

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

ΠΑΘΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

**Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΩΓΕΑ ΣΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (STAT1) ΚΑΙ Η
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ, ΤΟ ΒΑΘΜΟ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΣΤΟ
ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΣΤΟΜΑΤΙΚΗΣ
ΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ**

ΕΛΕΝΗ Η. ΠΑΠΠΑ

Στοματικός & Γναθοπροσωπικός Χειρουργός

Ιατρός – Οδοντίατρος

ΑΘΗΝΑ 2014

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΔΟΓΕΩΡΓΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Καθηγητής (Επιβλέπων)

ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής

ΝΙΚΗΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΔΟΓΕΩΡΓΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Καθηγητής

ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Καθηγητής

ΝΙΚΗΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΒΟΥΓΙΟΥΚΛΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Καθηγητής

ΙΑΤΡΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ , Καθηγητής

ΝΙΚΟΛΑΤΟΥ ΓΑΛΙΤΗ ΟΥΡΑΝΙΑ , Καθηγήτρια

ΣΚΛΑΒΟΥΝΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, Καθηγήτρια

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Οδοντιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

(Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202, παρ. 2, Ν.5343).

Αφιέρωση

Στην ιερή μνήμη των αγαπημένων μου γονιών Βούλας και Ηλία

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	σελ. 13
ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	σελ. 15
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 17
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ. 18
A.1. Επιδημιολογία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου.....	σελ. 18
A.2. Ο ρόλος των ιών του ανθρωπίνου θηλώματος (HPVs).....	σελ. 19
A.3. Σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος με το σύστημα TNM.....	σελ. 23
A.4. Αξιολόγηση του συστήματος TNM	σελ. 31
A.5. Συστήματα για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης του ΑΚΣ συμπληρωματικά ως προς το TNM.....	σελ. 33
B. Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΕΦΑΛΗΣ & ΤΡΑΧΗΛΟΥ.....	σελ. 38
B.1. Η χειρουργική του καρκίνου του στόματος.....	σελ. 40
B.2. Ο ρόλος της ακτινοθεραπείας στον καρκίνο του στόματος.....	σελ. 42
B.3. Ο ρόλος της χημειοθεραπείας και χημειοακτινοθεραπείας στον καρκίνο του στόματος.....	σελ. 43
B.3.1. Εισαγωγική χημειοθεραπεία.....	σελ. 44
B.3.2. Ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία.....	σελ. 46
B.3.3. Εισαγωγική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία.....	σελ. 47
B.3.4. Συμπληρωματική χημειοθεραπεία ή συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία.....	σελ. 51
B.4. Νεότερες θεραπείες – Στοχευμένη μοριακή θεραπεία.....	σελ. 53
B.4.1. Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι του EGFR.....	σελ. 54
B.4.2. Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι των παραγόντων VEGF/VEGFR.....	σελ. 60
B.4.3. Αναστολείς της COX-2 σε συνδυαστική θεραπεία (cell cycle dysregulation).....	σελ. 64
B.4.4. Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι των παραγόντων Ras, Raf, mTOR.....	σελ. 66
B.4.5. Εμβόλια έναντι των ιών HPV.....	σελ. 69
B.4.6. Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι του υποδοχέα IGF-1R	σελ. 72

Γ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ STAT ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ.....	σελ. 75
Γ.1. Η διαδικασία ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STATs.....	σελ. 77
Γ.2. Ο ρόλος των πρωτεϊνών STATs στον καρκίνο.....	σελ. 79
Γ.2.1. Η επίδραση των πρωτεϊνών STAT3 και STAT5 στην ογκογένεση..	σελ. 79
Γ.2.2. Η πρωτεΐνη STAT1 ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας.....	σελ. 81
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	σελ. 85
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 87
A. ΑΣΘΕΝΕΙΣ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ. 88
A.1. Ασθενείς και δείγματα ιστών.....	σελ. 88
A.2. Ανοσοϊστοχημική χρώση.....	σελ. 89
A.3. Παθολογοανατομική μελέτη.....	σελ. 93
A.4. Στατιστική ανάλυση.....	σελ. 94
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	σελ. 96
B.1. Κλινικές και παθολογοανατομικές παράμετροι.....	σελ. 96
B.2. Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των STAT1 και PSTAT1 μεταξύ των περιοχών με ΑΚΣ και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών των παρασκευασμάτων.....	σελ. 101
B.3. Συσχέτιση των ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων έκφρασης των STAT1 και PSTAT1 με τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα.....	σελ. 104
B.4. Αξιολόγηση της επίδρασης των παθολογοανατομικών παραμέτρων στην επιβίωση των ασθενών του δείγματος.....	σελ. 110
B.5. Πολυπαραγοντική ανάλυση της επίδρασης των παραπάνω παραμέτρων στη συνολική επιβίωση των ασθενών του δείγματος.....	σελ. 119
B.6. Αξιολόγηση της επιβίωσης ανάμεσα στις ομάδες συμπληρωματικής θεραπείας των ασθενών.....	σελ. 120
B.7. Συσχέτιση των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τους παράγοντες STAT1 και PSTAT1 με την επιβίωση ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας των ασθενών χωριστά.....	σελ. 124
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ. 127
Γ.1. Σύγκριση της παρούσας μελέτης με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.....	σελ. 127
Γ.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων από τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των STAT1 και PSTAT1 σε περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς.....	σελ. 128
Γ.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων με εργασίες που αφορούν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των STAT1 και PSTAT1 σε όγκους κεφαλής και τραχήλου και ανάλυση των μηχανισμών της ογκοκατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης STAT1.....	σελ. 130

Γ.4.	Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης PSTAT1 με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών, συμπεριλαμβανομένης της συνολικής επιβίωσης.....	σελ. 132
Γ.5.	Ανάλυση των προγνωστικών δεικτών της συνολικής επιβίωσης των ασθενών.....	σελ. 133
Γ.6.	Η πρωτεΐνη PSTAT1 ως προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης σε ασθενείς με συμπληρωματική χημειοθεραπεία και οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται η δράση αυτή.....	σελ. 134
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		σελ. 137
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....		σελ. 139
SUMMARY.....		σελ. 141
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		σελ. 143

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (ΑΚΣ) αποτελεί το 90% των κακοήθων νεοπλασμάτων της στοματικής κοιλότητας και του στοματοφάρυγγα. Το κάπνισμα και η κατάχρηση αλκοόλης συνιστούν τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες για τη νόσο. Πρόσφατα ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος (HPV), κυρίως ο υπότυπος 16, έχει συσχετιστεί άμεσα με την εμφάνιση ΑΚΣ σε νεότερες ηλικίες, ιδίως στο στοματοφάρυγγα. Παρά την πρόοδο στις χειρουργικές τεχνικές και τις μεθόδους ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας, τα ποσοστά επιβίωσης δεν έχουν αλλάξει σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες.

Η πρόοδος που έχει συντελεστεί στη μοριακή βιολογία έχει βοηθήσει να γίνουν κατανοητές πολλές από τις μεταβολές σε επίπεδο κυττάρου που οδηγούν στην εμφάνιση του ΑΚΣ. Η γνώση αυτή αυξάνει τις πιθανότητες για τη χρήση στο εγγύς μέλλον διαφόρων μοριακών δεικτών που θα συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση και στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου και της ανταπόκρισής του σε συγκεκριμένες θεραπευτικές μεθόδους.

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να εξετάσει τα επίπεδα έκφρασης του επαγωγέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής - 1 (STAT1) σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας και να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση που μπορεί να παρουσιάζουν με διάφορες ιστοπαθολογικές παραμέτρους, καθώς και με την επιβίωση των ασθενών.

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα Καθηγητή της παρούσας μελέτης, κ. Νικόλαο

Παπαδογεωργάκη, για όλη τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφερε. Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Αλεξανδρίδη για την υποστήριξη και καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής. Ευχαριστώ επίσης θερμά το τρίτο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Νικητάκη, για τη συνολική του υποστήριξη σε όλα τα στάδια της μελέτης. Στον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογοανατομίας, κ. Δημήτρη Βλαχοδημητρόπουλο, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για όλη τη βοήθειά του στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης που διεκπεραιώθηκε με την υλικοτεχνική υποδομή του εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών .

Τέλος στο συνάδελφο και φίλο κ. Δημήτριο Αυγουστίδη εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ και την ευγνωμοσύνη μου για την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία των ευρημάτων και την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της έρευνας αυτής.

ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή βασίζεται στην ακόλουθη δημοσιευμένη επιστημονική εργασία:

- Pappa Elena, Nikitakis Nikolaos, Vlachodimitropoulos Dimitrios, Avgoustidis Dimitrios, Okseloglou Vlassios, Papadogeorgakis Nikolaos. **Phosphorylated signal transducer and activator of transcription-1 immunohistochemical expression is associated with improved survival in patients with oral squamous cell carcinoma.**

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2014 Jan;72(1):211-221.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Επιδημιολογία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου

Ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου αποτελεί τον πιο συχνό τύπο κακοήθειας επιθηλιακής προέλευσης του ανώτερου αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος ⁽¹⁾. Περιλαμβάνει όγκους της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα. Σε σύγκριση με άλλες ανατομικές περιοχές ο καρκίνος κεφαλής και τραχήλου είναι ο έκτος πιο συχνός τύπος κακοήθειας σε παγκόσμιο επίπεδο με 900.000 νέες περιπτώσεις ετησίως, από τις οποίες οι 139.000 εμφανίζονται στην Ευρώπη, ενώ περίπου 350.000 άνθρωποι καταλήγουν από τη νόσο σε ετήσια βάση ^(2, 3). Ο καρκίνος της στοματικής κοιλότητας, αποτελεί μεγάλο μέρος των καρκίνων κεφαλής και τραχήλου, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων αυτών, περίπου 90%, είναι ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στόματος (ΑΚΣ) ⁽³⁾.

Μέχρι πρόσφατα, στους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες του ΑΚΣ συμπεριλαμβάνονταν το κάπνισμα και το αλκοόλ ^(4, 5). Την τελευταία δεκαετία όμως, συγκεκριμένοι τύποι του ιού του ανθρώπινου θηλώματος (Human Papilloma Viruses, HPVs) και κυρίως ο υπότυπος 16, έχουν αναδειχθεί σε πιθανούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, ιδίως σε νεότερες ηλικίες ^(6, 7). Επιπλέον, διάφορα ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς και πολυμορφισμοί γονιδίων έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση του στοματικού καρκίνου, μέσα από πολύπλοκους κυτταρικούς μηχανισμούς ⁽⁸⁾.

Παρά την πρόοδο που έχει συντελεστεί στις μεθόδους αντιμετώπισης, συμπεριλαμβανομένων τόσο της χειρουργικής, όσο και της ακτινοθεραπείας και της χημειοθεραπείας, αλλά και στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας του καρκίνου

αυτού, τα ποσοστά της πενταετούς επιβίωσης παραμένουν μη ικανοποιητικά και δεν ξεπερνούν το 61,5% για τους ασθενείς όλων των σταδίων ⁽⁹⁾.

Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την αναγκαιότητα περαιτέρω κατανόησης των μοριακών μηχανισμών της νόσου με στόχο την πρόληψη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της.

A.2. Ο ρόλος των ιών του ανθρώπινου θηλώματος (HPVs)

Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '80 ανευρέθηκαν ομοιότητες στα μορφολογικά χαρακτηριστικά βλαβών που σχετίζονται με την παρουσία ιών HPV, τόσο στο γεννητικό σωλήνα (τράχηλος μήτρας), όσο και στη στοματική κοιλότητα, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι οι ιοί HPV πιθανό να εμπλέκονται στη δημιουργία του πλακώδους καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα ^(10, 11).

Η αύξηση της επίπτωσης τόσο του καρκίνου της φαρυγγικής αμυγδαλής, όσο και της ρίζας της γλώσσας (τμήματος του στοματοφάρυγγα) έχει αποδοθεί στην αύξηση της συχνότητας της HPV λοίμωξης ^(12 - 14). Στη Σουηδία, αναφέρθηκε μεταβολή της συνολικής επίπτωσης του καρκίνου της ρίζας της γλώσσας από 0,15/100.000 άτομα το χρόνο κατά την περίοδο 1970 - 1974 σε 0,47/100.000 άτομα στο διάστημα 2005 - 2007, ενώ η παρουσία των ιών HPV σε καρκίνο της ρίζας της γλώσσας αυξήθηκε από 58% κατά την περίοδο 1998 - 2001 σε 84% την περίοδο 2004 - 2007 ($P < 0.05$) ⁽¹⁴⁾. Σύμφωνα με έρευνα του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των ΗΠΑ (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program - SEER) έχει παρατηρηθεί ετήσια αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου σε περιοχές του στόματος που μπορεί να παρουσιάζουν πιθανή εμπλοκή με HPV λοίμωξη, όπως η ρίζα της

γλώσσας, η αμυγδαλή και ο φάρυγγας, σε ποσοστό 0,8% για δεδομένα που αφορούν την περίοδο από το 1973 έως το 2004 ⁽¹³⁾.

Πιο πρόσφατα δεδομένα που στηρίζονται σε τυχαιοποιημένες μελέτες και μετα-αναλύσεις αποδεικνύουν ότι οι ιοί HPV αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του στόματος και του στοματοφάρυγγα σε νέα άτομα με χαμηλά ποσοστά κατανάλωσης καπνού και αλκοόλ ^(15 - 22). Ο στοματοφάρυγγας και ιδίως η φαρυγγική αμυγδαλή αποτελούν τις περιοχές εντόπισης πλακώδους καρκινώματος που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την παρουσία ιών HPV, σε ποσοστά που ανέρχονται ακόμα και στο 60%. Επιπλέον, συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας κατέδειξε την παρουσία του ιού HPV σε ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενών με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου σε ποσοστό 25,9% σε σύνολο 5.046 δειγμάτων από 60 ξεχωριστές μελέτες ⁽²²⁾. Ειδικότερα, η συχνότητα ανεύρεσης ιών HPV κυμάνθηκε στο 36% για τον καρκίνο του στοματοφάρυγγα, στο 23,5% για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας και στο 24% για τον καρκίνο του λάρυγγα. Ο HPV 16 ήταν ο υπότυπος του ιού με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δείγματα που ήταν θετικά για HPV και η παρουσία του ανήλθε στο 87% των θετικών για HPV δειγμάτων από την περιοχή του στοματοφάρυγγα, στο 68% από τη στοματική κοιλότητα και στο 69% από τον λάρυγγα ^(22, 23). Τελευταία επιστημονικά δεδομένα συνηγορούν στη συσχέτιση των ιών HPV και με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του γναθιαίου κόλπου. Η συνολική εντόπιση ογκογονικών τύπων HPV στο εν λόγω νεόπλασμα ανέρχεται στο 21,7% ⁽²²⁾.

Παρόλο όμως το μεγάλο αριθμό επιστημονικών μελετών, ο ρόλος των ιών HPV στην παθογένεια του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου, ιδίως όσον αφορά το ΑΚΣ παραμένει ακόμη και σήμερα αμφιλεγόμενος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η απόκλιση που παρουσιάζουν οι διάφορες μελέτες στην εντόπιση DNA

του ιού σε καρκινικές βλάβες είναι πολύ μεγάλη, με ποσοστά που μπορεί να κυμαίνονται από 0% έως 100% ^(23 - 32). Επιπλέον, ένα μεγάλο ποσοστό όγκων κεφαλής και τραχήλου θετικών για HPV είναι μεταφραστικά ανενεργοί για τους ιούς αυτούς ⁽¹⁶⁾.

Η παραπάνω μεγάλη απόκλιση στην ανίχνευση ιών HPV μπορεί να εξηγηθεί από διάφορους παράγοντες, όπως π.χ. από τις διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται (in situ υβριδοποίηση, Southern Blot, PCR), αλλά και από τα διαφορετικά είδη δειγμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί και στα οποία οι παραπάνω τεχνικές παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας στην ανίχνευση HPV DNA (υλικό βιοψιών, στοματικό επίχρισμα, σάλιο) ^(19, 29). Επιπλέον, τα ποσοστά ανίχνευσης HPV σε δείγματα ταχειών βιοψιών είναι συχνά υψηλότερα, συγκρινόμενα με εκείνα που προέρχονται από δείγματα σε φορμαλίνη. Ακόμη, τα δείγματα από επιχρίσματα της στοματικής κοιλότητας δεν θεωρούνται τα πλέον αξιόπιστα για τον εντοπισμό HPV σε καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου ^(29, 31).

Ακόμη και σήμερα, δεν υπάρχει ομοφωνία για το ποια είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος για ανίχνευση του HPV στους καρκίνους κεφαλής και τραχήλου. Οι δοκιμασίες ανίχνευσης του HPV βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση HPV DNA σε καρκινικούς ιστούς είτε με τη μέθοδο της PCR, είτε με τη μέθοδο της in situ υβριδοποίησης (ISH), είτε και με τις δύο μεθόδους. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 62 ανάλογων εργασιών η παρουσία HPV DNA στα 4.852 δείγματα βιοψιών που συγκεντρώθηκαν από καρκίνους κεφαλής και τραχήλου ανήλθε στο 34,5%, ενώ ειδικά για τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας το ποσοστό αυτό ήταν 38,1% ⁽³⁰⁾. Αναφορικά με τη μέθοδο ανίχνευσης, οι μελέτες που βασίστηκαν στην εφαρμογή της PCR ανέφεραν υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης HPV DNA σε σύγκριση με τις

μελέτες που χρησιμοποίησαν ISH (34,8% έναντι 32,9%, κυρίως στην υποομάδα του στοματικού καρκίνου) ⁽³⁰⁾.

Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία HPV DNA σε διάφορους όγκους της κεφαλής και του τραχήλου με παραμέτρους που υποδηλώνουν κακή πρόγνωση, όπως είναι η χαμηλή διαφοροποίηση του όγκου, η παρουσία θετικών λεμφαδένων και τα προχωρημένα στάδια της νόσου ^(19, 20, 33 - 35). Σε αντίθεση όμως με αυτές τις παρατηρήσεις, οι ασθενείς με καρκίνους κεφαλής και τραχήλου που εμφανίζονται θετικοί για HPV DNA ανταποκρίνονται πιο αποτελεσματικά στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία ^(32, 33). Επιπλέον, δεν αναπτύσσουν συχνά δεύτερες πρωτοπαθείς εστίες σε σύγκριση με τους όγκους που είναι αρνητικοί για HPV DNA ^(32, 33).

Πρόσφατη μετα-ανάλυση διερεύνησε τη συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία HPV DNA και στην πενταετή επιβίωση ασθενών με καρκίνους κεφαλής και τραχήλου, καθώς και στο χρονικό διάστημα επιβίωσης κατά το οποίο οι ασθενείς παρέμειναν ελεύθεροι νόσου ⁽³⁶⁾. Τα αποτελέσματα από την εργασία αυτή έδειξαν ότι δεν υπήρξε διαφορά στα ποσοστά ολικής επιβίωσης ανάμεσα στους ασθενείς που ήταν θετικοί για παρουσία HPV DNA, συγκριτικά με αυτούς στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε HPV DNA σε οποιαδήποτε θέση καρκίνου πλην του στοματοφάρυγγα ⁽³⁶⁾. Ειδικά δε, οι HPV DNA θετικοί ασθενείς με όγκους του στοματοφάρυγγα εμφάνιζαν κατά 28% μειωμένο κίνδυνο θανάτου ⁽³⁶⁾. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για το χρονικό διάστημα επιβίωσης κατά το οποίο οι ασθενείς παρέμειναν ελεύθεροι νόσου ⁽³⁶⁾.

Συμπερασματικά, οι καρκίνοι της κεφαλής και του τραχήλου στους οποίους ανιχνεύεται HPV DNA αποτελούν ιδιαίτερη βιολογική οντότητα. Αναφορικά με τον καρκίνο του στοματοφάρυγγα, ο HPV παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση με βλάβες που

αφορούν την αμυγδαλή. Επιπλέον, η λοίμωξη με HPV έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί επακριβώς το βιολογικό υπόβαθρο αυτής της παρατήρησης.

A.3. Σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος με το σύστημα TNM

Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Κεφαλής & Τραχήλου (American Head & Neck Society), ο καρκίνος του στόματος περιλαμβάνει συγκεκριμένες ανατομικές δομές της στοματικής κοιλότητας που παρουσιάζονται στον **Πίνακα A.1**. Παράλληλα, η **Εικόνα A.1** περιέχει τις θέσεις της στοματικής κοιλότητας που επισκοπούνται σε μία τυπική κλινική εξέταση.

Πίνακας A.1 Οι ανατομικές δομές που περιλαμβάνονται στον καρκίνο του στόματος ⁽³⁷⁾.

Χείλη

Ερυθρό κράσπεδο άνω και κάτω χείλους

Συγχειλίες

Στοματική κοιλότητα

Βλεννογόνοι:

- άνω και κάτω χείλους,
- παρειάς,
- οπισθογόμφιων περιοχών,
- αυλάκων (ουλοχειλικές, ουλοπαρειακές, ουλογλωσσικές).

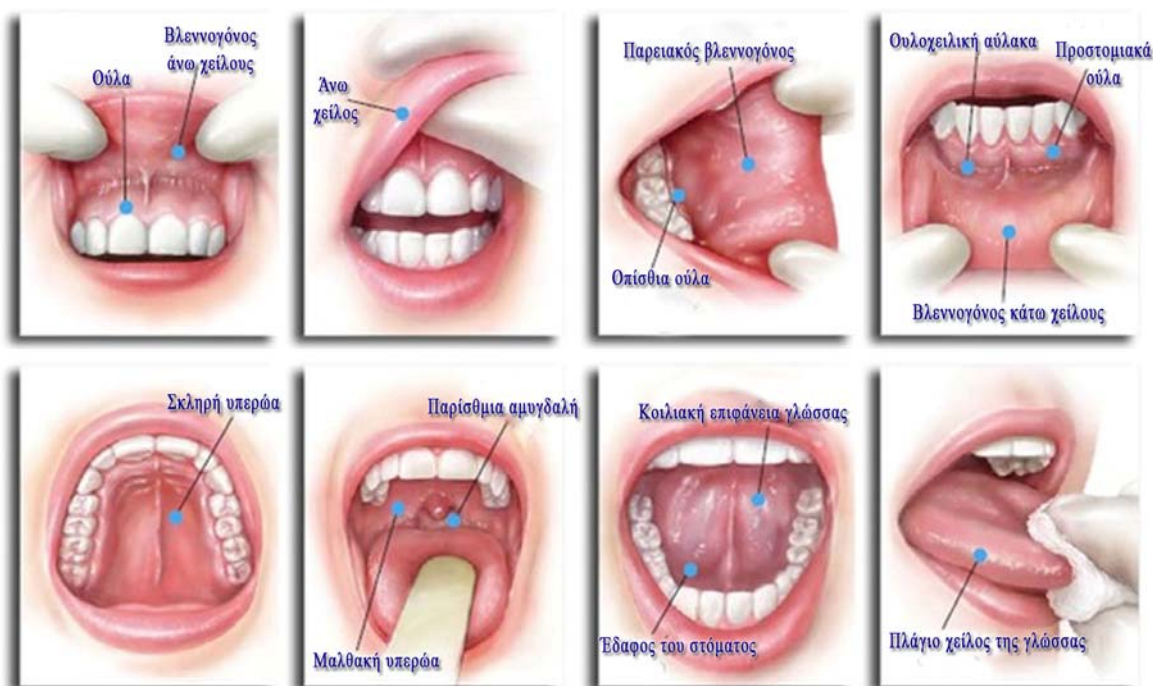
Φατνιακό οστόν της άνω και κάτω γνάθου – ούλα

Σκληρή υπερώα

Γλώσσα:

- Πρόσθια 2/3 της γλώσσας (ραχιαία επιφάνεια και πλάγια χείλη της γλώσσας μέχρι το ύψος των περιχαρακωμένων θηλών).
- Κοιλιακή επιφάνεια της γλώσσας.

Έδαφος του στόματος



Εικόνα Α.1 Σχηματική απεικόνιση των ανατομικών δομών της στοματικής κοιλότητας που ελέγχονται κατά την κλινική εξέταση.

Μετά το πέρας της κλινικής εξέτασης και τη διενέργεια μίας σειράς παρακλινικών εξετάσεων στις οποίες περιλαμβάνονται η βιοψία της βλάβης και η παθολογοανατομική εξέταση, το υπερηχογράφημα, η υπολογιστική τομογραφία κεφαλής και τραχήλου, η μαγνητική τομογραφία, το PET-SCAN κ.ά., πραγματοποιείται η *κλινική σταδιοποίηση* του καρκίνου του στόματος⁽³⁸⁾.

Η κλινική σταδιοποίηση της νόσου είναι μείζονος σημασίας, καθότι όχι μόνο καθορίζει το σχέδιο θεραπείας σε μεγάλο βαθμό, αλλά καθιστά δυνατή την αρχική πρόγνωση⁽³⁹⁾. Μετά τη διενέργεια της χειρουργικής επέμβασης ακολουθεί αναλυτική παθολογοανατομική εξέταση του παρασκευάσματος (και των λεμφαδένων του τραχήλου) και η σταδιοποίηση επανακαθορίζεται με βάση το πόρισμα της παθολογοανατομικής έκθεσης (παθολογοανατομική σταδιοποίηση)⁽³⁸⁾.

Το σύστημα που χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα για τη σταδιοποίηση των κακοήθων όγκων είναι το σύστημα **TNM** (Tumor, Node, Metastasis)^(40, 41). Το

σύστημα αυτό έχει αναπτυχθεί από τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (Union International Against Cancer, UICC) και χρησιμοποιείται μόνο για συμπαγείς όγκους^(40, 41). Από το 1987 η Αμερικάνικη Μικτή Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) ενσωμάτωσε και το δικό της σύστημα σταδιοποίησης στο σύστημα TNM^(40, 41). Η παρούσα έκδοση είναι η 7^η, η οποία εκδόθηκε για πρώτη φορά το **2009**^(40, 41).

Στο σύστημα αυτό αξιολογούνται τρεις παράμετροι:

- α.** το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας (**T**),
- β.** η παρουσία ή απουσία, αλλά και η έκταση των περιοχικών λεμφαδενικών μεταστάσεων (**N**) και τέλος,
- γ.** η παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (**M**). Οι πνεύμονες αποτελούν τη συχνότερη θέση χορήγησης απομακρυσμένων μεταστάσεων, ακολουθούμενη από τα οστά, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η παρουσία λεμφαδενικής μετάστασης στο μεσοθωράκιο χαρακτηρίζεται ως απομακρυσμένη μετάσταση, εκτός εάν αφορά το επίπεδο VII⁽⁴¹⁾.

Η χορήγηση μεταστάσεων στους περιοχικούς (τραχηλικούς) λεμφαδένες αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα στους ασθενείς με καρκίνους κεφαλής και τραχήλου, επιβαρύνοντας την πρόγνωση της νόσου, ειδικά εάν αυτή εμφανίζεται με τη μορφή της εξωκαψικής λεμφαδενικής επέκτασης^(39, 42).

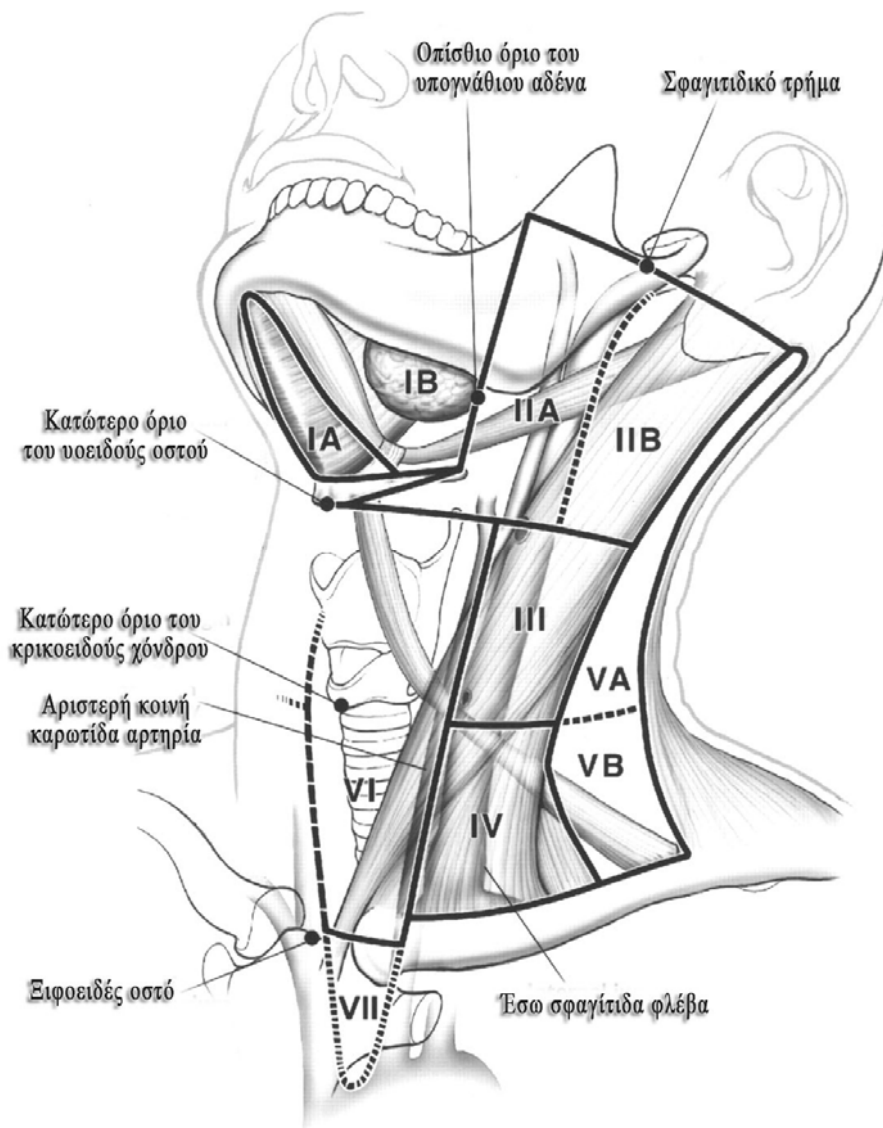
Σε γενικές γραμμές, η οδός χορήγησης μεταστάσεων στους λεμφαδένες της κεφαλής και του τραχήλου από την πρωτοπαθή καρκινική εστία της στοματικής κοιλότητας είναι προβλεπόμενη και ακολουθεί συγκεκριμένη σειρά: Οι μεταστάσεις χορηγούνται αρχικά στους άνω, κατόπιν στους μέσους και τελικά στους κατώτερους τραχηλικούς λεμφαδένες^(39, 41). Ωστόσο πολλές φορές όταν η νόσος εντοπίζεται στο

πρόσθιο τμήμα της στοματικής κοιλότητας μπορεί να εξαπλωθεί απευθείας στους λεμφαδένες του μέσου τριτημορίου του τραχήλου ^(39, 41).

Οι τραχηλικοί λεμφαδένες χωρίζονται σε 7 επίπεδα με βάση διακριτά ανατομικά στοιχεία, όπως αναγράφεται αναλυτικά στον **Πίνακα Α.2** και αποδίδεται σχηματικά στην **Εικόνα Α.2**.

Πίνακας Α.2 Τα επίπεδα των λεμφαδένων του τραχήλου ⁽⁴³⁾.

Επίπεδο	Θέσεις λεμφαδένων
I	Λεμφαδένες που βρίσκονται άνωθεν του υοειδούς οστού, κάτω από τον μυλοϋοειδή μυ και έμπροσθεν του οπισθίου χείλους του υπογνάθιου αδένα. Υποδιαιρείται στα επίπεδα: ΙΑ: Υπογενεΐδιο τρίγωνο. ΙΒ: Υπογνάθιο τρίγωνο.
II	Λεμφαδένες στο ανώτερο τριτημόριο της έσω σφαγίτιδας φλέβας, εκτεινόμενοι από το επίπεδο της βάσης του κρανίου έως το υοειδές οστόν. Υποδιαιρείται στα επίπεδα: IIΑ: λεμφαδένες έμπροσθεν, όπισθεν, επί τα εκτός ή εντός της έσω σφαγίτιδας φλέβας, σε άμεση επαφή με αυτή, IIΒ: λεμφαδένες πίσω από την έσω σφαγίτιδα φλέβα, οι οποίοι όμως διαχωρίζονται από αυτή με στρώμα λιπώδους ιστού.
III	Λεμφαδένες στο μέσο τριτημόριο της έσω σφαγίτιδας φλέβας, εκτεινόμενοι από το κατώτερο όριο του υοειδούς οστού έως το κατώτερο όριο του κρικοειδούς χόνδρου.
IV	Λεμφαδένες στο κατώτερο τριτημόριο της έσω σφαγίτιδας φλέβας, εκτεινόμενη από το κατώτερο όριο του κρικοειδούς χόνδρου έως το ύψος της κλείδας.
V	Λεμφαδένες εντός του οπίσθιου τραχηλικού τριγώνου (αφορίζεται από το οπίσθιο χείλος του στερνοκλειδομαστοειδούς μυός, το πρόσθιο χείλος του τραπεζοειδή μυ και την κλείδα). Υποδιαιρείται στα επίπεδα: VA: λεμφαδένες μεταξύ της βάσης του κρανίου και του κρικοειδούς χόνδρου, πίσω από το οπίσθιο χείλος του στερνοκλειδομαστοειδή μυ. VB: λεμφαδένες ανάμεσα στον κρικοειδή χόνδρο και στην κλείδα, πίσω από το οπίσθιο χείλος του στερνοκλειδομαστοειδή μυ.
VI	Λεμφαδένες που εντοπίζονται στο πρόσθιο κεντρικό τμήμα του τραχήλου, εκτεινόμενοι από το υοειδές οστόν, έως την ξιφοειδή απόφυση.
VII	Λεμφαδένες που βρίσκονται κάτω από τη ξιφοειδή απόφυση, εντός του ανώτερου τμήματος του μεσοθωρακίου, ανάμεσα στις δύο κοινές καρωτίδες αρτηρίες με επέκταση προς τα κάτω ως το ύψος της ανώνυμου φλέβας.



Εικόνα Α.2.

Σχηματική απόδοση των επιπέδων των λεμφαδένων του τραχήλου (Προσαρμογή από Shah και συν. 2012) ⁽⁴³⁾.

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος με βάση το σύστημα TNM 7 παρουσιάζεται αντίστοιχα στους **Πίνακες Α.3** και **Α.4**.

Πίνακας Α.3 Οι τιμές των παραμέτρων του συστήματος TNM 7 για τον καρκίνο του στόματος ⁽⁴¹⁾.

T: Tumour / Πρωτοπαθής καρκινική εστία

Tx	Δεν έχει πραγματοποιηθεί εκτίμηση της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας.
T0	Η ύπαρξη όγκου δεν τεκμηριώνεται.
Tis	Καρκίνωμα in Situ.
T1	Όγκος με μέγιστη διάμετρο έως 2cm.
T2	Όγκος με μέγιστη διάμετρο $\geq 2 - 4$ cm.
T3	Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 4 cm.
T4	
T4a	Ο όγκος διηθεί τους ετερόχθονες μύες της γλώσσας (γενειογλωσσικός, υογλωσσικός, βελονογλωσσικός, γλωσσουπερώϊος), το δέρμα του προσώπου, το γναθιαίο κόλπο, το φλοιώδες πέταλο της γνάθου.
T4b	Ο όγκος επεκτείνεται στον υπομασητήριο χώρο, στα πέταλα της πτερυγοειδούς απόφυσης του σφηνοειδούς οστού ή στη βάση του κρανίου ή/και διηθεί την έσω κωτιίδα.

N: Nodes / Λεμφαδένες

Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν έχουν αξιολογηθεί.
N0	Χωρίς μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες.
N1	Μετάσταση σε μονήρη λεμφαδένα, ομόπλευρα με τον όγκο, μέγιστης διαμέτρου έως 3cm.
N2	
N2a	Μετάσταση σε μονήρη λεμφαδένα, ομόπλευρα με τον όγκο, μέγιστης διαμέτρου > 3 cm–6cm.
N2b	Μετάσταση σε πολλαπλούς λεμφαδένες, ομόπλευρα ως προς την αρχική εστία, χωρίς όμως κάποιος να έχει μέγιστη διάμετρο > 6 cm.
N2c	Μετάσταση σε πολλαπλούς λεμφαδένες, αμφίπλευρα ή ετερόπλευρα ως προς την αρχική εστία, χωρίς όμως κάποιος να εμφανίζει μέγιστη διάμετρο > 6 cm.

N3	Μετάσταση σε λεμφαδένα με μέγεθος > 6cm ως προς τη μεγαλύτερή του διάμετρο.
-----------	---

M: Metastasis / Απομακρυσμένες Μεταστάσεις

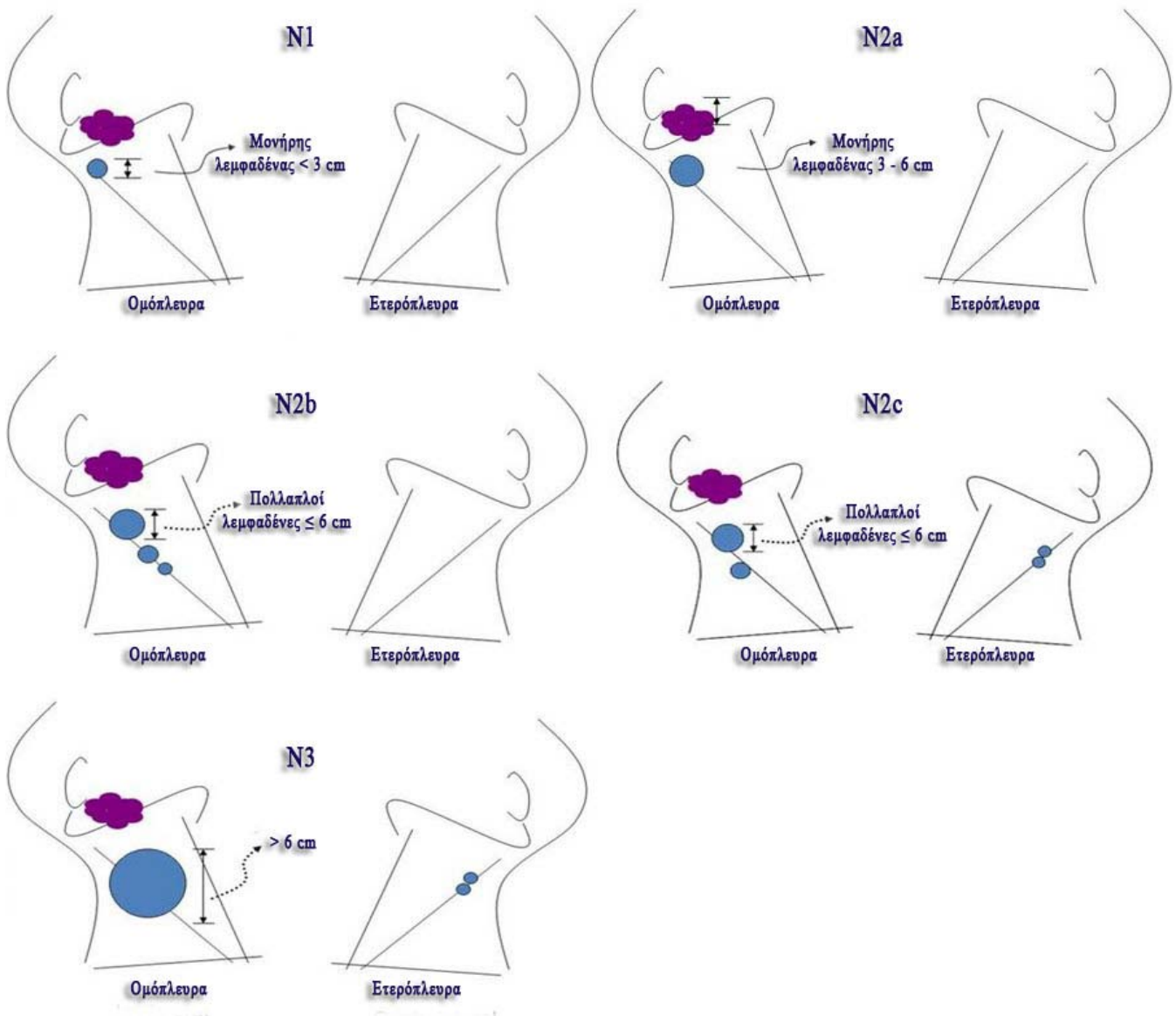
Mx	Η παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης δεν είναι δυνατό να αξιολογηθεί.
M0	Καμία απομακρυσμένη μετάσταση.
M1	Ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης.

- Σημ:**
- α) Με τον όρο «επιχώριοι λεμφαδένες» γίνεται αναφορά στους τραχηλικούς λεμφαδένες.
 - β) Η μετάσταση σε λεμφαδένες της μέσης γραμμής θεωρείται ως ομόπλευρη μετάσταση.
 - γ) Η διήθηση της επιφάνειας της φατνιακής ακρολοφίας ή του φατνίου των δοντιών από πρωτοπαθή όγκο των υπερκείμενων ούλων δεν είναι επαρκής για να χαρακτηριστεί ο όγκος ως T4.

Πίνακας Α.4 Σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος με το σύστημα TNM 7 ⁽⁴¹⁾.

Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο II	T2	N0	M0
Στάδιο III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
Στάδιο IVA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
Στάδιο IVB	Οποιοδήποτε T	N3	M0
	T4b	Οποιοδήποτε N	M0
Στάδιο IVC	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Η **Εικόνα Α.3** παρουσιάζει σχηματικά την ταξινόμηση των μεταστάσεων στους τραχηλικούς λεμφαδένες με βάση το σύστημα TNM 7.



Εικόνα Α.3

Σχηματική απεικόνιση της ταξινόμησης των μεταστάσεων του καρκίνου του στόματος στους τραχηλικούς λεμφαδένες με βάση το σύστημα TNM 7 ⁽⁴¹⁾.

Ο κίνδυνος εμφάνισης μεταστάσεων στους λεμφαδένες καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας και από άλλους παράγοντες, οι οποίοι θα αναλυθούν στη συνέχεια, οι οποίοι όμως δεν λαμβάνονται υπόψη στο σύστημα TNM ⁽⁴¹⁾. Γενικά, ο κίνδυνος αυτός είναι μικρότερος για τον καρκίνο του χείλους και οι μεταστάσεις, όταν χορηγούνται, εμφανίζονται αρχικά στους υπογενειδίου και υπογνάθιους λεμφαδένες και ακολούθως στους σφαγιτιδικούς λεμφαδένες ⁽⁴¹⁾. Όγκοι που εξορμούνται από τη σκληρά υπερώα και τη φατνιακή απόφυση εμφανίζουν επίσης μικρό κίνδυνο χορήγησης μεταστάσεων που περιλαμβάνουν τους παρειακούς, τους υπογνάθιους, τους σφαγιτιδικούς και περιστασιακά τους οπίσθιους φαρυγγικούς λεμφαδένες ⁽⁴¹⁾. Τέλος, όσο πιο κοντά βρίσκεται η πρωτοπαθής εστία στη μέση γραμμή, τόσο περισσότερο αυξάνει ο κίνδυνος χορήγησης μεταστάσεων αμφοτερόπλευρα στους λεμφαδένες του τραχήλου. Αμφοτερόπλευρες μεταστάσεις χορηγούν συχνότερα και οι όγκοι από το πρόσθιο τριτημόριο της γλώσσας ή τη μαλθακή υπερώα ⁽⁴¹⁾.

A.4.Αξιολόγηση του συστήματος TNM

Διάφοροι παράγοντες που δε λαμβάνονται υπόψη στο σύστημα TNM και που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μεταστάσεων στους λεμφαδένες του τραχήλου σε περιπτώσεις ΑΚΣ είναι ⁽³⁹⁾:

- 1. Η ύπαρξη περινευρικής διήθησης,*
- 2. Η εμφάνιση λεμφαγγειακής διήθησης,*
- 3. Ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου και*
- 4. Το βάθος διήθησης του όγκου.*

Η τελευταία παράμετρος προσδιορίζεται από το μεγαλύτερο βάθος διήθησης του όγκου σε μία ανατομική δομή, έως την αρχική επιφάνειά της, χωρίς δηλαδή να λαμβάνεται υπόψη το εξωφυτικό σκέλος της βλάβης. Ειδικά δε για το

ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας, βάθος διήθησης ίσο ή μεγαλύτερο από 5mm έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μεταστάσεων στους τραχηλικούς λεμφαδένες, η οποία ανέρχεται σε ποσοστό 65% των περιπτώσεων ⁽⁴⁴⁾.

Ο κίνδυνος διήθησης σχετίζεται με την παράμετρο **T** του συστήματος TNM και επιπλέον με τη θέση εμφάνισης της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας ⁽⁴¹⁾. **Σε περιπτώσεις που δεν έχει πραγματοποιηθεί ακτινοβολήση της περιοχής**, ο τρόπος εξάπλωσης του όγκου επηρεάζεται από τις ανατομικές δομές ⁽⁴¹⁾: Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του χείλους εξαπλώνεται αρχικά επιφανειακά και αργότερα εις βάθος. Τον ίδιο τρόπο εξάπλωσης ακολουθεί και η καρκινική εστία στο έδαφος του στόματος και μόνο σε αψώτερο στάδιο είναι δυνατό να διηθήσει το γναθοϋοειδή μυ ή τον υπογλώσσιο αδένα. Αντίθετα, ο καρκίνος του πλάγιου χείλους της γλώσσας εμφανίζει την τάση να διηθεί σε βάθος τους αυτόχθονες μύες της γλώσσας. Οι όγκοι της υπερώας εξαπλώνονται επίσης επιφανειακά και σπάνια σε βάθος, όπως άλλωστε και οι όγκοι του στοματοφάρυγγα ⁽⁴¹⁾.

Το ΑΚΣ είναι δυνατό να εξαπλωθεί προς τα οστά των γνάθων. Η εξάπλωση αυτή σε ενόδοντες γίνεται μέσω του περιοδοντικού συνδέσμου, ενώ σε νωδούς ασθενείς απευθείας από τη φατνιακή ακρολοφία προς τους μυελικούς χώρους, ανάμεσα από τις οστικές δοκίδες του σπογγώδους οστού των γνάθων ⁽⁴¹⁾. Αυτό συμβαίνει λόγω της απορρόφησης της νωδής φατνιακής ακρολοφίας, οπότε επέρχεται λέπτυνση του φλοιώδους πετάλου της γνάθου ⁽⁴¹⁾. Ακολούθως και ειδικά για την κάτω γνάθο, ο όγκος μπορεί να εξαπλωθεί κατά μήκος του κάτω φατνιακού νεύρου ⁽⁴¹⁾.

Σε περιπτώσεις στις οποίες έχει προηγηθεί ακτινοβολήση της περιοχής, η εξάπλωση του όγκου δεν ακολουθεί προβλεπόμενη πορεία, ενώ παρουσιάζει και μεγαλύτερη επέκταση στον ίδιο χρόνο ⁽⁴¹⁾.

Ο κίνδυνος απομακρυσμένων μεταστάσεων εξαρτάται κυρίως από την τιμή της παραμέτρου **N** παρά από την παράμετρο **T** του συστήματος TNM ⁽⁴¹⁾. Οι επιχώριοι λεμφαδένες θα πρέπει πάντα να περιγράφονται και ως προς το επίπεδο του τραχήλου στο οποίο ανήκουν ⁽⁴¹⁾. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το επίπεδο των εμπλεκόμενων λεμφαδένων στον τράχηλο αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του στόματος (το χαμηλότερο επίπεδο σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και αυξημένο κίνδυνο χορήγησης απομακρυσμένων μεταστάσεων, δεδομένο που δεν αξιολογείται στο σύστημα ταξινόμησης TNM) ⁽³⁹⁾. Αντίστοιχης σημασίας είναι και η παρουσία εξωκαψικής επέκτασης της χορηγηθείσας μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες (επιπρόσθετη σημαντική παράμετρος που δυστυχώς δεν αξιολογείται κατά τη σταδιοποίηση στο σύστημα TNM) ⁽³⁹⁾. Στις διάφορες απεικονιστικές τεχνικές, όταν εμφανίζονται λεμφαδένες με ακανόνιστα όρια ή σημειώνεται απώλεια του φυσιολογικού ωοειδούς λεμφαδενικού περιγράμματος, τότε η εξωκαψική (εξωλεμφαδενική) επέκταση του όγκου πρέπει να θεωρείται δεδομένη ⁽³⁹⁾. Σε μία τέτοια περίπτωση, οι μεταστάσεις είναι δυνατό να επινέμονται και το περιλεμφικό λίπος ⁽³⁹⁾. Βέβαια, πάντα η παθολογοανατομική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος είναι αυτή που θα τεκμηριώσει την τελική έκταση της νόσου ⁽³⁸⁾.

A.5. Συστήματα για τον προσδιορισμό της διαφοροποίησης του ΑΚΣ συμπληρωματικά ως προς το TNM

Το σύστημα TNM για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του στόματος, το οποίο βασίζεται κυρίως σε κλινικά δεδομένα, δεν είναι επαρκές από μόνο του για την εξασφάλιση της βέλτιστης πρόγνωσης της νόσου ⁽⁴⁵⁾. Επομένως, θα πρέπει να ακολουθείται συμπληρωματικά και από άλλα συστήματα με τα οποία

πραγματοποιείται διαβάθμιση της διαφοροποίησης της νόσου, βάσει συγκεκριμένων ιστολογικών παραμέτρων ⁽⁴⁵⁾.

Το σύστημα που εφαρμόζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας για το ΑΚΣ, σύστημα Broders, περιλαμβάνει συγκεκριμένες διαβαθμίσεις της διαφοροποίησής του όγκου, στηριζόμενο στην ιστολογική διαφοροποίηση των κυττάρων του ⁽⁴⁵⁾. Οι διαβαθμίσεις αυτές δίδονται στον **Πίνακα Α.5**.

Πίνακας Α.5 Το σύστημα της ιστολογικής διαφοροποίησης των όγκων κατά Broders.

Διαβάθμιση	% αδιαφοροποίητων κυττάρων	Χαρακτηρισμός
Gx	-	Αδυναμία εκτίμησης της διαφοροποίησης του όγκου
G1	<25%	Όγκος καλής διαφοροποίησης
G2	<50%	Όγκος μέτριας διαφοροποίησης
G3	< 75%	Όγκος χαμηλής διαφοροποίησης
G4	> 75%	Αδιαφοροποίητος / Αναπλαστικός όγκος

Με το σύστημα Broders, ήδη από το 1920 έγινε η πρώτη προσπάθεια να προβλεφθεί η βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου του στόματος μέσα από τον χαρακτηρισμό των όγκων αυτών ως καλής, μέτριας ή χαμηλής διαφοροποίησης ⁽⁴⁶⁾. Ωστόσο, στην πορεία εφαρμογής του συστήματος δεν έγινε εφικτή η ανεύρεση συσχέτισης ανάμεσα στις παραπάνω διαβαθμίσεις και στην πρόγνωση της νόσου, δεδομένου ότι τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα απαρτίζονται από ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό με πιθανές διαφορές στην ικανότητα διήθησης και στο μεταστατικό τους δυναμικό ⁽⁴⁶⁾. Για το λόγο αυτό το σύστημα Broders, αν και αποτελεί παραδοσιακό παθολογοανατομικό εργαλείο έχει περιορισμένη μόνο χρησιμότητα στην κατάρτιση του σχεδίου θεραπείας και την πρόγνωση της πορείας της νόσου ^(45, 47).

Οι Anneroth και συν. (1987) πρότειναν ένα νέο σύστημα προσδιορισμού της διαφοροποίησης του ΑΚΣ στηριζόμενο σε 6 παραμέτρους, οι οποίες περιλαμβάνουν: **α.** το βαθμό κερατινοποίησης των κυττάρων του όγκου, **β.** τον πλειομορφισμό των πυρήνων τους, **γ.** τον αριθμό των μιτώσεων, **δ.** τον τρόπο διήθησης, **ε.** το στάδιο της διήθησης και **στ.** την παρουσία ή μη λεμφοπλασματοκυττάρων ⁽⁴⁶⁾. Στο σύστημα αυτό, κάθε μία από τις προαναφερθείσες παραμέτρους λαμβάνει έναν αριθμό μονάδων (από 1 έως 4) με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ⁽⁴⁶⁾. Το άθροισμα των μονάδων όλων των παραμέτρων χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση του ΑΚΣ σε 4 βαθμίδες, όπως φαίνεται στον **Πίνακα Α.5**. Οι παράμετροι του συστήματος και ο τρόπος αξιολόγησής τους δίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα Α.6**.

Πίνακας Α.5 Διαβάθμιση της διαφοροποίησης του ΑΚΣ σύμφωνα με το σύστημα Anneroth ⁽⁴⁶⁾.

Διαβάθμιση	Σύνολο Μονάδων
G – I	5 – 10
G – II	11 – 15
G – III	16 – 20
G – IV	20+

Πίνακας Α.6 Οι παράμετροι του συστήματος ιστολογικής διαφοροποίησης του ΑΚΣ κατά Anneroth ⁽⁴⁶⁾.

Μορφολογικές παράμετροι	ΜΟΝΑΔΕΣ			
	1	2	3	4
Βαθμός κερατινοποίησης	Υψηλός (>50% των κυττάρων του όγκου εμφανίζουν κερατινοποίηση)	Μέτριος (20 – 50% των κυττάρων του όγκου εμφανίζουν κερατινοποίηση)	Χαμηλός (5 – 20% των κυττάρων του όγκου εμφανίζουν κερατινοποίηση)	Απουσία κερατινοποίησης (0 – 5% των κυττάρων του όγκου εμφανίζουν κερατινοποίηση)
Πλειομορφισμός κυτταρικών πυρήνων	Μικρός (παρουσία ώριμων κυττάρων: >75%)	Μέτριος (παρουσία ώριμων κυττάρων: 50 – 75%)	Αφθονος (παρουσία ώριμων κυττάρων: 25 – 50%)	Εκτεταμένος (παρουσία ώριμων κυττάρων: 0 – 25%)
Αριθμός mitώσεων (σε οπτικό πεδίο υψηλής μεγέθυνσης)	0 – 1	2 – 3	4 – 5	> 5
Τρόπος διήθησης	Απώθηση , όρια διήθησης καλά περιγεγραμμένα	Διήθηση , συμπαγείς χορδές, ζώνες και/η νημάτια	Μικρές ομάδες ή χορδές διηθητικών κυττάρων	Εκσεσημασμένη και ευρέως εκτεταμένη κυτταρική διασπορά (σε μικρές ομάδες κυττάρων και/η μεμονωμένα κύτταρα)
Στάδιο διήθησης	Καρκίνωμα insitu και/η αμφισβητήσιμη διήθηση	Διακριτή διήθηση , η οποία αφορά όμως μόνο τη βασική μεμβράνη	Η διήθηση βρίσκεται κάτω από τη βασική μεμβράνη κοντά στο μυϊκό ιστό, στους σιελογόνους αδένες και στο περιόστεο	Εκτεταμένη και σε βάθος διήθηση , η οποία έχει αντικαταστήσει το μεγαλύτερο μέρος του υποκείμενου ιστού, διηθώντας και το οστό της γνάθου
Παρουσία λεμφοπλασματοκυττάρων	Εκσεσημασμένη	Μέτρια	Μικρή	Καμία

Το σύστημα Anneroth είναι εύκολο να εφαρμοστεί από τον παθολογοανατόμο, βασίζει τη διαφοροποίηση του όγκου σε πολλαπλές και με σαφή κριτήρια καθορισμένες παραμέτρους και μπορεί να συσχετιστεί με τη πρόγνωση της νόσου, αλλά και να καθοδηγήσει τον χειρουργό στο σχέδιο θεραπείας, πλεονεκτώντας συγκριτικά με το σύστημα Broders ^(43, 45).

Άλλοι παράγοντες που πιθανό να αποτελέσουν επικουρικές παραμέτρους για την πρόγνωση του ΑΚΣ σε διάφορα συστήματα και οι οποίες είναι δυνατό να προσδιοριστούν μέσα από την παθολογοανατομική εξέταση και την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών και μοριακών μεθόδων, όπως είναι ο μιτωτικός δείκτης (mitotic index), το περιεχόμενο του DNA (DNA content), η έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67 και της PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen, πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων), καθώς και ο δείκτης ενσωμάτωσης της βρωμοδεοξυουριδίνης στο DNA (bromodeoxyuridine labeling index) έχουν ερευνητικό ενδιαφέρον και δεν έχουν ακόμα εφαρμοστεί στην κλινική πράξη ⁽⁴⁵⁾.

Β. Η ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΕΦΑΛΗΣ & ΤΡΑΧΗΛΟΥ

Η αντιμετώπιση του ακανθοκυτταρικού καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου συνίσταται σε:

1. *χειρουργική αφαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας σε συνδυασμό με τραχηλικό λεμφαδενικό καθαρισμό ανά περίπτωση,*
2. *σε ακτινοθεραπεία,*
3. *σε χημειοθεραπεία και σε*
4. *νεότερες θεραπείες που περιλαμβάνουν εμβόλια και μοριακή θεραπεία⁽³⁸⁾.*

Η απόφαση για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας ή για συνδυασμό αυτών βασίζεται σε διάφορους παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται: **α.** το στάδιο του όγκου, **β.** η ανατομική του θέση, **γ.** η ηλικία του ασθενούς, **δ.** η επιθυμία του ασθενούς για διατήρηση λειτουργικότητας οργάνων – καλύτερη ποιότητα ζωής και **ε.** η ύπαρξη και άλλων νοσημάτων που πιθανό να απαγορεύουν συγκεκριμένες θεραπευτικές πρακτικές⁽³⁸⁾.

Για πρακτικούς λόγους το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της κεφαλής και του τραχήλου χωρίζεται σε τρία κλινικά στάδια:

1. **Αρχόμενη νόσος** (στάδια I και II κατά TNM),
2. **Τοπικά προχωρημένη νόσος** (στάδια III, IVA ή IVB κατά TNM),
3. **Μεταστατική νόσος** (στάδιο IVC κατά TNM) ή **υποτροπή της νόσου**⁽⁴¹⁾.

Αναφορικά με την παραπάνω ταξινόμηση, η θεραπεία που ακολουθείται ανά περίπτωση είναι η εξής:

- **Αρχόμενη νόσος** (αφορά το 40% των περιπτώσεων με όγκους κεφαλής και τραχήλου) και αντιμετωπίζεται είτε μόνο με χειρουργική επέμβαση ή μόνο με

ακτινοθεραπεία ⁽⁴⁸⁾. Όταν ο πρωτοπαθής όγκος αντιμετωπίζεται με ακτινοθεραπεία, τότε στο πεδίο της ακτινοθεραπείας θα πρέπει να περιλαμβάνονται και οι επιχώριοι λεμφαδένες ⁽⁴⁸⁾.

- **Σε τοπικά προχωρημένη νόσο** (αφορά το υπόλοιπο 60% των περιπτώσεων με όγκους κεφαλής και τραχήλου), εφόσον είναι δυνατή η αφαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας, τότε πραγματοποιείται χειρουργική θεραπεία που ακολουθείται από συμπληρωματική ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία, ανάλογα με την ύπαρξη παραγόντων υψηλού κινδύνου από την παθολογοανατομική εξέταση του όγκου, όπως είναι: *τα διηθημένα όρια εκτομής, η εξωκαψική επέκταση σε περίπτωση λεμφαδενικής μετάστασης και η παρουσία 2 ή περισσότερων θετικών λεμφαδένων του τραχήλου* ⁽⁴⁹⁾. Εάν δεν είναι δυνατή η χειρουργική επέμβαση, τότε συνήθως πραγματοποιείται ριζική χημειοακτινοθεραπεία ⁽⁵⁰⁾. Άλλη επιλογή αποτελεί η διενέργεια εισαγωγικής χημειοθεραπείας αρχικά, η οποία ακολουθείται είτε από ακτινοθεραπεία της περιοχής, είτε από χημειοακτινοθεραπεία, είτε από ριζική χειρουργική επέμβαση ^(51, 52). Η εισαγωγική χημειοθεραπεία μπορεί να οδηγήσει στην ελάττωση του μεγέθους του όγκου και στην εξάλειψη των λεμφαδενικών μεταστάσεων, μειώνοντας το στάδιο της νόσου και καθιστώντας πιθανή τη διενέργεια χειρουργικής επέμβασης ⁽⁵²⁾.
- **Σε μεταστατική νόσο**, όπου ο ασθενής δεν δύναται να χειρουργηθεί, υποβάλλεται σε **παρηγορητική** ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία ή συνδυασμό αυτών ⁽⁴³⁾.
- **Σε περιπτώσεις υποτροπής μετά από ακτινοθεραπεία**, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά η ακτινοθεραπεία ως θεραπεία διάσωσης ⁽⁵³⁾.

B.1. Η χειρουργική του καρκίνου του στόματος

Η χειρουργική του καρκίνου του στόματος έχει τρεις κατευθύνσεις: **1.** την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς εστίας ή την υποτροπή αυτής, **2.** την αντιμετώπιση πιθανών ή τεκμηριωμένων τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων και **3.** την αποκατάσταση των ελλειμμάτων και της λειτουργικότητας των ιστών της στοματογναθοπροσωπικής χώρας μετά την εκτομή της πρωτοπαθούς εστίας ^(38, 43).

Αναφορικά με τη χειρουργική της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας, ιδιαίτερης σημασίας για τον έλεγχο της νόσου είναι η πλήρης και σε υγιή όρια εξαίρεση της βλάβης, γεγονός που διαπιστώνεται με ταχείες βιοψίες διεγχειρητικά. Ανάλογα με το μέγεθος της βλάβης και την εντόπισή της, οι προσπελάσεις για την αφαίρεσή της είναι οι εξής: **α.** Ενδοστοματική προσπέλαση, **β.** Μέσω τραχηλικής τομής με διαχωρισμό του κάτω χείλους και / ή χωρίς οστεοτομία της κάτω γνάθου, **γ.** Μέσω της τεχνικής Visor (εγκάρσια τραχηλική τομή), **δ.** Μέσω της τομής Weber-Ferguson-Diffenbach για την άνω γνάθο και **ε.** Μέσω συνδυασμού των β και δ ^(38, 43).

Τα πλέον πιθανά για μεταστατική νόσο τραχηλικά επίπεδα είναι τα I, II και III, σπάνια το επίπεδο IV και ακόμη πιο σπάνια το επίπεδο V ⁽⁴³⁾. **Αναφορικά λοιπόν με τη χειρουργική των τραχηλικών λεμφαδενικών μεταστάσεων (τραχηλικός λεμφαδενικός καθαρισμός)** εφαρμόζονται οι εξής τύποι επεμβάσεων:

α. Ριζικός τραχηλικός λεμφαδενικός καθαρισμός (PTAK), δηλαδή en block αφαίρεση του κυτταρολιπώδους ιστού που φέρει τους λεμφαδένες όλων των επιπέδων της μίας πλευράς του τραχήλου, από το κάτω χείλος της κάτω γνάθου έως την κλείδα και από το έξω όριο του κάτωθεν του υοειδούς μυών μέχρι το πρόσθιο χείλος του τραπεζοειδούς μυός ^(38, 43).

β. Τροποποιημένος ριζικός τραχηλικός λεμφαδενικός καθαρισμός (ΤΡΤΛΚ), κατά αντιστοιχία με τον ΡΤΛΚ, αλλά με διατήρηση του παραπληρωματικού νεύρου (ΤΡΤΛΚ τύπου Ι) ή με διατήρηση του παραπληρωματικού νεύρου και της έσω σφαγίτιδας φλέβας (ΤΡΤΛΚ τύπου ΙΙ) ή τέλος με διατήρηση του παραπληρωματικού νεύρου, της έσω σφαγίτιδας φλέβας και του στερνοκλειδομαστοειδή μυ (ΤΡΤΛΚ τύπου ΙΙΙ)^(38, 43)

γ. Εκλεκτικός τραχηλικός λεμφαδενικός καθαρισμός, ο οποίος για τους ασθενείς με ΑΚΣ συνίσταται σε χειρουργική αφαίρεση του κυτταρολιπώδους ιστού των τραχηλικών επιπέδων Ι, ΙΙ και ΙΙΙ (υπερωμοϋοειδικός τραχηλικός λεμφαδενικός καθαρισμός, ΥΤΛΚ) ή και του επιπέδου ΙV (εκτεταμένος ΥΤΛΚ). Ο τύπος αυτός επέμβασης ενδείκνυται σε περιπτώσεις ασθενών με N0 τράχηλο και με πιθανό κίνδυνο λεμφαδενικών μεταστάσεων $\geq 25\%$, όπως και σε ασθενείς με N1 τράχηλο^(38, 43).

Τέλος, **όσον αφορά την αποκατάσταση των ελλειμμάτων και της λειτουργικότητας των ιστών της στοματο-γναθο-προσωπικής χώρας,** αυτή μπορεί να γίνει στον ίδιο χρόνο με την αφαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας ή σε αργότερο χρόνο, ανάλογα με τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου, τη γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς και τη βαρύτητα της λειτουργικής αναπηρίας που θα εγκαταλείψει η αφαίρεση της βλάβης. Η αποκατάσταση περιλαμβάνει ανά περίπτωση δερματικά μοσχεύματα ολικού ή μερικού πάχους, οστικά, χόνδρινα ή νευρικά μοσχεύματα, αλλά και διάφορους τύπους κρημνών, όπως τοπικούς ή απομακρυσμένους δερματικούς και δερμοπεριτονιακούς κρημνούς (μισχωτούς ή ελεύθερους), αλλά και μυϊκούς – μυοδερματικούς κρημνούς, καθώς και οστικούς κρημνούς (απλούς ή σύνθετους)^(38, 43).

B.2. Ο ρόλος της ακτινοθεραπείας στον καρκίνο του στόματος

Το πλακώδες επιθήλιο της στοματικής κοιλότητας έχει πολύ φτωχή ανταπόκριση στην ακτινοβολία ως μονοθεραπεία, επομένως ο ρόλος της ακτινοβολίας στην αντιμετώπιση του ΑΚΣ είναι κυρίως συμπληρωματικός, ακολουθώντας τη χειρουργική εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας ⁽⁵⁴⁾.

Ενδείξεις μετεγχειρητικής ακτινοβολίας αποτελούν: *τα θετικά ή εγγύς όρια της εκτομής με τη θέση της βλάβης, η περινευρική διήθηση, η λεμφαγγειακή διήθηση, η εκτεταμένη οστική διήθηση και η ύπαρξη θετικών λεμφαδένων* ⁽⁵⁴⁾. Κάθε περίπτωση όμως θα πρέπει να αξιολογείται ανεξάρτητα.

Σε ασθενείς με στοματικό καρκίνο σταδίου III ή IV, η μετεγχειρητική ακτινοβολία βελτιώνει τον τοπικό έλεγχο της νόσου, κυρίως επί ύπαρξης θετικών ορίων, όπως έδειξε η μελέτη των Vikram και συν. ήδη από το 1984 ⁽⁵⁵⁾. Οι ερευνητές αυτοί ανέφεραν ότι για τη χρονική περίοδο παρακολούθησης παρατηρήθηκε υποτροπή στο 39% των περιπτώσεων με καθαρά εγχειρητικά όρια και στο 73% των περιπτώσεων με θετικά όρια ⁽⁵⁵⁾. Ωστόσο, τα προηγούμενα ποσοστά ελαττώθηκαν σημαντικά, σε μόνο 2% και 10,5% αντίστοιχα, για τους ασθενείς που έλαβαν μετεγχειρητική ακτινοβολία ⁽⁵⁵⁾.

Στις νεότερες τεχνικές χορήγησης ακτινοθεραπείας στους ασθενείς με καρκίνο της κεφαλής και του τραχήλου υπάγονται: **α.** η IMRT ακτινοθεραπεία και **β.** η ακτινοβολία με τη μορφή ηλεκτρονίων ^(56, 57). Η IMRT ακτινοθεραπεία κυμαινόμενης έντασης δόσης αποτελεί ένα σύγχρονο τεχνολογικό βήμα προόδου για τους παραπάνω ασθενείς, παρουσιάζοντας λιγότερες επιπλοκές, όπως είναι δυσφαγία, συγκριτικά με την κλασσική ακτινοθεραπεία ⁽⁵⁶⁾. Επιπλέον, η ακτινοβολία με τη μορφή ηλεκτρονίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιφανειακούς ιστούς στον

τράχηλο, αποφεύγοντας βλάβες των εν τω βάθει ιστών, όπως του νωτιαίου σωλήνα⁽⁵⁷⁾.

Η μετεγχειρητική ακτινοβολία θα πρέπει να ξεκινάει σε όσο το δυνατόν συντομότερο χρονικό διάστημα μετά την επούλωση του χειρουργικού τραύματος: Καθυστέρηση πάνω από 6 εβδομάδες έχει συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά υποτροπών⁽⁵⁸⁾. Επιπλέον, ο τοπικοπεριοχικός έλεγχος του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας βελτιώνεται αν η διάρκεια της όλης της θεραπείας (από τη στιγμή της εγχείρησης έως την ολοκλήρωση της ακτινοθεραπείας) είναι μικρότερη από 100 ημέρες⁽⁵⁹⁾.

Σε περιπτώσεις που η ακτινοθεραπεία προηγηθεί της χειρουργικής επέμβασης, συνήθως οδηγεί σε υψηλό ποσοστό επιπλοκών, όπως είναι οι διαταραχές επούλωσης του τραύματος⁽⁶⁰⁾.

B.3. Ο ρόλος της χημειοθεραπείας και χημειοακτινοθεραπείας στον καρκίνο του στόματος

Οι διάφορες στρατηγικές χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας και χειρουργικής στους ασθενείς με καρκίνο του στόματος περιλαμβάνουν :

1. **την εισαγωγική χημειοθεραπεία**, που συνίσταται σε μερικούς κύκλους χημειοθεραπείας πριν το χειρουργείο ή την ακτινοθεραπεία,
2. **την ταυτόχρονη χορήγηση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας**,
3. **την εισαγωγική χημειοθεραπεία που ακολουθείται από χημειοακτινοθεραπεία και τέλος**
4. **τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία ή τη συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία μετά από ριζική θεραπεία της τοπικής νόσου.**

Γενικά, όπως προκύπτει από πολλαπλές τυχαιοποιημένες μελέτες και 3 μετα-ανάλυσεις, η προσθήκη της χημειοθεραπείας στην ακτινοθεραπεία συμβάλλει: **α.** στον καλύτερο τοπικοπεριοχικό έλεγχο της νόσου, **β.** στη μείωση του ποσοστού απομακρυσμένων μεταστάσεων και **γ.** στη διατήρηση οργάνου, προσφέροντας μεγαλύτερη συνολική επιβίωση και καλύτερη ποιότητα ζωής για τον ασθενή ^(61 – 71). Η χημειοθεραπεία μπορεί να συνδυαστεί με την ακτινοθεραπεία στην αντιμετώπιση τοπικά προχωρημένων καρκίνων σταδίου III/IV κεφαλής και τραχήλου ⁽⁷⁰⁾.

B.3.1. Εισαγωγική χημειοθεραπεία

Πρόσφατα στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζουν την εφαρμογή εισαγωγικής χημειοθεραπείας στη συνδυασμένη αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνους κεφαλής και τραχήλου προχωρημένων σταδίων ^(52, 72,73).

Αναφορικά με τους διάφορους συνδυασμούς χημειοθεραπευτικών παραγόντων, η εισαγωγική χημειοθεραπεία με σχήμα βασιζόμενο σε πλατίνη και 5-φθοριουρακίλη (PF) φαίνεται να είναι έχει καλύτερα αποτελέσματα, όπως προκύπτει από μετα-ανάλυση 5.269 ασθενών από 31 τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που συνέκριναν την εφαρμογή εισαγωγικής χημειοθεραπείας, ακολουθούμενης από τοπικοπεριοχική θεραπεία της νόσου ως μονοθεραπεία ⁽⁶⁸⁾. Παρόλο που στη μετα-ανάλυση αυτή αρχικά η εισαγωγική χημειοθεραπεία φάνηκε να προσφέρει ένα μη στατιστικά σημαντικό πλεονέκτημα της τάξης του 2%, προσεκτικότερη επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι στις 15 από τις 31 μελέτες που ενσωματώθηκαν στη μετα-ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός PF, ενώ στις υπόλοιπες 16 χρησιμοποιήθηκαν διάφορα σχήματα, όπως μπλεομυκίνη, μπλεομυκίνη με βινκριστίνη, σχήματα με 3 ως 5 φάρμακα χωρίς πλατίνα ή σχήματα

με 3 ως 5 φάρμακα που περιείχαν σισπλατίνη. Για τις 15 μελέτες που έκαναν χρήση συνδυασμού PF, η μετα-ανάλυση κατόρθωσε να αναδείξει συνολικά ένα στατιστικά σημαντικό πλεονέκτημα στην πενταετή επιβίωση της τάξης του 5% ($P=0,005$), παρόλο που καμία από αυτές τις μελέτες δε διέθετε μεμονωμένα την απαιτούμενη ισχύ για την ανάδειξη πλεονεκτημάτων από την εφαρμοζόμενη εισαγωγική χημειοθεραπεία ⁽⁶⁸⁾.

Επιπρόσθετα, δεδομένα από τη βιβλιογραφία δείχνουν ότι σχήματα που ενσωματώνουν ταξάνες (πακλιταξέλη ή δοσεταξέλη) στον συνδυασμό PF βελτιώνουν περαιτέρω το αποτέλεσμα της εισαγωγικής χημειοθεραπείας ^(51, 74, 75). Αναλυτικότερα, οι Posner και συν. (2007) τυχαιοποίησαν 501 ασθενείς με καρκίνους κεφαλής και τραχήλου σταδίων III ή IV, προκειμένου να λάβουν είτε συνδυασμό δοσεταξέλης, σισπλατίνης και 5-φθοριοουρακίλης (TPF), είτε σισπλατίνη και 5-φθοριοουρακίλη (PF) ⁽⁷⁵⁾. Μετά την εισαγωγική χημειοθεραπεία έγινε χορήγηση χημειοακτινοθεραπείας και στις δύο ομάδες. Η επιβίωση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα με τον συνδυασμό TPF σε σχέση με την ομάδα που έλαβε μόνο PF ($P=0,006$). Επιπλέον, οι ασθενείς που έλαβαν TPF είχαν σημαντικά μεγαλύτερη 3-ετή επιβίωση (62% έναντι 48%, $P=0.002$) και διάμεση επιβίωση (68 μήνες έναντι 30 μηνών, $P=0.006$). Στη μελέτη αυτή, το πλεονέκτημα στην επιβίωση φαίνεται να προήλθε από τη βελτίωση στον έλεγχο της τοπικοπεριοχικής νόσου με την προσθήκη της δοσεταξέλης στον συνδυασμό PF, ενώ η μικρή μείωση ως προς την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων που επίσης παρατηρήθηκε από τον συνδυασμό αυτών των τριών χημειοθεραπευτικών παραγόντων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ⁽⁷⁵⁾.

Επιπρόσθετα, άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III από τον Vermorken και συν. (2007) έδειξε επίσης σημαντικά μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης ελεύθερο

νόσου με τον συνδυασμό TPF συγκριτικά με τον συνδυασμό PF (11 μήνες έναντι 8,2 μηνών, $P=0,007$) μετά από εφαρμογή εισαγωγικής χημειοθεραπείας ακολουθούμενης από ακτινοθεραπεία ως μονοθεραπεία ⁽⁵¹⁾. Επιπλέον και οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν λιγότερες με τον συνδυασμό TPF σε σχέση με τον συνδυασμό PF ⁽⁵¹⁾.

Συνοψίζοντας, η εισαγωγική χημειοθεραπεία με σχήμα που περιέχει ταξάνες μπορεί να αλλάξει τη φυσική πορεία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου. Νέες μελέτες που συγκρίνουν την εφαρμογή χημειοακτινοθεραπείας ταυτόχρονα με ή χωρίς εισαγωγική χημειοθεραπεία (ή χημειοθεραπεία μαζί με μοριακό παράγοντα) διερευνούν περαιτέρω την αποτελεσματικότητα της εισαγωγικής χημειοθεραπείας.

B.3.2. Ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία

Μέχρι σήμερα, η ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία έχει δοκιμαστεί με επιτυχία στη θεραπεία του τοπικά προχωρημένου καρκίνου κεφαλής και τραχήλου και αποτελεί τη θεραπεία εκλογής για τη συντηρητική αντιμετώπιση περιπτώσεων με τοπικά προχωρημένη νόσο ⁽⁵⁰⁾. Μάλιστα, τα δεδομένα από τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III και μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι η ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία βελτιώνει την επιβίωση σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, αυξάνει τον έλεγχο της τοπικοπεριοχικής νόσου και επιτρέπει τη διατήρηση οργάνου στις περιπτώσεις αυτές ⁽⁶⁹⁾.

Όπως προκύπτει από μελέτη σε ασθενείς με εξαιρέσιμο και μη εξαιρέσιμο καρκίνο του στοματοφάρυγγα, θεραπεία με 3 κύκλους καρβοπλατίνης και 5-φθοριοουρακίλης σε τετραήμερη έγχυση, κατά τη διάρκεια καθημερινών συνεδριών ακτινοθεραπείας, είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση στη συνολική επιβίωση για μία περίοδο παρακολούθησης 3 ετών (από 31% σε 51%, $P=0,02$) ⁽⁶⁶⁾. Τόσο από την προηγούμενη όσο και από άλλες μελέτες τεκμηριώνεται ότι

η χημειοακτινοθεραπεία αυξάνει τον επαγόμενο από την ακτινοθεραπεία κυτταρικό θάνατο, όχι μόνο μέσω κυτταροτοξικών μηχανισμών, αλλά και μέσω άμεσης ακτινοευαισθητοποίησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί από τα μέσα της δεκαετίας του '80 ⁽⁷⁶⁾.

Από τις διάφορες μετα-αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί, αναδεικνύονται τα πλεονεκτήματα αναφορικά με την επιβίωση στους ασθενείς που λαμβάνουν ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία, παρά το κόστος της αυξημένης τοξικότητας που εμφανίζεται. Όπως προκύπτει από μετα-ανάλυση των Pignon και συν. (2000), το πλεονέκτημα ως προς την επιβίωση με τη χημειοακτινοθεραπεία είναι 8% στα 5 χρόνια ($P<0,001$) ⁽⁶⁸⁾. Επιπλέον, από προηγούμενη μετα-ανάλυση από τους El-Sayed και συν. (1996), η οποία συμπεριέλαβε 42 τυχαιοποιημένες προοπτικές μελέτες με περιπτώσεις καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, μεταξύ των οποίων και 11 μελέτες με εφαρμογή ταυτόχρονης χημειοακτινοθεραπείας, προέκυψε σημαντική μείωση της θνητότητας κατά 22% στις περιπτώσεις χορήγησης ταυτόχρονης χημειοακτινοθεραπείας ⁽⁶³⁾. Τρίτη μετα-ανάλυση από τους Munro και συν. (1995), η οποία είχε προηγηθεί των παραπάνω, έδειξε ότι η ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία αύξανε την επιβίωση κατά 12,1%, ενώ η εισαγωγική χημειοθεραπεία εμφάνιζε πλεονέκτημα ως προς την επιβίωση της τάξης μόνο του 3,7% ⁽⁶²⁾.

B.3.3. Εισαγωγική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία

Από μελέτες στις οποίες οι ασθενείς έλαβαν ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία, χωρίς να έχει προηγηθεί εισαγωγική θεραπεία, παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας απομακρυσμένων μεταστάσεων, παρά τον

έλεγχο της τοπικοπεριοχικής νόσου που είχε επιτευχθεί ⁽⁷⁷⁾. Το συμπέρασμα από τις εργασίες αυτές ήταν ότι οι μικρές δόσεις χημειοθεραπείας που χρησιμοποιούνται για ακτινοευαισθησία, παρόλο που μπορεί να ελέγξουν την πορεία της τοπικά προχωρημένης νόσου, δεν είναι αρκετές για την εκρίζωση των μικρομεταστάσεων ⁽⁷⁷⁾.

Λόγω της προηγούμενης διαπίστωσης, τελευταία υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για σχήματα στα οποία η εισαγωγική χημειοθεραπεία προηγείται της ταυτόχρονης χημειοακτινοθεραπείας. Η στρατηγική αυτή φαίνεται ιδιαίτερα ελκυστική σε πρωτοπαθείς εντοπίσεις καρκινικών εστιών που συνδέονται με υψηλή συχνότητα μεταστατικής νόσου, όπως είναι η βάση της γλώσσας και ο υποφάρυγγας.

Μέχρι σήμερα, σχήματα αυτού του τύπου έχουν δοκιμαστεί σε μελέτες φάσης II και III. Μία εκ τω μελετών αυτό από το Πανεπιστήμιο του Yale συμπεριέλαβε 42 ασθενείς με εξαιρεσίμους καρκίνους κεφαλής και τραχήλου σταδίων III και IV, οι οποίοι έλαβαν εισαγωγική χημειοθεραπεία με 2 κύκλους PFL (σισπλατίνη 20 mg/m²/ημέρα, 5-φθοριουρακίλη 800 mg/m²/ημέρα και λευκοβορίνη 500 mg/m²/ημέρα, σε συνεχή έγχυση για 4 ημέρες), ακολουθούμενους από ταυτόχρονη θεραπεία με σισπλατίνη (100 mg/m²/ημέρα, ημέρες 1 και 22) και ακτινοθεραπεία με δόση 7000 cGy. Η πενταετής ελεύθερη νόσου επιβίωση ήταν 60%, ενώ η διετής και πενταετής συνολική επιβίωση ήταν 67% και 52%, αντίστοιχα ⁽⁷⁸⁾.

Οι Machtay και συν. χρησιμοποίησαν εισαγωγική χημειοθεραπεία με 2 κύκλους καρβοπλατίνης (6 AUC) και πακλιταξέλης 200 mg/m² σε 53 επιλεγμένους ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεσίμο καρκίνο του στοματοφάρυγγα ⁽⁷⁹⁾. Στόχος των ερευνητών ήταν μεταξύ άλλων και η διατήρηση οργάνου. Οι ασθενείς με τη

μεγαλύτερη ανταπόκριση έλαβαν στη συνέχεια ριζική ακτινοθεραπεία (70 Gy σε 7 εβδομάδες) και ταυτόχρονα εβδομαδιαία χορήγηση πακλιταξέλης (30 mg/m²/ημέρα). Το ποσοστό ανταπόκρισης στην εισαγωγική χημειοθεραπεία ήταν 89%, ενώ 90% των ασθενών είχαν πλήρη ανταπόκριση και μετά την ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία. Η τριετής συνολική επιβίωση ανήλθε στο 70%, ενώ η τριετής ελεύθερη νόσου επιβίωση στο 59%. Ο έλεγχος της τοπικοπεριοχικής νόσου επετεύχθη σε ποσοστό 82% στα 3 χρόνια και έλεγχος των απομακρυσμένων μεταστάσεων σε ποσοστό 81%, κατά τη διάρκεια του ίδιου χρονικού διαστήματος. Η διατήρηση οργάνων ήταν εφικτή στο 77% των ασθενών, ενώ τοξικότητα σημειώθηκε στο 24% των συμμετεχόντων, με κυριότερη τη χρόνια δυσφαγία/εισρόφηση και την εξέλκωση των μαλακών ιστών, ως συνέπεια της ακτινοβολίας. Η σχετιζόμενη με τη θεραπεία θνητότητα ήταν 4%, καθώς δύο ασθενείς πέθαναν από αναπνευστική ανεπάρκεια ⁽⁷⁹⁾.

Σήμερα, νέοι παράγοντες έχουν προστεθεί στα καθιερωμένα σχήματα εισαγωγικής χημειοθεραπείας: Οι Kies και συν. 2010 παρουσίασαν μελέτη σε 47 ασθενείς με πρωτοπαθείς εντοπίσεις στην περιοχή κεφαλής και τραχήλου, σταδίων T0/1/2/3/4, N2b/c/3 και M0, η συντριπτική πλειοψηφία εκ των οποίων είχε καρκίνο του στοματοφάρυγγα (n = 42) και οι οποίοι δεν είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία ⁽⁸⁰⁾. Οι ασθενείς αυτοί έλαβαν εισαγωγική χημειοθεραπεία με 6 εβδομαδιαίους κύκλους πακλιταξέλης 135mg/m², καρβοπλατίνης (AUC2) και σετουξιμάμπης. Ακολούθως, στους ασθενείς πραγματοποιήθηκε είτε χειρουργική επέμβαση με ή χωρίς μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία, είτε ακτινοθεραπεία μόνο, είτε ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία. Οι διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις επελέγησαν ανάλογα με το στάδιο του όγκου και την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας. Σε όλους τους ασθενείς σημειώθηκε ανταπόκριση αναφορικά με την πρωτοπαθή εστία, και το 83% αυτών παρουσίασε πλήρη ανταπόκριση. Επιπλέον,

πλήρη κλινική ανταπόκριση αναφορικά με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις παρουσιάστηκε στο 27% των ασθενών, ενώ τέλος μετά από παρακολούθηση μεγαλύτερη των 3ετών σημειώθηκαν 2 τοπικές και 2 απομακρυσμένες υποτροπές⁽⁸⁰⁾.

Αντίστοιχες στρατηγικές διατήρησης οργάνου που περιλαμβάνουν εισαγωγική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία μπορεί να εμφανίζουν ακόμα μεγαλύτερη ανταπόκριση στον καρκίνο του στοματοφάρυγγα, όταν αυτός συνδέεται με τους ιούς HPV⁽³³⁾. Το Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) παρουσίασε την τελευταία πενταετία μελέτη, η οποία περιέλαβε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο πλακώδη καρκίνο του στοματοφάρυγγα ή του λάρυγγα⁽³³⁾. Στους ασθενείς αυτούς έγινε εισαγωγική χημειοθεραπεία με βάση τις ταξάνες (2 κύκλοι πακλιταξέλης/καρβοπλατίνης), ακολουθούμενη από χημειοακτινοθεραπεία με πακλιταξέλη με στόχο τη διατήρηση οργάνου. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν συγκριτικά για τα άτομα με HPV+ και HPV- καρκίνο. Η θετικότητα για HPV καθορίστηκε με *insitu* υβριδισμό και multiplex PCR. Οι θετικοί για HPV ασθενείς είχαν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης στο εφαρμοζόμενο σχήμα. Αναλυτικότερα, ύστερα από διάμεση παρακολούθηση 39,1 μηνών, για τους HPV+ ασθενείς τόσο ο κίνδυνος εξέλιξης της νόσου ([HR] = 0,27 / 95% CI = 0,10 – 0,75), όσο και ο κίνδυνος θανάτου από τη νόσο (HR = 0,36 / 95% CI = 0,15 – 0,85) ήταν σημαντικά ελαττωμένοι, συγκριτικά με τους HPV- ασθενείς⁽³³⁾.

B.3.4. Συμπληρωματική χημειοθεραπεία ή συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεσίμους καρκίνους κεφαλής και τραχήλου, όταν η νόσος είναι τοπικά προχωρημένη, ανάλογα με την ύπαρξη διαφόρων παραγόντων κινδύνου για υποτροπή αυτής. Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές, στους παράγοντες αυξημένου κινδύνου συγκαταλέγονται: τα διηθημένα χειρουργικά όρια, η εξωκαψική λεμφαδενική επέκταση, η περινευρική διήθηση, η παρουσία καρκινικών εμβόλων σε αγγεία, οι θετικοί λεμφαδένες στα επίπεδα IV ή V, αλλά και η παθολογοανατομική ταξινόμηση των όγκων της στοματικής κοιλότητας σε στάδιο III ή IV ^(43, 82). Η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας ή χημειοακτινοθεραπείας αποτελεί σήμερα πρότυπο θεραπείας για την αντιμετώπιση της νόσου στις περιπτώσεις αυτές ⁽⁸²⁾.

Δύο μελέτες φάσης III που αποτέλεσαν ορόσημο για την αποδοχή της θεραπείας αυτού του είδους είναι η μελέτη #22931 της EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) του 2004 και η μελέτη #9501 του RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) της ίδιας χρονιάς ^(82, 83). Η πρώτη μελέτη συνέκρινε τα αποτελέσματα από τη συμπληρωματική χορήγηση ακτινοθεραπείας, με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συμπληρωματική χορήγηση χημειοακτινοθεραπείας με σισπλατίνη, σε ασθενείς με όγκους κεφαλής και τραχήλου στους οποίους πραγματοποιήθηκε χειρουργική επέμβαση αρχικά και οι οποίοι είχαν υψηλούς παράγοντες κινδύνου για υποτροπή της νόσου ^(81, 82). Σε περίοδο διάμεσης παρακολούθησης 5 ετών, η υπολογιζόμενη συνολική επιβίωση ήταν 40% για την ομάδα που έλαβε μόνο συμπληρωματική ακτινοθεραπεία, συγκριτικά με 53% για την ομάδα με τη συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία ($P=0,02$). Επιπλέον, τόσο ο

έλεγχος της τοπικοπεριοχικής νόσου ($P=0,007$) όσο και το χρονικό διάστημα ελεύθερο νόσου ($P=0,04$) ήταν σημαντικά καλύτερα στη δεύτερη ομάδα των ασθενών. Αναφορικά με τη μελέτη 9501 του RTOG, ο έλεγχος της τοπικοπεριοχικής νόσου σε περίοδο παρακολούθησης 2 ετών ήταν 72% για τους ασθενείς στους οποίους εφαρμόστηκε μόνο συμπληρωματική ακτινοθεραπεία και 82% στους ασθενείς με συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία ($P=0,01$). Επιπλέον και το χρονικό διάστημα που οι ασθενείς της δεύτερης ομάδας παρέμειναν ελεύθεροι νόσου ήταν αυξημένο ($P=0,04$), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τη συνολική επιβίωση των ασθενών μεταξύ των δύο ομάδων ($P=0,19$). Η συγκεντρωτική όμως ανάλυση των αποτελεσμάτων και από τις δύο μελέτες επιβεβαίωσε ότι μετά από την εφαρμογή χειρουργικής θεραπείας σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της κεφαλής και του τραχήλου που έχουν υψηλούς παράγοντες κινδύνου για υποτροπή, η συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά ελέγχου της τοπικοπεριοχικής νόσου, βελτιώνει το διάστημα που οι ασθενείς παραμένουν ελεύθεροι νόσου, αλλά και τη συνολική επιβίωση⁽⁸¹⁾.

B.4 Νεότερες θεραπείες – Στοχευμένη μοριακή θεραπεία

Δεδομένου ότι τα επίπεδα επιβίωσης στα προχωρημένα στάδια του ΑΚΣ είναι ακόμη μη ικανοποιητικά και με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών αυτών, η σύγχρονη έρευνα επικεντρώνεται σε θεραπείες που σχετίζονται με τον έλεγχο των μοριακών παραγόντων που παρεμβαίνουν στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων ⁽⁸⁴⁾.

Οι αρχές της στοχευμένης μοριακής θεραπείας έχουν εφαρμοστεί σε πειραματικά μοντέλα για πληθώρα παραγόντων και οι κλινικές μελέτες που ακολούθησαν απέδειξαν την τεράστια δυναμική των φαρμάκων αυτών στη βελτίωση του αποτελέσματος της συμβατικής θεραπείας, χωρίς μάλιστα να αυξάνουν την τοξικότητα. Ωστόσο, η δυσκολία έγκειται στην επιλογή του κατάλληλου παράγοντα ανά περίπτωση ⁽⁸⁵⁾.

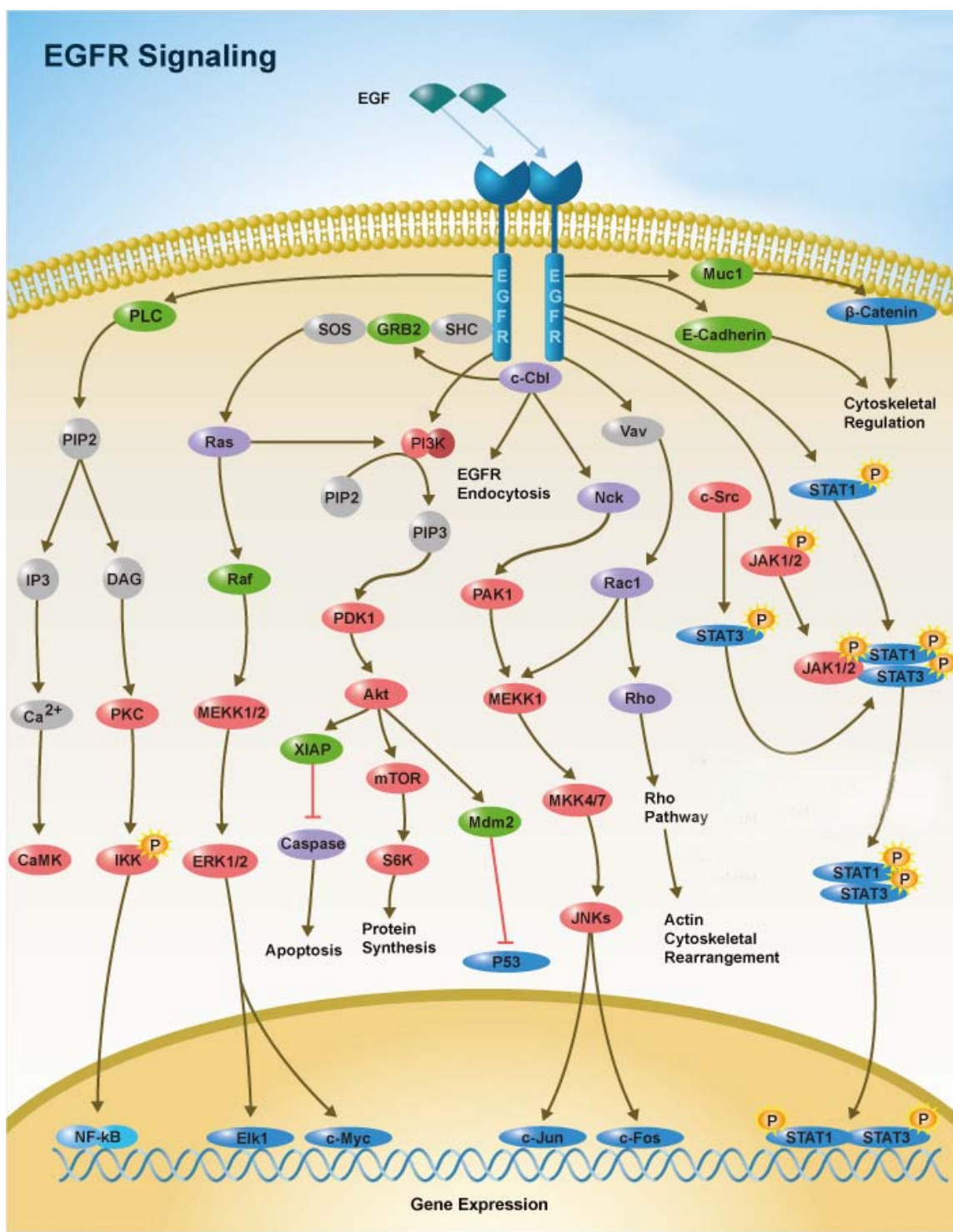
Ο ιδεώδης μοριακός παράγοντας πρέπει να δρα αποκλειστικά στο καρκινικό κύτταρο και να επηρεάζει περισσότερο κατά το δυνατόν μονοπάτια της καρκινογένεσης ⁽⁸⁶⁾. Έτσι, ένα μόριο που να μπορεί π.χ. να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη διήθηση των πέριξ ιστών και την αγγειογένεση θεωρείται καλύτερο μόριο από αυτό που παρεμβαίνει μόνο σε ένα από τα χαρακτηριστικά της νόσου ⁽⁸⁶⁾. Για το ΑΚΣ δυνητικοί στόχοι είναι μόρια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού (EGFR – υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα), με την αγγειογένεση (VEGF – αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας), με την απόπτωση (p53) και με τη φλεγμονή (μονοπάτι της κυκλοξυγενάσης) ⁽⁸⁶⁾. Αυτά τα μόρια έχουν μελετηθεί διεξοδικά ως προγνωστικοί παράγοντες του ΑΚΣ ⁽⁸⁶⁾.

B.4.1 Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι του EGFR

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR γνωστός και ως ERBB1 ή HER1 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που δεσμεύει τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF, το μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα-α (TGF α), την αμφιρεγκουλίνη (AR) και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας ενεργό ρόλο στην κυτταρική αύξηση, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη (**Εικόνες B.1 και B.2**). Ανήκει στην οικογένεια τύπου I υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης (RTKs), η οποία επίσης περιλαμβάνει τους υποδοχείς HER2, HER3 και HER4. Ο EGFR ανευρίσκεται σε όλα τα επιθήλια και μπορεί να εμφανίσει αυξημένη έκφραση στα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας σε περιπτώσεις λευκοπλακίας, αλλά και σε ΑΚΣ ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾.

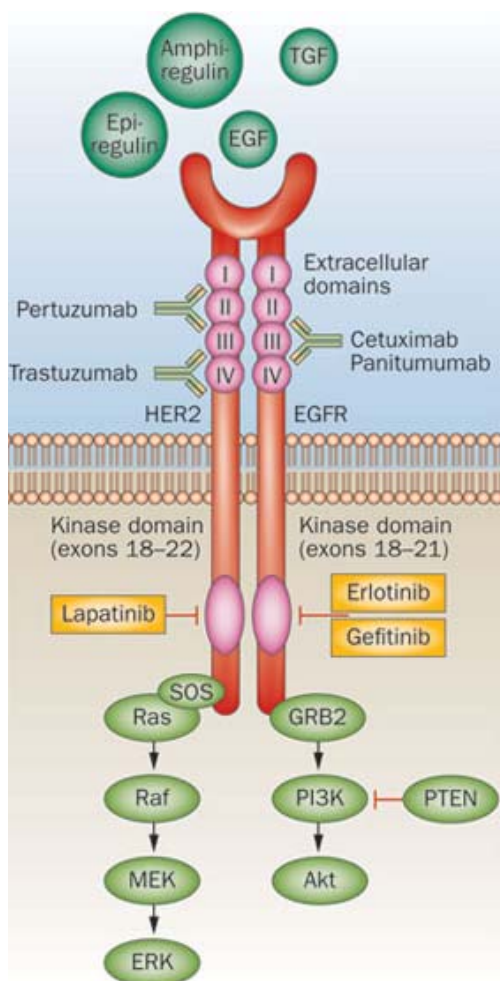
Ο EGFR αποτελεί ελκυστικό μοριακό στόχο για θεραπεία σε καρκίνους κεφαλής-τραχήλου ⁽⁹⁰⁾. Η υπερέκφραση του EGFR αποτελεί μία από τις συχνότερες μοριακές μεταβολές στους καρκίνους αυτούς και υπολογίζεται ότι αφορά το 30 - 83% των περιπτώσεων ⁽⁹⁰⁾. Η υπερέκφραση αυτή σχετίζεται συχνά με αυξημένη παραγωγή μορίων πρόσδεσης από τα πλακώδη καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου, όπως είναι ο αυξητικός παράγοντας TGF ⁽⁹⁰⁾.

Οι θεραπείες που στοχεύουν τον EGFR, όπως είναι το χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab (C225), το οποίο δρα στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα ή το gefitinib (μικρομοριακός αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης) κατά του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, αναστέλλουν τα μονοπάτια σηματοδότησης του EGFR και ενισχύουν το αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπείας (**Εικόνα B.3**) ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾.



Εικόνα Β.2

Τα κυριότερα μονοπάτια σημάτων που ενεργοποιούνται από τον EGFR είναι: **α.** το μονοπάτι RAS-RAF-MEKK1/2-ERK1/2 που ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, **β.** το μονοπάτι PI3K-Akt, το οποίο ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιαποπτωτικών σημάτων και την αγγειογένεση μέσω της έκφρασης του VEGF, **γ.** το μονοπάτι JAK (Janus Kinase) – STAT (Signal Transducer and Activation of Transcription) που σχετίζεται με την επιβίωση του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση και **δ.** το μονοπάτι PLC-γ (phospholipase C-γ) – PKC (protein kinase C) που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση και την κυτταρική απόπτωση. (Ciardello και Tortora 2008, προσαρμογή σχήματος από www.sinobiological.com)⁽⁹³⁾.



Εικόνα Β.3 Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών πρόσδεσης της στοχευμένης μοριακής θεραπείας έναντι του υποδοχέα του EGFR ⁽⁹²⁾.

Ο EGFR υπερεκφράζεται συχνά σε δυσπλασίες και καρκινώματα σχετιζόμενα με τον HPV, γεγονός που δείχνει ότι είναι σημαντικός για την κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου στις περιπτώσεις αυτές ^(94, 95). Ο μηχανισμός της επαγόμενης από τον HPV αύξησης της έκφρασης του EGFR δεν είναι σαφής, αλλά πιθανόν να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E5 του ιού ⁽⁹⁵⁾.

Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III που συνέκρινε τα αποτελέσματα από την εφαρμογή ακτινοθεραπείας υψηλής δόσης με ή χωρίς χημειοθεραπεία σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο κεφαλής και τραχήλου έδειξε ότι η προσθήκη cetuximab παρέτεινε σημαντικά τη συνολική επιβίωση ⁽⁹¹⁾. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 424 ασθενείς, εκ των οποίων το 60% εμφάνιζε καρκίνο του

στοματοφάρυγγα, το 25% καρκίνο του λάρυγγα και το υπόλοιπο 15% καρκίνο του υποφάρυγγα. Ο ελάχιστος και ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 28 και 38 μήνες αντίστοιχα. Η διάμεση επιβίωση με βάση τις καμπύλες Kaplan-Meier ήταν 54 μήνες έναντι 28 μηνών ($P=0,02$) υπέρ των ασθενών που έλαβαν το μονοκλωνικό αντίσωμα. Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με cetuximab ήταν μεγαλύτερη σε στοματοφαρυγγική εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, αλλά η ισχύς της μελέτης ήταν ανεπαρκής και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ως προς την τοξικότητα, κυριάρχησαν οι κλασικές ανεπιθύμητες ενέργειες της ακτινοθεραπείας κεφαλής/τραχήλου με υψηλές δόσεις, μολονότι παρατηρήθηκε και επιπρόσθετη τοξικότητα που αποδόθηκε στο αντίσωμα. Τα όψιμα λειτουργικά αποτελέσματα από τη μελέτη αυτή δεν έχουν ακόμα ανακοινωθεί, αν και η ανάλυση των αποτελεσμάτων που σχετίζονται με την ποιότητα ζωής των ασθενών απέτυχε να αναδείξει κάποιο πλεονέκτημα από την ομάδα των ασθενών που έλαβε cetuximab ⁽⁹¹⁾. Άλλες όμως μελέτες όπως αυτή του Bonner και συν. (2006), όσο και η μελέτη του Cuijpan και συν. (2007), παρέχουν κάποιες ενδείξεις ότι ο καρκίνος κεφαλής-τραχήλου που σχετίζεται με τον HPV ανταποκρίνεται καλύτερα στις στοχευμένες κατά του EGFR θεραπείες ^(90, 91).

Σε υποτροπή ή σε μεταστατική νόσο ο συνδυασμός cetuximab με σισπλατίνη ως θεραπεία πρώτης γραμμής έδωσε υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης σε σχέση με τη σισπλατίνη ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής σε τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III της ECOG, με σχετικό κίνδυνο για πρόοδο νόσου 0,78 ⁽⁹⁶⁾. Ωστόσο, η μελέτη αυτή δεν είχε την απαραίτητη ισχύ για την τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα επέτρεπε τη χρήση cetuximab τόσο σε υποτροπή, όσο και σε μεταστατική νόσο, συγχέοντας το αποτέλεσμα ως προς την επιβίωση ⁽⁹⁷⁾. Ακολούθησε τυχαιοποιημένη ευρωπαϊκή μελέτη φάσης III (μελέτη EXTREME) που συνέκρινε το

συνδυασμό σισπλατίνης ή καρβοπλατίνης με 5-φθοριοουρακίλη και cetuximab με τον ίδιο χημειοθεραπευτικό συνδυασμό χωρίς cetuximab, ως χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής σε υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής-τραχήλου ⁽⁹⁷⁾. Οι ασθενείς στο σκέλος του cetuximab έλαβαν το αντίσωμα και μετά το πέρας των 6 κύκλων της χημειοθεραπείας. Η μελέτη αυτή έδειξε σημαντικά βελτιωμένη επιβίωση στους ασθενείς που έλαβαν cetuximab ⁽⁹⁷⁾.

Σήμερα, η χορήγηση cetuximab ως μονοθεραπεία αποτελεί αποδεκτή θεραπεία δεύτερης γραμμής σε υποτροπιάζον/μεταστατικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου ⁽⁹⁷⁾.

Η αποτελεσματικότητα άλλων αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα EGFR, όπως των μικροαντισωμάτων panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab στη θεραπεία καρκίνου κεφαλής και τραχήλου ερευνάται σήμερα σε μελέτες φάσης II και III ⁽⁹⁸⁾. Άλλα μόρια – αναστολείς του υποδοχέα EGFR όπως τα gefitinib και erlotinib έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε διάφορες κλινικές μελέτες τα τελευταία χρόνια ^(99, 100). Παρόλα αυτά η μονοθεραπεία με τους παράγοντες αυτούς σε υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου έχει δείξει μέτρια κλινική αποτελεσματικότητα με ποσοστά ανταπόκρισης που κυμαίνονται μεταξύ 1% και 11% και μέση ολική επιβίωση από 5 έως 8 μήνες ^(99, 100).

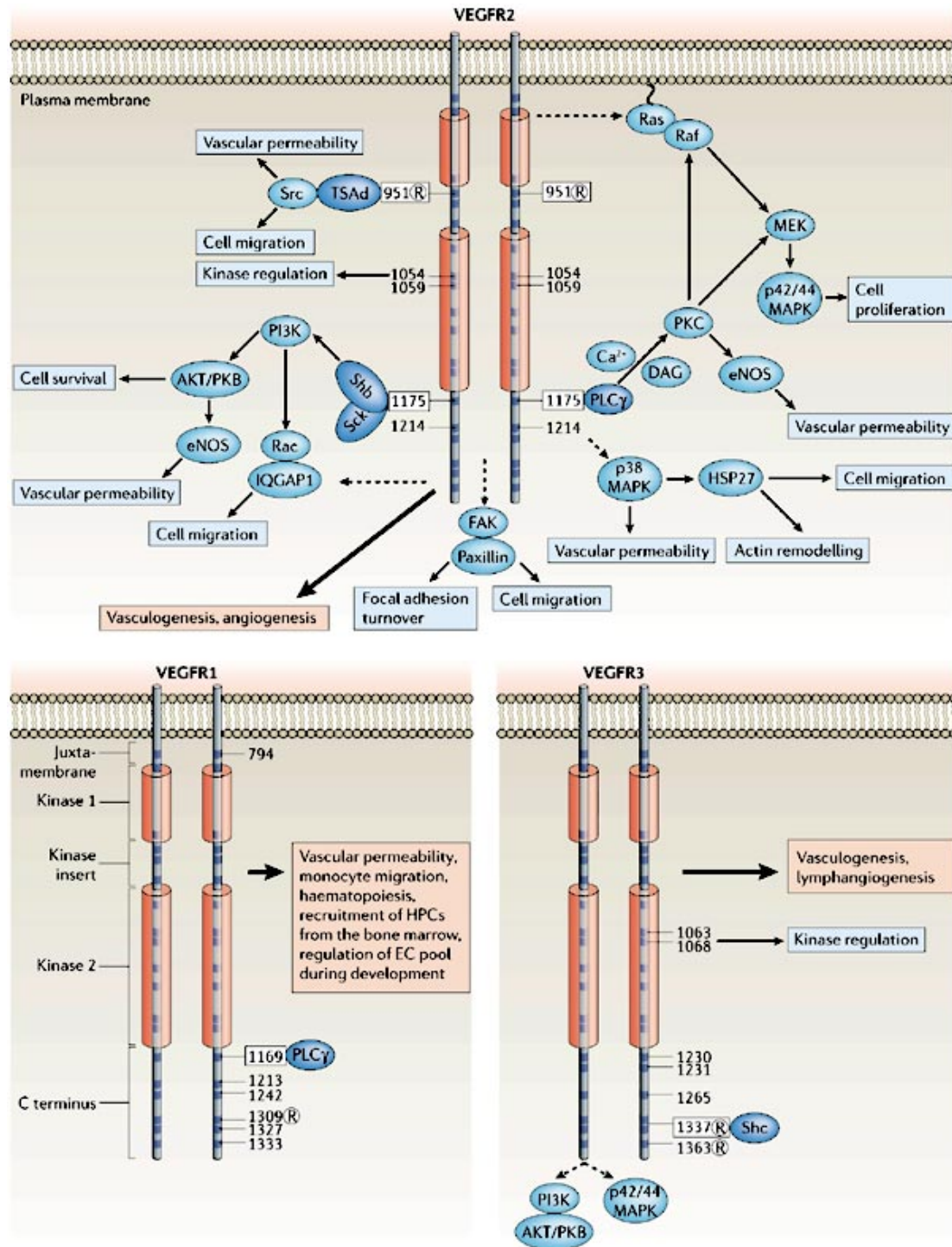
Τέλος, το πιθανό κλινικό όφελος από τη χρήση των μορίων lapatinib (αντιστρεπτός διπλός αναστολέας των υποδοχέων EGFR και HER2) και afatinib (μη αντιστρεπτός αναστολέας όλων των HER υποδοχέων) ερευνάται σήμερα σε μελέτες φάσης II ⁽⁸⁵⁾.

B.4.2 Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι των παραγόντων VEGF & VEGFR

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) είναι μία πολυσύνθετη κυττοκίνη, η οποία συμμετέχει στην αγγειογένεση, ενώ παράλληλα ενεργεί και ως παράγοντας επιβίωσης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα με την ενίσχυση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 ⁽¹⁰¹⁾. Επιπλέον, τόσο η πρωτεΐνη Bcl-2, όσο και ο VEGF αυξάνουν την έκφραση της κυττοκίνης ιντερλευκίνης - 8 (IL-8), η οποία αποτελεί πρόδρομο παράγοντα της αγγειογένεσης ⁽¹⁰¹⁾. Η αγγειογένεση διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και τη μεταστατική του ικανότητα. Ο VEGF αποτελεί παράγοντα στόχο για τη θεραπευτική του καρκίνου διότι συμμετέχει τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα, εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και στη διείσδυσή τους στους πέριξ ιστούς, ενώ παίζει καθοριστικό ρόλο στην αγγειογένεση κατά την αύξηση του όγκου αλλά και τη μετάστασή του ⁽¹⁰¹⁾.

Υπάρχουν διάφορες ισομορφές του VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), καθώς και διαφορετικοί διαμεμβρανικοί υποδοχείς οι οποίοι δεσμεύουν τις πρωτεΐνες αυτές, όπως είναι οι VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3 (**Εικόνα B.4**).

Στον άνθρωπο, ο VEGF-A είναι ο πιο ισχυρός ρυθμιστής της αγγειογένεσης ⁽¹⁰²⁾. Ο VEGF-A ενώνεται με τον υποδοχέα VEGFR-2 στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και οδηγεί στην επαγωγή ενδοκυττάρων σημάτων με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ⁽¹⁰²⁾. Για το λόγο αυτό η θεραπευτική επικεντρώνεται κυρίως στον VEGF-A και τον VEGFR-2 ⁽¹⁰²⁾.



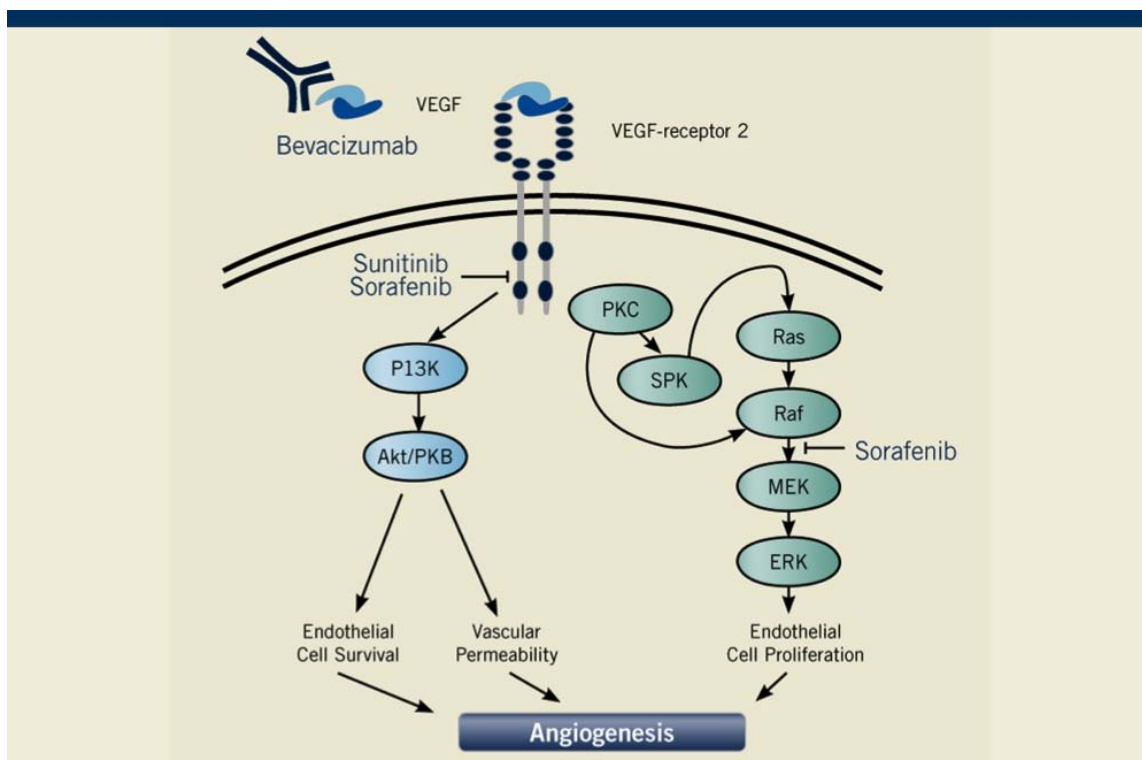
Εικόνα Β.4 Τα ενδοκυττάρια τμήματα των ενεργοποιημένων υποδοχέων του ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3). Οι θέσεις φωσφορύλωσης της τυροσίνης σημειώνονται με αριθμούς. (Προσαρμογή από Olsson και συν. 2006) ⁽¹⁰²⁾.

Όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες αναφορικά με τον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας, ο VEGF παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα και φαίνεται να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση της νόσου ^(103 – 105). Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε συσχέτιση των παραγόντων VEGF και VEGFR-2 με αύξηση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ^(104, 105). Επιπρόσθετα, γνωστοί κυτταροτοξικοί παράγοντες, όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη αυξάνουν την έκφραση του VEGF σε ασθενείς με ΑΚΣ, καθιστώντας τη στοχευμένη θεραπεία έναντι του παράγοντα αυτού ιδιαίτερα επιθυμητή ⁽¹⁰⁶⁾.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στον αποκλεισμό του VEGF βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του παράγοντα. Το Bevacizumab (Avastin) είναι ένα ανασυνδυασμένο ανθρώπειο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι όλων των ισομορφών του VEGF και έχει μελετηθεί εκτενώς σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου ⁽¹⁰⁷⁾. Το εν λόγω φάρμακο έχει πάρει έγκριση από τις αρχές των ΗΠΑ για χορήγηση σε μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ βρίσκεται στο τελικό στάδιο δοκιμών για τον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου **(Εικόνα Β.5)** ⁽¹⁰⁷⁾. Επιπλέον και αναστολείς τυροσινικών κινασών, όπως οι παράγοντες sunitinib, sorafenib και vandetanib είναι σε θέση να αναστείλουν το μονοπάτι ενδοκυττάρων σημάτων που ενεργοποιείται από τους υποδοχείς VEGFR, ωστόσο η δράση τους στους όγκους κεφαλής και τραχήλου βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση **(Εικόνα Β.5)** ⁽⁸⁵⁾.

Ακόμη, έχει υποθεθεί ότι η συνδυαστική στοχευμένη θεραπεία έναντι των EGFR και του VEGF επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα από τη μονοθεραπεία με κάθε έναν από τους παράγοντες αυτούς χωριστά. Ο EGFR προάγει την αγγειογένεση μέσω έκφρασης του VEGF, ενώ η αναστολή του EGFR έχει δειχθεί ότι μειώνει την έκκριση του VEGF και της νεοαγγείωσης του όγκου in vivo **(Εικόνα Β.1)** ⁽¹⁰⁸⁾. Επίσης,

πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η αντίσταση στους αναστολείς του EGFR σχετίζεται



Εικόνα Β.5. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου δράσης του Bevacizumab έναντι του VEGF (Προσαρμογή από Rini 2007) ⁽¹⁰⁷⁾.

με αύξηση των επιπέδων του VEGF ⁽¹⁰⁹⁾.

Είναι γεγονός λοιπόν πώς η ταυτόχρονη αναστολή των EGFR και του VEGF αποτελεί ερευνητικό πεδίο μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Προς την κατεύθυνση αυτή οι Vokes και συν. (2005) διερεύνησαν τα αποτελέσματα από τη συνδυασμένη χρήση του bevacizumab με το erlotinib σε ασθενείς με υποτροπιάζον ΑΚΣ ή με μετάσταση της νόσου ⁽¹¹⁰⁾. Τα αποτελέσματα από την παραπάνω έρευνα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά.

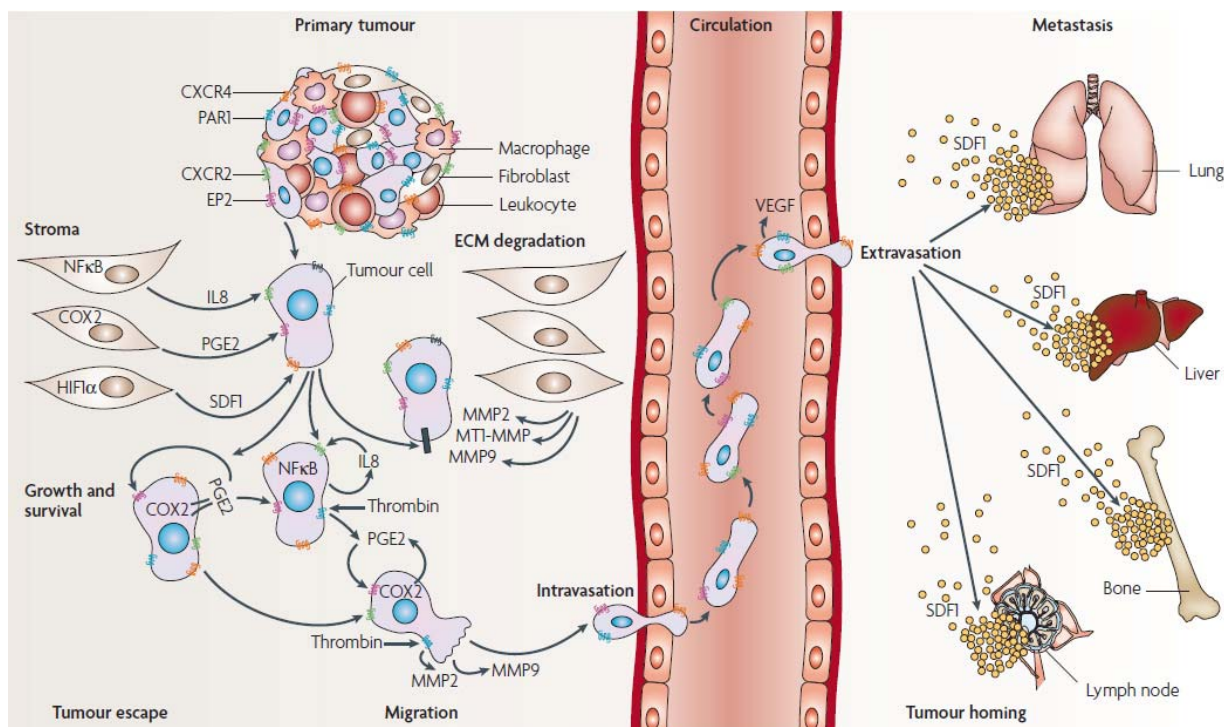
Η λεμφαγγειογένεση είναι μια σημαντική παράμετρος που σχετίζεται με τη μεταστατική ικανότητα του όγκου και τη δυνατότητά του να προκαλεί εξωκαψική επέκταση στους επιχώριους λεμφαδένες. Ο παράγοντας VEGF-C και ο υποδοχέας

αυτού VEGFR-3 αποτελούν κύριους ρυθμιστές της λεμφοαγγειογένεσης. Σήμερα, η υπόθεση για το αν η αναστολή του VEGFR-3 μπορεί να δράσει αποτελεσματικά στη μείωση του ρυθμού αύξησης του όγκου βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Ισομερή του VEGF-C, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του VEGFR-3 και VEGF-C, καθώς και αναστολείς της κινάσης του VEGFR-3 βρίσκονται υπό μελέτη^(111, 112). Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να αναστείλουν τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους παράγοντες VEGF-C, VEGF-D και της αγγειογένεσης, μέσω ενεργοποίησης του VEGFR-2⁽¹¹³⁾. Παρά το γεγονός ότι η στοχευμένη θεραπεία έναντι των παραγόντων αυτών έχει επιφέρει κάποια θετικά αποτελέσματα, απαιτούνται περεταίρω μελέτες προκειμένου να επιτευχθεί πρόληψη των μεταστάσεων του ΑΚΣ στους τραχηλικούς λεμφαδένες.

B.4.3 Αναστολείς της COX-2 σε συνδυαστική θεραπεία (cell cycle dysregulation)

Η κυκλοξυγενάση 2 (COX-2) συμμετέχει στη σύνθεση της προσταγλανδίνης-2, η οποία παίζει τεκμηριωμένο ρόλο στην ογκογένεση, καθώς αναστέλλει τη διαδικασία της απόπτωσης, συμμετέχει στην αγγειογένεση και επηρεάζει τη διηθητική ικανότητα του όγκου (**Εικόνα Β.6**)⁽¹¹⁴⁾. Η αναστολή της δράσης της COX-2 αποδεδειγμένα καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου⁽¹¹⁵⁾.

Επιπλέον, η COX-2 βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται σε ποσοστό 86% στο ΑΚΣ, καθώς και στις επιθηλιακές δυσπλασίες του βλεννογόνου του στόματος που παρουσιάζουν ανευπλοϊδικό DNA, χωρίς στο φυσιολογικό βλεννογόνο να έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχα ποσοστά^(116 - 118). Μάλιστα σε διηθητικούς καρκίνους κεφαλής και τραχήλου παρατηρήθηκε έως και 150πλάσια αύξηση της έκφρασης του m-RNA της COX-2 σε σχέση με φυσιολογικά άτομα⁽¹¹⁶⁾.



Εικόνα Β.6 Η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), η οποία εκφράζεται από τα κύτταρα του όγκου και του στρώματος επάγει την έκφραση της προσταγλανδίνης E2 (PGE2), η οποία προσδένεται στους υποδοχείς της στα καρκινικά κύτταρα και προάγει τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά και την αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μέσω της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 (MMP2, MMP9), ευνοώντας τελικά τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (119).

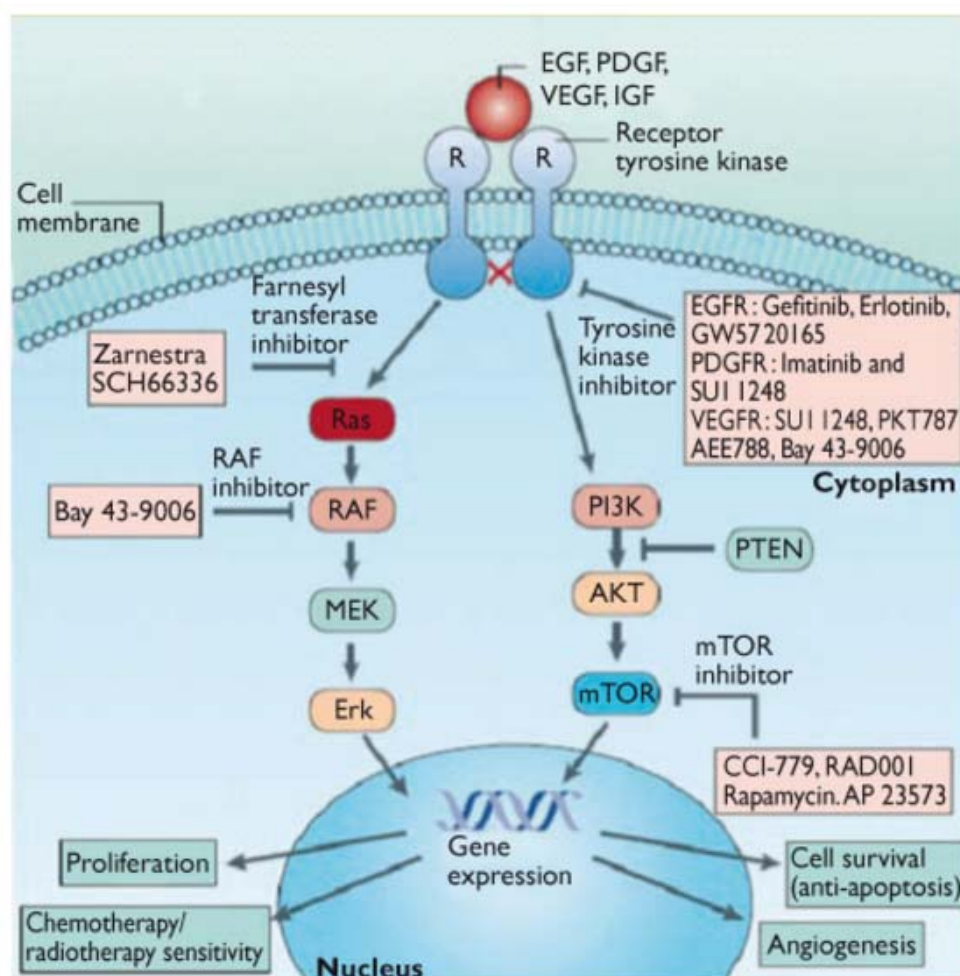
Γνωρίζοντας λοιπόν το ρόλο της φλεγμονώδους διαδικασίας στη καρκινογένεση, η χρήση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων που μπλοκάρουν τη COX-2 αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου. Το celecoxib, ένας εκλεκτικός αναστολέας της COX-2, έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες ως προστατευτικός παράγοντας σε ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση του εντέρου (120). Δε θα πρέπει όμως να παραλείπεται το γεγονός ότι πολλά από τα κλασικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), εφόσον δεν παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προφυλακτικοί παράγοντες στον καρκίνο σε κατάλληλη δοσολογία (121).

Σε πειραματικά μοντέλα η χρήση αναστολέων της COX-2 οδήγησε σε επιβράδυνση της εξέλιξης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της γλώσσας ⁽¹²²⁾. Επίσης, τα σκευάσματα αυτά εμφάνισαν θετική συνέργεια όταν χρησιμοποιήθηκαν μαζί με άλλους μοριακούς παράγοντες ή κυτταροτοξικά φάρμακα σε διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα, σε μελέτη με ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο κεφαλής και τραχήλου ο συνδυασμός αναστολέα του EGFR και celecoxib (COX-2 αναστολέας) οδήγησε σε επιβράδυνση της αύξησης του όγκου ⁽¹²³⁾. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη επιπέδου I παρατηρήθηκε ανταπόκριση σε ποσοστό 22% μετά από ταυτόχρονη χορήγηση gefitinib και celecoxib σε υποτροπιάζοντα ή μεταστατικά ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής και τραχήλου ⁽¹²⁴⁾.

B.4.4 Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι των παραγόντων Ras, Raf, mTOR

Τα ενδοκυττάρια μόρια Ras, Raf και το μόριο στόχος της ραπαμυσίνης των θηλαστικών (mTOR) αποτελούν μέρη του καταρράκτη σηματοδότησης του EGFR και του c-Met υποδοχέα των κινασών της τυροσίνης (**Εικόνα B.2**).

Το ογκογονίδιο Ras παίζει πολλαπλό ρόλο στην καρκινογένεση, τόσο στην επιβίωση του καρκινικού κυττάρου, όσο και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (**Εικόνα B.7**). Η ενεργοποίησή του συμβαίνει μετά την φάση της μετάφρασης του γενετικού υλικού σε μια περίοδο που είναι γνωστή ως ‘farnesylation’. Προκειμένου να ανακοπεί αυτή η περίοδος έγινε προσπάθεια να ανευρεθούν ειδικά φάρμακα τα οποία είναι σήμερα γνωστά ως FTIs (Farnesyl Transferase Inhibitors) ⁽¹²⁵⁾. Στην πορεία ωστόσο αποδείχθηκε ότι τα FTIs δρουν σε μια non-Ras πρωτεΐνη, την Rho-B ⁽¹²⁶⁾.



Εικόνα Β.7 Σχηματική απόδοση της αναστολής των παραγόντων Ras, RAF και mTOR, σε συνδυασμό με αναστολείς της τυροσινικής κίνησης των υποδοχέων του EGF (EGFR), PDGF (PDGFR) και του VEGF (VEGFR) ⁽¹³⁰⁾.

Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, τα FTIs έκαναν τα καρκινικά κύτταρα πιο ακτινοευαίσθητα σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου ⁽¹²⁷⁾. Σε μια από τις μελέτες αυτές, η χρήση του FTIL-778,123 σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία οδήγησε σε πλήρη ανταπόκριση σε 2 από τους 3 ασθενείς και μάλιστα η θεραπεία έγινε καλά ανεκτή ⁽¹²⁸⁾. Τέλος, σε άλλη μελέτη επιπέδου I/II, ο συνδυασμός lonafarnib και paclitaxel επέφερε βελτίωση σε ασθενείς

με καρκίνο κεφαλής και τραχήλου και επί του παρόντος σχεδιάζονται κλινικές μελέτες φάσης II για τη διερεύνηση της ανταπόκρισης των ασθενών σε συνδυασμούς αντίστοιχων σχημάτων ⁽¹²⁹⁾.

Η πρωτεΐνη Raf συχνά υπερεκφράζεται σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου ^(131, 132). Το Sorafenib είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας της πρωτεΐνης Raf -1 και των BRAF κινασών και η δράση του μελετάται σε καρκίνους κεφαλής και τραχήλου ήδη από το 2003 ⁽¹³³⁾.

Η πρωτεΐνη mTOR είναι μια κινάση θρεονίνης-σερίνης που ρυθμίζει την ανάπτυξη σε κυτταρικό επίπεδο, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη, καθώς και τη λειτουργία των ριβοσωμάτων **(Εικόνα Β.7)** ⁽¹³⁴⁾. Η πρωτεΐνη mTOR είναι αρνητικός ρυθμιστής της μετάφρασης των P13K και AKT και εκφράζεται σε ποσοστό 57 - 82% σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου ⁽¹³⁵⁾.

Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, η χρήση ενός αναστολέα της πρωτεΐνης mTOR, του sirolimus (παλαιότερη ονομασία rapamycin), έχει επιφέρει σημαντική μείωση της αύξησης του όγκου ⁽¹³⁶⁾. Σήμερα, υπάρχουν τουλάχιστον 3 φαρμακευτικά ανάλογα του sirolimus με τις ονομασίες CC1-779, RAD001 και AP23573 **(Εικόνα Β.7)**. Επιπλέον, το sirolimus παρουσίασε συνεργική δράση με το erlotinib σε άλλη πειραματική μελέτη ⁽¹³⁷⁾.

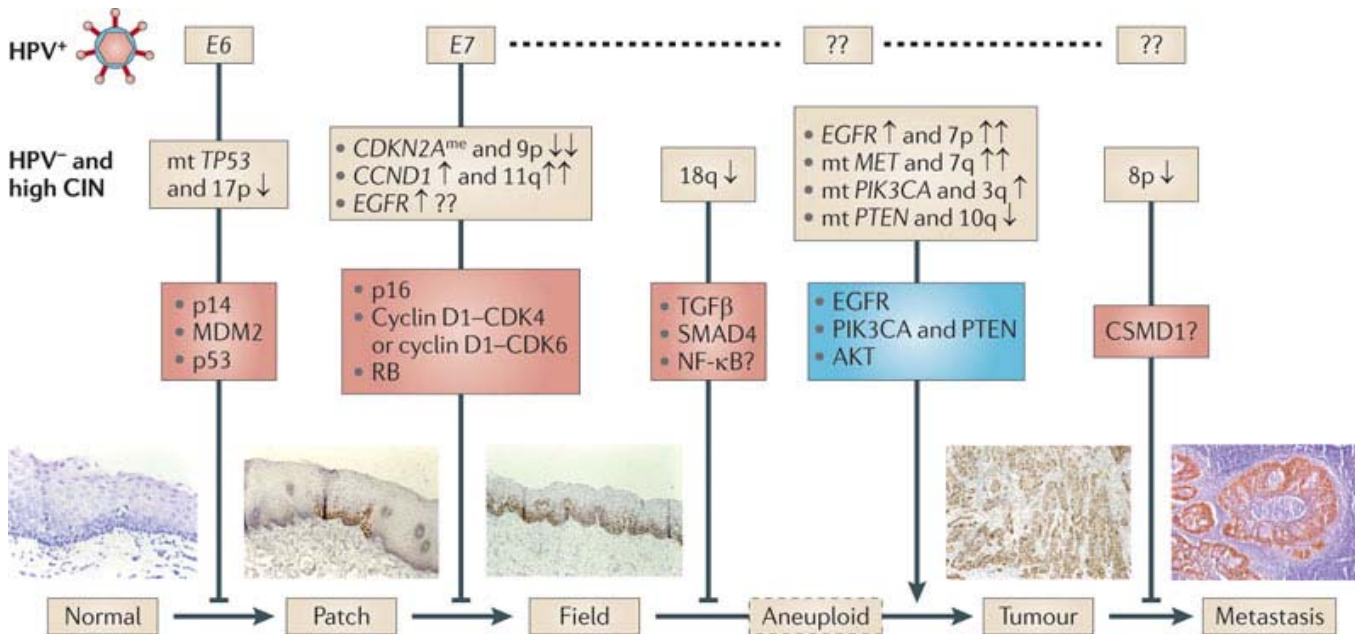
Επομένως, κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση της δράσης των mTOR αναστολέων, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο συνδυασμός τους με τους αναστολείς του EGFR και αναστολείς άλλων παραγόντων **(Εικόνα Β.7)**.

B.4.5 Εμβόλια έναντι των ιών HPV

Η εφαρμογή HPV - στοχευμένων θεραπειών σε καρκίνους σχετιζόμενους με τους ιούς αυτούς αποτελεί ενεργό πεδίο έρευνας. Σήμερα, κυκλοφορούν στο εμπόριο δυο τύποι εμβολίων κατά των ιών HPV, ένα διδύναμο εμβόλιο έναντι των τύπων HPV 16/18 (Germavix[®], GSK) και το τετραδύναμο εμβόλιο έναντι των τύπων HPV 6/11/16/18 (Gardasil[®], Merck). Έχοντας εξασφαλίσει άδεια κυκλοφορίας σχεδόν σε όλο τον κόσμο, τα εν λόγω εμβόλια έχουν δημιουργήσει πολλές προσδοκίες για την πρόληψη των λοιμώξεων, αλλά και των όγκων που σχετίζονται με τους ιούς HPV.

Αν και μέχρι σήμερα έχουν λάβει έγκριση για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε νεαρές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, διεξάγονται προοπτικές μελέτες για την αποτελεσματικότητά τους στην πρόληψη καρκίνων και προκαρκινωματοδών βλαβών άλλων ανατομικών περιοχών, όπως της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του πρωκτού στους άρρενες, ενώ έχει αναφερθεί και αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία υποτροπιάζουσας θηλωμάτωσης του λάρυγγα ^(138, 139). Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών, αλλά και η διαπίστωση μειωμένης συχνότητας ανίχνευσης HPV DNA στη στοματική κοιλότητα 4 έτη μετά τον εμβολιασμό νεαρών γυναικών με το διδύναμο εμβόλιο, καθιστούν επιτακτική τη διεξαγωγή προοπτικών μελετών για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων αυτών στην πρόληψη ορισμένων καρκίνων κεφαλής και τραχήλου, ιδιαίτερα σε άτομα νεαρής ηλικίας με ενεργό σεξουαλική ζωή ⁽¹⁴⁰⁾.

Ο τρόπος δράσης των ιών HPV στη δημιουργία ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου (HNSCC) δίνεται αναλυτικά στην **Εικόνα B.8**.



Εικόνα Β.8 Ο μηχανισμός δράσης των ιών HPV στην ανάπτυξη HNSCC (HPV+) σε αντιπαράθεση με τις περιπτώσεις HNSCC που δεν σχετίζονται με τους ιούς αυτούς, αλλά με πολλαπλές γενετικές μεταλλάξεις (HPV-, high CIN). **α.** Με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται οι γενετικές και χρωμοσωμικές τροποποιήσεις, **β.** με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα μονοπάτια που επηρεάζονται και τα οποία σχετίζονται με την ογκογένεση και **γ.** με κόκκινο χρώμα τα μονοπάτια που σχετίζονται με την ογκοκαταστολή⁽¹⁴¹⁾.

Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, στις περιπτώσεις HNSCC που σχετίζεται με τους ιούς HPV (HPV+), τα ογκογονίδια E6 και E7 των ιών αυτών ενσωματώνονται σε κάποιο βλαστικό κύτταρο του βλεννογόνου της στοματικής κοιλότητας. Τα ογκογονίδια αυτά προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη απενεργοποιώντας τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και p16, αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη p16 ανήκει στην κατηγορία των κυκλινοεξαρτώμενων αναστολέων κινάσων (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors, CDKIs)⁽¹⁴¹⁾.

Αντίστοιχα, στο μοντέλο αυτό γίνεται και αντιπαράθεση με τις περιπτώσεις καρκίνων που δεν σχετίζονται με τους ιούς HPV και οι οποίοι εμφανίζουν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων διαφόρων γονιδίων που δίνονται στα τετράγωνα με πορτοκαλί χρώμα (HPV-, high CIN), οδηγώντας σε παρόμοια αποτελέσματα με τη δράση των ιών HPV. Ακολούθως, δημιουργείται από το βλαστικό αυτό κύτταρο ένας στίχος γενετικά τροποποιημένων θυγατρικών κυττάρων (patch), τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν ανοσοϊστοχημικά, π.χ. με χρήση αντισωμάτων έναντι της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης p53. Τα κύτταρα αυτά είτε αποφεύγουν τους μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης, είτε μέσω της τροποποίησής τους αποκτούν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, αντικαθιστώντας σταδιακά το φυσιολογικό επιθήλιο. Τελικά, ένας κλώνος αυτών των κυττάρων θα εξελιχθεί σε μεταστατικό καρκίνωμα. Για τις περιπτώσεις καρκίνου που δεν σχετίζονται με τους ιούς HPV και οι οποίοι παρουσιάζουν μικρό αριθμό γενετικών τροποποιήσεων (HPV-, low CIN), ελάχιστα δεδομένα είναι γνωστά μέχρι σήμερα (141).

Αναφορικά με τις πρωτεΐνες CDKIs, αυτές ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: **α.** την κατηγορία p21 ($p21^{CIP1/waf1}$), που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες $p27^{KIP1}$ και $p57^{KIP2}$, καθώς και **β.** την κατηγορία INK4, που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$ και $p19^{INK4d}$ (142). Η p16 δεσμεύει τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες cdk4 και cdk6 και εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης pRb με αποτέλεσμα να επανέρχεται η δράση της pRb και να οδηγείται ο κυτταρικός κύκλος σε διακοπή. Η p21 ρυθμίζεται από την p53, ενώ η p27 είναι επίσης p53-εξαρτώμενη (142).

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένα 53 kD πολυπεπτίδιο, το οποίο δρα ως παράγοντας μεταγραφής και ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο, είτε καθελώνοντας τα κύτταρα στην

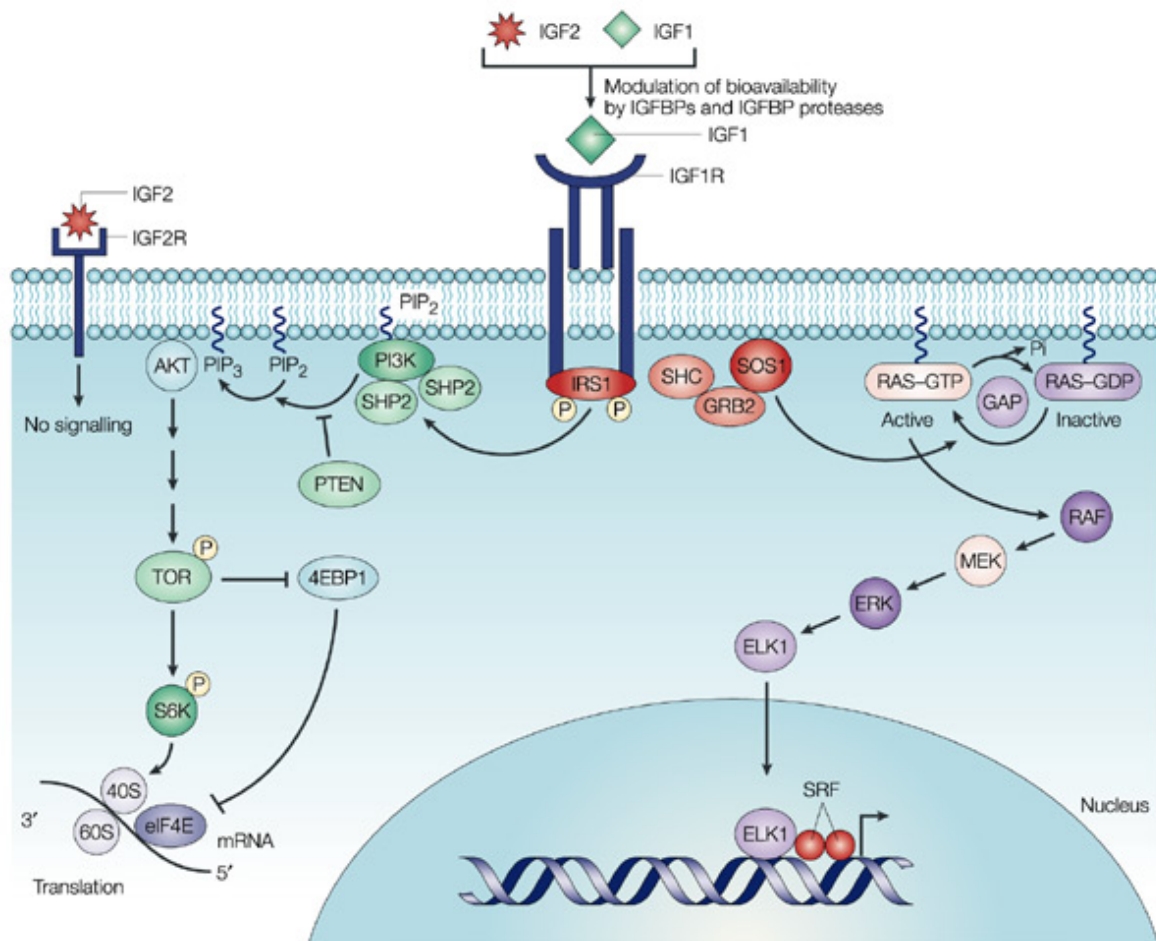
G1 φάση μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου *p21*, είτε προκαλώντας απόπτωση μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι Bax και GADD45. Επιπλέον η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη δέσμησης IGF-BP3, η οποία αναστέλλει τον αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης IGF και κατά συνέπεια προάγει την απόπτωση. Η παραγωγή της p53 ελέγχεται από την επαγωγή ενός αρνητικού ανατροφοδοτικού μηχανισμού, μέσω της MDM-2, μιας πρωτεΐνης που συνδέεται στο p53 προκαλώντας την αποδόμησή του ⁽¹⁴³⁾.

B.4.6 Στοχευμένη μοριακή θεραπεία έναντι του υποδοχέα IGF-1R

Ο υποδοχέας του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα – 1 (IGF-1R) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με δράση κινάσης της τυροσίνης, ο οποίος ενεργοποιείται από την πρόσδεση σε αυτόν των ινσουλινόμορφων αυξητικών παραγόντων -1 και -2 (IGF-1, IGF-2). Η παραγωγή των μορίων πρόσδεσης IGF-1 και IGF-2 αυξάνεται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα IGF-1R οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων δικτύων σημάτων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου, στα οποία περιλαμβάνονται το μονοπάτι PI3K-AKT-TOR και το σύστημα RAF-MAPK **(Εικόνα B.9)** ⁽¹⁴⁴⁾.

Η πρόσδεση των μορίων IGF-1 και IGF-2 στον υποδοχέα IGF-1R και άρα η ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού υπόκειται σε ρύθμιση μέσα από πολλούς μηχανισμούς. Διάφορες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στους παράγοντες IGF-1 και -2 (IGFBPs) παρατείνουν το χρόνο ημίσειας ζωής των παραγόντων αυτών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας του υποδοχέα IGF-1R. Ωστόσο, οι

πρωτεΐνες IGFBPs έχουν συγγένεια και για τον ίδιο τον υποδοχέα IGF-1R αντίστοιχη με αυτή των IGF και λειτουργούν ανταγωνιστικά στην πρόσδεση των IGF-1 και -2 σε αυτόν. Το γεγονός αυτό αποτελεί τη βάση του ανασταλτικού ρόλου των IGFBPs στην ενεργοποίηση του IGF-1R. Επιπρόσθετα, πρωτεάσες των IGFBPs, οι οποίες συχνά παράγονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα, απελευθερώνουν τους δεσμευμένους παράγοντες IGF-1 και IGF-2 από τις IGFBPs αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των παραγόντων και κατ' επέκταση και τη δραστηριότητα του υποδοχέα IGF-1R (Εικόνα Β.9) ⁽¹⁴⁴⁾.



Εικόνα Β.9 Σχηματική απόδοση του τρόπου ενεργοποίησης του υποδοχέα IGF-1R. Οι παράγοντες IGF-1 και -2 προσδένονται στον υποδοχέα και τον ενεργοποιούν. Οι πρωτεΐνες IGFBPs και οι πρωτεάσες τους λειτουργούν ρυθμιστικά (βλ. κείμενο). (Προσαρμογή από Pollak και συν. 2004) ⁽¹⁴⁴⁾.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, αναπτύχθηκαν διάφορες θεραπείες, εναντίον του υποδοχέα του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα – 1 (IGF-1R)⁽¹⁴⁵⁾. Παρόλα αυτά η κλινική εμπειρία από την εφαρμογή αυτών των θεραπειών στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου είναι ακόμη περιορισμένη.

Πρόσφατη μελέτη φάσης II διερεύνησε την πιθανή αποτελεσματικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος figitumumab (CP 751.871, fully human anti-IGF-1 RIgG2mAb) σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα/μεταστατικό HNSCC, οι οποίοι εμφάνιζαν ανταπόκριση σε παρηγορητική χημειοθεραπεία με πλατίνες. Από την εφαρμογή αυτού του αντισώματος δεν προήλθε κάποιο σημαντικό κλινικό όφελος⁽¹⁴⁶⁾. Άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II η οποία ολοκληρώθηκε τον Ιούλιο του 2012 διερεύνησε την αποτελεσματικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος cixutumumab (IMC-A12, fully human anti-IGF-1 RIgG1mAb) ως μονοθεραπεία, αλλά και σε συνδυασμό με το αντίσωμα cetuximab, σε περιπτώσεις υποτροπιάζοντος/μεταστατικού HNSCC, χωρίς ακόμη τα αποτελέσματά της να έχουν δημοσιευθεί⁽¹⁴⁷⁾.

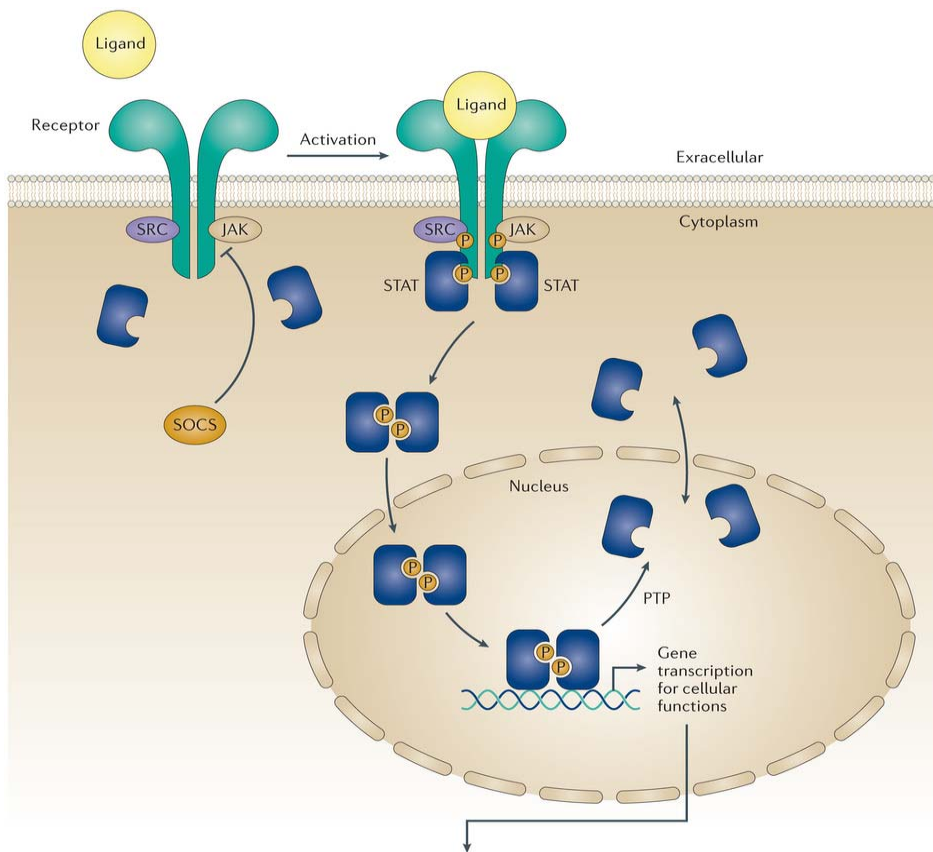
Συμπερασματικά, η ραγδαία πρόοδος που σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση των μηχανισμών της μοριακής βιολογίας του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου συνέβαλε στην ανάπτυξη νέων θεραπειών, οι οποίες περιλαμβάνουν και στοχευμένους μοριακούς δείκτες. Τα δεδομένα που έχουν προέλθει από τις υπάρχουσες μέχρι σήμερα κλινικές μελέτες, δημιουργούν υποσχέσεις για αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου στο μέλλον, ενώ επί του παρόντος μόνο οι EGFR αναστολείς εφαρμόζονται στην κλινική πράξη με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Γ. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ STAT ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Η οικογένεια των πρωτεϊνών επαγωγής σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STATs, Signal Transducers and Activators of Transcription) ήρθε στο προσκήνιο στη δεκαετία του '90, κατά τη διάρκεια της έρευνας της μεταγραφής γονιδίων σε απάντηση της δράσης των ιντερφερονών -α και -γ ⁽¹⁴⁸⁾. Συνολικά μέχρι σήμερα, 7 πρωτεΐνες έχουν συμπεριληφθεί στην οικογένεια αυτή και συγκεκριμένα οι STAT1,2,3,4,5A,5B και η STAT6 **(Εικόνα Γ.1)** ^(148, 149).

Η ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης και η μετακίνησή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου, διαδραματίζει τον ρόλο του μεταφορέα ενδοκυττάρων σημάτων ⁽¹⁵⁰⁾. Η σύνδεσή τους ακολούθως με συγκεκριμένες περιοχές του DNA, οδηγεί στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την ανανέωση των κυτταρικών δομών, καθώς και με άλλες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες **(Εικόνα Γ.1)** ⁽¹⁵⁰⁾. Παρόλο που σε κάποιο βαθμό και οι μη φωσφορυλιωμένες μορφές αυτών των πρωτεϊνών (USTATs), όπως η USTAT1 μπορούν να προσδεθούν στο DNA του κυττάρου, η συγγένεια πρόσδεσης που εμφανίζουν είναι πολύ μικρότερη από αυτή της φωσφορυλιωμένης μορφής τους (PSTATs) ⁽¹⁵¹⁾.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έχουν αναδείξει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι STATs πρωτεΐνες και ιδίως η STAT1, σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, το μελάνωμα, το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, διάφοροι τύποι λεμφώματος και λευχαιμίας, συμπεριλαμβανομένου και του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της κεφαλής και του τραχήλου ^(150, 152 – 158).



Εικόνα Γ.1

Σχηματική απεικόνιση του τρόπου ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STATs, μέσω της διαδικασίας φωσφορυλίωσης (P), μετά από την πρόσδεση κατάλληλου μορίου (Ligand) στον υποδοχέα του (Receptor).

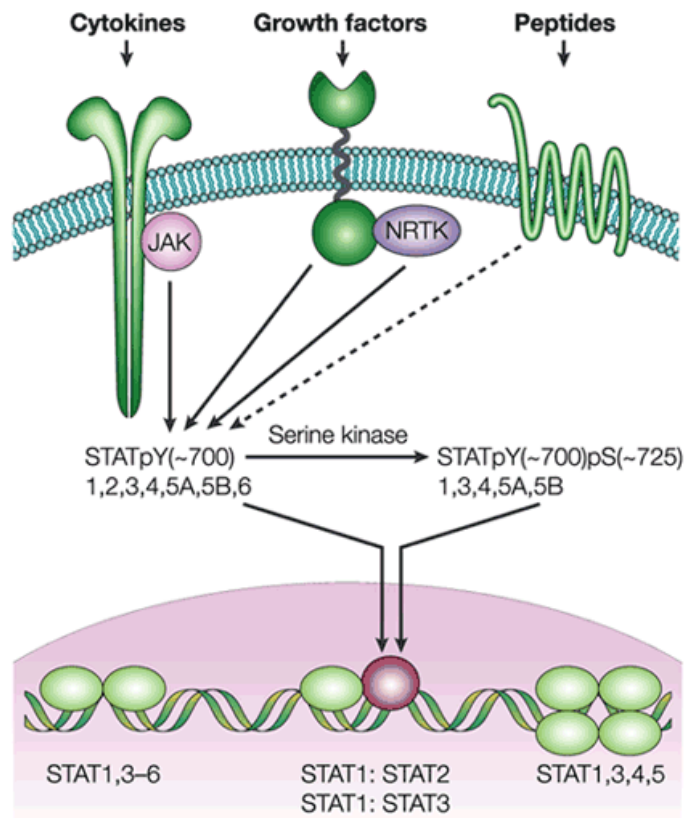
Η φωσφορυλίωση (P) λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια των JAK κινασών και οδηγεί στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας διαφόρων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών λειτουργιών που αναφέρονται στο διπλανό πίνακα ⁽¹⁵⁹⁾.

STAT	Κυτταρικές Λειτουργίες
1	- Κυτταρική αύξηση και απόπτωση - Παραγωγή κυτοκινών από T_H1 κύτταρα - Άμυνα κατά των μικροβίων
2	Μεσολαβητής σήματος από IFNα/IFNβ
3	- Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επιβίωση - Φλεγμονή - Ανοσολογική απόκριση - Εμβρυϊκή διάπλαση - Κινητικότητα κυττάρων
4	- Διαφοροποίηση των T_H1 κυττάρων - Φλεγμονώδεις αποκρίσεις - Κυτταρικός πολλαπλασιασμός
5A	- Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επιβίωση - Έκφραση της IL-2Rα στα T λεμφοκύτταρα - Ανάπτυξη του μαζικού αδένα - Σηματοδότηση παραγωγής γάλακτος
5B	- Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επιβίωση - Έκφραση της IL-2Rα στα T λεμφοκύτταρα - Σεξουαλικός διμορφισμός του ρυθμού σωματικής αύξησης - Κυτταρολυτική δραστηριότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (NK)
6	- Απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στη φλεγμονή και στις αλλεργίες - Πολλαπλασιασμός των B και T κυττάρων - Διαφοροποίηση των T_H2 κυττάρων

Γ.1. Η διαδικασία ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STATs

Οι πρωτεΐνες STATs βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, ως απόκριση του κυττάρου σε μια σειρά εξωκυττάρων σημάτων. Μεσολαβητές των σημάτων αυτών είναι διάφορες ιντερφερόνες, αυξητικοί παράγοντες, όπως οι EGF και PDGF, κυττοκίνες, καθώς και ορμόνες και πεπτίδια **(Εικόνα Γ.2)** ⁽¹⁴⁸⁾. Η πρόσδεση των παραπάνω μεσολαβητών στους υποδοχείς τους στη μεμβράνη του κυττάρου, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης και τη δημιουργία θέσεων πρόσδεσης για τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών STAT, μέσω των -SH2 περιοχών του μορίου τους ⁽¹⁶⁰⁾. Μετά την πρόσδεση της πρωτεΐνης STAT, ακολουθεί και η φωσφορυλίωση αυτής, η οποία διενεργείται μέσω των Janus κινασών (JAKs) που βρίσκονται σε στενή σύνδεση με μερικούς από τους προαναφερόμενους υποδοχείς αλλά και άμεσα, όπως στην περίπτωση του υποδοχέα του EGFR, ο οποίος έχει ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης **(Εικόνα Γ.2)** ⁽¹⁶¹⁾. Επιπλέον και άλλα μόρια που δεν σχετίζονται με κυτταρικούς υποδοχείς, όπως είναι οι πρωτεΐνες src και bal, μπορούν να ενεργοποιήσουν τις πρωτεΐνες STATs μέσω φωσφορυλίωσης ⁽¹⁴⁹⁾.

Μετά τη φωσφορυλίωσή τους, τα μόρια των πρωτεϊνών STAT αποχωρίζονται από τον υποδοχέα και σχηματίζουν ενεργά ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, μέσω πρόσδεσης της φωσφοτυροσίνης του ενός μορίου και της -SH2 περιοχής ενός άλλου μορίου STAT πρωτεΐνης **(Εικόνα Γ.2)** ⁽¹⁶⁰⁾. Τα ενεργά διμερή των STAT στη συνέχεια μετακινούνται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου προσδένονται σε κατάλληλες θέσεις του DNA που βρίσκονται σε περιοχές του προαγωγέα διαφόρων γονιδίων στόχων, ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών **(Εικόνα Γ.2)** ⁽¹⁶⁰⁾.



Εικόνα Γ.2 Η φωσφορυλίωση του κατάλοιπου τυροσίνης και σερίνης των πρωτεϊνών STATs και ο σχηματισμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών (Levy και Darnell 2002) ⁽¹⁶²⁾.

Επομένως, η φωσφορυλίωση των STAT μορίων στην τυροσίνη αποτελεί το πρώτο ουσιαστικό βήμα για την ενεργοποίησή τους και σχετίζεται άμεσα με την ικανότητά τους να συνδέονται με το DNA και να επάγουν τη μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων. Ωστόσο, εκτός από την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, η φωσφορυλίωση επιπλέον ενός κατάλοιπου σερίνης σε συγκεκριμένη περιοχή του μορίου ορισμένων STAT πρωτεϊνών, ιδίως των STAT1 και STAT3, οδηγεί σε μέγιστη δραστηριότητα του μορίου αναφορικά με την επίδρασή του στη μεταγραφή γονιδίων (Εικόνα Γ.2) ⁽¹⁶³⁾. Σε πολλές όμως περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση της σερίνης έχει συσχετιστεί και με αρνητική ρύθμιση της δράσης

των STATS στη μεταγραφή, μέσω μίας σειράς μηχανισμών που ακόμα δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως ⁽¹⁶⁰⁾.

Γ.2. Ο ρόλος των πρωτεϊνών STATS στον καρκίνο

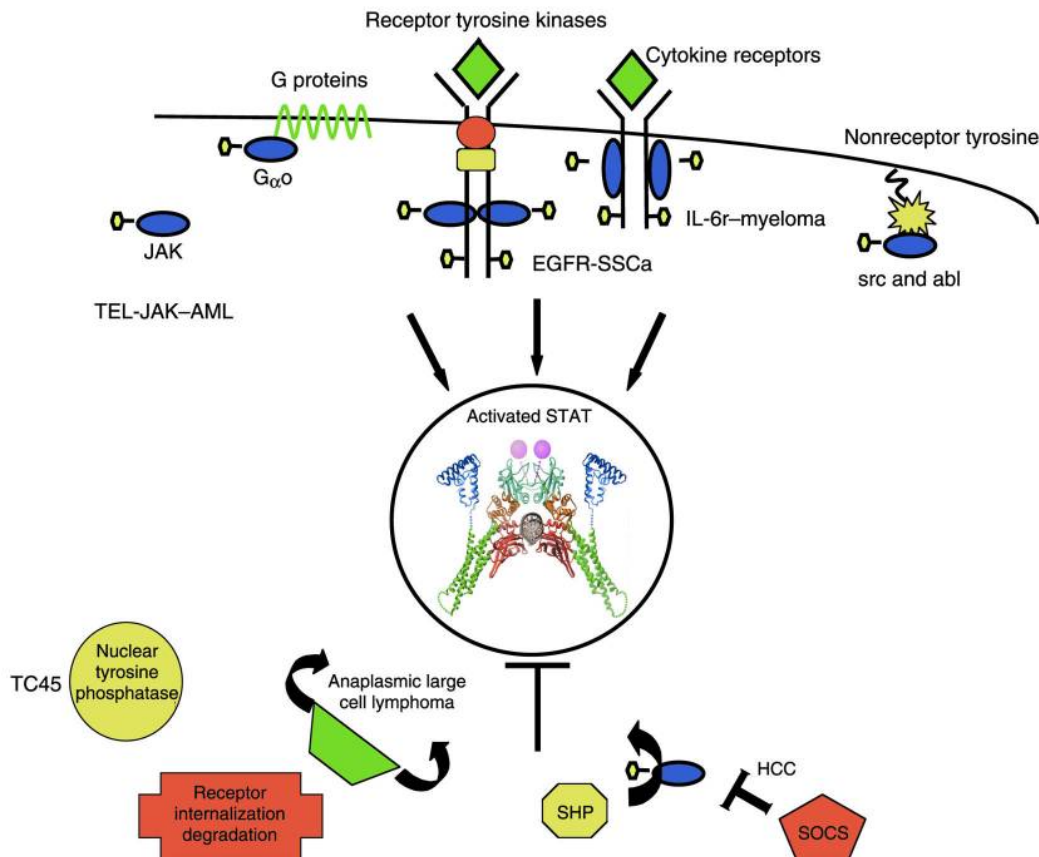
Στα φυσιολογικά κύτταρα η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STATS αποτελεί μια παροδική λειτουργία, που διαρκεί από λίγα λεπτά μέχρι μερικές ώρες. Αντίθετα, στα καρκινικά κύτταρα, οι STAT πρωτεΐνες απορρυθμίζονται προάγοντας την ογκογένεση **(Εικόνα Γ.3)** ⁽¹⁶⁰⁾. Επειδή όμως οι πρωτεΐνες STATS συμμετέχουν τόσο σε προαποπτωτικά, όσο και σε αντιαποπτωτικά μονοπάτια, ανάλογα με τον ιστό, τον τύπο της πρωτεΐνης STAT που ενεργοποιείται και το τελικό γονίδιο στόχο, οι συνέπειες της επίδρασής τους στην έναρξη και στην πορεία της ογκογένεσης είναι δύσκολο να προβλεφθούν ⁽¹⁶⁰⁾.

Μέχρι σήμερα τα περισσότερα ερευνητικά δεδομένα για το ρόλο των πρωτεϊνών STAT στην ογκογένεση αφορούν τις πρωτεΐνες STAT3, STAT5 και STAT1.

Γ.2.1. Η επίδραση των πρωτεϊνών STAT3 και STAT5 στην ογκογένεση

Ο επαγωγέας σήματος STAT3 και σε μικρότερο βαθμό ο STAT5 είναι συνεχώς ενεργοποιημένοι και εκφράζονται ισχυρά σε πολλές κακοήθειες, όπως σε καρκίνο του μαστού, του προστάτη, του εγκεφάλου, του αιμοποιητικού ιστού, αλλά και σε καρκίνο κεφαλής και τραχήλου **(Εικόνα Γ.3)** ⁽¹⁶⁴⁾. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 οδηγεί στην παραγωγή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης survivin ⁽¹⁶⁵⁾. Με τον τρόπο αυτό η πρωτεΐνη STAT3 συμβάλλει στην ογκογένεση μέσω συνεχούς διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από την άλλη, η συνεχής και μη ελεγχόμενη σηματοδότηση, μέσω

της πρωτεΐνης STAT5, οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση γονιδίων που παράγουν την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large protein) και το ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη-D1⁽¹⁶⁶⁾.



Εικόνα Γ.3

Διάφορα μονοπάτια που οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT στα καρκινικά κύτταρα, ιδίως της STAT3, στα οποία συγκαταλέγονται:

1. Η υπερέκφραση ή απορρύθμιση διαφόρων κινασών, όπως η TEL-JAK κινάση που προκαλεί αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα μέσω της δράσης της στις STATs 1, 3 και 5.
2. Η υπομονάδα $G_{\alpha O}$ της ογκογενετική πρωτεΐνης G που επιδρά στις JAK κινάσες, οδηγώντας σε υπερδραστικότητα της STAT3 σε κυτταρικές σειρές NIH3T3.
3. Η υπερέκφραση και η απορρύθμιση του υποδοχέα EGFR και του μορίου πρόσδεσης αυτού TGF- α διεγείρουν την ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα EGFR και των κινασών JAK και Src, οδηγώντας σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα.
4. Η υπερέκφραση του υποδοχέα της IL-6, αλλά και της ίδιας της IL-6 διεγείρουν τη δράση της STAT3 στο πολλαπλούν μυέλωμα.
5. Μη φυσιολογική ρύθμιση των ογκοπρωτεϊνών Src και Abl προκαλεί εκσεσημασμένη φωσφορυλίωση της STAT3 στα σαρκώματα και στη ΧΜΛ.
6. Η μεθυλίωση του γονιδίου SOCS1 ενεργοποιεί τις JAK κινάσες 1 και 2, οδηγώντας σε παρατεταμένη φωσφορυλίωση της STAT3 σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα.
7. Η απώλεια έκφρασης του γονιδίου PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT3) οδηγεί σε διαταραχή της δραστηριότητας της STAT3 στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα⁽¹⁵⁰⁾.

Επομένως, η στόχευση των ενεργών STAT3 μορίων είναι δυνατό να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ή να τα οδηγήσει στην απόπτωση και έχει προταθεί ως μια πολλά υποσχόμενη μοριακή τεχνική για τη θεραπεία του καρκίνου ⁽¹⁶⁴⁾.

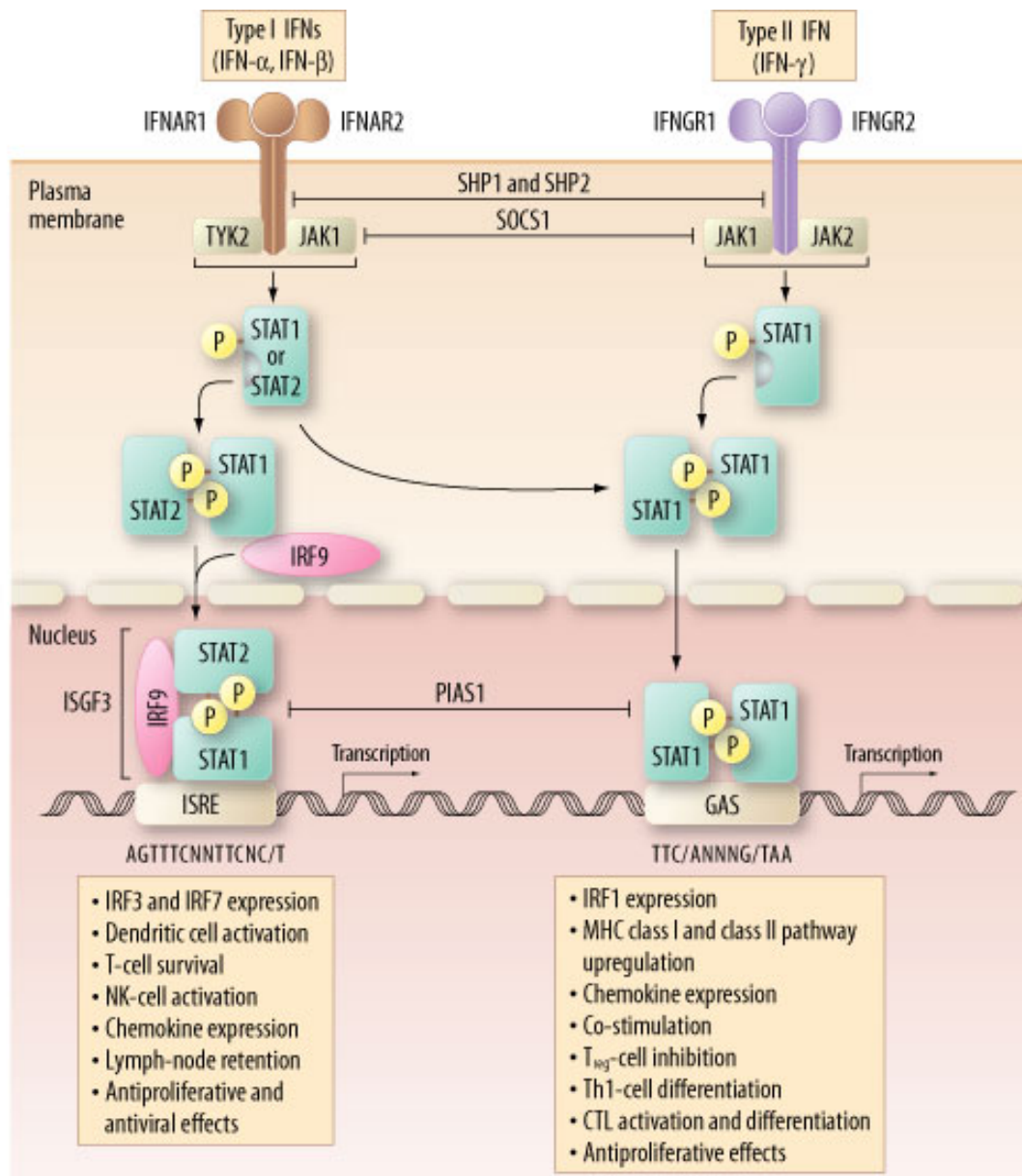
Γ.2.2. Η πρωτεΐνη STAT1 ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, το μόριο STAT1 θεωρείται ογκοκατασταλτικός παράγοντας που εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη και προάγει την απόπτωση. Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί με τους οποίους δρα δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί.

Η C τελική περιοχή του μορίου της STAT1 περιλαμβάνει μία περιοχή πρόσδεσης σε διάφορα γονίδια και δύο περιοχές φωσφορυλίωσης: **α.** Μία τυροσίνη στη θέση 701, η οποία ενεργοποιείται από τις Janus κινάσες (JAKS) και **β.** μία σερίνη στη θέση 727, η οποία ενεργοποιείται από τις MAP κινάσες (mitogen-activated protein). Η διμεροποίηση και μεταφορά του STAT1 στον πυρήνα εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 701, ενώ η φωσφορυλίωση της σερίνης 727 είναι απαραίτητη για τη μέγιστη δραστηριότητα της STAT1 ⁽¹⁶³⁾.

Πειραματικά δεδομένα, έχουν δείξει ότι η έλλειψη του STAT1 σε ποντίκια μπορεί μεν να μη σχετίζεται με αυτόματη ανάπτυξη όγκων σε αυτά, ωστόσο τα καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητα στην εμφάνιση όγκων από χημικά καρκινογόνα ⁽¹⁶⁶⁾. Επιπλέον, η πρωτεΐνη STAT1 έχει άμεσα συσχετιστεί και με την απόπτωση των κυττάρων. Για παράδειγμα, η έλλειψη αυτής σε ανθρώπινα U3A κύτταρα ινοσαρκώματος, τα καθιστά λιγότερο επιρρεπή στη δράση του TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), συγκριτικά με μητρικά κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη STAT1 ⁽¹⁶⁷⁾. Άλλες έρευνες υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση του STAT1 παρουσία

ιντερφερόνης μπορεί να προάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσει αναστολή της αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού (**Εικόνα Γ.4**)^(157, 169).



Εικόνα Γ.4 Τα μονοπάτια διαμεταγωγής σήματος και μεταγραφής που μεσολαβούνται από τη δράση των ιντερφερονών. Στο σχήμα αυτό φαίνεται ο ρόλος που επιτελούν τα ετεροδιμερή και ομοδιμερή της πρωτεΐνης STAT1 με την επίδρασή τους σε πλήθος κυτταρικών λειτουργιών, μέσα από τον έλεγχο της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων. Μεταξύ των κυτταρικών λειτουργιών που επηρεάζονται συγκαταλέγεται και η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁽¹⁶⁹⁾.

Μέχρι σήμερα έχει πραγματοποιηθεί μικρός αριθμός μελετών για τη διερεύνηση της επίδρασης της πρωτεΐνης STAT1 σε ανθρώπινα καρκινικά δείγματα. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη STAT1 έχει ογκοκατασταλτική δράση, η έκφρασή της συνήθως είναι μειωμένη σε διάφορους τύπους καρκίνου ^(152 - 155). Όσον αφορά το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, έχει αναφερθεί υπερμεθυλίωση του επαγωγέα του *STAT1* ως πιθανός μηχανισμός της ελαττωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης, σε περιορισμένο όμως αριθμό δειγμάτων και χωρίς να έχουν πραγματοποιηθεί συσχετίσεις με κλινικές παραμέτρους της νόσου ⁽¹⁵⁴⁾.

Στις περισσότερες από τις μελέτες αυτές η έκφραση της πρωτεΐνης έχει διερευνηθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους με τη χρήση αντι-STAT1 αντισωμάτων. Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί, τόσο για τον καρκίνο του μαστού όσο και του παχέος εντέρου, ότι σε περιπτώσεις όπου διαπιστώνεται αύξηση της έκφρασής της πρωτεΐνης STAT1, αυτή σχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών ^(153, 155). Αναφορικά όμως με το ΑΚΣ υπάρχει μόνο μία μελέτη, η οποία μάλιστα έχει συσχετίσει την ανοσοϊστοχημική έκφραση της STAT1 πρωτεΐνης με καλύτερη ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία ⁽¹⁷⁰⁾.

Συμπερασματικά, υπάρχουν ενδείξεις για τον ογκοκατασταλτικό ρόλο που επιτελεί η αυξημένη έκφραση του γονιδίου STAT1 σε διάφορες μορφές καρκίνου και ότι η δράση αυτή αναστέλλεται μέσα από τη μεθυλίωση του επαγωγέα του γονιδίου. Εντούτοις, η συχνότητα και η κλινική σημασία αυτών των φαινομένων στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο και σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελούν:

1. Η διερεύνηση πιθανών διαφορών στην ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης STAT1, καθώς και της ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένης) μορφής αυτής (PSTAT1), ανάμεσα σε ιστούς προερχόμενους από περιοχές με ΑΚΣ και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, έχοντας ως υλικό χειρουργικά παρασκευάσματα από ασθενείς με ΑΚΣ.
2. Η πιθανή συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών STAT1 και PSTAT1 με *ιστοπαθολογικές παραμέτρους*, όπως το μέγεθος του όγκου, το στάδιο της νόσου κ.ά., αλλά και με *κλινικές παραμέτρους*, όπως είναι το χρονικό διάστημα ελεύθερο νόσου και η συνολική επιβίωση των ασθενών.
3. Τέλος, αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί και η διερεύνηση πιθανών διαφορών στην ανταπόκριση των ασθενών στη συμπληρωματική θεραπεία, αναφορικά με τις ανοσοϊστοχημικές παραμέτρους της έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΑΣΘΕΝΕΙΣ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Α.1. Ασθενείς και δείγματα ιστών

Η μελέτη συμπεριέλαβε μια ομοιογενή ομάδα 49 ασθενών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο της στοματικής κοιλότητας από το 2004 μέχρι το 2009 και για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα των νεοπλασματικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών σε κύβους παραφίνης. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται από την Πανεπιστημιακή Κλινική της Στοματικής και ΓναθοΠροσωπικής Χειρουργικής του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός.

Οι ιατρικοί φάκελοι των ασθενών μελετήθηκαν αναδρομικά όσον αφορά πληροφορίες σχετικά με το φύλο, την ηλικία, την εντόπιση του όγκου, το είδος της χειρουργικής επέμβασης και προδρομικά όσο αφορά τις συμπληρωματικές μεθόδους θεραπείας, την ύπαρξη υποτροπής και την επιβίωση μέχρι και 7 χρόνια μετά, σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα παρακολούθησης του στοματικού καρκίνου ^(39, 171, 172). Με στόχο τη συλλογή ιστοπαθολογικών πληροφοριών έγινε επανεξέταση αντιπροσωπευτικών ιστολογικών τομών του όγκου από το κύριο χειρουργικό παρασκεύασμα και καταγραφή παραμέτρων όπως: ο βαθμός διαφοροποίησης, τα όρια εκτομής, καθώς και η ύπαρξη περινευρικής και περιαγγειακής διήθησης.

Η απόφαση για χορήγηση συμπληρωματικής θεραπείας λαμβανόταν στο ογκολογικό συμβούλιο, έχοντας υπόψη τις επιθυμίες και τις ιδιαιτερότητες του κάθε ασθενή, τη γενική κατάσταση της υγείας του, καθώς και διάφορα κριτήρια από τις ιστοπαθολογικές παράμετρους του χειρουργικού παρασκευάσματος, σύμφωνα πάντα με τις συστάσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας, όπως έχουν ήδη εκτεθεί στο Γενικό Μέρος της παρούσας μελέτης (**Γενικό Μέρος, Παράγραφος Β.2, σελ. 37**) ^(38, 39, 54).

Η πραγματοποίηση της έρευνας εγκρίθηκε από τις επιτροπές δεοντολογίας του Νοσοκομείου «ο Ευαγγελισμός» και του Πανεπιστημίου Αθηνών.

A.2. Ανοσοϊστοχημική χρώση

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, η οποία αποτελεί σχετικά απλή και γρήγορη μέθοδο εκτίμησης της έκφρασης πρωτεϊνών σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισμένους σε παραφίνη. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημεία συνοδεύεται από μεγάλη ευαισθησία, απαιτεί τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και επιτρέπει την επανεκτίμηση των αποτελεσμάτων, καθώς η χρώση δεν εξασθενεί ιδιαίτερα με την πάροδο του χρόνου ^(173, 174).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία αποτελούν προϊόντα των κλωνικών απογόνων ενός υβριδικού πλασματοκυττάρου, υπερτερούν των πολυκλωνικών καθώς έχουν ειδικότητα για ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο ^(173, 174). Μειονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τα πολυκλωνικά ^(173, 174). Το οπτικά ανιχνεύσιμο υλικό που χρησιμοποιείται για σήμανση των αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία ποικίλλει, ενώ η υπεροξειδάση αποτελεί το συχνότερα χρησιμοποιούμενο ένζυμο ^(173 - 175). Το οπτικό αποτέλεσμα είναι συνέπεια της ιδιότητας του ενζύμου να μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και να οξειδώνει το χρωμογόνο σε μία χρωματισμένη μορφή. Από το σύνολο των διαθέσιμων χρωμογόνων, μόνο η διαμινοβενζιδίνη (DAB) σχηματίζει αδιάλυτο ίζημα το οποίο διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα ^(173, 174).

Οι βασικότερες μέθοδοι εντοπισμού του πρωτογενούς αντισώματος είναι:

1. Η άμεση μέθοδος,
2. Η έμμεση μέθοδος,

3. Η έμμεση μέθοδος τριών βημάτων:

- α. Μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP),
- β. Μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC).

Η μέθοδος της αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης αποτελεί την τεχνική που χρησιμοποιείται συχνότερα. Οι αβιδίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με τη βιταμίνη βιοτίνη με πολύ μεγάλη συγγένεια. Το πρωτογενές αντίσωμα ανιχνεύεται από το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι βιοτινυλιωμένο. Το υλικό σήμανσης εντοπίζεται στο δευτερογενές αντίσωμα μέσω ενός συμπλέγματος αβιδίνης, βιοτίνης και υπεροξειδάσης ^(173, 174).

Η στρεπταβιδίνη είναι μία πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης η οποία αποτελείται από 4 πανομοιότυπες υπομονάδες, η κάθε μία από τις οποίες φέρει θέση δέσμευσης για τη βιοτίνη. Η μέθοδος της στρεπταβιδίνης έχει ευρεία εφαρμογή τα τελευταία χρόνια καθώς συνοδεύεται από το πλεονέκτημα της ελαττωμένης μη ειδικής χρώσης (background staining) ^(173 - 176).

Η ευαισθησία της ανοσοϊστοχημείας επηρεάζεται από παράγοντες που οδηγούν σε μείωση της αντιγονικότητας λόγω επικάλυψης των επιτόπων, όπως είναι η διαδικασία της μονιμοποίησης του ιστού και του εγκλεισμού σε παραφίνη. Επίσης, η εντόπιση του αντιγόνου μπορεί να επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου καθώς τα αντισώματα έχουν δυσκολότερη πρόσβαση σε αντιγόνα που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων ^(173 - 176). Η διαταραχή της αντιγονικότητας η οποία σχετίζεται με τις διαδικασίες μονιμοποίησης και εγκλεισμού, αποκαθίσταται σε κάποιο βαθμό με αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων είτε με επώαση σε διαλύματα πρωτεασών (π.χ. θρυψίνη), είτε με τη χρήση του φούρνου μικροκυμάτων ^(173 - 176).

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να ελαττωθεί λόγω παραμέτρων όπως η ύπαρξη κοινής αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ του υπό μελέτη αντιγόνου και άλλων μορίων, η σύνδεση της Fc μοίρας του πρωτογενούς αντισώματος με υποδοχείς φαγοκυττάρων, μαστοκυττάρων ή συμπλήρωμα, καθώς και η επιμόλυνση του παρασκευάσματος του πρωτογενούς αντισώματος με άλλα αντισώματα ^(173 - 175). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ειδικότητα της ανοσοϊστοχημείας είναι η ύπαρξη ενδογενούς δραστηριότητας υπεροξειδάσης, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βιοτίνης σε ιστούς όπως το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί κ.ά ^(173 - 175).

Τα παρασκευάσματα της παρούσας μελέτης είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και εγκλεισθεί σε παραφίνη.

Χρησιμοποιήθηκαν κύβοι παραφίνης από τους οποίους ελήφθησαν τομές πάχους 5μm οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες που είχαν επικαλυφθεί με λεπτό στρώμα πολύ-L-λυσίνης για να μην αποκολληθούν. Ακολούθησε αποπαραφίνωση των ιστολογικών τομών με τη χρήση ξυλόλης (10min × 2) και στη συνέχεια ενυδάτωση σε κατιούσα συγκέντρωση αλκοολικών διαλυμάτων:

- Αλκοόλη 100° (5min × 2),
- Αλκοόλη 96° (2min × 1),
- Αλκοόλη 80° (2min × 1),
- Αλκοόλη 70° (2min × 1) και
- αποσταγμένο H₂O για 5min.

Το επόμενο στάδιο αφορούσε στην αντιγονική ανάκληση (αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων) για την οποία οι τομές επώασθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (5min × 2) εντός ρυθμιστικού διαλύματος 0,01 mol/L κιτρικού Na (1000 ml απεσταγμένο H₂O + 2,1g κιτρικό Na / pH 6,0) και στη συνέχεια παρέμειναν εντός του

διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 20min. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε και για τα δύο αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Ακολούθησε η διαδικασία της κατανάλωσης ενδογενούς υπεροξειδάσης με την εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα: 98ml μεθανόλη + 2ml H₂O 30% για 20min και ξέπλυμα (5min × 3) με TBS (900ml NaCl 0,9% + 100ml Tris pH 7,6 / pH 7,6). Το επόμενο βήμα στη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας περιλάμβανε τη δέσμευση σημείων μη ειδικής σύνδεσης των ανοσοσφαιρινών με επώαση για 20min σε TBSBSA (10ml TBS – 0,1gr αλβουμίνη).

Ακολούθησε η προσθήκη του κατάλληλα διαλυμένου πρωτογενούς αντισώματος (αραιωμένου σε TBS που περιέχει BSA 2%) και ολονύκτια επώαση των ιστολογικών τομών στους 4°C. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης PSTAT1 και των συνολικών πρωτεϊνικών επιπέδων STAT1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

Μετά το ξέπλυμα του αντισώματος (× 3) με TBS, οι τομές επώασθηκαν με τα αντιδραστήρια του συστήματος ανίχνευσης Stravigen Multilink HRP - concentrated detection kit (Biogenex Laboratories, USA, dilution 1:80). Συγκεκριμένα, οι ιστολογικές τομές επώασθηκαν για 20min σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερογενές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, ακολούθησε ξέπλυμα (5min × 3) με TBS και στη συνέχεια επώασθηκαν με το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης – βιοτίνης – υπεροξειδάσης για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 ξεπλύματα με TBS, η αντίδραση υπεροξειδάσης εμφανίσθηκε με 0,025% διαμινοβενζιδίνη / 0,1% H₂O₂ σε Tris. Τέλος, η αιματοξυλίνη χρησιμοποιήθηκε για την πυρηνική χρώση και ακολούθησε αφυδάτωση των ιστολογικών τομών σε ανιούσα αλκοολών.

A.3. Παθολογοανατομική μελέτη

Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, οι τομές μελετήθηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, στους οποίους δεν ήταν γνωστά ούτε άλλα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα, ούτε πληροφορίες σχετικές με την κλινική έκβαση των αντίστοιχων ασθενών. Όταν η εκτίμηση των δύο παρατηρητών διέφερε σε ποσοστό 10% ή περισσότερο ή οδηγούσε σε διαφορετικό επίπεδο ανοσοδραστικότητας, ακολουθούσε επανεκτίμηση της περίπτωσης με σκοπό την επίτευξη συμφωνίας μεταξύ τους. Εκτός από το νεοπλασματικό ιστό, παρακείμενος καλοήγητος ιστός. (χωρίς στοιχεία υπερπλασίας, δυσπλασίας ή φλεγμονώδους αντίδρασης του συνδετικού ιστού) ήταν διαθέσιμος για ανοσοϊστοχημική μελέτη, είτε στην ίδια, είτε σε διαφορετικές ιστολογικές τομές.

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αξιολογήθηκαν αναφορικά με: **1)** την ένταση της πυρηνικής χρώσης των STAT1, PSTA1 και **2)** το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση για τις STAT1 και PSTA1 σε σχέση με τον συνολικό καταμετρημένο αριθμό κυττάρων, με βάση τα εξής κριτήρια:

A. Ανάλογα με την ένταση της χρώσης:

- ασθενής χρώση (+),
- μέτρια χρώση (++),
- έντονη χρώση (+++).

B. Ανάλογα με το ποσοστό των χρωσμένων κυττάρων:

- χαμηλό ποσοστό θετικών κυττάρων (<35%),
- ενδιάμεσο ποσοστό θετικών κυττάρων (35 - 70%),
- υψηλό ποσοστό θετικών κυττάρων (>70%).

Όγκοι με γνωστή έκφραση των πρωτεϊνών STAT1 και PSTA1 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά δείγματα ελέγχου, ενώ ιστολογικά τμήματα στα οποία παραλήφθηκε η χρήση του πρωτογενούς αντισώματος, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου.

A.4. Στατιστική ανάλυση

Αναφορικά με τις ποσοτικές παραμέτρους από το ιστορικό των ασθενών της παρούσας μελέτης (ηλικία των ασθενών, μέγεθος του όγκου σε cm), υπολογίστηκαν τόσο η μέση τιμή, όσο και η τυπική απόκλιση αυτών, χωριστά ανά φύλο, αλλά και για το σύνολο των ασθενών. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους (ποιοτικά δεδομένα) πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της συχνότητας εμφάνισής τους, επίσης χωριστά ανά φύλο, αλλά και στο σύνολο του δείγματος.

Οι τιμές που αφορούν την ανοσοϊστοχημική χρώση των πρωτεϊνών STAT1 και PSTA1 κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως (**Ειδικό Μέρος, Παράγραφος A.3, σελ. 86**) και εφαρμόστηκε η δοκιμασία McNemar προκειμένου να εκτιμηθούν οι πιθανές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών ανάμεσα στις περιοχές με ΑΚΣ και των παρακείμενων περιοχών με φυσιολογικό ιστό.

Η δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων εφαρμόστηκε προκειμένου να διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στις ανοσοϊστοχημικές παραμέτρους των πρωτεϊνών STAT1 και PSTA1 και των διάφορων κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών. Οι συγκρίσεις που αφορούν τις ποσοτικές παραμέτρους (ηλικία ασθενών, μέγεθος του όγκου σε cm) βασίστηκαν στην εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς μονής κατεύθυνσης (one way ANOVA).

Αναφορικά με την επιβίωση των ασθενών, υπολογίστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης με βάση τη μέθοδο των Kaplan – Meier, τόσο για το σύνολο του δείγματος των ασθενών, όσο και χωριστά ανά είδος εφαρμοζόμενης συμπληρωματικής θεραπείας. Ακολούθως εκτιμήθηκαν οι πιθανές διαφορές μεταξύ τους με βάση τη δοκιμασία log-rank.

Τέλος, η σημασία κάθε μίας από τις ιστοπαθολογικές παραμέτρους, αλλά και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των παραγόντων STAT1 και PSTAT1 στην επιβίωση αναλύθηκαν με βάση το πολυπαραγοντικό μοντέλο αναλογικού κινδύνου του Cox (Cox proportional hazards model).

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της στατιστικής εφαρμογής SPSS, έκδοση 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL), ενώ η τιμή $P < 0,05$ αποτέλεσε το όριο στατιστικής σημαντικότητας για όλες τις συγκρίσεις.

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.1. Κλινικές και παθολογοανατομικές παράμετροι

Η κατανομή συχνότητων των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν (σύνολο 12) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα B.1**, τόσο για ολόκληρο το δείγμα ασθενών, όσο και χωριστά ανά φύλο. Οι παράμετροι αυτές αφορούν:

1. την ηλικία των ασθενών (μέσος όρος, τυπική απόκλιση, κατανομή σε ομάδες ηλικίας ≥ 55 ετών και < 55 ετών),
2. τις θέσεις εντόπισης των όγκων (γλώσσα, παρειακός βλεννογόννος, φατνιακή ακρολοφία - ούλα και έδαφος του στόματος),
3. την ιστολογική διαφοροποίηση των νεοπλασμάτων (χαμηλή, μέτρια, υψηλή),
4. την ύπαρξη ή μη περινευρικών διηθήσεων,
5. την ύπαρξη ή μη περιαγγειακών διηθήσεων,
6. τα όρια εκτομής (αρνητικά όρια: απόσταση $\geq 5\text{mm}$ από τη βλάβη, πλησίον της βλάβης: απόσταση $< 5\text{mm}$ και θετικά όρια: όρια εντός της βλάβης),
7. την παράμετρο **pT** του συστήματος **TNM 7**, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου και τη διήθηση παρακείμενων ανατομικών δομών ως εξής:

pT1	Όγκος με μέγιστη διάμετρο $\leq 2\text{cm}$.
pT2	Όγκος με μέγιστη διάμετρο μεγαλύτερη από 2cm έως και 4cm.
pT3	Όγκος με μέγιστη διάμετρο $> 4\text{cm}$.
pT4	Ο όγκος επεκτείνεται σε παρακείμενες ανατομικές δομές, όπως τα οστά των γνάθων, το κάτω φατνιακό νεύρο, τους ετερόχθονες μύες της γλώσσας (γενειογλωσσικός, υπογλωσσικός, βελονογλωσσικός, γλωσσουπερώιος), τον γναθιαίο κόλπο, το δέρμα του προσώπου, τα πέταλα της πτερυγοειδούς απόφυσης του σφηνοειδούς οστού, τη βάση του κρανίου ή την έσω καρωτίδα.

Πίνακας Β.1

Η κατανομή των δεδομένων για τις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους του δείγματος ανάμεσα στο σύνολο των ασθενών, αλλά και χωριστά ανά φύλο.

Παράμετροι		Άνδρες	Γυναίκες	P*	Σύνολο
Αριθμός ασθενών		33 (67,3%)	16 (32,7%)		49 (100%)
Ηλικία (έτη)					
	M.O. ± SD	57,1 ± 14,9	63,6 ± 14,7	0,157**	59,2 ± 15,0
	Εύρος	23 – 77	26 – 85		23 – 85
	≥55	20 (60,6%)	12 (75,0%)	0,360	32 (65,3%)
	<55	13 (39,4%)	4 (25,0%)		17 (34,7%)
Εντόπιση					
	Γλώσσα	20 (60,6%)	6 (37,5%)		26 (53,1%)
	Παρειακός βλεννογόνος	4 (12,1%)	4 (25,0%)		8 (16,3%)
	Οπισθογόμφια περιοχή	2 (6,1%)	1 (6,3%)	0,447	3 (6,1%)
	Φατν. ακρολοφία & ούλα	4 (12,1%)	4 (25,0%)		8 (16,3%)
	Έδαφος του στόματος	3 (9,1%)	1 (6,3%)		4 (8,2%)
Ιστολογική διαφοροποίηση					
	Χαμηλή	9 (27,3%)	3 (18,8%)		12 (24,5%)
	Μέτρια	17 (51,5%)	7 (43,8%)	0,528	24 (49,0%)
	Υψηλή	7 (21,2%)	6 (37,5%)		13 (26,5%)
Περινευρική διήθηση					
	Ναι	8 (24,2%)	5 (31,3%)		13 (26,5%)
	Όχι	25 (75,8%)	11 (68,8%)	0,733	36 (73,5%)
Περιαγγειακή διήθηση					
	Ναι	3 (9,1%)	3 (18,8%)		6 (12,2%)
	Όχι	30 (90,9%)	13 (81,3%)	0,377	43 (87,8%)
Όρια εκτομής					
	Αρνητικά (≥5mm)	24 (72,7%)	15 (93,8%)		39 (79,6%)
	Πλησίον της βλάβης (<5mm)	6 (18,2%)	1 (6,3%)	0,377	7 (14,3%)
	Θετικά	3 (9,1%)	0 (0,0%)		3 (6,1%)
p T					
	1	11 (33,3%)	3 (18,8%)		14 (28,6%)
	2	13 (39,4%)	6 (37,5%)		19 (38,8%)
	3	7 (21,2%)	3 (18,8%)	0,311	10 (20,4%)
	4	2 (6,1%)	4 (25,0%)		6 (12,2%)
Μέγεθος όγκου (cm)					
	M.O. ± SD	2,9 ± 1,5	3,2 ± 1,1	0,481**	3,0 ± 1,4
	≥2	21 (63,6%)	13 (81,3%)	0,324	34 (69,4%)
	<2	12 (36,4%)	3 (18,8%)		15 (30,6%)
p N					
	0	11 (33,3%)	5 (31,3%)		16 (32,7%)
	1	22 (66,7%)	10 (62,5%)		32 (65,3%)
	2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,459	0 (0,0%)
	3	0 (0,0%)	1 (6,3%)		1 (2,0%)

Σταδιοποίηση

<i>I</i>	6 (18,2%)	0 (0,0%)		6 (12,2%)
<i>II</i>	6 (18,2%)	2 (12,5%)	0,116	8 (16,3%)
<i>III</i>	19 (57,6%)	10 (62,5%)		29 (59,2%)
<i>IV</i>	2 (6,1%)	4 (25,0%)		6 (12,2%)

Επανεμφάνιση νόσου

<i>Τοπική μόνο</i>	12 (36,4%)	9 (56,3%)		21 (42,9%)
<i>Περιοχική μόνο</i>	3 (9,1%)	0 (0,0%)	0,153	3 (6,1%)
<i>Τοπική & Περιοχική</i>	0 (0,0%)	1 (6,3%)		1 (2,0%)
<i>Όχι</i>	18 (54,5%)	6 (37,5%)		24 (49,0%)

Συμπληρωματική θεραπεία

<i>Μόνο ακτινοθεραπεία</i>	14 (42,4%)	10 (62,5%)		24 (49,0%)
<i>Μόνο χημειοθεραπεία</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,696	1 (2,0%)
<i>Χήμειο- & Ακτινοθεραπεία</i>	14 (42,4%)	5 (31,3%)		19 (38,8%)
<i>Καμία</i>	4 (12,1%)	1 (6,3%)		5 (10,2%)

* Ακριβής δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων.

** ANOVA μίας κατεύθυνσης.

8. την απόλυτη τιμή του μεγέθους του όγκου σε cm, όπως προσδιορίζεται από τη μέγιστη διάμετρο αυτού (μέσος όρος, τυπική απόκλιση, κατανομή συχνοτήτων ανάμεσα όγκους μέγιστης διαμέτρου $\geq 2\text{cm}$ και $< 2\text{cm}$),
9. την παράμετρο pN του συστήματος TNM 7, η οποία διαφοροποιείται με βάση την ύπαρξη (pN+) ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων, ως εξής:

pN0	Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες.
pN1	Μετάσταση σε μονήρη λεμφαδένα, ομόπλευρα με τον όγκο, μέγιστης διαμέτρου έως 3cm.
pN2	Μεταστάσεις που δεν ξεπερνούν τα 6cm ως προς τη μέγιστη διάμετρό τους και αφορούν είτε: • Μονήρη λεμφαδένα, ομόπλευρα με τον όγκο (μέγιστης διαμέτρου $> 3\text{cm}$ και έως 6cm), • Πολλαπλούς λεμφαδένες ομόπλευρα ως προς την αρχική εστία, • Πολλαπλούς λεμφαδένες, αμφίπλευρα ή ετερόπλευρα ως προς την αρχική εστία.
pN3	Μετάσταση σε λεμφαδένα με μέγεθος μεγαλύτερο από 6cm κατά τη μεγαλύτερη του διάσταση.

10. την παθολογοανατομική σταδιοποίηση της νόσου με βάση το σύστημα TNM (στάδια I, II, III και IV),
11. την επανεμφάνιση ή μη της νόσου στον ίδιο ασθενή κατά την περίοδο παρακολούθησης και τέλος
12. την εφαρμογή ή μη συμπληρωματικής θεραπείας (είτε αποκλειστικά ακτινοθεραπείας, είτε αποκλειστικά χημειοθεραπείας, είτε συνδυασμού αυτών).

Από τους 49 ασθενείς, οι 33 (67,3%) ήταν άνδρες και οι 16 (32,7%) γυναίκες. Η μέση ηλικία για ολόκληρη την ομάδα μελέτης ήταν 59,2 έτη ($\pm$ SD: 15,0 έτη) και το εύρος ηλικιών κυμάνθηκε ανάμεσα στα 23 και 85 έτη. Μετά την ολοκλήρωση της παθολογοανατομικής μελέτης των χειρουργικών παρασκευασμάτων, 6 ασθενείς (12,2% επί του συνόλου) χαρακτηρίστηκαν ως σταδίου I, 8 ασθενείς (16,3%) ως σταδίου II, 29 (59,2%) ως σταδίου III και τέλος οι υπόλοιποι 6 (12,2%) ως σταδίου IV, σύμφωνα με τη σταδιοποίηση που παρέχει το σύστημα TNM 7 και που ήδη έχει παρουσιαστεί (**Γενικός Μέρους, Πίνακας Α.4, σελ. 24**).

Αναλυτικότερα, αναφορικά με την περιοχή εντόπισης των όγκων, η γλώσσα ενεπλάκη σε 26 περιπτώσεις (53,1%), το έδαφος του στόματος σε 4 (8,2%), η φαρυγγική ακρολοφία και τα ούλα σε 8 (16,3%), ο παρειικός βλεννογόνο σε 8 (16,3%) και η οπισθογόμφια περιοχή στις υπόλοιπες 3 (6,1%). Από την ταξινόμηση των δειγμάτων ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης των νεοπλασμάτων προέκυψαν συνολικά 13 περιπτώσεις (26,5%) με όγκους υψηλής διαφοροποίησης, 24 περιπτώσεις (49,0%) με όγκους μέτριας διαφοροποίησης και 12 (24,5%) με όγκους χαμηλής διαφοροποίησης. Στη συντριπτική πλειοψηφία των παρασκευασμάτων δεν παρατηρήθηκαν περινευρικές ($n = 36$, 73,5%) ή περιαγγειακές ($n = 43$, 87,8%)

δηθήσεις. Επιπλέον και τα όρια εκτομής ήταν αρνητικά για τους περισσότερους ασθενείς ($n = 39, 79,6\%$), ενώ βρίσκονταν πλησίον της βλάβης ή ήταν θετικά σε μόλις 7 ($14,3\%$) και 3 ($6,1\%$) περιπτώσεις αντίστοιχα.

Από την αξιολόγηση των παραμέτρων pT και pN του συστήματος ταξινόμησης TNM 7, το ένα τρίτο περίπου των ασθενών ($n = 16, 32,6\%$) εμφάνισαν όγκους $pT \geq 3$, ενώ σε μόλις έναν ασθενή ($2,0\%$) η παράμετρος pN ήταν μεγαλύτερη από την τιμή 1. Ο μέσος όρος του μεγέθους των όγκων κατά τη μέγιστη διάμετρό τους ήταν $3,0\text{cm}$ ($\pm\text{SD}: 1,4$), με πάνω από τα δύο τρίτα αυτών να αφορούν όγκους μέγιστης διαμέτρου $\geq 2\text{cm}$ ($n = 34, 69,4\%$). Επανεμφάνιση της νόσου σημειώθηκε στους μισούς περίπου ασθενείς ($n = 25, 51,0\%$) και ήταν τοπική για το σύνολο σχεδόν των περιπτώσεων αυτών ($n = 21$), με εξαίρεση μόλις 3 ασθενείς, όπου η επανεμφάνιση της νόσου ήταν περιοχική και σε μία μόλις περίπτωση που ο όγκος επανεμφανίστηκε με διπλή εντόπιση (τοπική και περιοχική).

Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών, 44 από τους 49 ($89,8\%$) έλαβε συμπληρωματική θεραπεία μετά το χειρουργείο και συγκεκριμένα: είτε **α.** μόνο ακτινοθεραπεία, είτε **β.** μόνο χημειοθεραπεία, είτε **γ.** συνδυασμό αυτών. Από τους εν λόγω ασθενείς, στους 24 ($49,0\%$ επί του συνόλου του δείγματος της μελέτης) εφαρμόστηκε αποκλειστικά ακτινοθεραπεία, στους 19 ($38,8\%$) εφαρμόστηκε συνδυασμός ακτινο-χημειοθεραπείας και μόνο σε έναν ασθενή ($2,0\%$) εφαρμόστηκε αποκλειστικά χημειοθεραπεία.

Όπως προκύπτει από τη μελέτη του **Πίνακα Β.1** δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή συχνοτήτων των διαφόρων κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, ανάμεσα στα δύο φύλα ($P \geq 0,05$ σε όλες τις συγκρίσεις του **Πίνακα Β.1**).

B.2. Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των STAT1 και PSTAT1 μεταξύ των περιοχών με ΑΚΣ και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών των παρασκευασμάτων

α. Ένταση της χρώσης. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα STAT1 κυμάνθηκε ανάμεσα σε μέτρια (++) και έντονα (+ + +) επίπεδα, τόσο στις περιοχές με ΑΚΣ, όσο και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ αντίθετα η χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 κυμάνθηκε ανάμεσα σε ασθενή (+) και μέτρια (++) επίπεδα έντασης, όπως φαίνεται στον **Πίνακα Β.2**.

Πίνακας Β.2. Σύγκριση της κατανομής συχνοτήτων των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των STAT1 και PSTAT1, ανάμεσα στις περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς.

Παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής χρώσης		Περιοχές με ΑΚΣ (n = 49)		P*	
STAT1	Παρακείμενοι φυσ. ιστοί	Ένταση	Έντονη	Μέτρια	0,092
		Έντονη	4 (8,2%)	3 (6,1%)	
		Μέτρια	10 (20,4%)	32 (65,3%)	
		Ποσοστό κυττάρων	Υψηλό	Μεσαίο	0,014
		Υψηλό	7 (14,3%)	19 (38,8%)	
		Μεσαίο	3 (6,1%)	20 (40,8%)	
PSTAT1	Παρακείμενοι φυσ. ιστοί	Ένταση	Ασθενής	Μέτρια	0,180
		Ασθενής	38 (77,6%)	2 (4,1%)	
		Μέτρια	7 (14,3%)	2 (4,1%)	
		Ποσοστό κυττάρων	Χαμηλό	Υψηλό ή μέσο	<0,001
		Χαμηλό	9 (18,4%)	2 (4,1%)	
		Υψηλό ή μέσο	30 (61,2%)	8 (16,3%)	

*Δοκιμασία Mc Nemar.

*Δοκιμασία Mc Nemar.

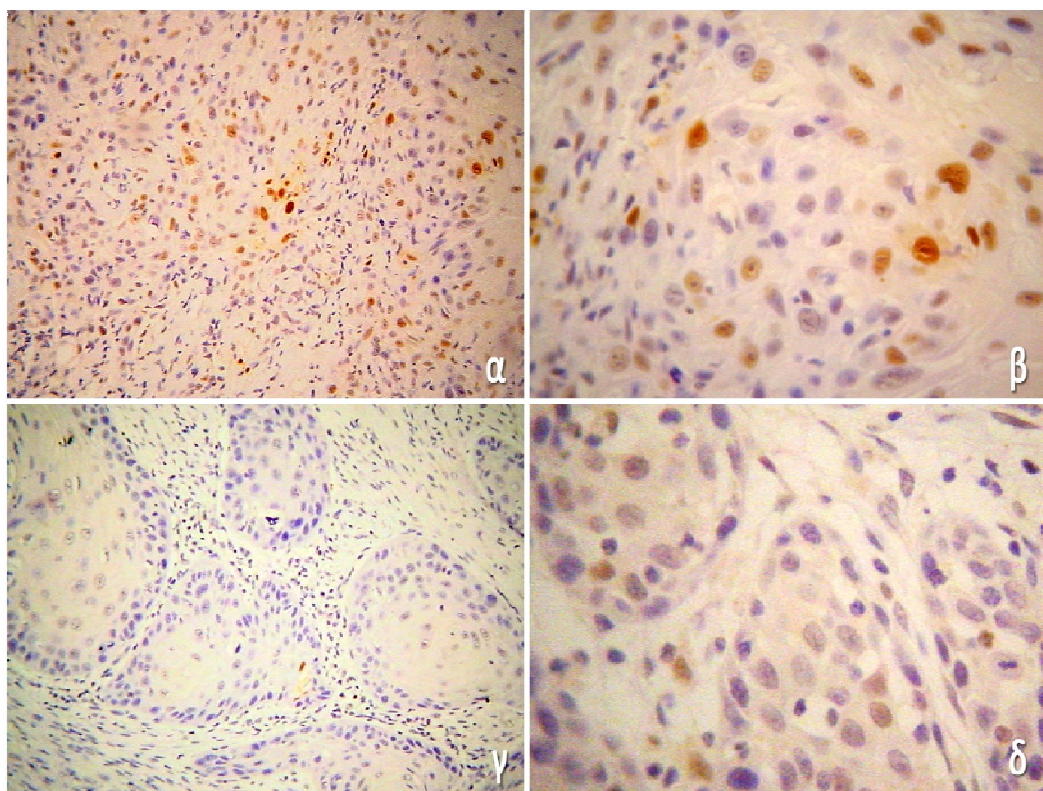
Σε ποσοστό 26,5% των ασθενών, δηλαδή σε 13 περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα STAT1 μεταξύ των περιοχών με ΑΚΣ και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Η μεταβολή αυτή αφορά αύξηση κατά 14,3% της συχνότητας εμφάνισης της έντονης χρώσης για τον παράγοντα αυτόν στις περιοχές με ΑΚΣ. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα έντασης της χρώσης ανάμεσα στις περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς για τον παράγοντα PSTAT1 διέφεραν μόνο στο 18,4% των ασθενών, δηλαδή σε 9 μόλις περιπτώσεις. Η διαφορά αυτή μεταφράζεται συνολικά σε αύξηση κατά 10,2% στη συχνότητα εμφάνισης της ασθενούς έντασης χρώσης του παράγοντα αυτού κατά την εξαλλαγή του φυσιολογικού βλεννογόνου σε ΑΚΣ. Ωστόσο, καμία από αυτές τις μεταβολές στην ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των δύο παραγόντων δεν ήταν στατιστικά σημαντική, όπως δείχνει ο **Πίνακας Β.2.** ($P = 0,092$ και $P = 0,180$ για το STAT1 και PSTAT1 αντίστοιχα).

β. Ποσοστά κυττάρων με θετική χρώση. Τα ποσοστά των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα STAT1 στις περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκαν ανάμεσα σε μέσα και υψηλά επίπεδα, ενώ τα ποσοστά των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 επεκτάθηκαν 3 επίπεδα διαβάθμισης (χαμηλά, μέσα και υψηλά, **Πίνακας Β.2.**).

Σχεδόν στο ήμισυ των ασθενών ($n = 22$, 44,9%) τα επίπεδα των ποσοστών των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα STAT1 διέφεραν μεταξύ των περιοχών με ΑΚΣ και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Μάλιστα παρατηρήθηκε συνολικά μείωση κατά 32,7% στη συχνότητα των υψηλών επιπέδων των ποσοστών αυτών κατά την εξαλλαγή του φυσιολογικού βλεννογόνου σε ΑΚΣ και στροφή προς τα μεσαίου επιπέδου ποσοστά, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($P = 0,014$, **Πίνακας Β.2.**). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν και διαφορές αναφορικά με τα

επίπεδα των ποσοστών των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 μεταξύ των προαναφερθέντων περιοχών για τη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ($n = 32, 65,3\%$). Η παρατήρηση αυτή αντανακλά μία μείωση κατά 57,1% στα υψηλού και μεσαίου επιπέδου ποσοστά κυττάρων με θετική χρώση PSTAT1 από τις περιοχές με φυσιολογικό βλεννογόνο και στροφή σε χαμηλότερα επίπεδα ποσοστού κυττάρων με θετική PSTAT1 χρώση στις περιοχές με ΑΚΣ. Η μεταβολή αυτή ήταν λίαν στατιστικά σημαντική ($P < 0,001$, **Πίνακας Β.2.**).

Στην **Εικόνα Β.1.** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα για τις παραμέτρους της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του παράγοντα PSTAT1, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως.



Εικόνα Β.1. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του παράγοντα PSTAT1 στις περιοχές με ΑΚΣ των παρασκευασμάτων. Οι **εικόνες α** και **β** έχουν ληφθεί από ΑΚΣ με μέτρια επίπεδα έντασης χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 και μεσαία επίπεδα ποσοστού κυττάρων θετικών για τον παράγοντα αυτό. Οι **εικόνες γ** και **δ** προέρχονται από ΑΚΣ με ασθενή χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 και χαμηλά επίπεδα ποσοστού κυττάρων με θετική για τον παράγοντα αυτό έκφραση (**εικόνες α** και **γ**: μεγέθυνση 100x, **β** και **δ**: 400x).

B.3. Συσχέτιση των ανοσοϊστοχημικών παραμέτρων των STAT1 και PSTAT1 με τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα

Τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα του δείγματος ταξινομήθηκαν ανάλογα με τα επίπεδα της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τους παράγοντες STAT1 και PSTAT1 και με τα επίπεδα του ποσοστού των κυττάρων με θετική χρώση έναντι των παραγόντων αυτών, προκειμένου να πραγματοποιηθούν πολλαπλές στατιστικές συγκρίσεις. Τα στοιχεία από την παραπάνω ανάλυση παρουσιάζονται στους **Πίνακες B.3^α.** και **B.3^β.** για τον παράγοντα STAT1 και στους **Πίνακες B.4^α.** και **B.4^β.** για τον παράγοντα PSTAT1.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που λήφθηκαν υπόψη για κάθε επί μέρους σύγκριση ήταν τα εξής:

1. *το φύλο* (οι γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες),
2. *η ηλικία* (άτομα ηλικίας ≥ 55 ετών συγκριτικά με άτομα ηλικίας <55 ετών),
3. *η θέση εντόπισης του ΑΚΣ* (η γλώσσα συγκριτικά με τις υπόλοιπες εντοπίσεις),
4. *η διαφοροποίηση του νεοπλάσματος* (τα χαμηλής και μέτριας διαφοροποίησης νεοπλάσματα συγκριτικά με τα υψηλής διαφοροποίησης),
5. *η περινευρική διήθηση* (τα θετικά δείγματα συγκριτικά με τα αρνητικά),
6. *η περιαγγειακή διήθηση* (τα θετικά δείγματα συγκριτικά με τα αρνητικά),
7. *η τιμή της παραμέτρου pT* (οι τιμές 1 ή 2 συγκριτικά με τις τιμές 3 ή 4),
8. *το μέγεθος του όγκου* (όγκοι μέγιστης διαμέτρου $\geq 2\text{cm}$ συγκριτικά με όγκους μέγιστης διαμέτρου $<2\text{cm}$),
9. *η τιμή της παραμέτρου pN* (pN0 έναντι pN+),

10. το στάδιο της νόσου, σύμφωνα με τη σταδιοποίηση του συστήματος TNM 7, όπως έχει προαναφερθεί, συγκρίνοντας τους όγκους αρχικών σταδίων (I & II) με τους όγκους προχωρημένων σταδίων (III & IV) και τέλος
11. την επανεμφάνιση της νόσου (περιπτώσεις με τοπική ή περιοχική επανεμφάνιση της νόσου συγκριτικά με αυτές χωρίς επανεμφάνιση).

Αναφορικά με τα επίπεδα της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα STAT1 στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ, στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ($n = 35$, 71,4%) η ένταση κυμάνθηκε σε μέτρια επίπεδα, ενώ στους υπόλοιπους ασθενείς ($n = 14$, 28,6%) σε έντονα επίπεδα (**Πίνακας Β.3^α**). Από τις επιμέρους συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν ανάμεσα στις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους που προαναφέρθηκαν και στα επίπεδα της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα αυτού δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P \geq 0,05$ σε όλες τις συγκρίσεις του **Πίνακα Β.3^α**).

Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε και μεταξύ των επιπέδων των ποσοστών των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα STAT1 στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ και των κλινικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών, όπως φαίνεται στον **Πίνακα Β.3^β**. Και στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P \geq 0,05$ σε όλες τις συγκρίσεις του **Πίνακα Β.3^β**). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι τα μεσαίου επιπέδου ποσοστά των κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα STAT1 εμφανίστηκαν στις περιοχές με ΑΚΣ σε 39 δείγματα (79,6%), ενώ τα υψηλού επιπέδου ποσοστά μόνο σε 10 δείγματα (20,4%). Επιπλέον, οι συχνότητες των μεσαίου επιπέδου ποσοστών υπερβαίνουν τις συχνότητες των υψηλών επιπέδου ποσοστών κυττάρων με θετική για τον παράγοντα STAT1 χρώση σε όλες τις επί μέρους συγκρίσεις του **Πίνακα Β.3^β**.

Πίνακας Β.3^α Η κατανομή των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων των ασθενών σύμφωνα με τα επίπεδα έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα **STAT1** στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ (Έντονη χρώση: +++, Μέτρια ένταση χρώσης: ++).

		Ένταση ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα STAT1 στις περιοχές με ΑΚΣ				
Παράμετροι		Έντονη		Μέτρια		P*
Συνολικός αρ. ασθενών		14	28,6%	35	71,4%	
Φύλο						
	Γυναίκες	6	37,5%	10	62,5%	0,501
	Ανδρες	8	24,2%	25	75,8%	
Ηλικία (έτη)						
	≥55	9	28,1%	23	71,9%	1,000
	<55	5	29,4%	12	70,6%	
Εντόπιση του όγκου						
	Γλώσσα	5	19,2%	21	80,8%	0,205
	Άλλη	9	39,1%	14	60,9%	
Διαφοροποίηση του ΑΚΣ						
	Υψηλή	3	23,1%	10	76,9%	0,731
	Μέτρια & Χαμηλή	11	30,6%	25	69,4%	
Περινευρική διήθηση						
	Ναι	5	38,5%	8	61,5%	0,476
	Όχι	9	25,0%	27	75,0%	
Περιαγγειακή διήθηση						
	Ναι	3	50,0%	3	50,0%	0,334
	Όχι	11	25,6%	32	74,4%	
pT						
	1 ή 2	12	36,4%	21	63,6%	0,104
	3 ή 4	2	12,5%	14	87,5%	
Μέγεθος του όγκου (cm)						
	≥ 2	9	26,5%	25	73,5%	0,735
	< 2	5	33,3%	10	66,7%	
pN						
	pN0	6	37,5%	10	62,5%	0,501
	pN+	8	24,2%	25	75,8%	
Στάδια της νόσου						
	Αρχικά (I & II)	5	35,7%	9	64,3%	0,503
	Προχωρημένα (III & IV)	9	25,7%	26	74,3%	
Επανεμφάνιση της νόσου						
	Ναι	5	20,0%	20	80,0%	0,217
	Όχι	9	37,5%	15	62,5%	

*Δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων.

Πίνακας Β.3^β Η κατανομή των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων των ασθενών σύμφωνα με τη διαβάθμιση του ποσοστού των κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα **STAT1** στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ (Υψηλό επίπεδο: >70% των κυττάρων με θετική χρώση, Μεσαίο επίπεδο: 35% – 70% των κυττάρων με θετική χρώση).

Παράμετροι		Επίπεδα του ποσοστού των κυττάρων με θετική STAT1 ανοσοϊστοχημική χρώση στις περιοχές με ΑΚΣ				P*
		Υψηλά		Μεσαία		
Συνολικός αρ. ασθενών		10	20,4%	39	79,6%	
Φύλο						
	Γυναίκες	2	12,5%	14	87,5%	0,464
	Άνδρες	8	24,2%	25	75,8%	
Ηλικία (έτη)						
	≥55	7	21,9%	25	78,1%	1,000
	<55	3	17,6%	14	82,4%	
Εντόπιση του όγκου						
	Γλώσσα	5	19,2%	21	80,8%	1,000
	Άλλη	5	21,7%	18	78,3%	
Διαφοροποίηση του ΑΚΣ						
	Υψηλή	4	30,8%	9	69,2%	0,422
	Μέτρια & Χαμηλή	6	16,7%	30	83,3%	
Περινευρική διήθηση						
	Ναι	1	7,7%	12	92,3%	0,253
	Όχι	9	25,0%	27	75,0%	
Περιαγγειακή διήθηση						
	Ναι	1	16,7%	5	83,3%	1,000
	Όχι	9	20,9%	34	79,1%	
pT						
	1 ή 2	5	15,2%	28	84,8%	0,261
	3 ή 4	5	31,3%	11	68,8%	
Μέγεθος του όγκου (cm)						
	≥ 2	8	23,5%	26	76,5%	0,702
	< 2	2	13,3%	13	86,7%	
pN						
	pN0	3	18,8%	13	81,3%	0,810
	pN+	7	21,2%	26	78,8%	
Στάδια της νόσου						
	Αρχικά (I & II)	3	21,4%	11	78,6%	1,000
	Προχωρημένα (III & IV)	7	20,0%	28	80,0%	
Επανεμφάνιση της νόσου						
	Ναι	7	28,0%	18	72,0%	0,289
	Όχι	3	12,5%	21	87,5%	

*Δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων.

Πίνακας Β.4^α Η κατανομή των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων των ασθενών σύμφωνα με τα επίπεδα έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα **PSTAT1** στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ (Μέτρια ένταση χρώσης: ++, Ασθενής ένταση χρώσης: +).

		Ένταση ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 στις περιοχές με ΑΚΣ				
Παράμετροι		Μέτρια		Ασθενής		P*
Συνολικό αρ. ασθενών		4	8,2%	45	91,8%	
Φύλο						
	Γυναίκες	1	6,3%	15	93,8%	1,000
	Άνδρες	3	9,1%	30	90,9%	
Ηλικία (έτη)						
	≥55	2	6,3%	30	93,8%	0,602
	<55	2	11,8%	15	88,2%	
Εντόπιση όγκου						
	Γλώσσα	3	11,5%	23	88,5%	0,612
	Άλλη	1	4,3%	22	95,7%	
Διαφοροποίηση του ΑΚΣ						
	Υψηλή	3	23,1%	10	76,9%	0,052
	Μέτρια & Χαμηλή	1	2,8%	35	97,2%	
Περινευρική διήθηση						
	Ναι	0	0,0%	13	100%	0,562
	Όχι	4	11,1%	32	88,9%	
Περιαγγειακή διήθηση						
	Ναι	0	0,0%	6	100%	1,000
	Όχι	4	9,3%	39	90,7%	
pT						
	1 ή 2	4	12,1%	29	87,9%	0,289
	3 ή 4	0	0,0%	16	100%	
Μέγεθος του όγκου (cm)						
	≥2	1	2,9%	33	97,1%	0,427
	<2	3	20,0%	12	80,0%	
pN						
	pN0	3	18,8%	13	81,3%	0,096
	pN+	1	3,0%	32	97,0%	
Στάδια της νόσου						
	Αρχικό (I & II)	3	21,4%	11	78,6%	0,065
	Προχωρημένο (III & IV)	1	2,9%	34	97,1%	
Επανεμφάνιση της νόσου						
	Ναι	1	4,0%	24	96,0%	0,349
	Όχι	3	12,5%	21	87,5%	

* Δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων.

Πίνακας Β.4^β Η κατανομή των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων των ασθενών σύμφωνα με τη διαβάθμιση του ποσοστού των κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα **PSTAT1** στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ (Υψηλό επίπεδο: >70% των κυττάρων με θετική χρώση, Μεσαίο επίπεδο: 35% – 70% των κυττάρων με θετική χρώση, Χαμηλό επίπεδο: <35% των κυττάρων με θετική PSTAT1 χρώση).

Παράμετροι	Επίπεδα του ποσοστού των κυττάρων με θετική PSTAT1 ανοσοϊστοχημική χρώση στις περιοχές με ΑΚΣ				P*
	Υψηλά	Μεσαία	Χαμηλά		
Συνολικός αρ. Ασθενών	4 8,2%	6 12,2%	39 79,6%		
Φύλο					
Γυναίκες	2 12,5%	2 12,5%	12 75,0%		0,746
Ανδρες	2 6,1%	4 12,1%	27 81,8%		
Ηλικία (έτη)					
≥55	3 9,4%	5 15,6%	24 75,0%		0,648
<55	1 5,9%	1 5,9%	15 88,2%		
Εντόπιση του όγκου					
Γλώσσα	3 11,5%	4 15,4%	19 73,1%		0,592
Άλλη	1 4,3%	2 8,7%	20 87,0%		
Διαφοροποίηση του ΑΚΣ					
Υψηλή	1 7,7%	2 15,4%	10 76,9%		0,847
Μέτρια & Χαμηλή	3 8,3%	4 11,1%	29 80,6%		
Περινευρική διήθηση					
Ναι	1 7,7%	1 7,7%	11 84,6%		1,000
Όχι	3 8,3%	5 13,9%	28 77,8%		
Περιαγγειακή διήθηση					
Ναι	0 0,0%	0 0,0%	6 100,0%		0,753
Όχι	4 9,3%	6 14,0%	33 76,7%		
pT					
1 ή 2	3 9,1%	2 6,1%	28 84,8%		0,239
3 ή 4	1 6,3%	4 25,0%	11 68,8%		
Μέγεθος του όγκου (cm)					
≥2	2 5,9%	5 14,7%	27 79,4%		0,632
<2	2 13,3%	1 6,7%	12 80,0%		
pN					
pN0	2 12,5%	1 6,3%	13 81,3%		0,548
pN+	2 6,1%	5 15,2%	26 78,8%		
Στάδια της νόσου					
Αρχικά (I & II)	1 7,1%	1 7,1%	12 85,7%		0,851
Προχωρημένα (III & IV)	3 8,6%	5 14,3%	27 77,1%		
Επανεμφάνιση της νόσου					
Ναι	2 8,0%	4 16,0%	19 76,0%		0,869
Όχι	2 8,3%	2 8,3%	20 83,3%		

*Δοκιμασία Fisher δύο κατευθύνσεων.

Όσον αφορά το PSTAT1, η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα αυτό κυμάνθηκε ανάμεσα σε ασθενή και μέτρια επίπεδα και αφορούσε 45 (91,8%) και μόνο 4 (8,2%) περιπτώσεις, αντίστοιχα (**Πίνακας B.4^a**). Το ασθενές επίπεδο έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 ήταν το επίπεδο με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε όλες τις επιμέρους συγκρίσεις. Ωστόσο, από την προσεκτικότερη παρατήρηση αυτών των δεδομένων διαπιστώθηκε τάση αυξημένης συχνότητας του μέτριου επιπέδου έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1, τόσο στους όγκους υψηλής διαφοροποίησης ($P = 0,052$), όσο και στους όγκους αρχικών σταδίων ($P = 0,065$).

Παράλληλα, τα επίπεδα των ποσοστών των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 στις περιοχές με ΑΚΣ των παρασκευασμάτων συμπεριέλαβαν και τις τρεις κατηγορίες διαβάθμισης (χαμηλή, μέση και υψηλή) και αφορούσαν 39 (79,6%), 6 (12,2%) και 4 ασθενείς (8,2%) αντίστοιχα, όπως σημειώνεται στον **Πίνακα B.4^b**. Η κατανομή συχνοτήτων των επιπέδων αυτών για κάθε επιμέρους κλινικό ή παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό των ασθενών που μελετήθηκε δεν οδήγησε σε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P \geq 0,05$ σε όλες τις συγκρίσεις του **Πίνακα B.4^b**).

B.4. Αξιολόγηση της επίδρασης των παθολογοανατομικών παραμέτρων στην επιβίωση των ασθενών του δείγματος

Η διάμεση συνολική επιβίωση για την ομάδα μελέτης ανήλθε στους 52,4 μήνες (εύρος: 0,9 – 95,2 μήνες), όπως άλλωστε ήδη έχει παρουσιαστεί στον **Πίνακα B.1**. Μετά από την εφαρμογή του μοντέλου αναλογικού κινδύνου του Cox (Cox proportional hazards model) στις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών, ως σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες για τη συνολική επιβίωση των ασθενών αναδείχθηκαν οι εξής παράγοντες:

- Η περινευρική διήθηση ($P = 0,004$, HR: 3,20, 95% CI: 1,44 – 7,14),
- Η τιμή pT του συστήματος TNM 7, τιμές pT 3 ή 4 συγκριτικά με 1 ή 2 ($P = 0,049$, HR: 2,35, 95% CI: 1,00 – 4,68),
- Η τιμή pN του συστήματος TNM 7, $pN+$ συγκριτικά με $pN0$ ($P = 0,013$, HR: 3,47, 95% CI: 1.30 – 9.24) και
- Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση της νόσου, σύμφωνα πάντα με το ίδιο σύστημα, δηλαδή νόσος προχωρημένων σταδίων (III & IV) συγκριτικά με νόσο αρχικών σταδίων (I & II) ($P = 0,013$, HR: 3,87, 95% CI: 1,33 – 11,29).

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα B.5^a**. Το φύλο (γυναίκες συγκριτικά με άνδρες), η ηλικία (άτομα ≥ 55 ετών συγκριτικά με άτομα μικρότερης ηλικίας), η θέση εντόπισης του όγκου (γλώσσα συγκριτικά με υπόλοιπες εντοπίσεις), η ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου (χαμηλή συγκριτικά με μέτρια και υψηλή), η περιαγγειακή διήθηση και τα θετικά όρια εκτομής δεν φαίνεται να είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στη συνολική επιβίωση των ασθενών του παρόντος δείγματος.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και διερεύνηση της συσχέτισης των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τους παράγοντες STAT1 και PSTAT1 με τη συνολική επιβίωση των ασθενών του δείγματος και συγκεκριμένα της έντασης της χρώσης και του ποσοστού των κυττάρων με θετική χρώση για κάθε παράγοντα χωριστά. Τα δεδομένα που προέκυψαν παρατίθενται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα B.5^b**. Όπως όμως προκύπτει από τη μελέτη του παραπάνω πίνακα, καμία από τις παραμέτρους της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των δύο αυτών παραγόντων δεν αποτέλεσε σημαντικό προγνωστικό δείκτη για τη συνολική επιβίωση των ασθενών του δείγματος ($P \geq 0,05$ σε όλες τις συγκρίσεις του **Πίνακα B.5^b**).

Πίνακας Β.5^α Η επίδραση των κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων των ασθενών στη συνολική επιβίωση, όπως υπολογίστηκε με την εφαρμογή του μοντέλου αναλογικού κινδύνου του Cox.

Χαρακτηριστικά		<i>P</i>	HR (95% CI)
Φύλο			
	γυναίκες	0,189	1,69 (0,77 – 3,71)
Ηλικία (έτη)			
	≥55	0,376	1,46 (0,63 – 3,34)
Θέση εντόπισης όγκου			
	γλώσσα	0,444	0,74 (0,35 – 1,59)
Ιστολογική διαφοροποίηση ΑΚΣ			
	χαμηλή	0,103	0,41 (0,14 – 1,20)
Περινευρική διήθηση			
	ναι	0,004	3,20 (1,44 – 7,14)
Περιαγγειακή διήθηση			
	ναι	0,060	2,57 (0,96 – 6,83)
pT			
	3 or 4	0,049	2,35 (1,00 – 4,68)
pN			
	pN+	0,013	3,47 (1,30 – 9,24)
Όρια εκτομής			
	θετικά	0,229	2,13 (0,62 – 7,27)
Στάδιο νόσου			
	Προχωρημένο (III & IV)	0,013	3,87 (1,33 – 11,29)

Πίνακας Β.5^β Συσχέτιση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με τις παραμέτρους της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των παραγόντων *STAT1* και *PSTAT1* από τις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ, όπως υπολογίστηκε με την εφαρμογή του μοντέλου αναλογικού κινδύνου του *Cox*.

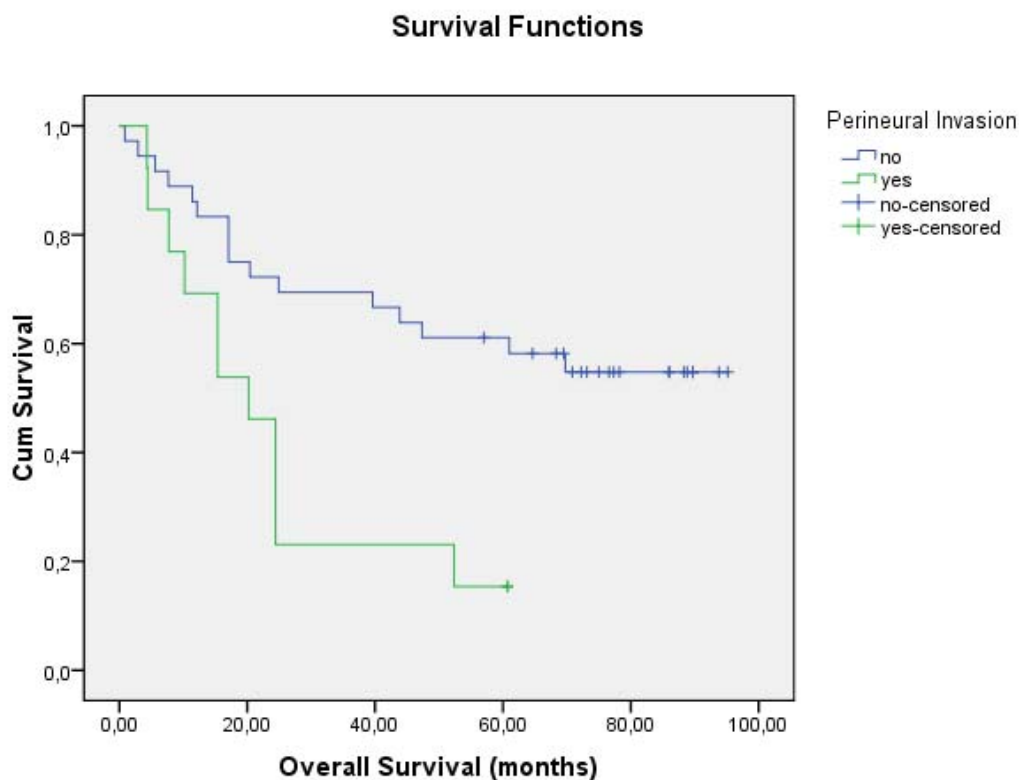
Παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής χρώσης		<i>P</i>	HR (95% CI)
STAT1	Επίπεδο έντασης έντονο <> μέτριο	0,380	0,67 (0,27 – 1,65)
	Ποσοστό θετικών κυττάρων υψηλό <> μεσαίο	0,093	2,03 (0,89 – 4,65)
PSTAT1	Επίπεδο έντασης μέτριο <> ασθενές	0,224	0,29 (0,04 – 2,13)
	Ποσοστό θετικών κυττάρων υψηλό ή μεσαίο <> χαμηλό	0,701	1,20 (0,48 – 2,97)

Για κάθε έναν από τους παραπάνω παράγοντες των οποίων η επίδραση στην συνολική επιβίωση ήταν στατιστικά σημαντική πραγματοποιήθηκε και υπολογισμός των καμπυλών επιβίωσης κατά Kaplan - Meier, σύγκριση αυτών με την εφαρμογή της δοκιμασίας Log Rank κατά Mantel - Cox, αλλά και υπολογισμός της μέσης και της διάμεσης επιβίωσης, όπου ήταν εφικτό. Τα αποτελέσματα από την παραπάνω ανάλυση παρουσιάζονται στα **Σχήματα B.1** έως **B.4** για κάθε παράγοντα χωριστά.

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα που παρατίθενται μαζί με το **Σχήμα B.1**, η μέση χρονική διάρκεια επιβίωσης για τους ασθενείς χωρίς περινευρικές διηθήσεις ήταν 63,8 μήνες (95% CI: 51,5 – 76,0 μήνες), ενώ για τους ασθενείς με περινευρικές διηθήσεις ανήλθε μόλις στους 24,98 μήνες (95% CI: 14,5 – 35,5 μήνες). Αντίστοιχα η διάμεση επιβίωση, όπως κατέσται δυνατό να υπολογιστεί μόνο για τους ασθενείς με περινευρικές διηθήσεις ήταν 20,3 μήνες (95% CI: 11,9 – 28,6 μήνες). Οι δύο καμπύλες επιβίωσης διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με την εφαρμογή της δοκιμασίας log rank ($P = 0,003$, $\chi^2 = 9,123$, $df = 1$), δεδομένο που αντανakλά το γεγονός ότι οι ασθενείς με περινευρικές διηθήσεις είχαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μικρότερη πιθανότητα να επιβιώσουν μέχρι τη λήξη της χρονικής περιόδου παρακολούθησης στην οποία επεκτάθηκε η παρούσα μελέτη.

Αναφορικά με την παράμετρο pT του συστήματος TNM (**Σχήμα B.2**), η μέση χρονική διάρκεια επιβίωσης για τους ασθενείς με τιμή pT 3 ή 4 ήταν σχεδόν η μισή συγκριτικά με τη μέση επιβίωση των ασθενών με τιμή pT 1 ή 2, δηλαδή 36,4 μήνες (95% CI: 20,8 – 52,0 μήνες) και 62,8 (95% CI: 49,9 – 75,7 μήνες), αντίστοιχα. Η διάμεση επιβίωση, των ασθενών με τιμή pT 3 ή 4 ανήλθε στους 20,4 μήνες (95% CI: 13,2 – 27,7 μήνες). Οι καμπύλες επιβίωσης ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες ασθενών διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0,043$, $\chi^2 = 4,112$, $df = 1$), η διαφορά αυτή όμως βρέθηκε πολύ κοντά στο όριο στατιστικής σημαντικότητας ($P < 0,05$).

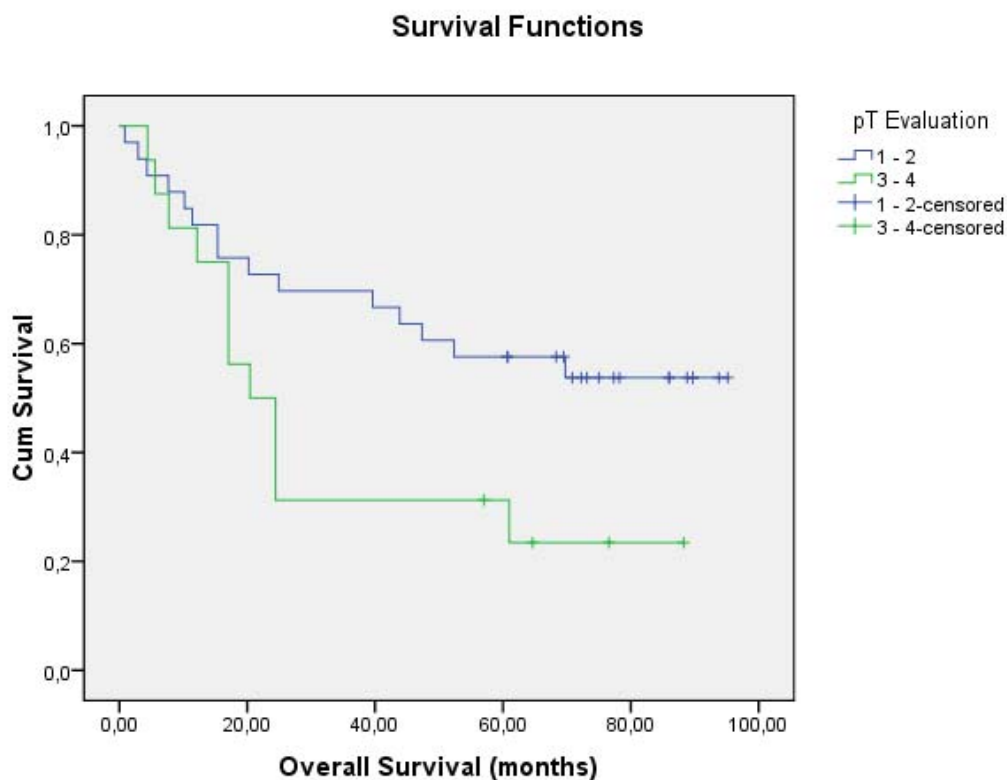
Σχήμα Β.1 Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan - Meier ανάμεσα στους ασθενείς με περινευρικές διηθήσεις από τον όγκο και σε ασθενείς χωρίς περινευρικές διηθήσεις. Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης αυτών των ασθενών (Όλοι οι υπολογισμοί έχουν γίνει σε μήνες).



Μέσες και διάμεσες τιμές του συνολικού διαστήματος επιβίωσης για τους ασθενείς με και χωρίς περινευρικές διηθήσεις

Περινευρική διήθηση	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
Όχι	63,745	6,243	51,509	75,981				
Ναι	24,979	5,373	14,447	35,511	20,238	4,272	11,866	28,610
Σύνολο δείγμ.	54,742	5,511	43,940	65,545	52,370	19,212	14,714	90,025

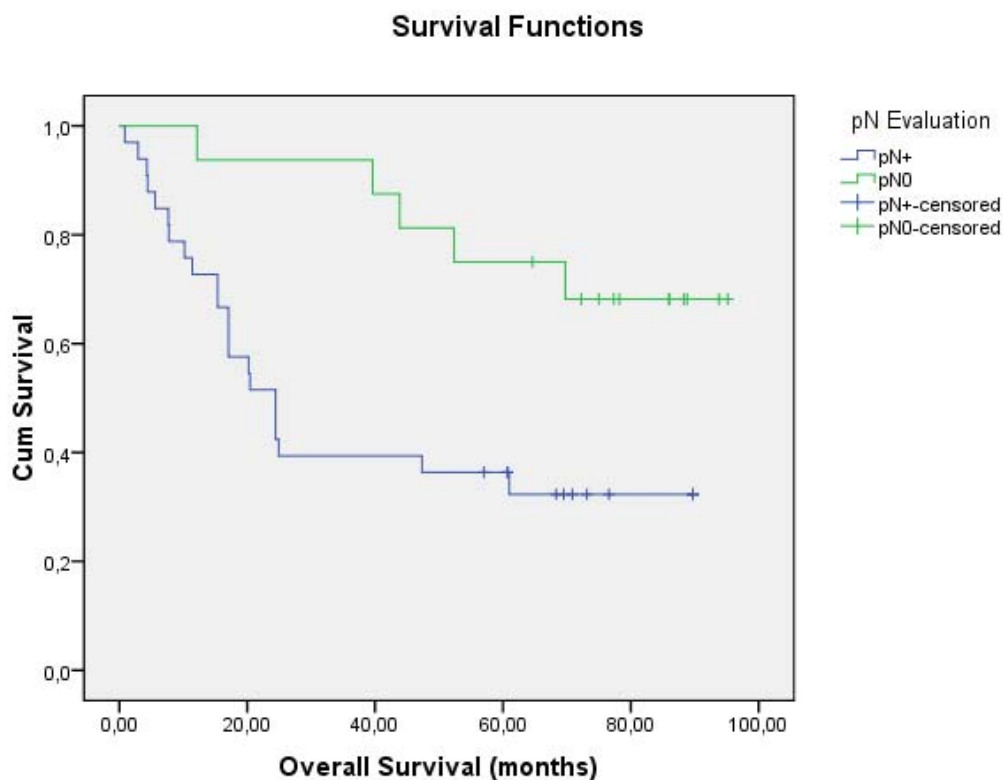
Σχήμα Β.2 Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan - Meier ανάμεσα στους ασθενείς με τιμή pT 1 ή 2 συγκριτικά με τους ασθενείς με τιμή pT 3 ή 4, σύμφωνα με το σύστημα TNM 7. Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης αυτών των ασθενών (Όλοι οι υπολογισμοί έχουν γίνει σε μήνες).



Μέσες και διάμεσες τιμές του συνολικού διαστήματος επιβίωσης για τους ασθενείς με τιμή pT 1 ή 2, συγκριτικά με τους ασθενείς με τιμή pT 3 ή 4

Μέγεθος όγκου (pT)	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
1 ή 2	62,807	6,579	49,912	75,702	.	.	.	.
3 ή 4	36,395	7,961	20,791	51,998	20,435	3,680	13,223	27,647
Σύνολο δείγμ.	54,742	5,511	43,940	65,545	52,370	19,212	14,714	90,025

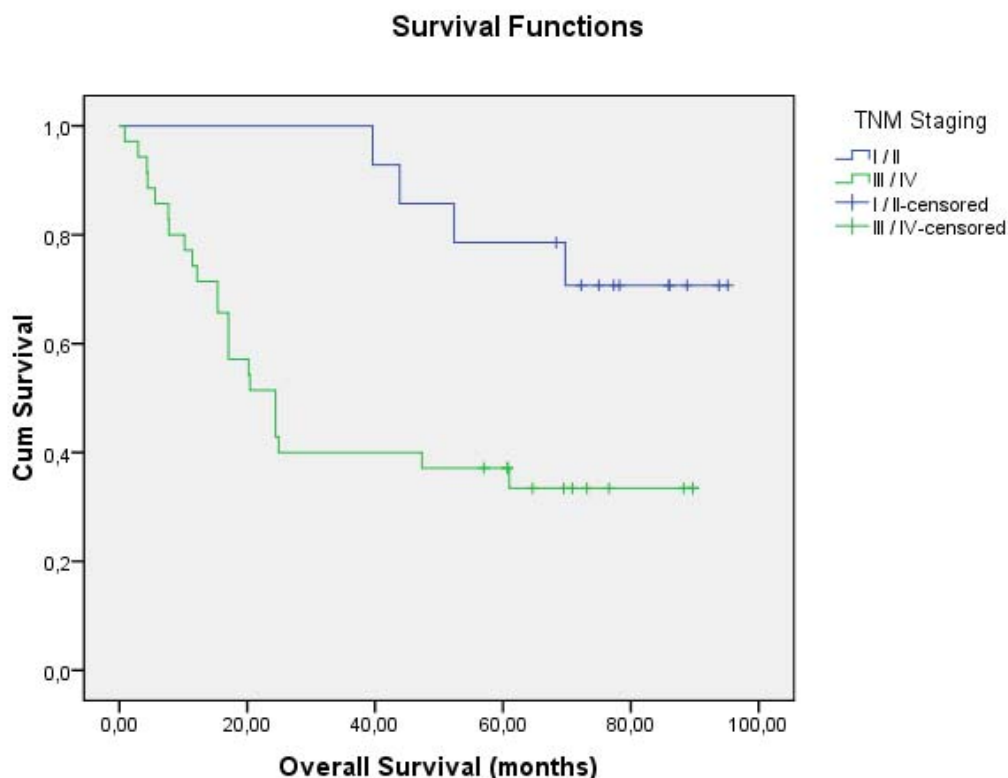
Σχήμα Β.3 Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan - Meier ανάμεσα στους ασθενείς με τιμή $pN+$ συγκριτικά με τους ασθενείς με τιμή $pN0$, σύμφωνα με το σύστημα TNM 7. Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης αυτών των ασθενών (Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν σε μήνες).



**Μέσες και διάμεσες τιμές της συνολικής επιβίωσης
για τους ασθενείς με τιμή $pN+$, συγκριτικά με τους ασθενείς με $pN0$**

Λεμφαδενικές μεταστάσεις (pT)	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
$pN+$	41,265	6,227	29,059	53,470	24,444	4,179	16,253	32,634
$pN0$	78,901	6,546	66,071	91,731	.	.	.	.
Σύνολο δείγματος	54,742	5,511	43,940	65,545	52,370	19,212	14,714	90,025

Σχήμα Β.4 Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan - Meier ανάμεσα στους ασθενείς αρχικών σταδίων του ΑΚΣ (I & II) κατά την εκτομή της πρωτοπαθούς εστίας, συγκριτικά με τους ασθενείς σε προχωρημένων σταδίων (III & IV), σύμφωνα με το σύστημα TNM 7. Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης αυτών των ασθενών (Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν σε μήνες).



Μέσες και διάμεσες τιμές της συνολικής επιβίωσης για τους ασθενείς με αρχικά στάδια ΑΚΣ (I & II) συγκριτικά με τους ασθενείς προχωρημένων σταδίων (III & IV)

Στάδια ΑΚΣ σύμφωνα με το σύστημα TNM	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
Αρχικά (I & II)	82,489	5,567	71,578	93,400	.	.	.	.
Προχωρημένα (III & IV)	41,845	6,091	29,907	53,783	24,444	4,309	15,998	32,890
Σύνολο δείγματος	54,742	5,511	43,940	65,545	52,370	19,212	14,714	90,025

Αντίστοιχα, ανάμεσα στους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (pN+), η μέση χρονική διάρκεια επιβίωσης ήταν σχεδόν η μισή συγκριτικά με τη μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, δηλαδή 41,3 μήνες (95% CI: 29,1 – 53,5 μήνες) και 78,9 (95% CI: 66,1 – 91,7 μήνες), αντίστοιχα. Τα δεδομένα παρατίθενται μαζί με το **Σχήμα B.3**. Η διάμεση επιβίωση, των ασθενών με λεμφαδενικές μεταστάσεις ανήλθε στους 24,4 μήνες (95% CI: 16,3 – 32,6 μήνες). Οι καμπύλες επιβίωσης διέφεραν και στις δύο αυτές ομάδες ασθενών σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0,008$, $\chi^2 = 7,075$, $df = 1$).

Κατά παρόμοιο τρόπο (**Σχήμα B.4**), συγκρίνοντας τη μέση χρονική διάρκεια επιβίωσης των ασθενών προχωρημένων σταδίων της νόσου (III & IV) και αυτών αρχικών σταδίων (I & II), η μέση χρονική διάρκεια επιβίωσης ήταν η μισή για την πρώτη κατηγορία ασθενών και ανήλθε μόλις στους 41,9 μήνες (95% CI: 29,9 – 53,8 μήνες), συγκριτικά με τους 82,5 μήνες (95% CI: 71,6 – 93,4 μήνες) των ασθενών αρχικών σταδίων. Η διάμεση επιβίωση, των ασθενών προχωρημένων σταδίων ανήλθε στους 24,4 μήνες (95% CI: 16,0 – 32,9 μήνες) και ήταν αντίστοιχη αυτής που υπολογίστηκε για τους ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις. Τέλος, οι καμπύλες επιβίωσης διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό και στην περίπτωση αυτή ($P = 0,007$, $\chi^2 = 7,209$, $df = 1$).

B.5. Πολυπαραγοντική ανάλυση της επίδρασης των παραπάνω παραμέτρων στη συνολική επιβίωση των ασθενών του δείγματος

Για την ταυτόχρονη πολυπαραγοντική ανάλυση όλων των παραμέτρων που επέδρασαν στη συνολική επιβίωση των ασθενών του δείγματος, δημιουργήθηκε μια σειρά από μοντέλα πολλαπλής παλινδρόμησης κατά Cox, ακολουθώντας την προσθήκη αυτών των παραγόντων σε κάθε μοντέλο κατά στάδια. Οι παρακάτω

παράμετροι λήφθησαν υπόψη για τον υπολογισμό των μοντέλων παλλινδρόμησης κατά Cox ως συμπαράγοντες που επηρεάζουν τη συνολική επιβίωση:

- *Οι περινευρικές διηθήσεις,*
- *Η τιμή της παραμέτρου pT για το μέγεθος του όγκου ($pT3$ ή 4 συγκριτικά με $pT 1$ ή 2),*
- *Η τιμή pN για τις λεμφαδενικές μεταστάσεις ($pN +$ συγκριτικά με τιμή $pN0$) και*
- *Το στάδιο της νόσου σύμφωνα με την παθολογοανατομική σταδιοποίηση του συστήματος TNM, δηλαδή τα προχωρημένα στάδια της νόσου (III & IV) συγκριτικά με τα αρχικά στάδια (I & II).*

Στο τελικό πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλλινδρόμησης κατά COX μόνο το στάδιο της νόσου, όπως καθορίζεται από την παθολογοανατομική σταδιοποίηση του συστήματος TNM 7 ($P = 0,038$, HR: 3,18, 95% CI: 1,06 – 9,53) και η παρουσία περινευρικών διηθήσεων ($P = 0,028$, HR: 2,50, 95% CI: 1,10 – 5,68) αναδείχθηκαν ως σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

B.6. Αξιολόγηση της επιβίωσης ανάμεσα στις ομάδες συμπληρωματικής θεραπείας των ασθενών

Οι συμπληρωματικές θεραπείες που εφαρμόστηκαν στους ασθενείς μετά την εκτομή της πρωτοπαθούς εστίας κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, ως εξής:

- **Ομάδα I:** Εφαρμογή αποκλειστικά ακτινοθεραπείας.
- **Ομάδα II:** Εφαρμογή αποκλειστικά χημειοθεραπείας ή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία.
- **Ομάδα III:** Καμία συμπληρωματική θεραπεία.

Η απόφαση για εφαρμογή συμπληρωματικής θεραπείας στους ασθενείς του δείγματος βασίστηκε στην ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων, δηλαδή σε τιμή $pN+$ ($P < 0,001$), όπως και στην ύπαρξη προχωρημένου σταδίου της νόσου, σύμφωνα με την παθολογοανατομική σταδιοποίηση του συστήματος TNM 7 ($P = 0,001$). Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται στον **Πίνακα B.6**. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από την παραπάνω συσχέτιση ανάμεσα σε κάθε παθολογοανατομική παράμετρο που μελετήθηκε με το είδος της θεραπείας που εφαρμόστηκε, αλλά και τη μέση και διάμεση επιβίωση ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας. Η χρονική διάρκεια επιβίωσης ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0,012$) και η διαφορά αυτή αναλύεται στη συνέχεια του κειμένου.

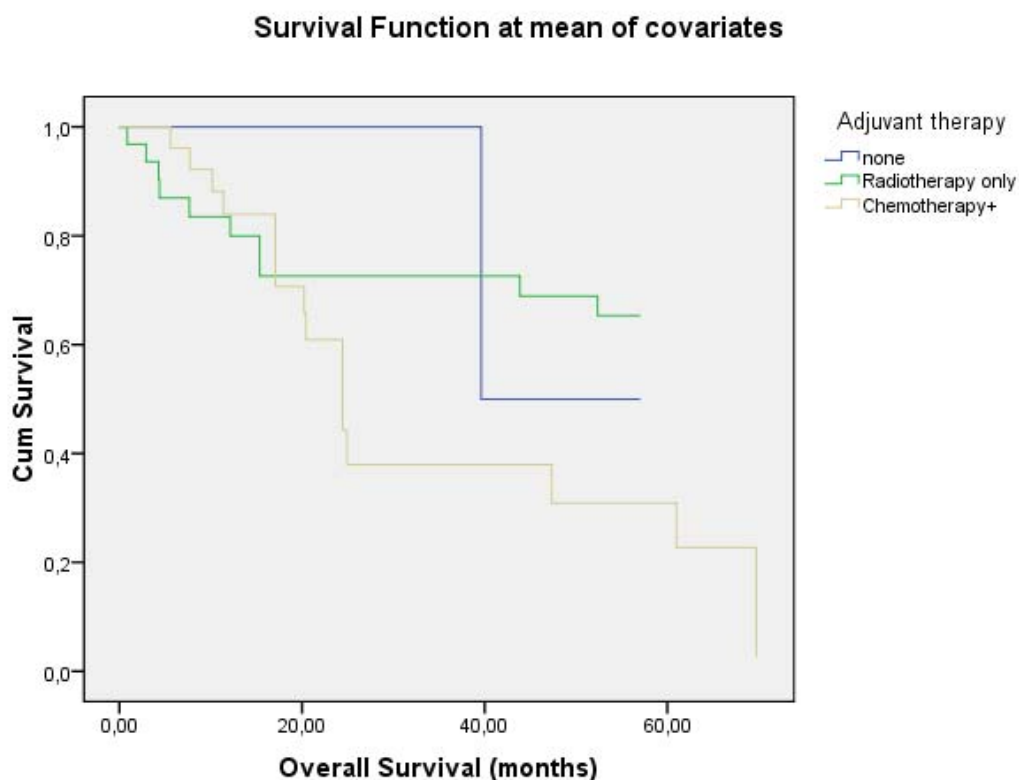
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση με βάση το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox για την αξιολόγηση της επίδραση του κάθε παράγοντα στην επιβίωση των ασθενών ανάμεσα στις διάφορες ομάδες συμπληρωματικής θεραπείας. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, προέκυψε ότι μόνο το στάδιο της νόσου (νόσος προχωρημένων σταδίων συγκριτικά με νόσο αρχικών σταδίων) ήταν αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης ανάμεσα στις διάφορες ομάδες θεραπείας ($P = 0,033$, HR: 4,9, 95% CI: 1,13 – 21,13). Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan Meier, ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας (εκφρασμένες σε μήνες) παρατίθενται στο **Σχήμα B.5** και μαζί δίδονται και τα δεδομένα που αφορούν τις μέσες και διάμεσες τιμές της επιβίωσης των ασθενών.

Πίνακας Β.6 Συσχέτιση των παθολογοανατομικών παραμέτρων που μελετήθηκαν στους ασθενείς του δείγματος με το είδος της συμπληρωματικής θεραπείας που εφαρμόστηκε.

Παράμετροι	Είδος συμπληρωματικής θεραπείας			P
	Αποκλειστικά ακτινοθεραπεία	Αποκλειστικά χημειοθεραπεία ή Χημειο - και ακτινοθεραπεία	Καμία θεραπεία	
Αριθμός ασθενών	24 (49,0%)	20 (40,8%)	5 (10,2%)	
Επιβίωση (μήνες)				
Μέση	60,2	33,1	84,1	0,012
Διάμεση	-	24,4	-	
pN				
pN0	9 (56,3%)	2 (12,5%)	5 (31,3%)	<0,001*
pN+	15 (45,5%)	18 (54,5%)	0 (0,0%)	
pT				
1 ή 2	18 (54,5%)	10 (30,3%)	5 (15,2%)	0,065
3 ή 4	6 (37,5%)	10 (62,5%)	0 (0,0%)	
Ιστολογική διαφοροποίηση ΑΚΣ				
Υψηλή	6 (46,2%)	4 (30,8%)	3 (23,1%)	0,185
Μέτρια ή χαμηλή	18 (50,0%)	16 (44,4%)	2 (5,6%)	
Περινευρική διήθηση				
Όχι	17 (47,2%)	14 (38,9%)	5 (13,9%)	0,461
Ναι	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0 (0,0%)	
Περιαγγειακή διήθηση				
Όχι	21 (48,8%)	17 (39,5%)	5 (11,6%)	1,000
Ναι	3 (50,0%)	3 (50,0%)	0 (0,0%)	
Όρια εκτομής				
Ελεύθερα	20 (51,3%)	16 (41,0%)	3 (7,7%)	0,522
Πλησίον ή θετικά	4 (40,0%)	4 (40,0%)	2 (20,0%)	
Στάδιο της νόσου				
Αρχικό (I & II)	6 (42,9%)	3 (21,4%)	5 (35,7%)	0,001*
Προχωρημένο (III & IV)	18 (51,4%)	17 (48,6%)	0 (0,0%)	

*Για αυτές τις παραμέτρους πραγματοποιήθηκε και πολυπαραγοντική ανάλυση της επίδρασής τους στην επιβίωση κατά Cox, ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες συμπληρωματικής θεραπείας.

Σχήμα Β.5 Οι καμπύλες επιβίωσης των ασθενών κατά Kaplan – Meier ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας. Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης των ασθενών αυτών (Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν σε μήνες).



Οι μέσες και διάμεσες τιμές της επιβίωσης των ασθενών ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας, εκφρασμένες σε μήνες								
Συμπληρωματική θεραπεία	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (μήνες)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (μήνες)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
Καμία	84,067	9,938	64,588	103,546	.	.	.	.
Ακτινοθεραπεία αποκλειστικά	60,206	7,540	45,428	74,984	.	.	.	.
Χημειοθεραπεία μόνο ή χημειο- και ακτινοθεραπεία	33,126	5,668	22,017	44,235	24,444	2,211	20,111	28,776
Σύνολο δείγματος	54,742	5,511	43,940	65,545	52,370	19,212	14,714	90,025

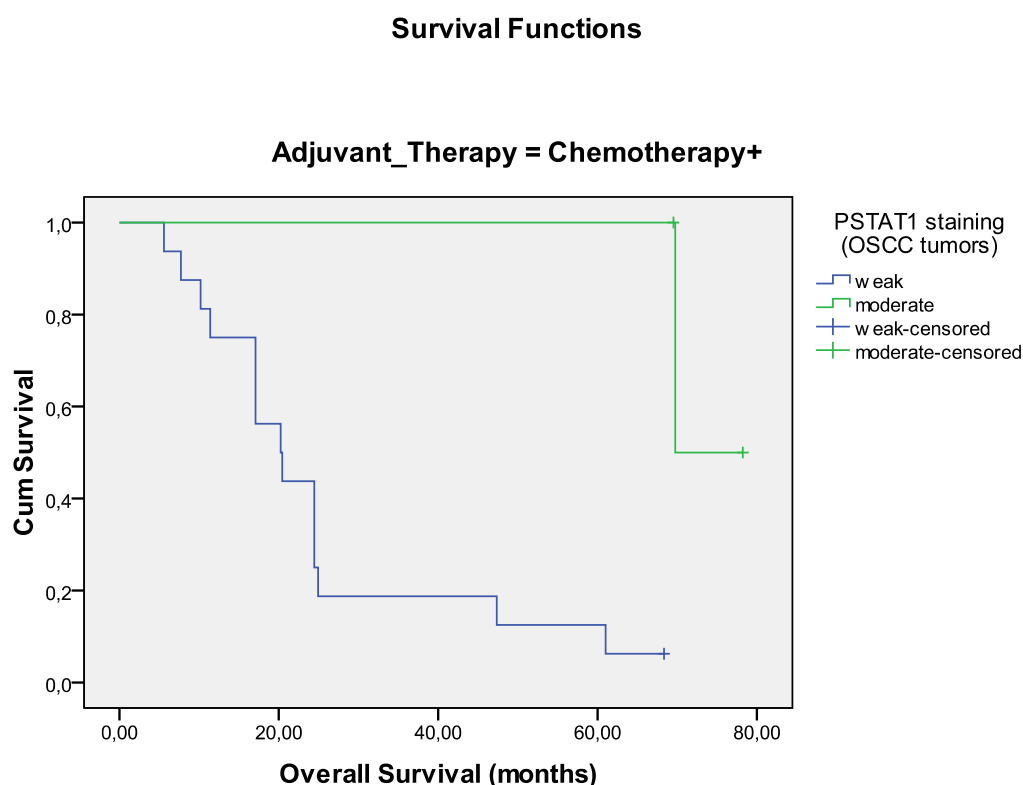
Από τη σύγκριση των καμπυλών αυτών με τη δοκιμασία log rank προέκυψε ότι οι καμπύλες διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0,012$, $\chi^2 = 8,926$, $df = 2$). Στους ασθενείς που δεν έγινε καμία συμπληρωματική παρέμβαση η μέση επιβίωση ήταν η μεγαλύτερη και ανήλθε στους 84,1 μήνες (95% CI: 64,6 – 103,6 μήνες). Ακολουθούν οι ασθενείς στους οποίους εφαρμόστηκε μόνο συμπληρωματική ακτινοθεραπεία με μέση επιβίωση 60,2 μήνες (95% CI: 45,4 – 75,0 μήνες) και τέλος οι ασθενείς οι οποίοι ακολούθησαν είτε χημειοθεραπεία είτε συνδυασμό χήμειο- και ακτινοθεραπείας με μέση επιβίωση 33,1 μήνες (95% CI: 22,0 – 44,2 μήνες) και διάμεση επιβίωση 24,4 μήνες (95% CI: 20,1 – 28,8 μήνες).

B.7. Συσχέτιση των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τους παράγοντες STAT1 και PSTAT1 με την επιβίωση ανά ομάδα συμπληρωματικής θεραπείας των ασθενών χωριστά

Επιπλέον, υπολογίστηκαν και οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan - Meier για κάθε μία από τις παραμέτρους της ανοσοϊστοχημικής χρώσης των παραγόντων STAT1 και PSTAT1 στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ για τους ασθενείς κάθε ομάδας συμπληρωματικής θεραπείας χωριστά. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε και εφαρμογή της δοκιμασίας log rank για την αξιολόγηση πιθανών στατιστικών διαφορών στην αθροιστική επιβίωση των ασθενών με βάση τις ανοσοϊστοχημικές αυτές παραμέτρους. Από το σύνολο των συγκρίσεων που πραγματοποιήθηκαν και οι οποίες συμπεριέλαβαν την ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και το ποσοστό θετικής χρώσης των κυττάρων για τους παράγοντες STAT1 και PSTAT1, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύγκριση των καμπυλών αθροιστικής επιβίωσης αναφορικά μόνο με τα επίπεδα της έντασης χρώσης του παράγοντα PSTAT1 στην ομάδα των ασθενών με εφαρμογή αποκλειστικά συμπληρωματικής χημειοθεραπείας

ή συνδυασμού χημειοθεραπείας με ακτινοθεραπεία ($P = 0,008$, $\chi^2 = 6,936$, $df = 1$). Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα B.6**, αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η μέτρια ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 στα ΑΚΣ σχετίζεται με καλύτερη απόκριση στην εφαρμογή συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, συγκριτικά με την ασθενή χρώση. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με μέτρια ένταση χρώσης για τον παράγοντα αυτόν η μέση επιβίωση ανήλθε στους 74,0 μήνες (95% CI: 68,1 – 79,9 μήνες) και ήταν σχεδόν τριπλάσια αυτής που παρατηρήθηκε για όσους είχαν ασθενή ένταση χρώσης στην ίδια ομάδα, η οποία ανήλθε μόλις στους 25,1 μήνες (95% CI: 16,5 – 33,8 μήνες). Επιπλέον και η διάμεση επιβίωση για τα άτομα με ασθενή ένταση χρώσης του παράγοντα PSTAT1 στην ομάδα αυτή συμπληρωματικής θεραπείας ήταν μόλις 20,2 μήνες (95% CI: 13,7 – 26,8 μήνες). Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται αναλυτικά μαζί με το **Σχήμα B.6**.

Σχήμα Β.6 Οι καμπύλες επιβίωσης των ασθενών κατά Kaplan – Meier για την ομάδα που έλαβε συμπληρωματική χημειοθεραπεία ή συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας (chemotherapy+) με βάση την ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα **PSTAT1** στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ (moderate = μέτρια ένταση χρώσης, weak = ασθενής ένταση). Επιπλέον παρατίθενται και τα δεδομένα από τον υπολογισμό της μέσης και διάμεσης επιβίωσης αυτών των ασθενών (Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν σε μήνες).



Μέσες και διάμεσες τιμές του χρονικού διαστήματος επιβίωσης των ασθενών στους οποίους εφαρμόστηκε συμπληρωματική χημειοθεραπεία μόνη της ή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία με βάση την ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ

Ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του παράγοντα PSTAT1	Μέση επιβίωση				Διάμεση επιβίωση			
	Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)		Τιμή (μήνες)	Τυπικό σφάλμα (S.E.)	95% Διάστημα Αξιοπιστίας (μήνες)	
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
Ασθενής ένταση	25,111	4,413	16,461	33,761	20,238	3,351	13,670	26,806
Μέτρια ένταση	73,988	2,997	68,114	79,862	69,749	.	.	.
Σύνολο ασθενών ομάδας	33,126	5,668	22,017	44,235	24,444	2,211	20,111	28,776

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1. Σύγκριση της παρούσας μελέτης με την υπάρχουσα βιβλιογραφία

Ανατρέχοντας στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει ταυτόχρονα τις παραμέτρους που αφορούν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων PSTAT1 και STAT1, τόσο σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του στόματος (ΑΚΣ), όσο και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Παράλληλα, διερευνά τις πιθανές συσχετίσεις της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των παραγόντων STAT1 και PSTAT1 με τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται η συνολική επιβίωση των ασθενών, αλλά και η ανταπόκριση στη συμπληρωματική θεραπεία που εφαρμόστηκε ανά περίπτωση (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό αυτών). Το χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών ανήλθε στα 7 έτη μετά την εκτομή της πρωτοπαθούς εστίας.

Μέχρι σήμερα, ένας μικρός αριθμός μελετών έχει διερευνήσει το ρόλο του παράγοντα STAT1 στη μεταφορά ενδοκυττάρων σημάτων σε καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου, χωρίς όμως να εστιάζει στην ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα αυτού (PSTAT1), με εξαίρεση τις εργασίες των Leibowitz και συν.^(177, 178). Οι εργασίες αυτές όμως στηρίχθηκαν αποκλειστικά σε κυτταρικές σειρές και στην έρευνα διαφόρων παραμέτρων που αφορούν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης PSTAT1 και του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, μόνο οι Laimer και συν. (2007) είχαν μελετήσει προηγουμένως το πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του παράγοντα STAT1 σε ασθενείς με ΑΚΣ και το πιθανό του ρόλο ως προγνωστικού δείκτη για την επιβίωση των ασθενών, σε περιπτώσεις εφαρμογής συμπληρωματικής χημειοθεραπείας⁽¹⁷⁰⁾. Οι ερευνητές αυτοί όμως δεν διέκριναν την ενεργοποιημένη

από τη μη ενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης STAT1, δηλαδή τη φωσφορυλιωμένη (PSTAT1) από τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της (USTAT1), ενώ το ερευνητικό πρωτόκολλο που εφάρμοσαν ήταν πολύ διαφορετικό από το ερευνητικό πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης και στηρίχθηκε αποκλειστικά και μόνο στις διαβαθμίσεις του ποσοστού των κυττάρων με θετική χρώση για τον παράγοντα STAT1.

Γ.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων από τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των STAT1 και PSTAT1 σε περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τόσο όσον αφορά τις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ, όσο και τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, προέκυψε ότι η διαβάθμιση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα STAT1 κυμάνθηκε ανάμεσα σε μέτρια και έντονα επίπεδα, ενώ για τον παράγοντα PSTAT1 ανάμεσα σε μέτρια και ασθενή επίπεδα. Παράλληλα, τα ποσοστά των κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα STAT1 κυμάνθηκαν ανάμεσα σε υψηλά και μεσαία επίπεδα, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 συμπεριέλαβαν όλες τις διαβαθμίσεις (χαμηλή, μέση και υψηλή). Πρακτικά όμως, το τελευταίο επίπεδο διαβάθμισης απαντήθηκε μόνο σε 4 περιπτώσεις (8,2% του συνόλου των παρασκευασμάτων). Οι διαφορές αυτές μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι το STAT1 αντίσωμα ανιχνεύει τα ενδογενή επίπεδα STAT1, τόσο τις α- (91kDa) όσο και τις β- (84kDa) ισομορφές αυτού, ανεξάρτητα από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του STAT1, ενώ το αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη μορφή του STAT1 [phospho-STAT1 (Tyr 701)] ανιχνεύει τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης

STAT1, μόνο όταν αυτή είναι φωσφορυλιωμένη στην περιοχή της τυροσίνης 701 ⁽¹⁵¹⁾. Ως εκ τούτου, τα υψηλότερα επίπεδα διαβαθμίσεων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του παράγοντα STAT1 που παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν τόσο στο μεγάλο αποθεματικό της ανενεργής μορφή του παράγοντα αυτού στους πυρήνες των κυττάρων (USTAT1), όσο και στον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με έκφραση της πρωτεΐνης USTAT1, συγκριτικά με την ενεργό φωσφορυλιωμένη μορφή της (PSTAT1).

Όταν πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των παραπάνω παραγόντων ανάμεσα σε περιοχές με ΑΚΣ και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, παρατηρήθηκε μείωση κατά 32,7% στη συχνότητα εμφάνισης των υψηλών ποσοστών κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα STAT1 ($P = 0,014$) στα ΑΚΣ. Την ίδια στιγμή, παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη μείωση, της τάξης του 57,1%, η οποία αφορούσε τη συχνότητα εμφάνισης των υψηλών και μεσαίου επιπέδων ποσοστών κυττάρων με θετική PSTAT1 χρώση και πάλι στις περιοχές με ΑΚΣ ($P < 0,001$). Η παρατήρηση αυτή αντανάκλα το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου *STAT1* μειώνεται στον καρκίνο του στόματος, οδηγώντας σε χαμηλότερο αριθμό κυττάρων με αποθέματα της ανενεργής μορφής του παράγοντα αυτού (USTAT1). Επιπλέον, εκτός από τη μείωση της διαθεσιμότητας των μορίων USTAT1, τα ακόμη μικρότερα ποσοστά καρκινικών κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον παράγοντα PSTAT1 δείχνουν ότι και οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση του STAT1 είναι εξίσου ελαττωμένοι στις περιπτώσεις καρκίνου. Δεδομένου ότι τα ποσοστά των κυττάρων με συνολική έκφραση του παράγοντα STAT1 (USTAT1 και PSTAT1) ανέρχονται σε μεσαία επίπεδα στους περισσότερους όγκους, αλλά και ότι τα ποσοστά των κυττάρων με έκφραση του παράγοντα PSTAT1 κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα,

είναι λογικό να υποτεθεί ότι η αναλογία USTAT1/PSTAT1 αυξάνεται στα ΑΚΣ του στόματος. Μάλιστα, αν και έχει αποδειχθεί ότι τα μονομερή του USTAT1 μπορούν να συνδεθούν με το DNA από μόνα τους, η συγγένειά τους με το μόριο αυτό είναι πολύ μικρότερη από εκείνη των PSTAT1 ομοδιμερών ⁽¹⁵¹⁾. Επομένως, εύλογα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μείωση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν την ενεργό φωσφορυλιωμένη μορφή του παράγοντα αυτού (PSTAT1) οδηγεί σε αποδυνάμωση της ογκοκατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης STAT1 στα ΑΚΣ.

Γ.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων με εργασίες που αφορούν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των STAT1 και PSTAT1 σε όγκους κεφαλής και τραχήλου και ανάλυση των μηχανισμών της ογκοκατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης STAT1

Τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα των Yim και συν. (2012), οι οποίοι ακολούθησαν παρόμοια μεθοδολογία ⁽¹⁵⁸⁾. Οι ερευνητές αυτοί συνέκριναν την έκφραση του παράγοντα STAT1 ανάμεσα σε περιοχές με θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης STAT1 στο DNA των όγκων ήταν σημαντικά χαμηλότερη, συγκριτικά με αυτή των παρακείμενων φυσιολογικών περιοχών ⁽¹⁵⁸⁾. Από την άλλη πλευρά, η μελέτη των Xi και συν. (2006) σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC) δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαφορές μέσα από την πραγματοποίηση ανάλογων συγκρίσεων ⁽¹⁵⁴⁾. Ωστόσο, οι ερευνητές αυτοί σημειώνουν ότι η έκφραση του παράγοντα STAT1 ήταν χαμηλότερη τόσο στις περιοχές με HNSCC, όσο και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, όταν και οι δύο αυτές περιοχές συγκρίθηκαν με φυσιολογικούς ιστούς από την περιοχή του

στοματοφάρυγγα υγιών ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου ⁽¹⁵⁴⁾.

Η ογκοκατασταλτική δράση της πρωτεΐνης STAT1, η οποία λαμβάνει χώρα μέσα από την ενεργοποίηση της απόπτωσης των κυττάρων και την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, πραγματοποιείται με έναν από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

- Την άμεση ενεργοποίηση αποπτωτικών γονιδίων ⁽¹⁷⁹⁾.
- Την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη p53 και την επαγωγή της απόπτωσης μέσα από την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων που αποκρίνονται στη δράση της πρωτεΐνης p53 ⁽¹⁶⁷⁾.
- Την αναστολή της δραστηριότητας του γονιδίου MDM2 και, ως εκ τούτου, την ενίσχυση των αποπτωτικών διεργασιών που συνδέονται με την πρωτεΐνη p53 ⁽¹⁷⁹⁾.
- Επιπλέον, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT1 μέσα στα κύτταρα του όγκου μπορεί να προκληθεί από ενδοκυττάρια σήματα ή μέσω αυξητικών παραγόντων με αυτοκρινή ή παρακρινή δράση. Μάλιστα, η πρωτεΐνη STAT1 μπορεί να ενεργοποιηθεί και από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εκκρίνουν ιντερφερόνες (IFNs), οδηγώντας με τον τρόπο αυτό το ανοσοποιητικό σύστημα σε αντικαρκινική δράση ^(177, 178, 180).
- Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF σχετίζονται με χαμηλότερη δραστηριότητα της πρωτεΐνης STAT1 σε θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, εξηγώντας με τον τρόπο αυτό περαιτέρω τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν σε απορρύθμιση της έκφρασης του παράγοντα STAT1 στον καρκίνο ⁽¹⁵⁸⁾.

Γ.4. Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης PSTAT1 με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών, συμπεριλαμβανομένης της συνολικής επιβίωσης

Εστιάζοντας στη δραστική μορφή της πρωτεΐνης STAT1 (PSTAT1), τα ευρήματα από την παρούσα μελέτη σχετικά με το ρόλο του γονιδίου *STAT1* στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του στόματος παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όταν η ένταση της χρώσης της πρωτεΐνης PSTAT1 σε περιοχές με ΑΚΣ μελετήθηκε αναφορικά με τις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών, προέκυψε ότι η υψηλή ένταση ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 εμφάνισε τάση συσχέτισης με τους καλά διαφοροποιημένους όγκους ($P = 0,052$), αλλά και τους όγκους εκείνους που με βάση το σύστημα pTNM ταξινομήθηκαν ως όγκοι αρχικών σταδίων ($P = 0,065$). Ωστόσο, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών με αυτά τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.

Όσον αφορά την επιβίωση, οι διαβαθμίσεις του επιπέδου έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον παράγοντα PSTAT1 από περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ δεν σχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση των ασθενών, όταν υπολογίστηκαν οι καμπύλες Kaplan - Meier και εφαρμόστηκε η δοκιμασία log rank ($P = 0,191$). Μέχρι σήμερα, προηγούμενη μελέτη των Widschwendter και συν. (2002) σε καρκίνο του μαστού συσχέτισε την αυξημένη έκφραση του παράγοντα PSTAT1 με σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών, όσο και του διαστήματος κατά το οποίο οι ασθενείς παρέμειναν ελεύθεροι νόσου⁽¹⁵³⁾. Επιπλέον, οι Simpson και συν. (2010) κατέληξαν επίσης στο συμπέρασμα ότι η παρουσία υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης STAT1 στον πυρήνα του κυττάρου σχετίζεται με βελτίωση της επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου⁽¹⁵⁵⁾. Από την

άλλη πλευρά, οι Laimer και συν. (2007) συνέδεσαν την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης STAT1 με απουσία μεταστάσεων στους λεμφαδένες ασθενών με ΑΚΣ του στόματος και όχι με τη συνολική επιβίωση ⁽¹⁷⁰⁾. Αυτές οι αποκλίσεις μεταξύ των διαφόρων ερευνητών μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι η διαβάθμιση των παραμέτρων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης βασίστηκε σε διαφορετικά πρωτόκολλα, γεγονός που δεν καθιστά τα αποτελέσματα άμεσα συγκρίσιμα. Παράλληλα όμως και τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα διέφεραν μεταξύ των ασθενών των μελετών αυτών αναφορικά με τον αριθμό τους, τις μεθόδους συμπληρωματικής θεραπείας και τις περιοχές προέλευσης των δειγμάτων των νεοπλασμάτων.

Γ.5. Ανάλυση των προγνωστικών δεικτών της συνολικής επιβίωσης των ασθενών

Στην παρούσα μελέτη, διάφοροι άλλοι παράγοντες που μελετήθηκαν αποτέλεσαν προγνωστικούς δείκτες για τη συνολική επίβιωση των ασθενών. Ανάμεσα στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται:

- η παρουσία περινευρικής διήθησης,
- η εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων,
- το μέγεθος του όγκου (όγκοι pT 3 ή 4, συγκριτικά με όγκους pT 1 ή 2) και
- η παθολογοανατομική σταδιοποίηση της νόσου με βάση το σύστημα TNM (όγκοι προχωρημένων σταδίων III ή IV, συγκριτικά με όγκους αρχικών σταδίων I ή II).

Ωστόσο, στο τελικό πολυπαραγοντικό μοντέλο παλινδρόμησης κατά Cox, μόνο η σταδιοποίηση της νόσου βάσει του συστήματος pTNM και η παρουσία περινευρικής διήθησης αναδείχθηκαν ως σημαντικές παράμετροι.

Η προγνωστική σημασία της σταδιοποίησης με βάσει το σύστημα TNM για τη συνολική επιβίωση των ασθενών έχει αναγνωριστεί εδώ και πολλές δεκαετίες ^(181, 182). Επιπλέον και η παρουσία περινευρικών διηθήσεων, έχει επίσης τεκμηριωθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για τοπική υποτροπή της νόσου, υψηλότερα ποσοστά μεταστάσεων, αλλά και μείωση της χρονικής διάρκειας επιβίωσης σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της κεφαλής και του τραχήλου, από πολλούς ερευνητές ⁽¹⁸³⁾.

Γ.6. Η πρωτεΐνη PSTAT1 ως προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης σε ασθενείς με συμπληρωματική χημειοθεραπεία και οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται η δράση αυτή

Όσον αφορά τα διαφορετικά πρωτόκολλα συμπληρωματικής θεραπείας, τα αποτελέσματά από την παρούσα μελέτη κατέδειξαν ότι οι ασθενείς που εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την πρωτεΐνη PSTAT1 σε περιοχές με ΑΚΣ και συγκεκριμένα, μέτρια επίπεδα έντασης συγκριτικά με ασθενή επίπεδα, επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μετά από εφαρμογή συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία. Μάλιστα, στους ασθενείς με μέτρια ένταση χρώσης για την πρωτεΐνη PSTAT1 μετά από χημειοθεραπεία, η μέση επιβίωση ανήλθε στους 74,0 μήνες (95% CI: 68,1 – 79,9 μήνες) και ήταν σχεδόν τριπλάσια αυτής που παρατηρήθηκε για όσους είχαν ασθενή ένταση χρώσης, η οποία ανήλθε μόλις στους 25,1 μήνες (95% CI: 16,5 – 33,8 μήνες).

Δεδομένου ότι ανάλογη παρατήρηση δε σημειώθηκε μεταξύ των ατόμων που υποβλήθηκαν αποκλειστικά σε συμπληρωματική ακτινοθεραπεία, ούτε και μεταξύ αυτών που δεν ακολούθησαν κάποιο πρωτόκολλο συμπληρωματικής θεραπείας, η

διαφορά που παρατηρήθηκε στην επιβίωση μεταξύ των ασθενών αυτών σχετίζεται αποκλειστικά με την εφαρμογή της χημειοθεραπείας. Το εύρημα αυτό δεν είναι άμεσα συγκρίσιμο με τα αποτελέσματα της εργασίας των Laimer και συν. (2007), οι οποίοι ανέφεραν επίσης καλύτερη ανταπόκριση σε συμπληρωματική χημειοθεραπεία για ασθενείς με ΑΚΣ, οι οποίοι «εμφάνισαν αυξημένη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT1»⁽¹⁷⁰⁾. Ωστόσο, η αυξημένη ενεργοποίηση που αναφέρουν οι ερευνητές αυτοί αντανakλά υψηλότερα ποσοστά κυττάρων με ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης STAT1 και όχι την ένταση χρώσης για την ενεργό μορφή της πρωτεΐνης αυτής (PSTAT1). Παρόλα αυτά, τόσο η παρούσα μελέτη, όσο και η εργασία των Laimer και συν. (2007), παρόλο που διαφέρουν δραστικά σε επίπεδο σχεδιασμού και ανάλυσης των αποτελεσμάτων καταδεικνύουν τον πιθανό ρόλο των διαφορετικών μορφών της πρωτεΐνης STAT1 ως προγνωστικών δεικτών για την ανταπόκριση στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με ΑΚΣ.

Μία σειρά από διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς που έχουν αναφερθεί από διάφορους ερευνητές μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη χημειοευαισθησία των καρκινικών κυττάρων με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης STAT1. Μεταξύ αυτών των μηχανισμών, συγκαταλέγονται:

- Η συνέργεια μεταξύ ορισμένων χημειοθεραπευτικών παραγόντων με την ανοσοαπόκριση εναντίον των καρκινικών κυττάρων, η οποία εμπλέκει την έκφραση του γονιδίου *STAT1*. Συγκεκριμένα, έχει τεκμηριωθεί ότι η πρωτεΐνη PSTAT1 είναι απαραίτητη για τη δράση του μηχανισμού επεξεργασίας αντιγόνων (Antigen Processing Machinery, APM) του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (HLA class I) σε όγκους της κεφαλής και του τραχήλου. Μείωση της δραστηριότητας του μηχανισμού αυτού μπορεί να

οδηγήσει σε διαφυγή των κακοηθών κυττάρων από την ανοσολογική απόκριση (178, 184).

- Η συνεργική δράση ανάμεσα στην 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) ή στην δοξορουβικίνη και σε διάφορες ιντερφερόνες, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT1 με αποτέλεσμα την επαγωγή προαποπτωτικών σημάτων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (185, 186).
- Το μονοπάτι έλεγχου του κυτταρικού κύκλου που σχετίζεται με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη της αταξίας - τηλεαγγειεκτασίας (Ataxia Telangiectasia Mutated protein, ATM), το οποίο αποτελεί άλλο ένα πεδίο αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης STAT1 και διαφόρων χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η αλληλεπίδραση αυτή δημιουργεί βλάβες στο DNA και γονοτοξικό στρες οδηγώντας σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και της σύνθεσης του DNA (179, 187, 188).
- Η ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση που προκαλείται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, μέσω θεραπείας αναστολής της μεθυλίωσης του γονιδίου *STAT1* σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα της κεφαλής και του τραχήλου. Η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *STAT1* ενισχύει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου αυτού αποτελεί τον κυρίαρχο μηχανισμό που προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του γονιδίου σε καρκίνους της κεφαλής και του καρκίνου (154).

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα ποσοστά των θετικών κυττάρων για έκφραση των παραγόντων STAT1 και PSTAT1 είναι μειωμένα στις περιοχές των παρασκευασμάτων με ΑΚΣ, συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ($P = 0,014$ και $P < 0,001$ αντίστοιχα).
2. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων έντασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την πρωτεΐνη PSTAT1 με τη συνολική επιβίωση των ασθενών που βρίσκονται υπό συμπληρωματική χημειοακτινοθεραπεία.
3. Προκειμένου να εδραιωθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης PSTAT1 ως προγνωστικού βιολογικού δείκτη για την ανταπόκριση των ασθενών με ΑΚΣ στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία, απαιτείται η διεξαγωγή τυχαιοποιημένων διπλών τυφλών μελετών προοπτικού τύπου σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η παρούσα μελέτη διερευνά τα πρότυπα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του επαγωγέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής-1 (STAT1), καθώς και της ενεργού φωσφορυλιωμένης μορφής του (PSTAT1), ως πιθανών προγνωστικών δεικτών σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (ΑΚΣ).

Ασθενείς και Μέθοδοι: Η έκφραση των πρωτεϊνών STAT1 και PSTAT1 προσδιορίστηκε ανοσοϊστοχημικά, τόσο σε περιοχές με ΑΚΣ, όσο και σε παρακείμενες περιοχές φυσιολογικού βλεννογόνου, σε μία σειρά 49 ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης της πρωτοπαθούς καρκινικής εστίας από τη στοματική κοιλότητα. Τα αποτελέσματα από την ανοσοϊστοχημεία συσχετίστηκαν με όλες τις διαθέσιμες κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους που ελήφθησαν μέσα από περίοδο παρακολούθησης 7 ετών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η συνολική επιβίωση και η ανταπόκριση των ασθενών στην εφαρμοζόμενη συμπληρωματική θεραπεία.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στροφή προς χαμηλότερα ποσοστά κυττάρων με έκφραση των πρωτεϊνών STAT1 ($P < 0,014$) και PSTAT1 ($P < 0,001$) στις περιοχές με ΑΚΣ, συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ δεν τεκμηριώθηκε κάποια συσχέτιση με τις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των ασθενών. Ωστόσο, για την ομάδα των ασθενών που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία, η αυξημένη ένταση χρώσης για την πρωτεΐνη PSTAT1 σε περιοχές με ΑΚΣ συσχετίστηκε με καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με τη συνολική επιβίωση ($P = 0,008$).

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που διερευνά ταυτόχρονα τα πρότυπα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών STAT1 και PSTAT1 και την προγνωστική τους σημασία σε ασθενείς με ΑΚΣ, αναδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει η πρωτεΐνη PSTAT1 ως βιολογικού δείκτη για τον καθορισμό της θεραπευτικής διαδικασίας. Βέβαια, είναι αναγκαία η διεξαγωγή μεγάλων προοπτικών μελετών για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας.

SUMMARY

Purpose: To estimate whether the immunohistochemical (IHC) expression patterns of the tumor suppressor gene signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) and its active phosphorylated form (PSTAT1) serve as potential prognostic and predictive markers in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Patients and Methods: STAT1 and PSTAT1 protein expressions were examined immunohistochemically in OSCC tumor tissues and adjacent normal mucosa from 49 patients who underwent primary surgery. The IHC scores were correlated with all available clinicopathologic parameters that were obtained from a maximum of 7 years of follow-up, including survival and response to adjuvant therapy treatment.

Results: There was a shift toward lower percentages of cells with STAT1 ($P < .014$) and PSTAT1 ($P < .001$) expression detected in OSCC tumors compared with adjacent normal tissue sites. No association with patients' clinicopathologic characteristics was shown. However, for the group of patients who received adjuvant chemotherapy, increased PSTAT1 intensity of staining in OSCC tumors was strongly associated with better overall survival ($P = .008$).

Conclusions: This is the first study to concurrently evaluate STAT1 and PSTAT1 IHC expression patterns and their prognostic significance in patients with OSCC, highlighting the potential role of PSTAT1 as a biomarker in therapeutic decision making. Large prospective studies are needed to verify these findings.

Βιβλιογραφία

1. Marcu LG, Yeoh E. **A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1303-14.
2. Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. **Head and neck cancer: past, present, future.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1111-8.
3. Psyrri A, Licitra L, Lacombe D, Schuurin E, Budach W, Ozsahin M, Knecht R, Vermorken JB, Langendijk JA. **Strategies to promote translational research within the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Head and Neck Cancer Group: a report from the Translational Research Subcommittee.** *Ann Oncol* 2010;21:1952-60.
4. Hayes RB, Bravo-Otero E, Kleinman DV, Brown LM, Fraumeni JF Jr, Harty LC, Winn DM. **Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico.** *Cancer Causes Control* 1999;10:27-33.
5. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. **Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain.** *Oral Oncol* 2006;36:170-4.
6. Angiero F, Gatta LB, Seramondi R, Berenzi A, Benetti A, Magistro S, Ordesi P, Grigolato P, Dessy E. **Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer.** *Anticancer Res* 2010;30:3435-40.
7. Saini R, Tang TH, Zain RB, Cheong SC, Musa KI, Saini D, Ismail AR, Abraham MT, Mustafa WM, Santhanam J. **Significant association of high-risk human papillomavirus (HPV) but not of p53 polymorphisms with oral squamous cell carcinomas in Malaysia.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:311-20.
8. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. **Advances in the biology of oral cancer.** *Oral Oncol* 2007;43:523-34.
9. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER cancer statistics review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations).** National Cancer Institute, Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/. Accessed 25 March 2013.
10. Syrjanen K, Syrjanen S, Pyrhonen S. **Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas.** *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1982; 44: 323-34.
11. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M et al. **Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV)**

- involvement in oral squamous cell carcinogenesis.** *Int J Oral Surg* 1983; 12:418–24.
12. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H et al. **Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer.** *Int J Cancer* 2006; 119:2620–3.
 13. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF et al. **Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States.** *J Clin Oncol* 2008;6:612–9.
 14. Attner P, Du J, Nasman A et al. **The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer.** *Int J Cancer* 2010; 126:2879–84.
 15. Miller C, Johnstone B. **Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91: 622–35.
 16. Wiest T, Schwarz E, Enders C et al. **Involvement of intact HPV16 E6/7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control.** *Oncogene* 2002;21:1510–7.
 17. Syrjanen S. **HPV infections and tonsillar carcinoma.** *Clin Pathol* 2004;57:449–55.
 18. Syrjanen S. **Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer.** *J Clin Virol* 2005;32:59–66.
 19. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M et al. **Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis.** *Clin Otolaryngol* 2006; 31:259–66.
 20. Gillison ML, D’Souza G, Westra W et al. **Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16 positive and human papillomavirus type 16 negative head and neck cancers.** *J Natl Cancer Inst* 2008;100: 407–20.
 21. Trottier H, Burchell AN. **Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases.** *Public Health Genomics* 2009;12: 291–307.
 22. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M et al. **Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC).** *Head Neck Oncol* 2010;2:15.
 23. Kreimer A, Clifford G, Boyle P et al. **Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467–75.

24. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR et al. **Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection.** *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626–36.
25. Smith E, Hoffman H, Summersgill K et al. **Human papillomavirus and risk of oral cancer.** *Laryngoscope* 1998;108:1098–1103.
26. Herrero R, Castellangue X, Pawlita M et al. **Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer Multicenter Study.** *J Natl Cancer Int* 2003;95:1772–83.
27. Hansson B, Rosenqvist K, Antonsson A et al. **Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden.** *Acta Otolaryngol* 2005;125:1337–44.
28. Castro T, Bussoloti Filbo I. **Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx.** *Braz J Otorhinolaryngol* 2006;72:272–82.
29. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M et al. **Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions.** *Int J Oncol* 2007;30:813–23.
30. Termine N, Panzarella V, Falaschini S et al. **HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007).** *Ann Oncol* 2008;19:1681–90.
31. Chaudhary A, Singh M, Sundaram S et al. **Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review.** *Head Neck Oncol* 2009; 1: 22.
32. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. **Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications.** *J DentRes* 2009;88:300–306.
33. Fakhry C, Westra W, Li S et al. **Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial.** *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261–9.
34. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S et al. **Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium.** *Int J Epidemiol* 2009;39:166–81.
35. Lajer CB, von Buchwald C. **The role of human papillomavirus in head and neck cancer.** *APMIS* 2010;118:510–9.
36. Ragin CC, Taioli E. **Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis.** *Int JCancer* 2007;121:1813–20.

37. Werning JW. **Oral Cancer: Diagnosis, Management, and Rehabilitation, 1st edition.** *Thieme 2007, ISBN: 1588903095.*
38. Αγγελόπουλος ΠΑ, Αλεξανδρίδης Κ. **Σύγχρονη Στοματική & Γναθοπροσωπική Χειρουργική.** *Αθήνα 2004.*
39. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.** *Who Press 2005.*
40. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch, eds. **International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification of Malignant Tumors (7th ed).** *Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009.*
41. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FL, Trotti A (Eds). **AJCC Cancer Staging Manual (7thed.).** *Springer Verlag, New York 2010, ISBN 978-0-387-88440-0.*
42. Patel SG, Shah JP. **TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity.** *CA Cancer J Clin 2005;55(4):242-58.*
43. Shah JP, Patel SG, Sing B. **Head and Neck Cancer – Surgery and Oncology (4thed.).** *Elsevier 2012, ISBN: 978-0-323-05589-5.*
44. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. **Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer.***Oral Oncol. 2003;39(4):386-90.*
45. Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. **A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis.** *J Oral Maxillofac Pathol 2011;15(2):168-76.*
46. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. **Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas.***Scand J Dent Res 1987;95:229-49.*
47. Roland NJ, Caslin AW, Nash J, Stell PM. **Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck.***Head Neck. 1992;14:224-9.*
48. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. **Head and neck cancer.** *Lancet 2008;371(9625):1695-709..*
49. Bernier J, Cooper JS. **Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence?** *Oncologist 2005;10(3):215-24.*
50. Haddad RI, Shin DM. **Recent advances in head and neck cancer.** *N Engl J Med. 2008;359(11):1143-54.*

51. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. **Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer.** *N Engl J Med. [Clinical Trial, Phase III Comparative Study Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2007;357(17):1695-704.
52. Perisanidis C, Sulzbacher I, Mittlböck M, Mitchell D, Czembirek C, Seemann R, et al. **Survival of patients with pathologic T0N+ oral and oropharyngeal cancer after neoadjuvant therapy and surgery: the minority report.** *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115(3):293-8.
53. Wang CC, McIntyre J. **Re-irradiation of laryngeal carcinoma—techniques and results.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26(5):783-5.
54. Huang SH, O’Sullivan B. **Oral Cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18(2):233-40.
55. Vikram B. **Changing patterns of failure in advanced head and neck cancer.** *Arch Otolaryngol* 1984;110:564-5.
56. Pauloski BR, Rademaker AW, Logemann JA, Discekici-Harris M, Mittal BB. **Comparison of swallowing function after intensity-modulated radiation therapy and conventional radiotherapy for head and neck cancer.** *Head Neck* 2014;doi: 10.1002/hed.23796.
57. F. Khan. **The Physics of Radiation Therapy.** *Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010.*
58. Schiff PB, Harrison LB, Strong EW, Fass EW, Shah JP, Spiro R, Sessions R, Gerold F, Vikram B, Fuks ZY. **Impact of the time interval between surgery and postoperative radiation therapy on locoregional control in advanced head and neck cancer.** *J Surg Oncol* 1990;43(4):203-8.
59. Rosenthal DI, Liu L, Lee JH, Vapiwala N, Chalian AA, Weinstein GS, Chilian I, Weber RS, Machtay M. **Importance of the treatment package time in surgery and postoperative radiation therapy for squamous carcinoma of the head and neck.** *Head Neck* 2002;24(2):115-26.
60. Brown JS, Shaw RJ, Bekiroglou F, Rogers SN. **Systematic review of the current evidence in the use of postoperative radiotherapy for oral squamous cell carcinoma.** *Br J Oral Maxillofac Surgery* 2012;50(6):481-9.
61. Paccagnella A, Orlando A, Marchiori C, et al. **Phase III trial of initial chemotherapy in stage III or IV head and neck cancers: a study by the Gruppo di Studio sui Tumori della Testa e del Collo.** *J Natl Cancer Inst* 1994;86:265-9.
62. Munro AJ. **An overview of randomised controlled trials of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer.** *Br J Cancer* 1995;68:83-91.

63. El-Sayed S, Nelson N. **Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials.** *J Clin Oncol* 1996;14:838-47.
64. Lefebvre JL, Chevalier D, Lubinski B, et al. **Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group.** *J Natl Cancer Inst* 1996;88:890-9.
65. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. **Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099.** *J Clin Oncol* 1988;16(4):1310-7.
66. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. **Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2081-6.
67. Domenge C, Hill C, Lefebvre JL, et al. **Randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in oropharyngeal carcinoma. French Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC).** *Br J Cancer* 2000;83:1594-8.
68. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, et al. **Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer.** *Lancet* 2000;355:949-55.
69. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. **Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer.** *N Engl J Med* 2003;349:2091-8.
70. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, et al. **An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer.** *J Clin Oncol* 2003;21:92-8.
71. Baujat B, Audry H, Bourhis J, et al. **Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1703 patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64(1):47-56.
72. Argiris A, Karamouzis MV. **Empowering induction therapy for locally advanced head and neck cancer.** *Ann Oncol* 2011;22(4):773-81.
73. Lorch JH, Goloubeva O, Haddal RL et al. **Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: long term results of the tax 324 randomised phase 3 trial.** *Lancet Oncol* 2011;12(2):153-9.

74. Hitt R, Lopez-Pousa A, Martinez-Trufero J, et al. **Phase III study comparing cisplatin plus fluorouracil to paclitaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer.** *J Clin Oncol* 2005;23:8636-45.
75. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. **Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer.** *N Engl J Med* 2007;357:1705-15.
76. Fu KK. **Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy.** *Cancer* 1985;55:2123-30.
77. Garden AS, Asper JA, Morrison WH, et al. **Is concurrent chemoradiation the treatment of choice for all patients with Stage III or IV head and neck carcinoma?** *Cancer* 2004;100:1171-8.
78. Kwong M, DiStasio S, et al. **Cisplatin, Douracil, and Eucoverin induction chemotherapy followed by concurrent cisplatin chemotherapy for organ preservation and cure in patients with advanced head and neck cancer: long term follow up.** *Clin Oncol* 2004;22:3061-9.
79. Machtay M, Rosenthal DI, Hershock D et al. **Organ preservation therapy using induction plus concurrent chemoradiation for advanced resectable oropharyngeal carcinoma: A University of Pennsylvania Phase II Trial.** *J Clin Oncol* 2002;20(19):3964-71.
80. Kies MS, Holsinger FC, Lee JJ, William WN Jr et al. **Induction chemotherapy and cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: results from a phase II prospective trial.** *J Clin Oncol* 2010;28(1):8-14.
81. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF et al. **Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC(#22931) and RTOG (#9501).** *Head Neck* 2005;27(10):843-50.
82. Bernier J, Dommene C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. **Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer.** *N Engl J Med* 2004;350(19):1945-52.
83. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. **Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck.** *N Engl J Med* 2004;350(19):1937-44.
84. Vanneman M, Dranoff G. **Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment.** *Nature Rev Cancer* 2012;12(4):237-51.

85. Specenier P, Vermoken JB. **Biologic therapy in head and neck cancer: a road with hurdles.** *ISNR Oncol* 2012;2012:163752.
86. Braakhuis BJ et al. **A genetic progression model of oral cancer :current evidence and clinical implications.** *J Oral Path Med* 2004;33:317-22.
87. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, Matsuya T. **Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991;418(4):349-53.
88. Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. **Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas.** *J Pathol* 1986; 149: 9-14.
89. Partridge M. **Head and neck cancer and precancer: can we use molecular genetics to make better predictions?** *Ann R Coll Surg Engl* 1999;81:1-11.
90. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. **Radiotherapy plus cetuximab for Squamous cell carcinoma of the head and neck.** *N Engl J Med* 2006;354:567-78.
91. Curran D, Giralt J, Harari PM, et al. **Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab.** *J Clin Oncol* 2007;25:2191-7.
92. Martini M, Vecchione L, Siena S, Tjpar S, Bardelli A. **Targeted therapies: how personal should we go?.** *Nature Reviews Clinical Oncology* 2012;9:87-97.
93. Ciardiello F, Tortora G. **EGFR antagonists in cancer treatment.** *N Engl J Med* 2008;358(11):1160-74.
94. Pirn D, Collins M, Banks L. **Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor.** *Oncogene* 1992;7:27-32.
95. Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, et al. **Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene.** *Cancer Res* 2005;65:6534-42.
96. Burtneß B, Goldwasser MA, Flood W, et al. **Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Co operative Oncology Group study.** *J Clin Oncol* 2005;23:8646-54.
97. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. **Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer.** *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-27.

98. Fung C, Grandis JR. **Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Expert Opin Emerg Drugs Review* 2010;15(3):355-73.
99. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, et al. **Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Clin Oncol* 2003;21(10):1980-7.
100. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, et al. **Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck.** *J Clin Oncol* 2004;22(1):77-85.
101. Nor JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, Polverini PJ. **Upregulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth.** *Cancer Res* 2001;61:2183-8.
102. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. **VEGF receptor signaling – in control of vascular function.** *Nature Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-71.
103. Mineta H, Miura K, Ogino T, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, et al. **Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas.** *Br J Cancer* 2000;83:775–81.
104. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. **Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis.** *Clin Cancer Res* 2005a;11:1434-40.
105. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. **Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2.** *Mod Pathol* 2005b;18:485–94.
106. Riedel F, Gotte K, Goessler U, Sadick H, Hormann K. **Targeting chemotherapy-induced VEGF up-regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines.** *Anticancer Res* 2004;24:2179–2183.
107. Rini BI. **Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions.** *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1098-106.
108. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, et al. **Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD 1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor.** *Clin Cancer Res* 2001;7:1459–65.
109. Vitoria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, et al. **Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor**

- receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis.** *Cancer Res* 2001;61:5090–101.
110. Vokes EE, Cohen EE, Mauer AM, Karrison TG, Wong SJ, Skoog-Shuman LJ, et al. **A phase I study of erlotinib and bevacizumab for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (abstract).** *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;22:A5504.
 111. Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, et al. **Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor.** *Cancer Res* 2005;65:6901–9.
 112. Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, et al. **Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody.** *J Natl Cancer Inst* 2005;97:14–21.
 113. Jimenez X, Lu D, Brennan L, Persaud K, Liu M, Miao H, et al. **A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3.** *Mol Cancer Ther* 2005;4:427–434.
 114. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. **Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention.** *J Clin Oncol* 2005;23:254–66.
 115. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, et al. **Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2.** *J Clin Invest* 1997;99:2254–9.
 116. Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, et al. **Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Cancer Res* 1999;59:991–994.
 117. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. **Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer.** *Head Neck* 2002;24:792–9.
 118. Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. **Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development.** *J Clin Oncol* 2005;23:346–6.
 119. Dorsam RT, Gutkind JS. **G-protein-coupled receptors and cancer.** *Nature Rev Cancer* 2007;7:79–94.
 120. Steinbach G, Lynch PM, Philips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. **The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.** *N Engl J Med* 2000;342:1946–1952.
 121. White WB, Faich G, Whelton A, Maurath C, Ridge NJ, Verburg KM, et al. **Comparison of thromboembolic events in patients treated with celecoxib, a**

- cyclooxygenase-2 specific inhibitor, versus ibuprofen or diclofenac.** *Am J Cardiol* 2002;89:425–30.
122. Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, Kitayama W, Endoh T, Sasaki Y, et al. **Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide.** *Cancer Res* 2001;61:1451–6.
 123. Zhang X, Chen ZG, Choe MS, Lin Y, Sun S, Wieand HS, et al. **Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model.** *Clin Cancer Res* 2005;11:6261–9.
 124. Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, Zhao X, Lee JC, Joshi VA, et al. **Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck.** *J Clin Oncol* 2005;23:6976–81.
 125. Kohl NE, Mosser SD, deSolms SJ, Giuliani EA, Pompliano DL, Graham SL, et al. **Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyl transferase inhibitor.** *Science* 1993;260:1934–7.
 126. Prendergast GC. **Farnesyltransferase inhibitors define a role for RhoB in controlling neoplastic pathophysiology.** *Histol Histopathol* 2001;16:269–75.
 127. Brunner TB, Gupta AK, Shi Y, Hahn SM, Muschel RJ, McKenna WG, et al. **Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers.** *Int J Radiat Biol* 2003;79:569–76.
 128. Hahn SM, Bernhard EJ, Regine W, Mohiuddin M, Haller DG, Stevenson JP, et al. **A phase I trial of the farnesyltransferase inhibitor L-778, 123 and radiotherapy for locally advanced lung and head and neck cancer.** *Clin Cancer Res* 2002;8:1065–1072.
 129. Khuri FR, Glisson BS, Kim ES, Statkevich P, Thall PF et al. **Phase I study of farnesyltransferase inhibitor Ionafernib with paclitaxel in solid tumors.** *Clin Cancer Res* 2004;10(9):2968–76.
 130. Von der Weid NX, Ansari M. **Hémato-oncologie pédiatrique : de la biologie cellulaire aux traitements ciblés et individualisés.** *Rev Med Suisse* 2012;8:403–8.
 131. Riva C, Lavieille JP, Reyt E, Brambilla E, Lunardi J, Brambilla C. **Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: implications in drug and radioresistance.** *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31(B):384–391.
 132. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. **Discovery of a novel Raf kinase inhibitor.** *Endocr Relat Cancer* 2001;8:219–25.

133. Lee JT, McCubrey JA. **BAY-43-9006 Bayer/Onyx.***Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:757–63.
134. Schmelzle T, Hall MN. **TOR, a central controller of cell growth.** *Cell* 2000;103:253–262.
135. Mandal M, Younes M, Swan EA, Jasser SA, Doan D, Yigitbasi O, et al. **The Akt inhibitor KP372-1 inhibits proliferation and induces apoptosis and anoikis in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Oral Oncol* 2006;42:430–9.
136. Nathan CO, Amirghahari N, Rong X, Giordano T, Sibley D, Nordberg M, et al. **Mammalian target of rapamycin inhibitors as possible adjuvant therapy for microscopic residual disease in head and neck squamous cell cancer.** *Cancer Res* 2007;67:2160–8.
137. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, et al. **Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors.** *Mol Cancer Ther* 2006;5:2676–84.
138. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011 Dec 23;60(50):1705-8.
139. Mudry P, Vavrina M, Mazanek P, Machalova M, Litzman J, Sterba J. **Recurrent laryngeal papillomatosis: successful treatment with human papillomavirus vaccination.** *Arch Dis Child* 2011 May;96(5):476-7.
140. Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, Katki HA, Porras C et al. **Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica.***PLoS One* 2013;8(7):e68329.
141. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff BR. **The molecular biology of head and neck cancer.** *Nat Rev Cancer* 2011;11:9-22.
142. Schoelch ML, Regezi JA, Cekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, Le QT, Silverman S, Fu KK. **Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol* 1999;35:333-42.
143. Scully C, Field JK, Tanzawa H. **Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control.** *Oral Oncol* 2000;36:256-63.
144. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. **Overview of insulin-like growth factor 1 receptor activation and downstream signaling.** *Nat Rev Cancer* 2004;4:505-518.

145. Rodon J, DeSantos V, Ferry RJ, Jr., Kurzrock R. **Early drug development of inhibitors of the insulin-like growth factor-I receptor pathway: lessons from the first clinical trials.** *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):2575-88.
146. Schmitz S, Kaminsky-Forrett MC, Henry S, Zanetta S, Geoffrois L, Bompas E, et al. **Phase II study of figitumumab in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical activity and molecular response (GORTEC 2008-02).** *Ann Oncol* 2012;23(8):2153-61.
147. National Institutes of Health. **Clinical trials registry. Identifier: NCT00617734. Completed July 2012. Available at:** <http://www.clinicaltrials.gov>.
148. Bromberg J, Darnell JE Jr. **The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.** *Oncogene* 2000;19:2468-73.
149. Darnell JE Jr. **STATs and gene regulation.** *Science* 1997;277:1630-5.
150. Bromberg J. **Stat proteins and oncogenesis.** *J Clin Invest* 2002;109:1139-42.
151. Yang J, Stark GR. **Roles of unphosphorylated STATs in signaling.** *Cell Res* 2008;18:443-51.
152. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. **STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias.** *Oncogene* 2000;19:2496-504.
153. Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W. **Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2002;8:3065-74.
154. Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, Chai RL, Ferrel RE, Zamboni B, Hunt J, Grandis JR. **Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2006;98:181-9.
155. Simpson JA, Al-Attar A, Watson NF, Scholefeld JH, Ilyas M, Durrant LG. **Intratumoral Tcell infiltration, MHCclass I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer.** *Gut* 2010;59:926.
156. Butterbach K, Beckmann L, de Sanjosé S, Benavente Y, Becker N, Foretova L, Maynadie M, Cocco P, Staines A, Boffetta P, Brennan P, Nieters A. **Association of JAK-STAT pathway related genes with lymphoma risk: results of a European case-control study (EpiLymph).** *Br J Haematol* 2011;153:318-33.
157. Schmitt MJ, Philippidou D, Reinsbach SE, Marque C, Wienecke-Baldacchino A, Nashan D, Behrmann I, Kreis S. **Interferon-γ-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells.** *Cell Commun Signal* 2012;10:41.

158. Yim JH, Kim ES, Choi HJ, Jeon MJ, Han JM, Kim WG, Kim TY, Gong G, Kim SY, Kim WB, Shong YK. **Association between STAT1 activity and BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas.** *J Surg Oncol* 2012;106:719-723.
159. Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J. **Therapeutic modulators of STAT signaling for human diseases.** *Nature Rev Drug Discov* 2013;12:611-629.
160. Bowman T, Garcia R, Turkson J. **STATs in oncogenesis.** *Oncogene* 2000;19:2474-88.
161. Darnell JE Jr, Kerr IM. **Jak - STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs extracellular signaling proteins.** *Science* 1994;264:1415-21.
162. Levy DE, Darnell JE Jr. **Stats: Transcriptional control and biological impact.** *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-52.
163. Wen Z, Zhong Z and Darnell Jr JE. **Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.** *Cell* 1995;82(2):241-50.
164. Nikitakis NG, Siavash H, Sauk JJ. **Targeting the STAT pathway in head and neck cancer: Recent advances and future prospects.** *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:637-51.
165. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kariako S et al. **Persistent activation of STAT3 signaling induces surviving gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2006;12(1):11-9.
166. de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. **STAT5-Dependent Cyclin D1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-Transformed Cells.** *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3(5):299-305.
167. Townsend P et al. **STAT1 interacts with p53 to enhance DNA damage induced apoptosis.** *J Biol Chem* 2004;279:5811-20.
168. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. **Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases.** *Science* 1997;278:1630-2.
169. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. **Interferons, immunity, and cancer immunoediting.** *Nature Rev Immunol.* 2006;6:836-48.
170. Laimer K, Spizzo G, Obrist P, Gastl G, Brunhuber T, Schäfer G, Norer B, Rasse M, Haffner MC, Doppler W. **STAT1 activation in squamous cell cancer of the oral cavity: a potential predictive marker of response to adjuvant chemotherapy.** *Cancer* 2007;110:326-33.
171. Lentsch EJ. **Management of cervical metastasis.** *Curr Oncol Rep* 2012;6:141-51.

172. Lucev A, Rogic M, Licul V, et al. **Comparison of three postoperative follow-up methods in patients with oral cancer.** *Coll Antropol* 2012;36:761.
173. Chan JK. **Advances in Immunochemistry: Impact in surgical pathology practice.** *Sem Diagn Pathol* 2000;17:170-7.
174. Mukai K, Rosai J. **Applications of immunoperoxidase techniques in surgical pathology.** In Wolff M, Fenoglio CM (eds): *Progress in Surgical Pathology, vol 1* NewYork, Masson Publishing USA, Inc., pp 15-99, 1980.
175. Perisanidis C, Perisanidis B, Wrba F, Brandstetter A, El Gazzar S, Papadogeorgakis N, et al. **Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *J Oral Pathol Med* 2012;41(1):40-6.
176. Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto D Jr. **Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system.** *J Oral Pathol Med* 2002;31:379-84.
177. Leibowitz MS, Andrade Filho PA, Ferrone S, et al. **Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediated TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes.** *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:525-35.
178. Leibowitz MS, Srivastava RM, Andrade Filho PA, et al. **SHP2 is overexpressed and inhibits pSTAT1-mediated APM component expression, T-cell attracting chemokine secretion, and CTL recognition in head and neck cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2013;19:798-808.
179. Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, et al. **STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage.** *J Cell Sci* 2005;118:1629-39.
180. Battle TF, Wierda WG, Rassenti LZ, et al. **In vivo activation of signal transducer and activator of transcription 1 after CD154 gene therapy for chronic lymphocytic leukemia is associated with clinical and immunologic response.** *Clin Cancer Res* 2003;9:2166-72.
181. Woolgar JA. **Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol* 2006;42:229-39.
182. Ling W, Mijiti A, Moming A. **Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: A retrospective analysis of 210 cases.** *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71:775-85.
183. Tai SK, Yang MH, Chang SY, et al. **Treatment for T1-2 oral squamous cell carcinoma with or without perineural invasion: Neck dissection and postoperative adjuvant therapy.** *Ann Surg Oncol* 2012;19:1995-2002.
184. Lake RA, Robinson BW. **Immunotherapy and chemotherapy – A practical relationship.** *Nat Rev Cancer* 2005;5:397-405.

185. Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM, et al. **STAT1: A modulator of chemotherapy-induced apoptosis.** *Cancer Res* 2004;64:8357-64.
186. Kondo M, Nagano H, Wada H, et al. **Combination of IFN-alpha and 5-fluorouracil induces apoptosis through IFN-alpha/beta receptor in human hepatocellular carcinoma cells.** *Clin Cancer Res* 2005;11:1277-86.
187. Sampath D, Rao VA, Plunkett W. **Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs.** *Oncogene* 2003;22:9063-74.
188. Kastan MB, Bartek J. **Cell-cycle checkpoints and cancer.** *Nature* 2004;432:316-23.

