+), EMA(+), S100(-), CLA(-), vimentin(-),CK7,CK20 variable	Καρκίνωμα
CLA(+),Pan-cytokeratin AE1/3(-),EMA(-), S100(-)	Λέμφωμα
S100(+),HMB45(+), melan-A(+), pan-cytokeratin (-), CLA(-)	Μελάνωμα
Vimentin(+), desmin(+), CD117(+),myogen(+), factorVIIIantigen(+), pan-cytokeratin AE1/3 (συνήθως-), S100(συνήθως -), CLA(-), HMB45(-), melanA(-)	Σάρκωμα
Epithelial stains(+), chromogranin (+), synaptophysin(+)	Νευροεδοκρινείς όγκοι
	ΕΙΔΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ
CK7(-), CK20(+), CDX2(+)	Καρκίνωμα παχέως εντέρου
CK7(+), CK20(-), TTF1(+)	Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα
CK7(+), CK20(-), P63(+), CK5/6(+)	Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα
TTF(+), chromogranin(+), synaptophysin(+)	Νευροενδοκρινές καρκίνωμα πνεύμονα (μικροκυτταρικό-μεγαλοκυτταρικό)
CK7(+), ER(+), PR(+), GCDFP(+), her2/neu(+), mammoglobin(+)	Καρκίνωμα μαστού
CK7(+), ER(+), WT1(+), mesothelin(+)	Καρκίνωμα ωοθηκών
CK20(+), CK5/^(+), P63(+)	Καρκίνωμα μεταβατικών κυττάρων ουροδόχου κύστης
PSA(+), CK7(-), CK20(-),	Καρκίνωμα προστάτη
CK7(+),Ca19.9(+), mesothelin(+)	Καρκίνωμα παγκρέατος
RCC(+), CD10(+), pan-cytokeratin AE1/3(+)	Καρκίνωμα νεφρού
Hepar1(+), CD10(+)	Καρκίνωμα ήπατος
Alpha-inhibin(+), melanA(+), CK7(-), CK20(-)	Καρκίνωμα επινεφριδίου
PLAP(+), OCT4(+)	Καρκίνωμα γεννητικών κυττάρων
Thyroglobulin(+), TTF1(+)	Καρκίνωμα θυρεοειδούς

EMA: epithelial membrane antigen, S100: calcium binding protein expressed in melanocytes, CLA: common leukocyte antigen, CK: cytokeratin, HMB45: antihuman melanosome antibody, melanA: melanoma antigen, CD117: tyrosin kinase receptor (c-kit), CDX2: intestinal specific transcription factor, TTF1: thyroid transcription factor, p63: tumor suppression gene protein, PSA: prostate specific antigen, RCC: brush border of proximal kidney tubule antibody, ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, GCDFP: gross cystic fluid protein 15, WT1: Wilm's tumor transcription factor, CD10: common acute lymphocytic leukemia antigen, Hepar1: hepatocyte paraffin1 marker, PLAP: placental alkaline phosphatase, OCT4: octamen binding transcription. [59, 60-65]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη συνδυασμένων κυτταροκινών λόγω σχετικής ειδικότητας στα διάφορα καρκινικά κύτταρα – **πίνακας 4-** [60] όπως για παράδειγμα το CK20 σε όγκους γαστρεντερικού, βλεννώδη καρκινώματα ωθηκών μεταβατικού επιθηλίου και άλλα. Αναφέρονται στη βιβλιογραφία ποσοστά ευαισθησίας κατάδειξης της πρωτοπαθούς εστίας της τάξης του 80% [64-67] αν και η επιβεβαίωση της επιτυγχάνεται στο 30% των περιστατικών που υποβλήθηκαν σε αυτοψία. Το υψηλό κόστος και το σχετικά μετριασμένο όφελος της ανοσοϊστοχημείας οδήγησε τους ειδικούς στην προσπάθεια καθιέρωσης της χρήσης της ανοσοϊστοχημείας με το δυνατό μικρότερο κόστος και το μεγαλύτερο όφελος. Για το λόγο αυτό υπάρχει η προσπάθεια περιορισμού το δυνατόν περισσότερο της ανοσοϊστοχημείας στον έλεγχο κυρίως των κυτταροκινών στην καθημερινή ιατρική πράξη και συμμόρφωσης με αλγόριθμους.

Πίνακας 4. Ποσοστά έκφρασης κυτταροκινών στα διάφορα καρκινικά κύτταρα.

CK7+, CK20+		%	CK7-, CK20+		%
Βλεννώδες ωθηκών		95	Αδενοκαρκίνωμα π. εντέρου		80
Μεταβατικού επιθηλίου		65	Αδενοκαρκίνωμα Merkel		75
Αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος		65	Αδενοκαρκίνωμα στομάχου		35
Χολαγγειοκαρκίνωμα		65			
Αδενοκαρκίνωμα στομάχου		40			
CK7+, CK20-		%	CK7-, CK20-		%
Μη βλενώδες ωθηκών		100	Επινεφριδίου		100
Θυρεοειδούς		100	Σεμίνωμα		95
Μαστού		90	Προστάτη		85
Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα		90	Ηπατοκυτταρικό		80
Ενδομητριοειδές ενδομητρίου		85	Νεφρικό αδενοκαρκίνωμα		80
Εμβρυικό		80	Καρκινοειδές		80
Μεσοθηλίωμα		65	Πλακώδες και μικροκυτταρικό πνεύμονα		75
Μεταβατικού επιθηλίου		35	Πλακώδες Οισοφάγου		70
Πάγκρεας		30	Πλακώδες Κεφαλής τραχήλου		70
Χολαγγειοκαρκίνωμα		30	Μεσοθηλίωμα		35

Επί του παρόντος και στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση υπάρχουν περιορισμοί όπως η έλλειψη τυποποιημένης προσέγγισης στην τεχνική της χρώσης, η υποκειμενικότητα του παθολογοανατόμου που θα αναγνώσει την εξέταση, η ετερογένεια του βιοπτικού υλικού και οι παράγοντες που επηρεάζουν την

αντιγονικότητα. Περιορισμοί που ίσως οδηγούν στη μικρότερη αποδοτικότητα-ευαισθησία της συγκεκριμένης τεχνικής και εξηγούν εν μέρει το γεγονός ότι η χρήση της δεν έχει επιφέρει αύξηση στην επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Το αμέσως επόμενο βήμα της επιστημονικής κοινότητας και αφού ήδη από τα προηγούμενα χρόνια υπήρξε η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας ήταν η εφαρμογή της σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, με την ελπίδα να ανιχνευθεί η πρωτοπαθής εστία και να χορηγηθεί ανάλογη θεραπεία.

Από τη δεκαετία 1990 και με την ανακάλυψη της τεχνικής των μικροσυστοιχιών DNA άρχισε η προσπάθεια καταγραφής όλων εκείνων των γονιδίων που υπερεκφράζονται και χαρακτηρίζουν συγκεκριμένους όγκους είτε στη πρωτοπαθή βλάβη είτε στη μεταστατική. [52,53] Έτσι λοιπόν με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας (μικροσυστοιχίες DNA, real time polymerase chain reaction είτε για messenger RNA είτε για microRNA) η επιστημονική κοινότητα κατάφερε σε πρώτη φάση να ταυτοποιήσει μεταστατικές βλάβες σε ήδη γνωστές πρωτοπαθείς εστίες με ακρίβεια 90% [68-72] Αν και η πρόκληση ήταν μεγάλη στο να μπορέσει επιτέλους με μεγαλύτερη ακρίβεια να ταυτοποιηθεί η πρωτοπαθής εστία, υπήρχαν βασικές δυσκολίες αφού δεν ήταν εφικτό να βρεθεί η πρωτοπαθής εστία και να επιβεβαιωθεί ή όχι το αποτέλεσμα της ταύτισης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν έμμεσα στοιχεία προερχόμενα είτε από τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών αναλύσεων είτε από την κλινική εικόνα και τον εργαστηριακό έλεγχο του ασθενούς είτε από την απεικονιστική εύρεση της πρωτοπαθούς εστίας σε μεταγενέστερη εξέταση είτε ακόμη και μετά από αυτοψίες. [73-76] **Πίνακας 5.** Διάφορες μελέτες στις οποίες έγινε χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας επιβεβαίωσαν τελικά ταύτιση του αποτελέσματος σε ποσοστό ως και 90%. [77-78] Το κλινικό όφελος από την αναγνώριση της πρωτοπαθούς εστίας μέσω μοριακών τεχνικών, σε επίπεδο διάμεσης επιβίωσης δεν έχει ακόμη αποδοθεί παρά μόνο σε μια μικρή μελέτη [78] του Hainsworth JD et al όπου και επιβεβαιώθηκε στους ασθενείς εκείνους που πήραν θεραπεία διάμεση επιβίωση που φθάνει τους 12,5 μήνες ενώ εκείνη της υποομάδας που έλαβε εμπειρική χημειοθεραπεία μόνο 5 μήνες.

Σε πρόσφατη τυφλή πολυκεντρική μελέτη η διαγνωστική ακρίβεια μιας μοριακής τεχνικής συγκρίθηκε με εκείνη της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης σε ασθενείς με γνωστή πρωτοπαθή νόσο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακρίβεια και στις δύο τεχνικές είναι σχεδόν ίδια, 89% έναντι 83% αντιστοίχως. [79] Παρόμοια αποτελέσματα

Πίνακας 5. Επικύρωση αποτελεσμάτων ανίχνευσης γονιδιακού προτύπου με κλινικοπαθολογοανατομικό έλεγχο ή/και μεταγενέστερή ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας.

Μελέτες	Δοκιμασία	Αριθμός ασθενών/ Κλινικοπαθολογο ανατομική επικύρωση αποτελέσματος	Μετάγχρονη επικύρωση αποτελέσματος
Tothill et al.72	μικροσυστοιχίες	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Talantov et al.83	RT-PCR	22 ασθενείς 17 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Bridgewater et al.84	μικροσυστοιχίες	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Monzon et al.85	μικροσυστοιχίες	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Varadhachary et al.45	RT-PCR	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Horlings et al.75	μικροσυστοιχίες	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	Δεν έγινε
Greco et al.86	RT-PCR	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)	13 ασθενείς 11 επικυρώσεις (85%)
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction Κλινικοπαθολογοανατομικός έλεγχος: κλινικός και παθολογοανατομικός έλεγχος (ανοσοϊστοχημεία) Μεταγενέστερος έλεγχος: απεικόνιση- αυτοψία			

επιτεύχθηκαν σε έτερη μελέτη με ποσοστά ακρίβειας 79% για την μοριακή τεχνική έναντι 73% για την ανοσοϊστοχημεία. [80]

Σήμερα κυκλοφορούν στις αγορές αρκετά τεστ ανίχνευσης γονιδιακού προτύπου τα οποία φθάνουν να ελέγχουν ταυτόχρονα ως και 2000 γονίδια με ευαισθησία 88% και ειδικότητα 99%. Επειδή όμως το κόστος της εξέτασης είναι υψηλό, η ευαισθησία τους δεν παρουσιάζει αισθητή διαφορά από τις υπόλοιπες τεχνικές με τα ως τώρα δεδομένα και επειδή μένει ακόμη να αποδειχθεί το κλινικό όφελος της στη διάμεση επιβίωση αυτά τα τεστ βρίσκονται ακόμη σε περιορισμένη χρήση στην καθ' ημέρα ιατρική πράξη. [81-83]

Βιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου

Η χρήση της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας έχει τα τελευταία χρόνια φτάσει στο πλαφόν δραστηριότητας, σε όλους σχεδόν τους τύπους μεταστατικής κακοήθειας. Ακόμα και στους ασθενείς με ΚΑΠΕ, κυρίως εκείνους που ανήκουν στην ομάδα πτωχής πρόγνωσης, η διάμεση επιβίωση των 12 μηνών δεν έχει ξεπεραστεί. [87]

Την τελευταία δεκαετία περίπου η στοχεύουσα θεραπεία αποτελεί την πιο εξελίξιμη μορφή θεραπείας. Για την εξέλιξή της χρειάστηκε η βαθύτερη εξερεύνηση της βιολογίας του καρκίνου. Η έλλειψη γνώσης της βιολογικής συμπεριφοράς του οποιουδήποτε τύπου καρκίνου αποτελεί τροχοπέδη όχι μόνο για την κατανόηση της νόσου αλλά, και για την θεραπευτική της αντιμετώπιση.

Ακόμη και σήμερα η βιολογική συμπεριφορά του ΚΑΠΕ παραμένει μυστήριο. Η μεγάλη ετερογένεια που παρουσιάζει η νόσος δυσκολεύει ακόμη περισσότερο τις προσπάθειες διερεύνησης της. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο και η στοχεύουσα θεραπεία δεν έχει ακόμη βρει τη θέση της σε αυτή τη μορφή κακοήθειας. Παρόλα αυτά βήματα προς την αποκατάσταση αυτής της έλλειψης έχουν γίνει.

Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις

Οι κυριότερες που έχουν περιγραφεί αφορούν τα χρωμοσώματα 1,6,7,11 και 12, με το τελευταίο να είναι ίσως εκείνο που έδωσε την πιο γνωστή χρωμοσωμική αναδιάταξη.

Στο χρωμόσωμα 1, η απαλοιφή του άκρου p αλλά και το ισοχρωμόσωμα 1q έχουν περιγραφεί στα 12 από τα 13 περιστατικά με ΚΑΠΕ στη μελέτη του Abbruzzese et al. [88] Αντίστοιχα συχνά παρατηρείται και σε συμπαγείς όγκους. [89] Το ισοχρωμόσωμα 12p είναι ίσως εκείνο που έχει δώσει τα περισσότερα δεδομένα. Η παρουσία του σε όγκους με άγνωστη την πρωτοπαθή εστία αποτελεί προβλεπτικό δείκτη ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. [90] Αποτελεί επιπλέον χαρακτηριστικό των όγκων εκ γεννητικών κυττάρων, προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο μια πιθανή πρωτοπαθή εστία σε ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα και λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής.

Η ανευπλοειδία είναι μια άλλη μορφή χρωμοσωμικής αναδιάταξης και μάλιστα περιγράφεται σε ποσοστό 70% σε ασθενείς με ΚΑΠΕ χωρίς όμως να μπορεί να προσδώσει στον όγκο χαρακτηριστικά που τον διαφοροποιούν από άλλες τυπικές μεταστατικές κακοήθειες.

Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια

Η έκφραση αλλά και οι μεταλλάξεις διαφόρων ογκογονιδίων (π.χ c-myc, Ras, Her 2, EGFR, bcl2) όπως και ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση και αγγειογέννηση έχουν πολλάκις μελετηθεί σε δείγματα ασθενών με ΚΑΠΕ.

Η υπερέκφραση των c-myc, Ras και ελέγχεται στο 30% των ασθενών [3] ενώ η υπερέκφραση του Her 2 στο 4-11% [5] Η υπερέκφραση αυτών των γονιδίων δεν φαίνεται να έχει κάποιο σημαντικό ρόλο στην διάγνωση, πρόγνωση ή αντιμετώπιση της νόσου.

Ο υποδοχέας του παράγοντα επιδερμικής ανάπτυξης (EGFR- epidermal growth factor receptor) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας ο οποίος ελέγχει την κυτταρική επιβίωση τον πολλαπλασιασμό αλλά και την αναστολή της απόπτωσης. Επομένως μεταλλάξεις του υποδοχέα είναι ικανές να διαταράζουν την λειτουργία της απόπτωσης του κυττάρου και να επάγουν τον πολλαπλασιασμό του αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την επιβίωσή του. Η αύξηση αυτή συνεπάγεται συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών και εμφάνιση πρώιμου μεταστατικού φαινοτύπου. [91] Με βάση τα προηγούμενα σε ασθενείς με ΚΑΠΕ οι γενετικές διαταραχές του υποδοχέα EGFR θα μπορούσαν να αποτελούν ιδανικό δείκτη για την νόσο ενώ από τη στιγμή που υπάρχει αντι-EGFR αγωγή θα υπήρχε καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση.

Πράγματι στο ΚΑΠΕ η έκφραση του EGFR φθάνει σε ποσοστό 66% ενώ υψηλού βαθμού έκφραση παρουσίασε το 35% σύμφωνα με τη μελέτη του Massard et al. Αν και η ανταπόκριση στην πλατίνα ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με αυξημένη έκφραση του EGFR η επιβίωση δεν παρουσίασε διαφορά. [92] Το ίδιο αποτέλεσμα παρουσίασε και η Dona et al. όπου σε 50 δείγματα διερευνήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση, η παρουσία ενεργών μεταλλάξεων αλλά και το εύρος των επαναλαμβανόμενων βάσεων κυτοσίνης- αδενοσίνης σε ιντρόνιο του υποδοχέα. Το συμπέρασμα επιβεβαίωσε την απουσία μοριακού προβλεπτικού δείκτη σε αυτούς τους ασθενείς. [91]

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το bcl-2 γονίδιο είναι ελεγκτής αποπτωτικού μιτοχονδριακού μονοπατιού και κατά συνέπεια της κυτταρολογικής επιβίωσης. Υπερέκφραση του bcl-2 παρουσιάζουν πολλοί όγκοι. [93]

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης του bcl-2 έδειξε θετικότητα της τάξης του 65% ενώ η υπερέκφραση στο 40% των δειγμάτων χωρίς όμως παρά τα υψηλά ποσοστά να ορίζεται κάποια προγνωστική αξία. [94] Σε αντίθεση ο συνδυασμός της υπερέκφρασης του bcl-2 και του P53, που απαντάται στο 20 % των ασθενών ΚΑΠΕ αποτελεί προβλεπτικό δείκτη, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν καλύτερη ανταπόκριση στη λήψη χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα.

Το P53 είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια. Πρόκειται για γονίδιο που ελέγχει την κυτταρολογική απάντηση σε καταστάσεις κυτταρολογικού στρες με τον έλεγχο της απόπτωσης, της επιδιόρθωσης του DNA, της γενετικής σταθερότητας και της γήρανσης του κυττάρου. Μεταλλάξεις του γονιδίου σχετίζονται σε αρκετούς τύπους κακοήθειας όπως ο καρκίνος του μαστού, της κεφαλής- τραχήλου και του ήπατος.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του P53 αναφέρεται σε διάφορες μελέτες στο 50-70% [94] ενώ οι μεταλλάξεις του γονιδίου αναγνωρίζονται στο 26%. [95] Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται είτε σε παρουσία μεταλλάξεων σε διαφορετικά εξώνια από εκείνα που αξιολογήθηκαν στη μελέτη (μελετήθηκαν τα εξώνια 5-9), είτε σε κάποιο επιγενετικό φαινόμενο είτε τέλος σε προβλήματα που αφορούν την αντιγονικότητα στην ανοσοϊστοχημεία.

Σε νεότερες μελέτες των μονοπατιών Wnt και Hedgehog, μεταλλάξεις των γονιδίων CTNNB1 και MET, οι οποίες παρουσιάζονται σε ποσοστό 6,7 και 20,7 % σε ασθενείς με ΚΑΠΕ συνδέονται με πτωχή προγνωστική αξία (διάμεση ολική επιβίωση 11 έναντι 21 μηνών, $p = 0.015$). [96]

Διαταραχές γονιδίων εμπλεκόμενων στη διαδικασία της μετάστασης.

Λόγο του σημαντικού ρόλου που έχουν στον έλεγχο της διασποράς των καρκινικών κυττάρων σε μεταστατικές εστίες, τα γονίδια αυτής της κατηγορίας έχουν τα τελευταία χρόνια γίνει αντικείμενο μελέτης για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ. [97] Πρόκειται για γονίδια που ελέγχουν τον μεταστατικό φαινότυπο και την ανάπτυξη των δευτεροπαθών εστιών αλλά δεν επηρεάζουν την διαδικασία της μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε κακόηθες.

Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το KISS-1, το οποίο έχει μελετηθεί σε αρκετά είδη κακοήθειας και έχει συνδεθεί με την παρουσία προχωρημένου σταδίου της νόσου αλλά και πτωχή πρόγνωση. Το KISS-1 ενεργοποιώντας την δραστηριότητα της I-kB μπορεί να μειώσει την ικανότητα του NF-kB να προσδεθεί στον promoter της MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) πρωτεΐνης με την επακόλουθη μείωση στην έκφραση του γονιδίου. [98] Η μελέτη της Dova et al κατά την οποία ελέγχθηκαν 50 δείγματα για μεταλλάξεις στα εξόνια 3 και 4 του KISS-1 μέσω RT-PCR, δεν ανέδειξε κάποια μετάλλαξη που θα δικαιολογούσε την διαταραχή στη λειτουργία του συγκεκριμένου γονιδίου. [90] Κατά συνέπεια οι συγγραφείς υποθέτουν την παρουσία κάποιου επιγενετικού μηχανισμού ή την μετάλλαξη σε άλλο εξόνιο από εκείνα που ελέγχθησαν στη μελέτη για να δικαιολογήσουν αυτή τη διαταραχή.

Άλλα γονίδια αυτής της κατηγορίας είναι εκείνα που είναι υπεύθυνα για την εξάντληση των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου χώρου και τον σχηματισμό νέων αγγείων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα MMPs (matrix metalloproteinase-2, MMP-2 and MMP-9) και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Τα τελευταία φαίνεται πως έχουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην αγγειογένεση. Διάφορες μελέτες δεν ανέδειξαν τα MMPs γονίδια σε προγνωστικούς δείκτες. [99-101] Τα TIMPs, αντιθέτως, εκφράζονται στο 80 % των δειγμάτων ενώ στα μισά εξ αυτών υπάρχει υπερέκφραση, που παρατηρείται κυρίως στα πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ. Επιπλέον η παρουσία τους σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση. [102]

Διαταραχές γονιδίων εμπλεκόμενων στη διαδικασία της αγγειογένεσης

Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία εκείνη της δημιουργίας νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα. Πρόκειται για μία φυσιολογική διαδικασία η οποία όμως στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων και λόγω της παραγωγής αγγειογενετικών ουσιών αυξάνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορεί να αναπτυχτεί και να επιζήσει ένας όγκος.

Η παρουσία του φαινομένου της αγγειογένεσης συνδυάζεται με την πυκνότητα των αγγείων, η αύξηση της οποίας σχετίζεται με μεγαλύτερες ή και περισσότερες μεταστάσεις καθώς και χειρότερη επιβίωση. [103]

Ο Hillen et al. συνέκρινε την πυκνότητα της αγγείωσης των ηπατικών μεταστάσεων από ΚΑΠΕ με αυτή των ηπατικών μεταστάσεων από καρκίνο παχέως εντέρου και καρκίνο μαστού, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια ιδιομορφία. [6]

Σε άλλη μελέτη η έκφραση του CD34 (a MVD marker), vascular endothelial growth factor (VEGF) και της thrombospondin-1 (TSP1) εξετάστηκε σε 81 δείγματα ασθενών με την ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν την στενή σχέση της αυξημένης αγγειογένεσης και της υπερέκφρασης του VEGF σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. [7]

Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

Η αναγνώριση των βασικών μοριακών αλλοιώσεων που χαρακτηρίζουν τον ΚΑΠΕ εξελίσσεται αργά.

Με την ανακάλυψη της RT-PCR (real time polymerase chain reaction) δόθηκε το έναυσμα για την μελέτη έκφρασης γονιδίων και την αναγνώριση προτύπων πολυγονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζουν ειδικά τα διάφορα είδη όγκων και μάλιστα με ακρίβεια που σε ορισμένες μελέτες έφτασαν το 90%, [68] ισοσκελίζοντας έτσι το ποσοστό ανίχνευσης της πρωτοπαθούς από αποτελέσματα αυτοψίας. [70] Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας την πολυγονιδιακή έκφραση ενός ΚΑΠΕ με τα πρότυπα πολυγονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζουν διάφορους όγκους γνωστής προέλευσης, επιτυγχάνεται η «βιολογική» ταξινόμηση του ΚΑΠΕ σε κάποιον ιστό προέλευσης. Τα ποσοστά ακρίβειας στην ανίχνευση της πρωτοπαθούς ανιχνεύθηκαν και από άλλες μελέτες με σημαντικότερη εκείνη του Hainsworth et al. Σε αυτή τη μελέτη η ακρίβεια της τεχνικής CancerTYPE ID (bioTheranostics, Inc), έφτασε στο 90 % περίπου. Πρόκειται για μια τεχνική κατά την οποία μελετήθηκαν η έκφραση 92 γονιδίων και με βάση αυτή ανιχνεύθηκε ο ιστός προέλευσης ανάμεσα από 39 ταυτοποιημένους τύπους κακοήθειας. Πέρα από το υψηλό ποσοστό ακρίβειας, αυτή η μελέτη έδειξε διάμεση επιβίωση στους 12,9 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία ειδική για τον ιστό προέλευσης, που φαίνεται υψηλότερη από εκείνη που παρουσιάζουν οι μελέτες που αξιολογούν την επιβίωση μετά τη λήψη εμπειρικής χημειοθεραπείας. [75,82,85,104-106]

Ανάλυση micro RNA (Μη κωδικοποιούντα RNAs) έκφρασης

Η τελευταία ανακάλυψη της μοριακής βιολογίας αποτελείται από τα λεγόμενα μη κωδικοποιούντα RNAs (micro-RNA, mi-RNA). Πρόκειται για μικρά, μονήρους στοιβάδας μόρια RNA με μήκος περίπου τα 22 νουκλεοτίδια τα οποία δεν έχουν ρόλο στην κωδικοποίηση των πρωτεϊνών αλλά στη σύνδεση στο μεταγραφικό RNA (messenger-RNA) και τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είτε με την αποδόμηση του messenger-RNA είτε καταστέλλοντας την μετάφρασή του.

Τα mi-RNA αποτελούν το 2-5% των ανθρωπίνων γονιδίων. Φαίνεται ότι η αποσταθεροποίηση τους μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο τα οδηγούν να συμπεριφέρονται είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια είτε ως ογκογονίδια. [107] Τα διάφορα mi-RNA έχουν πολλαπλές λειτουργίες σε ένα καρκινικό κύτταρο οδηγώντας το στην απορρύθμιση, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη διήθηση και την μετάσταση. [108] Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα mi-RNA εκφράζονται διαφορετικά στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου κάνοντας έτσι την ανίχνευσή τους ειδική για κάθε τύπο καρκίνου. [108-109] Η μελέτη της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων mi-RNA και σύγκριση του πολυγονιδιακού προτύπου με πρότυπα έκφρασης mi-RNA που χαρακτηρίζουν τυπικούς όγκους και αντίστοιχους ιστούς προέλευσης μπορεί να οδηγήσει στην βιολογική ταυτοποίηση του ΚΑΠΕ και αναγνώριση του ιστού προέλευσης. Οι πρώτες μελέτες είδη έχουν δώσει τα αποτελέσματά τους με τη μελέτη του Rosenfeld et al. να επιτυγχάνει ποσοστά ακρίβειας στο 90 % σε 22 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. [110] Ο Lu et al. επιβεβαίωσε τα ποσοστά ακρίβειας καταφέροντας να ταυτοποιήσει την πρωτοπαθή εστία στα 12 από τα 17 δείγματα ασθενών με ΚΑΠΕ σε αντίθεση με την τεχνική ανάλυσης του γονιδιακού προφίλ βασισμένη σε 16000 μεταγραφικά RNA η οποία δεν είχε τόσο επαρκή αποτελέσματα.

Σε άλλη μελέτη με χρήση micro-RNA η επιβεβαίωση της ανίχνευσης της πρωτοπαθούς εστίας έφτασε στο αξιομνημόνευτο ποσοστό του 92% σε 84 δείγματα ασθενών ΚΑΠΕ.[77]

Διαγνωστική προσέγγιση

Η διάγνωση ενός ασθενούς με ΚΑΠΕ είναι διάγνωση εξ αποκλεισμού. Κρίνεται γι αυτό το λόγο απαραίτητη η διερεύνηση της πρωτοπαθούς εστίας και η υποβολή του ασθενούς σε σειρά εξετάσεων όπως αυτές περιγράφονται στον **πίνακα 6**. Το ιατρικό ιστορικό, η φυσική εξέταση, ο πλήρης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος, η γενική εξέταση των ούρων και των κοπράνων, οι απεικονιστικές εξετάσεις (αξονική τομογραφία θώρακος, κοιλίας, οπισθοπεριτοναϊκού χώρου και πυέλου, μαστογραφία), καθώς και η ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση του βιοπτικού υλικού αποτελούν τον βασικό και απαραίτητο διαγνωστικό έλεγχο για όλους τους ασθενείς με πιθανή την διάγνωση της συγκεκριμένης νόσου. [15,111]

Η συνέχεια είναι διαφορετική αφού ασθενείς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά υποχρεούνται να υποβληθούν σε περαιτέρω διαγνωστικό έλεγχο. Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς που στον πρώτο αυτό εργαστηριακό έλεγχο παρουσιάζουν χαρακτηριστικά νευροενδοκρινούς καρκινώματος θα πρέπει μέσω του βαθμού διαφοροποίησης του όγκου να κατηγοριοποιηθούν σε καλής ή χαμηλής διαφοροποίησης. Εκείνοι οι οποίοι έχουν καλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινές καρκίνωμα έχουν καλύτερη πρόγνωση αλλά και χειρότερη ανταπόκριση στη λήψη θεραπείας με βάση την πλατίνα σε σχέση με τους ασθενείς που είναι μέτριας ή και χαμηλής διαφοροποίησης. Οι επιπλέον ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με συναπτοφυσίνη και χρωμογρανίνη κρίνονται απαραίτητες όπως και ο ενδοσκοπικός έλεγχος αναπνευστικού και γαστρεντερικού, καθώς και το σπινθηρογράφημα Octreoscan.

Οι ασθενείς με χαρακτηριστικά πλακώδους καρκινώματος παρουσιάζονται συνήθως με τραχηλική ή βουβονική λεμφαδενοπάθεια. Σε αυτούς τους ασθενείς ο απεικονιστικός έλεγχος με ποσιτρονική /αξονική τομογραφία προσφέρει πιθανή βοήθεια στη λήψη βιοψίας, διευκολύνει τον σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας, καθορίζει την έκταση της νόσου και εξυπηρετεί την επίβλεψη της νόσου. [112-114] Πολλές μικρές μελέτες προσπάθησαν να αποδώσουν έναν πιο ακριβή ρόλο για την PET/CT. (Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων/ Αξονική Τομογραφία) χωρίς να προσφέρουν όμως ασφαλή συμπεράσματα. [115] Στη μελέτη του Moller et al. αξιολογήθηκαν δεδομένα τεσσάρων μικρότερων μελετών και περισυλλέχθηκαν στοιχεία από 152 ασθενείς με εξωτραχηλική νόσο. Σε αυτούς τους ασθενείς ανιχνεύθηκε με τη βοήθεια της PET/CT η πρωτοπαθής εστία σε ποσοστό 39%. Στο 50% η πρωτοπαθής εστία ήταν

στον πνεύμονα. Η ευαισθησία, η ειδικότητα και η ακρίβεια εκτιμήθηκε στο 87%, 88% και 88% αντιστοίχως. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η PET/CT έχει κάποιον ρόλο στην ανίχνευση της πρωτοπαθούς ο οποίος όμως μένει να αποδειχθεί με μεγαλύτερες και τυχαιοποιημένες μελέτες. [36,116-118] Ο Seve et al. αντιθέτως με

Πίνακας 6. Απαραίτητος έλεγχος για τη διάγνωση ΚΑΠΕ.

Κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα
• Ιστολογικά επιβεβαιωμένος μεταστατικός καρκίνος
• Λεπτομερές ιατρικό ιστορικό
• Ολοκληρωμένη κλινική εξέταση (με γυναικολογική καιδακτυλική εξέταση ορθού)
• Ανοσοϊστοχημική ανάλυση βιοψίας
Εργαστηριακές αναλύσεις για όλους τους ασθενείς
• Πλήρης αιματολογικός έλεγχος
• Βιοχημικός έλεγχος
• Γενική ούρων
• Μικροβιολογικός έλεγχος απώλειας αίματος στα κόπρανα
• Ακτινογραφία θώρακος
• Αξονική τομογραφία θώρακος- κοιλίας -πυέλου
Εργαστηριακές αναλύσεις για συγκεκριμένους ασθενείς
• Μαστογραφία-μαγνητική μαστογραφία για όλες τις γυναίκες με λεμφαδενοπάθεια μασχάλης από αδενοκαρκίνωμα
• Υπέρηχος όρχεων για άρρενες με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής
• Ποσιτρονική /αξονική τομογραφία σε πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής τραχήλου
• Αιματολογικός έλεγχος α-εμβρυικής πρωτεΐνης και β ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης
• Αιματολογικός έλεγχος ειδικού προστατικού αντιγόνου για όλους τους άντρες
• Ενδοσκόπηση επί σημείων, συμπτωμάτων ή παρακλινικών
• Σπινθηρογράφημα με οκτρεοτίδη και αιματολογικός έλεγχος χρωμογρανίνης Α επί NET

τη δική του ανασκόπηση συμπεράνει ότι η χρήση της PET/CT σε εξωτραχηλικές βλάβες προσφέρει όφελος σε ασθενείς με μονήρη μετάσταση όπου διακυβεύεται η ίαση. [119]

Στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα τραχήλου, η διενέργεια βρογχοσκόπησης για βλάβες που εντοπίζονται στην κατώτερη τραχηλική περιοχή ή στην υπερκλείδια χώρα κρίνεται απαραίτητη.

Οι ασθενείς με διήθηση βουβονικών λεμφαδένων από πλακώδες καρκίνωμα θα πρέπει να υποβληθούν σε έλεγχο γεννητικών οργάνων όπως επίσης και σε έλεγχο της περιπρωκτικής χώρας και ορθοσιγμοειδοσκόπηση καθότι η διάγνωση της πρωτοπαθούς σε αυτούς καθορίζει την πρόγνωση.

Σε γυναίκες όπου μπορεί κανείς να υποψιαστεί μετά τον πρώτο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο πιθανή πρωτοπαθή εστία στις ωθήκες κρίνεται επιβεβλημένος ο συμπληρωματικός ανοσοϊστοχημικός έλεγχος με WT1 και μεσοθηλίνη αλλά και ο αιματολογικός έλεγχος του Ca125. Στους άντρες ηλικίας άνω των 40 ετών αντιθέτως είναι απαραίτητη η μέτρηση του προστατικού αντιγόνου όταν υπάρχει η υποψία πιθανούς πρωτοπαθούς στον προστάτη αδένα.

Οι άντρες ηλικίας άνω των 65 ετών με μάζα κατά την απεικόνιση μεσοθωρακίου ή οπισθοπεριτοναϊκού χώρου θα πρέπει να υποβληθούν σε βιοχημικό έλεγχο α-εμβρικής πρωτεΐνης και β ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης, υπερηχογράφημα όρχεων καθώς και ανοσοϊστοχημικό έλεγχο PLAP(+), OCT4(+), προς αποκλεισμό πιθανών εξωγοναδικών όγκων.

Τέλος η παρουσία αδenoκαρκινώματος μασχαλιαίας χώρας, κυρίως σε γυναίκες, θέτει την υπόνοια μεταστατικού καρκινώματος με πρωτοπαθή εστία στο μαστό. Για το λόγο αυτό οι συγκεκριμένοι ασθενείς υποβάλλονται σε ανοσοϊστοχημικό έλεγχο CK7(+), ER(+), PR(+), GCDFP(+), her2/neu(+), mammoglobin(+), μαστογραφία αρχικά και μαγνητική τομογραφία μαστού στη συνέχεια. Η μαγνητική τομογραφία μαστού ωφελεί στην ανεύρεση της πρωτοπαθούς κυρίως σε γυναίκες με αυξημένη πυκνότητα μαστών, [120] αλλά και επιτρέπει την καλύτερη εκτίμηση έκτασης της νόσου οδηγώντας έτσι τον χειρουργό ακόμα και σε επεμβάσεις μερικής ή ολικής μαστεκτομής. [121-123]

Σήμερα αν και παρέχεται η δυνατότητα ανάλυσης του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης (gene profiling microarray -GEP) με την χρήση των τεχνικών της μικροσυστοιχίας ή RT-PCR, ακόμη και σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η χρήση τους στην κλινική ιατρική δεν έχει ακόμη εδραιωθεί. [59]

Θεραπεία

Ο διαχωρισμός των ασθενών με ΚΑΠΕ σε ευνοϊκής και πτωχής πρόγνωσης από δύο περίπου δεκαετίες ήταν το πρώτο ίσως βήμα προς την ορθότερη και αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση.

Προ αυτής της εξέλιξης η πλειονότητα των ασθενών υποβαλλόταν σε εμπειρική θεραπεία με μικρά ποσοστά ανταπόκρισης και βελτίωσης της επιβίωσης. Σήμερα, στο 20 % των ασθενών με ΚΑΠΕ (ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης) οι θεραπευτικοί χειρισμοί στις διάφορες υποομάδες έχουν ως εξής:

1. Σε γυναίκες με περιτοναϊκή καρκινώματα:

Το γαστρεντερικό σύστημα, ο πνεύμονας, ο μαστός και φυσικά οι ωοθήκες και το περιτόναιο θα μπορούσαν να αποτελέσουν την πιο πιθανή πρωτοπαθή εστία της διήθησης του περιτοναίου από αδενοκαρκίνωμα. Όταν φυσικά πρόκειται για ορώδες αδενοκαρκίνωμα τότε οι ωοθήκες ή το περιτόναιο είναι το πρώτο όργανο που θα πρέπει να διερευνηθεί. Αν μετά από αυξημένη τιμή Ca125, πλήρη απεικονιστικό έλεγχο ή/ και λαπαροτομία δεν ανευρεθεί βλάβη στις ωοθήκες τότε πρόκειται για πρωτοπαθές καρκίνωμα του περιτοναίου. Η ομοιότητα που παρουσιάζει το γενετικό πρότυπο του συγκεκριμένου καρκινώματος με το καρκίνωμα των ωοθηκών, [76] έχει εφαρμογή και στη θεραπεία με τη χρήση κοινής θεραπευτικής προσέγγισης. Αυτή συνίσταται σε κυτταρομειωτική χειρουργική επέμβαση, και χημειοθεραπευτικό σχήμα (κατά κύριο λόγο συνδυασμός πλατινούχου σκευάσματος και ταξάνης ακόμα και ενδοπεριτοναϊκά όπου υπάρχει η τεχνογνωσία) ενώ επιβεβαιώνεται και από τα παρόμοια ποσοστά ανταπόκρισης και επιβίωσης. Η διάμεση επιβίωση αυτών των ασθενών φθάνει τους 30 μήνες. [124-125]

2. Σε γυναίκες με αδενοκαρκίνωμα μασχαλιαίας χώρας.

Σε αυτές τις ασθενείς ο μαστός αποτελεί την πιο πιθανή πρωτοπαθή εστία, ακόμη περισσότερο αν ανοσοϊστοχημικώς ο όγκος παρουσιάζει θετικότητα σε υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, και *cerb2*. [126]

Η μαγνητική τομογραφία των μαστών ανιχνεύει την πρωτοπαθή εστία σε ποσοστό 44-80% έστω και αν η μαστογραφία είναι αρνητική, ενώ και μετά μαστεκτομής σε ποσοστό 20-30% δεν ανευρίσκεται η πρωτοπαθής εστία. [36,38,127]

Έτσι λοιπόν αυτές οι ασθενείς αντιμετωπίζονται ως καρκίνος μαστού σταδίου II ή III με μαστεκτομή, λεμφαδενικό καθαρισμό, ακτινοθεραπεία περιοχής,

χημειοθεραπεία, και χορήγηση ορμονοθεραπείας και τραστουζουμάμπης ανάλογα, της θετικότητας ή μη, του όγκου στους αντίστοιχους υποδοχείς. Η 5-ετής επιβίωση της νόσου είναι στο 72%. [39] Σε περίπτωση που δεν αναγνωρίζεται πρωτοπαθής εστία στον μαστό, υπάρχει η επιλογή ακτινοθεραπείας του μαστού αντί για μαστεκτομή, με παρόμοια αποτελεσματικό τοπικο-περιοχικό έλεγχο της νόσου.

3 Άντρες με οστικές μεταστάσεις και με αυξημένο προστατικό αντιγόνο αίματος ή θετικότητα στη χρώση του προστατικού αντιγόνου:

Ακόμα και αν τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι τέτοια που δεν προσομοιάζουν εκείνα ενός ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο προστάτη, παρόλα αυτά ο ανδρογονικός αποκλεισμός είναι μια επιλογή. Οι οστεοβλαστικές μεταστάσεις ή η θετική βιοψία προστάτου είναι δύο σημεία που ενισχύουν μια τέτοιου είδους θεραπευτική προσέγγιση. [46,47,128]

4. Ασθενείς με μονήρη μετάσταση:

Η θεραπευτική προσέγγιση αυτών των ασθενών θα πρέπει να βασιστεί στη θεωρία ότι μια πρωτοπαθής βλάβη μπορεί να προσομοιάσει σε μεταστατική. Βάση αυτής της θεωρίας η χειρουργική προσπέλαση για την εκτομή της εστίας αλλά και η λήψη χημειοθεραπείας ή /και ακτινοθεραπείας αποτελούν θεραπευτικά μέσα αυτής της υποομάδας. [46]

5. Καλής και χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινές καρκίνωμα:

Τα καλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινή καρκινώματα αντιμετωπίζονται ως τυπικά καρκινοειδή και λαμβάνουν θεραπεία με οκτρεοτίδη και διάφορα χημειοθεραπευτικά (στρεπτοζοσίνη, δοξορουβικίνη, 5 φθοριοουρακίλη, τεμοζολαμίδη) αλλά και νεότερες θεραπείες όπως sunitinib, everolimus. Αυτά τα νεοπλάσματα παρουσιάζουν αργή εξέλιξη αλλά και κακή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα.

Αντιθέτως τα χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινή καρκινώματα έχουν υψηλότερη ανταπόκριση στην λήψη θεραπείας με βάση την πλατίνα και την ετοποσίδη όπως συμβαίνει και με τα μικροκυτταρικά καρκινώματα. Η προσθήκη ταξάνης δεν προσέδωσε κάτι περισσότερο στην επιβίωση πέραν από αυξημένη τοξικότητα με τη μέση επιβίωση να κυμαίνεται στους 12-15.5 μήνες και την ανταπόκριση στο 50%. [41,42]

6. Ασθενείς με χαρακτηριστικά όγκων εκ γεννητικών κυττάρων:

Αποτελούν υπότυπο των ασθενών με χαμηλής διαφοροποίησης- μέσης γραμμής ΚΑΠΕ και είναι το 20% εξ αυτών.

Έτσι χαρακτηρίζονται ασθενείς με αυξημένα επίπεδα α-εμβρικής πρωτεΐνης και β ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης στον ορό, ηλικίας συνήθως μικρότερης των 50 ετών, κυτταρογενετικές αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 12, με νόσο σε μεσοθωράκιο, οπισθοπεριτόναιο ή/και πνευμονικές μεταστάσεις και μικρής διάρκειας συμπτώματα. Αυτοί οι ασθενείς υποβάλλονται επιτυχώς σε χημειοθεραπεία με βάση την σισπλατίνη όπως και οι μεταστατικοί μη σεμινωματοειδείς όγκοι.

7. Πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων τραχήλου:

Ο ρόλος της ακτινοθεραπείας μαζί με χημειοθεραπεία σε αυτούς τους ασθενείς είναι σήμερα κοινά αποδεκτός. Σε μία μη τυχαιοποιημένη μελέτη η χορήγηση σύγχρονης σισπλατίνη- φθοριοουρακίλη και ακτινοθεραπεία έναντι μόνο ακτινοθεραπείας επέφερε αύξηση των ποσοστών πλήρους ύφεσης (81% έναντι 60%) αλλά και αύξηση στη διάμεση επιβίωση 37 έναντι 24 μηνών). [129] Σε αυτή την υποομάδα και η χειρουργική εξαίρεση (τραχηλικός καθαρισμός) φαίνεται να αποτελεί θεραπευτική επιλογή. [19,43]

8. Αδενοκαρκίνωμα με ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά καρκίνου παχέως εντέρου, CDX2 (+), CK20(+) και CK7(-):

Πρόκειται ίσως για την κατηγορία ασθενών που ευνοήθηκε περισσότερο από την χρήση της ανοσοϊστοχημείας στην καθημερινή ιατρική πράξη, αφού σε μικρές αναδρομικές και προοπτικές σειρές επιτεύχθηκε επιβίωση παρόμοιας με εκείνη των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο παχέως εντέρου, με τους ίδιους θεραπευτικούς χειρισμούς (οξαλιπλατίνη, ιρινοτεκάνη 5 φθοριοουρακίλη, καπεσιταβίνη). Μέση επιβίωση 20-24 μήνες. [44,45]

9. Ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων βουβωνικής χώρας:

Η χειρουργική εξαίρεση και ακτινοθεραπεία αλλά και η χορήγηση χημειοθεραπείας αποτελούν την θεραπεία εκλογής όταν παρά τον πλήρη έλεγχο δεν ανευρίσκεται η πρωτοπαθής εστία.

Το 80% των ασθενών με ΚΑΠΕ δεν ανήκουν σε κάποια από τις υποομάδες ευνοϊκής πρόγνωσης, φέρουν σπλαγχνικές μεταστάσεις υψηλού φορτίου και κατά συνέπεια δεν υπάρχει καμία υποψία για την πιθανή πρωτοπαθή εστία. Οι ασθενείς αυτοί ανήκουν στην υποομάδα ΚΑΠΕ πτωχής πρόγνωσης. Αυτός είναι και ο λόγος που σε αυτή την υποομάδα η επιλογή θεραπείας είναι ξεκάθαρα εμπειρική. [130]

Στον **πίνακα 7** αναφέρονται οι μελέτες φάσης 2 της τελευταίας δεκαετίας για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ, πτωχής πρόγνωσης που έχουν υποβληθεί σε θεραπευτικό σχήμα. Στο σύνολο αυτών των ασθενών η μέση επιβίωση έγκειται στους 9 μήνες.

Σήμερα και μέσα από την εκτίμηση αυτών των αποτελεσμάτων έχουν καθοριστεί συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα όπως αυτά αναφέρονται στον **πίνακα 8**.

Πίνακας 7. Επιβίωση ασθενών με ΚΑΠΕ πτωχής πρόγνωσης σε μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, φάσης 2.

Έτος δημοσίευσης	Αριθμός ασθενών	Σχήμα	Διάμεση επιβίωση (μήνες)	Μονοετής Επιβίωση %	Διετής Επιβίωση %	Τριετής Επιβίωση %
2000 [131]	33	PC	10	25	5	ΔΑ
2001 [132]	34	PFUL	8,3	26	ΔΑ	ΔΑ
	17	CE	6,4			
2003 [133]	30	GemCis	7,2	36	14	ΔΑ
2004 [134]	37	PCis	11	38	11	ΔΑ
2004 [135]	35	GemD	10	43	7	ΔΑ
2004 [136]	102	CDoxE	9	35,3	18	11
2005 [137]	22	PC	6,5	27	ΔΑ	ΔΑ
2006 [138]	66	GemCis	13,6	52	ΔΑ	ΔΑ
	33	GemVCis	9,6	30	ΔΑ	ΔΑ
2006 [139]	51	GemC	7,8	26	12	ΔΑ
2007 [140]	42	PC	8,5	33	17	ΔΑ
2007 [141]	47	OxIri	9,5	40	ΔΑ	ΔΑ
2007 [142]	33	Gem CapeC	7,6	35,6	14,2	ΔΑ
1997-2009 [143-150]	456	Διάφορα σχήματα	9,1	38	19	12
Άθροισμα ασθενών	988		9	35	14	12

Gem, gemcitabine; Cape, capecitabine; Ox, oxaliplatin; Iri, irinotecan; V, vinorelbine; Cis, cisplatin; B, bevacizumab; FU, fluorouracil; C, carboplatin; P, paclitaxel; L, leucovorin; Dox, doxorubicin; E, etoposide; Er, erlotinib; D, docetaxel; ΔΑ: Δεν αναφέρεται

Πίνακας 8. Επιλεγμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα χαμηλής τοξικότητας για την παρηγορητική αντιμετώπιση ασθενών με ΚΑΠΕ.

Χημειοθεραπεία (/m²)	Χρόνος	Διάστημα	Σχόλια
Πακλιταξέλη 175 Καρβοπλατίνη AUC 5	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα
Σισπλατίνη 75 Ετοποσίδη 100	Ημέρα 1 Ημέρες 1-3	Ανά 3 εβδομάδες	Ασθενείς με καλή φυσική κατάσταση, νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά, απαιτείται καλή ενυδάτωση
Δοσεταξέλη 75 Καρβοπλατίνη AUC 5	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα
Καπεσιταβίνη 2000 p.os Οξαλιπλατίνη 85-130	Ημέρες 1-14 Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Διάρροιες, νευροτοξικότητα
Ιρινοτεκάνη 160 Οξαλιπλατίνη 80	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα, διάρροιες
Γεμισιταβίνη 1000 Ιρινοτεκάνη 100	Ημέρα 1 Ημέρες 1 και 8	Ανά 3 εβδομάδες	Διάρροιες
Σισπλατίνη 60-75 Γεμισιταβίνη 1000	Ημέρα 1 Ημέρες 1 και 8	Ανά 3 εβδομάδες	Ασθενείς με καλή φυσική κατάσταση, απαιτείται καλή ενυδάτωση

Η στοχεύουσα θεραπεία αποτελεί την εξέλιξη της ογκολογίας τα τελευταία 10-15 έτη και έχει σε διάφορες μελέτες δοκιμαστεί σε όλους τους τύπους καρκίνου και σε κάποιους εξ αυτών αποτελεί μάλιστα την θεραπεία εκλογής. Δεν θα μπορούσε

Πίνακας 9. Ανακεφαλαίωση της διάγνωσης και θεραπείας των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Ιστολογικός τύπος καρκινώματος	Κλινική αξιολόγηση	Ειδικές εξετάσεις	Υποομάδες	Θεραπεία	Πρόγνωση
Αδενοκαρκίνωμα (καλής ή μέσης διαφοροποίησης)	CT θώρακος κοιλίας,, PSA (άντρες), μαστογραφία (γυναίκες)	Ανοσοϊστοχημεία PSA χρώση (άντρες), ER, PR, (γυναίκες)	1. Γυναίκες με μασχαλαίους λεμφαδένες	1. Ως καρκίνος μαστού	Αύξηση της επιβίωσης με εξειδικευμένη θεραπεία
			2.Γυναίκες με περιτοναϊκή καρκινομάτωση	2. Κυτταρομείωση και χημειοθεραπεία, ως καρκίνος ωοθηκών	
			3.Άντρες με βλαστική οστική μετάσταση και PSA ή PSA χρώση	3.Ορμονοθεραπεία για καρκίνο προστάτη	
			4.Μονήρη μεταστατική εστία	4.Εκτομή, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία	
			5.Πρότυπο π.εντέρου	5. Ως μεταστατικός καρκίνος π. εντέρου	
Πλακώδες	Τραχηλικός λεμφαδένας: πανενδοσκόπηση, PET/CT. Υπερκλείδιοι λεμφαδένες: Βρογχοσκόπηση, PET/CT. Βουβωνικοί λεμφαδένες: εξέταση πυέλου, πρωκτού, ορθοσκόπηση.	Ανοσοϊστοχημεία	1.Τραχηλική λεμφαδενοπάθεια	1. Χ/Κ εκτομή, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία	Αύξηση της επιβίωσης 25-50% 5ετή επιβίωση
			2.Υπερκλείδιοι λεμφαδένες	Ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία	
Καρκίνωμα ή αδενοκαρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης	CT θώρακος κοιλίας,, HCG, AFP	Ανοσοϊστοχημεία, γενετική ανάλυση. Ανάλυση μοριακού προτύπου	1. Άτυπος εξωγοναδικός όγκος (ανωμαλίες χρωμ 12)	Ως γοναδικός όγκος	40-50% ίαση
			2.Λεμφαδενικής επικράτησης νόσος	Θεραπεία με πλατίνα	Αύξηση της επιβίωσης
			3.Στρωματικοί όγκοι (CD 117+)	Ιματινίμπη	Αύξηση της επιβίωσης
Νευροενδοκρινές	CT θώρακος κοιλίας, Octreoscan	Ανοσοϊστοχημεία, γενετική ανάλυση.	1. Καλής διαφοροποίησης	Ως καρκινοειδές	Αύξηση της επιβίωσης
			Μικροκυτταρικό ή όγκος της ομάδας Ewing Χαμηλής διαφορ.	Σισπλατίνη και ετοποσίδη	

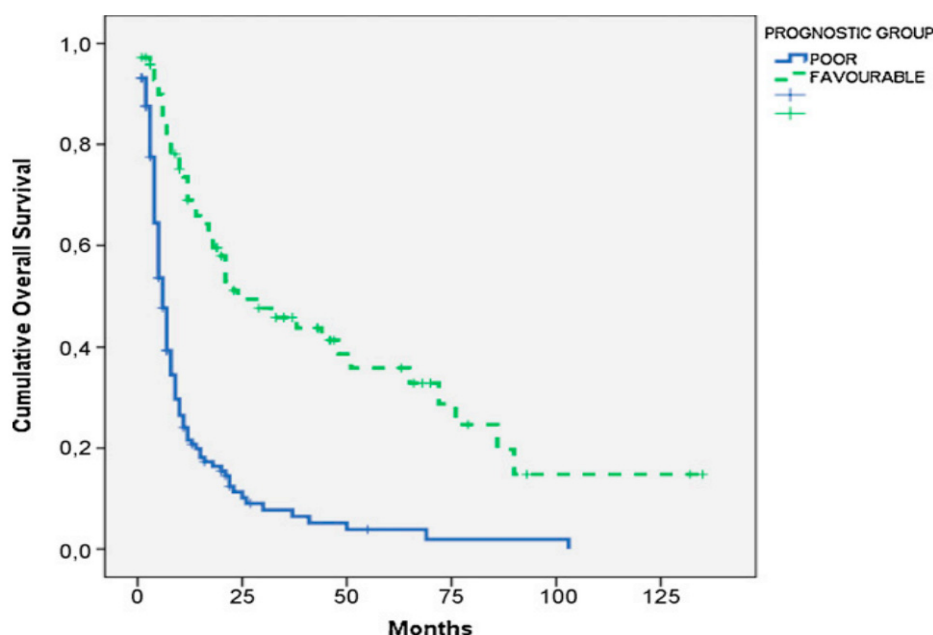
λοιπόν να μην υπάρχουν μελέτες ανάλογες και για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι ακόμη πρώιμα, όμως η ανταπόκριση και η επιβίωση, μαζί ίσως και με την περαιτέρω εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας είναι υπέρ της μεγαλύτερης χρήσης αυτής της μορφής θεραπείας στο μέλλον και σε αυτόν τον τύπο κακοήθειας. [151-152]

Στον **πίνακα 9**. παρουσιάζεται μια συνοπτική ανακεφαλαίωση της διαγνωστικής και θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με καρκίνο αγνώστου πρωτοπαθούς με την χρήση όλων των δυνατών μέσων που μας παρέχει η καθ' ημέρα κλινική πράξη.

Προγνωστικοί παράγοντες

Η αναγνώριση προγνωστικών παραγόντων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ συναντά δυσκολίες κυρίως λόγω της ετερογένειας της νόσου. Παρόλα αυτά, βήματα προς τον καθορισμό τέτοιων παραγόντων έχουν γίνει με πιο σημαντικό εκείνο του διαχωρισμού σε ομάδα ευνοϊκής και πτωχής πρόγνωσης. Η **εικόνα 1**, δείχνει την διαφορά της διάμεσης επιβίωσης στους ασθενείς των ομάδων πτωχής και ευνοϊκής πρόγνωσης με ΚΑΠΕ, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στην ογκολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού νοσοκομείου Ιωαννίνων από το 1995 ως το 2011. Η τράπεζα των ασθενών αποτελούνταν από 219 ασθενείς και η διάμεση επιβίωση ήταν 24 μήνες έναντι 6 μηνών υπέρ των ασθενών της υποομάδας με ευνοϊκή πρόγνωση (two-sided $p < 0.05$). [51]

Εικόνα 1. Διαφορά επιβίωσης μεταξύ των πτωχής και ευνοϊκής πρόγνωσης ομάδων ΚΑΠΕ.



Η ανεύρεση νέων προγνωστικών ή και προβλεπτικών παραγόντων αποτελεί αντικείμενο έρευνας από 30 έτη περίπου.

Στον **πίνακα 10**, αναγράφονται οι παράγοντες που είχαν προγνωστική αξία μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση σε κάθε μελέτης ξεχωριστά. Πρόκειται για μελέτες στις οποίες συμπεριλαμβάνεται αξιοσημείωτος αριθμός ασθενών, ικανού να στηρίξει τα αποτελέσματα αυτά.

Πίνακας 10. Παράμετροι με προγνωστική αξία σε παλαιότερες μελέτες.

ΜΕΛΕΤΕΣ	ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΚΑ.ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	ΕΣΤΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	ΑΡ. ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑ	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	ΠΑΡΑΤΑΣΗ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΟΣ ΟΙ	ΣΥΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ	LDH	ALP	ALB	ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΔΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	ΔΕΜΦΟΠΕΝΙΑ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
P. Seve et al ¹⁵³	2006	317			X				X			X	X		X			X	
S. Culine et al ¹⁵⁴	2002	150			X								X						
A.S Alberts et al ¹⁵⁵	1989	100		X	X		X		X										
A. Van der Gaast et al. ¹⁵⁶	1995	79			X									X					
J. L. Abbruzzese et al ¹⁵⁷	1994	657		X		X	X	X	X										
A. Piga et al ¹⁵⁸	2005	102								X			X	X					X ^α
P. Lorenzo et al ¹⁵⁹	2007	100			X				X				X	X					
I. Thöm et al ¹⁶⁰	2009	136		X	X			X											X ^β
M. Kodaira et al ¹⁶¹	2010	58			X		X												
M.J. Fernandez Kotarelo et al ¹⁶²	2010	265	X			X								X	X				X ^γ
D. Trivanovich et al. ¹⁶³	2009	145			X				X		X		X						
K.R. Hess et al ²⁹	1999	1000	X			X	X	X	X										
Van der Wouw et al ⁵⁷	2004	70	X		X			X	X				X						
R. Pasterz et al ¹⁶⁴	1986	70			X		X												X ^δ
H.J. Lu et al ¹⁶⁵	2012	63													X		X		

LDH: γαλακτική δεϋδρογενάση, ALP:αλκαλική φωσφατάση

α : αυξημένη επιβίωση για τους ασθενείς που έλαβαν καρβοπλατίνη AUC ≥6 έναντι καρβοπλατίνη AUC<6

β : θεραπευτική προσέγγιση ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης

γ : αυξημένη επιβίωση για τους ασθενείς που έλαβαν οποιοδήποτε τύπο θεραπείας

δ : αυξημένη επιβίωση για τους ασθενείς που απάντησαν στη χημειοθεραπεία

Ήδη από το 1989 ο Alberts et al. κατάφερε να ταυτοποιήσει κλινικές παραμέτρους με προγνωστική αξία σε δείγμα 100 ασθενών. Η καλή φυσική κατάσταση (PS=0), το φύλο (θήλυ), η παρουσία λεμφαδενικών μόνο μεταστάσεων, αλλά και η απουσία ηπατικών αποτέλεσαν τους παράγοντες αυτούς. Οι συγγραφείς, όμως δεν προχώρησαν στην δημιουργία αλγορίθμου. [155]

Το 1994 ο Abruzzese et al. μετά την συλλογή δεδομένων από 657 περιστατικά ΚΑΠΕ, από τα οποία όμως μόνο μια μικρή μειοψηφία είχε λάβει χημειοθεραπεία, ενώ επίσης και ο διαχωρισμός σε πτωχής και ευνοϊκής πρόγνωσης ομάδες δεν ήταν ολοκληρωμένος (σύμφωνα με τα σημερινά κριτήρια), αναγνώρισε 5 παραμέτρους με προγνωστική αξία. Η λεμφαδενική εστία των μεταστάσεων (είτε αυτή βρίσκεται στο μεσοθωράκιο είτε στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, αλλά όχι στον υπερκλείδιο χώρο) (RR 0,46 $p < 0,0001$) αποτέλεσε προγνωστικό παράγοντα που προσέδωσε στους ασθενείς με ΚΑΠΕ ευνοϊκή πρόγνωση. Αντιθέτως ο αυξημένος αριθμός μεταστάσεων (RR 1,23 $p < 0,0001$), η ιστολογική διάγνωση του αδενοκαρκινώματος (σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ιστολογικές διαγνώσεις) (RR 1,46 $p = 0,0001$), το φύλο (άρρεν) των ασθενών (RR 1,39 $p = 0,0007$) και η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων αποτέλεσαν δείκτες πτωχής πρόγνωσης (RR 1,33 $p = 0,0064$). [157]

Ο Hess et al. ξεκινώντας με βάση την μελέτη του Abruzzese et al. συγκέντρωσε δεδομένα 1000 ασθενών ΚΑΠΕ και προχώρησε στη δημιουργία 10 προγνωστικών υποομάδων, βασιζόμενος σε πέντε παραμέτρους (φυσική κατάσταση, η ιστολογική διάγνωση, τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης στο αίμα και η παρουσία ή μη ηπατικών μεταστάσεων). Το διάστημα διάμεσης ολικής επιβίωσης μεταξύ αυτών των υποομάδων ήταν 5 (95% CI, 4–7 μήνες) ως 40 μήνες (95% CI, 22–66 μήνες). Η διάμεση ολική επιβίωση ήταν 11 μήνες (95% CI, 10–12 μήνες), με μόνο 11% (95% CI, 9–14%) 5ετή επιβίωση. Σε αυτή τη μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι η ιστολογική διάγνωση του αδενοκαρκινώματος, η καλή φυσική κατάσταση (PS=0), η απουσία ηπατικών μεταστάσεων και η φυσιολογική τιμή της αλκαλικής φωσφατάσης συνδέονται με ευνοϊκή πρόγνωση. [29] Η πολυπλοκότητα όμως αυτού του αλγορίθμου δεν επέτρεψε την περαιτέρω χρήση του.

Ο Van de Gaast et al. με δεδομένα 79 ασθενών συνέδεσε την φυσική κατάσταση (PS) και την αλκαλική φωσφατάση και ανέπτυξε προγνωστικό αλγόριθμο που οδήγησε στην δημιουργία 3 ομάδων, την ομάδα ευνοϊκής, ενδιάμεσης και πτωχής πρόγνωσης οι οποίες και παρουσίαζαν διάμεσο επιβίωση 4 έτη, 10 και 4 μήνες αντιστοίχως. Όμως το συγκεκριμένο μοντέλο παρουσίαζε δύο μειονεκτήματα που

έθεσαν την χρήση του σε αμφιβολία. Πρώτον είχε τεκμηριωθεί σε ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα και αδιαφοροποίητο καρκίνωμα και δεύτερον δεν αξιολογήθηκε ποτέ σε ανεξάρτητους πληθυσμούς. [156]

Ο Culine et. al. διαπίστωσε με δεδομένα από 150 ασθενείς ΚΑΠΕ, στους οποίους δεν συμπεριλαμβάνονται ασθενείς από την ομάδα της ευνοϊκής πρόγνωσης, ότι η κλινική κατάσταση και η παρουσία ή μη ηπατικών μεταστάσεων αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες. Χρησιμοποιώντας αρχικά αυτές τις δύο παραμέτρους διέκρινε τρεις προγνωστικές υποομάδες (καλής, ενδιάμεσης και πτωχής πρόγνωσης με διάμεση ολική επιβίωση τους 10,8- 6 και 2,4 μήνες αντίστοιχα). Σε ένα δεύτερο βήμα η προσθήκη της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (αναλογία κινδύνου [RR] 2.1) ως ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη, οδήγησε στον διαχωρισμό δύο προγνωστικών ομάδων με διάμεση επιβίωση 11,7 και 3,9 μήνες ($p < 0,0001$). Η μονοετής επιβίωση για τις δύο υποομάδες ήταν 45% και 11%, αντιστοίχως. Αυτή η δεύτερη κατηγοριοποίηση υποβλήθηκε σε ανεξάρτητη αξιολόγηση. Σε αυτή η διάμεση επιβίωση μεταξύ των δύο προγνωστικών υποομάδων ήταν 12 μήνες και 7 μήνες, ($p = 0.0089$), ενώ η μονοετής επιβίωση ήταν 53% και 23%, αντιστοίχως. [154, 166]

Ο Ponce Lorenzo J et al. χρησιμοποίησε τις ίδιες παραμέτρους με τον Culine et. al. σε πληθυσμό 100 ασθενών ΚΑΠΕ και δημιούργησε τρεις προγνωστικές ομάδες. Η ευνοϊκής πρόγνωσης (καλή κλινική κατάσταση PS 0-1 και απουσία ηπατικών μεταστάσεων), η ενδιάμεσης πρόγνωσης (καλή κλινική κατάσταση PS 0-1 ή απουσία ηπατικών μεταστάσεων) και η πτωχής πρόγνωσης (κακή κλινική κατάσταση PS >2 και παρουσία ηπατικών μεταστάσεων) ομάδες με διάμεση ολική επιβίωση 10,8- 4 και 1,9 μήνες αντίστοιχα ($p < 0.0001$). [159]

Στη μελέτη του Seve et al. περισυλλέγησαν δεδομένα από 317 περιστατικά από το 1998 ως το 2004. Οι συγγραφείς κατάφεραν να δημιουργήσουν 2 ομάδες πρόγνωσης. Η ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης (φυσιολογική μέτρηση αλβουμίνης και απουσία ηπατικών μεταστάσεων) είχε επιβίωση 1 έτος σε αντίθεση με την ομάδα πτωχής πρόγνωσης όπου η επιβίωση ήταν στους 3 μήνες ($p < 0,0001$). Όμως 117 ασθενείς από τους 317 δεν είχαν λάβει χημειοθεραπεία με πλατίνα θέτοντας έτσι τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης σε αμφισβήτηση. [153]

Ο Fernandez-Cotarelo MJ et al. σε αναδρομική ανάλυση 265 ασθενών ΚΑΠΕ αναγνώρισε, μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση, ως ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες, την ηλικία [HR 1,3 (95%CI 1,0-1,8) $p < 0,05$], την αλβουμίνη [HR 1,9

(95%CI 1,4-2,6) $p < 0,01$], την αλκαλική φωσφατάση [HR 1,8 (95%CI 1,3-2,5) $p < 0,01$], την ιστολογική διάγνωση (πλακώδη καρκινώματα) [HR 0,38 (95%CI 0,29-0,47) $p < 0,01$] και την θεραπευτική αντιμετώπιση [HR 0,37 (95%CI 0,3-0,5) $p < 0,05$]. Δεν προχώρησε όμως σε δημιουργία αλγορίθμου. [162]

Ο Pasterz R et al. με τη σειρά του και μετά από ανάλυση δεδομένων 70 ασθενών με ΚΑΠΕ διαπίστωσε ότι οι ασθενείς που είχαν ανταποκριθεί στη λήψη συνδυασμού χημειοθεραπευτικών φαρμάκων παρουσίαζαν διάμεση ολική επιβίωση 16 μηνών έναντι 3 μηνών των ασθενών οι οποίοι δεν είχαν ανταποκριθεί. Επιπλέον οι ασθενείς σε καλή φυσική κατάσταση κατά την διάγνωση της νόσου με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία παρουσίασαν διάμεση ολική επιβίωση 17 μήνες έναντι 7 μηνών εκείνων που δεν ανταποκρίθηκαν. Συμπερασματικά οι ασθενείς με ΚΑΠΕ και καλή φυσική κατάσταση ή με παρουσία μόνον λεμφαδενικής ή υποδόριας νόσου θα πρέπει να λάβουν συνδυαστική χημειοθεραπεία ανεξαρτήτως ηλικίας, ιστολογικού τύπου και μεταστατικών εστιών. [164]

Η απουσία οποιουδήποτε επιθηλιακού καρκινικού δείκτη στον αιματολογικό έλεγχο [έναντι της θετικότητας έστω ενός, Odds Ratio 4,16 (1,05-16,45), $p = 0,042$], ο μικρός αριθμός των μεταστάσεων [(από 1 έως και 3 έναντι >4) Odds Ratio 1,66 (0,42-6,53), $p = 0,470$], ο αριθμός των οργάνων που φέρουν μεταστατικές εστίες [(από 1 έως και 2 έναντι >3) Odds Ratio 8,20 (1,28-52,63), $p = 0,026$], η απουσία οστικών μεταστάσεων [έναντι της παρουσίας, Odds Ratio 6,66 (1,65-26,86), $p = 0,008$], ο ιστολογικός τύπος [χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα έναντι αδenoκαρκίνωμα Odds Ratio 2,53 (0,69-9,30), $p = 0,161$] και η τοξικότητα στη χημειοθεραπεία [grade III-IV έναντι $<II$, Odds Ratio 3,94 (0,98-15,63), $p = 0,053$] ταυτοποιήθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες από την ανάλυση 102 ασθενών με ΚΑΠΕ στην μελέτη του A. Piga et al. [158]

Οι Thöm I et al. και Kambhu SA et al. ταυτοποίησαν διάφορους επισφαλείς παραμέτρους όπως οι υποδόριες εναποθέσεις καρκινικών κυττάρων, η ουδετεροπενία, η θρομβοπενία στη διάγνωση, το αρσενικό φύλο, οι σπλαχνικές μεταστάσεις κάτω από το διάφραγμα, η κακή φυσική κατάσταση και η απουσία οποιασδήποτε θεραπευτικής παρέμβασης. [160, 167]

Ο Van Der Wouw et al. προσπάθησε να συνδέσει κλινικές παραμέτρους, εργαστηριακές παραμέτρους και ανοσοϊστοχημικές με την πρόγνωση 70 ασθενών ΚΑΠΕ. Η καλή κλινική κατάσταση, η απουσία ηπατικών μεταστάσεων αλλά και οι

φυσιολογικές τιμές της γαλακτικής δεϋδρογονάσης αποτέλεσαν τους ανεξάρτητους παράγοντες που προσέδιδαν στους ασθενείς ευνοϊκή πρόγνωση. Αντιθέτως από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση δεν ταυτοποιήθηκε κάποιος ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. [57]

Αρκετές μεταγενέστερες μελέτες προσπάθησαν να δώσουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Σε αυτές υπήρξε η αναγνώριση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης, της κλινικής κατάστασης, της αλβουμίνης και του αριθμού των λεμφοκυττάρων ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες της νόσου.

Στόχοι της μελέτης

Η ανεύρεση νέων προγνωστικών ή και προβλεπτικών παραγόντων αποτελεί αντικείμενο έρευνας από 30 έτη περίπου. Πολλαπλές και συνεχείς ερευνητικές προσπάθειες δεν έχουν καταφέρει να ταυτοποιήσουν τέτοιους παράγοντες με ευρεία συναίνεση.

Διάφορες ερευνητικές προσπάθειες της έκφρασης των ογκογονιδίων, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των υποδοχέων ή των μονοπατιών μετάδοσης σημάτων καθώς και αγγειογενετικών παραγόντων δεν κατέστησαν δυνατή τη διαλεύκανση της βιολογίας- παθογένειας του ΚΑΠΕ, ούτε κατάφεραν να καθορίσουν τη μοριακή ταυτότητα του συγκεκριμένου νοσήματος. Παρά δηλαδή την εύρεση δύο διαφορετικής προγνωστικής αξίας κατηγορίες συνεχίζεται να υφίσταται η ετερογένεια της νόσου σε μεγάλο βαθμό τόσο στη συμπεριφορά όσο και στην επιβίωση.

Εν αναμονή πιθανών εξελίξεων σε μοριακό επίπεδο και λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η έρευνα μας, περιλαμβάνει δύο μέρη:

1. τη δημιουργία προγνωστικού αλγόριθμου, βασισμένου σε κλινικο-παθολογοανατομικά και εργαστηριακά ευρήματα, ικανού να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς ανάλογα με τον κίνδυνο θανάτου και να προσδώσει με αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα, όπου αυτή υπάρχει, για την πλέον αξιόπιστη εκτίμηση της πρόγνωσης και την εξατομίκευση της θεραπευτικής προσέγγισης.
2. την ταυτοποίηση ζωτικών βιομορίων, μέσω της ανοσοϊστοχημικής τους έκφρασης, την συσχέτιση τους με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά καθώς και τον καθορισμό της προγνωστικής ή /και προβλεπτικής τους αξίας με απώτερο στόχο την αποσαφήνιση και κατανόηση της βιολογίας του ΚΑΠΕ σε ένα πρώτο βαθμό αλλά και σε δεύτερο βαθμό, μελλοντικά, την αποκάλυψη νέων θεραπευτικών, στοχευτικών μορίων, δίνοντας ίσως ώθηση στα λιμνάζοντα νερά της θεραπευτικής προσέγγισης αυτών των ασθενών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**Α. Προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με
Καρκίνωμα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας
(ΚΑΠΕ): αναδρομική ανάλυση 311 περιπτώσεων
για την ανάπτυξη προγνωστικού αλγόριθμου**

Εισαγωγή

Το 2-5% όλων των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων παρουσιάζεται με μεταστάσεις, χωρίς την ανεύρεση της πρωτοπαθούς εστίας ακόμη και μετά από ενδεδειγμένη διαγνωστική έλεγχο. Η επίπτωση του ΚΑΠΕ είναι 7-12 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού στις ΗΠΑ [168], ενώ στην Ευρώπη φθάνει τα 5,3-6,7 περιστατικά [11]. Ο πλήρης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος (συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών δεικτών), η γενική ούρων, η ανάλυση κοπράνων για την παρουσία αίματος, ο απεικονιστικός έλεγχος (αξονική τομογραφία του θώρακος και της κοιλίας, μαστογραφία και άλλα), η ενδοσκόπηση, η παθολογοανατομική εκτίμηση της βιοψίας (οπτικό μικροσκόπιο και ανοσοϊστοχημεία) είναι απαραίτητες εξετάσεις για την εξ αποκλεισμού διάγνωση του ΚΑΠΕ. [15,57] Οι νέες τεχνικές γονιδιακής ανάλυσης και μη κωδικοποιούντος RNA (micro RNA) παρουσιάζουν αρκετά υψηλή ευαισθησία, αλλά επιπλέον προοπτικές μελέτες θα πρέπει αποδείξουν την χρησιμότητα τους στην καθ' ημέρα ιατρική πράξη. [2]

Οι ασθενείς με ΚΑΠΕ διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες προγνωστικές υποομάδες, την υποομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης με μακρύτερη επιβίωση και καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και εκείνη με πτωχή πρόγνωση στην οποία παρουσιάζεται επιβίωση 6-10 μηνών και μικρότερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Στην πρώτη υποομάδα συμπεριλαμβάνονται: τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής, γυναίκες με ορώδες θηλώδες περιτοναϊκό αδενοκαρκίνωμα, τα χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινή καρκινώματα, το πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων κεφαλής τραχήλου, γυναίκες με αδενοκαρκίνωμα μασχαλιαίων μόνο λεμφαδένων, αδενοκαρκινώματα με ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά καρκίνου παχέως εντέρου, ασθενείς με μικρή μονήρη μετάσταση, ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων βουβονικής χώρας, και ασθενείς με βλαστικές μεταστάσεις οστών και αυξημένο προστατικό αντιγόνο (PSA) [51]. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν μεταστατικές εστίες σε ήπαρ, πνεύμονες εγκέφαλο ή άλλες σπλαχνικές εστίες ή παρουσιάζουν μη θηλώδες περιτοναϊκό αδενοκαρκίνωμα ανήκουν στην ομάδα πτωχής πρόγνωσης και αντιπροσωπεύουν το 80 % των περιστατικών ΚΑΠΕ. [12]

Επιλεγμένη έρευνα στην έκφραση των ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων υπευθύνων για τη μετάδοση του σήματος ή της αγγειογέννησης

δεν έχει ακόμη αποφέρει πληροφορίες που να μπορούν να στοιχειοθετήσουν πρόγνωση ή και θεραπεία σε αυτούς του ασθενείς. Εν αναμονή περισσότερων μελετών και αποτελεσμάτων συνεχίζει ως και σήμερα ο διαχωρισμός των περιστατικών σε πτωχής και ευνοϊκής ομάδας να αποτελεί την κυριότερη προγνωστική εξέλιξη. [52,169]

Ο στόχος της μελέτης είναι η δυνατόν μεγαλύτερη συλλογή περιστατικών από το αρχείο της ογκολογικής κλινικής και η στατιστική ανάλυση τους (μονο- και πολυπαραγοντική), έτσι ώστε με τη χρήση κλινικών και εργαστηριακών παραγόντων να κατασκευασθεί προγνωστικός αλγόριθμος ικανός να οδηγήσει στην καλύτερη αντιμετώπιση και εξατομίκευση θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών ΚΑΠΕ.

Μέθοδοι και χαρακτηριστικά ασθενών

Έγινε αναδρομική έρευνα των κλινικών αρχείων της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ασθενών με ΚΑΠΕ που διεγνώσθησαν από το 1988 ως το 2011 με επικαιροποίηση των δεδομένων έκβασης και εισαγωγή σε ηλεκτρονικό αρχείο. Έγινε κατά αυτόν τον τρόπο ο έλεγχος 450 περιστατικών εκ των οποίων η ολοκληρωμένη συλλογή δεδομένων αφορά τελικά 311 ασθενείς. Η διάγνωση στηρίχθηκε στο λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, τη λεπτομερή φυσική εξέταση σε εργαστηριακά, απεικονιστικά, ενδοσκοπικά και παθολογοανατομικά ευρήματα (οπτικό μικροσκόπιο και ανοσοϊστοχημεία). [169-170] 139 ασθενείς συνολικά αποκλείστηκαν από την μελέτη. 109 αποκλείστηκαν λόγω ελλιπών στοιχείων και 30 λόγω ελλιπούς διαγνωστικής προσέγγισης.

Συλλέξαμε σε ηλεκτρονικό αρχείο τα δημογραφικά στοιχεία, εργαστηριακά αποτελέσματα (προ της ενάρξεως οποιασδήποτε παρέμβασης) αλλά και τα στοιχεία που αφορούσαν τη θεραπευτική προσέγγιση και προσπαθήσαμε να βρούμε το συσχετισμό τους με την επιβίωση, υποβάλλοντας τα σε στατιστική ανάλυση. Αν και πολλά δεδομένα προήλθαν πριν από το 2000 παρόλα αυτά οι ανταποκρίσεις τους εκτιμήθηκαν βάση των κριτηρίων του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO-World Health Organization)

Το μοντέλο Cox αναλογικού κινδύνου χρησιμοποιήθηκε στην μονοπαραγοντική ανάλυση ενώ η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης Wald, στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression-free survival-PFS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως την πρόοδο της νόσου ή το θάνατο. Η ολική επιβίωση (overall survival-OS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως το θάνατο ή έως την τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης (follow-up) με τις καμπύλες Kaplan-Meier. Όλες οι υπολογιζόμενες p-values ήταν διωνυμικές και τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0.05$. Η δημιουργία του προγνωστικού αλγόριθμου βασίστηκε σε παραμέτρους στατιστικά σημαντικούς της πολυπαραγοντικής ανάλυσης του μοντέλου Cox αναλογικού κινδύνου και πραγματοποιήθηκε μέσω της στατιστικής μεθόδου των δέντρων ταξινόμησης και παλινδρόμησης (Classification and Regression Tree -CART). Η ανάλυση CART χρησιμοποιήθηκε για να βαθμονομήσει τις παραμέτρους με προγνωστική αξία και βάση αυτών να διαχωρίσει σε υποομάδες τους ασθενείς. Η αξιοπιστία της

συγκεκριμένης προγνωστικής διαβάθμισης επιβεβαιώθηκε όταν μετά τον διαχωρισμό του πληθυσμού σε 10 τυχαίες υποομάδες διαπιστώθηκε επαναλήψιμη κατάταξη των ασθενών σε υποομάδες με προγνωστική αξία. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS 16.0 (Chicago, Illinois, USA).

Αποτελέσματα

Δημογραφικά ασθενών και χαρακτηριστικά όγκων

Συγκεντρώθηκαν στο διάστημα 1988 έως 2011, δεδομένα 311 ασθενών με ΚΑΠΕ, 180 αντρών (57,9%) και 131 γυναικών (42 περιστατικά,1%). Οι 131 (42,8%) ασθενείς ήταν ηλικίας άνω των 70 ετών, ενώ 168 (56,7%) παρουσιάστηκαν σε καλή κλινική κατάσταση (PS: 0-1). 86 (27,7%) ασθενείς είχαν δύο και πάνω συμπαρομαρτούντα νοσήματα. Γενικά κυρίως συμπτώματα παρουσίασε η πλειονότητα των ασθενών, με 64 (20,3%) να εμφανίζουν απώλεια βάρους και 253 (81,6%) αδυναμία, καταβολή, ανορεξία και πυρετό.

Το αδenoκαρκίνωμα, αποτέλεσε την πιο συχνή ιστολογική διάγνωση (171 περιστατικά, 55%), με την πλειονότητα να χαρακτηρίζεται ως χαμηλής διαφοροποίησης, ενώ το αδιαφοροποίητο/χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα (95 περιστατικά, 30%), το πλακώδες (18 περιστατικά, 6%) το νευροενδοκρινές (19 περιστατικά, 6%), και το χαμηλής διαφοροποίησης νεόπλασμα (8 περιστατικά, 3%) παρουσιάστηκαν λιγότερο συχνά.

Όσον αφορά τις μεταστατικές εστίες, 196 (63,4%) ασθενείς είχαν σπλαχνικές μεταστάσεις. Η υποομάδα των ΚΑΠΕ σπλαχνικής νόσου ήταν η πιο αντιπροσωπευτική με 193 ασθενείς (62%) ακολουθούμενη από την υποομάδα των ΚΑΠΕ κεφαλής τραχήλου (13 περιστατικά, 4%), τα αδenoκαρκίνωματα μασχαλιαίας χώρας (12 περιστατικά, 4%) τα νευροενδοκρινή (13 περιστατικά, 4%)τα ορώδη περιτοναϊκά ΚΑΠΕ (29 περιστατικά, 9%), και τέλος τα βλεννώδη περιτοναϊκά (22 περιστατικά, 7%). Από τα 311 περιστατικά τα 217 (69,8%) ανήκαν στην υποομάδα των πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ.

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών αλλά και τα χαρακτηριστικά που παρουσίαζαν οι μεταστατικές εστίες συμπεριλαμβάνονται στον **πίνακα 11**.

Θεραπευτική προσέγγιση και έκβαση των ασθενών

Από τους 311 ασθενείς, στους διακόσιους εξήντα-δύο (84%) χορηγήθηκε κυτταροτοξική χημειοθεραπεία η οποία συμπεριλάμβανε στους 178 (68%) πλατίνα. Σε χειρουργική επέμβαση υποβλήθηκαν 231 (74%), ενώ ακτινοθεραπεία έλαβαν 92(32%).

Πίνακας 11. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και χαρακτηριστικά όγκων.

N=311	Ασθενείς	%		Ασθενείς	%
Φύλο <i>Άρρεν/Θήλυ</i>	180/131	57.9/42.1	Κλιν./Παθολογική Υποομάδα		
Ηλικία <i>Διάμεση (διάστημα)</i>	69 (23-87)		<i>Σπλαχνική</i>	193	62
Κλινική κατάσταση -PS <i>0-1 vs ≥ 2</i>	168/128	56.7/43.2	<i>Μέσης γραμμής λεμ.</i>	29	9.4
Συμπαρομαρτούντα νοσήματα <i>0-1 vs ≥ 2</i>	224/86	72.3/27.7	<i>Ορώδες περιτοναϊκό</i>	29	9.4
Ιστορικό καπνίσματος <i>Ποτέ</i>	143	47.8	<i>Βλεννώδες</i>	22	7
Συμπτώματα εμφάνισης <i>Ναι/Όχι</i>	253/57	81.6/18.4	<i>περιτοναϊκό</i>		
Απώλεια βάρους <i>Ναι/Όχι</i>	64/247	20.3/79.7	<i>Πλακώδες τραχήλου</i>	13	4.2
Διάρκεια συμπτωμάτων <i>Ως 4 μήνες</i>	172	68.2	<i>Νευροενδοκρινές</i>	13	4.2
<i>Πάνω από 4 μήνες</i>	80	31.8	<i>Μασχάλης</i>	12	3.8
Φορτίο νόσου (δήθηση οργάνου >30%) <i>Ναι/Όχι</i>	75/142	34.6/65.4	Ιστολογία <i>Αδενοκαρκίνωμα</i>	171	55
Προγνωστική υποομάδα <i>Πτωχής/Ευνοϊκής</i>	217/94	69.8/30.2	<i>Χαμηλής διαφοροποίησης/αδιαφοροποίητο καρκίνωμα</i>	95	30
Μεταστ. εστίες <i>Σπλαχνικές</i>	196	63.4	<i>Νευροενδοκρινές</i>	19	6
<i>Υπεζωκότας/περιτόναιο</i>	57	18.4	<i>Πλακώδες</i>	18	6
<i>Μαλακά μόρια/λεμφαδένες</i>	56	18.2	<i>Χαμηλής διαφοροποίησης νεόπλασμα</i>	8	3
Ηπατικές μεταστ. <i>1 -2 vs ≥ 3</i>	25/70	26.3/73.7			

Η ακτινοθεραπεία είχε τη μορφή παρηγορητικής σε 54 (17,4%) ενώ με θεραπευτική πρόθεση εφαρμόστηκε σε 45 ασθενείς (14,5%). Στον **πίνακα 12** εμφανίζονται τα δεδομένα που αφορούν τη θεραπεία και την έκβαση τους.

Πίνακας 12. Θεραπεία και έκβαση.

N=311		Ασθενείς	%
<i>Χημειοθεραπεία</i>	<i>Με βάση την πλατίνα</i>	178	68
	<i>Όχι πλατίνα</i>	84	32
<i>Χειρουργική επέμβαση</i>	<i>Ναι</i>	80	25.8
	<i>Όχι</i>	231	74.2
<i>Ακτινοθεραπεία</i>	<i>Όχι</i>	212	68.2
	<i>Παρηγορητική</i>	54	17.4
	<i>Θεραπευτική</i>	45	14.4
<i>Ανταπόκριση</i>	<i>CR+PR (ORR)</i>	77	30
	<i>ORR+SD</i>	99	38.5
<i>Διάστημα ελεύθερο νόσου</i>	<i>Περιστατικά</i>	268	86.1
	<i>Διάμεσο</i>	4 μήνες	
	<i>95% CI</i>	2.5-6.3	
<i>Ολική επιβίωση</i>	<i>Περιστατικά</i>	247	79.4
	<i>Διάμεση</i>	8 μήνες	
	<i>95% CI</i>	6.7-9.1	

Ο δείκτης αντικειμενικής ανταπόκρισης σύμφωνα με τα κριτήρια του παγκόσμιου οργανισμού υγείας- WHO- ήταν 30% (77 ανταποκρίσεις), ενώ το κλινικό όφελος ήταν 38,5% (99 ασθενείς οι οποίοι παρουσίασαν είτε ανταπόκριση νόσου είτε σταθερότητα αυτής). Οι 268 των ασθενών παρουσίασαν πρόοδο νόσου και οι 247 είχαν αποβιώσει την περίοδο της καταγραφής των δεδομένων. Καταγράφηκε διάμεσο διάστημα ελεύθερο νόσου για το σύνολο του πληθυσμού 4 μήνες (95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.5–6.3) και διάμεση ολική επιβίωση 8 μήνες (95% CI 6.7–9.2). Οι ασθενείς που ανήκαν στην υποομάδα των ευνοϊκής πρόγνωσης ΚΑΠΕ (N=94) παρουσίασαν διάμεσο διάστημα ελεύθερης νόσου και ολική επιβίωση σε σύγκριση με εκείνα των πτωχής πρόγνωσης (N=217), 4 μήνες έναντι 8 (Log-rank p = 0.0005) και 21 μήνες έναντι 7 (Log-rank p = 0.0005) αντιστοίχως.

Μονοπαραγοντική ανάλυση

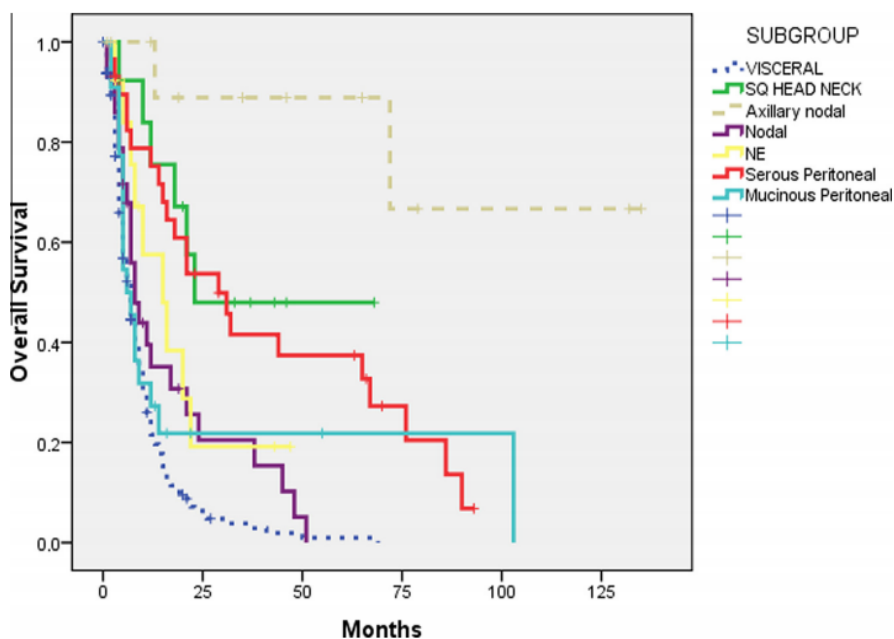
Η ηλικία (κάτω των 70 ετών), το φύλο (θήλυ), καλή φυσική κατάσταση (PS 0–1), τα πλακάδια καρκινώματα, η απουσία απώλειας βάρους, το φορτίο νόσου (non bulky), το κάπνισμα (μη καπνίζοντες) και η υποομάδα του ορώδους θηλώδους

περιτοναϊκού αδενοκαρκινώματος αποτελούν τους παράγοντες εκείνους στους οποίους η μονοπαραγοντική ανάλυση έδωσε ευνοϊκή προγνωστική αξία. **Εικόνα 2. Πίνακας 13** Στη θεραπευτική προσέγγιση η χορήγηση της χημειοθεραπείας (ο συνδυασμός με βάση την πλατίνη και την ταξάνη) αλλά και η ακτινοθεραπεία με θεραπευτικό σκοπό, όπως και κυτταρομειωτική χειρουργική επέμβαση αποτέλεσαν ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες. **Πίνακας 14.**

Πίνακας 13. Διάρθρωση ολική επιβίωση για κάθε κλινικοπαθολογοανατομική υποομάδα ΚΑΠΕ.

Διάστημα (μήνες)	Σπλαχνική Υποομάδα ΚΑΠΕ	Πλακώδες κεφαλής-τραχήλου ΚΑΠΕ	Μασχαλιαίοι λεμφαδένες ΚΑΠΕ	Μέσης γραμμής λεμφαδένες ΚΑΠΕ	Νευροενδοκρινές ΚΑΠΕ	Ορώδες περιτοναϊκό ΚΑΠΕ	Βλεννώδες περιτοναϊκό ΚΑΠΕ
Διάρθρωση ολική επιβίωση	6	23	Not reached	11	15	32	8
95% CI	5–7	19.1–26.2	–	5.1–16.9	6.1–23.9	25–36.7	2.9–13.1

Εικόνα 2. Επιβίωση των κλινικο- παθολογικών ομάδων υποομάδων ΚΑΠΕ.



Πίνακας 14. Προγνωστικοί παράγοντες μετά από μονοπαραγοντική ανάλυση.

Παράμετρος		Μέση ολική επιβίωση	p	95% CI
Φύλο	Θήλυ	12	0.0005	7.5-16.5
	Άρρεν	7		5.7-8.3
Ηλικία	Ως 55	11	0.0005	7.9-14.1
	56-69	10		7.7-12.3
	>70	5		4-5.9
Κλινική κατάσταση PS	0-1	13	0.0005	10.6-15.4
	2-4	5		4.3-5.6
Ιστολογία	Αδενοκαρκίνωμα	8	0.006	6.6-9.4
	Πλακώδες	21		14.6-27.3
	Χαμηλής διαφοροποίησης/ αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	7		0-21.2
	Νευροενδοκρινές	10		3.8-10.2
	Χαμηλής διαφοροποίησης νεόπλασμα	4		3.2-4.8
Μεταστατικές εστίες	Σπλαχνικές	7	0.0005	5.6-8.4
	Μαλακά μόρια/ λεμφαδένες	21		12.6-29.3
	Περιτοναϊκό	12		6.7-17.3
Φορτίο νόσου (διήθηση οργάνου >30% του)	Ναι	5	0.0005	3.7-6.3
	Όχι	12		7.5-16.5
ΚΑΙΠΕ υποομάδα	Ορώδες περιτοναϊκό	29	0.0005	15.5-42.5
	Πλακώδες	23		
	Νευροενδοκρινές	15		5.8-24.2
	Άλλο	6-8		
Κάπνισμα	Ναι	8	0.005	6.4-9.6
	Όχι	10		7.5-12.5
Απώλεια βάρους	Ναι	6	0.0005	4.3-7.7
	Όχι	10		8.2-11.7
Συμπτώματα	Ναι	7	0.0005	5.9-8.0
	Όχι	18		6.9-29.0
Θεραπευτικός χειρισμός- Χημειοθεραπεία	Πλατίνη	8	0.034	6.4-9.5
	Ταξάνη	10		6.2-13.8
	Πλατίνα και ταξάνη	14		11.0-16.9
	Άλλο	8		5.5-10.4
Θεραπευτική κυτταρομειωτική χειρουργική επέμβαση	Ναι	16	0.0005	9.7-22.3
	Όχι	7		5.9-8.0
Ακτινοθεραπεία	Θεραπευτική	16	0.02	5.4-8.6
	Παρηγορική	9		7.6-10.3
	Όχι	7		5.4-8.6

Όσον αφορά τα αιματολογικά εργαστηριακά ευρήματα επιβεβαιώθηκε η κοινή πεποίθηση ότι οι φυσιολογικές τιμές συσχετίζονται με ευνοϊκότερη πρόγνωση.

Πίνακας 15. Συμπεριλήφθηκαν για αυτό το αποτέλεσμα από τους 311 ασθενείς μόνο

Πίνακας 15. Εργαστηριακά ευρήματα με προγνωστική αξία στην μονοπαράγοντική ανάλυση.

Παράμετρος	N		Μέση ολική επιβίωση	p	95% CI
<i>Hb</i> >11mg/dl	297	Ναι Όχι	9 5	0.003	3.7-6.3 7.4-10.6
Λευκοκυττάρωση >10 ³ /mm ³	298	Ναι Όχι	5 12	0.0005	4.0-6.0 10.1-13.9
Λεμφοκύτταρα <1500	175	Ναι Όχι	6 12	0.014	4.8-7.2 10.0-14.0
Αλβουμίνη >3g/dl	207	Ναι Όχι	9 4	0.0005	6.9-11.0 2.4-5.6
LDH<350 IU/L	266	Ναι Όχι	10 7	0.001	6.2-13.8 4.5-7.5
Φυσιολογική ALP	289	Ναι Όχι	11 6	0.0005	8.2-13.8 4.5-7.5
Na ⁺ <135 mmol/l	270	Ναι Όχι	5 8	0.0005	2.4-7.6 6.9-9.0
Μονοκυττάρωση >500/mm ³	259	Ναι Όχι	6 10	0.002	4.7-7.3 7.8-12.2
TKE >75	160	Ναι Όχι	7 9	0.043	6.0-7.9 7.3-10.7
Ολική χολερυθρίνη >1 mg/dl	219	Ναι Όχι	4 10	0.0005	3.2-4.8 8.0-11.9
INR>1.2	155	Ναι Όχι	4 8	0.001	3.1-4.9 6.5-9.5
AST>75 U/L	291	Ναι Όχι	4 9	0.0005	3.3-4.9 7.5-10.5
ALT>75 U/L	291	Ναι Όχι	4 9	0.0005	3.2-4.7 7.2-10.7
γGT>150 U/L	277	Ναι Όχι	5 10	0.0005	3.9-6.0 7.8-12.1
Κρεατινίνη >1.5 mg/dl	289	Ναι Όχι	5 9	0.028	3.9-6.0 7.7-10.2
K ⁺ >5.5 mmol/l	262	Ναι Όχι	4 8	0.002	2.2-5.9 6.9-9.0
Διορθωμένη υπερασβεστιαμία <8mg%	198	Ναι Όχι	1 8	0.0005	6.6-9.0
CEA>10 U/ml	239	Ναι Όχι	6 10	0.0005	4.7-7.3 7.7-12.3
CA19-9>50 U/ml	228	Ναι Όχι	6 11	0.0005	4.9-7 8.7-13.3
bHCG>10mIU/ml	74	Ναι Όχι	5 10	0.0005	1.8-8.2 7.0-13
β ₂ MG>3000 mg/dl	51	Ναι Όχι	5 9	0.031	2.7-7.3 0.9-17
Οποιοσδήποτε αυξημένος καρκινικός δείκτης	263	Ναι Όχι	7 12	0.003	5.9-8.1 9.8-14.1
AFP>10ng/ml	193	Ναι Όχι	5 7	0.02	2.2-7.8 5.4-8.6

εκείνοι για τους οποίους υπήρχαν δεδομένα που να αφορούν τα εργαστηριακά τους ευρήματα πριν την θεραπευτική τους προσέγγιση.

Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η αναιμία, (αιμοσφαιρίνη < 11 mg/dl) την οποία παρουσίασαν 63 (21,2%) από τους εκτιμώμενους ασθενείς ήταν δείκτης πτωχής πρόγνωσης. Άλλοι παράμετροι όπως η λευκοκυττάρωση (>10,000/mm³) που παρατηρήθηκε στους 111 (37%) ασθενείς, η λεμφοπενία, η υποαλβουμιναιμία (Alb < 3 mg/dl), η αυξημένη τιμή της γαλακτικής δευδρογονάσης αλλά και της αλκαλικής φωσφατάσης, η υπονατρίαμια καθώς και η αύξηση της τιμής συγκεκριμένων καρκινικών δεικτών (καρκινοεμβρυικό αντιγόνο, CA19.9, α-εμβρυικής πρωτεΐνης, β ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης και β2 μικροσφαιρίνη) αποτελούσαν επίσης παραμέτρους οι οποίοι προσέδιδαν πτωχή πρόγνωση στους ασθενείς ($p < 0.05$). Η αυξημένες τιμές των καρκινικών δεικτών CA125 και CA15.3 που βρέθηκαν στο 58,6% και 37,8% των ασθενών αντίστοιχα δεν παρουσίασαν προγνωστική αξία ενώ αντιθέτως η αύξηση οποιουδήποτε καρκινικού δείκτη, όπως αυτή παρουσιάστηκε στο 69,9% των εκτιμώμενων ασθενών προσέδιδε χειρότερη πρόγνωση.

Πολυπαραγοντική ανάλυση και ανάλυση μέσω της μεθόδου των δέντρων ταξινόμησης και παλινδρόμησης –CART

Η πολυπαραγοντική ανάλυση αποκάλυψε τρεις παραμέτρους με σαφή ανεξάρτητο συσχετισμό με τον κίνδυνο θανάτου: την φυσική κατάσταση (PS 0-1), με σαφή ανεξάρτητη προγνωστική αξία (Αναλογία κινδύνου- Hazard Ratio HR 0.56, $p = 0.002$), την απουσία λευκοκυττάρωσης (λευκοκύτταρα πάνω από 10,000/mm³, HR 0.51, $p = 0.001$) και την υποομάδα του ΚΑΠΕ η οποία στην παθολογοανατομική κατηγοριοποίηση αναφέρεται ως σπλαχνική (HR 1.75, $p = 0.001$).

Πίνακας 16.

Πίνακας 16. Ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες σε πολυπαραγοντική ανάλυση

	Hazard Ratio	95% CI	2-sided P value
PS 0-1	0.56	0.39-0.81	0.002
Σπλαγχνική υποομάδα ΚΑΠΕ	1.7	0.98-3.5	0.001
WBC up to 10.000/mm ³	0.51	0.34-0.76	0.001
Χολερυθρίνη ως 1 mg/dl	0.67	0.45-1.001	0.054

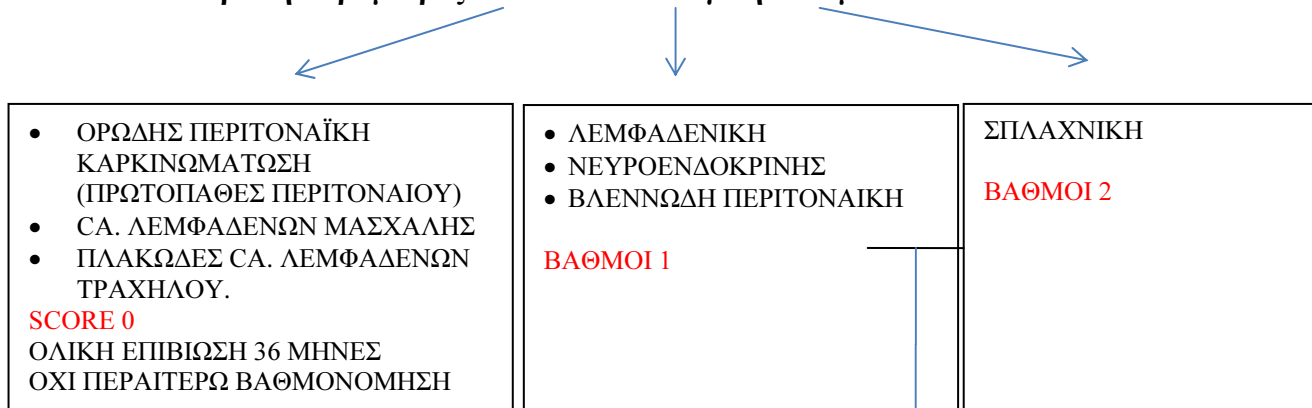
Ο προγνωστικός αλγόριθμος δημιουργήθηκε με τη χρησιμοποίηση της στατιστικής μεθόδου των δέντρων ταξινόμησης και παλινδρόμησης –CART. Η φυσική κατάσταση, η παρουσία ή μη της λευκοκυττάρωσης καθώς και η κλινικο-παθολογοανατομική υποομάδα των ασθενών αποτέλεσαν τις μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη της βαθμονόμησης (κλίμακα 0-4) και κατά συνέπεια την δημιουργία του αλγόριθμου - Ioannina Score for CUP Outpatient Oncologic Prognostication (I-SCOOP, **εικόνα 3**).

Το πρώτο βήμα για τη χρήση του αλγόριθμου αποτελεί η γνώση της κλινικο-παθολογοανατομικής ομάδας στην οποία ανήκει ο ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα ασθενείς που εμφανίζονται στη διάγνωση με ορώδες περιτοναϊκό αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες κεφαλής τραχήλου ή αδενοκαρκίνωμα μασχάλης βαθμολογούνται με μηδέν σύμφωνα με τον αλγόριθμο και δεν χρήζουν περαιτέρω διαγνωστικής προσέγγισης. Αυτοί οι ασθενείς αποτελούν την ομάδα χαμηλού κινδύνου και έχουν διάμεση ολική επιβίωση τους 36 μήνες. Όλες οι υπόλοιπες παθολογοανατομικές υποομάδες βαθμολογούνται με ένα, πλην της υποομάδας που χαρακτηρίζεται από σπλαχνικές μεταστάσεις η οποία βαθμολογείται με δύο βαθμούς κινδύνου. Ο καθορισμός του αν υπάρχει ή όχι λευκοκυττάρωση αποτελεί το δεύτερο βήμα στο οποίο υποβάλλονται όλες οι υπόλοιπες υποομάδες. Στην παρουσία λευκοκυττάρωσης στους ασθενείς προστίθεται ένας ακόμη βαθμός κινδύνου σε αντίθεση με εκείνους όπου δεν παρουσιάζουν λευκοκυττάρωση και κατά συνέπεια βαθμολογούνται με μηδέν. Το ίδιο συμβαίνει και με το τρίτο βήμα όπου η κακή φυσική κατάσταση (PS >1) βαθμολογείται με έναν βαθμό. Οι ασθενείς με τελική βαθμολογία 1-2 βαθμούς κατατάσσονται στην ενδιάμεση ομάδα κινδύνου και έχουν διάμεσο επιβίωση 11-14 μήνες, ενώ εκείνοι που κατατάσσονται στην υψηλού κινδύνου ομάδα παρουσιάζουν διάμεση ολική επιβίωση 5-8 μήνες.

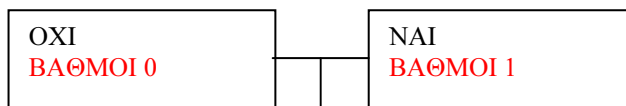
Εικόνα 3

I-SCOOP: Ioannina Score for CUP Outpatient Oncologic Prognostication (Range 0-4)

1. Πρώτη παράμετρος: Κλινικο-παθολογική υποομάδα ΚΑΠΕ



2. Δεύτερη παράμετρος: Λευκοκυττάρωση (WBC>10,000/mm³)



ΝΑΙ
ΒΑΘΜΟΙ 0

ΟΧΙ
ΒΑΘΜΟΙ 1

3. Τρίτη παράμετρος: Φυσική κατάσταση PS 0 or 1

ΟΜΑΔΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ		
• ΒΑΘΜΟΙ 0	ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 36 ΜΗΝΕΣ	ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ
• ΒΑΘΜΟΙ 1	ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 14 ΜΗΝΕΣ	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ
• ΒΑΘΜΟΙ 2	ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 11 ΜΗΝΕΣ	ΚΙΝΔΥΝΟΥ
• ΒΑΘΜΟΙ 3	ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 8 ΜΗΝΕΣ	ΥΨΗΛΟΥ
• ΒΑΘΜΟΙ 4	ΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ 5 ΜΗΝΕΣ	ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η αξιοπιστία της συγκεκριμένης προγνωστικής διαβάθμισης επιβεβαιώθηκε όταν μετά τον διαχωρισμό του πληθυσμού σε 10 τυχαίες υποομάδες, αξιολόγησης (N=103) και ελέγχου (N=208) υπήρξε αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων σε ποσοστό 80%. Συγκεκριμένα, σε οκτώ από τις δέκα δοκιμασίες οι τρεις παραμετροί επιβεβαιώθηκαν ως προγνωστικά σημαντικές και κατέταξαν τους ασθενείς σε υποομάδες με διάκριτη επιβίωση, όπως στον αρχικό πληθυσμό.

**B. Μελέτη μοριακών δεικτών με προβλεπτική και
προγνωστική αξία στο Καρκίνωμα Αγνώστου
Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ)**

Εισαγωγή

Το καρκίνωμα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας -ΚΑΠΕ, κατατάσσεται στις δέκα πιο συχνές κακοήθειες του αναπτυγμένου κόσμου και υπολογίζεται στο 2-5% των κακοηθειών. Η διάγνωση της νόσου είναι εξ αποκλεισμού. Μετά δηλαδή την ολοκλήρωση, εμπειριστατωμένης και λεπτομερούς διαγνωστικής προσέγγισης, η αδυναμία ανίχνευσης της πρωτοπαθούς εστίας κατατάσσει τους ασθενείς σε αυτή την ετερογενή κλινική οντότητα. Είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς ότι, αν εξαιρεθούν οι ασθενείς που ανήκουν στην υποομάδα των ευνοϊκής πρόγνωσης του ΚΑΠΕ, υπάρχει έλλειψη στην ποικιλία της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Πρόσφατη μετανάλυση απέδειξε την έλλειψη ανωτερότητας των δεικτών ανταπόκρισης και ολικής επιβίωσης, οποιασδήποτε συνδυαστικής χημειοθεραπείας, ανεξάρτητα του πόσο μοντέρνα είναι, έναντι της μονοθεραπείας.[87] Ο ΚΑΠΕ λοιπόν αποτελεί ετερογενή νόσο χαρακτηριζόμενη από πρόωμη μεταστατική διάθεση, υψηλό μεταστατικό φορτίο, υποστροφή της πρωτοπαθούς εστίας και αντίσταση στη θεραπεία. Γίνεται κατανοητό ότι χωρίς την γνώση της βιολογικής συμπεριφοράς της νόσου δεν θα καταστεί δυνατή η τροποποίηση των βιομορίων-κλειδιών για την ανάπτυξη των όγκων, με την χρήση της στοχεύουσας θεραπείας και κατά συνέπεια θα χαθεί η μοναδική ίσως ελπίδα για την επιμήκυνση της ολικής επιβίωσης.

Το μονοπάτι σηματοδότησης Notch αποτελεί θεμελιώδες μονοπάτι ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης επιβίωσης και απόπτωσης και έχει διατηρηθεί από τα ασπόνδυλα ως τα θηλαστικά. [171] Υπάρχουν τέσσερις υποδοχείς Notch, οι Notch 1 ως 4, οι οποίοι είναι ανενεργοί ως την στιγμή της σύνδεσης με τον συνδέτη τους, jagged 1 και 2 καθώς και Delta-like 1, Delta-like 3 και Delta-like 4 που βρίσκονται στα προσκείμενα κύτταρα. [172] Το μονοπάτι σηματοδότησης Notch είναι συχνά απορυθμισμένο σε κακοήθεις όγκους κυρίως του μαστού, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, και του λεμφώματος Hodgkin. [173] Επιπλέον, η απορύθμιση του συγκεκριμένου μονοπατιού σχετίζεται με την απόκτηση του φαινοτύπου της επιθηλιακής- μεσεγχυματογενούς μετατροπής [174] και αυτό-ανανέωσης των στελεχιαίων κυττάρων. [175]

Το μονοπάτι σηματοδότησης MAPK (Ras/Raf/MEK/ERK) έχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της επιβίωσης και της απόπτωσης. [176] Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού, που

προκαλείται από μια ποικιλία σημάτων, οδηγεί στην ενεργοποίηση των RAF πρωτεϊνών μέσω της πρωτεΐνης Ras. Πιο συγκεκριμένα, η RAF πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη Ras ως απόκριση στα διάφορα σήματα που δέχεται το κύτταρο. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη RAF πρωτεΐνη φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη MEK1/2, που με την σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές MAP κινάσες ERK1 και ERK2. Οι ενεργοποιημένες κινάσες ERK1/2, που έχουν τη δυνατότητα φωσφορυλίωσης περισσότερο από 100 διαφορετικών υποστρωμάτων όπως μεμβρανικές, κυτταροπλασματικές, κυτταροσκελετικές, ριβοσωμικές και πυρηνικές πρωτεΐνες (μεταγραφικοί παράγοντες), επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την «μοίρα» των κυττάρων. Το μονοπάτι αυτό συνδέεται με την αντίσταση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αλλά και την αποφυγή της αποπτωτικής διαδικασίας. [177] Αξιοσημείωτη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του MAPK και του PTEN/AKT μονοπατιού κυρίως μέσω του Ras οπότε ελέγχει και τα δύο μονοπάτια.

Το PTEN/AKT μονοπάτι έχει κεντρική δράση σε πολλαπλές κυτταρικές διαδικασίες οι οποίες συμβάλουν στην εκκίνηση και πρόοδο της κακοήθειας όπως: η κυτταρική ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, και η αναστολή της απόπτωσης. [178] Απορύθμιση του μονοπατιού μέσω υπερέκφρασης, μεταλλάξεων ή αποκλίνουσα ενεργοποίηση διαφόρων βιομορίων παρατηρείται σε πολλούς όγκους. Τα κεντρικά μόρια PTEN-phosphatase and tensin-like protein- και AKT –Rac-alpha serine/threonine-protein kinase- αλλά και τα άμεσα (mTOR, PDK1) και έμμεσα (cyclin D1, p21- cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, RPS6-40S ribosomal protein S6) θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς στόχους θεραπείας για τους ασθενείς με κακοήθεια.

Μία άλλη ζωτικής σημασίας συνιστώσα, για το απορυθμισμένο καρκινικό κύτταρο είναι ο υποδοχέας cMET. Πρόκειται για πρωτεΐνη η οποία φυσιολογικά εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Ο συνδέτης του, είναι ο αυξητικός ηπατοκυτταρικός παράγοντας (Hepatocyte growth factor- HGF) ο οποίος παράγεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Η σύνδεση αυτή είναι ουσιώδη για την εμβρυική ανάπτυξη αλλά και για την επούλωση των τραυμάτων. Μια μεγάλη ποικιλία κακοηθειών όπως, ο καρκίνος του παχέως εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, του μαστού, και του προστάτη παρουσιάζουν αποδεδειγμένα διαταραχές στη σηματοδότηση του cMET μονοπατιού, το οποίο είναι υπεύθυνο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την αγγειογένεση και την μετάσταση. [179]

Σε αυτή την αναδρομική μελέτη, εξερευνήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των διαμεμβρανικών υποδοχέων και των συνδετών τους (Notch 1,2,3, Jagged 1 και 2 και cMET) όπως επίσης και πρωτεϊνών που επιτρέπουν τη μετάδοση του μηνύματος pERK (pMAPK) αλλά και του μονοπατιού AKT (PTEN, AKT cyclin D1, p21, RPS6) σε 100 περιστατικά ΚΑΠΕ, με τη χρήση των ιστικών μικροσυτοιχιών. Λιγοστά είναι τα δεδομένα στη βιβλιογραφία για τα συγκεκριμένα μονοπάτια στους ασθενείς με ΚΑΠΕ. Στόχος μας ήταν η ταυτοποίηση βιομορίων με προγνωστική σημασία για την έκβαση των ασθενών με ΚΑΠΕ ώστε να δημιουργήσουμε τις προϋποθέσεις για μελλοντική συμπλήρωση του Προγνωστικού Αλγόριθμου του μέρους Α με αυτά.

Ασθενείς και μέθοδοι

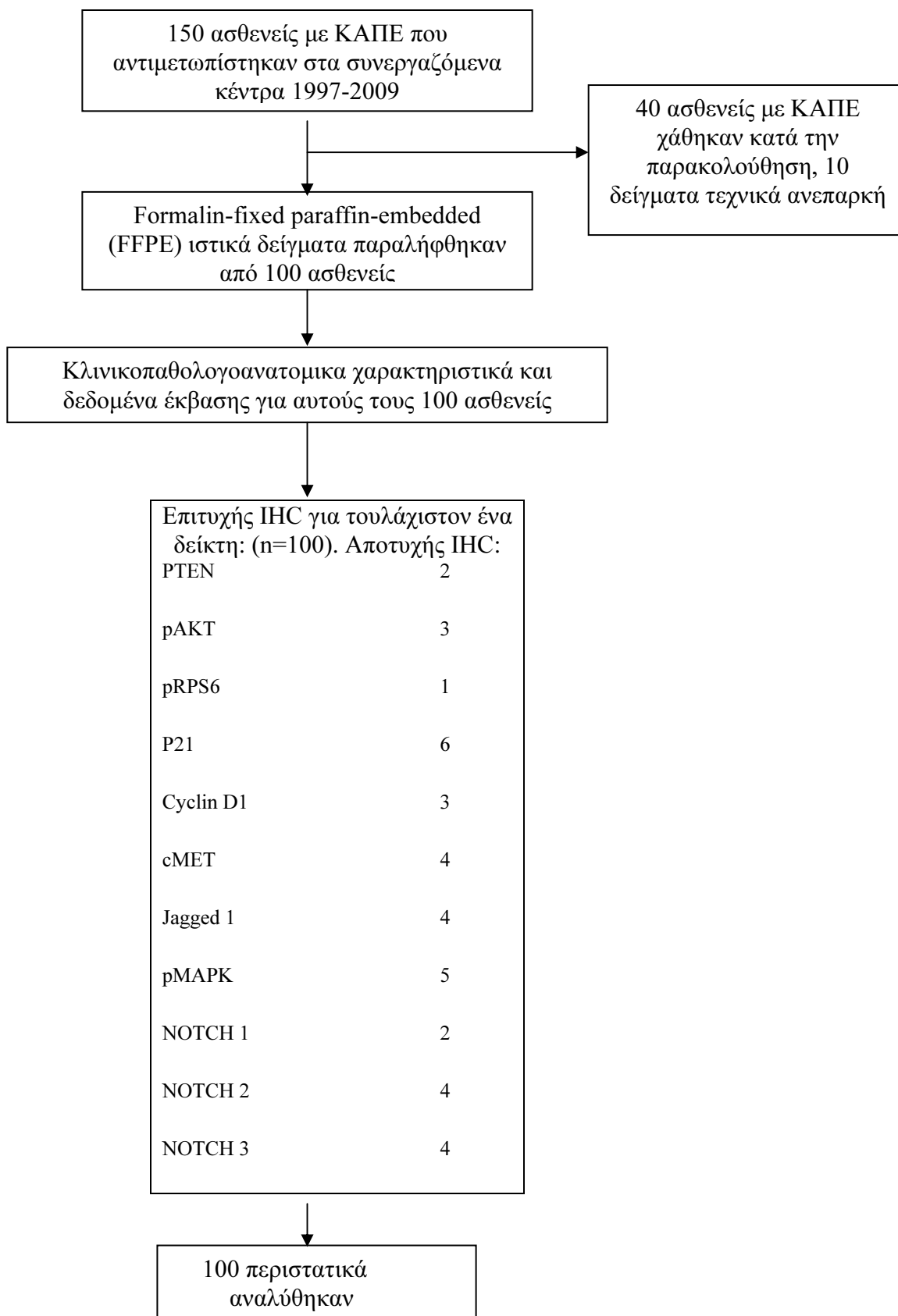
Ασθενείς

Από 150 ασθενείς που διαγνώστηκαν με ΚΑΠΕ και αντιμετωπίστηκαν σε κέντρα της HeCOG (Hellenic Cooperative Oncology Group) όπως και σε κέντρα της Βαλένθιας, Ισπανία (Institute of Health Research Hospital Clinic of Valencia – INCLIVA- University of Valencia, Spain) από το 1995 ως το 2011, καταφέραμε τελικώς να συλλέξουμε τα δεδομένα των 100 από αυτούς. Οι 40 ασθενείς χάθηκαν στην παρακολούθηση και σε 10 περιστατικά υπήρξε ανεπαρκές υλικό. Η διάγνωση του ΚΑΠΕ τέθηκε μετά από την ολοκλήρωση του ενδεδειγμένου κλινικού, εργαστηριακού αλλά και απεικονιστικού ελέγχου, έτσι όπως προβλέπεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής ογκολογικής εταιρίας (ESMO). ελήφθησαν δείγματα όγκου (κύβος παραφίνης). Όλοι οι ασθενείς παρείχαν γραπτή συγκατάθεση για τη χρήση των δεδομένων τους και του βιοπτικού τους υλικού. [180] **Εικόνα 4.**

Ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue Microarrays-TMAs)

Έμπειροι παθολογοανατόμοι και ο υπότροφος επανέλεξαν, ιστολογικά, πλακίδια με τομές πάχους 5mm και χρώση αιματοξυλίνης –ηωσίνης από 100 ιστικούς κύβους παραφίνης (Formalin-fixed paraffin-embedded -FFPE) ασθενών με ΚΑΠΕ. Σκοπός τους ήταν η πιστοποίηση της καταλληλότητας του υλικού, της ύπαρξης όγκου αλλά και η επιβεβαίωση της παθολογοανατομικής διάγνωσης καρκινώματος. Ιστικοί κύλινδροι πάχους 1.5mm εισήχθησαν σε ένα ενιαίο μπλοκ παραφίνης με ειδικές ισαπέχουσες θέσεις υποδοχής δείγματος για ιστικές μικροσυστοιχίες στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Οι ιστικές μικροσυστοιχίες (TMAs) παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια του μηχανήματος Beecher Instruments MTA-1 Tissue Arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). Κάθε μπλοκ TMA περιείχε 30-87 ιστικούς κυλίνδρους από τους αρχικούς ιστικούς κύβους παραφίνης, ενώ κύλινδροι από διάφορες νεοπλασίες αλλά και μη νεοπλασματικούς ιστούς συμπεριλήφθησαν ως ιστός ελέγχου. Δύο κηλίδες (spots) από κάθε όγκο, πάχους 5μm τοποθετήθηκαν σε κάθε ένα από πέντε κύρια πλακίδια (master array slides), ένα για κάθε υπό μελέτη δείκτη.

Εικόνα 4. Γράφημα ροής – παρατήρησης (*REMARK flow chart*).



Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Τα πλακίδια των ΤΜΑς στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημική χρώση στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. -με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου συστήματος Bond Max™ (Leica Microsystems, Germany) και εστάλησαν για εκτίμηση της έκφρασης τους - όλων των προαναφερθέντων βιοδεικτών- από παθολογοανατόμους του Παθολογοανατομικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και από τον υπότροφο.

Οι τομές χρώστηκαν με αντισώματα έναντι:

- PTEN, clone 6H2.1, Dako, Glostrup, DK, σε αραιώση 1:200, για 30 λεπτά
- phosphorylated Akt1/2/3 at Threonine 308 (SC, San Ramon, CA), σε αραιώση 1:1000 ολονύχτια στους 4°C
- Cyclin D1, clone SP4 (Spring, Pleasanton, CA) σε αραιώση 1:70 για 30 λεπτά
- p21, clone SX118 (Dako) σε αραιώση 1:60 για 30 λεπτά
- phospho-S6 ribosomal protein at Serine 235/236, clone D57.2.2E (CST, Danvers, MA) σε αραιώση 1:100 ολονύχτια στους 4°C
- NOTCH1: anti-activated NOTCH1 (ab8925) σε αραιώση 1:300; Abcam για 30 λεπτά
- NOTCH 2: anti-activated NOTCH2 (ab72803) σε αραιώση 1:100; Abcam για 30 λεπτά
- NOTCH3: anti-NOTCH3 (ab23426) σε αραιώση 1:600, Abcam για 30 λεπτά
- Jagged1: Anti- JAG1, HPA021555, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, σε αραιώση 1:80
- Phospho- p44/42Thr202/Tyr204 : 20G11, CST, Beverly, MA, σε αραιώση 1:100
- cMET :8F11, Leica Biosystems, Newcastle, UK, σε αραιώση 1:50.

Η πρόσδεση των αντισωμάτων έγινε ορατή με τη χρήση των αντιδραστηρίων Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). DAB (3,3-diaminobenzidine) χρησιμοποιήθηκε ως χρωμογόνο ενώ η αιματοξυλίνη ως δείκτης αντίχρωσης. Η ποιότητα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αξιολογήθηκε με τη χρήση θετικών ελέγχων.

Οι ιστικές μικροσυστοιχίες μελετήθηκαν ως προς την ανοσοϊστοχημική έκφραση των διαμεμβρανικών υποδοχέων Notch1-3 και cMET, του συνδέτη των Notch υποδοχέων Jagged 1, του ενεργοποιημένου μεταγωγέα σήματος pMAPK, των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου Cyclin D1 και p21, του αναστολέα PI3K/AKT μονοπατιού PTEN, του pRPS6 που αποτελεί δομικό συστατικό του ριβοσώματος καθώς και της ενεργοποιημένης κινάσης phospho-AKT.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 2 μm από κάθε μπλοκ μικροσυστοιχίας και ξηράθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60 ° C για όλη τη νύχτα. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε ένα Bond Max σύστημα αυτοματοποιημένης ανοσοϊστοχημείας Vision Biosystem (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο. Αρχικά, οι ιστοί αποπαραφινώθηκαν και προεπεξεργάστηκαν με το ρυθμιστικό διαλύματος (EDTA buffer pH 8.8) στους 98 ° C για 20 λεπτά. Μετά τα στάδια πλύσης, διεξήχθη απενεργοποίηση της υπεροξειδάσης με τη χρήση του πολυμερούς κιτ (Bond Polymer DC9800 -Leica Microsystems GmbH) για 10 λεπτά. Οι ιστοί υποβλήθηκαν εκ νέου σε διαδικασία πλύσης και στη συνέχεια επώαστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα για 30 λεπτά (πλην των φωσφορυλιωμένων αντισωμάτων τα οποία επώαστηκαν ολονύχτια). Ακολούθως, οι ιστοί επώαστηκαν με πολυμερές για 10 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία της αντίχρωσης με DAB-χρωμογόνο επί 10 λεπτά.

Τα ποσοστά χρώσης των καρκινικών κυττάρων υπολογίστηκαν και η μέση τιμή των δύο ιστικών κυλίνδρων καταγράφηκε με τη βοήθεια δύο παθολογοανατόμων και τον υπότροφο, σε οπτικό μικροσκόπιο τριών κεφαλών. Θετικά δείγματα ελέγχου ήταν καρκινώματα από μαστό, έντερο, νεφρό και θυρεοειδή αδένα, φυσιολογικός πλακούντας και λέμφωμα αμυγδαλής ενώ για αρνητικό δείγμα ελέγχου, το μελετώμενο αντιγόνο παραλήφθηκε.

Ανοσοϊστοχημικά σημεία θετικότητας (cut offs)

Μετά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν ανευρέθηκε τεκμηριωμένη τιμή θετικότητας (cut-offs) της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για κανένα από τα βιομόρια υπό αξιολόγηση, σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. Με αυτά τα δεδομένα τα ανοσοϊστοχημικά cut-offs υπολογίστηκαν προοπτικά με βάση αναλύσεις κατανομής σε ιστογράμματα

συχνότητας. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόσαμε, αναλύσεις κατανομής των καταγεγραμμένων ποσοστών των βαμμένων καρκινικών κυττάρων σε όλα τα δείγματα και τα συγκρίναμε με τις τιμές θετικότητας που ανευρέθηκαν στη βιβλιογραφία. Σε περίπτωση που το ιστόγραμμα συχνότητας καταδείκνυε εμφανώς ποσοστό κυτταρικής χρώσης που διέκρινε τον πληθυσμό σε δύο διάκριτες υποομάδες (bimodal distribution), επιλέγονταν η τιμή αυτή ως cut-off. Σε αντίθετη περίπτωση, επιλέγονταν ως cut off η τιμή με βέλτιστη ευαισθησία και ειδικότητα για πρόβλεψη Overall Survival σε Receiver Operating Characteristics (ROC) ανάλυση. Κατορθώσαμε με αυτό τον τρόπο την επιλογή τιμών θετικότητας που διέκριναν και διαχώρισαν τον κάθε πληθυσμό σε υποομάδες θετικές ή αρνητικές στην ανοσοϊστοχημική έκφραση, χωρίς όμως τον καθορισμό προγνωστικής αξίας.

Συγκεκριμένα:

- Θετικά περιστατικά για PTEN ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 60\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για phospho-AKT ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 85\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για RPS6 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>60\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για p21 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>10\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για Cyclin D1 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>20\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH1 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 5\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH2 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>20\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH3 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>80\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για cMET ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>20\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για pMAPK ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $>40\%$ των καρκινικών κυττάρων

- Θετικά περιστατικά για Jagged 1 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε >5% των καρκινικών κυττάρων

Στο τελικό στάδιο της ανάλυσης και για να μην απολέσουμε τιμές που θα μπορούσαν να έχουν προγνωστική αξία, κάναμε ROC (Receiver-operating-curve) ανάλυση στην ανοσοϊστοχημική βαθμονόμηση όλων των παραμέτρων, λαμβάνοντας το θάνατο (Overall Survival event) ως ενδεικτική παράμετρο και δεν βρήκαμε κάποιο cut-off με στατιστικώς σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα.

Στατιστική ανάλυση

Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman (Spearman correlation coefficient-Rho) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του συσχετισμού μεταξύ των υπό μελέτη δεικτών, ενώ το τεστ Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε ως μη παραμετρικό ανάλογο (ANOVA). Η προγνωστική αξία των διαφόρων μεταβλητών αλλά και η προβλεπτική τους αξία για απάντηση στην θεραπεία μελετήθηκαν με την χρήση του μοντέλου αναλογικού κινδύνου Cox αλλά και του χ^2 τεστ, αντιστοίχως. Το μοντέλο Cox αναλογικού κινδύνου χρησιμοποιήθηκε στην μονοπαραγοντική ανάλυση ενώ η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης Wald, στην πολυπαραγοντική ανάλυση στην οποία εισήχθησαν όλες οι υπό μελέτη ανοσοϊστοχημικές παράμετροι. Το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression-free survival-PFS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως την πρόοδο της νόσου ή το θάνατο. Η ολική επιβίωση (overall survival-OS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως το θάνατο ή έως την τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης (follow-up) με τις καμπύλες Kaplan-Meier και τα τεστ Logrank, Breslow. Όλες οι υπολογιζόμενες p-values ήταν διωνυμικές και τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0.05$. Δεν έγινε διόρθωση πολλαπλών συγκρίσεων κατά Bonferroni. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS 16.0 (Chicago, Illinois, USA).

Αποτελέσματα

Ασθενείς, χαρακτηριστικά του όγκου και ανοσοϊστοχημική έκφραση των βιομορίων

Το αδενοκαρκίνωμα ήταν ο πιο συχνός ιστολογικός υπότυπος με το 90% αυτών να είναι μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης. Η σπλαχνική, η υπομάδα με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής καθώς και η περιτοναϊκή ή πλευριτική καρκινωμάτωση αποτελούν τις τρεις πιο συχνές υποομάδες του υπό μελέτη πληθυσμού. Τα τρία τέταρτα των ασθενών περίπου, παρουσίαζαν στην διάγνωση της νόσου καλή φυσική κατάσταση (Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organisation (ECOG/WHO) performance status 0 ή 1) και οι περισσότεροι έλαβαν χημειοθεραπευτικό σχήμα με βάση την πλατίνα, οι μισοί εκ των οποίων ανταποκρίθηκαν. **Πίνακας 17.**

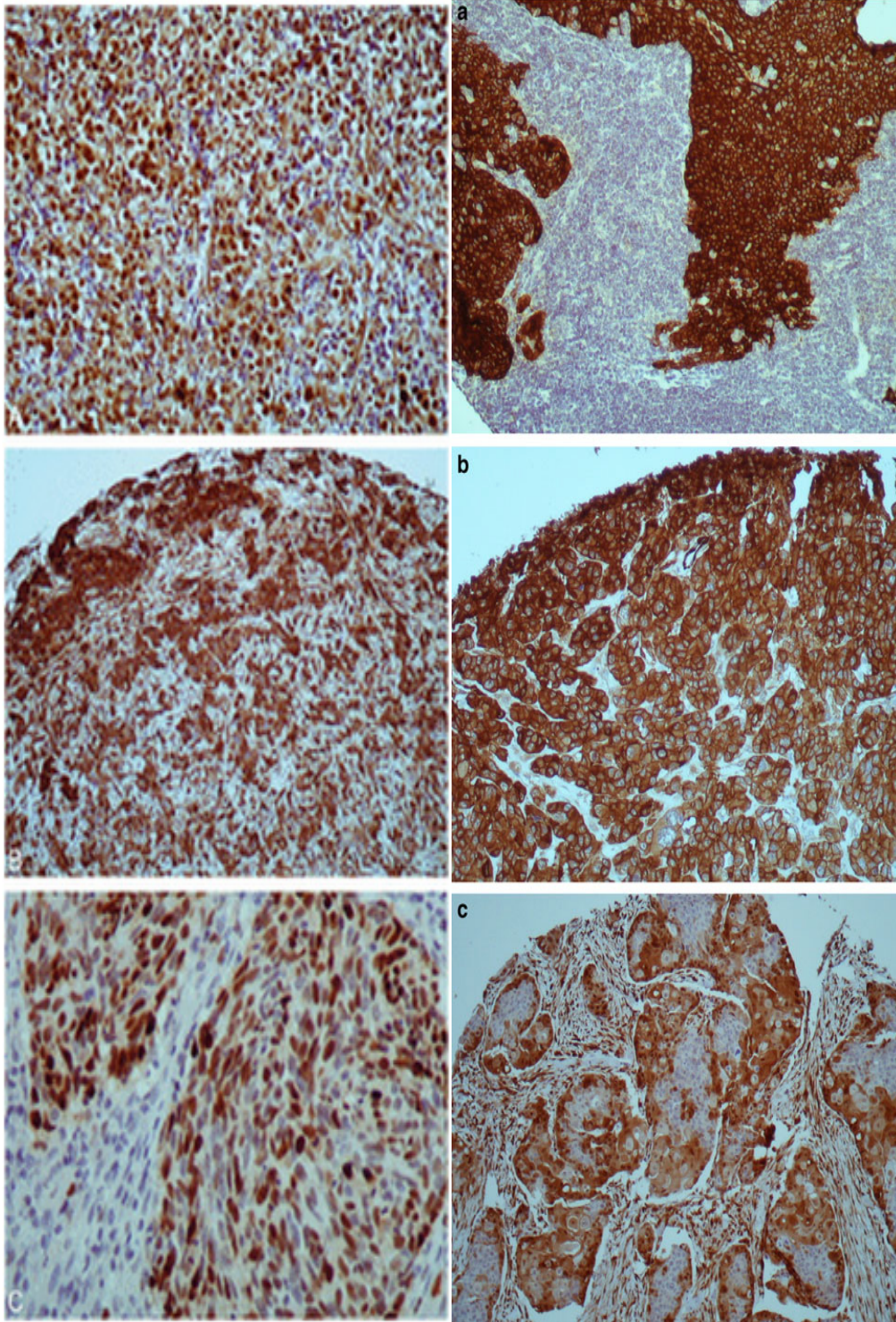
Η υποομάδα των πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύτηκε από το 30% των περιστατικών και παρουσίαζαν κυρίως σπλαχνικές μεταστάσεις. Η διάμεση παρακολούθηση ήταν 28 μήνες και 61 ασθενείς είχαν αποβιώσει. Το διάμεσο διάστημα ελεύθερο νόσου ήταν 7 μήνες (95% CI 4.8–9.2) ενώ η μέση ολική επιβίωση 12 μήνες (95% CI 8.7–15.3) για όλους τους ασθενείς. Όσον αφορά τις υποομάδες η διάμεση ολική επιβίωση ήταν 11 μήνες για του ασθενείς με λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής, 17 μήνες για εκείνους με περιτοναϊκή ή πλευριτική καρκινωμάτωση και 9 μήνες για την σπλαχνική νόσο. Δεν υπήρξε όμως καμία σημαντική στατιστική διαφορά της ολικής επιβίωσης μεταξύ των διαφόρων υποομάδων.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του PTEN εξετάστηκε σε 98 δείγματα, του AKT σε 97 δείγματα, του RPS6 σε 99 δείγματα, του p21 σε 94 δείγματα, της cyclin D1 σε 97 δείγματα, cMET σε 96 δείγματα, Notch 1 σε 98 δείγματα, Notch 2 σε 96 δείγματα, Notch 3 σε 96 δείγματα, Jagged1 σε 96 δείγματα, **Πίνακας 18** ενώ για την έκφραση της pMAPK ελέγχθησαν και 95 δείγματα. Τα βιομόρια PTEN, pAKT, pRPS6, Notch 3 και pMAPK έδειξαν συχνή υπερέκφραση (υψηλό ποσοστό θετικών καρκινικών κυττάρων). **Εικόνα 5 και 6.**

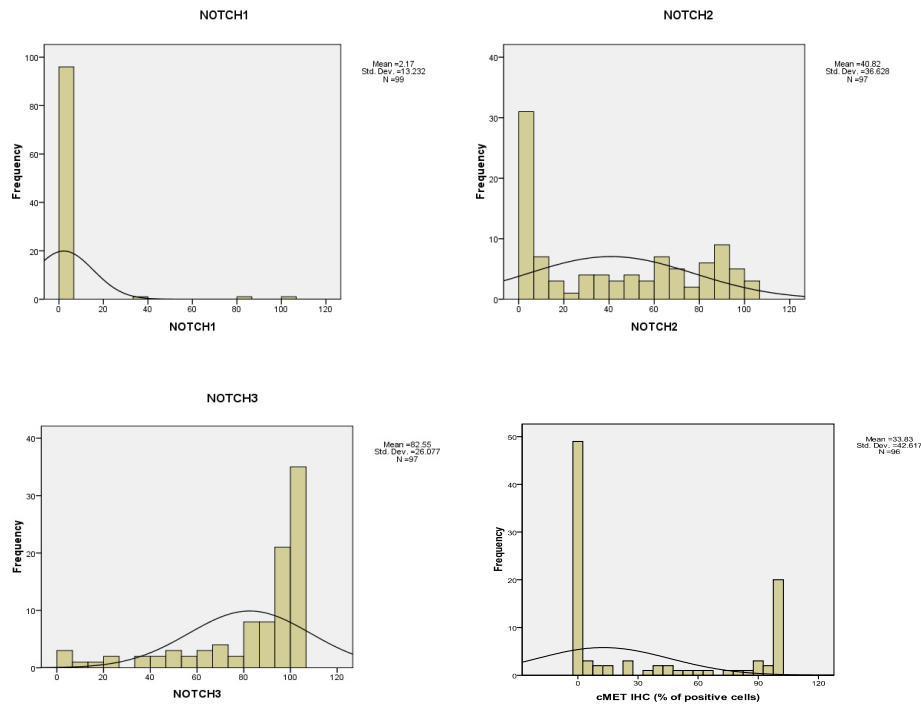
Πίνακας 17. Χαρακτηριστικά των ασθενών

N= 100		
Γένος	Άνδρες	47
	Γυναίκες	53
Ηλικία, έτη	Διάμεση (εύρος)	61 (35-85)
Φυσική κατάσταση-PS	PS 0-1	69
	PS 2	23
	Απολεσθέντα δεδομένα	8
Ιστολογία	Αδενοκαρκίνωμα	55
	Πλακώδες καρκίνωμα	20
	Πτωχά διαφοροποιημένο/ αδιαφ. καρκίνωμα	15
	Νεόπλασμα	9
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)	1	7
	2	38
	3	6
	Απολεσθέντα δεδομένα	9
Αριθμός μεταστατικών εστιών	1	51
	2 ή περισσότερες	49
Υποομάδα ΚΑΠΕ	Σπλαγγική	27
	Πλακώδες τραχήλου/ βουβώνων -λεμφαδένες	25
	Περιτοναϊκή καρκινωμάτωση	20
	Μασχαλιαίοι λεμφαδένες	8
	Απολεσθέντα δεδομένα	9
Χημειοθεραπεία	Ναι/Όχι	68 (78%)/ 19(22%)
	Βασισμένη στην πλατίνα	27(32%)
	Πλατίνα και ταξάνη	23(27%)
	Βασισμένη στην ταξάνη	3(4%)
	Άλλη	31(37%)
Απάντηση στη θεραπεία	Πλήρης/ Μερική ύφεση	40
Διάμεσο ελεύθερο διάστημα υποτροπής (95% CI)		7 μήνες (4,8-9,2)
Διάμεση ολική επιβίωση(95% CI)		12 μήνες (8,7-15,3)

Εικόνα 5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση διαφόρων βιομορίων σε ιστικές μικροσυστοιχίες. **Αριστερά:** (A) pAKT πρωτεϊνική έκφραση (×200); (B) pRPS6 έκφραση (×100); (C) p21 πυρηνική έκφραση (×400). **Δεξιά:** a. cMET (x200), b. Notch3 (x200), c. pMAPK (x200)



Εικόνα 6. Ιστογράμματα συχνοτήτων που δείχνουν την κατανομή έκφρασης (% των χρωματισμένων κυττάρων) NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 και cMET



Πίνακας 18. Αθροιστικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των υπό μελέτη βιομορίων

Βιομόρια	N	Βαμμένα καρκινικά κύτταρα, διάμεση τιμή %	Cut-off (%)	Θετική χρώση (N)
PTEN	98	60	60	49
pAKT	97	97	85	71
pRPS6	99	72	60	59
P21	94	17	10	57
Cyclin D1	97	12	20	43
cMET	96	2	20	40
Notch 1	98	0	5	2
Notch 2	96	35	20	54
Notch 3	96	95	80	70
Jagged 1	96	0	5	21
pMAPK	95	53	40	51

Συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης βιομορίων με άλλα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Σκοπός της τρέχουσας διατριβής αποτελεί η ανίχνευση πιθανής σχέσης μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης βιομορίων, και κλινικο- παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών σε ασθενείς με διάγνωση ΚΑΠΕ, χρησιμοποιώντας τα ανοσοϊστοχημικά cut-offs όπως αυτά περιγράφονται σε προηγούμενη παράγραφο. Notch 3, cMET, p21 και CyclinD1 ήταν τα βιομόρια εκείνα τα οποία έδωσαν τις περισσότερες πληροφορίες σε αυτό τον τομέα. Πιο συγκεκριμένα: εντοπίστηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση Notch 3, cMET και CyclinD1 κατά κύριο λόγο σε πλακώδη καρκινώματα έναντι αδενοκαρκινωμάτων (χ^2 $p < 0,001$). Ειδικότερα, η έκφραση cMET εντοπίστηκε στο 90% των πλακωδών καρκινωμάτων έναντι του 29% των αδενοκαρκινωμάτων και καρκινωμάτων, ενώ η έκφραση του Notch 3 στο 90% των πλακωδών καρκινωμάτων και στο 65% των αδενοκαρκινωμάτων και 71% των καρκινωμάτων. Τέλος η CyclinD1, εντοπίζεται στο 70% των πλακωδών καρκινωμάτων και στο 39% των αδενοκαρκινωμάτων.

Σχετικά με τις κλινικές υποομάδες αλλά και την φυσική ιστορία η έκφραση του cMET ήταν επίσης σημαντική στην λεμφαδενική υποομάδα (65% εκφράζει το cMET) έναντι της σπλαχνικής (μόνο το 23% θετικό για το cMET), της μασχαλιαίας λεμφαδενοπάθειας και της περιτοναϊκής καρκινωμάτωσης (μόνο το 35% θετικό για το cMET στη κάθε υποομάδα, χ^2 $p < 0,001$). Η έκφραση του Notch 3 παρατηρήθηκε κυρίως στην υποομάδα της μασχαλιαίας λεμφαδενοπάθειας (το 85% θετικό) και της λεμφαδενικής υποομάδας (το 86% θετικό) σε αντίθεση με εκείνη της σπλαχνικής (θετικότητα στο 68%) αλλά και της περιτοναϊκής καρκινωμάτωσης υποομάδα (μόνο το 53% θετικό, χ^2 $p = 0,043$). **Πίνακας 19.**

Υψηλή έκφραση του p21 παρατηρήθηκε στη λεμφαδενική υποομάδα (76% θετικό) και στην σπλαχνική υποομάδα (θετικότητα στο 63%) σε αντίθεση με την υποομάδα της περιτοναϊκής και πλευριτικής καρκινωμάτωσης ($p = 0,025$). Επιπροσθέτως αυξημένη έκφραση της CyclinD1 παρουσίασε η λεμφαδενική υποομάδα (60% θετικό) έναντι της σπλαχνικής υποομάδας (θετικότητα στο 42%) και της υποομάδας της περιτοναϊκής και πλευριτικής καρκινωμάτωσης (22%, $p = 0,04$).

Πίνακας 19. Συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των βιομορίων με κλινικά, παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

	cMET	Notch1	Notch2	Notch3	Jagged1	pMAPK
	(Chi-Square / p-value)					
Φύλο P value	0.97 0.32	0.20 0.65	2.09 0.15	1.96 0.16	4.89 0.03	1.89 0.17
PS P value	4.71/0.03	0.15/0.69	1.03/0.31	1.55/0.21	0.03/0.86	0.04/0.8
Ηλικία P value	0.49/0.78	2.18/0.34	0.19/0.91	0.22/0.90	1.78/0.41	1.82/0.40
Ιστολογικός τύπος P value	35.29 0.001 (πλακώδες vs αδενοκαρκίνωμα και καρκίνωμα)	5.99 0.11	3.98 0.26	12.84 0.001 (πλακώδες vs αδενοκαρκίνωμα)	4.57 0.21	0.71 0.87
Grade P value	6.84 0.03 (καλής vs. χαμηλής διαφοροποίησης)	4.31 0.12	2.67 0.26	3.01 0.22	0.11 0.95	0.11 0.95
Υποομάδα P value	21.82 0.001 (μέσης γραμμής λεμφαδενική vs. σπλαχνική vs. περιτοναϊκή)	2.36 0.5	5.6 0.13	8.1 0.043 (μασχαλιαίων λεμφαδένων vs. σπλαχνική vs περιτοναϊκή)	2.67 0.44	6.42 0.09
Μεταστατικές εστίες P value	16.96 0.001 μαλακών μορίων ή/και λεμφαδένες vs σπλάχνων vs. οστά	1.05 0.79	5.82 0.12	12.02 0.007 (σπλάχνων vs. περιτόναιο/ υπεζωκότας vs.μαλακών μορίων ή/και λεμφαδένες vs. οστά)	3.76 0.29	8.48 0.04 (καμία διαφορά στην post hoc analysis)
Αρ. μεταστατικών εστιών P value	11.46/0.001 (1 μετασ. εστία vs. 2/3 εστιών)	2.94/0.23	7.06/0.03 (1 μετασ. εστία vs. 2/3 εστιών)	1.82/0.40	2.12/0.35	0.57/0.75
Έτος διάγνωσης P value	3.11/0.21	2.39/0.30	4.60/0.10	0.15/0.93	1.42/0.49	4.53/0.10
Χημειοθεραπεία Ναι/Όχι P value	0.01/0.92	0.24/0.62	1.21/0.27	0.74/0.39	0.02/0.88	0.00/0.98
Σχήμα ΧΜΘ P value	3.47/0.32	1.19/0.76	2.10/0.55	5.65/0.13	4.46/0.22	0.77/0.86

Φύλο: αρσενικό vs. θηλυκό; Ηλικία <56 vs. 56–65 vs. >65 yo, PS 0–1 vs.>1, Ιστολογία: αδενοκαρκίνωμα vs. πλακώδες vs. καρκίνωμα vs. νεόπλασμα; Grade: καλής vs. μέτριας vs. χαμηλής διαφοροποίησης; Υποομάδα: σπλαχνική vs. μασχαλιαίων λεμφαδένων vs. περιτοναϊκή καρκινωμάτωση vs. μέσης γραμμής λεμφαδενική vs πλακώδους τραχηλικών/βουβονικών λεμφαδένων; Μεταστατικές εστίες: σπλάχνων vs.μαλακών μορίων ή/και λεμφαδένες vs. οστά vs. περιτόναιο/ υπεζωκότας. Αριθμός μεταστατικών εστιών: 1 vs. 2/3 vs >3. Έτος διάγνωσης: <2001 vs. 2001–2005 vs.>2005. Χημειοθεραπεία: χημειοθεραπεία vs. όχι χημειοθεραπεία. Σχήμα χημειοθεραπείας: Πλατίνα vs ταξάνη vs πλατίνα/ταξάνη vs ούτε πλατίνα ούτε ταξάνη. Σημείωση Η ανοσοϊστοχημική ένταση (% χρωματισμένα καρκινικά κύτταρα) θεωρήθηκε συνεχής μεταβλητή και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Kruskal-Wallis test

Επιπλέον η έκφραση του cMET ήταν χαρακτηριστική στο ΚΑΠΕ με μεταστάσεις σε μαλακά μόρια και λεμφαδένες έναντι του ΚΑΠΕ με σπλαχνικές αλλά και οστικές μεταστάσεις (χ^2 $p < 0,001$). Η έκφραση του Notch 3 δεν ανευρέθηκε στις οστικές μεταστάσεις (0%, χ^2 $p = 0,007$). Δεν υπήρξαν άλλοι στατιστικά σημαντικοί συσχετισμοί.

Η σχέση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των βιομορίων τέθηκε και αυτή σε έρευνα. Όπως φαίνεται στον **πίνακα 20** η πιο σημαντική σχέση μεταξύ των βιομορίων δημιουργήθηκε μεταξύ του Notch 3 και του cMET (Spearman's rho correlation coefficient=0,39, Sig.2-tailed, $p < 0,001$) ενώ η σχέση μεταξύ Notch 3 και pMAPK παρουσίασε οριακή στατιστική σημαντικότητα (Spearman's rho correlation coefficient=0,2, Sig.2-tailed, $p = 0,059$).

Πίνακας 20. Συσχέτιση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μεταξύ των διαφόρων βιομορίων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Spearman Rho test	Notch1	Notch2	Notch3	Jagged1	pMAPK
cMET	-0.1 / P=0.33	-0.13 P=0.2	0.39 P=0.001	-0.04 P=0.69	0.02 P=0.86
Notch1		0.1 P=0.34	0.09 P=0.4	-0.06 P=0.56	0.15 P=0.14
Notch2			-0.06 P=0.53	0.01 P=0.95	0.01 P=0.91
Notch3				-0.03 P=0.78	0.2 P= 0.059
Jagged1					-0.07 P=0.47

Η ανοσοϊστοχημική ένταση (% χρωματισμένα καρκινικά κύτταρα) θεωρήθηκε συνεχής μεταβλητή και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Spearman's rho τεστ [Correlation Coefficient / Sig. (2-tailed)] Στην παρένθεση αναφέρεται επίσης η συσχέτιση Pearson.

Προγνωστική και προβλεπτική αξία των βιομορίων- Μονοπαραγοντική Ανάλυση

Βασικό ερώτημα στο οποίο προσπαθεί να απαντήσει αυτή η διδακτορική διατριβή, είναι κατά πόσο η μονοπαραγοντική ανάλυση, της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης, των υπό μελέτη βιομορίων μπορεί να ανιχνεύσει την προγνωστική αξία κάποιων από αυτά σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του phospho-AKT καθώς και του phospho RPS6 καθώς και η υψηλή έκφραση του pMAPK συνδέθηκαν με πτωχή έκβαση. **Πίνακας 21.** Η υπερέκφραση του pMAPK εμφάνισε

Πίνακας 21. Προγνωστική επίδραση των βιομορίων στην ολική επιβίωση σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

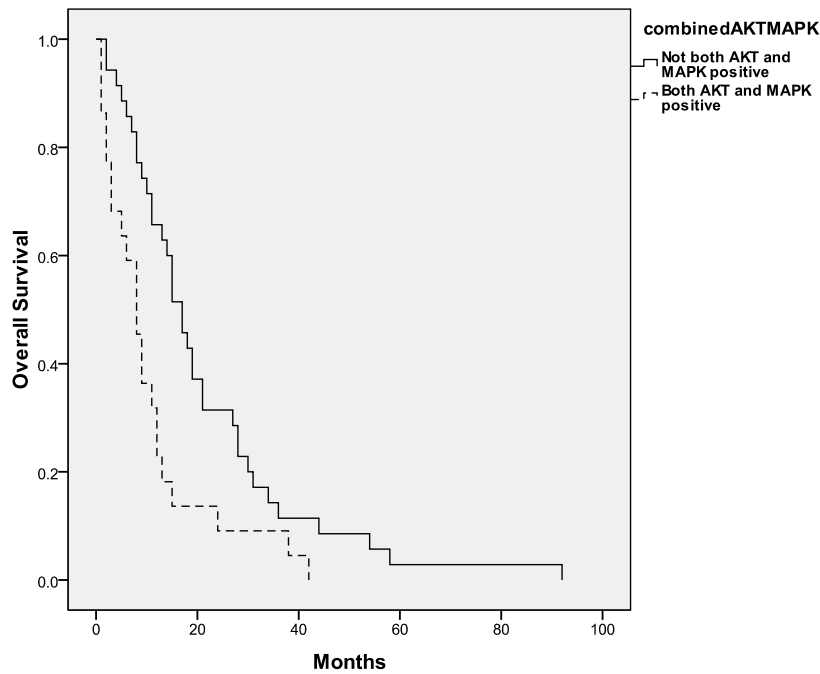
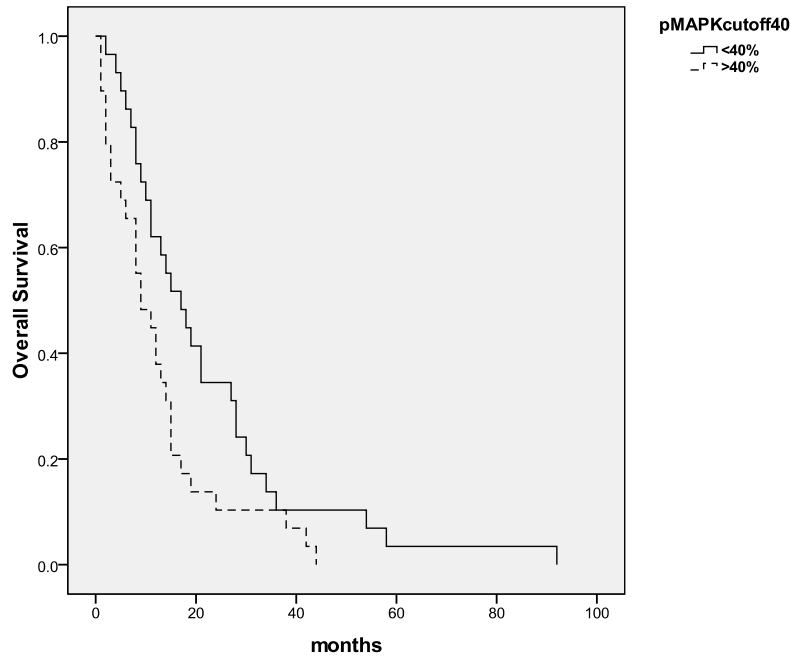
Πρωτεΐνη	Διάμεση ολική επιβίωση (μήνες)	95% CI (μήνες)	Breslow <i>P</i>
pAKT			0.047
Υψηλό	11	7.3–14.7	
Χαμηλό	15	8.7–21.1	
pRPS6			0.030
Υψηλό	9	6.0–12.0	
Χαμηλό	17	7.1–13.4	
cMET			0.05
Υψηλό	15	9.1-20.9	
Χαμηλό	9	4.5-13.5	
pMAPK			0.016
Υψηλό	9	10–24	
Χαμηλό	17	3.7–14.3	

ακόμη σημαντικότερη στατιστική διαφορά, αφού η μέση ολική επιβίωση κυμάνθηκε στους 17 μήνες (95 % CI 10–24) έναντι των 9 μηνών (95 % CI 3.7–14.3) ($p = 0.016$) που παρουσίασαν οι ασθενείς τα δείγματα των οποίων είχαν χαμηλή έκφραση pMAPK. Πράγματι η σύγχρονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του p-AKT και του pMAPK συνδέονται με διάμεση ολική επιβίωση τους 8 μήνες έναντι 17 μηνών όταν δεν εκφράζεται κανένα από αυτά τα δύο βιομόρια. **Εικόνα 7.**

Ένα άλλο βιομόριο με προγνωστικό αντίκτυπο ήταν το cMET καθώς η υπερέκφραση του παρουσίασε οριακή στατιστική σημαντικότητα καλύτερης πρόγνωσης. Η διάμεση ολική επιβίωση της αυξημένης έκφρασης έναντι της χαμηλής ήταν 15 μήνες (95 % CI 9.1–20.9) και 9 μηνών (95 % CI 4.5–13.5), ($p = 0.05$).

Εικόνα 7. Ολική επιβίωση και ανοσοϊστοχημική έκφραση των pMAPK και συνδυασμό των p-AKT και pMAPK σε όλους τους ασθενείς με ΚΑΠΕ

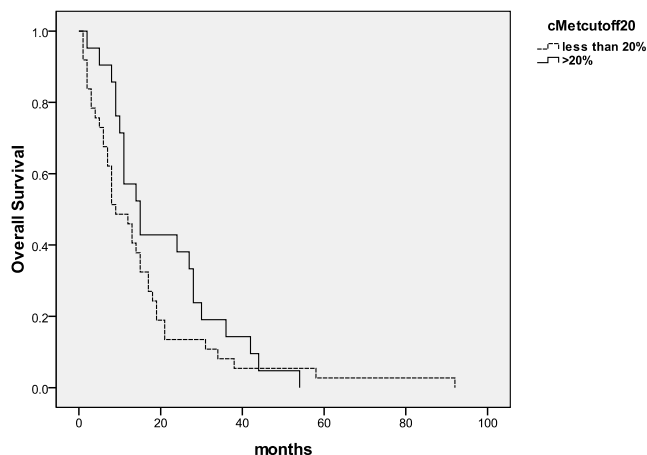
pMAPK



αντίστοιχα και το μέσο διάστημα ελεύθερο νόσου ήταν 9 μήνες (95 % CI 7,6–10,4) έναντι 6 μηνών (95 % CI 4–8), αντιστοίχως, ($p = 0.056$). Πίνακας 21. Εικόνα 8.

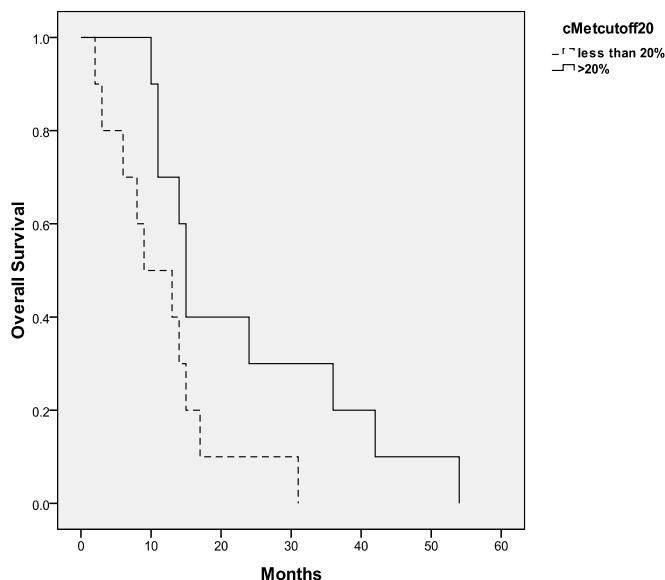
Εικόνα 8. Ολική επιβίωση και σύγχρονη ανοσοϊστοχημική έκφραση του cMET σε όλους τους ασθενείς με ΚΑΠΕ

cMET



Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων και η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη βιομορίων με τις κλινικές υποομάδες ΚΑΠΕ, επιβεβαίωσε την θετική προγνωστική επίδραση του cMET στην ολική επιβίωση ασθενών με ΚΑΠΕ λεμφαδενική νόσο μέσης γραμμής. **Εικόνα 9. Πίνακας 22.**

Εικόνα 9. Ολική επιβίωση σε ασθενείς της λεμφαδενική μέσης γραμμής υποομάδας του ΚΑΠΕ, που εκφράζουν το cMET έναντι εκείνων που δεν το εκφράζουν.



Η υπερέκφραση του cMET συνδυάστηκε με καλύτερη πρόγνωση σε αυτούς τους ασθενείς (μέση επιβίωση 15 μήνες [95 % CI 13.5–16.5]) έναντι. 9 μηνών [95 % CI 1.2–16.7] σε εκείνους τους ασθενείς με χαμηλής έκφρασης cMET), ($p = 0.049$). Αντιθέτως

η έκφραση της pMAPK σχετίστηκε με μικρότερο μέσο διάστημα ελεύθερης νόσου στην υπομάδα της σπλαχνικής νόσου, (4 μήνες [95 % CI 2.7–5.3] έναντι 10 μηνών [95 % CI 7.8– 12.1] για τους υψηλής έναντι χαμηλής έκφρασης αντιστοίχως) (Breslow p = 0.05). Δύο βιοδείκτες Notch1 and Notch3 ήταν επίσης οριακής προγνωστικής σημασίας. Πιο συγκεκριμένα η υπερέκφραση του Notch3 σχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση στα μέσης γραμμής λεμφαδενικά ΚΑΠΕ (μέση επιβίωση 12 μήνες [95 % CI 7.8–16.2] έναντι 31 μηνών [95 % CI 8.6–53.4] σε υψηλής έναντι χαμηλής έκφρασης αντίστοιχα) (Breslow p = 0.05), ενώ η υψηλή έκφραση του Notch1 συνδέθηκε με χαμηλό μέσο διάστημα ελεύθερης νόσου στη σπλαχνική υποομάδα subgroup (3 μήνες έναντι 7 μηνών [95 % CI 2.9–11] για τα υψηλής έναντι χαμηλής έκφρασης, αντίστοιχα) (Breslow p = 0.05).

Πίνακα 22. Προγνωστική επίδραση των βιομορίων στην ολική επιβίωση στις κλινικές υποομάδες των ασθενών με ΚΑΠΕ.

Βιομόρια	Ανοσοϊστοχημικά cut-off	Υποομάδα ΚΑΠΕ	Μέση ολική επιβίωση (μήνες)	95% CI	Breslow p
cMET	≥20% <20%	Μέσης γραμ. - λεμφαδένες	15 9	13.5 – 16.5 1.2 – 16.7	0.049
Notch3	≥80% <80%	Μέσης γραμ. - λεμφαδένες	12 31	7.8 – 16.2 8.6 – 53.4	0.051

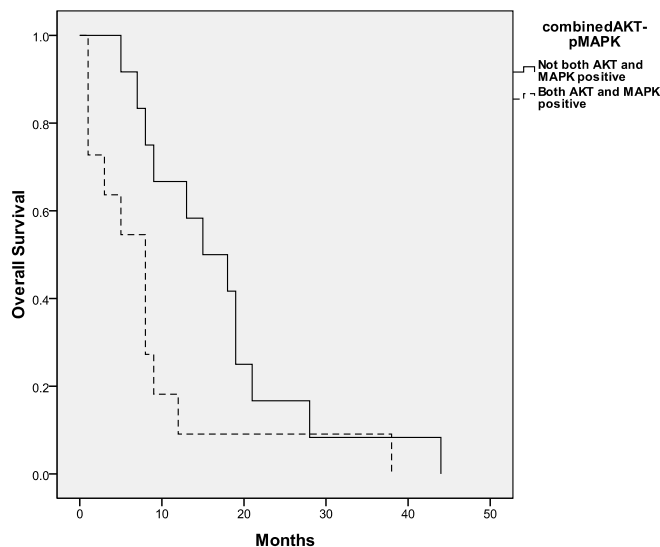
Στα υπόλοιπα βιομόρια δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, με την εξαίρεση ίσως της αυξημένης έκφρασης του p21, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με την βελτίωση της ανταπόκρισης (p = 0.09).

Κλινικο-παθολογοανατομικοί παράγοντες που συνδέθηκαν με χαμηλή ολική επιβίωση ήταν το αρσενικό φύλο (Διάμεση ολική επιβίωση 9 έναντι 17 μηνών, p = 0.0005), η φυσική κατάσταση (ECOG/WHO performance status >1 (διάμεση ολική επιβίωση 5 έναντι 14 μηνών, p = 0.001), και η χορήγηση χημειοθεραπείας κατά την οποία δεν χορηγήθηκε πλατίνα (διάμεση ολική επιβίωση 7 έναντι 15 μηνών, p = 0.029).

Κάποια βιομόρια συνδέθηκαν με πτωχή πρόγνωση και εκφράστηκαν κατά κύριο λόγο στη σπλαχνική ομάδα: η Cyclin D1 (Διάμεση ολική επιβίωση 5 έναντι 13

μηνών, $p = 0.027$), το RPS6 (Διάμεση ολική επιβίωση 8 έναντι 19 μηνών, $p = 0.034$), και η σύγχρονη έκφραση AKT and MAPK (Μέση ολική επιβίωση 8 έναντι 15 μηνών, $p = 0.011$). **Εικόνα 10.**

Εικόνα 10. Ολική επιβίωση σε ασθενείς της σπλαχνικής υποομάδας του ΚΑΠΕ, που εκφράζουν τον συνδυασμό pAKT-pMAPK έναντι εκείνων που δεν εκφράζουν κανένα από τα δύο βιομόρια.



Όσον αφορά την συσχέτιση της έκφρασης των υπο μελέτη βιομορίων με το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία, η αυξημένη έκφραση του pMAPK σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία (Pearson χ^2 , 2-sided = 0.02) ενώ cMET (Pearson χ^2 , 2-sided = 0.04) και Notch3 είχαν οριακή προβλεπτική σημασία για την θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΑΠΕ. (Pearson χ^2 , 2-sided = 0.09). **Πίνακας 23.**

Πίνακας 23. Προβλεπτική αξία διαφόρων βιομορίων ασθενών με ΚΑΠΕ για ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία.

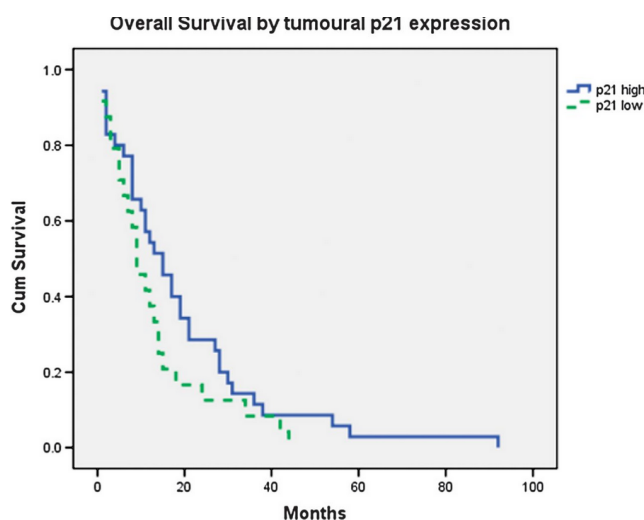
Βιομόρια	Pearson χ^2	2-sided P value
pMAPK	5.367	0.02
cMET	4.151	0.04
Notch3	2.781	0.09

Προγνωστική και προβλεπτική αξία των βιομορίων- Πολυπαραγοντική Ανάλυση

Ο μικρός αριθμός περιστατικών, η οριακή στατιστική σημασία και οι πολλαπλές και συνεχείς αναλύσεις των δεδομένων δικαιολογούν την επιφυλακτικότητα στην επεξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων τα οποία θα μπορούσαν ίσως να αποδοθούν σε στατιστικές διακυμάνσεις. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκαν πολυπαραγοντικές αναλύσεις για όλα τα εξεταζόμενα βιομόρια (p21, CyclinD1, pAKT, pRPS6, PTEN, cMET, Jagged1, NOTCH 1-3 και pMAPK).

Η υπερέκφραση του cMET σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο θανάτου (RR 0.48, $p = 0.025$). Η υψηλή έκφραση του p21 συνδέθηκε με μειωμένο κίνδυνο θανάτου (risk ratio [RR] = 0.34 [95% CI 0.16– 0.73], $P = 0.005$) **Εικόνα 11**. ενώ η αυξημένη έκφραση των pAKT (RR = 2.39 [95% CI 1.23–4.66], $P = 0.01$), pRPS6 (RR = 2.76 [95% CI 1.31–5.84], $P = 0.008$) συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο θανάτου. **Πίνακας 24**.

Εικόνα 11. Ολική επιβίωση και ανοσοϊστοχημική έκφραση του p21 σε όλους τους ασθενείς με ΚΑΠΕ.



Πίνακας 24. Πολυπαραγοντική ανάλυση βιομορίων.

Παράμετρος	Αναλογία κίνδυνου θανάτου (Hazard ratio)	95% CI	2-sided p
P21	0,34	0,16-0,73	0,005
cMET	0,48	0,26-0,91	0,025
pAKT Thr308	2,39	1,23-4,66	0,01
pS6RP Ser235/236	2,76	1,31-5,84	0,008

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Η στρατηγική της θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με ΚΑΠΕ παραμένει, ακόμη και σήμερα, μία πρόκληση για την ιατρική ογκολογική κοινότητα. Η μικρή σχετικά συχνότητα με την οποία απαντάται το συγκεκριμένο καρκίνωμα δεν διευκολύνει την ανάπτυξη τυχαιοποιημένων μελετών με μεγάλο αριθμό ασθενών. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο οι περισσότερες είναι μη τυχαιοποιημένες. Το εύρος του οφέλους στην επιβίωση από την χημειοθεραπεία, το οποίο περιγράφεται σε ιστορικές αντιπαραβολές παραμένει αμφιλεγόμενο. Η ετερογένεια, που εμπεριέχει αυτή η κλινική οντότητα, είναι και η αιτία της μικρής ανταπόκρισης της νόσου στα ήδη υπάρχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα αλλά και της αδυναμίας που υπάρχει στην εύρεση νέας θεραπευτικής στρατηγικής ακόμη και στην εποχή της στοχεύουσας θεραπείας. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών με ΚΑΠΕ σε διακριτές κλινικο- παθολογοανατομικές υποομάδες αποτελούν το σημαντικότερο βήμα των τελευταίων δύο δεκαετιών, καθώς πρόσφερε καλύτερη κατανόηση της νόσου, μεγαλύτερη προγνωστική αντίληψη αλλά και θεραπευτικό ορθολογισμό. Παρόλα αυτά συνεχίζει να υφίσταται υψηλός βαθμός ετερογένειας κυρίως στην υποομάδα των ασθενών με πτωχή πρόγνωση που αποτελούν και το 80% των περιστατικών με ΚΑΠΕ. Σκοπός ενός διαχωρισμού σε προγνωστικές ομάδες αποτελεί η καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση τους.

Ο στόχος αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν διπλός. Από την μία η δημιουργία προγνωστικού αλγόριθμου βασιζόμενου σε κλινικά, εργαστηριακά και παθολογοανατομικά ευρήματα. Ευρήματα τα οποία μπορούν εύκολα να αναζητηθούν σε όλα τα ιατρικά κέντρα του κόσμου χωρίς υψηλό κόστος και χωρίς την ανάγκη χρήσης πολυδάπανων συστημάτων. Ο δεύτερος στόχος ήταν η ανίχνευση μέσω της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης διαφόρων βιομορίων, που συμμετέχουν σε συγκεκριμένα ουσιώδη μονοπάτια σηματοδότησης και η λειτουργία των οποίων φαίνεται να προκαλεί και να συντηρεί την καρκινική διαδικασία όπως συμβαίνει και σε άλλους τύπους κακοήθειας. Τα βιομόρια με προγνωστική ή/και προβλεπτική αξία θα προσδώσουν σε αυτούς τους ασθενείς την δυνατότητα κατηγοριοποίησης της πρόγνωσης, αλλά και θα μπορούσαν στο άμεσο μέλλον να αποτελέσουν στόχους βιολογικών παραγόντων.

Σε αυτή την αναδρομική μελέτη προσπαθήσαμε να εκμεταλλευτούμε τα δεδομένα ενός σχετικά μεγάλου πληθυσμού ασθενών ΚΑΠΕ, τα υποβάλαμε σε πολυπαραγοντική αλλά και CART ανάλυση και με την ταυτοποίηση τριών

ανεξάρτητων προγνωστικών παραγόντων (κλινικο-παθολογοανατομική υποομάδα, φυσική κατάσταση και λευκοκυττάρωση) καταφέραμε την δημιουργία αλγορίθμου (I-SCOOP). Ο προγνωστικός αυτός αλγόριθμος φέρει βαθμονόμηση με κλίμακα 0-4 και κατηγοριοποιεί τρεις καλά διακριτές προγνωστικές ομάδες: την ευνοϊκής, ενδιάμεσης και πτωχής πρόγνωσης υποομάδα. Ο καθορισμός της κλινικο-παθολογοανατομικής υποομάδας μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την βιολογία του όγκου και της πρωτοπαθούς εστίας, ενώ η μέτρηση της φυσικής κατάστασης (PS) σχετίζεται με την "ανάγνωση" της λειτουργικής ικανότητας του ασθενούς σε οποιοδήποτε χρονικό διάστημα. [15,57,181-182] Η λευκοκυττάρωση θεωρείται ως δείκτης φλεγμονώδους αντίδρασης προκληθείσα από τα καρκινικά κύτταρα, έμμεσος μετρητής του συστηματικού φορτίου της νόσου και των μεταστατικών εστιών αλλά και δείκτης οργανικού στρες. [183] Με την χρήση των τριών αυτών δυναμικών παραμέτρων ο αλγόριθμος εξασφαλίζει τον διακριτό διαχωρισμό των προγνωστικών υποομάδων, κυρίως εκείνων των ευνοϊκής και ενδιάμεσης πρόγνωσης. Η ομαδοποίηση είναι ενδεχομένως λιγότερο ιδανική για την υποομάδα υψηλού κινδύνου καθώς το ανώτερο όριο επιβίωσης βρίσκεται αρκετά κοντά σε εκείνο της ενδιάμεσης υποομάδας ενώ το κατώτερο δείχνει εμφανώς οδυνηρή έκβαση.

Σε αρκετές μελέτες ερευνητές προσπάθησαν να ενσωματώσουν σε προγνωστικούς αλγόριθμους εργαστηριακές μεταβλητές όπως η γαλακτική δεϋδρογενάση και η αλκαλική φωσφατάση όμως δεν κατάφεραν να το επιτύχουν με ποικίλλουσα επιτυχία. Οι λειτουργικές αποθήκες των οργάνων, η αλληλεπίδραση όγκου- ξενιστή, αλλά και η βιολογική κυρίως, παρά η χρονολογική ηλικία είναι παράγοντες που θα μπορούσαν να καθορίσουν την πρόγνωση. Από την άλλη παράμετροι όπως: η ιστολογική διάγνωση, η κλινικο-παθολογοανατομική υποομάδα, η φυσική κατάσταση, η παρουσία και ο αριθμός των ηπατικών μεταστάσεων, ο αριθμός και οι εστίες των μεταστάσεων αλλά και εργαστηριακές μεταβλητές όπως η αλβουμίνη, η γαλακτική δεϋδρογενάση, η αλκαλική φωσφατάση, η λευκοκυττάρωση, η λεμφοπενία και η συνοσηρότητα επέδειξαν προγνωστική αξία σε ομάδα μελετών που διερεύνησε την παρουσία προγνωστικών παραμέτρων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 10.

Ο μεγαλύτερος ίσως περιορισμός των περισσότερων μελετών που ασχολήθηκαν με την δημιουργία προγνωστικού αλγορίθμου, συνίσταται στην αδυναμία της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων σε ανεξάρτητους πληθυσμούς. Στην δική μας μελέτη επιχειρήθηκε εσωτερική αξιολόγηση η οποία επέδειξε την σταθερότητα και την

ανεξαρτησία του μοντέλου. Συγκεκριμένα, οι ίδιες τρεις προγνωστικές παράμετροι κατέταξαν με συνέπεια τους ασθενείς μας σε διάκριτες προγνωστικές υποομάδες σε οκτώ από τα δέκα τυχαία παραχθέντα σετ πληθυσμού ελέγχου και πληθυσμού επιβεβαίωσης. Η «εσωτερική αξιολόγηση» που επιχειρήσαμε, μολονότι ενισχύει την προγνωστική αξία του αλγορίθμου I-SCOOP, δεν υποκαθιστά την αναγκαία εξωτερική αξιολόγηση του αλγορίθμου σε ανεξάρτητο πληθυσμό, διαφορετικό από αυτόν της παρούσας διατριβής.

Παρά την συνεχή διερεύνηση, όλα αυτά τα χρόνια, πιθανών παραμέτρων με σαφή προγνωστική αξία η ετερογένεια της νόσου συνεχίζει να υφίσταται. Σήμερα, ένας ιδανικός προγνωστικός αλγόριθμος ο οποίος θα μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί στην καθ' ημέρα κλινική πράξη θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει την χρήση μοριακής βιολογικής πλατφόρμας για συγκεκριμένα περιστατικά αλλά και να διαχωρίζει ευκρινώς τις διάφορες προγνωστικές ομάδες. Με αυτό τον τρόπο ασθενείς με ευνοϊκή πρόγνωση θα θεραπεύονται με στόχο την μακροχρόνια επιβίωση ή ακόμα και την ίαση με ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση. Στους ασθενείς με ενδιάμεση επιβίωση θα πρέπει να προσφέρονται θεραπευτικές στρατηγικές (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, στοχεύουσες θεραπείες) με σκοπό τον μακρόχρονο έλεγχο της νόσου ενώ στους ασθενείς υψηλού κινδύνου αφού εκτιμηθεί η γενική τους κατάσταση, συνοσηρότητα και προτιμήσεις θα πρέπει να συζητηθεί το ενδεχόμενο χορήγησης κάποιας θεραπείας χαμηλής τοξικότητας, η συμμετοχή σε κλινική δοκιμή ή η παρηγορική/υποστηρικτική μόνο αγωγή.

Συνοπτικά, ο προγνωστικός αλγόριθμος του ΚΑΠΕ I-SCOOP, εφόσον επιβεβαιωθεί σε ανεξάρτητο πληθυσμό, χρησιμοποιεί εύκολα προσδιορίσιμες και λίγες σε αριθμό παραμέτρους για την κατάταξη των ασθενών σε τρεις προγνωστικές ομάδες, επιτρέποντας την πλέον αξιόπιστη εκτίμηση πρόγνωσης, την καλύτερη πληροφόρηση του ασθενούς και τον ορθολογικό σχεδιασμό της θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Στο παρελθόν έχει πολλάκις μελετηθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση διαφόρων βιομορίων όπως c-Myc, Ras, HER-2 [3,5], EGFR [91], c-Kit [184], Bcl-2, p53 [94], VEGF [7], και Matrix Metalloproteinases χωρίς όμως να τεκμηριωθεί σε κάποιο από αυτά προγνωστική ή προβλεπτική σημασία. Δεν προκύπτει λοιπόν τουλάχιστον με τα δεδομένα που έχουμε συγκεντρώσει ως σήμερα, σχέση μεταξύ θεραπείας και μοριακού προτύπου. Αυτό θα μπορούσε να είναι μια πιθανή απόδειξη ότι αυτό που λείπει για να προχωρήσουμε στην καλύτερη αντίληψη της νόσου δεν είναι η πρωτοπαθής εστία αλλά η κατανόηση της βιολογίας της νόσου [104]. Στην προσπάθεια

αποσαφήνισης της βιολογίας της νόσου, προσπαθήσαμε, μέσω της εξέτασης μονοπατιών της ενδοκυττάριας σηματοδότησης που είναι σημαντικά για την έναρξη και την πρόοδο της καρκινικής διαδικασίας, να ανιχνεύσουμε την πιθανή εμπλοκή ρυθμιστικών παραγόντων όπως Notch, MAPK, cMET, Jagged1, p21, CyclinD1, pAKT, pRPS6 και PTEN. Η αναδρομική φύση της μελέτης καθώς και η χρήση μόνο της ανοσοϊστοχημείας χωρίς την μελέτη της έκφρασης του mRNA ή κάποιων υποκείμενων γενετικών αλλαγών, αποτελούν γνωστούς περιορισμούς. Πιστεύουμε όμως ότι η ανοσοϊστοχημική μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης είναι αποδεκτό πρώτο βήμα για την μελέτη της βιολογίας του ΚΑΠΕ, καθώς οι πρωτεΐνες αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές κυτταρικών λειτουργιών. Αν σκεφθεί κανείς την ασάφεια που χαρακτηρίζει την βιολογική συμπεριφορά του ΚΑΠΕ, τα αποτελέσματά μας, εφόσον υποβληθούν σε λεπτομερή επεξεργασία και ανεξάρτητη αξιολόγηση θα μπορέσουν να μας δώσουν αξιόλογες πληροφορίες για αυτή τη νόσο.

Στη μελέτη μας τα περισσότερα βιομόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι PTEN/AKT παρουσιάζουν θετική έκφραση στους 100 ασθενείς που αποτέλεσαν το δείγμα μας. Αν και μόνο το 17% των καρκινικών κυττάρων χρωματίζονται για το p21 βιομόριο εντούτοις η έκφραση του δείχνει να συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Στην ίδια ανάλυση η έκφραση των AKT και RPS6 συνδέονται με πτωχή πρόγνωση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν την σημαντικότητα του μονοπατιού PTEN/AKT στην κλινική έκβαση των ασθενών με ΚΑΠΕ. Για να βελτιώσουμε την ευαισθησία και ειδικότητα της διερεύνησης μας, αναλύσαμε την φωσφορυλιωμένη μορφή (ενεργοποιημένη) των AKT και RPS6, η οποία αντιπροσωπεύει την ενεργό διαμόρφωση των πρωτεϊνών αυτών, σε αντίθεση με άλλους ερευνητές που μελέτησαν την ολική μορφή της πρωτεΐνης (ενεργός και μη διαμόρφωση).

Η AKT πρωτεΐνη έχει κεντρικό ρόλο στην έναρξη και πρόοδο της καρκινικής διαδικασίας. Ενεργοποιείται από την PI3K και μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορα μονοπάτια προωθεί την πρωτεϊνική σύνθεση (κυρίως μέσω mTOR και RPS6), αναστέλλει την απόπτωση, ενεργοποιεί τον κυτταρικό κύκλο (εν μέρει μέσω downregulation των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου όπως το p21 και τη cyclin D1) και αυξάνει τον κυτταρικό μεταβολισμό. Από την άλλη η PTEN πρωτεΐνη είναι ο πιο σημαντικός αναστολέας του PI3K/AKT μονοπατιού αν και όχι ο μόνος ελεγκτής.

[185]

Η πρωτεΐνη RPS6 κωδικοποιεί ένα συστατικό της ριβοσωμικής υπομονάδας (subunit) 40S το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο υπόστρωμα των πρωτεϊνικών κινασών στο ριβόσωμα. Πιθανόν συμμετέχει στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, όπως και στην ανάπτυξη μέσω της εκλεκτικής μετάφρασης ειδικών τμημάτων του μεταγραφικού RNA. [185,186] Η cyclin D1 και το p21 κυρίως αντιτίθενται στους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, με την πρώτη να προωθεί και το δεύτερο να αναστέλλει την μετάβαση G1/S ενόσω στο μεταξύ αλληλεπιδρούν με άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως Rb και P53. [186] Τα ευρήματα μας λοιπόν κατά τα οποία η αυξημένη έκφραση των ενεργοποιημένων AKT (pAKT) και RPS6 συνδέονται με πτωχή πρόγνωση, ενώ εκείνη του p21 με βελτιωμένη έκβαση συνάδουν με την εμπειριστατωμένη γνώση της κυτταρικής δυναμικής. Προφανώς αν και η μελέτη μας αποκαλύπτει διάφορες διαστάσεις της κυτταρικής δυναμικής του ΚΑΠΕ δεν είναι αρκετή για να διαφοροποιήσει και να ανιχνεύσει πιθανή πρωτοπαθή εστία.

Η απορρύθμιση του PTEN/AKT μονοπατιού παρατηρήθηκε σε διάφορους τύπους κακοήθειας. [178] Η χρήση αυτού του μονοπατιού ως θεραπευτικός στόχος έχει αποδειχθεί ευεργετική και έχει ήδη περάσει στην καθ' ημέρα κλινική πράξη (για παράδειγμα το trastuzumab στον καρκίνο του μαστού, τα erlotinib και gefitinib στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τα cetuximab και panitumumab σε εκείνο του παχέως εντέρου, οι αναστολείς mTOR στον διαυγοκυτταρικό καρκίνο του νεφρού, στον καρκίνο μαστού σε συνδυασμό με εβερολίμη). [187-188] Η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών παραγόντων βρίσκεται σε εξέλιξη με στόχο βιομόρια του μονοπατιού PTEN/AKT ή/και βιομόρια που αλληλεπιδρούν με αυτό. [185, 189-190]

Η ακραία ποικιλία στην ένταση της χρώσης των υπό μελέτη βομορίων, (διακύμανση από 0 ως 100%), αντανakλά την έμφυτη ετερογένεια αυτής της κλινικής οντότητας και υπογραμμίζει έτσι την ανάγκη για περαιτέρω κατηγοριοποίηση. Τα βιομόρια με την πιο συχνή έκφραση ήταν τα Notch 3 και pMAPK, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την πιθανή εμπλοκή τους στη βιολογική συμπεριφορά του ΚΑΠΕ. Τα Notch 1 και Notch 3 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διαφορά όσον αφορά τα ποσοστά έκφρασης τους αγγίζοντας τα δύο άκρα τις διακύμανσης. Υψηλή έκφραση του βιομορίου Notch3 παρατηρείται και στα καρκινώματα του πνεύμονα [191, 192]. Ενώ τα Notch1 και Notch2 παρουσιάζουν υψηλού βαθμού δομική ομοιομορφία ο Notch3 υποδοχέας αποκλίνει τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. [193]. Δεν είναι προς το παρόν ξεκάθαρος ο ρόλος του Notch μονοπατιού.

Το μονοπάτι σηματοδότησης Notch διατηρήθηκε αυτούσιο κατά την διάρκεια της εξέλιξης στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς. Ο ρόλος του είναι σημαντικός τόσο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και για την απόπτωση, την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την μεταστατική εξέλιξη. Ο ογκογενετικός ρόλος του έχει παρατηρηθεί στην κακοήθεια του μαστού, του παγκρέατος, του π. εντέρου, των γλοιωμάτων του εγκεφάλου, του πνεύμονα και του μελανώματος. Εκτός όμως από τον ογκογενετικό του ρόλο φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη της καρκινικής διαδικασίας, κυρίως μέσω της επιθηλιακής- μεσεγχυματικής μετατροπής, καθώς και την αγγειογέννηση. [194-196]

Το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK είναι ίσως το πιο καλά μελετημένο μονοπάτι της κυτταρικής βιολογίας. Ο ρόλος του είναι εκείνος της μετάδοσης του σήματος από τον εξωκυττάριο χώρο στον κυτταρικό πυρήνα μέσω της εξειδικευμένων, ενεργοποιημένων γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαίρεσης και πολλαπλασιασμού. Τέλος το Ras/Raf/MAPK συμμετέχει στη διαδικασία επώασης του τραύματος, του κυτταρικού κύκλου της κυτταρικής μετανάστευσης και στην διαδικασία της αγγειογέννησης. Η απορρύθμιση του σχετίζεται με μια πλειάδα καρκινωμάτων όπως του οισοφάγου, του π. εντέρου, ωοθηκών, μελανώματος και του θυρεοειδούς. [197]

Ο c-MET είναι ένας υποδοχέας η ενεργοποίηση του οποίου μέσω της σύνδεσης του με τον ηπατοκυτταρικό αυξητικό παράγοντα ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα, την μετανάστευση και την διήθηση. Αν και το MET μονοπάτι είναι σημαντικό στην ομοιόσταση των ιστών, ανιχνεύθηκε η αποκλίνουσα συμπεριφορά του στους καρκινικούς ιστούς, μέσω ουσιώδους ή παρατεταμένης ενεργοποίησης του c-MET. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων, ενίσχυσης ή πρωτεϊνικής υπερέκφρασης. [198] Στον καρκίνο του π. εντέρου, του θυρεοειδούς, των ωοθηκών, του παγκρέατος του πνεύμονα και του μαστού απαντάται αρκετά συχνά η απορρύθμιση του συγκεκριμένου μονοπατιού.

Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής έρχονται σε συμφωνία με την υπάρχουσα εκτίμηση του ενεργού ρόλου των υποδοχέων Notch σε συγκεκριμένους καρκινικούς όγκους. [199]. Όσον αφορά το cMET, η έκφραση του ακολουθεί την θεωρία του «όλα ή τίποτα», με το 50% των δειγμάτων να παρουσιάζει υψηλή έκφραση και το υπόλοιπο 50% χαμηλή. Αυτή η διαπίστωση τοποθετεί το cMET στη θέση του

βιολογικού διακόπτη, καθιστώντας το επιλεγμένο σημείο cut-off ασφαλές. Η χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση του Jagged1 (συνδέτης) δείχνει ότι το Notch μονοπάτι ίσως να ενεργοποιείται και από άλλους συνδέτες.

Η σχέση μεταξύ cMET και κλινικό- παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών αναδεικνύει την συνεισφορά αυτού του βιομορίου στο ΚΑΠΕ. Η συχνή εμφάνιση του σε πλακώδη καρκινώματα κατά κύριο λόγο σε αντίθεση με τα αδενοκαρκινώματα και καρκινώματα, έρχεται να συμφωνήσει με αναφορές σχετικές με τον ανερχόμενο ρόλο του HGF, και του υποδοχέα του στην παθογένεση των πλακωδών καρκινωμάτων, [200,201] πιθανόν μέσω αρνητικής ρύθμισης (downregulation) της E καντχερίνης και επακόλουθης εξέλιξης της επιθηλιακής- μεσεγγυματικής μετατροπής (Epithelial-mesenchymal transition- EMT) [202,203]. Παρομοίως, στα πλακώδη καρκινώματα υπερεκφράζεται και το Notch 3 υποδεικνύοντας πιθανή συνέργεια μεταξύ του Notch 3 και του cMET στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. [204] Η έκφραση του cMET ήταν αυξημένη στα πλακώδη καρκινώματα των τραχηλικών και βουβωνικών λεμφαδένων, όπως επίσης και στην υποομάδα με διήθηση των λεμφαδένων μέσης γραμμής, σε αντίθεση με την σπλαχνική υποομάδα. Ήταν δηλαδή αυξημένη σε υποομάδες ΚΑΠΕ με ευνοϊκή πρόγνωση. Επιπλέον αυξημένη παρουσιάστηκε η έκφραση του συγκεκριμένου βιομορίου και σε δείγματα ασθενών με καλή φυσική κατάσταση (PS: 0-1), με λίγες μεταστατικές εστίες, και στα καλής διαφοροποίησης πλακώδη καρκινώματα. Συσχετισμοί που στηρίζουν τη σύνδεση του cMET με την ευνοϊκή πρόγνωση, ενισχύονται από τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης, αλλά αναφέρονται και σε άλλες μελέτες. [205]. Σε άλλες μελέτες αντιθέτως η έκφραση του cMET συνδέεται με χαμηλή διαφοροποίηση και ταχεία επιδείνωση της νόσου. [206-207] Αυτή η αντίφαση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε ίσως να εξηγηθεί από μία πιθανή τροποποίηση της δράσης του cMET εξαρτώμενη από το νεόπλασμα ή/και το μικροπεριβάλλον του κυττάρου, αλλά και από μία τροποποίηση του διακριτού ρόλου του βιομορίου στο ΚΑΠΕ. Πιθανές επίσης ερμηνείες αποτελούν, σε διάφορες σειρές, η χρήση διαφορετικών αντισωμάτων που μελετούν την ολική πρωτεΐνη ή διαφορετικούς φωσφορυλιωμένους επίτοπους, η παλαιότητα των μπλοκ παραφίνης η οποία διαταράσσει την αντιγονικότητα, οι διαφορετικές τεχνικές μονιμοποίησης/κατεργασίας και ανοσοϊστοχημείας. Ωστόσο, όλες αυτές οι επεξηγήσεις, θα πρέπει να εκφέρονται προσεκτικά, καθώς οι νέες μελέτες στοχεύουν στην ανίχνευση οδηγού μετάλλαξης της δράσης του cMET στο ΚΑΠΕ και όχι στην μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης. Μεταλλάξεις του γονιδίου MET βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά στο ΚΑΠΕ σε αντίθεση

με την παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου σε άλλους όγκους. [208]. Πρόσφατα μελετήσαμε την επίπτωση μεταλλάξεων του MET γονιδίου σε ΚΑΠΕ και δεν επιβεβαιώσαμε την υψηλή επίπτωση μεταλλάξεων που ανέφεραν οι Stella et al. [209] Πιο συγκεκριμένα μετά από την ανάλυση του καρκινικών κυττάρων 87 ασθενών με ΚΑΠΕ, ανιχνεύθηκε η παρουσία μεταλλάξεων στο MET σε ποσοστό 6,7% των περιστατικών. Η παρουσία μεταλλάξεων αποτέλεσε δείκτη πτωχής πρόγνωσης για τα συγκεκριμένα περιστατικά, τόσο για το διάμεσο διάστημα ελεύθερο νόσου (5 μήνες έναντι των 9 μηνών για τα περιστατικά εκείνα στα οποία απουσίαζαν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις, $p = 0.009$) όσο και για τη διάμεση ολική επιβίωση (7 έναντι 20 μηνών, $p = 0.005$). [96]

Στην δική μας σειρά ασθενών, προσοχή στην εκτίμηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας χρειάζεται γιατί:

α) έγινε αποτίμηση μόνο του ολικού cMET και όχι της ενεργοποιημένης μορφής του (φωσφορυλιωμένο cMET),

β) η επιλογή του cut-off, δεν βασίστηκε σε κριτήρια διεθνώς αναγνωρισμένα, καθώς τέτοια κριτήρια δεν υπάρχουν,

γ) το μέγεθος του δείγματος ήταν μικρό ενώ και τα στατιστικά αποτελέσματα είχαν οριακή προγνωστική αξία.

Στα αποτελέσματα αυτής της διδακτορικής διατριβής συγκαταλέγεται και η αξιοπρόσεκτη σχέση της αυξημένης ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του pMAPK με την ολική επιβίωση (μικρότερη επιβίωση σε όλους τους ασθενείς με ΚΑΠΕ, $p=0,016$) και το διάμεσο διάστημα ελεύθερο νόσου (μικρότερο μέσο διάστημα ελεύθερο νόσου σε ασθενείς με σπλαχνική νόσο, $p=0,05$), το οποίο έρχεται σε συμφωνία με την πτωχή πρόγνωση που παρουσιάζουν οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από τροποποίηση του μονοπατιού pMAPK. [176] Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, συνδέονται μόνο με το ενεργοποιημένο pMAPK (phospho pMAPK) και κατά συνέπεια ενισχύουν την προγνωστική αξία του αποτελέσματος. Η αυξημένη έκφραση του Notch 3 ήταν ενδεικτική της κακής έκβασης επιβεβαιώνοντας τον ρόλο του ως υποκινητή της κακοήθους διαδικασίας. [210]

Η υπερέκφραση του Notch 3 συμβαδίζει με την αυξημένη έκφραση των cMET και pMAPK βιομορίων ($p<0,001$ και $p=0,059$ αντιστοίχως). Γενικά αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο μονοπατιών Notch 3 και pMAPK είναι πολύπλοκες και εξαρτώμενες σε υψηλό βαθμό από το περιβάλλον, [211] καθώς κάποιες φορές υπάρχει συνέργεια και άλλες ανταγωνιστική δράση. Το ίδιο επιβεβαιώνεται και στη

δική μας μελέτη. [192] Όσον αφορά στην προγνωστική αξία της συνύπαρξης των cMET και Notch 3 θα πρέπει για άλλη μια φορά να είμαστε προσεκτικοί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση κατά την οποία η έκφραση του cMET αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη τότε η συνύπαρξή του με το Notch 3 ίσως αντιπροσωπεύει ένα ανασταλτικό κύκλωμα ελέγχου.

Το φωσφορυλιωμένο MAPK φαίνεται πως έχει θετική προβλεπτική αξία για την ανταπόκριση από την λήψη της χημειοθεραπείας ($p=0,02$). Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει μεγάλη εμπειρία της προγνωστικής του αξίας στον καρκίνο, ενώ υπάρχουν και μελέτες με αντίθετα αποτελέσματα (κακή ανταπόκριση στη γεμισιταβίνη εκεί που υπάρχει υπερέκφραση του pMAPK). [212] Και η αυξημένη έκφραση του cMET φαίνεται να σχετίζεται με ευνοϊκή προβλεπτική αξία αν και σε μικρότερη έκταση σε ασθενείς με ΚΑΠΕ ($p=0,04$). Παρόμοιες μελέτες για την έκφραση του cMET είναι σπάνιες. Μονό η αρνητική προβλεπτική αξία στη χορήγηση αντι- EGFR αντισωμάτων σε ασθενείς με καρκίνο παχέως εντέρου έχει περιγραφεί. [213] Η έκφραση του Notch3 είναι αρνητικά συνυφασμένη με την ευαισθησία του πλακώδους καρκινώματος κεφαλής τραχήλου στην πλατίνη [214], αν και αυτή η σχέση δεν επιβεβαιώθηκε στη μελέτη μας. Αντιθέτως η αυξημένη έκφραση του Notch3 επιφέρει οριακή θετική προβλεπτική αξία στο ΚΑΠΕ ($p=0,09$).

Θα πρέπει κανείς να αναγνωρίσει το γεγονός ότι σε αντίθεση με την καθ' ημέρα κλινική πράξη η πλειονότητα των περιστατικών μας ανήκουν στην υποομάδα των ευνοϊκής πρόγνωσης ΚΑΠΕ. Επιπλέον η αναδρομική φύση της μελέτης μέσω της εξέλιξης των απεικονιστικών μεθόδων και της διαγνωστικής προσέγγισης, η διαφοροποίηση και η κατηγοριοποίηση των υποομάδων του ΚΑΠΕ, εισήγαγε αρκετά συστηματικά σφάλματα (biases). Γι' αυτό τα αποτελέσματά μας θα πρέπει να ερμηνευθούν προσεκτικά και μετά ίσως από προοπτική και ανεξάρτητη αξιολόγηση. Ωστόσο η υποομάδα του ΚΑΠΕ της λεμφαδενικής μέσης γραμμής πιστεύεται ότι είναι ετερογενής και πιθανόν να περιλαμβάνει περιστατικά υψηλού και χαμηλού κινδύνου, όπως φαίνεται και από την διάμεση ολική επιβίωση των 14 ως 16 μηνών. Επιπλέον τρία περιστατικά περιτοναϊκής καρκινώματος δεν ανήκουν στα ευνοϊκής πρόγνωσης γιατί είναι βλενωδούς ιστολογικού τύπου. Τέλος η ανομοιογένεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης στη περίοδο εξέτασης πιθανόν με τη σειρά της να οδηγήσει σε bias. Η χρήση των ειδικών επιτόπων των φωσφορυλιωμένων βιομορίων, η αντιγονικότητα των επιτόπων, η αντικειμενικότητα του παρατηρητή καθώς και η

απουσία κοινά αποδεκτού, ομοιογενούς συστήματος βαθμονόμησης της έκφρασης αποτελούν περιορισμούς της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και πρέπει να ληφθούν υπόψη. [215].

Θα πρέπει να τονιστεί πως όταν γίνεται μια μελέτη για την βιολογική συμπεριφορά του ΚΑΠΕ, τίθεται το ερώτημα κατά πόσο τα ευρήματα αποτελούν μοναδική υπογραφή του ΚΑΠΕ ή απλά προέρχονται από την μεταστατική διαδικασία ή τον ιστό στόχο. Πραγματικά, τα βιομόρια και μονοπάτια σηματοδότησης που βρήκαμε ενεργοποιημένα στο ΚΑΠΕ και με προγνωστική αξία, δεν αποτελούν εύρημα ειδικό για το ΚΑΠΕ. Τα ίδια αποτελούν σημαντικές οδούς σηματοδότησης και είναι προγνωστικοί παράμετροι σε πολλούς τυπικούς μεταστατικούς όγκους γνωστής πρωτοπαθούς εστίας. Αναγνωρίζουμε λοιπόν, ότι τα ευρήματα μας δεν αποτελούν βιολογική υπογραφή ειδική για το ΚΑΠΕ και ότι ο μοναδικός αξιόπιστος τρόπος μελέτης του ΚΑΠΕ είναι η σύγκριση της βιολογίας του ΚΑΠΕ με αυτήν τυπικών μεταστατικών όγκων. Πρόσφατα συγκρίναμε την έκφραση 900 microRNA ανάμεσα σε ΚΑΠΕ με βιολογική ταυτοποίηση του ιστού προέλευσης με την πλατφόρμα miRView Mets (Rosetta Genomics, Rehovot, Israel) και σε μεταστάσεις από αντίστοιχη, γνωστή πρωτοπαθή εστία, χωρίς να βρούμε σημαντικές διαφορές έκφρασης. [77] Προς το παρόν η microRNA υπογραφή ειδική για το ΚΑΠΕ μόνο και διακριτή από αυτήν τυπικών μεταστατικών όγκων δεν υπάρχει.

Η αντίσταση στη στοχεύουσα θεραπεία (αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, αναστολείς EGFR) επιτείνει την ανάγκη για την ταυτοποίηση νέων στόχων. Η μελέτη μας με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των Notch, MAPK, cMET, Jagged1, p21, CyclinD1, pAKT, pRPS6 και PTEN βιομορίων είναι η πρώτη στην προσπάθεια εύρεσης νέων στόχων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. Στα πρώιμα δεδομένα μας τα cMET και MAPK μονοπάτια δείχνουν σημαντικά για την γέννηση και πρόοδο της καρκινικής διαδικασίας του ΚΑΠΕ. Η δυνατότητα υποβολής των αποτελεσμάτων σε ανεξάρτητη αξιολόγηση είναι πιθανόν να επιβεβαιώσουν αυτά τα ευρήματα και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων στοχευουσών θεραπειών. Ο σχετικά ικανοποιητικός αριθμός περιστατικών και η ανεξάρτητη βαθμολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης από έμπειρους παθολογοανατόμους και τον υπότροφο προσδίδουν αξία στα αποτελέσματα αυτής της διατριβής. Χρήζουν όμως περαιτέρω αξιολόγησης σε ανεξάρτητο πληθυσμό ασθενών ΚΑΠΕ.

Ως σήμερα, σε αντίθεση με αυτό που ευρέως πιστεύεται, δεν έχει επιτευχθεί βελτίωση της ολικής επιβίωσης παρά την ανίχνευση –όπου αυτό επιτεύχθηκε- της

πρωτοπαθούς εστίας με πλατφόρμες πολυγονιδιακής έκφρασης και την χορήγηση ειδικής χημειοθεραπείας ή/και στοχεύουσας θεραπείας. Γι αυτό, μαζί με το υψηλό κόστος της τεχνικής, δεν έχει κριθεί, ακόμη, απαραίτητη η χρήση τους στην καθ' ημέρα ιατρική πράξη. Χρήζει όμως περαιτέρω αξιολόγησης. Η προσδοκία ότι η βιολογική ταυτοποίηση του ιστού προέλευσης και η χορήγηση θεραπείας ειδικής για τον ιστό προέλευσης θα οδηγήσουν σε βελτίωση της επιβίωσης των αρρώστων θα πρέπει να αποδειχθεί μέσα από προοπτικές τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές. Προτείνουμε την χρήση αυτής της βιολογικής-μοριακής τεχνικής όχι μόνο για την βιολογική ταυτοποίηση της πρωτοπαθούς αλλά και στον στον τομέα της πρόγνωσης, για την δημιουργία ίσως κάποιου αλγορίθμου, καθώς και για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της νόσου. Με άλλα λόγια, οι μοριακές πλατφόρμες μπορούν να μελετήσουν όχι μόνο τις ομοιότητες αλλά και τις μοριακές διαφορές του ΚΑΠΕ από τους τυπικούς μεταστατικούς συμπαγείς όγκους.

Συνοψίζοντας, θεωρούμε ότι τα δεδομένα αυτής της διατριβής θα μπορούσαν να συνεισφέρουν α) στην εφαρμογή ενός απλού και εύχρηστου κλινικο-παθολογοανατομικού προγνωστικού αλγόριθμου, β) καταδεικνύουν ορισμένα μοριακά μονοπάτια που ενδεχομένως έχουν προγνωστική σημασία και αποτελούν θεραπευτικούς στόχους για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ, γ) δεν τεκμηριώνουν κάποια ολιγο-πρωτεϊνική βιολογική υπογραφή του ΚΑΠΕ μοναδική για το ΚΑΠΕ και διαφορετική από αυτές τυπικών μεταστατικών όγκων γνωστής πρωτοπαθούς εστίας.

Περίληψη

Εισαγωγή. Το ΚΑΠΕ αποτελεί ετερογενή κλινική οντότητα, για την οποία αφενός δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της πρωτοπαθούς εστίας ακόμη και μετά από πλήρη διαγνωστική προσέγγιση αφετέρου η θεραπευτική του προσέγγιση είναι σχεδόν ομοιόμορφη. Για το λόγο αυτό η ταυτοποίηση κλινικών, παθολογικών ή/και εργαστηριακών παραμέτρων με προγνωστική αξία θα μπορούσε να συνεισφέρει στην συσχέτιση της νόσου με τον κίνδυνο θανάτου, αλλά και στην εξατομίκευση της θεραπείας ενώ η αποσαφήνιση της βιολογικής συμπεριφοράς αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την βελτίωση της θεραπευτικής αντιμετώπισης και κατά συνέπεια της παράτασης της 12μηνιας ολικής επιβίωσης.

Ο στόχος δηλαδή αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν διπλός. Αρχικά η δημιουργία προγνωστικού αλγόριθμου ικανού να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς με ΚΑΠΕ και να βοηθήσει στην εξατομίκευση της θεραπευτικής προσέγγισης και σε δεύτερο βαθμό, υποθέτοντας ότι αυτός ο τύπος κακοήθειας μπορεί να κατέχει ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε την πιθανή προγνωστική ή/και προβλεπτική αξία βιομορίων που συμμετέχουν στην μετάδοση σήματος μέσω των μονοπατιών PTEN/AKT, cMET, NOTCH και MAPK, με την χρήση της ανοσοϊστοχημικής τους έκφρασης.

Ασθενείς και Μέθοδοι. Έγινε αναδρομική έρευνα των κλινικών αρχείων της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ασθενών με ΚΑΠΕ που διεγνώσθησαν από το 1988 ως το 2011 με επικαιροποίηση των δεδομένων έκβασης και εισαγωγή σε ηλεκτρονικό αρχείο. Καταφέραμε την συλλογή δεδομένων από 311 ασθενείς. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση, με τη χρήση του μοντέλου Cox αναλογικού κινδύνου για μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση, καθώς και τη χρήση της στατιστικής μεθόδου των δέντρων ταξινόμησης και παλινδρόμησης (Classification and Regression Tree -CART).

Ακολούθησε η συλλογή δεδομένων, από 100 δείγματα ασθενών με ΚΑΠΕ και εξετάσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των p21, CyclinD1, pAKT, pRPS6, PTEN, cMET, Jagged1, NOTCH 1-3 και pMAPK βιομορίων. Χρησιμοποιήσαμε την τεχνική των ιστικών μικροσυστοιχιών σκοπεύοντας να καθορίσουμε την έκφραση αυτών των

βιομορίων με κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά καθώς και με την προγνωστική σημασία που αυτή έχει στην έκβαση των ασθενών.

Αποτελέσματα. Η επεξεργασία των δεδομένων των 311 ασθενών με ΚΑΠΕ ανέδειξε ότι οι περισσότεροι ασθενείς παρουσίασαν χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα ή αδιαφοροποίητο καρκίνωμα (85%), κυρίως με σπλαχνικές μεταστάσεις(62%), είχαν καλή φυσική κατάσταση (55%) και έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα(68%). Η μέση επιβίωση όλων των ασθενών ήταν 8 μήνες (95% CI 6.7–9.1). Στη μονοπαραγοντική ανάλυση αρκετοί παράμετροι συσχετίστηκαν με την έκβαση των περιστατικών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ως ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες την καλή φυσική κατάσταση (HR 0.58, $p = 0.002$ για PS 0–1), την κλινικο-παθολογοανατομική υποομάδα (HR 2.44, $p = 0.001$ για την υποομάδα της σπλαχνικής νόσου) και την λευκοκυττάρωση (HR 0.37, $p = 0.001$, cut off <10,000/mm³ λευκοκύτταρα). Αυτοί οι τρεις παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του προγνωστικού αλγόριθμου (Ioannina Score for CUP Outpatient Oncologic Prognostication, I-SCOOP), ο οποίος κατάφερε τον διαχωρισμό των ασθενών σε 3 ομάδες, την ευνοϊκής, την ενδιάμεσης και την πτωχής πρόγνωσης. Οι ομάδες αυτές παρουσίασαν μέση επιβίωση 36, 11-15 και 5-8 μήνες αντίστοιχα. Ο αλγόριθμος υποβλήθηκε σε αξιολόγηση επιβεβαιώνοντας την στατιστική του δυναμική.

Τα 100 δείγματα που υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημική ανάλυση ανέδειξαν τα pAKT, Notch3 και pMAPK ως τα βιομόρια με τη μεγαλύτερη έκφραση. Το pAKT [RR = 2.39 (95% CI 1.23–4.66), $p = 0.01$] και pRPS6 [RR = 2.76 (95% CI 1.31–5.84), $p = 0.008$] εκφραζόμενο φαίνεται να προσδίδει στον ασθενή πτωχή πρόγνωση. Βρέθηκε μία γραμμική σχέση της έκφρασης μεταξύ του Notch3 και του cMET ($p = 0.001$) ενώ η αυξημένη έκφραση του pMAPK συνδέθηκε με πτωχή έκβαση (μέση ολική επιβίωση 9 έναντι 17 μηνών, $p = 0.016$) καθώς και θετική προβλεπτική αξία ($p = 0.02$). Η πρόγνωση ήταν ακόμη χειρότερη όταν υπήρξε η συνδυασμένη έκφραση των pMAPK και pAKT [μέση ολική επιβίωση 8 μηνών (95% CI 5.3–10.7) έναντι 17 μηνών (95% CI 13.1–20.9)]. Η μελέτη αυτή ανέδειξε επιπλέον θετική προγνωστική σημασία που έχει η έκφραση του cMET με (μέση ολική επιβίωση 15 έναντι 9 μηνών, $p = 0.05$) τόσο στη μονοπαραγοντική όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση (κίνδυνος θανάτου RR 0.48, $p = 0.025$). Και η αυξημένη έκφραση του p21 σχετίστηκε με καλύτερη επιβίωση. [RR = 0.34 (95% CI 0.16–0.73), $p = 0.005$]. Τα cMET και Notch3 εκφράζονται πιο συχνά στα πλακώδη καρκινώματα καθώς και σε ΚΑΠΕ με μονήρη

μετάσταση (η έκφραση του cMET είναι αυξημένη όταν υπάρχει λεμφαδενική ή μαλακών μορίων μεταστατική νόσος, $p=0.001$, και του Notch3 στη σπλαχνική νόσο και στη λεμφαδενική ή μαλακών μορίων μεταστατική νόσος, $p=0.001$).

Συμπεράσματα. Αναπτύξαμε έναν απλό και εύκολο στη χρήση προγνωστικό αλγόριθμο βασισμένο σε κλινικο-ιστολογικές και εργαστηριακές μεταβλητές που επιτρέπει την καταλληλότερη πρόγνωση αλλά και την εξατομίκευση της θεραπευτικής προσέγγισης.

Η έκφραση των p21 και cMET φαίνεται να σχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση, σε αντίθεση με την αυξημένη έκφραση των pMAPK, pAKT τα οποία σχετίστηκαν με πτωχή πρόγνωση. Το ίδιο επιβεβαιώθηκε και από τον συνδυασμό τους. Η μελέτη μας προσπάθησε να καθορίσει τον ρόλο των βιομορίων που συμμετέχουν στην λειτουργία των PTEN/AKT, MAPK, Notch και MET μονοπατιών. Πρόκειται για κυτταρικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος η λειτουργία των οποίων καθορίζει την έναρξη και την ανάπτυξη της καρκινικής διαδικασίας.

Ο προγνωστικός αλγόριθμος I-SCOOP και η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη βιομορίων θα μπορούσε μετά ίσως και από αξιολόγησης τους σε μεγαλύτερο και ανεξάρτητο πληθυσμό να συμβάλλει περαιτέρω στην θεραπευτική στρατηγική και αντιμετώπιση αυτών των ασθενών. Η χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας θα μπορούσε να συμπληρώσει την προγνωστική αξία αυτού του αλγόριθμου.

Abstract

Study of clinicopathologic and immunohistochemical variables with prognostic and predictive value in cancer of unknown primary (CUP) and development of a prognostic algorithm

Background: CUP represents a heterogeneous population of patients with systemic malignancy, variable outcomes and managed on the basis of “one size fits all” therapeutic concepts.

Identification of clinical, pathologic and laboratory parameters with prognostic utility could contribute to estimation of death hazard and tailoring of therapy. Also insights into the molecular biology of CUP are urgently needed.

Patients and Methods: Our study is divided in two parts. In the first part, clinical, pathologic and laboratory data from 311 patients with CUP diagnosed in a single university centre from 1988 to 2011 were examined for prognostic significance in univariate, multivariate and Classification and Regression Tree (CART) analyses. We analysed all published CUP prognostic algorithms in PubMed and EmBase from 1985 to date in order to describe defining characteristics.

We also retrospectively examined in the second part the immunohistochemical (IHC) expression of PTEN, phospho-AKT, Cyclin D1, p21, phospho-RPS6, Notch1, 2, 3, Jagged1, cMET, and pMAPK biomolecules in 100 CUP tumors using tissue microarrays. From the percentage of staining tumour cells and the literature, we selected cut-offs to classify the expression of each biomolecule, aiming to study their correlation to clinicopathologic characteristics and prognostic utility for patient outcome.

Results: In the 311 patients which were examined for the development of a prognostic algorithm, most patients harboured poorly differentiated adenocarcinoma or carcinoma (85%) in visceral sites (62%) and were managed with combination chemotherapy. Median overall survival for all patients was 8 months (95% CI 6.7–9.1). Multivariate analysis established that only leucocytosis (HR 0.37, $p = 0.001$, cut off $<10,000/\text{mm}^3$ leucocytes), clinicopathologic CUP subgroup (HR 2.44, $p = 0.001$ for the visceral subgroup) and performance status (HR 0.58, $p = 0.002$ for PS 0–1) retained

independent prognostic significance. These three parameters were used for developing a prognostic algorithm (Ioannina Score for CUP Outpatient Oncologic Prognostication, I-SCOOP) which produced a dynamic 5-tier point score and classified patients in low, intermediate and high risk groups with median survival times of 36, 11–14 and 5–8 months respectively.

The immunohistochemical analysis of the 100 CUP patients showed that PTEN, pAKT, pRPS6, Notch3, and pMAPK were frequently expressed. At univariate analysis, high IHC expression of pAKT and pRPS6 displayed statistically significant association with worse survival. Prognosis was worse upon concurrent high IHC expression of pMAPK and pAKT {median overall survival = 8 months [95% confidence interval (CI) 5.3-10.7] versus 17 months [95% CI 13.1-20.9]}. In multivariate analysis, high p21 was associated with better survival (risk ratio [RR] = 0.34 [95% CI 0.16-0.73], P = 0.005). High expression of pAKT (RR = 2.39 [95% CI 1.23-4.66], P = 0.01) or pRPS6 (RR = 2.76 [95% CI 1.31-5.84], P = 0.008) was associated with worse survival. A linear correlation of Notch3 and cMET expression was found (p = 0.001), while pMAPK emerged as the major adverse prognostic factor (median overall survival OS 9 vs. 17 months, p = 0.016), carrying also a significantly positive predictive value (p = 0.02). Our study indicated a favorable prognostic impact of cMET expression in CUP, both in univariate (median OS 15 vs. 9 months, p = 0.05) and in multivariate analysis (Relative Risk RR for death 0.48, p = 0.025). cMET and Notch3 expression were found to be statistically more frequent in squamous carcinomas (positive in 90 % of cases), associated with a unique metastatic IHC pattern (cMET-high in soft tissue/lymph node metastases, p<0.001, Notch3-high in visceral, peritoneal/pleural and soft tissue/lymph node metastases, p<0.001).

Conclusions: We developed a simple and easy to use CUP prognostic algorithm based on readily available clinicopathologic and laboratory variables. A major limitation of most studies on CUP prognostic scores is the inability to proceed to prospective or retrospective validation of the algorithm in an independent CUP patient population. However, intrinsic statistical validation generated promising, though not definite, hints that our model is stable and independent of random population and data fluctuations

Our preliminary data pinpoint the MAPK and cMET axes as crucial in defining cancer progression and outcome in CUP patients and, if prospectively validated in independent series, could identify these biomolecules as promising therapeutic targets.

Παρουσιάσεις και Δημοσιεύσεις διατριβής

1. Dimitrios Petrakis, George Pentheroudakis, Evangelos Voulgaris, Nicholas Pavlidis. Prognostication in cancer of unknown primary (CUP): Development of a prognostic algorithm in 311 cases and review of the literature *Cancer Treatment Reviews* 2013;39: 701–708.
2. Dimitrios Krikelis, George Pentheroudakis, Anna Goussia, Vassiliki Siozopoulou, Mattheos Bobos, Dimitrios Petrakis, Aikaterini Stoyianni, Vassilios Golfinopoulos, Andres Cervantes, Tudor Ciuleanu, George Fountzilias, Vassiliki Malamou-Mitsi, Nicholas Pavlidis Profiling immunohistochemical expression of NOTCH1–3, JAGGED1, cMET, and phospho-MAPK in 100 carcinomas of unknown primary *Clin Exp Metastasis* 2012;29:603–614.
3. Pavlidis N, Petrakis D, Golfinopoulos V, Pentheroudakis G. Long-term survivors among patients with cancer of unknown primary. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;84(1):85-92.
4. ECCO-ESMO 2011 Meeting (23-27 September 2011, Stockholm)
 - Immunohistochemical profiling of signaling pathways in Cancer of Unknown Primary (CUP), Abstract 1450, Poster
George Pentheroudakis, Dimitrios Petrakis, Anna Gousia, Vassiliki Siozopoulou, Matthaios Bobos, George Fountzilias, Andres Cervantes, Vassiliki Malamou-Mitsi, Tudor Ciuleanu, Nicholas Pavlidis.
 - Prognostic Factors in Patients with Cancer of Unknown Primary (CUP), Abstract 9437, Poster
Dimitrios Petrakis, Evangelos Voulgaris, George Pentheroudakis, Nicholas Pavlidis.
5. 18th Pan-Hellenic Clinical Oncology Conference of the Hellenic Society of Medical Oncology (EOΠΕ), Athens 24-27 April 2012
 - Immunohistochemical Study of switching benchmarks in cancer of unknown primary (CUP)

Dimitrios Krikelis, George Pentheroudakis, Dimitrios Petrakis, Anna Gousia, Vassiliki Siozopoulou, Matthaios Bobos, Aikaterini Stoyianni, Vassilios Golfopoulos, Andres Cervantes, Vassiliki Malamou-Mitsi, Tudor Ciuleanu, George Fountzilias, Nicholas Pavlidis.

- Prognostic Factors in Patients with Cancer of Unknown Primary (CUP): retrospective analysis of 311 cases for the development of a prognostic score.

Dimitrios Petrakis, A. Vagionas, Georgios Pentheroudakis, Nikolaos Pavlidis.

Βιβλιογραφία

1. Cerezo L, Raboso E, Ballesteros AI. Unknown primary cancer of the head and neck: a multidisciplinary approach. *Clin Transl Oncol* 2011; 13:88-97.
2. Pentheroudakis G, Briassoulis E, Pavlidis N. Cancer of unknown primary site: missing primary or missing biology? *Oncologist* 2007; 12(4):418-425.
3. Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, Fountzilias G, Agnantis N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995;15:2563-7.
4. Briassoulis E, Tsokos M, Fountzilias G, et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications: a Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998;18:1907-14.
5. Hainsworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of Her-2 in patients with poorly differentiated carcinoma or poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000;18:632-5.
6. Hillen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74:81-5.
7. Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briassoulis E, et al. Angiogenesis in cancer of unknown primary: clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1. *BMC Cancer* 2005;5:25
8. Gauri R. Varadhachary, M.D., and Martin N. Raber, M.D. Cancer of Unknown Primary Site. *N Engl J Med* 2014;371:757-65.
9. Mnatsakanyan E, Tung WC, Caine B, Smith- Gagen J. Cancer of unknown primary: tim etrnds in incidence, United States. *Cancer Causes Control* 2014;25:745-57.
10. Greco FA, Heinsworth JD. Introduction: unknown primary cancer. *Semin Oncol* 2009;36:6.
11. Visser O, Coebergh JWW, Schouten LJ. Incidence of cancer in the Netherlands 1993. *The Netherlands Cancer Registry: Utrecht; 1993.*

12. Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69(3):271-8.
13. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
14. Kuttesch JF, Jr., Parham DM, Kaste SC, RaoBN, Douglass EC, Pratt CB. Embryonal malignancies of unknown primary origin in children. *Cancer*. 1995, 75:115-121.
15. Pavlidis N, Briasoulis E, Heinsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of unknown primary. *Eur J Cancer*. 2003;39:1990-2005.
16. Kaaks R, Sookthai D, Hemminki K, et al. Risk factors for cancers of unknown primary site: Results from the prospective EPIC cohort. *Int J Cancer* 2014;135:2475-85.
17. Brewster DH, Lang J, Bhatti LA, Thomson CS, Oien KA. Descriptive epidemiology of cancer of unknown primary site in Scotland. *Cancer Epidemiol*. 2014;38:227-34.
18. Yasui T, Morii E, Yamamoto Y et al. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e95364.
19. Pavlidis N, Pentheroudakis G, Plataniotis G. Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary site: a favourable prognosis subset of patients with CUP. *Clin Transl Oncol*. 2009 Jun;11(6):340-8.
20. Hemminki K, Ji J, Sundquist J, Shu X. Familial risks in cancer of unknown primary: tracking the primary sites. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):435-40.
21. Australian Government- Australian Cancer. Available at: www.canceraustralia.gov.au/affected-cancer/cancer-types/unknown-primary.
22. Komov DV, Komarov IG, Podrguliskii KR, et al. Cancer metastases from an unestablished primary tumor (clinical aspects, diagnosis, treatment). *Sov Med Rev F Oncology* 1991, 4,1-33.
23. Neumann G. The impact of cancer with unspecified site. *Off Gesundheitswes* 1988, 50,13-19.
24. Levi F, Te Vc, Erler G, Randimbisoml, La Vecchia C. Epidemiology of unknown primary tumours. *Eur J cancer* 2002;38:1810-1812.

25. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, et al. Cancer Incidence in Five Continents, Vol VI. IARC Scientific Publication No. 120. Lyon, IARC, 1992.
26. Bevier M, Sandquist J, Hemminki K. Incidence of cancer of unknown primary in Sweden: analysis by location of metastasis. *Eur j Cancer Prev* 2012;21;596-601.
27. Cancer Research UK. Available at: www.cancerresearchuk.org.
28. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents, vol VII. IARC No 143. Lyon; IARC 1991.
29. Hess KR, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL Classification and regression tree analysis of 1000 consecutive patients with unknown primary carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Nov;5(11):3403-10.
30. Chorost MI, Lee MC, Yeoh CB, Molina M, Ghosh BC. Unknown primary *J Surg Oncol*. 2004 Sep 15;87(4):191-203.
31. Hainsworth JD, Greco FA. Treatment of patients with cancer of an unknown primary site. *N Engl J Med*. 1993 Jul 22;329(4):257-63.
32. Blaszyk H, Hartmann A, Bjornsson. Cancer of unknown primary: clinicopathologic correlations. *J.APMIS*. 2003 Dec;111(12):1089-94.
33. Hillen HF. Unknown primary tumours. *Postgrad Med J*. 2000 Nov;76(901):690-3
34. Bugat R, Bataillard A, Lesimple T, Voigt JJ, Culine S. et al.. Summary of the Standards, Options and Recommendations for the management of patients with carcinoma of unknown primary site (2002). *Br J Cancer*. 2003 Aug;89 Suppl 1:S59-66.
35. Pentheroudakis G, Pavlidis N. Serous papillary peritoneal carcinoma: unknown primary tumour, ovarian Cancer counterpart or a distinct entity? A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;75:27-42.
36. Block EF, Meyer MA. Positron emission tomography in diagnosis of occult adenocarcinoma of the breast. *Am Surg* 1998;64:906.
37. Schorn C, Fischer U, Luftner-Nagel S, Westerhof JP, Grabbe E. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol* 1999;9:470.
38. Henry-Tillman RS, Fischer U, Luftner-Nagel S, et al. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol* 1999;9:470.

39. Pentheroudakis G, Lazaridis G, Pavlidis N. Axillary nodal metastase from carcinoma of unknown primary (CUPAx): a systematic review of published evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:1–11.
40. Pentheroudakis G, Stoyianni A, Pavlidis N. Cancer of unknown primary patients with midline nodal distribution: midway between poor and favourable prognosis? *Cancer Treat Rev* 2011;37(2):120–6.
41. A. Stoyianni, G. Pentheroudakis, N. Pavlidis Neuroendocrine carcinoma of unknown primary. A systematic review of the literature and a comparative study with other neuroendocrine tumors *Cancer Treat Rev*, 37 (5) (2011), pp. 358–365.
42. Hainsworth JD, Spigel DR, Litchy S, Greco FA. Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: a Minnie Pearl Cancer Research Network Study. *J Clin Oncol* 2006;24:3548.
43. B.A. Jereczek-Fossa, J. Jassem, R. Orecchia Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary *Cancer Treat Rev*, 30 (2) (2004), pp. 153–164.
44. Varadhachary GR, Raber MN, Matamoros A, Abbruzzese JL. Carcinoma of unknown primary with a colon cancer-profile changing paradigm and emerging definitions. *Lancet Oncol* 2008;9(6):596.
45. Varadhachary G, Talantov D, Rober M, et al. Molecular profiling of carcinoma of unknown primary and correlation with clinical evaluation. *J Clin Oncol* 2008;26:4442–8.
46. Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site: 20 questions to be answered. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl. 7):vii 303– 307.
47. P.S. Gentile, H.W. Carloss, T-Y Huant, *et al.* Disseminated prostate carcinoma simulating primary lung cancer *Cancer*, 62 (1988), pp. 711–715
48. D.T. Tell, J.M. Khoury, H.G. Taylor, S.P. Veasey A typical metastasis from prostate cancer: clinical utility of the immunoperoxidase technique for prostate specific antigen *JAMA*, 253 (1985), pp. 3574–3575.
49. Riihimäki M, Thomsen H, Hemminki A, Sundquist K, Hemminki KBM. Comparison of survival of patients with metastases from known versus unknown primaries: survival in metastatic cancer; *C Cancer*. 2013 Jan 28;13:36.

50. Pavlidis N Cancer of unknown primary: biological and clinical characteristics *Ann Oncol.* 2003;14 Suppl 3:iii11-8.
51. Pavlidis N, Petrakis D, Golfopoulos V, Pentheroudakis G. Long-term survivors among patients with cancer of unknown primary? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 84(1):85-92.
52. Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site. *Lancet.* 2012 Apr 14;379(9824):1428-35.
53. Hemminki K, Bevier M, Hemminki A, Sundquist J. Survival in cancer of unknown primary site: population-based analysis by site and histology *Ann Oncol.* 2012 Jul;23(7):1854-63.
54. Hemminki K, Riihimäki M, Sundquist K, Hemminki A. Site-specific survival rates for cancer of unknown primary according to location of metastases. *Int J Cancer.* 2013 Jul;133(1):182-9.
55. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, Hemminki K. Time trends in survival from cancer of unknown primary: small steps forward *Eur J Cancer.* 2013 Jul;49(10):2403-10.
56. Handorf CR, Kulkarni A, Grenert JP, et al. A multicenter study directly comparing the diagnostic accuracy of gene expression profiling and immunohistochemistry for primary site identification in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1067-75.
57. Van Der Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, Hillen HF. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res.* 2004;24:297-301.
58. Varadhachary GR, Karanth S, Qiao W, Carlson HR, Raber MN, Hainsworth JD, Greco FA. Carcinoma of unknown primary with gastrointestinal profile: immunohistochemistry and survival data for this favorable subset. *Int J Clin Oncol.* 2014 Jun;19(3):479-84.
59. NCCN guidelines Version 1. 2015. Occult primary. www.nccn.org.
60. Maeda T, Kajiyama K, Adachi E, Takenaka K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. The expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Mod Pathol.* 1996, 9:901-909.

61. Sack MJ, Roberts SA. Cytokeratins 20 and 7 in the differential diagnosis of metastatic carcinoma in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol.* 1997, 16:132-136.
62. Tot T. Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer.* 1999, 85:171-177.
63. Owen KA. Pathologic evaluation of unknown primary cancer. *Semin Oncol* 2009;36:8.
64. Dennis JL, Oien KA. Hunting the primary: novel strategies for defining the origin of tumor. *J Pathol*;13:262.
65. Dabbs DJ. *Diagnostic immunochemistry.* (ed3). Philadelphia: Saunders Elsevier;2010:100.
66. Varadhachary GR, Greco FA. Overview of patient management and future directions in unknown primary carcinoma. *Semin Oncol.* 2009 Feb;36(1):75-80.
67. Wick MR. Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2008 ;12:72-84.
68. Bender RA, Erlander MG. Molecular Classification of Unknown Primary Cancer *Seminars in Oncology,* 2009: 36;38-43.
69. Monzon FA, Koen TJ. Diagnosis of metastatic neoplasms: molecular approaches for identification of tissue of origin *Arch Pathol Lab Med.* 2010 Feb;134(2):216-24.
70. Pentheroudakis G, Golfopoulos V, Pavlidis N. Switching benchmarks in cancer of unknown primary: from autopsy to microarray. *Eur J Cancer* 2007;43:2026-36.
71. Bloom G, Yang IV, Boulware D, et al. Multi-platform, multi-site, microarray-based human tumor classification. *Am J Pathol* 2004;164:9-16.
72. Tothill RW, Kowalczyk A, Rischin D, et al. An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin. *Cancer Res* 2005;65:4031-40.
73. Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. *Oncologist* 2012;17:801-12.
74. Ferracin M, Pedriali M, Veronese A, et al. MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin. *J Pathol* 2011;225:43-53.

75. Horlings HM, van Laar RK, Kerst JM, et al. Gene expression profiling to identify the histogenetic origin of metastatic adenocarcinomas of unknown primary. *J Clin Oncol* 2008;26:4435-41.
76. Greco FA, Spigel DR, Yardley DA, Erlander MG, Ma XJ, Hainsworth JD. Molecular profiling in unknown primary cancer: accuracy of tissue of origin prediction. *Oncologist* 2010;15:500-6
77. Pentheroudakis G, Pavlidis N, Fountzilas G, Krikelis D et al. Novel microRNA-based assay demonstrates 92% agreement with diagnosis based on clinicopathologic and management data in a cohort of patients with carcinoma of unknown primary. *Mol Cancer*. 2013; 12: 57.
78. Hainsworth JD, Rubin MS, Spigel DR, et al. Molecular gene expression profiling to predict the tissue of origin and direct site-specific therapy in patients with carcinoma of unknown primary site: a prospective trial of the Sarah Cannon Research Institute. *J Clin Oncol* 2013;31: 217-23.
79. Handorf CR, Kulkarni A, Grenert JP, Weiss LM, Rogers WM et al. A multicenter study directly comparing the diagnostic accuracy of gene expression profiling and immunohistochemistry for primary site identification in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):1067-75.
80. Weiss LM, Chu P, Schroeder BE, Singh V, Zhang Y, Erlander MG, Schnabel CA. Blinded comparator study of immunohistochemical analysis versus a 92-gene cancer classifier in the diagnosis of the primary site in metastatic tumors. *J Mol Diagn*. 2013 Mar;15(2):263-9.
81. Monzon FA, Dumur CI. Diagnosis of uncertain primary tumors with the Pathwork tissue-of-origin test. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010 Jan;10(1):17-25.
82. Dumur CI, Lyons-Weiler M, Sciulli C et al. Interlaboratory performance of a microarray-based gene expression test to determine tissue of origin in poorly differentiated and undifferentiated cancers. *J Mol Diagn*. 2008 Jan;10(1):67-77.
83. Talantov D, Baden J, Jatkoe T et al. A quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin. *J Mol Diagn*. 2006 Jul;8(3):320-9.

84. Bridgewater J, van Laar R, Floore A, Van'T Veer L Gene expression profiling may improve diagnosis in patients with carcinoma of unknown primary. *Br J Cancer*. 2008 Apr 22;98(8):1425-30.
85. Monzon FA, Lyons-Weiler M, Buturovic LJ et al. Multicenter validation of a 1,550-gene expression profile for identification of tumor tissue of origin. *J Clin Oncol*. 2009 May 20;27(15):2503-8.
86. Greco FA, Lenington WJ, Spigel DR, Hainsworth JD. Molecular profiling diagnosis in unknown primary cancer: accuracy and ability to complement standard pathology. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Jun 5;105(11):782-90.
87. Golfinopoulos V, Pentheroudakis G, Salanti G, et al. Comparative survival with diverse chemotherapy regimens for cancer of unknown primary site: multiple-treatments meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009 Nov;35(7):570-3.
88. J.L. Abbruzzese, R. Lenzi, M.N. Raber, S. Pathak, P. Frost, The biology of unknown primary tumors, *Semin. Oncol*. 20 (1993) 238–243.
89. N.B. Atkin, Chromosome 1 aberrations in cancer, *Cancer Genet. Cytogenet*. 21(1986) 279–285.
90. R.J. Motzer, E. Rodriguez, V.E. Reuter, F. Samaniego, E. Dmitrovsky, D.F. Bajorin, D.G. Pfister, N.Z. Parsa, R.S. Chaganti, G.J. Bosl, Genetic analysis as an aid in diagnosis for patients with midline carcinomas of uncertain histologies, *J. Natl Cancer Inst*. 83 (1991) 341–346.
91. L. Dova, G. Pentheroudakis, I. Georgiou, V. Malamou-Mitsi, G. Vartholomatos, G. Fountzilias, N. Kolaitis, E. Kitsiou, N. Pavlidis, Global profiling of EGFR gene mutation, amplification, regulation and tissue protein expression in unknown primary carcinomas: to target or not to target? *Clin. Exp. Metastasis* 24 (2007) 79–86.
92. C. Massard, J.J. Voigt, A. Laplanche, S et al. Carcinoma of an unknown primary: are EGF receptor, Her-2/neu, and c-Kit tyrosine kinases potential targets for therapy? *Br. J. Cancer* 97(2007) 857–861.
93. J.C. Reed, T. Miyashita, S. et al BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy *J. Cell. Biochem.*, 60 (1996), pp. 23–32.

94. E. Briasoulis, M. Tsokos, G. Fountzilias, D. Bafaloukos, P. Kosmidis, E. Samantas, D.Skarlos, C. Nicolaides, N. Pavlidis, Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications. A Hellenic Co-operative Oncology Group study, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1907–1914.
95. M. Bar-Eli, J.L. Abbruzzese, D. Lee-Jackson, P. Frost, p53 gene mutation spectrum in human unknown primary tumors, *Anticancer Res.* 13 (1993) 1619–1623.
96. Pentheroudakis G, Kotteas EA, Kotoula V, Papadopoulou K, Charalambous E, Cervantes A, Ciuleanu T, Fountzilias G, Pavlidis N. Mutational profiling of the RAS, PI3K, MET and b-catenin pathways in cancer of unknown primary: a retrospective study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Clin Exp Metastasis.* 2014 Oct;31(7):761-9.
97. B.A. Yoshida, M.M. Sokoloff, D.R. Welch, C.W. Rinker-Schaeffer Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field *J. Natl Cancer Inst.*, 92 (2000), pp. 1717–1730.
98. C. Yan, H. Wang, D.D. Boyd, KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1164–1172.
99. Y. Jiang, I.D. Goldberg, Y.E. Shi, Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer, *Oncogene* 21 (2002) 2245–2252.
100. J.F. Porter, S. Shen, D.T. Denhardt, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 463–470.
101. X.W. Liu, M.E. Taube, K.K. Jung, Z. Dong, Y.J. Lee, S. Roshy, B.F. Sloane, R. Fridman, H.R. Kim, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, *Cancer Res.* 65 (2005) 898–906.
102. V. Karavasilis, V. Malamou-Mitsi, E. Briasoulis, E. Tsanou, E. Kitsou, H. Kalofonos, G. Fountzilias, T. Fotsis, N. Pavlidis, Matrix metalloproteinases in carcinoma of unknown primary, *Cancer* 104 (2005) 2282–2287.

103. N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch, J. Folkman, Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) 1–8.
104. J.D. Hainsworth, D.R. Spigel, M.S. Rubin, R.V. Boccia, E.P. Fox, I. Firdaus, M.G. Erlander, C. Schnabel, F.A. Greco, Treatment of carcinoma of unknown primary site (CUP) directed by molecular profiling diagnosis: a prospective, phase II trial, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010)8 abstr 10540.
105. F.A. Greco, M.G. Erlander, Molecular classification of cancers of unknown primary site, *Mol. Diagn. Ther.* 13 (2009) 367–373.
106. F.A. Monzon, F. Medeiros, M. Lyons-Weiler, W.D. Henner, Identification of tissue of origin in carcinoma of unknown primary with a microarray-based gene expression test, *Diagn. Pathol.* 5 (2010) 3.
107. B. Zhang, X. Pan, G.P. Cobb, T.A. Anderson, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, *Dev. Biol.* 302 (2007) 1–12.
108. K.M. Nelson, G.J. Weiss, MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3655–3660.
109. J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, T.R. Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature* 435 (2005) 834–838.
110. N. Rosenfeld, R. Aharonov, E. Meiri et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 462–469.
111. Ultmann JE, Phillips TL: Cancer of unknown primary site, in De Vita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (ed3). Philadelphia, PA, Lippincott 1989, pp 1941-1950.
112. Rudmik L, Lau HY, Matthews TW, et al. Clinical utility of PET/CT in the evaluation of head and neck squamous cell carcinoma with an unknown primary: a prospective clinical trial. *Head Neck* 2011; 33:935-40.
113. Joshi U, van der Hoeven JJ, Comans EF, Herder GJ, Teule GJ, Hoekstra OS. In search of an unknown primary tumour presenting with extracervical metastases: the diagnostic performance of FDG-PET. *Br J Radiol* 2004;77:1000-6.

114. Rusthoven KE, Koshy M, Paulino AC. The role of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor. *Cancer* 2004;101:2641-9.
115. Moller AK, Loft A, Berthelsen AK, et al. 18F-FDG PET/CT as a diagnostic tool in patients with extracervical carcinoma of unknown primary site: a literature review. *Oncologist* 2011;16:445-51.
116. Kim KW, Krajewski KM, et al. Cancer of unknown primary sites: what radiologists need to know and what oncologists want to know. *AJR Am J Roentgenol.* 2013 Mar;200(3):484-92.
117. Delgado-Bolton RC, Fernández-Pérez C, González-Maté A, Carreras JL. Meta-analysis of the performance of 18F-FDG PET in primary tumor detection in unknown primary tumors. *J Nucl Med.* 2003 Aug;44(8):1301-14.
118. Kole AC, Nieweg OE, Pruim J, Hoekstra HJ, Koops HS, Roodenburg JL, Vaalburg W, Vermey A. Detection of unknown occult primary tumors using positron emission tomography. *Cancer.* 1998 Mar 15;82(6):1160-6.
119. Sève P, Billotey C, Broussolle C, Dumontet C, Mackey JR. The role of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose positron emission tomography in disseminated carcinoma of unknown primary site. *Cancer.* 2007 Jan 15;109(2):292-9.
120. Bleicher RJ, Morrow M. MRI and breast cancer: role in detection, diagnosis, and staging. *Oncology (Williston Park).* 2007 Nov;21(12):1521-8.
121. McMahon K, Medoro L, Kennedy D Breast magnetic resonance imaging: an essential role in malignant axillary lymphadenopathy of unknown origin. *Australas Radiol.* 2005 Oct;49(5):382-9.
122. Olson JA Jr, Morris EA, Van Zee KJ, Linehan DC, Borgen PI. Magnetic resonance imaging facilitates breast conservation for occult breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000 Jul;7(6):411-5.
123. Stomper PC, Waddell BE, Edge SB, Klippenstein DL. Breast MRI in the Evaluation of Patients with Occult Primary Breast Carcinoma. *Breast J.* 1999 Jul;5(4):230-234.

124. Ransom DT, Patel SR, Kenney GL, et al. Papillary serous carcinoma of the peritoneum: a review of 33 cases treated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer* 1990;66:1091.
125. Piver MS, Eltabbakh GH, Hempling RE, et al. Two sequential studies for primary peritoneal carcinoma: induction with weekly cisplatin followed by either cisplatin/doxorubicin/cyclophosphamide or paclitaxel/cisplatin. *Gynecol Oncol* 1997;67:141.
126. Bhatia SK, Saclarides TJ, Witt TR, et al. Hormone receptor studies in axillary metastases from occult breast cancer. *Cancer* 1987;59:1170.
127. Schorn C, Fischer U, Luftner-Nagel S, Westerhof JP, Grabbe E. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol* 1999;9:470.
128. D.T. Tell, J.M. Khoury, H.G. Taylor, S.P. Veasey A typical metastasis from prostate cancer: clinical utility of the immunoperoxidase technique for prostate specific antigen JAMA, 253 (1985), pp. 3574–3575.
129. De Braud F, Heilbrun LK, Ahmed K, et al. Metastatic squamous cell carcinoma of an unknown primary localized to the neck: advantages of an aggressive treatment. *Cancer* 1989;64:510.
130. Fernandez JA, Suanz C, Martinez JA, et al. Metastatic squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes from an unknown primary tumor: prognostic factors. *Clin Otolaryngol* 1998;23(2):158-63.
131. Briasoulis E, Kalofonos H, Bafaloukos D, et al. Carboplatin plus paclitaxel in unknown primary cancer: a phase II Hellenic Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2000;18:3101.
132. Dowell JE, Garrett AM, Shyr Y, et al. A randomized phase II trial in patients with carcinoma of an unknown primary site. *Cancer* 2001;91:592.
133. Balana C, Manzano JL, Moreno L, et al. A phase II study of cisplatin, etoposide and gemcitabine in an unfavorable group of patients with carcinoma of unknown primary site. *Ann Oncol* 2003;14:1425.
134. Park YH, Ryoo BY, Choi SJ, et al. A phase II study of paclitaxel plus cisplatin chemotherapy in an unfavorable group of patients with cancer of unknown primary site. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:681.

135. Pouessel D, Culine S, Becht C, et al. Gemcitabine and docetaxel as front-line chemotherapy inpatients with carcinoma of an unknown primary site. *Cancer* 2004;100:1257.
136. Piga A, Nortilli R, Cetto GL, et al. Carboplatin, doxorubicin and etoposide in the treatment of tumors of unknown primary site. *Br J Cancer* 2004;90:1898.
137. El-Rayes BF, Shields AF, Zalupski M, et al. A phase II study of carboplatin and paclitaxel in adenocarcinoma of unknown primary site. *Am J Clin Oncol* 2005;28:152.
138. Palmeri S, Lorusso V, Palmeri L, et al. Cisplatin and gemcitabine with either vinorelbine or paclitaxel in the treatment of carcinoma of unknown primary site. *Cancer* 2006;1007:2898.
139. Pittman KB, Oliver IN, Koczwara R, et al. Gemcitabine and carboplatin in carcinoma of unknown primary site: a phase 2 Adelaide cancer-trials and education collaborative study. *Br J Cancer* 2006;95:1309.
140. Berry W, Elkordy M, O'Rourke M, et al. Results of a phase II study of weekly paclitaxel plus carboplatin in advanced carcinoma of unknown primary origin: a reasonable regimen for the community-based clinic? *Cancer Invest* 2007;25:27.
141. Briasoulis E, Fountzilas G, Bamias A, et al. Multicenter phase II trial of irinotecan plus oxaliplatin [IROX regimen] in patients with poor-prognosis cancer of unknown primary: a Hellenic Cooperative Group study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62:277.
142. Schneider BJ, El-Reyes B, Muler JH, et al. Phase II trial of carboplatin, gemcitabine and capecitabine in patients with carcinoma of unknown primary site cancer. *Cancer* 2007;110:770.
143. Hainsworth JD, Erland JB, Kalman CA, et al. Carcinoma of unknown primary site: treatment with one-hour paclitaxel, carboplatin and extended schedule etoposide. *J Clin Oncol* 1997;15:2385.
144. Greco FA, Gray J, Burris HA, et al. Taxane-based chemotherapy with carcinoma of unknown primary site. *Cancer J* 2001;7:203.
145. Greco FA, Erland JB, Morrissey LH, et al. Phase II trials with docetaxel plus cisplatin or carboplatin. *Ann Oncol* 2000;11:211.

146. Greco FA, Burris HA, Litchy S, et al. Gemcitabine, carboplatin, and paclitaxel for patients with unknown primary site: a Minnie Pearl Cancer Research Network study. *J Clin Oncol* 2002;20:1651.
147. Hainsworth JD, Burris HA, Calvert SW, et al. Gemcitabine in the second-line therapy of patients with carcinoma of unknown primary site: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *Cancer Invest* 2001;19:335.
148. Hainsworth JD, Spigel DR, Raefsky EL, et al. Combination chemotherapy with gemcitabine and irinotecan in patients with previously treated carcinoma of an unknown primary site. *Cancer* 2005;104:1992.
149. Greco FA, Hainsworth JD, Yardley DA, et al. Sequential paclitaxel/carboplatin/etoposide followed by irinotecan/gemcitabine for patients with carcinoma of unknown primary site: a Minnie Pearl Cancer Research Network phase II trial. *Oncologist* 2004;9:644.
150. Hainsworth JD, Spigel DR, Thompson DS, et al. Paclitaxel/carboplatin plus bevacizumab/erlotinib in the first-line treatment of patients with carcinoma of unknown primary site. *Oncologist* 2009;14:1189.
151. Hainsworth JD, Spigel DR, Farley C, et al. Bevacizumab and erlotinib in the treatment of patients with carcinoma of unknown primary site: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 2007;25:1747.
152. Hainsworth JD, Spigel DR, Thompson DS, et al. Paclitaxel/carboplatin plus bevacizumab/erlotinib in the first-line treatment of patients with carcinoma of unknown primary site. *Oncologist* 2009;14:1189.
153. Seve P, Ray-Coquard I, Trillet-Lenoir V, Sawyer M, Hanson J, Broussolle C, Negrier S, Dumontet C, Mackey JR Low serum albumin levels and liver metastasis are powerful prognostic markers for survival in patients with carcinomas of unknown primary site. *Cancer*. 2006 Dec 1;107(11):2698-705
154. Culine S, Kramar A, Saghatchian M, et al. Development and validation of a prognostic model to predict the length of survival in patients with carcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2002;20:4679.

155. Alberts AS, Falkon G, Falkon HC, Van Der Marve MP. Treatment and prognosis of metastatic carcinoma of unknown primary: analysis of 100 patients. *Med Pediatr Oncol* 1989;17:188–92.
156. Van Der Gaast A, Verweij J, Planting AST, et al. Simple prognostic model to predict survival in patients with undifferentiated carcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 1995;13:1720.
157. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, et al. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol* 1994;12:1272.
158. Piga A, Gesuita R, Catalano V, et al. Identification of clinical prognostic factors in patients with unknown primary tumors treated with a platinum- based Table 6 Parameters with prognostic value in previous CUP studies. combination. *Oncology* 2005;69:135–44.
159. Ponce Lorenzo J, Segura Huerta A, Diaz Beverige R, et al. Carcinoma of unknown primary site: development in a single institution of a prognostic model based on a clinical and serum variables. *Clin Trans Oncol* 2007;9: 452–8.
160. Thöm I, Rogers C, Andritzky B, et al. Single center management of 136 patients with cancer of unknown primary site (CUP syndrome) over a period of 10 years. *Onkologie* 2009;32:741–6.
161. Kobaira M, Takahashi S, Yamada S, Ueda K, et al. Bone metastasis and poor performance status are prognostic factors for survival of carcinoma of unknown primary site in patients treated with systemic chemotherapy. *Ann Oncol* 2010;21:1163–7.
162. Fernandez-Cotarelo MJ, Guerra-Vales JM, Colina F, Dela Cruz J. Prognostic factors in cancer of unknown primary site. *Tumori* 2010;96:111–6.
163. Trivanovic D, Petkovic M, Stimac D. New prognostic index to predict survival in patients with cancer of unknown primary site with unfavourable prognosis. *Clin Oncol* 2009;21:43–8.
164. Pasterz R, Savaraj N, Burgess M. Prognostic factors in metastatic carcinoma of unknown primary. *J Clin Oncol* 1986;4(11):1652–7.
165. Lu HJ, Chen KJ, Tseng CH, et al. Evaluation of prognosis for carcinoma of unknown origin in elderly patients. *Oncology* 2012;83(1):24–30.

166. Culine S. Prognostic factors in unknown primary cancer. *Semin Oncol* 2009;36:60–4.
167. Kambhu SA, Kelsen DP, Fiore J, et al. Metastatic adenocarcinoma of unknown primary site. Prognostic variables and treatment results. *Am J Clin Oncol* 1990;13:55-60.
168. Greco FA, Heinsworth JD. Cancer of unknown primary site. In: de Vita TV, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer Principles and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co; 1997. p. 2423–43.
169. Pavlidis N. Forty years experience of treating cancer of unknown primary. *Acta Oncologica* 2007;46:592–601.
170. Fizasi K, Greco FA, Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 6):Vi64–8.
171. Borggrefe T, Oswald F (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66:1631–1646.
172. Miele L (2006) Notch signaling. *Clin Cancer Res* 12:1074–1079.
173. Miele L, Miao H, Nickoloff BJ (2006) NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 6:313–323.
174. Wang Z, Li Y, Kong D, Sarkar FH (2010) The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr Drug Targets* 11:745–751.
175. Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH (2009) Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett* 279:8–12.
176. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773:1263–1284.
177. Davis JM, Navolanic PM, Weinstein-Oppenheimer CR, Steelman LS, Hu W, Konopleva M, Blagosklonny MV, McCubrey JA (2003) Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clin Cancer Res* 9:1161–1170.

178. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
179. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915–925
180. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 23:9067–9072.
181. Van Damme V, Govaerts E, Nackaerts K, Dooms C, Wauters I, Vansteenkiste J. Clinical factors predictive of long-term survival in advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2013 Jan;79(1):73–6.
182. Mercadante S, Valle A, Porzio G, Aielli F, Adile C, Casuccio A. Prognostic factors of survival in patients with advanced cancer admitted to home care. *J Pain Symptom Manage* 2013;45(1):56–62.
183. Cerny J, Rosmarin AG. Why does my patient have leukocytosis? *Hematol Oncol Clin North Am* 2012;26(2):303–19.
184. Dova L, Pentheroudakis G, Golfopoulos V, Malamou-Mitsi V, Georgiou I, Vartholomatos G, Ntemou A, Fountzilas G, Pavlidis N (2008) Targeting c-KIT, PDGFR in cancer of unknown primary: a screening study for molecular markers of benefit. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:697–704.
185. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6:184-192.
186. Jeon YJ, Kim IK, Hong SH, et al. Ribosomal protein S6 is a selective mediator of TRAIL-apoptotic signaling. *Oncogene* 2008;27:4344-4352.
187. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:851-864.
188. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9:153-166.

189. Dan S, Okamura M, Seki M, et al. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res* 2010;70:4982-4994.
190. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-562.
191. Dang TP, Gazdar AF, Virmani AK, Sepetavec T, Hande KR, Minna JD, Roberts JR, Carbone DP (2000) Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92:1355–1357
192. Haruki N, Kawaguchi KS, Eichenberger S, Massion PP, Olson S, Gonzalez A, Carbone DP, Dang TP (2005) Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* 65: 3555–3561.
193. Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:247–253.
194. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011;138(17):3593-612.
195. N Sethi, Y Kang. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. *British Journal of Cancer* (2011) 105, 1805–1810.
196. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776
197. Harrison H, Farnie G, Howell SJ, Rock RE, Stylianou S, Brennan KR, Bundred NJ, Clarke RB (2010) Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res* 70:709–718.
198. Danilkovitch-Miagkova A., Zbar B. (2002) Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 109: 863–867.
199. Molina, Julian R, Adjei, Alex A. The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006;1: 7-9
200. Grugan KD, Miller CG, Yao Y, Michaylira CZ, Ohashi S, Klein- Szanto AJ, Diehl JA, Herlyn M, Han M, Nakagawa H, Rustgi AK (2010) Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11026–11031.

201. Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, El Dinali M, Yala S, Kanteti R, Cohen EE, Lingen MW, Martin L, Krishnaswamy S, Klein-Szanto A, Christensen JG, Vokes EE, Salgia R (2009) The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 69:3021–3031.
202. Kim CH, Kim J, Kahng H, Choi EC (2007) Change of E-cadherin by hepatocyte growth factor and effects on the prognosis of hypopharyngeal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 14:1565–1574.
203. Yu J, Shi R, Zhang D, Wang E, Qiu X (2011) Expression of integrin-linked kinase in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: correlation with E-cadherin expression, tumor microvessel density and clinical outcome. *Virchows Arch* 458: 99–107.
204. Stoyianni A, Goussia A, Pentheroudakis G, Siozopoulou V, Ioachim E, Krikelis D, Golfinopoulos V, Cervantes A, Bobos M, Fotsis T, Bellou S, Fountzilas G, Malamou-Mitsi V, Pavlidis N (2012) Immunohistochemical study of the epithelial-mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility. *Anticancer Res.*
205. Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G (2001) Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC. *Clin Cancer Res* 7:3519–3525.
206. Crosswell HE, Dasgupta A, Alvarado CS, Watt T, Christensen JG, De P, Durden DL, Findley HW (2009) PHA665752, a smallmolecule inhibitor of c-Met, inhibits hepatocyte growth factorstimulated migration and proliferation of c-Met-positive neuroblastoma cells. *BMC Cancer* 9:411.
207. Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, Gulotta G, Dieli F, Giordano S, De Maria R, Stassi G (2010) Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res* 70:8874–8885.
208. Stella GM, Benvenuti S, Gramaglia D, Scarpa A, Tomezzoli A, Cassoni P, Senetta R, Venesio T, Pozzi E, Bardelli A, Comoglio PM (2011) MET mutations in cancers of unknown primary origin (CUPs). *Hum Mutat* 32:44–50.

209. Stella GM, Benvenuti S, Gramaglia D, Scarpa A, Tomezzoli A, Cassoni P, Senetta R, Venesio T, Pozzi E, Bardelli A, Comoglio PM. MET mutations in cancers of unknown primary origin (CUPs). *Hum Mutat.* 2011 Jan;32(1):44-50.
210. Radtke F, Raj K (2003) The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3:756–767.
211. Sundaram MV (2005) The love-hate relationship between Ras and Notch. *Genes Dev* 19:1825–1839.
212. Klotz R, Zeimet AG, Reimer D, Muller-Holzner E, Chamson M, Marth C (2008) Activated p38-MAPK and gemcitabine sensitivity in recurrent ovarian cancer. *Anticancer Res* 28:2975–2980.
213. Inno A, Salvatore MD, Cenci T, Martini M, Orlandi A, Strippoli A, Ferrara AM, Bagala C, Cassano A, Larocca LM, Barone C (2011) Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer? *Clin Colorectal Cancer* 10:325–332.
214. Gu F, Ma Y, Zhang Z, Zhao J, Kobayashi H, Zhang L, Fu L (2010) Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 23:671–676.
215. Rudiger T, Hofler H, Kreipe HH, Nizze H, Pfeifer U, Stein H, Dallenbach FE, Fischer HP, Mengel M, von Wasielewski R, Muller-Hermelink HK (2002) Quality assurance in immunohistochemistry: results of an interlaboratory trial involving 172 pathologists. *Am J Surg Pathol* 26:873–882.

