



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΑΘΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

Μελέτη της Σηματοδοτικής Οδού mTOR στα Κακοήθη Νεοπλάσματα των Σιαλογόνων Αδένων

Σμαράγδα Διαμαντή

Σμήναρχος (ΥΟ)

Διευθύντρια Στοματολογικού Τμήματος

251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας

ΑΘΗΝΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων) Νικόλαος Νικητάκης
2. Επίκουρος Καθηγητής Κωνσταντίνος Τόσιος
3. Καθηγήτρια Αλεξάνδρα Σκλαβούνου

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Κιτράκη Ευθυμία, Καθηγήτρια
2. Σκλαβούνου Αλεξάνδρα, Καθηγήτρια
3. Τσιχλάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής
4. Λάζαρης Ανδρέας Αναπληρωτής, Καθηγητής
5. Νικητάκης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής
6. Τόσιος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής
7. Χρυσομάλη Ευανθία, Επίκουρη 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.

Η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής ήταν δύσκολη και επίπονη διαδικασία η οποία έφτασε στην ολοκλήρωσή της με τη βοήθεια και στήριξη εκλεκτών συναδέλφων.

Η Αμερικανίδα συγγραφέας Gertrude Stein είχε πεί ότι:

« Η σιωπηρή ευγνωμοσύνη δεν έχει και μεγάλη αξία για κανέναν»

Μέσα λοιπόν από αυτή τη σελίδα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στους ανθρώπους που με βοήθησαν στα στάδια αυτής της διαδικασίας.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Αναπληρωτή Καθηγητή Στοματολογίας κ. Νικόλαο Νικητάκη για την επιλογή του θέματος καθώς και για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που έδειξε προς μένα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δντρια του Εργαστηρίου Στοματολογίας, Καθηγήτρια κα Αλεξάνδρα Σκλαβούνου, για την υποστήριξη αλλά και τη συμβολή της με αποτελεσματικό τρόπο σε καθοριστικές στιγμές.

Θερμά επίσης ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Στοματολογίας κ. Κων/νο Τόσιο για την διακριτική υποστήριξη του όλα αυτά τα χρόνια.

Περαιτέρω θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα του Τμήματος Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής κ. Γεώργιο Ρασσιδάκη, για την πολύτιμη βοήθεια του στα πρώτα βήματα της ερευνητικής μου εργασίας.

Σημαντικό ρόλο κατέχει και η συνεργασία μου με το Τμήμα Έρευνας του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας, τον Δντη του Τομέα Εκπαίδευσης και Έρευνας, αλλά και τον Δκτή του νοσοκομείου. Οι άνθρωποι αυτοί πίστεψαν σε μένα και υποστήριξαν το αίτημα μου στο επιστημονικό συμβούλιο για την έγκριση της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την ανοχή τους, καθώς και για τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση που μου παρείχαν στην διάρκεια της πολυετούς αυτής διαδρομής.

Σμαράγδα Διαμαντή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΙΑΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ	10
2. ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΙΑΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ	13
Α. Γενικά Στοιχεία - Συχνότητα - Εντόπιση	13
Β. Ιστολογική Ταξινόμηση Κακοήθων Όγκων Αδενικού Επιθηλίου	16
Γ. Κλινική Εικόνα Κακοήθων Όγκων των Σιαλογόνων Αδένων	17
Δ. Συνηθέστερα Κακοήθη Νεοπλασμάτα Σιαλογόνων Αδένων	17
1. Αδενοειδές Κυστικό Καρκίνωμα (Adenoid Cystic Carcinoma - ACC)	17
α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά	18
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	19
γ. Πρόγνωση	21
2. Βλεννοεπιδερμοειδές Καρκίνωμα (Mucoperidermoid carcinoma - MEC)	23
α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά	24
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	26
γ. Πρόγνωση	31
3. Κυψελοκυτταρικό Καρκίνωμα (Acinic cell carcinoma - ACC)	33
α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά	33
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	34
γ. Πρόγνωση	36
4. Πολύμορφο Αδενοκαρκίνωμα Χαμηλής Κακοήθειας (Polymorphous Low Grade Adenocarcinoma - PLGA)	36
α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά	37
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	37
γ. Πρόγνωση	39
5. Αδενοκαρκίνωμα Μη Ταξινομημένο (Adenocarcinoma Not Other Specified - ANOS)	39
α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά	40
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά	40
γ. Πρόγνωση	41
3. mTOR	42
Α. Γενικά Στοιχεία	42
Β. Δομή και λειτουργία mTOR	43
Γ. Σηματοδοτική οδός της mTORC1	48
Ανωθεν της mTOR ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού	50
1. Αυξητικοί παράγοντες	50
2. Θρεπτικά συστατικά – αμινοξέα	51
3. Κυτταρική ενέργεια - ATP	52
Κάτωθεν της mTOR ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού	53
1. Μετάφραση-Πρωτεϊνοσύνθεση	53
2. Αυτοφαγία	58
3. Μεταβολισμός	58
Δ. Σηματοδοτική οδός της mTORC2	59
Λειτουργικές επιδράσεις της mTORC2	60
- Κυτταρική επιβίωση, μεταβολισμός, πολλαπλασιασμός.	60
- Οργάνωση κυτταροσκελετού	61
Ε. m TOR και καρκίνος	61
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
ΣΚΟΠΟΣ	68

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	69
Υλικό	69
Μέθοδος	70
Αξιολόγηση	72
Στατιστική Ανάλυση	73
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
1. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων	74
2. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία καλοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων	75
3. Ιστολογικά χαρακτηριστικά κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων	76
4. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ανά ιστολογικό τύπο κακοήθους νεοπλασματος σιαλογόνων αδένων	77
5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες	78
Κακοήθη Νεοπλάσματα	78
Καλοήθη Νεοπλάσματα	81
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	81
Στατιστική Αξιολόγηση	84
6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της p4EBP1 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες	89
Κακοήθη Νεοπλάσματα	89
Καλοήθη Νεοπλάσματα	92
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	92
Στατιστική Αξιολόγηση	95
7. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες	99
Κακοήθη Νεοπλάσματα	99
Καλοήθη Νεοπλάσματα	101
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	102
Στατιστική Αξιολόγηση	105
8. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της pS6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες	109
Κακοήθη Νεοπλάσματα	109
Καλοήθη Νεοπλάσματα	112
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	112
9. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες	119
Κακοήθη Νεοπλάσματα	119
Καλοήθη Νεοπλάσματα	122
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	122
Στατιστική Αξιολόγηση	125
10. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της eIF4E στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες.	129
Κακοήθη Νεοπλάσματα	129
Καλοήθη Νεοπλάσματα	132
Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες	132
Στατιστική Αξιολόγηση	135
11. Ανάλυση των συσχετίσεων των πρωτεϊνών μεταξύ τους	141
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	157
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	159
ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	166
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	172

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων είναι σπάνιες βλάβες, αποτελούν το 3-6,5% των νεοπλασμάτων της κεφαλής και του τραχήλου¹.

Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων εμφανίζεται στην παρωτίδα (80%), ένα μικρό ποσοστό εμφανίζεται στον υπογνάθιο σιαλογόνο αδένα (10-15%), και πολύ σπανιότερα στον υπογλώσσιο και στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες (5-10%).¹⁻³

Οι Otoh et al. (2005)⁴ παρουσιάζουν μικρότερα ποσοστά εντόπισης των όγκων στην παρωτίδα (45,6%). Άλλοι συγγραφείς αναφέρουν ως 2η συχνότερη περιοχή εντόπισης των νεοπλασμάτων, τους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες.⁵

Τα νεοπλάσματα της παρωτίδας είναι συνήθως καλοήθη. Αντίθετα, στον υπογλώσσιο και στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων είναι κακοήθη. Στον υπογνάθιο σιαλογόνο αδένα παρατηρείται ίδια συχνότητα εμφάνισης καλοήθων και κακοήθων όγκων.⁴

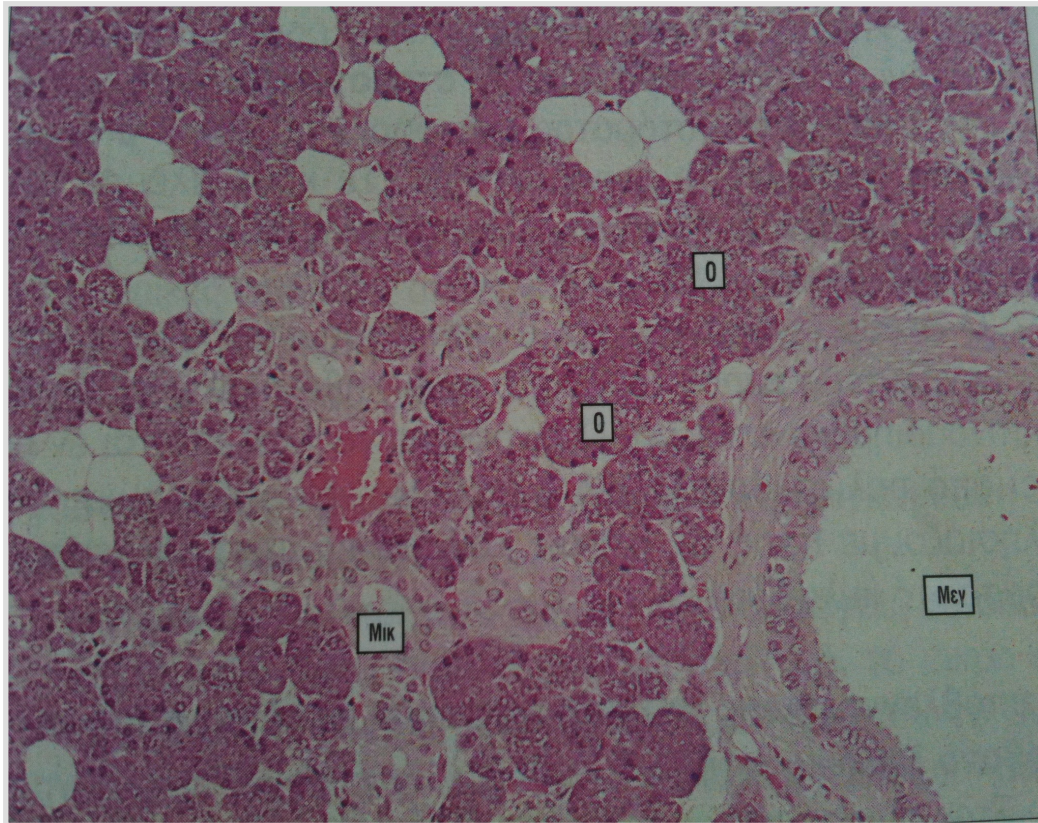
Η συχνότερη θέση εντόπισης νεοπλασμάτων στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες είναι η υπερώα (44-54%), ακολουθεί ο βλεννογόνος των χειλέων (21-22%), ο παρειακός βλεννογόνος (11-15%), το οπισθογόμφιο τρίγωνο (1-5%), το έδαφος του στόματος (3-5%) και τέλος η γλώσσα (1-4%).³

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΙΑΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ

Οι σιαλογόνοι αδένες ανάλογα με το μέγεθός τους, διακρίνονται στους μείζονες (παρωτίδες, υπογνάθιοι, υπογλώσσιοι) και στους ελάσσονες.

Η παρωτίδα είναι ορώδης αδένας, ο υπογνάθιος είναι μικτός (κυρίως ορώδης) και ο υπογλώσσιος είναι μικτός (κυρίως βλεννώδης). (Εικ. 1)

Οι ελάσσονες σιαλογόνοι αδένες είναι περίπου 400-700, βρίσκονται διασκορπισμένοι σε πολλές θέσεις στο βλεννογόνο του στόματος και ο αριθμός αυτός διαφέρει από άτομο σε άτομο.



Εικ 1. Παρωτίδα, η οποία αποτελείται από ορώδη κύτταρα (O= ορώδη κύτταρα)
Stenens A., Lowe J. In Human Histology 1998: 188-190⁸

Από τοπογραφικής λοιπόν άποψης οι ελάσσονες σιαλογόνοι αδένες ταξινομούνται στις παρακάτω ομάδες:

- α) χειλικοί: βρίσκονται στον υποβλεννογόνιο ιστό των χειλέων και είναι μικτοί αδένες
- β) παρειικοί: αποτελούν συνέχεια των χειλικών προς τις παρειές και είναι μικτοί αδένες
- γ) οπισθογόμφιοι: βρίσκονται στο οπισθογόμφιο τρίγωνο και είναι βλεννώδεις αδένες
- δ) υπερώιοι: βρίσκονται στην σκληρή, τη μαλακή υπερώα και τη σταφυλή και είναι αμιγείς βλεννώδεις αδένες

ε) γλωσσικοί: διαιρούνται στους πρόσθιους και τους οπίσθιους. Οι πρόσθιοι (αδένες των Blandin-Nuhn) βρίσκονται μέσα στη μυϊκή μάζα της κάτω μοίρας της γλώσσας κοντά στη μέση γραμμή και στην κορυφή της γλώσσας και είναι μικτοί αδένες. Οι οπίσθιοι διαιρούνται σε δύο ομάδες στους αδένες του von Ebner που εκβάλλουν στις περιχαρακωμένες και φυλλοειδείς θηλές και είναι ορώδεις και στους αδένες της ρίζας της γλώσσας που είναι βλεννώδεις

στ) γλωσσοϋπερώιοι: βρίσκονται στο βλεννογόνο των γλωσσοϋπερώιων πτυχών και είναι βλεννώδεις

ζ) ελάσσονες υπογλώσσιοι: βρίσκονται στην άνω επιφάνεια του μείζονος υπογλωσσίου αδένος έχουν 5-15 ελάσσονες εκφορητικούς πόρους που εκβάλλουν στην υπογλώσσια πτυχή του εδάφους του στόματος. Είναι μικτοί αδένες.^{6,7}

Οι σιαλογόνοι αδένες ιστολογικά αποτελούνται από τις αδενοκυψέλες, τους εκφορητικούς πόρους και το στηρικτικό υπόστρωμα.⁷

Η λειτουργία τους ρυθμίζεται από το συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό αυτόνομο νευρικό σύστημα. Το μεν συμπαθητικό τροφοδοτεί τους σιαλογόνους αδένες με τροφικές και αγγειοσυσταλτικές ίνες, ενώ το παρασυμπαθητικό με εκκριτικές και αγγειοδιασταλτικές ίνες. Οι συμπαθητικές νευρικές ίνες καταλήγουν στους σιαλογόνους αδένες μέσα από το καρωτιδικό πλέγμα, ενώ οι παρασυμπαθητικές με το γλωσσοφαρυγγικό, το προσωπικό και το τρίδυμο νεύρο. Έτσι ο ερεθισμός του συμπαθητικού προκαλεί βλεννώδη, παχύρρευστη έκκριση, ενώ ο ερεθισμός του παρασυμπαθητικού προκαλεί άφθονο παχύρρευστο σάλιο.⁷

2. ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΙΑΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ

A. Γενικά Στοιχεία - Συχνότητα - Εντόπιση

Τα κακοήθη νεοπλάσματα (καρκινώματα) των σιαλογόνων είναι σπάνια. Η εκτιμώμενη επίπτωση τους είναι 1:100,000. Αντιπροσωπεύουν το 3-5% των κακοηθειών κεφαλής- τραχήλου και λιγότερο από 1% όλων των κακοηθειών.^{1-3, 9,10} Περίπου 5.000 νέες περιπτώσεις ετησίως καταγράφονται στις ΗΠΑ.¹⁰

Η αιτιοπαθογένεια και οι μοριακοί μηχανισμοί της ογκογένεσης των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων παραμένουν υπό διερεύνηση.^{11,12}

Τα κακοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων αντιπροσωπεύουν το 21,7% όλων των όγκων των σιαλογόνων αδένων και τα περισσότερα από αυτά εντοπίζονται στους μείζονες σιαλογόνους αδένες δηλ. στις παρωτίδες, στους υπογνάθιους και στους υπογλώσσιους σιαλογόνους αδένες.^{5,13} Στις παρωτίδες ανευρίσκονται κακοήθεις όγκοι σε ποσοστό 25% σε αντίθεση με τους υπογλώσσιους σιαλογόνους αδένες όπου, η ανάπτυξη κακοήθους όγκου ανέρχεται σε ποσοστό 75%.^{13,14}

Τα συχνότερα αναπτυσσόμενα καρκινώματα των σιαλογόνων αδένων είναι: το βλεννοεπιδερμοειδές, το αδενοειδές κυστικό και το αδenoκαρκίνωμα μη ταξινομημένο (NOS).¹³

Σε κάποιες μελέτες το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα περιγράφεται ως το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων,^{4, 14,15} ενώ σε άλλες ως συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων αναφέρεται το βλεννοεπιδερμοειδές.^{6,16-19}

Το 52,5% των κακοήθων όγκων εντοπίζεται στην παρωτίδα, το 12,2% στον υπογνάθιο σιαλογόνο αδένα, το 1,6% στον υπογλώσσιο σιαλογόνο αδένα και 33,4% σε θέσεις των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων.²⁰

Οι Ito et al. (2005) ¹⁸ αναφέρουν ότι το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων είναι το βλεννοεπιδερμοειδές που αντιπροσωπεύει το 13,5% όλων των όγκων (καλοήθων και κακοήθων) και το 41,6% των κακοήθων νεοπλασμάτων.

Το αδενοειδές κυστικό είναι το δεύτερο συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων αντιπροσωπεύοντας το 7,9% όλων των όγκων (καλοήθων και κακοήθων) και το 24,2% των κακοήθων νεοπλασμάτων.¹⁸

Οι Tian et al. (2010)²¹ αναφέρουν ότι από όλα τα κακοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων το αδενοειδές κυστικό και το βλεννοεπιδερμοειδές εμφανίζουν την ίδια συχνότητα (30%) και ακολουθούν το κυψελοκυτταρικό και το καρκίνωμα εκ πλειομόρφου αδενώματος με συχνότητα 8%, ενώ το αδenoκαρκίνωμα NOS εμφανίζεται με συχνότητα 6%. ²¹

Οι Bjørndal et al. (2011)²⁰ αναφέρουν ότι το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων είναι το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα (27,9%) και ακολουθεί το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα (16,9%). ²⁰

Η βιβλιογραφική ανασκόπηση αποκάλυψε ότι η συχνότητα των διαφόρων κακοήθων υποτύπων στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες είναι η ακόλουθη:

- Eveson & Cawson (1985) ²² :
Αδενοειδές κυστικό: 13,1%, Βλεννοεπιδερμοειδές: 8,9%, Κακόηθες εκ πλειομόρφου αδενώματος: 7,1%, Άλλο: 15,2% ²²
- Waldron et al. (1988) ²³:
Βλεννοεπιδερμοειδές: 15,3%, Πολύμορφο χαμηλής κακοήθειας: 11,0%, Αδενοειδές κυστικό: 9,4%, Άλλο: 1,9% ²³

- Ellis et al. (1990) ²⁴:
Βλεννοεπιδερμοειδές: 21,5%, Αδενοειδές κυστικό: 7,7%,
Κυψелоκυτταρικό: 3,5%, Άλλο: 12,1% ²⁴
- Lukšić et al. (2011) ²⁵ :
Αδενοειδές κυστικό: 49,6%, Βλεννοεπιδερμοειδές: 14,4%,
Αδενοκαρκίνωμα εκ πλειομόρφου αδενώματος: 9,6%.²⁵

Η βιβλιογραφική ανασκόπηση αποκάλυψε ότι η συχνότητα των διαφόρων κακοήθων υποτύπων στους μείζονες σιαλογόνους αδένες είναι η ακόλουθη:

- Eveson & Cawson (1985) ²² :
 - για την παρωτίδα:
Αδενοειδές κυστικό: 2%, Βλεννοεπιδερμοειδές: 1,5%,
Κυψелоκυτταρικό καρκίνωμα: 2,5%, Άλλο: 4,4%
 - για τους υπογνάθιους σιαλογόνους αδένες:
Αδενοειδές κυστικό: 16,8%, Βλεννοεπιδερμοειδές: 1,6%,
Κυψелоκυτταρικό καρκίνωμα: 0,5%, Άλλο: 8,9% ²²
- Ellis et al. (1990) ²⁴:
 - για την παρωτίδα:
Βλεννοεπιδερμοειδές: 9,6%, Αδενοειδές κυστικό: 2%,
Κυψелоκυτταρικό: 8,6%, Άλλο: 7,5% ¹⁶
 - για τους υπογνάθιους σιαλογόνους αδένες:
Βλεννοεπιδερμοειδές: 9,1%, Αδενοειδές κυστικό: 11,7%,
Κυψелоκυτταρικό: 2,7%, Άλλο: 10,8% ²⁴
- Lukšić et al. (2011) ²⁵ :
 - για την παρωτίδα:
Βλεννοεπιδερμοειδές: 32,5%, Αδενοειδές κυστικό: 15,9%,
Κυψелоκυτταρικό: 10,3%, Άλλο: 13,5%
 - για τους υπογνάθιους σιαλογόνους αδένες:
Αδενοειδές κυστικό: 42,8%, Βλεννοεπιδερμοειδές: 23,8%,
Αδενοκαρκίνωμα NOS: 9,5%, Άλλο: 14,3% ²⁵

Β. Ιστολογική Ταξινόμηση Κακοήθων Όγκων Αδενικού Επιθηλίου

Η πιο πρόσφατη ιστολογική ταξινόμηση των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα. (Πιν.1)

26,27

Πίνακας 1	
WHO ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΟΥ ΑΔΕΝΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ²⁴	
Κυψελοκυτταρικό καρκίνωμα	
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα	
Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα	
Πολύμορφο χαμηλής κακοήθειας αδеноκαρκίνωμα	
Επιθηλιο-Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα	
Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα	
Βασικοκυτταρικό αδеноκαρκίνωμα	
Σμηγματορροϊκό καρκίνωμα	
Σμηγματορροϊκό λεμφαδеноκαρκίνωμα	
Κυστικό αδеноκαρκίνωμα	
Ηθμοειδές κυστικό αδеноκαρκίνωμα χαμηλής κακοήθειας	
Βλεννώδες αδеноκαρκίνωμα	
Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα	
Πορογενές καρκίνωμα	
Αδеноκαρκίνωμα μη ταξινομημένο (NOS)	
Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα	
Καρκίνωμα εκ πλειομόρφου αδενώματος	
Καρκινοςάρκωμα	
Πλειόμορφο αδένωμα με μεταστατική ικανότητα	
Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα	
Μικροκυτταρικό καρκίνωμα	
Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα	
Λεμφοεπιθηλιακό καρκίνωμα	
Σιαλοβλάστωμα	
<i>Seifert G, Sobin LH. The World Health Organization's histological classification of salivary gland tumors: a commentary on the second edition. Cancer (1992) ²⁶</i>	

Γ. Κλινική Εικόνα Κακοήθων Όγκων των Σιαλογόνων Αδένων

Τα κακοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων εμφανίζονται σε ευρύ φάσμα ηλικιών με συχνότερη ανάπτυξη κατά την 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής και μέσο όρο ηλικίας τα 47 χρόνια. Συχνότερα προσβάλλονται οι γυναίκες και η αναλογία ανδρών/γυναικών είναι 1:1,5 ή 1:1,2. Όλες οι εθνικότητες διατρέχουν τον ίδιο κίνδυνο.^{5,18, 28}

Ανάπτυξη καρκινώματος μπορεί να γίνει και σε έδαφος προϋπάρχοντος για μεγάλο διάστημα καλοήθους μικτού όγκου παρωτίδας.

Το πρωταρχικό σύμπτωμα είναι συνήθως ασυμπτωματική διόγκωση του υπεύθυνου σιαλογόνου αδένου αλλά μπορεί να είναι και επώδυνη. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην διάχυτη διόγκωση των παρωτίδων από συστηματικό νόσημα η οποία κάποιες φορές λαμβάνεται εσφαλμένα ως διόγκωση λόγω όγκου. Πρωτοπαθή λεμφώματα στη περιοχή των παρωτίδων είναι εξαιρετικά σπάνια.²⁸⁻³¹

Η κλινική διαφορική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνει καλοήθεις όγκους των σιαλογόνων αδένων (πλειόμορφο αδένωμα, μυοεπιθηλίωμα), σιελολίθους, φλεγμονώδη/αυτοάνοσα νοσήματα.²⁹⁻³¹

Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν τα κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των συνηθέστερων κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων.

Δ. Συνηθέστερα Κακοήθη Νεοπλάσματα Σιαλογόνων Αδένων

1. Αδενοειδές Κυστικό Καρκίνωμα (Adenoid Cystic Carcinoma - ACC)

Το 1859, ο Billroth χρησιμοποίησε τον όρο κυλίνδρωμα για να περιγράψει τα χαρακτηριστικά τεσσάρων όγκων των σιελογόνων

αδένων. Αυτός ο όρος ήταν σε χρήση ως το 1953 όταν οι Froote και Frazell έδωσαν στη βλάβη το όνομα “αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα”.³²

α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα (ACC) είναι μια σπάνια κακοήθεια που παρουσιάζεται στους μείζονες και ελάσσονες σιαλογόνους αδένες. Παρατηρείται σπανιότερα και σε άλλες περιοχές όπως στο τραχειοβρογχικό δέντρο, στο μαστό, στο γεννητικό σύστημα των γυναικών και στον προστάτη.

Αποτελεί το 10% όλων των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων³³⁻³⁸ το 22% όλων των καρκινωμάτων των σιαλογόνων αδένων,⁴⁰ και περίπου το 1% όλων των κακοηθειών της κεφαλής και του τραχήλου.^{34,35}

Το 15-30% των όγκων που εμφανίζονται στους υπογνάθιους είναι ACC, το 2-15% των όγκων που εμφανίζονται στην παρωτίδα είναι ACC και το 30% των όγκων που εμφανίζονται στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες είναι ACC.⁴⁰

Η πλειονότητα αυτών παρουσιάζεται στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες της στοματικής κοιλότητας.^{33,35,38,40}

Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 47- 56 χρόνια κυρίως σε γυναίκες. (Γ:Α/ 1,2:1)^{33-38, 40}

Το ACC εμφανίζεται ως διόγκωση ελαστικής σύστασης μεγέθους μερικών εκατοστών. Αναπτύσσεται συνήθως αργά, με αποτέλεσμα η θεραπεία του να καθυστερεί μήνες ή έτη.



Εικ . 2 Όγκος (ACC) στην υπερώα με ελκωμένη επιφάνεια
Αρχείο Εργαστηρίου Στοματολογίας ΕΚΠΑ

Η υπερώα είναι η συνηθέστερη θέση εντόπισης για τους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες και ακολουθεί η γλώσσα (4,4%). Όταν ο όγκος εντοπίζεται στην υπερώα μπορεί να είναι εξελκωμένος. (Εικ. 2) Έχουν περιγραφεί και ενδοστικές εντοπίσεις.

Τις περισσότερες φορές ο όγκος είναι ασυμπτωματικός, αν και περιγράφονται περιπτώσεις όπου οι ασθενείς αναφέρουν πόνο, συνεχή, βύθιο και αυξανόμενο σε ένταση. Όταν εντοπίζεται στην παρωτίδα μπορεί να προκληθεί παράλυση του προσωπικού νεύρου.

Η κλινική διαφορική διάγνωση θα πρέπει να περιλαμβάνει καλοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων, (πλειόμορφο αδένωμα, μυοεπιθηλίωμα), νεκρωτική σιαλομεταπλασία, κακοήγη νεοπλάσματα λεμφικού ιστού (λέμφωμα), και σε περιπτώσεις ενδοστικής εντόπισης οδοντογενείς όγκους (αδαμαντινοβλάστωμα, μύξωμα).³²

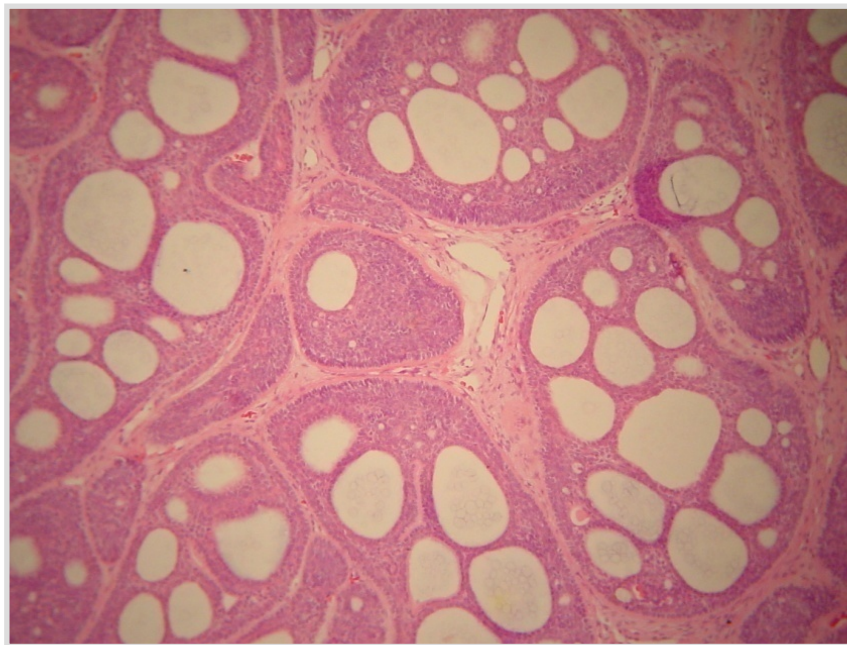
β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

Ιστολογικά παρατηρούνται τρία κυτταροδομικά πρότυπα: το ηθμοειδές, το σωληνώδες και το συμπαγές.

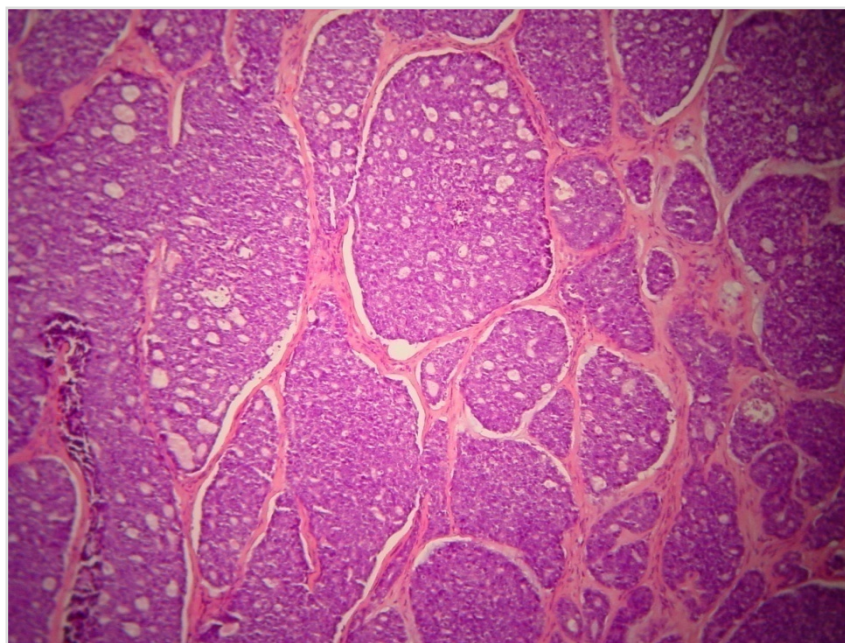
Το ηθμοειδές πρότυπο έχει χαρακτηριστική εικόνα. Αποτελείται από νησίδια βασικοειδών επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν κυλινδρικούς ή κυστικούς χώρους που μοιάζουν με ελβετικό τυρί. Οι χώροι αυτοί περιέχουν βασεόφιλο βλεννώδες υλικό ή υαλοειδές ηωσινόφιλο υλικό ή συνδυασμό των παραπάνω. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μικρά, κυβοειδή, με βασεόφιλο πυρήνα και λίγο κυτταρόπλασμα.³²

Το σωληνώδες πρότυπο αποτελείται από αδενικούς χώρους επιμηκυσμένων αυλών που επενδύονται από επιθηλιακά κύτταρα και περιβάλλονται από ένα ή περισσότερα στρώματα βασικοειδών κυττάρων.^{37, 39-41} (Εικ.3)

Το συμπαγές πρότυπο αποτελείται από συμπαγή επιθηλιακά κύτταρα με νεκρωτική περιοχή στο κέντρο. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μικρά, βασεόφιλα και υπερχρωματικά.^{37, 39-41} (Εικ 4)



Εικ.3 Σωληνώδες πρότυπο (χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη χ 200)
Αρχείο Εργαστηρίου Στοματολογίας ΕΚΠΑ



Εικ. 4 Συμπαγές πρότυπο (χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη x 100)
Αρχείο Εργαστηρίου Στοματολογίας ΕΚΠΑ

Έχει μελετηθεί η σχέση μεταξύ του ιστολογικού προτύπου και της πρόγνωσης του όγκου. Οι Huang et al. (1997) ⁴² παρατήρησαν σε ποσοστό 16,7% δεκαετή επιβίωση σε ασθενείς με συμπαγές ιστολογικό τύπο και 47,4% για τον ηθμοειδή και σωληνώδη τύπο. Οι Spiro et al. (1974) ⁴³ αντιθέτως υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει σχέση μεταξύ ιστολογικού προτύπου και πρόγνωσης.

Από τους περισσότερους μελετητές είναι αποδεκτό ότι όγκοι στους οποίους προέχουν τα συμπαγή χαρακτηριστικά (>30%) παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση.^{34,38, 44-47} Όμως το στάδιο της νόσου είναι περισσότερο σημαντικό από τον ιστολογικό υπότυπο για τον καθορισμό της έκβασης της νόσου.^{37, 48,49}

γ. Πρόγνωση

Το ACC έχει παρατεταμένη κλινική πορεία και ποικίλη κλινική συμπεριφορά.

Έχει τάση για περινευρική διήθηση και αυτό εξηγεί μερικώς την τάση για τοπική υποτροπή. Η τοπική υποτροπή είναι πιθανότερη όταν υπάρχουν θετικά χειρουργικά όρια, περινευρική διήθηση και η πρωταρχική εστία βρίσκεται στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες.^{35,36,50} Απομακρυσμένες μεταστάσεις είναι πιθανότερο να συμβούν όταν ο όγκος είναι συμπαγής ιστολογικά, έχει αρχικό μέγεθος > 3cm, η πρωταρχική εστία είναι στη ρινική κοιλότητα ή στους παραρρίνιους κόλπους και υπάρχουν θετικοί λεμφαδένες.^{34,40,48} Συχνότερα μεθίσταται στους πνεύμονες και στα οστά,^{38,45,47} αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μεταστάσεων στο ήπαρ, στον θυρεοειδή και στον σπλήνα⁵¹. Μετάσταση στους λεμφαδένες είναι σπάνια αλλά αν συμβεί είναι αρνητικός προγνωστικός δείκτης επιβίωσης.⁵²

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι απομακρυσμένη μετάσταση είναι συχνότερη όταν ο όγκος εντοπίζεται στους υπογνάθιους σιαλογόνους από ότι στην παρωτίδα.⁵³

Σε πρόσφατη μελέτη των Orlatek et al. (2010)⁵⁴ προκύπτει ότι 42% των ασθενών με απομακρυσμένη μετάσταση δεν είχαν τοπικο-περιοχική υποτροπή ή αποτυχία.

Γενικά, πρωτοπαθής εστία στη ρινική κοιλότητα ή στους παραρρίνιους κόλπους, προχωρημένο στάδιο νόσου, συμπαγής ιστολογικά υπότυπος, θετικοί λεμφαδένες, διήθηση νεύρων και θετικά χειρουργικά όρια επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση.⁴⁴⁻⁴⁸ Επίσης το ACC που αναπτύσσεται στους μείζονες σιαλογόνους αδένες έχει καλύτερη έκβαση από αυτό των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων, κυρίως λόγω της έγκαιρης διάγνωσης, που διευκολύνεται από τη θέση εντόπισής του.^{41, 46}

Γενικά 5ετής επιβίωση επιτυγχάνεται σε ποσοστό 60% και 15ετής μόνο σε ποσοστό 35%.

Μερικά σημαντικά στατιστικά στοιχεία για το ACC όπως προκύπτουν από τη μελέτη της βιβλιογραφίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 2) ⁵⁵

Πίνακας 2

Έκβαση ACC	Στατιστικά
Ποσοστό ελεύθερης νόσου- επιβίωσης	3-χρόνια: 73% 5-χρόνια: 35% - % 10-χρόνια: 52% 15-χρόνια: 30% - 45% 20-χρόνια: 11%
Ποσοστό μεταστάσεων	Συνολικά: 21% - 55%
Ποσοστό επιβίωσης με μεταστατική νόσο	3-χρόνια: 41% - 46% 5-χρόνια: 16%

Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. Oral Oncol. (2006) ⁵

2. Βλεννοεπιδερμοειδές Καρκίνωμα (Mucoepidermoid carcinoma - MEC)

Η αναγνώριση του «βλεννοεπιδερμοειδούς όγκου» ως ξεχωριστού νεοπλασματος των σιαλογόνων αδένων οφείλεται σε μελέτες του Stewart et al. (1945) ⁵⁶ που υιοθέτησαν τον παραπάνω όρο. Από τότε το νεόπλασμα αυτό αποτέλεσε πεδίο αντιθέσεων και διχογνωμιών σε ότι αφορά στην πιθανή ύπαρξη καλοήθους μορφής του όγκου αλλά και των ιστολογικών διαφοροποιήσεων.⁵⁷ Σήμερα ο όρος βλεννο-

επιδερμοειδής όγκος δε θεωρείται δόκιμος διότι ακόμη και χαμηλής κακοήθειας (low grade) όγκοι μπορεί να υποτροπιάσουν ή να δώσουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες της περιοχής ⁵⁸⁻⁶⁴

Ο ορισμός που δόθηκε από τους Ellis (1996) ⁶⁵ και Auclair (1991) ⁶⁶ είναι: ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος που αποτελείται από ποικίλη αναλογία επιδερμοειδών, βλεννωδών, ενδιάμεσων και διαυγών κυττάρων τα οποία συχνά επιδεικνύουν κυστικό πρότυπο ανάπτυξης. Με βάση τα μορφολογικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά διακρίνεται σε χαμηλής, ενδιάμεσης και υψηλής κακοήθειας τύπο.

Χημικά καρκινογόνα και ογκογόνοι ιοί δε σχετίζονται με την ανάπτυξη του MEC, αλλά προηγούμενη έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία φαίνεται ότι παίζει σπουδαίο ρόλο. Μεταξύ των επιζώντων της έκρηξης της ατομικής βόμβας στη Χιροσίμα και στο Ναγκασάκι το 1945, η συχνότητα του MEC ανέρχεται σε 44%.⁶⁷ Παρομοίως έχει αναφερθεί ανάπτυξη μετά από ακτινοβολία για καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος ή λευχαιμίας. ⁶⁸

α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Σχεδόν το 60% των MEC εντοπίζονται στους μείζονες και το 35% στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες. ^{60, 65, 66,}

Οι παρωτίδες είναι η κυρίαρχη θέση εντόπισης, με το 48% των περιπτώσεων να εντοπίζεται στις παρωτίδες, το 11% στους υπογναθίους και μόνο το 1% στους υπογλώσσσιους σιαλογόνους αδένες. Η υπερώα και ο βλεννογόμος των παρειών είναι οι πιο συχνές θέσεις όταν το καρκίνωμα εντοπίζεται στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες και ακολουθούν η γλώσσα, τα ούλα, το έδαφος του στόματος και η ρινική κοιλότητα.^{60,66}

Σπάνιες θέσεις ανάπτυξης MEC αναφέρονται από έκτοπο σιαλογόνο αδένος στους ενδο- & περιπαρωτιδικούς λεμφαδένες αλλά και ενδοοστικά στην κάτω και άνω γνάθο.^{57,69-71} (Εικ. 5)

Σε αρκετές μελέτες περιγράφεται ως το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων, ενώ σε άλλες είναι 2^ο σε συχνότητα κακόηθες νεόπλασμα μετά το αδеноειδές κυστικό.

Παρουσιάζει μεγάλο εύρος ηλικιακής κατανομής και δεν είναι σπάνιο σε παιδιά

Επίσης παρατηρείται μια ελαφρά υπεροχή των γυναικών σε σχέση με τους άνδρες (Γ:Α/3:2).

Η κλινική εικόνα του MEC ποικίλει ανάλογα με την ιστολογική διαφοροποίηση στο 15% των περιπτώσεων. Όγκοι υψηλής κακοήθειας (high grade) παρουσιάζονται ως μάζες που αυξάνονται γρήγορα σε διαστάσεις.⁵⁸⁻⁶⁶

Όγκοι χαμηλής και ενδιάμεσης κακοήθειας (low grade, intermediate grade) παρουσιάζονται ως βραδέως αναπτυσσόμενες μάζες.

Ανεξάρτητα από τη θέση εντόπισης το πρωταρχικό σημείο στο 75% των περιπτώσεων είναι μια ασυμπτωματική διόγκωση, ενώ σπάνια αναφέρεται συνοδός πόνος, καθήλωση δέρματος ή εν τω βάθει ιστών, μερική ή ολική παράλυση του προσωπικού νεύρου, αιμορραγία και εξέλκωση του όγκου.^{63,64}

Στη ψηλάφηση ο όγκος έχει ασαφή όρια και σύσταση ελαστική ή μαλακή.

Το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες έχει ποικίλη κλινική εικόνα και υποδύεται αυτή άλλων καλοήθων νεοπλασματικών ή φλεγμονωδών καταστάσεων.⁷¹ Όταν ο όγκος εντοπίζεται ειδικά στην υπερώα μιμείται την κλινική εικόνα βλεννωδών κύστεων (κλυδάζουσα, κυανή, ελαστική). Επίσης ανάλογα με την εντόπιση οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν δυσφωνία, δυσφαγία, πόνο, παραισθησία, ενώ ο όγκος μπορεί να είναι εξελκωμένος ή ακόμη και να αιμορραγεί.^{57,60}



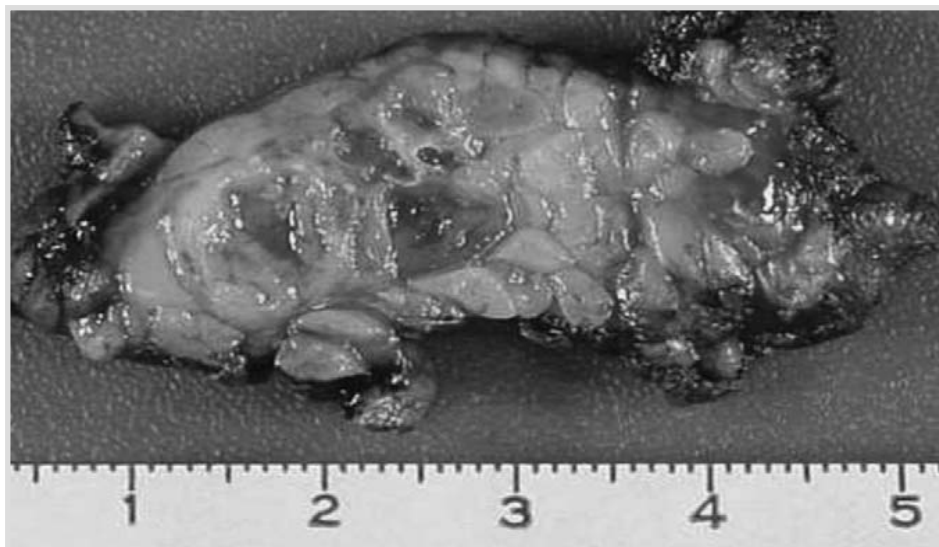
Εικ 5. Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα
Αρχείο Εργαστηρίου Στοματολογίας ΕΚΠΑ

Σε μελέτη των Spiro et al. (1978) ⁶⁰ σε 29% των ασθενών παρατηρήθηκε διόγκωση τραχηλικών λεμφαδένων εξαιτίας μετάστασης. Συμμετοχή των λεμφαδένων είναι συχνή στους όγκους των υπογναθίων σιελογόνων αδένων και σε υψηλής κακοήθειας βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα των παρωτίδων.

Λεμφαδενική συμμετοχή ανευρίσκεται σπάνια στα αρχικά στάδια σε νεοπλάσματα των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων, ενώ η διόγκωση που παρατηρείται κατά την εξέλιξη της νόσου είναι παρόμοια σε ποσοστό με αυτή των όγκων που αναπτύσσονται στις παρωτίδες.⁶⁰

β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

Μακροσκοπικά οι MEC όγκοι είναι συμπαγείς, ελαστικοί, συχνά κυστικοί, λευκού ή ιώδους χρώματος, με καλά περιγεγραμμένα ή διηθημένα όρια. (Εικ. 6) ^{72,73} Οι όγκοι καλής διαφοροποίησης μοιάζουν με καλοήθεις κυστικούς όγκους. Το μέγεθος όγκων των παρωτίδων κυμαίνεται από 1-12 cm ενώ των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων ως 5 cm.^{74,75}

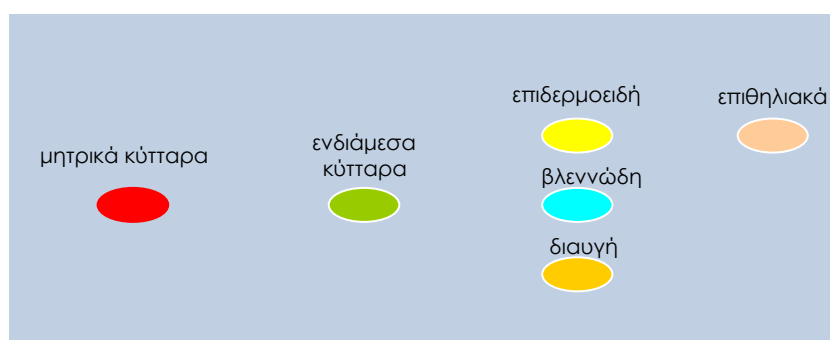


Εικ.6. Μακροσκοπική εικόνα low-grade όγκου. Παρατηρείστε την κυστική εμφάνιση της κομμένης επιφάνειας

Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. Adv Anat Pathol. (2006) .⁷³

Οι MEC όγκοι αποτελούνται από βλεννώδη επιδερμοειδή αλλά και από πολλά άλλα κύτταρα τα οποία θεωρείται ότι προέρχονται από ένα μητρικό κύτταρο.⁵⁷⁻⁵¹ (Σχ. 1)

Σχήμα 1



Προτεινόμενη Ιστοπαθογένεση του MEC

1. «Μητρικά» κύτταρα

Έχουν το μέγεθος λεμφοκυττάρου, το σχήμα τους είναι στρογγυλό ή ωοειδές, και πυρήνα μικρό και στρογγυλό. Το κυτταρόπλασμα είναι

βασεόφιλο και δεν βάφεται με τις χρωστικές βλεννοκαρμίνης PAS, ή Sudan IV.^{57, 65,66} Ανευρίσκονται στους μεγάλους πόρους των σιαλογόνων αδένων και θεωρούνται προγονικά για άλλους τύπους κυττάρων.

2. Ενδιάμεσα κύτταρα

Είναι ωοειδούς σχήματος, με μέγεθος περίπου 3 φορές μεγαλύτερο από αυτό των λεμφοκυττάρων. Περιέχουν βαθυχρωματικό πυρήνα και ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Όπως και τα μητρικά κύτταρα δεν περιέχουν βλέννη ή λίπος. Η χρώση PAS είναι επίσης αρνητική. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται προς επιδερμοειδή ή διαυγή κύτταρα.⁷³

3. Επιδερμοειδή κύτταρα

Αυτά τα κύτταρα δε χρωματίζονται με βλεννοκαρμίνη και έχουν μια ασθενή PAS αντίδραση. Όταν αθροίζονται σε πρότυπο σαν πλακόστρωτο (pavementlike) τα επιδερμοειδή κύτταρα σχηματίζουν συμπαγείς περιοχές και φωλίες που μοιάζουν με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Ατομική κερατινοποίηση κυττάρων και σχηματισμός μαργαριταριών κερατίνης σπάνια ανευρίσκονται στο βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα και συνήθως παρατηρούνται σε φλεγμονώδεις όγκους.⁷³

4. Διαυγή κύτταρα

Είναι κύτταρα ποικίλου μεγέθους και σχήματος και έχουν διαυγές “σα νερό” κυτταρόπλασμα (water-clear). Ο πυρήνας τους είναι κεντρικά τοποθετημένος, ωοειδής, στρογγυλός και πυκνωτικός.⁷³

5. Βλεννώδη κύτταρα

Είναι συνήθως μεγάλα κύτταρα με σχήμα μπαλονιού. Ο πυρήνας τους είναι μικρός, τοποθετημένος στην περιφέρεια του κυττάρου. Το κυτταρόπλασμα είναι αφρώδες και ελαφρώς βασεόφιλο και δίνει ισχυρή θετική αντίδραση με χρώση βλεννοκαρμίνης και PAS. Απαντώνται συνήθως σε μικρές συναθροίσεις και σπάνια μεταξύ των άλλων τύπων κυττάρων.⁷³

Τα παραπάνω κυτταρικά στοιχεία συγκροτούν λοβιδιακές αθροίσεις από τις οποίες άλλες περιέχουν κυστικούς χώρους και άλλες σχηματίζουν συμπαγή νησίδα ή χορδές. Η κυριαρχία του κάθε είδους κυττάρου καθορίζει και την διαφορετική δομή του όγκου, πχ όταν επικρατούν τα επιδερμοειδή ο όγκος είναι περισσότερο συμπαγής.⁷⁶

Επίσης το είδος του κυρίαρχου κυττάρου καθορίζει και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Όταν επικρατούν τα βλεννώδη κύτταρα ο όγκος εμφανίζει κυστικές περιοχές και είναι υψηλής διαφοροποίησης, όταν επικρατούν τα επιδερμοειδή ο όγκος είναι συμπαγής και θεωρείται χαμηλής διαφοροποίησης.⁷⁷

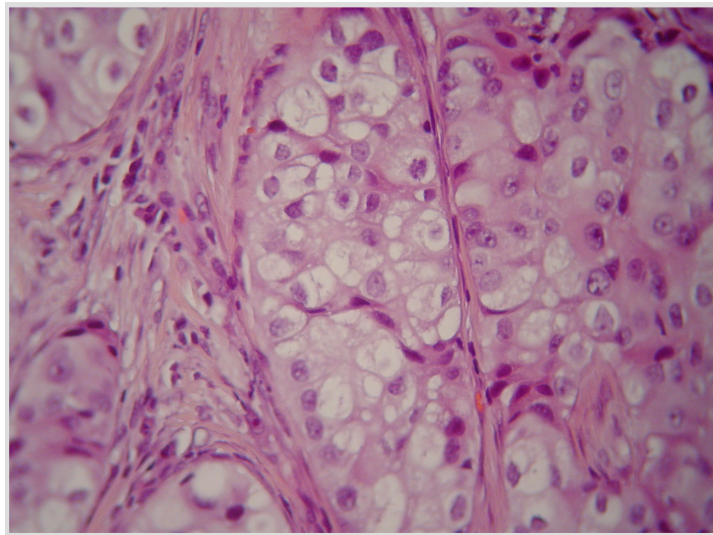
Η μικροσκοπική λοιπόν εικόνα εξαρτάται κυρίως από τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης.

Το σημείο κλειδί για χαμηλής κακοήθειας (low grade) (Εικ. 7) MEC είναι το κυρίαρχο κυστικό πρότυπο όπου: πολλαπλές καλά σχηματισμένες κυστικές ή μικροκυστικές δομές περιβάλλονται από ώριμα βλεννώδη, ενδιάμεσα, ή επιδερμοειδή κύτταρα. Ποσοτικά τα βλεννώδη είναι περισσότερα στους χαμηλής κακοήθειας όγκους.^{78,79}

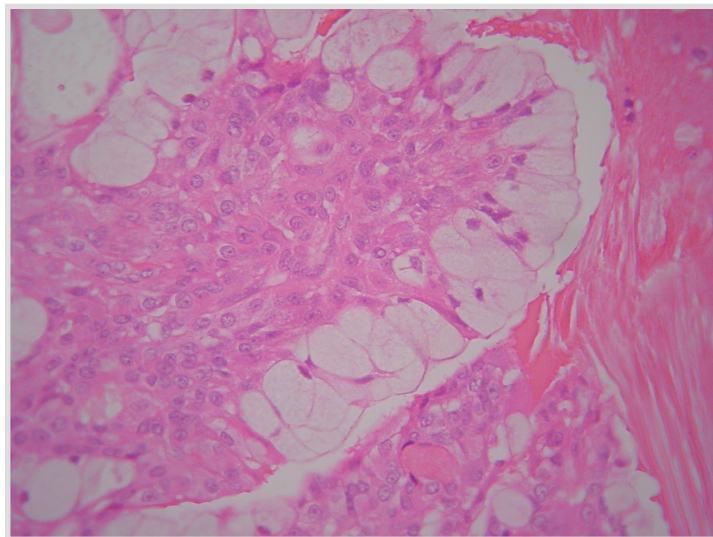
Οι συμπαγείς κυτταρικές περιοχές καταλαμβάνουν λιγότερο από το 10% του όγκου.

Οι όγκοι ενδιάμεσου βαθμού κακοήθειας (intermediate grade) (Εικ. 8) έχουν λιγότερους και μικρότερους κυστικούς χώρους από τους χαμηλής κακοήθειας. Κυριαρχούν τα ενδιάμεσα κύτταρα και σχηματίζουν συμπαγή νησίδα. Επίσης έχουν διηθημένα όρια.

Οι υψηλής κακοήθειας όγκοι (high grade) χαρακτηρίζονται από κυρίως συμπαγή νησίδια και τα κύτταρα εμφανίζουν ατυπία, αναπλασία και πολλές μιτώσεις. Επίσης παρατηρείται περινευρική και λεμφο-αγγειακή διήθηση.^{74- 79}



Εικ.7 Χαμηλής κακοήθειας βλεννοεπιδερμοειδές κυριαρχούν τα βλεννώδη κύτταρα (αιματοξυλίνη- ηωσίνη, χ 200). Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ



Εικ.8 Ενδιάμεσης κακοήθειας βλεννοεπιδερμοειδές (αιματοξυλίνη- ηωσίνη, χ200)
Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ

γ. Πρόγνωση

Η πρόγνωση εξαρτάται από το βαθμό διαφοροποίησης, το κλινικό στάδιο και την επαρκή χειρουργική αφαίρεση.

Έχει βρεθεί ότι η πρόγνωση σχετίζεται και με τους παρακάτω παράγοντες:

- α) ηλικία (καλύτερη πρόγνωση σε μικρή ηλικία)
- β) φύλο (καλύτερη πρόγνωση σε γυναίκες)
- γ) αγγειακή διήθηση
- δ) αριθμός μιτωτικών διαιρέσεων
- ε) κυτταρικός πολλαπλασιασμός (έκφραση του Ki 67 αντιγόνου)

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι:

- α) κυστικοί σχηματισμοί < 20%
- β) 4 ή περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις ανά 10 υψηλής μεγέθυνσης οπτικά πεδία
- γ) διήθηση νεύρων
- δ) νέκρωση και
- ε) αναπλασία ⁷³⁻⁷⁶

Τα παραπάνω ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά οι Auclair et al (1992)⁷⁷ τα κατέταξαν σε ένα σύστημα βαθμονόμησης (Πιν. 3) ⁷⁷ ο οποίος καθορίζει και το βαθμό κακοήθειας του βλεννοεπιδερμοειδούς.

Πίνακας 3	
Auclair et al	Βαθμός
Κυστικοί σχηματισμοί < 20%	2
4 ή περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις ανά 10 υψηλής μεγέθυνσης οπτικά πεδία	3
Διήθηση νεύρων	2
Νέκρωση	3
Αναπλασία	4
Auclair PL et al .Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Cancer. (1992) ⁷⁷	

Βαθμοί 0-4 χαρακτηρίζουν τα χαμηλής κακοήθειας (low grade) MEC
 Βαθμοί 5-6 χαρακτηρίζουν τα ενδιάμεσου βαθμού κακοήθειας (intermediate-grade) MEC. Βαθμοί 7-14 χαρακτηρίζουν τα υψηλής κακοήθειας (high grade).⁷⁷

Οι Brandwein et al. (2001)⁷⁸ πρότειναν ένα λίγο διαφορετικό σύστημα βαθμονόμησης που ταξινομεί τα MEC σε τάξη I, II, III (Πιν. 4).⁷⁸

Το αποτέλεσμα με βαθμούς 0 χαρακτηρίζει τα τάξης I MEC.

Το αποτέλεσμα με βαθμούς 2-3 χαρακτηρίζει τα τάξης II MEC.

Το αποτέλεσμα με βαθμούς 4 ή περισσότερο χαρακτηρίζει τα τάξης III MEC.⁷⁸

Πίνακας 4	
Brandwein et al.	Βαθμός
Κυστικοί σχηματισμοί < 25%	2
Διήθηση όγκου σε μικρά νησίδια	2
Ατυπίες	2
Λεμφο αγγειακή διήθηση	3
Οστική διήθηση	3
> 4 μιτωτικές διαιρέσεις ανά 10 υψηλής μεγέθυνσης οπτικά πεδία	3
Περινευρική διήθηση	3
Νέκρωση	3
<i>Brandwein MS et al. Mucoepidermoid carcinoma: .Am J Surg Pathol. (2001) ⁷⁸</i>	

Η σχέση μεταξύ πρωτοπαθούς εστίας του MEC και πρόγνωσης παραμένει αντικρουόμενο θέμα. Έχει αναφερθεί ότι η εντόπιση δεν επηρεάζει την επιβίωση, αν και MEC στους υπογνάθιους σιαλογόνους έχουν την χειρότερη πρόγνωση. Για να διευκρινισθεί η σχέση μεταξύ πρωτοπαθούς εντόπισης και πρόγνωσης απαιτείται περισσότερη

έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων.^{71,73,77} Η 5ετής επιβίωση υπολογίζεται στο 70%.

Οι Ραπίδης και συν. (2007)⁷⁵ αναφέρουν επιβίωση 85% οι Guzzo et al. (2002)⁶³ και Clode et al. (1991)⁷⁹ αναφέρουν επιβίωση περίπου 60%, ενώ οι Plambeck et al. (1996)⁶² 91,9%.

3. Κυψελοκυτταρικό Καρκίνωμα (Acinic cell carcinoma - ACC)

Το κυψελοκυτταρικό καρκίνωμα είναι κακόηθες νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων τα κύτταρα του οποίου διαφοροποιούνται σε ορώδη κύτταρα αδενοκυψελών.²⁷ Λόγω της ήπιας βιολογικής συμπεριφοράς του παλαιότερα ονομαζόταν κυψελοκυτταρικός όγκος. Ο όγκος αυτός όμως δίνει μεταστάσεις για αυτό και ο όρος καρκίνωμα είναι ο πλέον κατάλληλος.⁸⁰

α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Το κυψελοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί το 7-17,5% όλων των κακοήθων των σιαλογόνων αδένων και αναπτύσσεται τόσο στους μείζονες όσο και στους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες.⁸⁰⁻⁸²

Η συνηθέστερη θέση εντόπισής του είναι η παρωτίδα. Αποτελεί το 10-30% του συνόλου των κακοήθων όγκων των παρωτίδων. Δεύτερη σε συχνότητα θέση εντόπισής του είναι οι ελάσσονες σιαλογόνοι αδένες και συγκεκριμένα ο βλεννογόνος του άνω χείλους, ο παρειακός βλεννογόνος και η υπερώα.⁸²

Στους υπογνάθιους και υπογλώσσιους σιαλογόνους αδένες ανευρίσκεται σπάνια (2,7-4%). Άλλες σπάνιες θέσεις ανάπτυξης είναι η ρινική κοιλότητα, η κάτω γνάθος, ο λάρυγγας, η τραχεία, ο μαστός ή έκτοπος σιαλογόνος αδένας.

Το κυψελοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να εμφανισθεί αμφοτερόπλευρα στις παρωτίδες ή να έχει πολυεστιακή εντόπιση.

Αναπτύσσεται σε όλο το ηλικιακό φάσμα, με μέση ηλικία τα 40 έτη. Προτιμά τις γυναίκες σε αναλογία Γ:Α/2:1 ⁸³

Εμφανίζεται ως ευκίνητη διόγκωση, ελαστικής σύστασης. Το μέγεθος του συνήθως δεν ξεπερνά τα 3cm. Αναπτύσσεται αργά και τις περισσότερες φορές είναι ανώδυνος, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η διάγνωση και η θεραπεία. Οι Ellis et al. (1983) ⁸⁴ αναφέρουν πάρεση ή παράλυση του προσωπικού νεύρου στο 3-7,5% των ασθενών τους.⁸⁴

β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

Το κυψελοκυτταρικό καρκίνωμα ιστολογικά παρουσιάζει ποικιλομορφία, η οποία σε συνδυασμό με τη σπανιότητα του όγκου καθιστούν μερικές φορές δύσκολη την ιστοπαθολογική του διάγνωση.

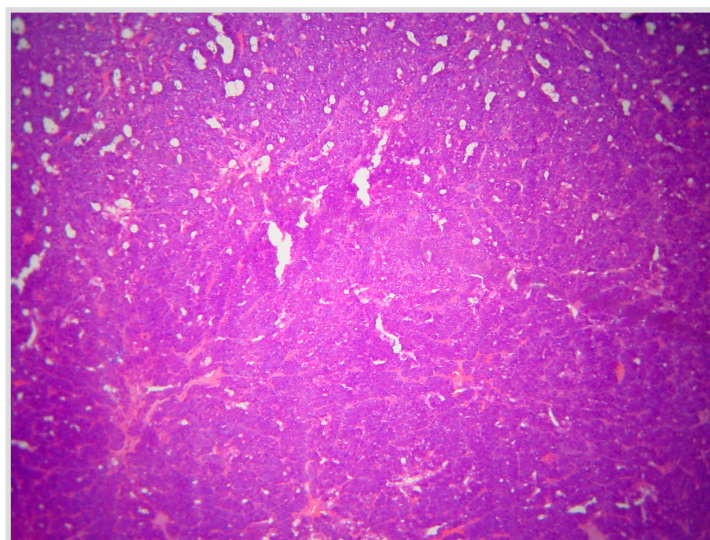
Παρατηρούνται τα παρακάτω είδη κυττάρων: α) κύτταρα που μοιάζουν με τα ορώδη κύτταρα των φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων, β) κύτταρα που μοιάζουν με αυτά των εκφορητικών πόρων γ) κύτταρα με κενотоπιώδες κυτταρόπλασμα δ) κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα.^{85,86}

Τα κυρίαρχα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν χαρακτηριστικά ορώδους εκκριτικού κυττάρου με σαφές περίγραμμα, κοκκώδες, βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και μικρό βαθυχρωματικό πυρήνα σε έκκεντρη θέση. Τα ζυμογόνα κοκκία που περιέχουν στο κυτταρόπλασμα δίνουν ανθεκτική στη διαστάση θετική αντίδραση PAS και αρνητική αντίδραση στη βλεννοκαρμίνη.

Ανάλογα με το είδος των νεοπλασματικών κυττάρων και τον τρόπο οργάνωσής τους διακρίνονται τέσσερεις κύριοι ιστολογικοί τύποι του κυψελοκυτταρικού καρκινώματος: α) ο συμπαγής β) ο μικροκυστικός γ) ο θυλακιώδης δ) ο θηλώδης-κυστικός.⁸⁷

Συνήθως συνυπάρχουν δύο ή περισσότεροι ιστολογικοί τύποι και είδη νεοπλασματικών κυττάρων σε έναν όγκο.

Στο συμπαγή τύπο τα νεοπλασματικά κύτταρα με χαρακτηριστικά ορώδους εκκριτικού κυττάρου διατάσσονται είτε με τη μορφή συμπαγών μαζών είτε οργανώνονται σε σχηματισμούς που μοιάζουν με αδενοκυψέλες και διαχωρίζονται από λεπτά ινώδη διαφράγματα συνδετικού ιστού.⁸⁷ (Εικ. 9)

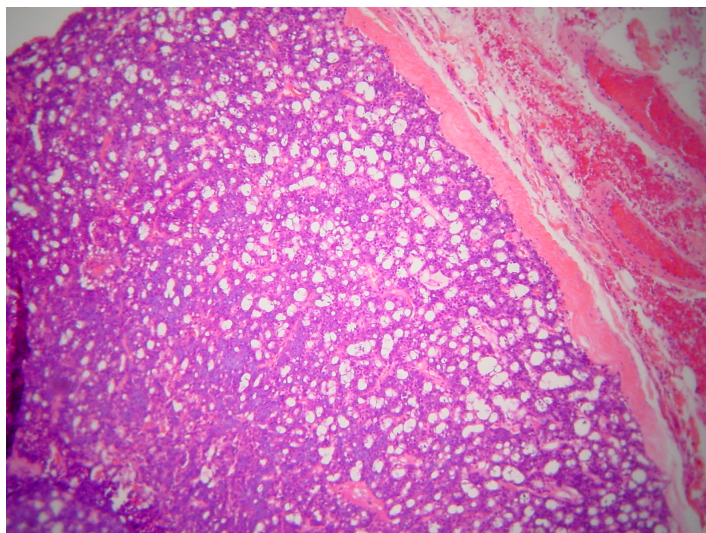


Εικ. 9 Κυψελλοκυτταρικό καρκίνωμα. Συμπαγής τύπος (αιματοξυλίνη- ηωσίνη, χ400) Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ

Στο μικροκυστικό τύπο παρατηρούνται πολλοί μικροί κυστικοί χώροι που περιέχουν βλεννώδες ή ηωσινόφιλο υλικό και δίνουν την εικόνα πλέγματος. Τα νεοπλασματικά κύτταρα που κυριαρχούν είναι αυτά που μοιάζουν με τα κύτταρα των εκφορητικών πόρων.⁸⁸ (Εικ. 10)

Στο θηλώδη – κυστικό τύπο παρατηρούνται μεγαλύτεροι κυστικοί χώροι που επενδύονται από επιθήλιο με θηλώδεις προσεκβολές προς την κυστική κοιλότητα.⁸⁴

Ο θυλακιώδης τύπος παρουσιάζει ομοιότητα με το θυρεοειδικό ιστό.



Εικ. 10 Κυψελλοκυτταρικό καρκίνωμα. Μικροκυστικός τύπος (αιματοξυλίνη- ηωσίνη, χ200) Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ

γ. Πρόγνωση

Παράγοντες που σχετίζονται με την πρόγνωση είναι το κλινικό στάδιο του νεοπλασματος κατά τη διάγνωση, το μέγεθος, η εντόπιση του όγκου και η ύπαρξη ή όχι μεταστάσεων.

Το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης κυμαίνεται από 76-90% και στη δεκαπενταετία το ποσοστό επιβίωσης μειώνεται στο 44-67%. Τα ποσοστά υποτροπής, μετάστασης και θνησιμότητας είναι 30%, 13% και 13% αντίστοιχα. Οι ασθενείς μπορεί να καταλήξουν από τοπικο-περιοχική υποτροπή ή μετάσταση. Οι πνεύμονες και τα οστά είναι οι συνηθέστερες θέσεις μετάστασης.^{84,87}

4. Πολύμορφο Αδενοκαρκίνωμα Χαμηλής Κακοήθειας (Polymorphous Low Grade Adenocarcinoma - PLGA)

Το πολύμορφο αδενοκαρκίνωμα χαμηλής κακοήθειας (PLGA) αναγνωρίσθηκε ως ξεχωριστή οντότητα το 1983, σχεδόν ταυτόχρονα από δυο διαφορετικές ομάδες τους Freedman και Lumerman (1983)⁸⁹

και τους Batsakis et al (1983).⁹⁰ Μέχρι τότε ο όγκος αναφερόταν με το γενικό όρο αδеноκαρκίνωμα.

Το PLGA είναι το 3ο σε συχνότητα κακόηθες ενδοστοματικό νεόπλασμα των σιαλογόνων αδένων, μετά το αδеноκυστικό και το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα.

α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Σχεδόν το 60% εντοπίζεται στην υπερώα και το υπόλοιπο ποσοστό σε οποιαδήποτε περιοχή του στόματος. Έχει αναφερθεί και ένα μικρό ποσοστό ανάπτυξής του στην παρωτίδα, στους υπογνάθιους και υπογλώσσιους σιαλογόνους αδένες.^{91,92}

Εμφανίζεται στα δυο τρίτα των περιπτώσεων σε γυναίκες ηλικίας μεταξύ 50-70 ετών.

Εμφανίζεται ως στέρα, μη ελκωμένη, διόγκωση ελαστικής σύστασης μεγέθους από 0,4-6 cm και αναπτύσσεται αργά.⁹¹

Συνήθως είναι ανώδυνος, αλλά μπορεί να εμφανισθεί πόνος ή ενόχληση. Επίσης μπορεί να διαβρώσει ή να διηθήσει το υποκείμενο οστό αλλά και να διηθήσει παρακείμενα λοβίδια φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων.^{91,92}

β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

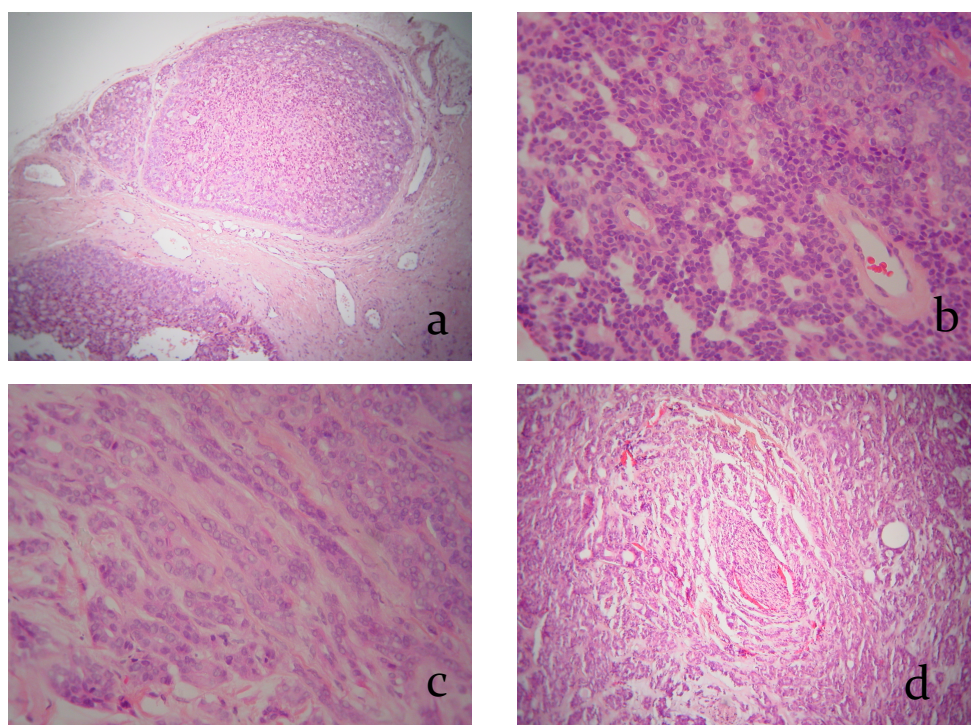
Τα νεοπλασματικά κύτταρα του PLGA έχουν ομοιόμορφη εμφάνιση, χωρίς έντονες ατυπίες ή αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα.^{93, 94}

Είναι μικρά, με ωοειδές ή επίμηκες σχήμα, ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και ασαφή κυτταροπλασματικά όρια. Ο πυρήνας έχει σχήμα στρογγυλό, ωοειδές ή ατρακτοειδές και είναι αραιοχρωματικός ή φυσαλιδώδης.^{93, 94}

Ο όγκος δεν περιβάλλεται από κάψα αλλά είναι καλά περιγεγραμμένος. Έτσι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρείται διήθηση των παρακείμενων ιστών από τα νεοπλασματικά κύτταρα (οστά, ινώδη συνδετικό ιστό, αγγεία, νεύρα).^{93, 94}

Τα νεοπλασματικά κύτταρα επιδεικνύουν διάφορα πρότυπα διάταξης. Μπορεί να σχηματίζουν συμπαγές πρότυπο, ή να διατάσσονται σε αναστομούμενες χορδές, νησίδια, πόρους ή κυστικούς χώρους στους οποίους προέχουν θηλώδεις προσεκβολές νεοπλασματικών κυττάρων.^{93, 94}

Το κύριο χαρακτηριστικό των νεοπλασματικών κυττάρων είναι η διάταξή τους σε επιμήκεις χορδές του ενός στίχου (Indian files).^{93, 94} (Εικ 11)



Εικ. 11. PLG (a) συμπαγές πρότυπο (b) ηθμοειδές πρότυπο (c) indian files (d) νευρική διήθηση. Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ

γ. Πρόγνωση

Τα ποσοστά επιβίωσης του PLGA είναι εξαιρετικά υψηλά. Οι Castle et al. (1999) ⁹¹ αναφέρουν επιβίωση στο 97% των ασθενών τους μετά από 10 χρόνια παρακολούθησης.

Τοπική υποτροπή μπορεί να συμβεί. Οι Evans et al. (2000) ⁹⁵ αναφέρουν τοπική υποτροπή σε ποσοστό 9-32% των ασθενών τους με μέσο όρο εμφάνισής της τα 7,5 έτη μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου.

Μετάσταση στους λεμφαδένες μπορεί να συμβεί σε ποσοστό από 0-15%. Οι Vincent et al. (1994)⁹⁶ αναφέρουν περίπτωση με λεμφαδενική μετάσταση 18 χρόνια μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Μεταστάσεις στους πνεύμονες είναι σπάνιες ωστόσο έχουν αναφερθεί 5 περιπτώσεις στη βιβλιογραφία.⁹⁶

Οι όγκοι που αναπτύσσονται στους μείζονες σιαλογόνους αδένες έχουν την ίδια βιολογική συμπεριφορά με τους όγκους των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων.⁹⁷

Επίσης υπάρχει η άποψη ότι οι όγκοι με θηλώδες, κυστικό πρότυπο είναι περισσότερο επιθετικοί και αυξάνεται ο κίνδυνος μετάστασης στους λεμφαδένες.^{95,98}

5. Αδενοκαρκίνωμα Μη Ταξινομημένο (Adenocarcinoma Not Other Specified - ANOS)

Τα κακοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Παρά την αναγνώριση και ταξινόμηση των περισσότερων τύπων, κάποια αναπλαστικά κυρίως καρκινώματα είναι δύσκολο ή αδύνατο να ταυτοποιηθούν και να ενταχθούν στις υπάρχουσες κατηγορίες. Αυτές λοιπόν οι κακοήθειες

αναφέρονται με το γενικό όρο αδеноκαρκίνωμα μη ταξινομημένο (NOS).

99

α. Επιδημιολογικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά

Είναι ασυνήθεις αλλά όχι σπάνιοι όγκοι ¹⁰⁰ Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η συχνότητα τους κυμαίνεται από 1,9% έως 11,8%. ¹⁰¹

Οι Spiro et al. (1982) ¹⁰⁰ υποστηρίζουν ότι εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 58 έτη, ενώ οι Matsuba et al.(1988) ¹⁰² υποστηρίζουν ότι υπάρχει ελαφρά υπεροχή των ανδρών.

Το 60% των αδеноκαρκινωμάτων εντοπίζεται στους μείζονες σιαλογόνους αδένες. Πρώτη σε συχνότητα θέση ανάπτυξης είναι η παρωτίδα (90%) και ακολουθεί ο υπογνάθιος σιαλογόνος αδένας (10%). Το υπόλοιπο 40% των αδеноκαρκινωμάτων εντοπίζεται τους ελάσσονες σιαλογόνους αδένες. Συνηθέστερη θέση εντόπισης είναι η υπερώα (συνήθως η σκληρή υπερώα), και ακολουθούν ο παρειακός βλεννογόνος, ο βλεννογόνος του άνω και κάτω χείλους. ¹⁰³

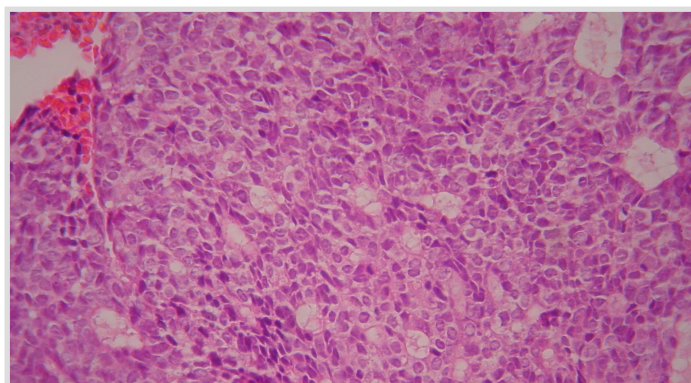
Τα αδеноκαρκινώματα εμφανίζονται ως ανώδυνες ή επώδυνες διογκώσεις μεγέθους έως 10 cm. Όταν εντοπίζονται στην παρωτίδα μπορεί να προκαλέσουν πάρεση του προσωπικού νεύρου και όταν εντοπίζονται στην υπερώα μπορεί η επιφάνειά τους να είναι εξελκωμένη. Στη ψηλάφηση έχουν υπόσκληρη σύσταση, δεν είναι ευκίνητα και δεν έχουν σαφή όρια. ¹⁰³

β. Ιστοπαθολογικά Χαρακτηριστικά

Η ιστοπαθολογική εικόνα των αδеноκαρκινωμάτων δεν είναι ειδική. Παρατηρούνται πολυάριθμα είδη νεοπλασματικών κυττάρων, (κυβοειδή, βλεννώδη, διαυγή, πλασματοκυττοειδή, κλπ) τα οποία διατάσσονται με πολλαπλούς τρόπους δίνοντας μεγάλη ποικιλία κυτταροδομικών

προτύπων. Έτσι λοιπόν ο όγκος μπορεί να είναι συμπαγής ή κυστικός με θηλώδεις προσεκβολές, να σχηματίζει πόρους, δοκίδες, νησίδια, ή δομές παρόμοιες με φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες.¹⁰⁴ (Εικ. 12)

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα αδενοκαρκινώματα στερούνται κριτηρίων που θα τα κατέτασσαν στους ήδη αναγνωρισμένους τύπους των όγκων σιαλογόνων αδένων. Για το λόγο αυτό ο ιστοπαθολόγος θα πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός, ώστε να εντοπίσει ακόμη και μικρές περιοχές που ανήκουν σε ταξινομημένο νεόπλασμα. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου σε ένα εκ πρώτης όψης αδενοκαρκίνωμα βρέθηκαν περιοχές πλειόμορφου αδενώματος ή αδενοειδούς κυστικού καρκινώματος.¹⁰⁴



Εικ .12 Αδενοκαρκίνωμα NOS (αιματοξυλίνη- ηωσίνη, χ400)
Αρχείο Στοματολογίας ΕΚΠΑ

γ. Πρόγνωση

Οι υπάρχουσες πληροφορίες για τη βιολογική συμπεριφορά των μη ταξινομημένων αδενοκαρκινωμάτων είναι ελάχιστες. Οι Matsuba et al. (1988) ¹⁰¹ κατέγραψαν για 54 ασθενείς με μέσο όρο επιβίωσης τα 4 έτη και υποστηρίζουν ότι η επιβίωση εξαρτάται από την εντόπιση του όγκου. Καλύτερη πρόγνωση έχουν τα αδενοκαρκινώματα των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων (περίπου 76% επιβίωση στη δεκαετία) και χειρότερη τα αδενοκαρκινώματα των παρωτίδων (περίπου 26% επιβίωση στη δεκαετία).¹⁰³

Επιπλέον ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα χαμηλής κακοήθειας έχουν μικρότερες πιθανότητες απομακρυσμένης ή λεμφαδενικής μετάστασης καθώς και υποτροπής.¹⁰²

Οι Wahlberg et al. (2002) ¹⁰⁶ αναφέρουν σε ποσοστό 55% δεκαετή επιβίωση στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παρωτίδας.

3. mTOR

A. Γενικά Στοιχεία

Το νησί του Πάσχα ή Ράπα Νουί (Rapa Nui) όπως ονομάζεται στην ομώνυμη τοπική γλώσσα, είναι ένα απομονωμένο νησί της Πολυνησίας στον Ειρηνικό ωκεανό. Το νησί αυτό είναι παγκοσμίως γνωστό για τα γιγάντια λίθινα αγάλματα ή μοάι, τα οποία συγκαταλέγονται στα 7 νέα θαύματα του κόσμου. Εν τούτοις το νησί αυτό έγινε επίσης γνωστό γιατί αποτελεί τον τόπο καταγωγής του μορίου TOR (**T**arget **O**f **R**apamycin). Περίπου πριν τρεις δεκαετίες ένα βακτηριακό στέλεχος, *Streptomyces hygroscopicus*, απομονώθηκε για πρώτη φορά στο έδαφος του νησιού. Το βακτήριο εκκρίνει μια μακρολίδη με αντιμυκητιασική δράση η οποία ονομάστηκε rapamycin προς τιμήν του νησιού (Rapa Nui). Σε σύντομο όμως χρονικό διάστημα αποδείχτηκε ότι η rapamycin έχει ανοσοκατασταλτικές και κυτταροστατικές ιδιότητες.¹⁰⁷

Στη δεκαετία του '90 κατά την διάρκεια γονιδιακού ελέγχου του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, αναγνωρίστηκαν δυο γονίδια στόχοι της rapamycin, που ονομάστηκαν Target of Rapamycin 1 (TOR1) και Target of Rapamycin 2 (TOR 2). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά επιτρέπουν στον μύκητα να διαφεύγει από την στάση του κυτταρικού κύκλου που προκαλεί η rapamycin.^{108,109}

Εκτεταμένες έρευνες κατέδειξαν ότι η Target of rapamycin (TOR) είναι μια πρωτεϊνική κινάση που έχει το ρόλο του κεντρικού ρυθμιστή στην κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμό.

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι η TOR βρίσκεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, δηλ. στα φυτά (AtTOR, *Arabidopsis thaliana*), στους σκώληκες (CeTOR, *Caenorhabditis elegans*), στα

έντομα (dTOR, *Drosophila melanogaster*) και στα θηλαστικά (mammals - mTOR).^{110,111}

B. Δομή και λειτουργία mTOR

Η mTOR είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης με μοριακό βάρος 290 kDa. Ανήκει στη οικογένεια PIKK (**P**hosphatidy**I**nositol **k**inase-related **k**inase).¹¹²⁻¹¹⁴ Η mTOR στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p36.2.¹¹³

Η mTOR ανευρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα^{115,116} καθώς και στις κυτταρικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ένα μέρος της mTOR μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αυτή η κίνηση ρυθμίζει την ικανότητα της mTOR να φωσφορυλιώνει την S6K1, με άγνωστο ως τώρα μηχανισμό.^{117,120,121}

Η ενδοκυττάρια εντόπιση και λειτουργίες περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.¹¹⁶ (Πιν.5)

Πιν. 5 Λειτουργίες της πρωτεΐνης mTOR στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα	
Πρωτεΐνη mTOR	Λειτουργία
Πλασματική μεμβράνη	Κυτταρική επιβίωση: mTORC2 φωσφορυλιώνει την Akt στη θέση Ser473 σε απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες
Κυτταρόπλασμα	Πρωτεϊνοσύνθεση: mTORC1 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί 4E-BP, ενώ φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί p70S6K Αυτοφαγία: mTORC1 ελέγχει πρωτεΐνες υπεύθυνες για αυτοφαγία Κυτταρική αύξηση: mTORC1 προάγει τη μετάφραση

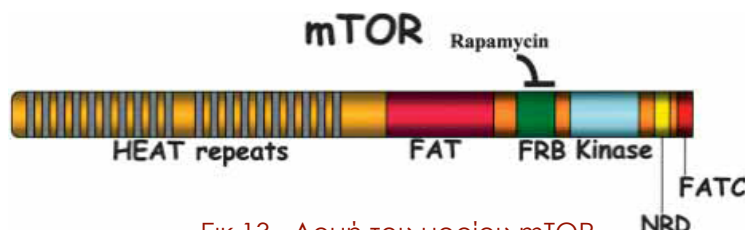
Μιτοχόνδρια	Κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση: - mTOR εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια μέσω FKBP38 ή διαμέσω συμπλόκου Bcl-XL και VDAC1. Η αναστολή mTOR υπολογίζεται από τη μείωση: - στην κατανάλωση οξυγόνου, και τα επίπεδα ATP. Υπερενεργοποίηση της mTORC1 αυξάνει: - τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA, και - την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του οξειδωτικού μεταβολισμού
Πυρήνας	Ρύθμιση της ριβοσωμικής βιογένεσης Φωσφορυλίωση των εναρκτήριων παραγόντων μεταγραφής της Pol I
<i>Bononi A, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. Enzyme Res. (2011) ¹¹⁶</i>	

Η mTOR περιέχει 2459 αμινοξέα και αποτελείται από δομικές περιοχές που έχουν διατηρηθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης. ¹¹⁴

Οι TOR πρωτεΐνες από τους μύκητες ως τα θηλαστικά παρουσιάζουν ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων σε ποσοστό 42%.⁶ Η mTOR πρωτεΐνη στον άνθρωπο και στον αρουραίο έχουν ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων σε ποσοστό 95%. ¹¹³

Δομικά αποτελείται από: (Εικ.13) ¹¹²

- 20 HEAT περιοχές στο αμινοτελικό άκρο
- FAT περιοχή
- FRB περιοχή
- Καταλυτική περιοχή κινάσης
- NRD περιοχή
- FATC περιοχή στο καρβοξυλικό – τελικό άκρο¹¹²



Εικ.13 . Δομή του μορίου mTOR

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. (2004) ¹¹²

Αναλυτικότερα το αμινοτελικό άκρο καταλαμβάνεται από 20 επαναλαμβανόμενες HEAT περιοχές. (Huntignton, EF3, A subunit of PP2A, TOR). Κάθε HEAT περιοχή αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες των 40 αμινοξέων με συγκεκριμένη διάταξη των υδροφιλικών και υδροφοβικών ομάδων τους. Οι HEAT περιοχές απαντώνται σε πολλές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη.^{112,122}

Στη συνέχεια ακολουθεί η FAT περιοχή (FRAP, ATM, TRA, μέλη της οικογένειας PIKK).^{112,123,1124}

Η FRB περιοχή είναι περιοχή ιδιαίτερου ενδιαφέροντος διότι αποτελεί τη θέση ένωσης της rapamycin με την mTOR. Κατά την είσοδό της στο κύτταρο η rapamycin ενώνεται με μια μικρή πρωτεΐνη υποδοχέα που είναι ενδοκυττάρια ισομεράση της προλίνης, την FKBP12 (**FK506 – binding protein 12 kDa**). Το σύμπλοκο rapamycin/ FKBP12 ενώνεται με την mTOR και αναστέλλει τις λειτουργίες της, προκαλώντας στάση του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση. Σημειακές μεταλλάξεις στην FRB περιοχή εμποδίζουν την ένωση FKBP–rapamycin στην mTOR με αποτέλεσμα την αντίσταση στη rapamycin.^{107,112}

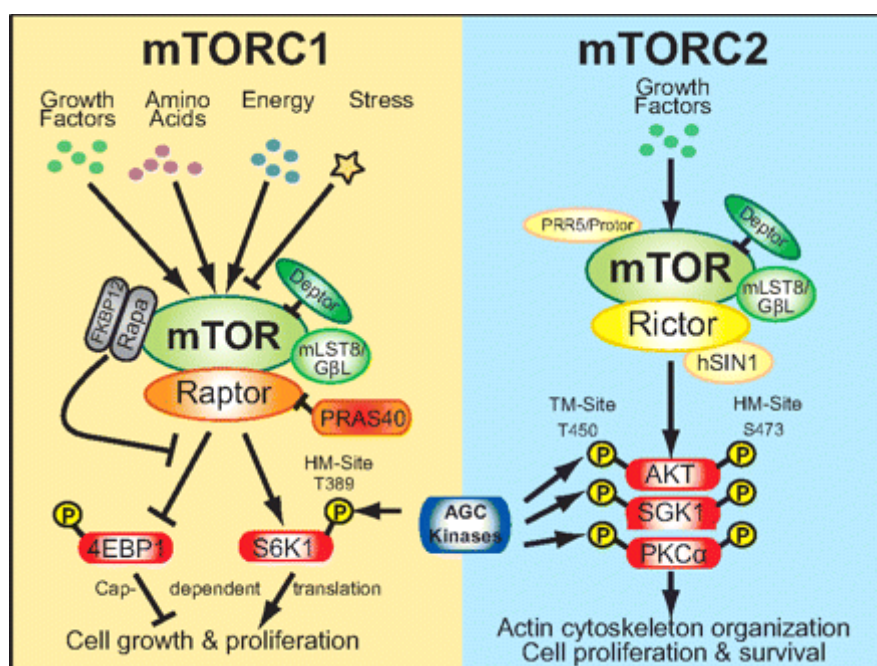
Έχει αποδειχθεί in vivo ότι η ένωση FKBP–rapamycin στην FRB περιοχή mTOR αναστέλλει κάποιες από τις λειτουργίες της mTOR. Κάποιοι επιστήμονες πιστεύουν ότι η ένωση αυτή εμποδίζει την αλληλεπίδραση της mTOR με τα υποστρώματά της, ενώ άλλοι ότι αναστέλλεται η αυτοφωσφορυλίωση της mTOR.

Το μισό καρβοξυτελικό άκρο περιέχει την περιοχή κινάσης και έχει ομοιότητα στην αλληλουχία με την καταλυτική περιοχή της PI3K (**Phosphatidylinositol 3- kinase**). Γι'αυτό η mTOR θεωρείται μέλος της οικογένειας PIKK (PI3K-related kinase). Επίσης η καταλυτική περιοχή κινάσης περιέχει το σημείο σύνδεσης του ATP.¹¹²

Στη συνέχεια ακολουθεί η περιοχή αρνητικής ρύθμισης (NRD) και τέλος άλλη μια FAT περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο (FATC)

Οι FAT και FATC περιοχές φαίνεται ότι συντονίζουν την δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης της mTOR, αλλά αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους παίρνοντας διάταξη η οποία αποκαλύπτει την καταλυτική περιοχή.¹¹²

Η πρωτεΐνη mTOR αποτελείται από 2 διαφορετικά δομικά και λειτουργικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα, την mTORC1 και την mTORC2. (Εικ. 14)¹²³



Εικ.14 Σύγκριση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2
Sofer A, et al. Mol Cell Biol. (2005)¹²³

Η mTORC1 είναι μια πρωτεϊνική κινάση, ευαίσθητη στη rapamycin, που αποτελείται από πέντε συστατικά:

- (I) mTOR είναι η καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου
- (II) raptor (**r**egulatory-**a**ssociated **p**rotein of **mTOR**)
- (III) mLST8, (**m**ammalian **l**ethal with **S**ec**13** protein **8**) επίσης γνωστή και ως GβL (**G**-protein **β**- subunit **l**ike protein)
- (IV) PRAS40 (**p**roline-**r**ich **A**KT **s**ubstrate **40** kDa)
- (V) Deptor (**D**EP-domain-containing **mTOR**-interacting protein)^{114,125,126,127}

Η ακριβής λειτουργία όλων των παραπάνω πρωτεϊνικών συστατικών του mTORC1 παραμένει αδιευκρίνιστη. Έχει προταθεί η άποψη ότι η Raptor είναι θετικός ρυθμιστής της mTORC1 συγκεντρώνοντας υποστρώματα για την mTORC1.¹²⁷

Η δύναμη του δεσμού αλληλεπίδρασης μεταξύ της mTORC1 και raptor τροποποιείται από θρεπτικές ουσίες και άλλα μόρια που ρυθμίζουν τη σηματοδοτική οδό mTORC1.¹²⁵

Ο ρόλος της mLST8/ GβL είναι επίσης ασαφής καθώς η διαγραφή αυτής της πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της mTORC1 *in vivo*.^{114,115}

Οι PRAS40 και Deptor είναι αρνητικοί ρυθμιστές της mTORC1.^{114,125} Όταν η δραστηριότητα της mTORC1 μειώνεται, PRAS40 και Deptor συγκεντρώνονται στο σύμπλοκο και αναστέλλουν τη λειτουργία της mTORC1. Ενώ όταν η mTORC1 ενεργοποιείται φωσφορυλιώνει απευθείας PRAS40 και Deptor, που στη συνέχεια μειώνουν την αλληλεπίδραση τους στην mTORC1, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της σηματοδοτικής οδού της mTORC1.^{114,126,127,128}

Ακόμη η PRAS40 φωσφορυλιώνεται απευθείας από την Akt στη θέση T246, απελευθερώνοντας έτσι την ανασταλτική της επίδραση στην mTORC1.¹²⁸

Η mTORC2, είναι μια πρωτεϊνική κινάση, ανθεκτική στη rapamycin, που περιλαμβάνει α) mTOR – καταλυτική υπομονάδα β) mLST8 αλλά γ) αντί για raptor αποτελείται από rictor, (**r**apamycin-**i**nsensitive **c**ompanion of **mTOR**) δ) mSIN1, (**m**ammalian **s**tress-**a**ctivated protein kinase **i**nteracting protein **1**) ε) Protor-1 (protein observed with Rictor-1) και στ) Deptor.^{114, 129}

Οι Rictor και mSIN1 σταθεροποιούν η μια την άλλη, και δημιουργούν τα δομικά θεμέλια της mTORC2.^{114, 129}

Η Rictor επίσης αλληλεπιδρά με την Protor-1, αλλά ο τρόπος της αλληλεπίδρασης παραμένει ασαφής.^{112, 130}

Η Rictor είναι απολύτως απαραίτητη για την καταλυτική δραστηριότητα της mTORC2, και πιθανώς συγκεντρώνει υποστρώματα για την mTORC2 (θετικός ρυθμιστής).^{131,132}

Η mSIN1, περιέχει ομόλογες περιοχές με τις περιοχές ένωσης Ras (Ras-binding domains) και μια περιοχή pleckstrin homology (PH)-like.¹³²

Η Deptor είναι αρνητικός ενδογενής ρυθμιστής της mTORC2. Ενώνεται στην FAT περιοχή της mTOR και αναστέλλει τη λειτουργία της.^{114,126,132}

Η mLST8 είναι σημαντική για τη λειτουργία της mTORC2 καθώς η διαγραφή αυτής της πρωτεΐνης μειώνει τη σταθερότητα και την δραστικότητα του συμπλόκου.^{114,115}

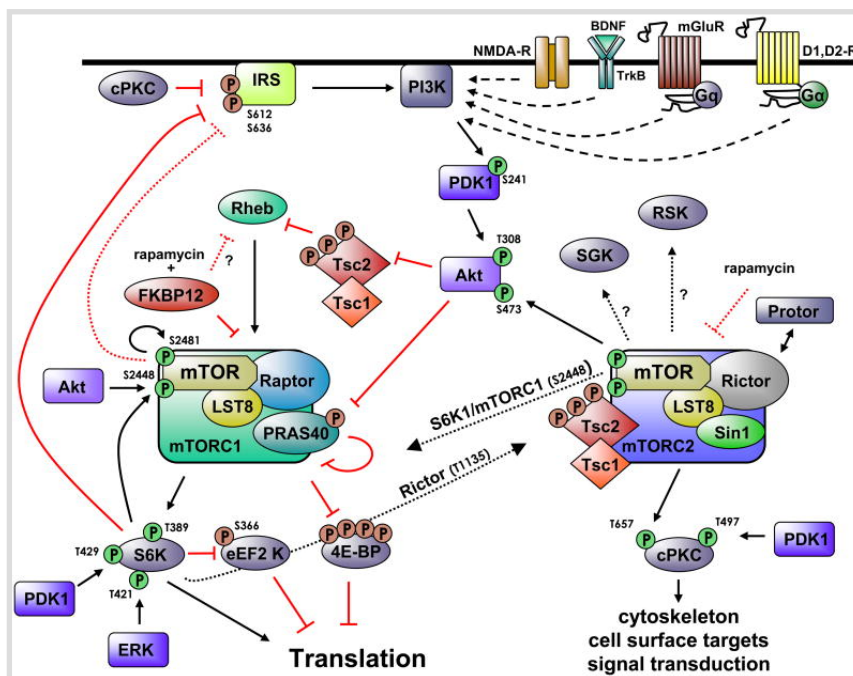
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η mTORC2, είναι ανθεκτική στη rapamycin, εν τούτοις πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι η μακροχρόνια έκθεση στη rapamycin εμποδίζει το σχηματισμό της mTORC2 και τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος Akt στη θέση Ser473.¹⁰⁸

Γ. Σηματοδοτική οδός της mTORC1

Η σπουδαιότητα του μορίου mTOR είναι αναμφισβήτητη και καταδεικνύεται από το γεγονός ότι αφαίρεση του μορίου στα ποντίκια είναι ασύμβατη με τη ζωή. Δυσλειτουργία του μορίου ανευρίσκεται σε διάφορα νοσήματα όπως καρκίνο, μεταβολικά νοσήματα, (διαβήτης τύπου 2), παχυσαρκία, και νεοπλασματικά σύνδρομα.^{116,35}

Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης TOR οδήγησε σε θεμελιώδη αλλαγή του τρόπου σκέψης για την κυτταρική ανάπτυξη, καθώς έγινε αντιληπτό ότι η διαδικασία αυτή δεν είναι ένα τυχαίο γεγονός που συμβαίνει όταν θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα αλλά, είναι μια διαδικασία ελεγχόμενη που ρυθμίζεται από σηματοδοτικές οδούς εξαρτώμενες από την πρωτεΐνη mTOR.

Η mTOR ενεργοποιεί την κυτταρική αύξηση μέσω θετικού και αρνητικού ελέγχου αναβολικών και καταβολικών διαδικασιών. Οι ελεγχόμενες από το μόριο mTOR αναβολικές διαδικασίες περιλαμβάνουν: μεταγραφή, πρωτεϊνοσύνθεση, μιτοχονδριακό μεταβολισμό, μεταφορά θρεπτικών συστατικών και ριβοσωμική βιογένεση. Ενώ οι ελεγχόμενες από το μόριο mTOR καταβολικές διαδικασίες περιλαμβάνουν : αποδόμηση mRNA, πρωτεόλυση - εξαρτώμενη από την ουμπικουτίνη, αυτοφαγία και απόπτωση.^{116,132,133} Πιο συγκεκριμένα η mTORC1 ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη ελέγχοντας την mRNA μετάφραση, την ριβοσωμική βιογένεση την αυτοφαγία και το μεταβολισμό ενώ η mTORC2 ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό.¹³³ Η mammalian TOR (mTOR) ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη σε απάντηση σε παράγοντες ανάπτυξης (όπως ινσουλίνη, ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας [IGF]-1), σε θρεπτικά συστατικά (όπως αμινοξέα), και κυτταρική ενέργεια (ATP). (Εικ. 15)¹¹⁶



Εικ.15 Συνοπτική περιγραφή της σηματοδοτικής οδού του mTOR.
Bononi A, et al. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate.
Enzyme Res. (2011) ¹¹⁶

Άνωθεν της mTOR ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού

1. Αυξητικοί παράγοντες

PI3K/Akt. Οι αυξητικοί παράγοντες όπως ινσουλίνη, ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1), επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) ενεργοποιούν την mTORC1 μέσω δυο διαφορετικών σηματοδοτικών οδών PI3K/Akt/TSC/Rheb και Ras/MEK/MAPK/RSK.^{112,114,123,132,135}

Η ινσουλίνη ενώνεται στην κυτταρική μεμβράνη στον υποδοχέα της, του τύπου της τυροσινικής κινάσης. Η ένωση αυτή φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα, προσελκύει το υπόστρωμα του υποδοχέα της Ινσουλίνης-1 (Insulin Receptor Substrate-1 – IRS-1), το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα, αλλά ενεργοποιεί και τις class I Phosphoinositide 3- kinases (PI3K). Οι οποίες με τη σειρά τους σχηματίζουν phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). Στη συνέχεια οι PIP3 προσδένονται στην PH (Pleckstrin Homology) περιοχή της Akt με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της τελευταίας στην πλασματική μεμβράνη. Στην πλασματική μεμβράνη ενεργοποιείται η Akt μέσω της φωσφορυλίωσης της από την φωσφοϊνσιτιδοεξαρτώμενη κινάση 1 - PDK1 στη θέση Thr³⁰⁸ και την mTORC2 στη θέση Ser⁴⁷³.¹³⁶ Η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί δυο πρωτεΐνες αναστολείς της mTORC1 την TSC2 και PRAS40. Η TSC2 (γνωστή και ως tuberlin) αποτελεί μέλος του ετεροδιμερούς συμπλόκου TSC1- TSC2. Είναι μια GTPάση ενεργοποιητική πρωτεΐνη (GTPase activating protein - GAP) για τη μικρή GTPάση Rheb. Η Rheb είναι θετικός ρυθμιστής της mTOR. Η TSC2 αναστέλλει την mTOR μετατρέποντας την Rheb-GTP (δραστική μορφή) σε Rheb-GDP (ανενεργή μορφή). Η PRAS40 ενώνεται απευθείας και αναστέλλει την mTOR οπότε η φωσφορυλίωση της σταματά την ανασταλτική της δράση.^{114,128,137,138}

Έτσι οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν την mTORC1 μέσω ενεργοποίησης της Rheb και αναστολής της PRAS40.

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργοποίηση της mTORC1 από αυξητικούς παράγοντες σχετίζεται με ενδοκυττάρια αύξηση του φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid PA) μέσω της φωσφολιπάσης D (phospholipase D, PLD). Το PA ενώνεται απευθείας στην FRB περιοχή της mTORC1. Σε πρόσφατες έρευνες αναφέρεται ότι απώλεια της TSC2 ή υπερέκφραση της Rheb-GTP ενεργοποιεί την PLD. Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι πλήρως κατανοητός ως τώρα γιατί η PA δεν επαρκεί από μόνη της να ενεργοποιήσει την mTORC1.^{112,123}

2. Θρεπτικά συστατικά – αμινοξέα

Τα τελευταία χρόνια διάφορες έρευνες καταδεικνύουν τη σχέση μεταξύ θρεπτικών συστατικών όπως γλυκόζης και αμινοξέων με την έναρξη της mTORC1 σηματοδότησης.

Τα αμινοξέα αποτελούν ένα ισχυρό θετικό ενεργοποιητικό σήμα της mTORC1.^{112,115}

Η ενεργοποίηση mTORC1 από τα αμινοξέα είναι ανεξάρτητη από TSC1/TSC2. Η απομάκρυνση αμινοξέων ειδικά της λευκίνης και της ισολευκίνης προκαλούν γρήγορα αναστολή mTORC1.^{114,123,139,140}

Η λευκίνη εισάγεται στο εσωτερικό των κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από τη γλουταμίνη. Η γλουταμίνη εισάγεται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω του SLC1A5 [solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter) member 5], και ανταλλάσσεται προκειμένου να εισέλθει στο κύτταρο η λευκίνη μέσω ενός ετεροδιμερούς συμπλόκου που αποτελείται από SLC7A5 [antiport solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ+ system, member 5] και SLC3A2 [solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport) member 2].

^{114,140}

Ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης της mTORC1, από αμινοξέα δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος, εντούτοις φαίνεται ότι συμμετέχουν οι class III PI3K, hVPS34, (human vacuolar protein-sorting-associated protein 34). Η ενεργοποίηση των οποίων διαμεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Ca²⁺/calmodulin.¹²⁸

Οι hVPS34, αποτελούν την πρώτη σύνδεση μεταξύ επάρκειας αμινοξέων και ενεργοποίησης mTORC1. Ο ακριβής ρόλος τους βέβαια δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Επίσης διάφορες GTP-άσες (RAGs, RalA) φαίνεται ότι προάγουν την ενεργοποίηση mTORC1. Οι Rag πρωτεΐνες ενώνονται με την Raptor και προκαλούν τη μετατόπιση mTORC1 σε περιπυρηνικές περιοχές οι οποίες περιέχουν σε αφθονία την ενεργοποιητική της mTORC1, Rheb. Τελευταία αναφέρεται ότι και οι RalA προάγουν την ενεργοποίηση της mTORC1 από αμινοξέα αλλά και τα αμινοξέα ενεργοποιούν τις MAP4K3 (serine/threonine kinase mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3).^{114,137}

Επιπλέον τα αμινοξέα ενεργοποιούν την S6 kinase 1 protein (S6K1) και αναστέλλουν την αυτοφαγία με mTOR-εξαρτώμενο τρόπο. Η ενεργοποίηση της S6K1 σημαίνει την φωσφορυλίωση της σε πολλαπλές περιοχές αμινοξέων Ser/Thr, με σημαντικότερη τη φωσφορυλίωση της στη θέση Thr-389 (η οποία καταλύεται από την mTORC1).^{132,137,139,140}

3. Κυτταρική ενέργεια - ATP

Η υποξία μειώνει τα επίπεδα του κυτταρικού ATP αναστέλλοντας μεταβολικές διεργασίες όπως οξειδωτική φωσφορυλίωση και ταυτόχρονα ενεργοποιεί τις AMPK οι οποίες αναστέλλουν την mTORC1, μέσω της φωσφορυλίωσης της TSC2 (στη θέση Ser¹³⁴⁵) και της raptor. Η φωσφορυλίωση της TSC2 ενεργοποιεί ή αναστέλλει την mTORC1 ανάλογα με τις θέσεις φωσφορυλίωσης.

Επίσης η υποξία καταστέλει την mTORC1 μέσω της Redd1/RTP801. Η Redd1 είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 232 αμινοξέων η οποία αναστέλλει την mTORC1.^{123,132}

Κάτωθεν της mTOR ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού

1. Μετάφραση-Πρωτεϊνοσύνθεση

Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης (mRNA μετάφραση) περιλαμβάνει την διαδοχική αποκωδικοποίηση του mRNA σε πρωτεΐνη. Είναι ενεργοβόρος διαδικασία που απαιτεί μεγάλα ποσά ATP, GTP καθώς και την παραγωγή μεγάλου αριθμού ριβοσωμάτων.¹³² Διαιρείται σε τρία στάδια: την έναρξη, την επιμήκυνση και τον τερματισμό.

Η mTORC1 ρυθμίζει και ελέγχει έναν αριθμό παραγόντων που συμμετέχουν στην έναρξη και την επιμήκυνση της μετάφρασης. Η ρύθμιση τους γενικά περιλαμβάνει αλλαγές στην κατάσταση της φωσφορυλίωσής τους.¹⁴¹

Η mTORC1 ρυθμίζει τη μετάφραση μέσω των των **S6Ks**, και **4E-BPs**. Οι S6Ks, και 4E-BPs, είναι υποστρώματα της mTORC1 και ρυθμιστές της μετάφρασης.¹³²

S6Ks

Οι S6Ks, ανήκουν στην AGC οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών. Στα θηλαστικά υπάρχουν 2 γονίδια για τις S6Ks, τα οποία κωδικοποιούν την S6K1 και την S6K2.

Η καλύτερα μελετημένη από τους ερευνητές είναι η S6K1. Η πλήρης ενεργοποίηση τους περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωσή τους σε δυο θέσεις:

α. στο C-τελικό υδροφοβικό της άκρο που επιτελείται από την mTORC1 στη θέση Thr389 και

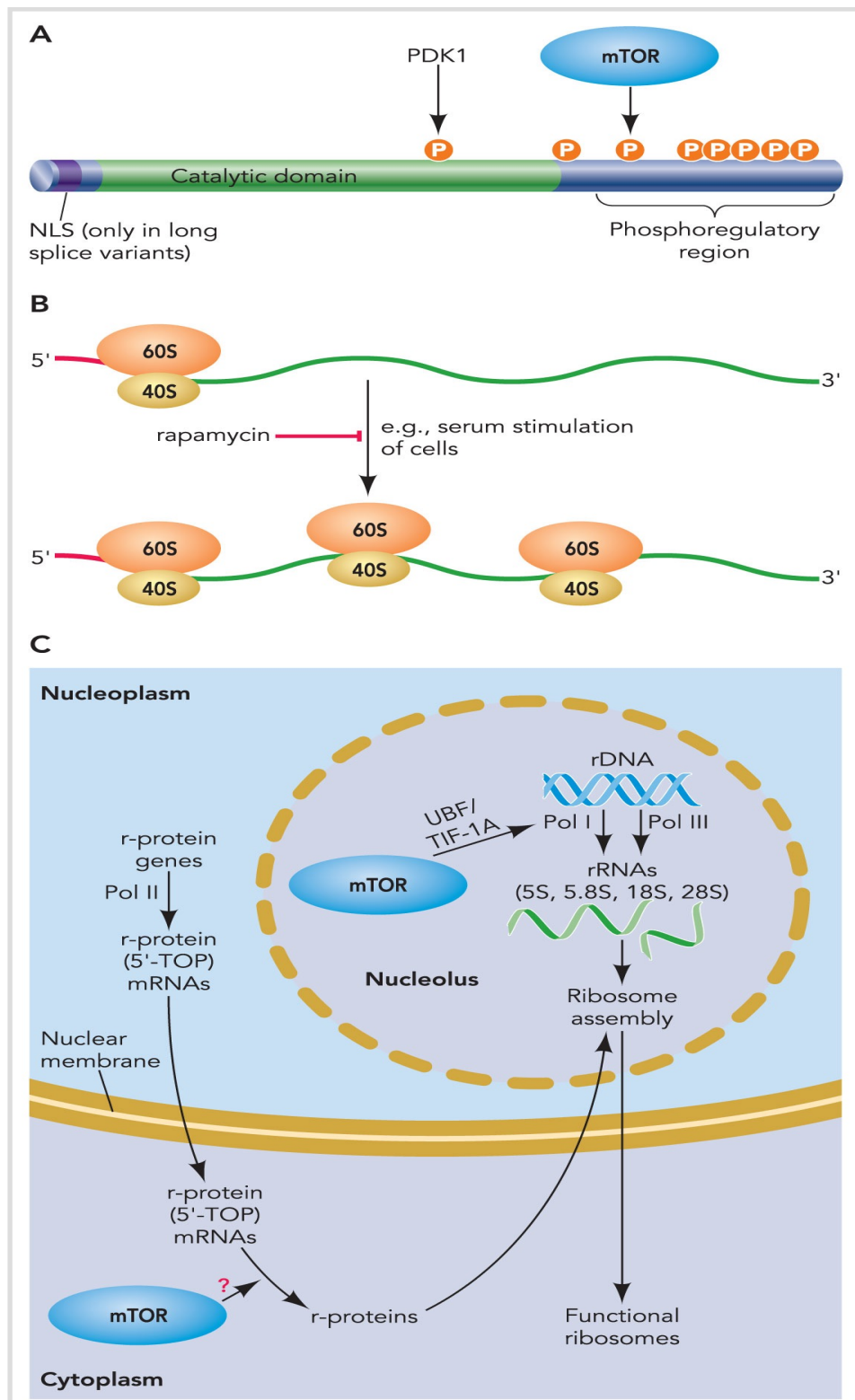
β. στην καταλυτική περιοχή της κινάσης που επιτελείται από την PDK1. ¹⁴¹

Οι ενεργοποιημένες S6Ks (S6K1, S6K2) μετά από τη φωσφορυλίωση τους, προάγουν και αυξάνουν τη μετάφραση των 5'TOP mRNAs, που κωδικοποιούν συστατικά απαραίτητα της μεταφραστικής μηχανής (ριβοσωμικές πρωτεΐνες, παράγοντες επιμήκυνσης και ο poly(A)-binding protein -PABP). Το αποτέλεσμα των S6Ks στη μετάφραση είναι έμμεσο μέσω φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων τους (**S6**, eEF-2K, eIF4B). Η πρώτη περισσότερο μελετημένη φωσφορυλίωση υποστρώματος είναι η **ριβοσωμική πρωτεΐνη S6** (συστατικό της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S). Η φωσφορυλίωση της S6 προάγει την τη συγκέντρωση των 5'TOP mRNAs στα ριβοσώματα.^{112,142} (Εικ. 16) ¹⁴¹

Τα 5'TOP mRNAs κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες, και παράγοντες επιμήκυνσης. Η S6K1 προάγει τη μεταφραστική αποτελεσματικότητα των νεόδμητων mRNAs. ^{132,143} Έτσι μέσω της αυξημένης μετάφρασης των 5'TOP mRNAs, η S6K1 αυξάνει τη γενική μεταφραστική ικανότητα. ¹⁴¹

Άλλο υπόστρωμα είναι ο ευκαρυωτικός εναρκτήριο παράγοντας 4B (eIF4B). Η φωσφορυλίωση του στη θέση Ser 422 διεγείρει τις δραστηριότητες ATPάσης και ελικάσης του eIF4A. ^{132,143}

Υπό την επίδραση λοιπόν αυξητικών παραγόντων και θρεπτικών συστατικών η mTORC1 φωσφορυλιώνει εκτός την p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1) και την eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1 (4EBP1) για συντονισμένη ρύθμιση και αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η φωσφορυλίωση της S6K1 συμβάλλει στην συγκέντρωση του eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) translation initiation complex, ενώ η φωσφορυλίωση του 4EBP1- καταστολέας της



Εικ. 16 Διάγραμμα λειτουργίας της S6K1 ¹⁴¹

μετάφρασης επάγει την απελευθέρωσή του από eIF4E, επιτρέποντας στον eIF4E να εκκινήσει τη μετάφραση. Οι S6K1 και 4EBP1 περιέχουν ένα TOR μοτίβο (TOS) που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με rapTOR για να διευκολυνθεί η συγκέντρωση υποστρωμάτων της mTOR.^{114,132,144} Η φωσφορυλίωση του 4EBP1 γίνεται σε 4 θέσεις (2 από αυτές είναι ευαίσθητες στη rapamycin).¹⁴⁵

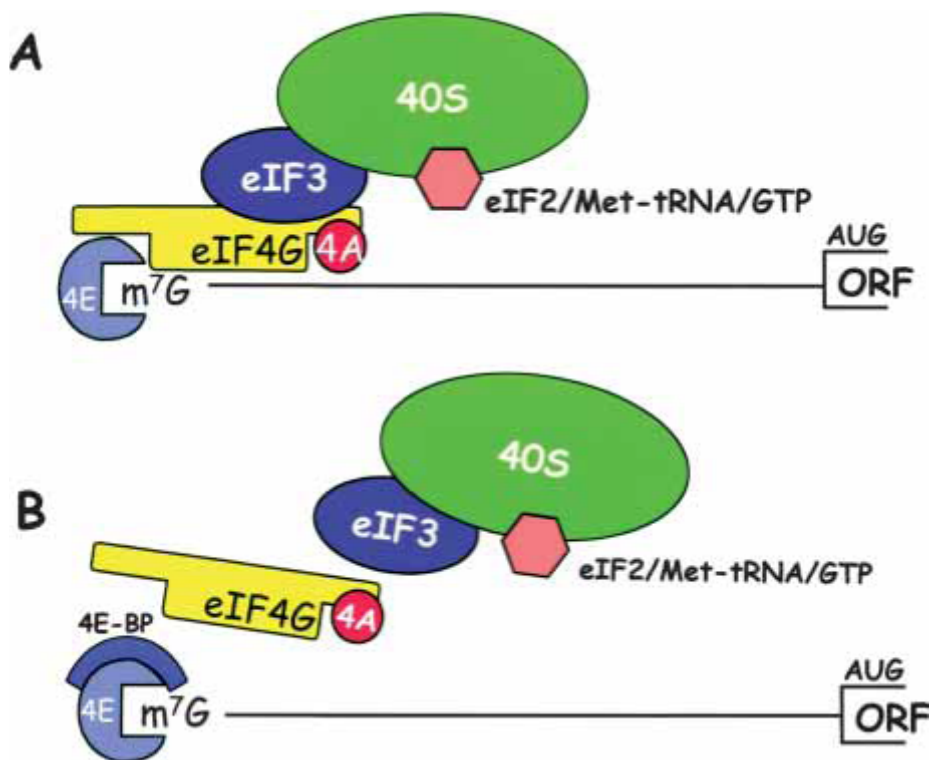
eIFs

Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται εναρκτήριοι της μετάφρασης παράγοντες (**e**ukaryotic **i**nitiation **f**actors -eIFs). Διαμεσολαβούν την έναρξη της μετάφρασης συγκεντρώνοντας mRNA στη μικρή ριβοσωμική μονάδα 40S (eIF4 group of factors) καθώς και το εναρκτήριο methionyl-tRNA (Met-tRNA_i) το οποίο αναγνωρίζει το εναρκτήριο κωδικόνιο.^{141,146}

eIF4E

Ένα κρίσιμο βήμα στη ρύθμιση της μετάφρασης είναι η πρόσληψη ενός ριβοσώματος στο 5' άκρο mRNA και η σύνδεση του με ένα κωδικόνιο έναρξης.^{112,146} Η ένωση αυτή διευκολύνεται με τη μεσολάβηση διαφόρων εναρκτηρίων της μετάφρασης παραγόντων. Το 5' άκρο όλων των mRNAs έχει δομή η οποία αναγνωρίζεται από τον ευκαριωτικό εναρκτήριο της μετάφρασης παράγοντα 4E {eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)}. Ο eIF4E ενώνεται στο 5' άκρο ως υπομονάδα ενός συμπλέγματος (που ονομάζεται eIF4F) και περιέχει άλλες δύο πρωτεΐνες (eIF4G1, eIF4GII) και την RNA ελικάση eIF4A.

Η ένωση αυτή ξετυλίγει την εγγύς δευτεροταγή δομή του mRNA επιτρέποντας έτσι την πρόσδεση και της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας καθώς και πλήθος άλλων εναρκτηρίων παραγόντων της μετάφρασης^{112,146} (Εικ. 17)¹¹²

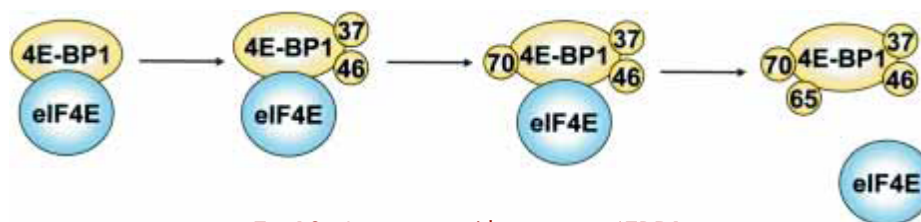


Εικ. 17. Επαγωγή της μετάφρασης από το mTORC1.
 Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*
 (2004) ¹¹²

4EBPs

Η αλληλεπίδραση μεταξύ eIF4E και eIF4G ρυθμίζεται από τις 4EBPs πρωτεΐνες (μια οικογένεια κατασταλτικών της μετάφρασης πρωτεϊνών). Οι 4EBPs ανταγωνίζονται με τον eIF4G για το σημείο σύνδεσης στον eIF4E.^{112,147}

Όταν οι 4EBPs είναι υποφωσφορυλιωμένες ενώνονται με ισχυρό δεσμό με τον eIF4E ενώ η υπερφωσφορυλίωση τους αποτρέπει αυτή την ένωση και έτσι ελευθερώνεται ο eIF4E για να ξεκινήσει η μετάφραση. Η περισσότερο μελετημένη από τις 4EBPs πρωτεΐνες είναι η 4EBP1. Η φωσφορυλίωση της γίνεται από την mTOR ιεραρχικά σε 4 θέσεις : Thr 37, Thr 46, Ser 65, και Thr 70.^{112,145} (Εικ. 18) ¹¹²



Εικ.18 Φωσφορυλίωση της 4EBP1.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* (2004) ¹¹²

Κάποιες θέσεις φωσφορυλίωσης της 4E-BP1 επηρεάζουν άμεσα τη σύνδεση με τον eIF4E ενώ άλλες δεν την επηρεάζουν. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση στο NH2-τελικό άκρο στη θέση Thr37/46 της 4E-BP1 στον άνθρωπο, απαιτείται για την επακόλουθη τροποποίηση θέσεων γειτονικών της θέσεως σύνδεσης του eIF4E (Ser65/Thr70), αλλά η ίδια δεν επηρεάζει τη σύνδεση του eIF4E. ^{141,148}

2. Αυτοφαγία

Κεντρικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας είναι η mTORC1, όπου παρουσία θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων αναστέλλει την έναρξη της αυτοφαγίας. Η αναστολή της mTORC1, ενεργοποιεί την αυτοφαγία. Η απελευθέρωση όμως αμινοξέων από την αποδόμηση των πρωτεϊνών οδηγεί σε εκ νέου ενεργοποίηση της mTORC1. Η mTORC1 επίσης αναστέλλει την αυτοφαγία φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας τις αυτοφαγικές πρωτεΐνες unc-51-like kinase 1/2 (ULK1/2) και το προϊόν του αυτοφαγικού ειδικού γονιδίου 13 (autophagy-specific gene 13 (ATG13)).^{114,149}

3. Μεταβολισμός

Η mTORC1 φαίνεται ότι μπορεί να ρυθμίζει ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια σε διάφορους τύπους ιστών τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο.¹³² Πρόσφατες έρευνες σε κυτταρικές

καλλιέργειες δείχνουν ότι η mTORC1, ρυθμίζει τη γλυκόλυση, τη βιοσύνθεση λιπιδίων και στερολών αλλά και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών.^{132,151}

Η mTORC1, ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια sterol regulatory element binding proteins, που ρυθμίζει την επίδραση των στερολών σε ένζυμα που συμμετέχουν στην ομοιόσταση λιπιδίων και χοληστερόλης. Η mTORC1, αυξάνει την δραστηριότητα του SREBP-1, και οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση στερολών, λιπιδίων και στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών.^{132,151,152}

Η mTORC1, φαίνεται ότι είναι και σημαντικός ρυθμιστής της λειτουργίας και του αριθμού των μιτοχονδρίων. Αναστολή της mTORC1 από την ραπαμυκίνη έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου, τη μείωση των επιπέδων του κυτταρικού ATP και μια ριζική αλλαγή στα μιτοχονδριακά φωσφοπρωτεώματα (phosphoproteome).^{132,153}

Η ενεργοποίηση της mTORC1, αυξάνει τον αριθμό των αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA όπως και την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του οξειδωτικού μεταβολισμού. Οι Cunningham και συν.¹⁵³ ανακάλυψαν ότι η mTORC1, αυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του PPARγ coactivator 1 (PGC1), ενός πυρηνικού συμπαραγόντα που παίζει ρόλο στη μιτοχονδριακή βιογένεση και τον οξειδωτικό μεταβολισμό, με άμεση αλλαγή στην αλληλεπίδραση με τον μεταγραφικό παράγοντα Yin-Yang 1 (YY1).

Δ. Σηματοδοτική οδός της mTORC2

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν την mTORC2 δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Οι αυξητικοί παράγοντες αυξάνουν την δραστηριότητα της mTORC2 και τη φωσφορυλίωση της AKT στη

Ser473, οπότε εύλογα θεωρούνται σηματοδότες του μονοπατιού. Με την επίδραση των αυξητικών παραγόντων η AKT φωσφορυλιώνεται στην κυτταρική μεμβράνη αφού ενωθεί με τις PtdIns(3,4,5)P₃ στην περιοχή με ομολογία πλεκτίνης (PH domain).

Επίσης και η PDK1 ελκύεται στην περιοχή και ενώνεται μέσω της PH περιοχής της και φωσφορυλιώνει την AKT στη θέση Ser308.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι και mS1N1 έχει περιοχή PH στο C-τελικό του άκρο, και μπορεί να παίζει ρόλο στη μετατόπιση της mTORC2 στη μεμβράνη και στη φωσφορυλίωση της AKT.

Λειτουργικές επιδράσεις της mTORC2

Σε αντίθεση με την mTORC1 λίγα είναι γνωστά για τη βιολογία της mTORC2.

Οι ανακαλύψεις των τελευταίων χρόνων αποκάλυψαν ότι η mTORC2 παίζει ρόλο σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες όπως κυτταρική επιβίωση, μεταβολισμός, πολλαπλασιασμός, και οργάνωση του κυτταροσκελετού.¹¹⁴ Ο ρόλος της mTORC2 σε αυτές τις λειτουργίες θα συζητηθεί παρακάτω.

- Κυτταρική επιβίωση, μεταβολισμός, πολλαπλασιασμός.

Η κυτταρική επιβίωση, ο μεταβολισμός και ο πολλαπλασιασμός εξαρτώνται από την κατάσταση ενεργοποίησης της AKT, η οποία ρυθμίζει θετικά τις διεργασίες αυτές, μέσω φωσφορυλίωσης διαφόρων επενεργητών (effectors)^{114,154,155}

Η πλήρης ενεργοποίηση της AKT προϋποθέτει τη φωσφορυλίωση της σε δύο θέσεις : τη Ser 308 από την PDK1 και Ser 473 από την mTORC2.

Αφαίρεση διαφορών τμημάτων της mTORC2 μπλοκάρουν τη φωσφορυλίωση της AKT στη Ser 473 και συνεπώς τη φωσφορυλίωση

downstream υποστρωμάτων της.^{114,156} Η αναστολή λοιπόν της AKT ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες (forkhead box proteins) FoxO1 και FoxO3a οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την αντίσταση στο stress, το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση.^{114,115}

Σε αντίθεση με την AKT οι TSC2 και GSK3 δεν επηρεάζονται από την απενεργοποίηση της mTORC2. Επίσης η GSK1(serum- and glycocorticoid protein kinase 1) η οποία παρουσιάζει ομολογία με την AKT φαίνεται ότι ρυθμίζεται από την mTORC2 , αλλά και φωσφορυλιώνει τις FoxO1 και FoxO3a στις ίδιες θέσεις με την AKT. Η απενεργοποίηση της mTORC2 καταργεί εντελώς την δραστηριότητα της GSK1.^{114,155-157}

- Οργάνωση κυτταροσκελετού

Έχει βρεθεί ότι η αφαίρεση διαφορών τμημάτων της mTORC2 επηρεάζει τον πολυμερισμό της ακτίνης και διαταράσσει τη μορφολογία των κυττάρων. Φαίνεται ότι η mTORC2 ελέγχει την ακτίνη του κυτταροσκελετού φωσφορυλιώνοντας την πρωτεϊνική κινάση Ca (PKCa) , την παξιλλίνη (paxillin) και μετατρέποντας σε GTP κατάσταση τις RhoA και Rac1. Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η mTORC2 ρυθμίζει τις παραπάνω διεργασίες δεν έχουν αποσαφηνισθεί.^{114,156,157}

E. m TOR και καρκίνος

Έχει διαπιστωθεί ότι η οδός σηματοδότησης της m TOR παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των νεοπλασιών. Έχουν εντοπισθεί αρκετές δυσλειτουργίες των συστατικών της σηματοδοτικής οδού m TOR στα καρκινικά κύτταρα. Οι πιο συχνές από αυτές είναι ενίσχυση της p110 υπομονάδας του PI3K, απώλεια του PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog), ενίσχυση της AKT2, μεταλλάξεις των TSC1 και TSC2 και

υπερέκφραση ή ενίσχυση των eIF4E και S6K1. Οι PI3K και AKT θεωρούνται πρωτοογκογονίδια και η λειτουργία τους ελέγχεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN.¹⁵⁸

Υψηλή δραστηριότητα της PI3K έχει βρεθεί σε καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος, των ωοθηκών, του μαστού και του προστάτη.

Οι καλύτερα μελετημένες μοριακές διαταραχές που ανευρίσκονται συχνά στον καρκίνο και επιδρούν στην οδό σηματοδότησης του mTOR είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN.

Οι μεταλλάξεις στο PTEN παρατηρούνται σε ένα ευρύ πεδίο κακοηθειών όπως σε καρκίνο προστάτη, μαστού, ουροδόχου κύστης, θυρεοειδούς, εγκεφάλου, νεφρού, μελάνωμα, κλπ. καθιστώντας το PTEN ένα από τα συχνότερα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια.¹⁵⁹

Επίσης υπερέκφραση της AKT έχει βρεθεί σε αρκετούς καρκίνους ειδικά του εντέρου. Η AKT έχει βρεθεί ότι προσφέρει χημειοανθεκτικότητα μέσω αναστολής της απόπτωσης. Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση της ErbB2 σχετίζεται με την ενεργοποίηση της AKT. Ερευνητικές μελέτες δείχνουν ότι απενεργοποίηση της AKT ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ακτινοθεραπεία.

Στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής τραχήλου έχουν ανευρεθεί σε μικρή συχνότητα οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN, αλλά συχνότερα έχουν παρατηρηθεί επιγενετικά φαινόμενα που οδηγούν σε ελαττωμένη έκφραση του PTEN. Επίσης έχει βρεθεί ενίσχυση της p110 υπομονάδας του PI3K και της Akt γεγονός που οδηγούν σε υπερδραστηριότητα της mTOR.^{160,161}

Μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε TSC1 και TSC2 κυρίως συμβάλλουν στη δημιουργία του συνδρόμου οζώδους σκλήρυνσης (TSC), το οποίο χαρακτηρίζεται από δημιουργία αμαρτωμάτων σε όργανα του σώματος (εγκέφαλος, νεφροί, δέρμα και καρδιά) και προδιάθεση για κακοήθειες. Οι ασθενείς με TSC σύνδρομο είναι

επιρρεπείς στην ανάπτυξη όγκων ουροδόχου κύστης και εκ διαυγών κυττάρων καρκίνωμα νεφρών. Επίσης η απενεργοποίηση του TSC οδηγεί σε απορρύθμιση της αγγειογένεσης. Πολλές μελέτες δείχνουν το σημαντικό ρόλο του eIF4E στην δημιουργία και ανάπτυξη όγκων. Κλινικές μελέτες δείχνουν ότι ενίσχυση του eIF4E γονιδίου και πρωτεϊνική υπερέκφραση μπορεί να παρατηρηθεί σε κακοήθειες. Αυξημένα επίπεδα του έχουν βρεθεί σε συμπαγείς όγκους του μαστού, του εντέρου, σε καρκίνους κεφαλής τραχήλου, σε non-Hodgkin's λεμφώματα και σε οξείες και χρόνιες μυελογενείς λευχαιμίες. ¹⁶²⁻¹⁶⁴

Η 4EBP αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η έκφραση της 4EBP-1 είναι αντιστρόφως συνδεδεμένη με την εξέλιξη κάποιων τύπων όγκων. ¹²⁴ Συγκεκριμένα σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση σε καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και του προστάτη. Η έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της 4EBP-1 σχετίζεται με χημειοανθεκτικότητα στον καρκίνο των ωοθηκών. ¹⁶²

Επίσης υπερέκφραση της Rheb έχει βρεθεί σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση στα κακοήγη νεοπλασμάτα κεφαλής- τραχήλου. Τέλος υπερέκφραση της S6K1 έχει βρεθεί σε καρκίνο των πνευμόνων και των ωοθηκών και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση των κακοηθειών αυτών. (Πίνακας 6) ¹⁵⁰.

Πρόσφατες έρευνες στην καρκινογένεση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής – τραχήλου έχουν αποκαλύψει αλλαγές (γενετικές και επιγενετικές) στον άξονα EGFR-PI3K-Akt-mTOR. ¹⁶³

Γενικά όσο περισσότερα στοιχεία αποκαλύπτονται τόσο περισσότερο γίνεται αντιληπτή η πολυπλοκότητα του μορίου. Παρ' όλη την έρευνα παραμένουν αρκετά αναπάντητα ερωτήματα όπως: με ποιους μοριακούς μηχανισμούς ενεργοποιείται η mTORC2, πως ανιχνεύονται τα επίπεδα των αμινοξέων προκειμένου να ενεργοποιηθεί η mTORC1, πως η Rheb ενεργοποιεί την mTORC1 κ.λ.π. ¹⁶⁵

Είναι βέβαια γεγονός ότι το μόριο mTOR απέκτησε πρωταγωνιστική θέση σε ότι αφορά στην αύξηση και το μεταβολισμό του κυττάρου, έγινε σαφής η αιτιολογική συσχέτιση του με αρκετά είδη καρκίνου και άνοιξε δρόμους για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Πίνακας 6. Πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια που συνδέονται με την σηματοδοτική οδό mTOR ¹⁵⁰

Πρωτοογκογονίδια	Απόδειξη	Βιβλιογραφία
PI3K	Υψηλή δραστηριότητα PI3K έχει ενοχοποιηθεί για μετασχηματισμό κυττάρων και εξέλιξη όγκων σε διάφορα είδη καρκίνου	Vivanco and Sawyers, 2002
PKB/Akt	Ενίσχυση της Akt σε διάφορα είδη καρκίνου	Vivanco and Sawyers, 2002
Rheb	Αυξημένη έκφραση της Rheb σε αρκετά κύτταρα όγκων και μπορεί αποτελεί στόχο μέσω του οποίου οι αναστολείς της farnesyl transferase ασκούν την ογκοκατασταλτική τους δραστηριότητα	Basso et al., 2005

Ras	Μεταλλάξεις της ras προκαλούν υπερδραστηριότητα πρωτεϊνών και είναι σύνηθες σε διάφορα είδη καρκίνου	Coleman et al., 2004
eIF4E	Έκτοπη υπερέκφραση της eIF4E μετασχηματίζει κύτταρα ex vivo and in vivo. eIF4E υπερεκφράζεται σε διάφορα είδη καρκίνου	Bjornsti and Houghton, 2004; Ruggero et al., 2004
S6K1	S6K1 υπερεκφράζεται ή ενισχύεται στον καρκίνο του μαστού και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση	Barlund et al., 2000

Ογκοκατασταλτικά	Απόδειξη	Βιβλιογραφία
PTEN	Απώλεια της λειτουργίας του έχει βρεθεί σε διάφορα είδη καρκίνου. Άτομα με με κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο PTEN αναπτύσσουν το σύνδρομο αμαρτωμάτων – όγκων (Cowden disease, Bannayan-Riley-Ruvaca syndrome, Proteus syndrome, Lhermitte-Duclos disease) και έχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου	Inoki et al., 2005; Sansal and Sellers, 2004; Vignot et al., 2005

TSC1, TSC2	Μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε TSC1 και TSC2 δημιουργούν το σύνδρομο οζώδους σκλήρυνσης (TSC), που χαρακτηρίζεται από δημιουργία αμαρτωμάτων σε όργανα του σώματος	Kwiatkowski, 2003
4E-BP1	Υπερέκφραση της ενεργοποιημένης 4E-BP1 μπλοκάρει το μετασχηματισμό κυττάρων από c-Myc	Lynch et al., 2004

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού mTOR στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Συγκεκριμένα, θα μελετηθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση συγκεκριμένων κομβικών ανιόντων και κατιόντων μορίων της οδού mTOR σε καλοήθεις όγκους (πλειόμορφα αδενώματα) και σε διάφορους τύπους κακοηθειών των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικοί ελάσσονες σιαλογόνοι αδένες).

Οι επιμέρους στόχοι της μελέτης είναι:

- Ο καθορισμός των επιπέδων του φωσφορυλιωμένου μορίου AKT, το οποίο αποτελεί ενεργοποιητή της οδού mTOR
- Η διερεύνηση των επιπέδων (φωσφορυλιωμένων και μη) των S6, 4EBP1 και eIF4e, τα οποία αποτελούν κατιόντα μόρια-στόχους της οδού mTOR
- Η σύγκριση της έκφρασης των ανωτέρω μορίων μεταξύ καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών ελασσόνων σιαλογόνων αδένων
- Η συσχέτιση της έκφρασης των μελετώμενων μορίων μεταξύ τους

Η διερεύνηση της έκφρασης των μορίων αυτών θα βοηθήσει στην κατανόηση του ρόλου της οδού mTOR στην ογκογένεση των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 39 περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων ποικίλων ιστοπαθολογικών υποτύπων, οι οποίες συγκρίθηκαν με 13 περιπτώσεις καλοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων και 8 περιπτώσεις φυσιολογικών ελασσόνων σιαλογόνων αδένων. Όλες οι παραπάνω περιπτώσεις ελήφθησαν από το Αρχείο του Ιστοπαθολογικού Εργαστηρίου της Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (1974-2007).

Επιλέχθηκαν οι περιπτώσεις με επάρκεια ιστού για την πραγματοποίηση της ανοσοϊστοχημικής διερεύνησης.

Οι περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων εντοπίζονταν σε ελάσσονες σιαλογόνους αδένες και παρουσίαζαν ιστολογική ποικιλομορφία. Οι περιπτώσεις καλοήθων όγκων των σιαλογόνων αδένων αφορούσαν όλες σε πλειόμορφα αδενώματα ελασσόνων σιαλογόνων αδένων. Η ομάδα ελέγχου προήλθε από φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες που αφαιρέθηκαν από περιπτώσεις βλεννωδών κύστεων με κριτήριο την απουσία φλεγμονής των σιαλογόνων αδένων.

Συλλέχθηκαν επίσης πληροφορίες για τους κακοήθεις και καλοήθεις όγκους των σιαλογόνων αδένων από τα παραπεμπτικά της ιστολογικής εξέτασης καθώς και οι ιστοπαθολογικές εκθέσεις με τη διάγνωση της βλάβης και οι κύβοι παραφίνης.

Στη συνέχεια καταγράφηκαν τα δημογραφικά (ηλικία, φύλο) και κλινικά στοιχεία όλων των περιπτώσεων και έγινε επιβεβαίωση της ιστοπαθολογικής διάγνωσης με επανεξέταση - επαναξιολόγηση των πλακιδίων αιματοξυλίνης- ηωσίνης χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του WHO 2005 για την ταξινόμηση των όγκων των σιαλογόνων αδένων.

Τέλος πραγματοποιήθηκε κοπή τομών πάχους 5μm των εγκιβωτισμένων σε κύβους παραφίνης ιστών.

Μέθοδος

Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, και χρησιμοποιείται για να εξακριβωθεί το είδος και η θέση έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Με την ανοσοϊστοχημική χρώση επιτυγχάνεται η οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος έναντι του αντιγόνου και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου.

Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημείας τα πλακίδια πρέπει να αφυδατωθούν και να καλυφθούν με ειδικές καλυπτρίδες.

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση όλων των περιπτώσεων, χρησιμοποιήθηκε το πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοϊστοχημείας της Leica BOND-MAX™ (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK), χρησιμοποιώντας το σύστημα NovoLink™ Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αδenoκαρκίνωμα μαστού και ως αρνητικοί μάρτυρες τομές με παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος.

Πιο συγκεκριμένα στο πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα :

1. Αποπαραφίνωση τομών με ξυλόλη και ενυδάτωση με διαβαθμισμένη αλκοόλη
2. Ανάκτηση του επιτόπου σε υψηλή θερμοκρασία με χρήση διαλύματος κιτρικού νατρίου.
3. Εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με χρήση 3% υπεροξείδιο του υδρογόνου (Novocastra™ Peroxidase Block, Novocastra™ Leica Microsystems).
4. Εφαρμογή του Novocastra™ Protein Block για τη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης του πρωτοταγούς αντισώματος και του πολυμερούς.
5. Επώαση τομών με αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα
6. Εφαρμογή Post Primary Block, (Novocastra™ Post Primary Block) για την ενίσχυση της διείσδυσης του ακόλουθου πολυμερούς αντιδραστηρίου.
7. Επώαση των τομών με το υπόστρωμα/χρωμογόνο 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB), που παρασκευάζεται από το Novocastra™ DAB Chromogen and Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer).
8. Χρώση τομών με αιματοξυλίνη, Novocastra™ Hematoxylin (0,02%) αφυδάτωση και κάλυψη με καλυπτρίδα.

Τα παρακάτω αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα της Cell Signalling Technologies Inc. Beverly, MA, USA:

- 1) 4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:1200)
- 2) Monoclonal Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:1600)
- 3) Monoclonal S6 Ribosomal Protein (54D2) Mouse mAb (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:100)

- 4) Polyclonal Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:200)
- 5) Monoclonal Phospho-AKT (Ser473) Rabbit mAb (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:50)
- 6) Polyclonal eIF4E Mouse Ab (Immunohistochemistry (Paraffin) 1:100)

Αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων μελετήθηκαν μικροσκοπικά από 2 ανεξάρτητους αξιολογητές (ΣΔ και ΝΝ). Η μεταξύ των παρατηρητών απόκλιση στα αποτελέσματα της αξιολόγησης ήταν μικρή (<3%).

Στις περιπτώσεις όπου υπήρξε διαφωνία μεταξύ των μελετητών έγινε επαναξιολόγηση των χρώσεων χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο πολλαπλών παρατηρήσεων και οι περιπτώσεις συζητήθηκαν ώσπου να επιτευχθεί συμφωνία.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση όλων των παραπάνω αναφερόμενων αντισωμάτων αξιολογήθηκε με ημιποσοτικό τρόπο σύμφωνα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων και την ένταση της χρώσης για κάθε περίπτωση και ταξινομήθηκε στις παρακάτω κατηγορίες:

1. Ποσοστό θετικών κυττάρων

- βαθμού 0, 0% ποσοστό θετικών κυττάρων
- βαθμού 1, <20% ποσοστό θετικών κυττάρων
- βαθμού 2, 20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων
- βαθμού 3, >50% ποσοστό θετικών κυττάρων

2. Ένταση χρώσης

- βαθμού 0, καθόλου χρώση
- βαθμού 1, ασθενής χρώση
- βαθμού 2, μέτρια χρώση
- βαθμού 3, έντονη χρώση

Επιπλέον υπολογίσθηκε ένα συνδυασμένο αποτέλεσμα (συνολικό άθροισμα) για κάθε περίπτωση (0, 2-6) το οποίο προκύπτει από το άθροισμα των βαθμών του ποσοστού των θετικών κυττάρων (0-3) και της έντασης της χρώσης (0-3).

Η μικροσκοπική μελέτη των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στις περιπτώσεις των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων περιελάμβανε την αξιολόγηση όλου του κυτταρικού πληθυσμού του όγκου. Επίσης καταγράφηκε αν η χρώση ήταν πυρηνική ή κυτταροπλασματική ή και τα δύο, όπως και η εντόπιση της θετικής ανοσοχρώσης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς των καρκινικών κυττάρων.

Στατιστική Ανάλυση

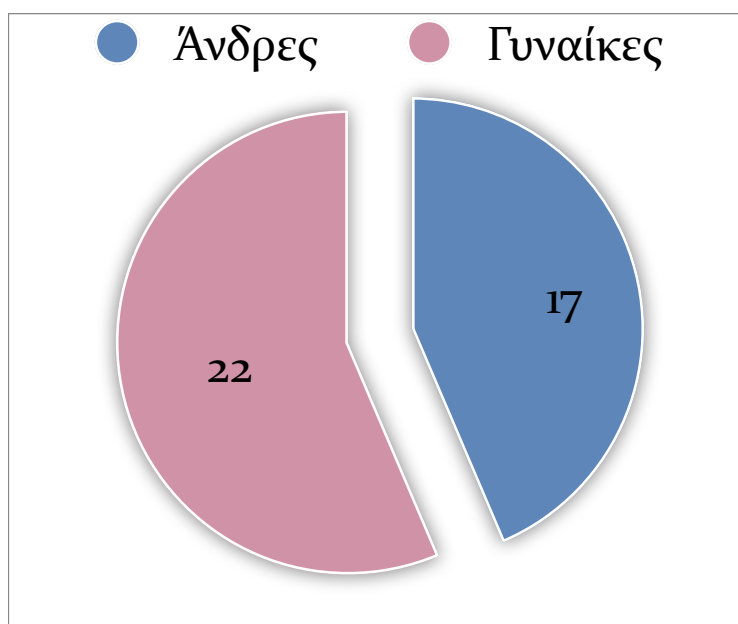
Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATA/SE 12.1, StataCorp LP (Texas, USA)

Ελέγχθηκε η μηδενική υπόθεση ότι το ποσοστό των θετικών κυττάρων για καθεμία από τις χρώσεις 4E-BP1, p4E-BP1, S6, pS6, pAKT και eIF4E κατανέμεται με τον ίδιο τρόπο μεταξύ των παρακάτω διαφορετικών κατηγοριών: φυσιολογικοί σιαλογόνοι αδένες (ομάδα ελέγχου), καλοήθη νεοπλάσματα και κακοήθη νεοπλάσματα. Ανάλογοι έλεγχοι έγιναν και για την κατανομή της έντασης της χρώσης και του συνολικού άθροισμα. Για τους παραπάνω ελέγχους χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal- Wallis test. Στη συνέχεια έγινε ο έλεγχος της ισότητας της κατανομής των παραπάνω παραμέτρων για καθένα ζεύγος μεταξύ των κακοήθων, καλοήθων νεοπλασμάτων και ομάδα ελέγχου χρησιμοποιώντας τη μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney's test. Τέλος χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Spearman's test για τη συσχέτιση της έκφρασης των 4E-BP1, p4E-BP1, S6, pS6, pAKT και eIF4E όσον αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση χρώσης και το συνολικό άθροισμα στις επιμέρους κατηγορίες και στο σύνολο των κακοήθων, καλοήθων νεοπλασμάτων και ομάδας ελέγχου. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p = 0,05$. Όλα τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά με επίπεδο $p \leq 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

Σε σχέση με το φύλο των ασθενών 22 ήταν γυναίκες (56,5%) και 17 ήταν άνδρες (43,5%). (Γράφημα 1)



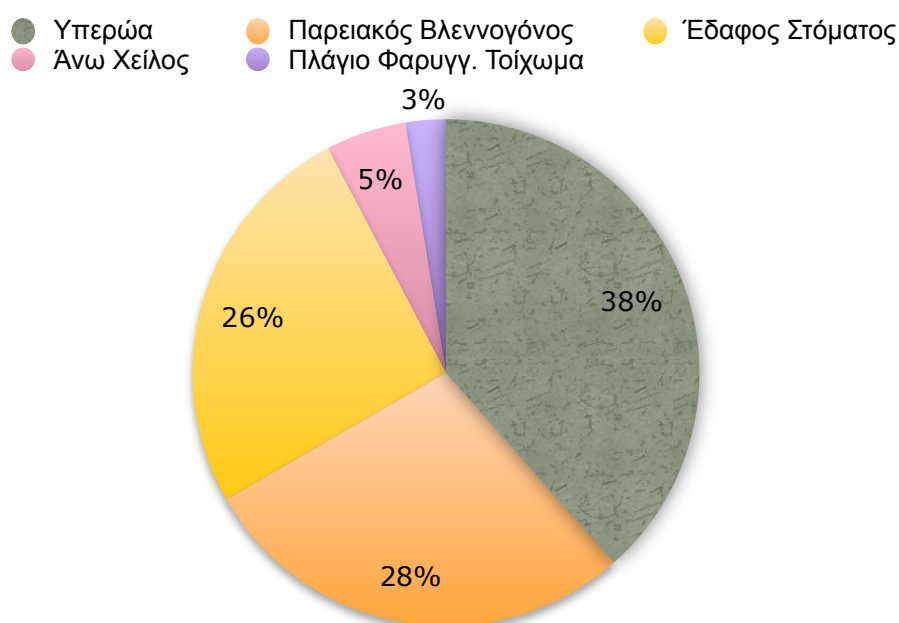
Γράφημα 1. Φύλο ασθενών κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

Η ηλικιακή κατανομή των γυναικών κυμαινόταν από 24-88 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα 56,6 έτη, και των ανδρών από 25-66 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα 45,8 έτη. (Πίνακας 7)

		Ηλικία					Σύνολο
		< 36	36-45	46-55	55-65	>66	
Φύλο	Γυναίκα	4	1	2	10	5	22
	Άνδρας	4	4	3	4	2	17
Σύνολο		8	5	5	14	7	39

Πίνακας 7. Ηλικιακή κατανομή ανδρών και γυναικών κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

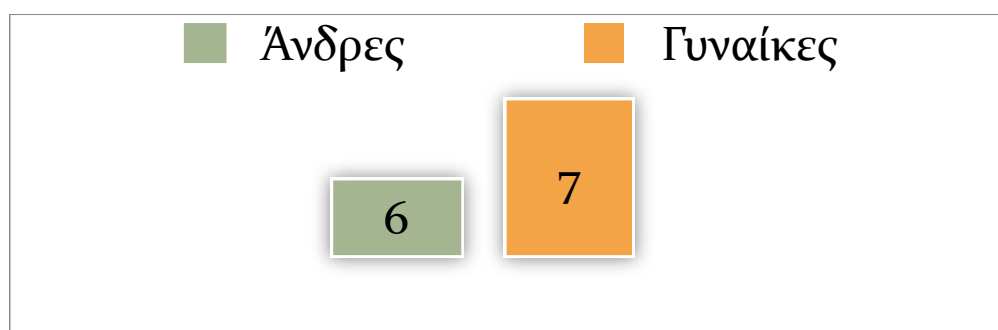
Σε σχέση με την εντόπιση, 15 περιπτώσεις εντοπίζονταν στην υπερώα (38,5%), 11 περιπτώσεις (28,2%) στον παρειακό βλεννογόνο, 10 περιπτώσεις (25,6%) στο έδαφος του στόματος, 2 περιπτώσεις (5,1%) στο άνω χείλος και 1 περίπτωση (2,6%) στο πλάγιο φαρυγγικό τοίχωμα. (Γράφημα 2)



Γράφημα 2. Εντόπιση κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

2. Δημογραφικά και κλινικά στοιχεία καλοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

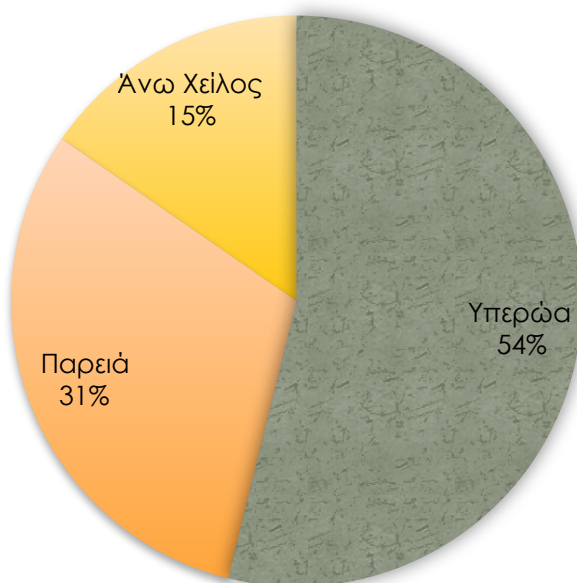
Σε σχέση με την ηλικία και το φύλο των ασθενών 7 ήταν γυναίκες (53,9%) και 6 ήταν άνδρες (46,1%). (Γράφημα 3)



Γράφημα 3. Φύλο ασθενών καλοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

Η ηλικιακή κατανομή των γυναικών κυμαινόταν από 33-65 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα 50 έτη, και των ανδρών από 30-60 έτη με μέσο όρο ηλικίας τα 48,8 έτη.

Σε σχέση με την εντόπιση 7 περιπτώσεις (53,9%) εντοπίζονταν στην υπερώα, 4 περιπτώσεις (30,8%) στην παρειά και 2 περιπτώσεις (15,3%) στο άνω χείλος. (Γράφημα 4)

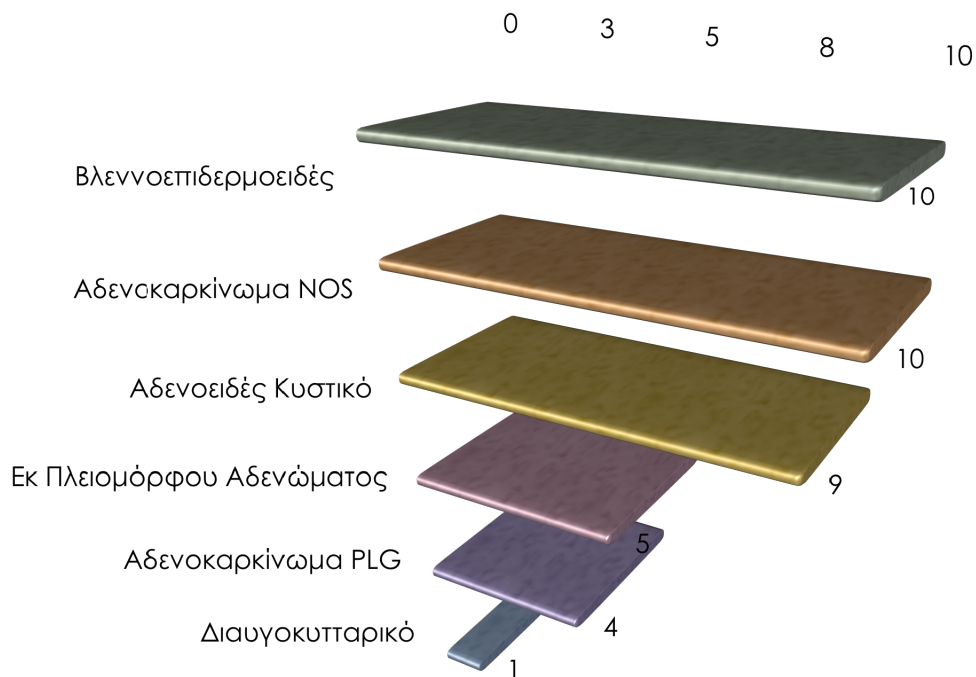


Γράφημα 4. Εντόπιση καλοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

3. Ιστολογικά χαρακτηριστικά κακοήθων νεοπλασμάτων σιαλογόνων αδένων

Η ιστολογική ταξινόμηση των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων είναι:

- 10 βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα (25,6%)
- 9 αδеноειδή κυστικά καρκινώματα (23,1%)
- 4 πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδеноκαρκινώματα (12,8%)
- 5 καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος (10,3%)
- 10 αδеноκαρκινώματα NOS (25,6%)
- 1 διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (2,56%) (Γράφημα 5)



Γράφημα 5. Ιστολογική ταξινόμηση των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων

4. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ανά ιστολογικό τύπο κακοήθους νεοπλασματος σιαλογόνων αδένων

Αναλύοντας τα δημογραφικά στοιχεία από τα παραπεμπτικά των ασθενών για τον κάθε ιστολογικό τύπο των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων διαπιστώνεται ότι:

1. Για τα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα το ηλικιακό εύρος κυμαίνεται από 35-88 έτη, ο μέσος όρος ηλικίας είναι 52,1 έτη και η αναλογία ανδρών /γυναικών: 3/7
2. Για τα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα το ηλικιακό εύρος κυμαίνεται από 26-76 έτη, ο μέσος όρος ηλικίας είναι 51,7 έτη και η αναλογία ανδρών /γυναικών: 5/4

3. Για τα αδενοκαρκινώματα NOS το ηλικικό εύρος κυμαίνεται από 24-70 έτη, ο μέσος όρος ηλικίας είναι 46,8 έτη και η αναλογία ανδρών /γυναικών: 3/7
4. Για τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος το ηλικικό εύρος κυμαίνεται από 33-64 έτη, ο μέσος όρος ηλικίας είναι 46,3 έτη και η αναλογία ανδρών /γυναικών: 4/1
5. Για τα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας καρκινώματα το ηλικικό εύρος κυμαίνεται από 37-74 έτη, ο μέσος όρος ηλικίας είναι 49,2 έτη και η αναλογία ανδρών /γυναικών: 2/3
6. Για το ένα διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα αφορούσε σε γυναίκα χωρίς διαθέσιμες πληροφορίες για την ηλικία.

5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της 4EBP1 υπήρξε θετική σε ποσοστό 100% με ποικιλομορφία σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και σπανίως πυρηνική. (Εικ.19 D-F)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν υπήρξαν περιπτώσεις με ποσοστό θετικών κυττάρων μικρότερο του 20%, ενώ το **66,6% των περιπτώσεων (26/39) εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50%** (βαθμός 3). Παρόμοιες παρατηρήσεις ισχύουν και για την ένταση

της χρώσης δηλ. **48,7% των περιπτώσεων (19/39) εμφάνισαν έντονη χρώση**, μέτρια χρώση το 33,3% (13/39) των περιπτώσεων και ήπια το 17,9% των περιπτώσεων (7/39). Επίσης στα κακοήγη νεοπλάσματα η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,67, για την ένταση της χρώσης ήταν 2,31 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,97. (Πίνακας 8 και 9)

Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος εμφάνισαν το χαμηλότερο ποσοστό θετικών κυττάρων. Συγκεκριμένα 2/5 (**40%**) περιπτώσεις **ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 3/5 περιπτώσεις (60%) στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,4. Αντίστοιχα όσον αφορά στην ένταση της χρώσης παρατηρήθηκε ότι μόνο 1 περίπτωση (20%) παρουσίασε έντονη χρώση, ενώ το **40%** των περιπτώσεων παρουσίασε **μέτριας έντασης χρώση** και το υπόλοιπο 40% ήπιας έντασης χρώση. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,2. Επίσης για το συνολικό άθροισμα 2/5 περιπτώσεις (40%) πήραν τη μέγιστη τιμή (6), το υπόλοιπο 40% είχε τιμή 4 και μόνο σε 1 περίπτωση (20%) παρατηρήθηκε τιμή 3. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,6. (Πίνακας 10)

Στα αδενοκαρκινώματα NOS παρατηρήθηκαν 2/10 περιπτώσεις (20%) στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 8/10 περιπτώσεις (**80%**) **στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,7. Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης στο **66%** των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **έντονη χρώση** (3). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,5. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι καμία περίπτωση δεν πήρε τη χαμηλότερη τιμή (2), ενώ το **70%** των

περιπτώσεων είχαν τη **μέγιστη τιμή** (6). Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,2. (Πίνακας 10)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα το 33% των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και το **67%** των περιπτώσεων **στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,7. Επίσης το **55,5%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **έντονη χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,3. Για το συνολικό άθροισμα το **40%** πήρε τη **μέγιστη τιμή** (6), και το άλλο 40%, την τιμή 5 επίσης ενώ 20% πήρε τιμή 3. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5. (Πίνακας 10)

Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα το **60%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **ποσοστό θετικών κυττάρων >50%**. Η μέση τιμή για για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,6

Το **50%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **μέτριας έντασης χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,1
Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι 4/10 περιπτώσεις (40%) έλαβαν τιμή 4, το **30%** πήρε τη **μέγιστη τιμή** 6 και το 20% των περιπτώσεων πήρε τιμή 5. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,7. (Πίνακας 10)

Τέλος στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα παρατηρήθηκε στο **50% των περιπτώσεων ποσοστό θετικών κυττάρων > 50%**. Η μέση τιμή για για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 3.
Επίσης στο **50%** των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **έντονη χρώση** και μέτριας έντασης χρώση στο υπόλοιπο 50%. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,5. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το

50% πήρε τη **μέγιστη τιμή 6** και το υπόλοιπο 50% την αμέσως μικρότερη δηλ. 5. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,5. (Πίνακας 10)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων τα αδενοκαρκινώματα NOS παρουσίασαν θετικά κύτταρα >50% στο 80% των περιπτώσεων.

Καλοήθη Νεοπλάσματα

Η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της 4EBP1 υπήρξε θετική σε ποσοστό 100% στα καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων (πλειόμορφα αδενώματα). Το **53,8%** των περιπτώσεων παρουσίασε **μέτριας έντασης χρώση**. Επίσης το **61,5%** εμφάνισε **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Τέλος για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε μόνο 1 περίπτωση με τιμή 5, ενώ η πλειονότητα των περιπτώσεων (**41,7%**) πήρε τη **μικρότερη τιμή 2**.

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,77 για την ένταση της χρώσης ήταν 1,54 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 3,31. (Πίνακας 8 και 9)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες αδένες (ομάδα ελέγχου) η έκφραση της 4EBP1 υπήρξε θετική σε ποσοστό 87,5% (7/13).

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,38, για την ένταση της χρώσης ήταν 0,88 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 2,25. (Πίνακας 8 και 9)

Πίνακας 8. Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της 4EBP1 για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήθη, κακοήθη)

4EBP1						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	1	12,50	0	0,00	0	0,00
Ήπια	7	87,50	6	46,15	7	17,95
Μέτρια	0	0,00	7	53,85	13	33,33
Έντονη	0	0,00	0	0,00	19	48,72
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Ήπια		Μέτρια		Μέτρια	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	1	12,50	0	0,00	0	0,00
<20%	3	37,50	4	30,77	0	0,00
20-50%	4	50,00	8	61,54	13	33,33
>50%	0	0,00	1	7,69	26	66,67
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	20-50%		20-50%		>50%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	1	12,50	0	0,00	0	0,00
2	3	37,50	4	30,77	0	0,00
3	4	50,00	2	15,38	5	12,82
4	0	0,00	6	46,15	8	20,51
5	0	0,00	1	7,69	9	23,08
6	0	0,00	0	0,00	17	43,59
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	2,5		4		5	

Πίνακας 9. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για 4EBP1.

4EBP1	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλόγη (A = 13)	Κακοήγη (A = 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	7 (87,5%)	13 (100,0%)	39 (100,0%)
Ένταση Χρώσης - MT ($\pm$ SD)	0.88 ($\pm$ 0,35)	1,54 ($\pm$ 0,52)	2,31 ($\pm$ 0,77)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - MT ($\pm$ SD)	1.38 ($\pm$ 0,74)	1,77 ($\pm$ 0,60)	2,67 ($\pm$ 0,48)
Συνολικό Άθροισμα - MT ($\pm$ SD)	2.25 ($\pm$ 1,04)	3,31 ($\pm$ 1,03)	4,97 ($\pm$ 1,09)

Πίνακας 10 . Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και διάμεσος για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της 4EBP1 στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων.

4EBP1		A, % Θετικών Περιπτώσεων	Διάμεσος Έντασης Χρώσης	Διάμεσος Ποσοστού Θετικών Κυττάρων	Διάμεσος Συνολικού Άθροισματος
Κακοήγη νεοπλάσματα		39/39, 100%	2	3	5
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	5/5, 100%	2,2	2,4	4,6
	Αδενοκαρκίνωμα NOS	10/10, 100%	2,5	2,7	5,2
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	2,3	2,7	5
	Βλεννοεπιδερμοειδές	10/10, 100%	2,1	2,6	4,7
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	4/4, 100%	2,5	3	5,5
	Διαυγοκυτταρικό	1/1, 100%	2	3	5

Στατιστική Αξιολόγηση

Ο στατιστικός έλεγχος για την 4EBP1, απέδειξε ότι οι διαφορές στο ποσοστό θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,0019 < 0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$), μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και ομάδας ελέγχου (φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων) είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$ αντίστοιχα). (Πίνακας 11, Ιστόγραμμα 1,2,3, Γράφημα 6,7,8)

Από τη στατιστική ανάλυση μεταξύ ομάδας ελέγχου και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων φαίνεται να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,25 > 0,05$), ενώ αντίθετα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ένταση της χρώσης και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,008 < 0,05$ και $p\text{-value}=0,049 < 0,05$ αντίστοιχα). (Πίνακας 11, Ιστόγραμμα 1,2,3, Γράφημα 1,2,3)

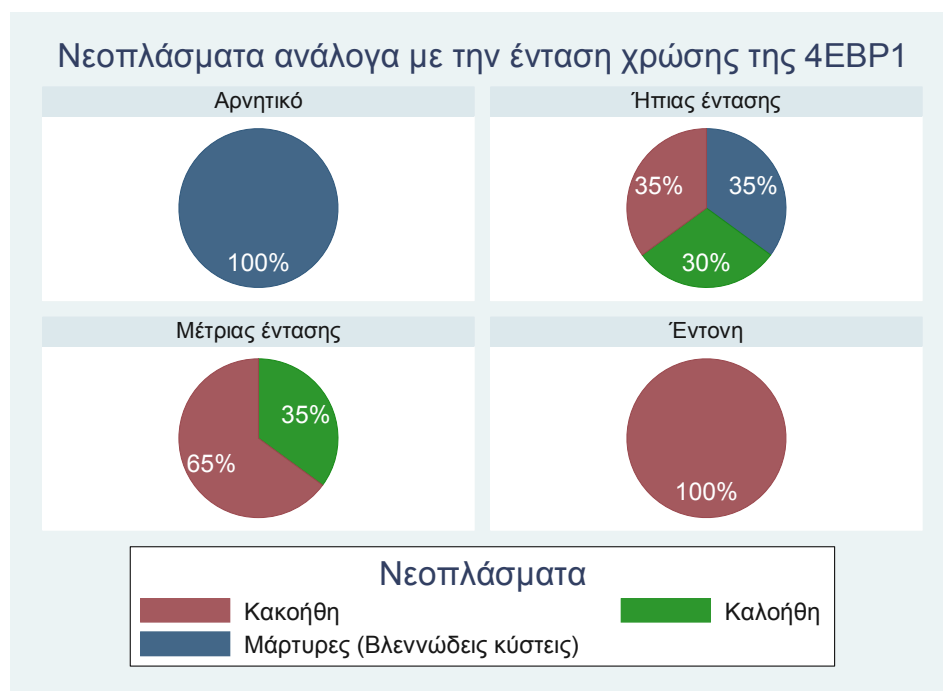
Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,7 > 0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,8 > 0,05$), καθώς και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,8 > 0,05$), μεταξύ των ιστολογικών τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. (Πίνακας 12)

**Πίνακας 11 : Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test
(Mann-Whitney U test) για 4EBP1**

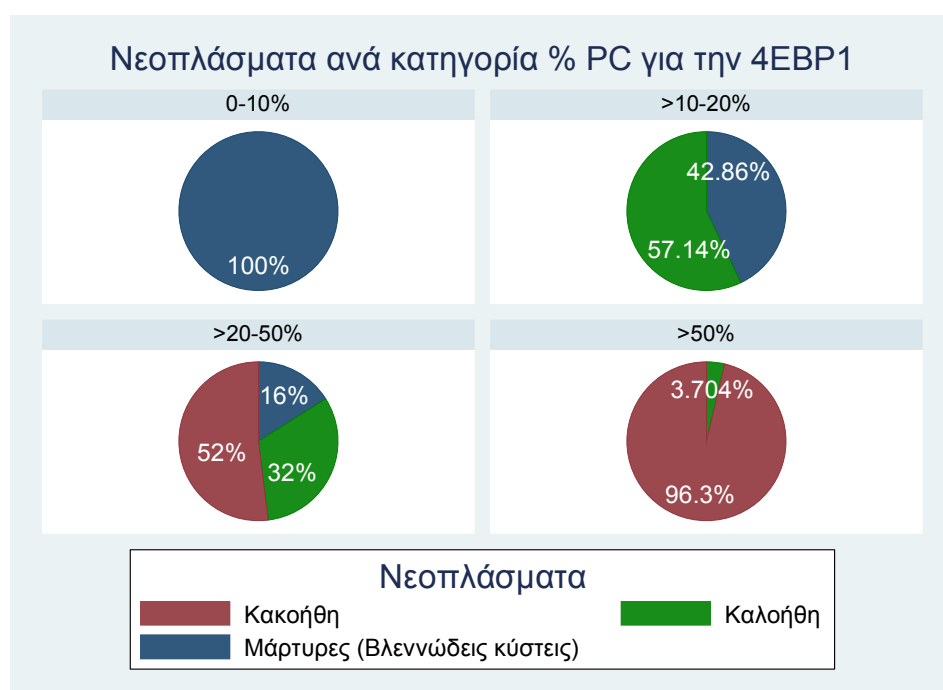
4EBP1		Mann- Whitney- Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήθη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήθη		Καλοήθη vs Κακοήθη	
		Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value
	Ένταση Χρώσης	-2,633	0,0085	-3,953	<0,001	-3,110	0,0019
	% Θετικών Κυττάρων	-1,150	0,2503	-4,157	<0,001	-4,162	<0,001
	Συνολικό Άθροισμα	-1,965	0,0494	-4,277	<0,001	-3,866	<0,001

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα του Kruskal-Wallis

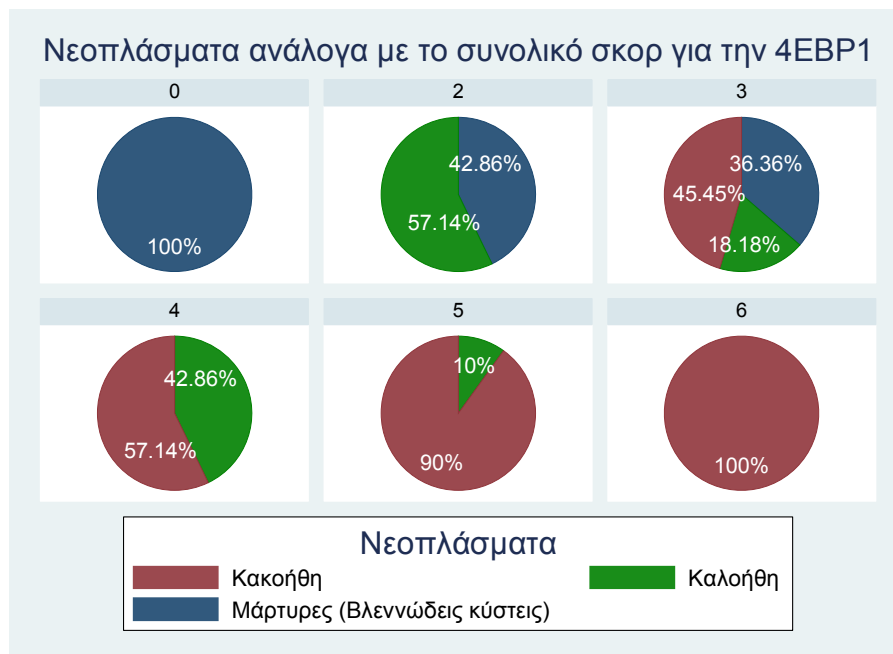
		S6	pS6	4EBP1	p4EBP1	pAKT	eIF4E
p-value	Ένταση Χρώσης	0,8687	0,5267	0,8345	0,8371	0,4281	0,5447
	% Θετικών Κυττάρων	0,8413	0,6949	0,7266	0,7737	0,8286	0,3983
	Συνολικό Άθροισμα	0,8603	0,6579	0,7678	0,8464	0,5889	0,4258



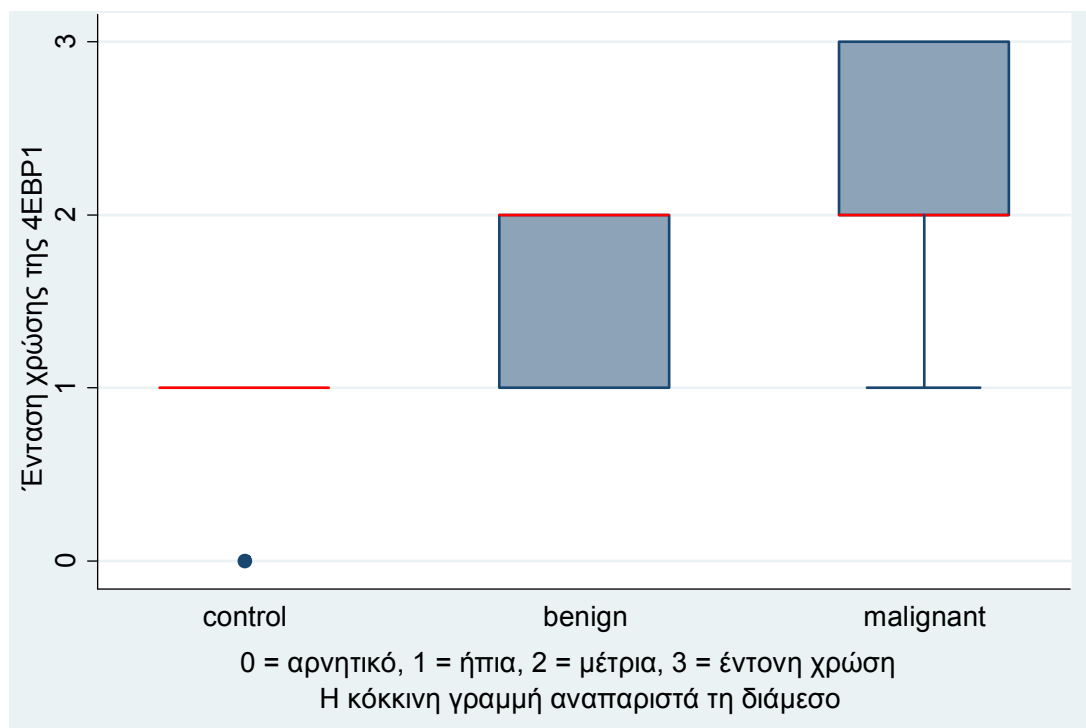
Γράφημα 6: Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της 4EBP1



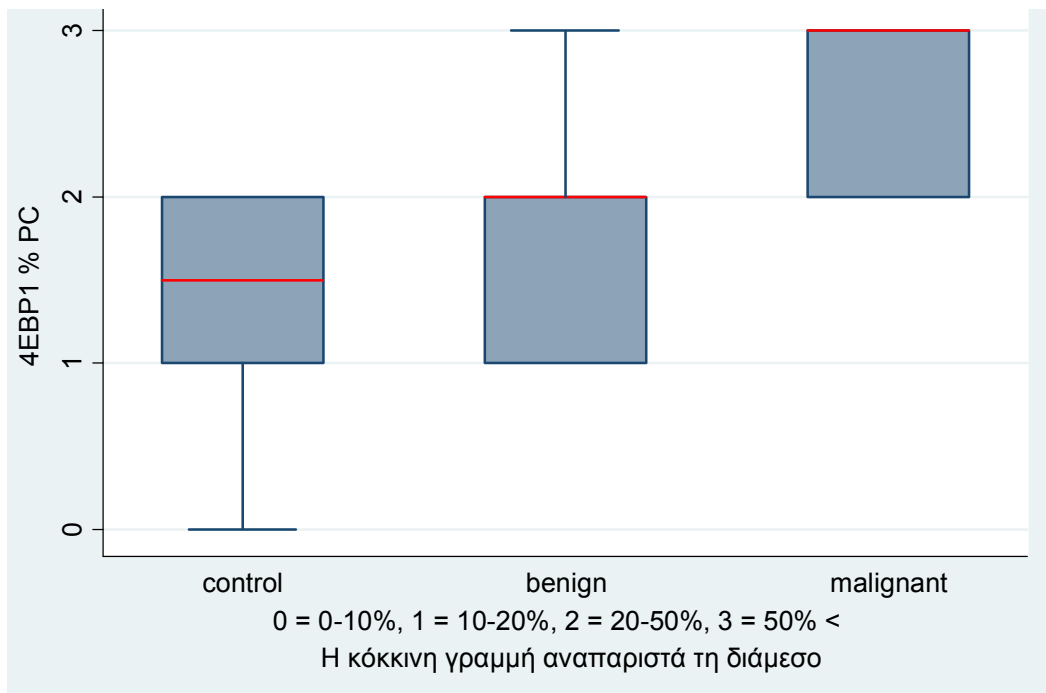
Γράφημα 7: Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το ποσοστό θετικών κυττάρων της 4EBP1



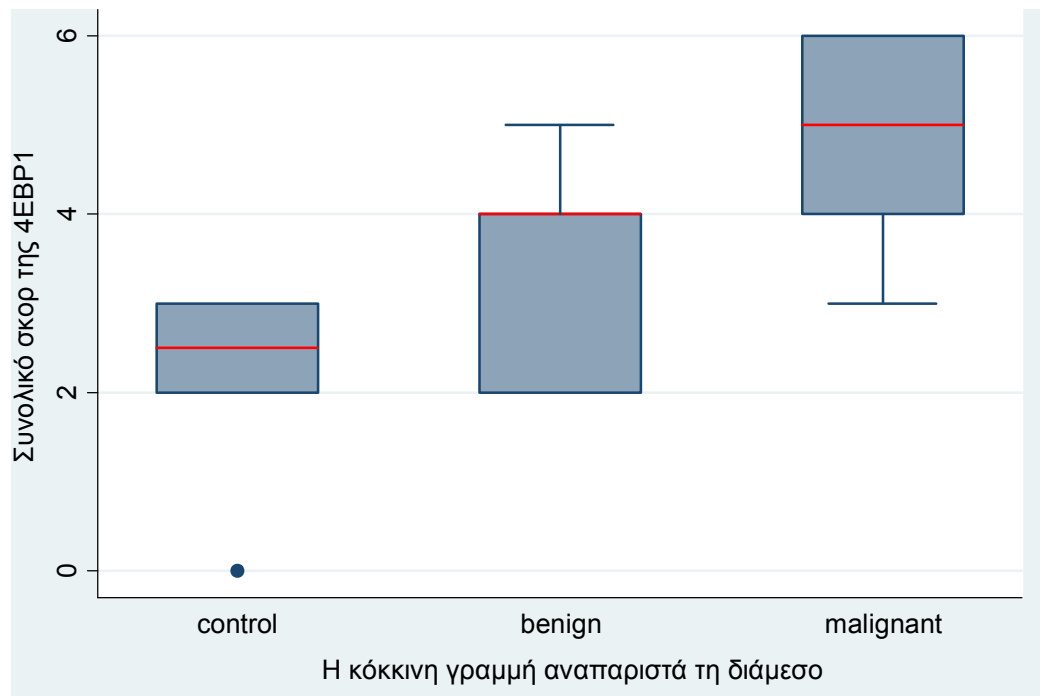
Γράφημα 8: Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το συνολικό άθροισμα της 4EBP1



Ιστόγραμμα 1: Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της 4EBP1 στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα καλοήγη και κακοήγη, νεοπλάσματα.



Ιστόγραμμα 2: Ιστόγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων της 4EBP1 στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα καλοήγη και κακοήγη, νεοπλάσματα.



Ιστόγραμμα 3: Ιστόγραμμα συνολικού αθροίσματος της 4EBP1 στην ομάδα ελέγχου καθώς και στα καλοήγη και κακοήγη, νεοπλάσματα

6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της p4EBP1 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η έκφραση της p4EBP1 υπήρξε θετική σε ποσοστό 97,4% (1 περίπτωση αδενοκαρκινώματος NOS είχε αρνητική έκφραση) με ποικιλομορφία σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p4EBP1 ήταν και κυτταροπλασματική και πυρηνική. (Εικ. 19 G-I)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στις περιπτώσεις θετικής έκφρασης της p4EBP1 το 66,67% (26/39) των περιπτώσεων εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50% (βαθμός 3). Σε ότι αφορά την ένταση της χρώσης παρατηρήθηκε έντονη χρώση στο 38,46% (15/39) των περιπτώσεων, μέτρια χρώση στο 30,77% (12/39) και ήπια μόλις στο 28,21% (11/39). Επίσης για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το 30,77% (12/39) των περιπτώσεων πήρε τη μέγιστη τιμή 6, το 28,21% (11/39) την τιμή 5 και το 23,08 (9/39) την τιμή 4. Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,59, για την ένταση της χρώσης ήταν 2,05 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,64. (Πίνακας 13,14)

Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος είχαν σε ποσοστό **40% θετικά κύτταρα της κατηγορίας 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και σε ποσοστό 60% θετικά κύτταρα της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,4. (Πίνακας 15)

Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης, παρατηρήθηκε σε ποσοστό **40% έντονη χρώση και συνολικό άθροισμα 6** καθώς και σε ποσοστό 60% ήπιας έντασης χρώση και συνολικό άθροισμα 3. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,8. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι 3/5 περιπτώσεις (**40%**) πήρε τη **μέγιστη τιμή 6** και το υπόλοιπο 60% την τιμή 3. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,2. (Πίνακας 15)

Στα αδеноκαρκινώματα NOS το **82% των περιπτώσεων παρουσίασε θετικά κύτταρα της κατηγορίας 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,7.

Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης παρατηρήθηκε ότι το **36,3%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **έντονη χρώση**, το 36,3% μέτρια χρώση και το 27,2% ήπια χρώση. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,1.

Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το 30% των περιπτώσεων πήρε την τιμή 6, το 40% την τιμή 4 και το υπόλοιπο 30% την τιμή 5. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 15)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα το 33% των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και το **67%** των περιπτώσεων στην κατηγορία 3 (**>50% ποσοστό θετικών κυττάρων**). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,7. Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης παρατηρήθηκε ότι το **55%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **έντονη χρώση**, το 33% μέτρια χρώση και το 11,1% ήπια χρώση. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,1. Τέλος για το συνολικό άθροισμα το 78% των περιπτώσεων έλαβε τις τιμές 6 (44,4%) και 5 (33,3%). Πιο συγκεκριμένα για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι μόνο 1 περίπτωση πήρε την τιμή 3, ενώ το

30% των περιπτώσεων πήρε τη μέγιστη τιμή 6 και το 40% την τιμή 4. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 15)

Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα το **60%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **ποσοστό θετικών κυττάρων >50%**. Η μέση τιμή για για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,6.

Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης το 50% παρουσίαζε μέτρια χρώση, το 20% ήπια και το **40% έντονη χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,1.

Για το συνολικό άθροισμα μόνο 1 περίπτωση πήρε την τιμή 3, ενώ το **30%** των περιπτώσεων τη **μέγιστη τιμή 6** και το 40% την τιμή 4. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,7. (Πίνακας 15)

Τέλος στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα παρατηρήθηκε στο **66,6% των περιπτώσεων ποσοστό θετικών κυττάρων >50%**. Η μέση τιμή για για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 3.

Αντίστοιχα όσον αφορά στην ένταση της χρώσης το **75%** των περιπτώσεων παρουσίασε **μέτριας έντασης χρώση** και το 25% ήπιας έντασης. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,3. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι 3/4 περιπτώσεις (**75%**) πήραν την **τιμή 5** και 1 περίπτωση την τιμή 6. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,25. (Πίνακας 15)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων τα αδενοκαρκινώματα NOS παρουσίασαν θετικά κύτταρα >50% στο 82% των περιπτώσεων και τα αδενοειδή κυστικά, έντονη έντασης χρώση στο 50% των περιπτώσεων.

Καλοήθη Νεοπλάσματα

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της p4EBP1 υπήρξε θετική σε ποσοστό 100% στα καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων (πλειόμορφα αδενώματα) αλλά σε μικρότερο βαθμό και ένταση συγκριτικά με τα κακοήθη νεοπλάσματα. Συγκεκριμένα το 69,2% των περιπτώσεων παρουσίασε ήπιας έντασης χρώση, και μόλις το 7,69% έντονη χρώση. Το 53,85% των περιπτώσεων εμφάνισε ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων), το 38,46% εμφάνισε ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων) και το 7,69% ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων στα καλοήθη νεοπλάσματα ήταν 1,69, η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,38 και η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 3,08. (Πίνακας 13,14)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες αδένες η έκφραση της p4EBP1 υπήρξε αρνητική στο 100% (8/8) των περιπτώσεων. (Πίνακας 13,14)

Πίνακας 13 : Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της p4EBP1 για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήγη, κακοήγη)

p4EBP1						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	8	100,00	0	0,00	1	2,56
Ήπια	0	0,00	9	69,23	11	28,21
Μέτρια	0	0,00	3	23,08	12	30,77
Έντονη	0	0,00	1	7,69	15	38,46
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Αρνητική		Ήπια		Μέτρια	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	8	100,00	0	0,00	1	2,56
<20%	0	0,00	5	38,46	1	2,56
20-50%	0	0,00	7	53,85	11	28,21
>50%	0	0,00	1	7,69	26	66,67
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0%		20-50%		>50%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	8	100,00	0	0,00	1	2,56
2	0	0,00	5	38,46	0	0,00
3	0	0,00	4	30,77	6	15,38
4	0	0,00	2	15,38	9	23,08
5	0	0,00	2	15,38	11	28,21
6	0	0,00	0	0,00	12	30,77
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0		3		5	

Πίνακας 14. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για p4EBP1.

p4EBP1	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλόγη (A = 13)	Κακοήγη (A = 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	0 (0,0%)	13 (100,0%)	38 (97,4%)
Ένταση Χρώσης - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	1,38 (±0,65)	2,05 (±0,89)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	1,69 (±0,63)	2,59 (±0,68)
Συνολικό Άθροισμα - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	3,08 (±1,12)	4,64 (±1,31)

Πίνακας 15. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της p4EBP1 στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων.

p4EBP1		A, % Θετικών Περιπτώσεων	Διάμεσος Έντασης Χρώσης	Διάμεσος Ποσοστού Θετικών Κυττάρων	Διάμεσος Συνολικού Άθροισματος
Κακοήγη Νεοπλάσματα		38/39, 97,5%	2	3	5
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	5/5, 100%	1	2	3
	Αδενοκαρκίνωμα NOS	9/10, 90%	2	3	5
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	3	3	5
	Βλεννοεπιδερμοειδές	10/10, 100%	2	3	4.5
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	4/4, 100%	2	3	5
	Εκ διαυγών κυττάρων	1/1, 100%	1	3	4

Στατιστική Αξιολόγηση

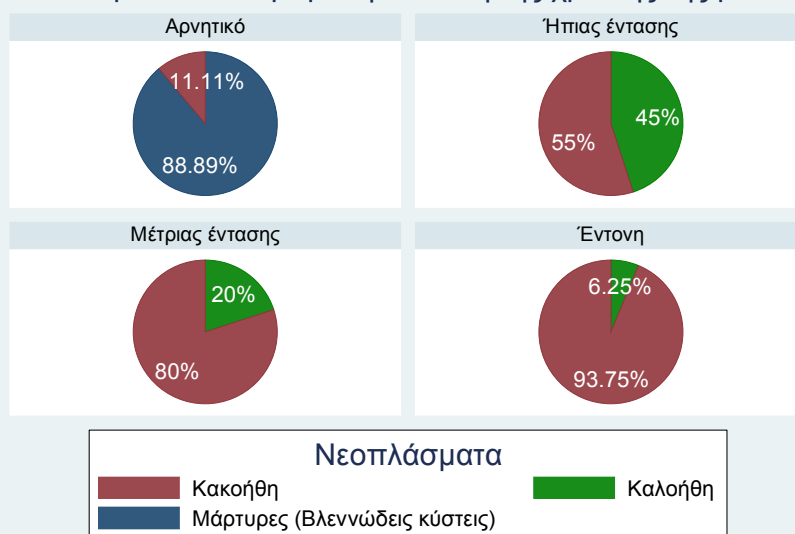
Ο στατιστικός έλεγχος για την p4EBP1 απέδειξε ότι, οι διαφορές στο ποσοστό θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,01 < 0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$) μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων, όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$ αντίστοιχα), και τέλος μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,001 < 0,05$ αντίστοιχα), ήταν στατιστικά σημαντική. (Πίνακας 16, Γράφημα 9,10,11, Ιστόγραμμα 4,5,6).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,8 > 0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,4 > 0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,58 > 0,05$) στους διάφορους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. (Πίνακας 12)

**Πίνακας 16 : Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test
(Mann-Whitney U test) για p4EBP1**

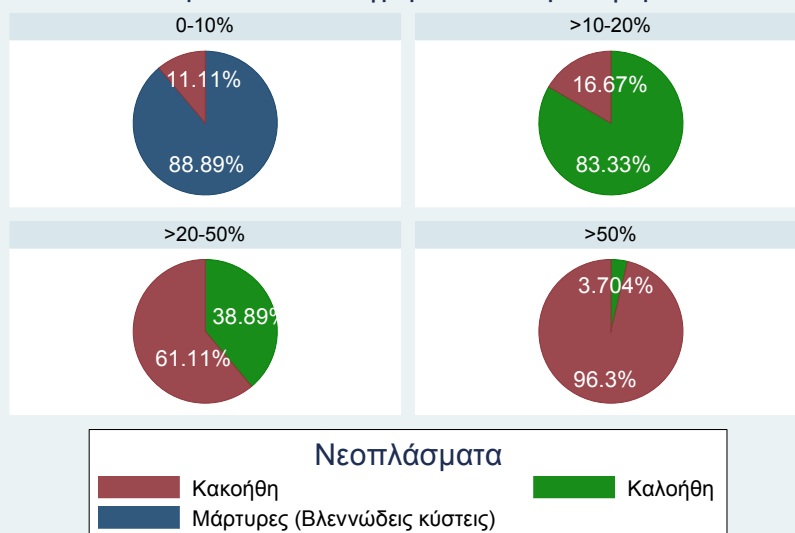
p4EBP1		Mann-Whitney-Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήθη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήθη		Καλοήθη vs Κακοήθη	
		Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value
	Ένταση Χρώσης	-4,049	<0,001	-4,458	<0,001	-2,452	0,0142
	% Θετικών Κυττάρων	-3,978	<0,001	-4,777	<0,001	-3,915	<0,001
	Συνολικό Άθροισμα	-3,916	<0,001	-4,403	<0,001	-3,601	<0,001

Νεοπλάσματα ανάλογα με την ένταση της χρώσης της p4EBP1

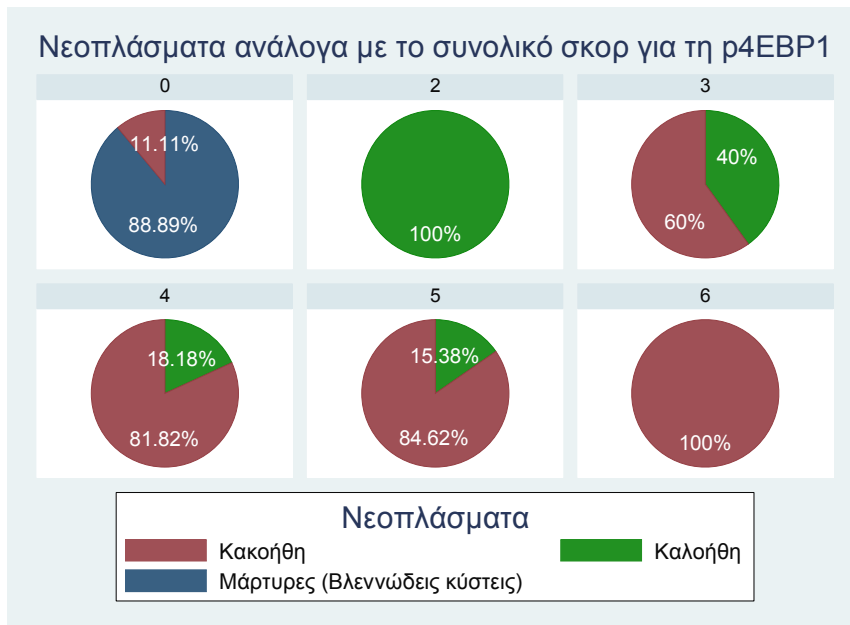


Γράφημα 9: Πιθανότητα Νεοπλάσματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της p4EBP1

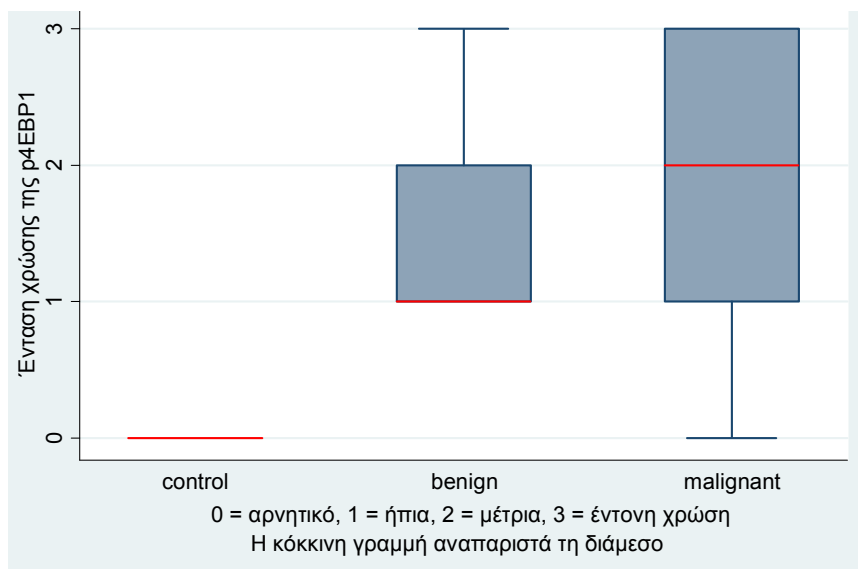
Νεοπλάσματα ανά κατηγορία % PC για την p4EBP1



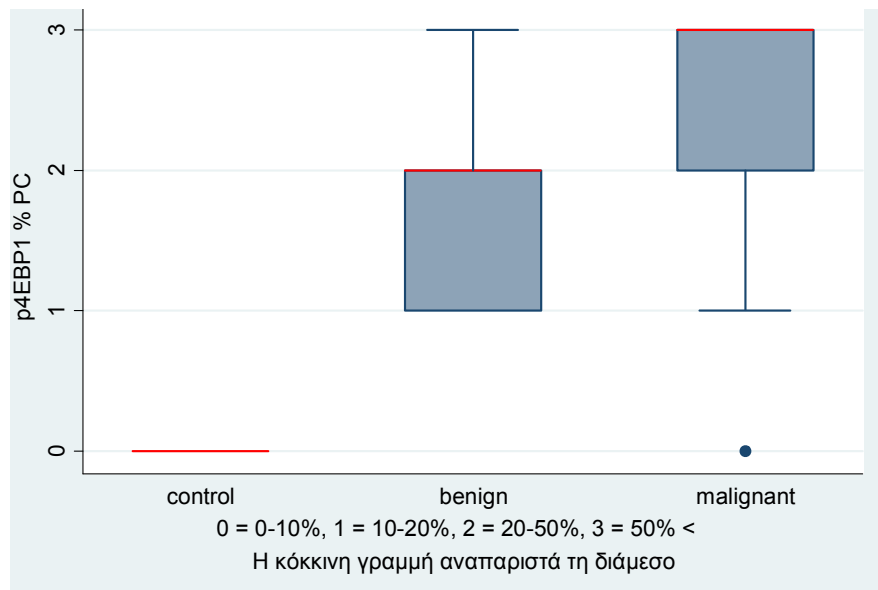
Γράφημα 10: Πιθανότητα Νεοπλάσματος ανάλογα με το ποσοστό θετικών κυττάρων της p4EBP1



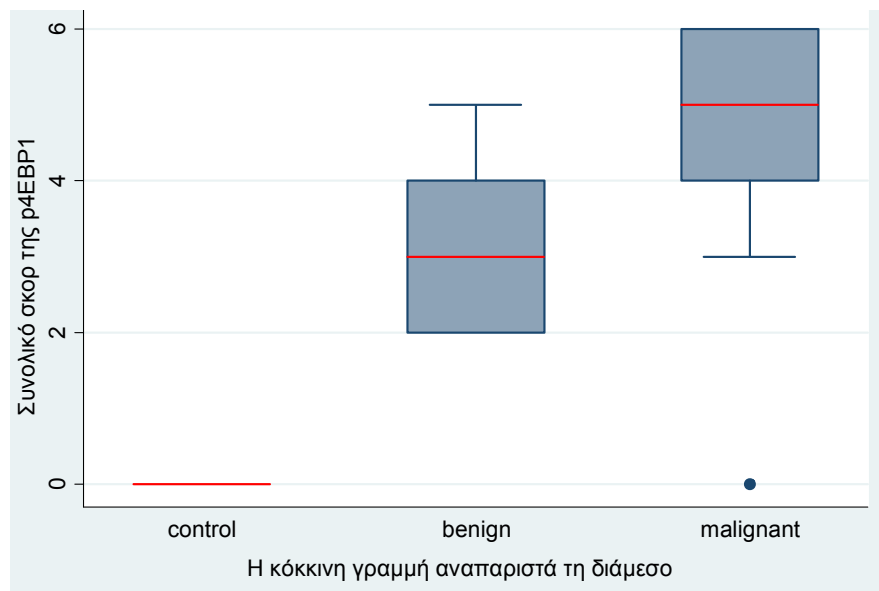
Γράφημα 11: Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το συνολικό άθροισμα της p4EBP1



Ιστόγραμμα 4: Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της p4EBP1 κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 5: Ιστόγραμμα του ποσοστού θετικών κυττάρων της p4EBP1 στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 6: Ιστόγραμμα του συνολικού αθροίσματος της p4EBP1 στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.

7. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της S6 υπήρξε θετική σε ποσοστό 100%, με ποικίλη έκφραση σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 ήταν κυτταροπλασματική. (Εικ.20 Α- C)

Το **54,76% (23/39) των περιπτώσεων των κακοήθων νεοπλασμάτων εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50%, το 76,19% των περιπτώσεων (32/39) εμφάνισε έντονη και μέτρια χρώση και τέλος το 54,76% (23/39) των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στα υψηλότερα επίπεδα του συνολικού άθροισμα (5,6).** Επίσης η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων στα κακοήθη νεοπλάσματα ήταν 2,46, η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,15 και η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,62. (Πίνακας 17, 18)

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος έχουν υψηλό ποσοστό θετικών κυττάρων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι 2/5 περιπτώσεις **(40%) ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων), 2/5 περιπτώσεις **(40%) ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 1 μόνο περίπτωση (20%) ταξινομήθηκε στην κατηγορία 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,2. Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης παρατηρήθηκε ότι μόνο 1

περίπτωση παρουσίασε ήπια χρώση, ενώ το **40%** των περιπτώσεων παρουσίασε **έντονη έντασης χρώση** και **μέτριας** έντασης χρώση το υπόλοιπο 40%. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,2. Επίσης για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι 2/5 περιπτώσεις (**40%**) πήραν τη **μέγιστη τιμή (6)**, το υπόλοιπο 40% πήρε τιμή 4 και μόνο σε 1 περίπτωση (20%) παρατηρήθηκε η τιμή 2. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,4. (Πίνακας 19)

Στα αδενοκαρκινώματα NOS παρατηρήθηκαν 5/10 περιπτώσεις (**50%**) στην κατηγορία 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων), και 4/10 περιπτώσεις (**40 %**) στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,4. Αντίστοιχα για την ένταση της χρώσης στο **40%** των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **έντονη χρώση** (3), στο **40%** των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **μέτρια χρώση** (2). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,2.

Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι μια μόνο περίπτωση έλαβε τη χαμηλότερη τιμή 2, 3/10 περιπτώσεις (30%) έλαβαν την υψηλότερη τιμή 6, 3/10 περιπτώσεις (30%) την τιμή 5 και 2/10 περιπτώσεις (20%) την τιμή 4. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,6. (Πίνακας 19)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα το 33,3% των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και **55,5%** των περιπτώσεων στην κατηγορία 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,4. Επίσης το **44,4%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **έντονη χρώση** και το **33% ήπια χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,1. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το **44,4%** πήρε τη **μέγιστη τιμή (6)**, ενώ από μια περίπτωση παρατηρήθηκε για τις τιμές 5, 4, και 3 ,2, αντίστοιχα. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,5. (Πίνακας 19)

Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα το **60%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **ποσοστό θετικών κυττάρων >50%** . Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,6

Επίσης το **60%** των περιπτώσεων παρουσίαζε **έντονη έντασης χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,2.

Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το 3/10 περιπτώσεις (30%) πήρε τιμή 5, το **30%** πήρε τη **μέγιστη τιμή 6**, το 30% των περιπτώσεων πήρε τιμή 4. **Και μια περίπτωση την τιμή 3**. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 19)

Τέλος στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα παρατηρήθηκε στο **75% των περιπτώσεων ποσοστό θετικών κυττάρων > 50%**. Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,8.

Επίσης στο **50%** των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **έντονη χρώση** και μέτριας και ήπιας έντασης χρώση στο υπόλοιπο (25%). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,25. Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το **50%** πήρε τη **μέγιστη τιμή 6** και το υπόλοιπο 50% την τιμή 4. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,05. Πίνακας 19)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων τα αδενοειδή κυστικά, τα βλεννοεπιδερμοειδή και τα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα έλαβαν το υψηλότερο συνολικό άθροισμα. (Πίνακας 19)

Καλοήγη Νεοπλάσματα

Η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της S6 υπήρξε θετική σε ποσοστό 100% και στα καλοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων (πλειόμορφα αδενώματα). Το **69.23%** (9/13) των περιπτώσεων παρουσίασε **μέτριας έντασης χρώση** . Επίσης το **61,54%** εμφάνισε

ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων), και τέλος για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε στο **46,15%** των περιπτώσεων τιμή 4.

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,54 για την ένταση της χρώσης ήταν 1,77 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 3,31. (Πίνακας 17,18)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες αδένες η έκφραση της S6 υπήρξε θετική σε ποσοστό 37,5% (3/8). Η αξιολόγηση της έντασης της χρώσης ήταν ήπια ενώ το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν <20% Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 0,63 για την ένταση της χρώσης ήταν 0,50 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 1,13. (Πίνακας 17, 18)

Πίνακας 17 . Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της S6 για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήθη, κακοήθη)

S6						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	5	62,50	1	7,69	0	0,00
Ήπια	2	25,00	2	15,38	9	23,07
Μέτρια	1	12,50	9	69,23	15	38,46
Έντονη	0	0,00	1	7,69	15	38,46
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Αρνητική		Μέτρια		Μέτρια	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	5	62,50	1	7,69	0	0,00
<20%	1	12,50	4	30,77	3	7,69
20-50%	2	25,00	8	61,54	15	38,46
>50%	0	0,00	0	0,00	21	53,84
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0%		20-50%		>50%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	5	62,50	1	7,69	0	0,00
2	1	12,50	1	7,69	3	7,69
3	1	12,50	4	30,77	5	12,82
4	1	12,50	6	46,15	10	25,64
5	0	0,00	1	7,69	7	17,94
6	0	0,00	0	0,00	14	35,89
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0		4		5	

Πίνακας 18. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της S6 στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων.

S6	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλοήγη (A = 13)	Κακοήγη A = 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	3 (37,5%)	12 (92,3%)	39 (100,0%)
Ένταση χρώσης - MT (±SD)	0,50 (±0,76)	1,77 (±0,73)	2,15 (±0,78)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - MT (±SD)	0,63 (±0,92)	1,54 (±0,66)	2,46 (±0,64)
Συνολικό Άθροισμα - MT (±SD)	1,13 (±1,64)	3,31 (±1,25)	4,62 (±1,31)

Πίνακας 19. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για S6

S6		A, % Θετικών Περιπτώσεων	Διάμεσος Έντασης Χρώσης	Διάμεσος Ποσοστού Θετικών Κυττάρων	Διάμεσος Συνολικού Άθροισματος
Κακοήγη Νεοπλάσματα		39/39, 100%	2	3	5
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	5/5, 100%	2	2	4
	Αδενοκαρκίνωμα NOS	10/10, 100%	2	2,5	5
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	2	3	5
	Βλεννοεπιδερμοειδές	10/10, 100%	2	3	5
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	4/4, 100%	2,5	3	5
	Διαυγοκυτταρικό	1/1, 100%	1	2	3

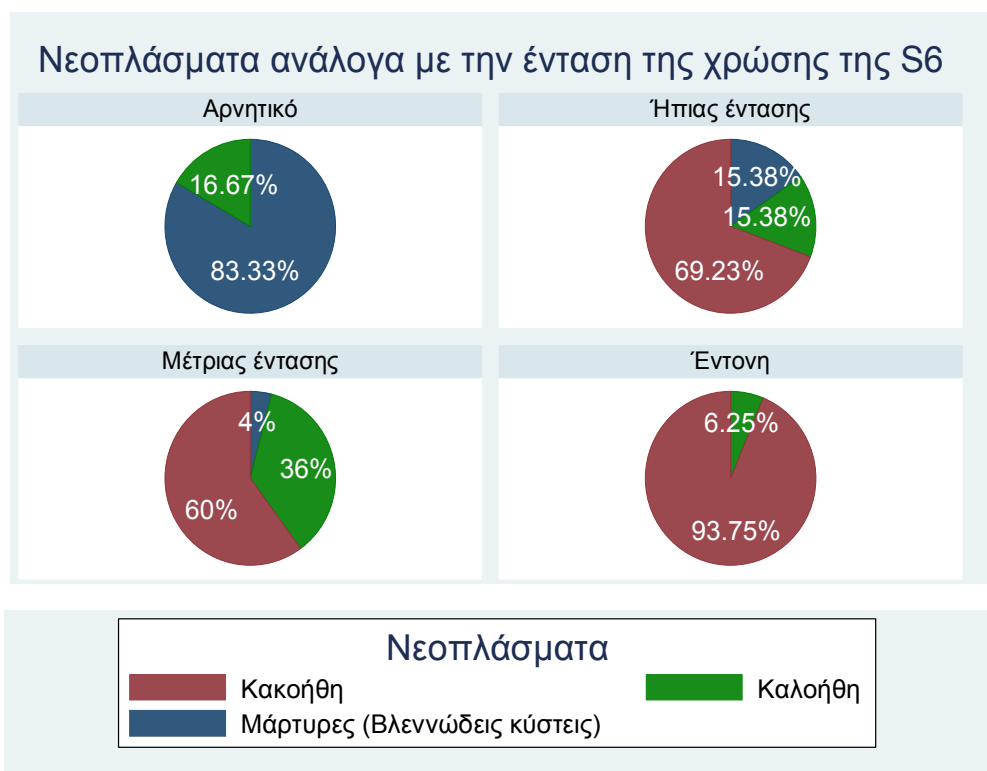
Στατιστική Αξιολόγηση

Ο στατιστικός έλεγχος για την S6, απέδειξε ότι οι διαφορές στην ένταση της χρώσης μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}=0,14>0,05$). Σε αντίθεση όμως οι διαφορές στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,001<0,05$) και συνολικού άθροισμα ($p\text{-value}=0,004<0,05$) μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης οι διαφορές στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,001<0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,001<0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,001<0,05$) μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}=0,000<0,05$) όπως επίσης και μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων σε ότι αφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,02<0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,003<0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,008<0,05$). (Πίνακας 20, Γράφημα 12,13,14, Ιστόγραμμα 7,8,9)

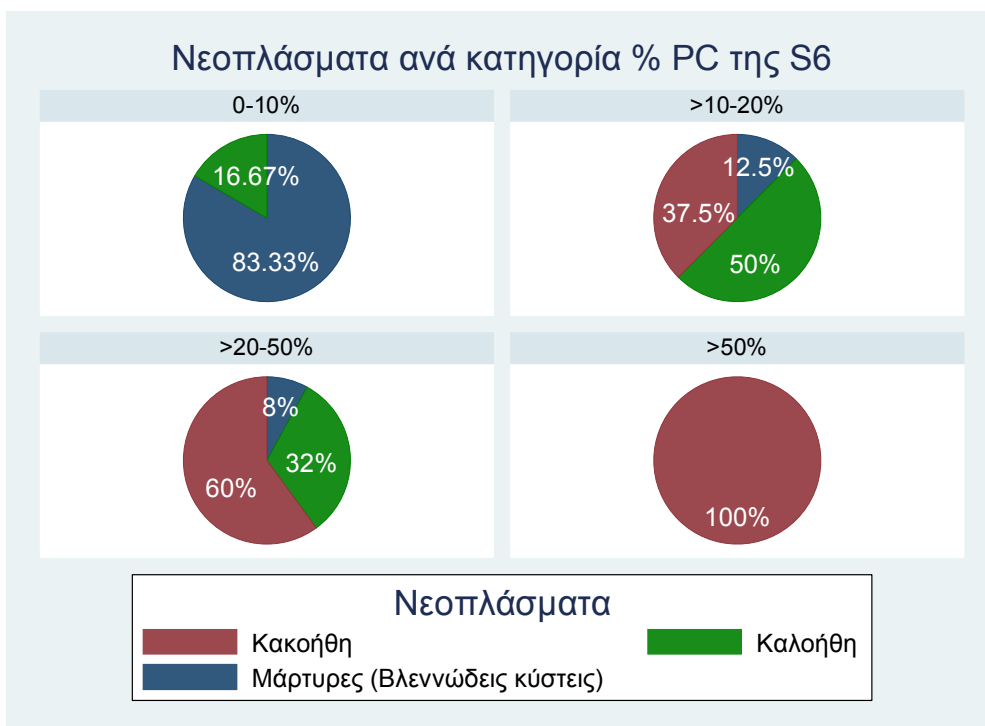
Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων μεταξύ των ιστολογικών τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. (Πίνακας 12)

**Πίνακας 20. Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test
(Mann-Whitney U test) για S6**

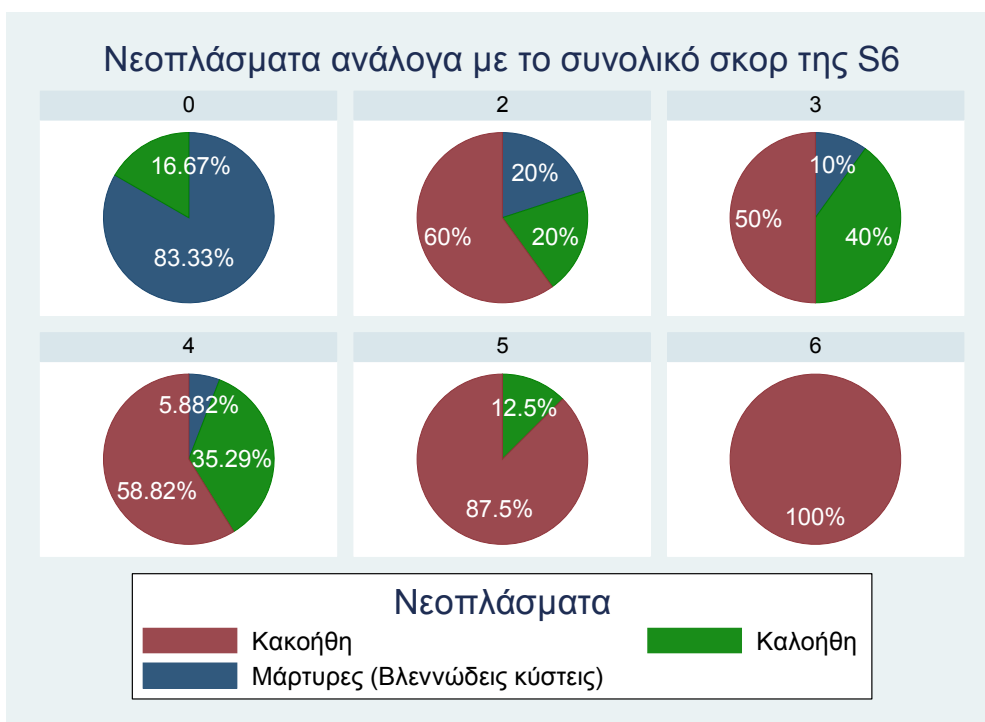
S6		Mann-Whitney-Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήγη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήγη		Καλοήγη vs Κακοήγη	
		Z-statistic	p-value	Z-statistic	p-value	Z-statistic	p-value
	Ένταση Χρώσης	-2,961	0,0031	-3,863	<0,001	-1,467	0,1424
	% Θετικών Κυττάρων	-2,229	0,0258	-4,070	<0,001	-3,758	<0,001
	Συνολικό Άθροισμα	-2,632	0,0085	-3,942	<0,001	-2,841	0,0045



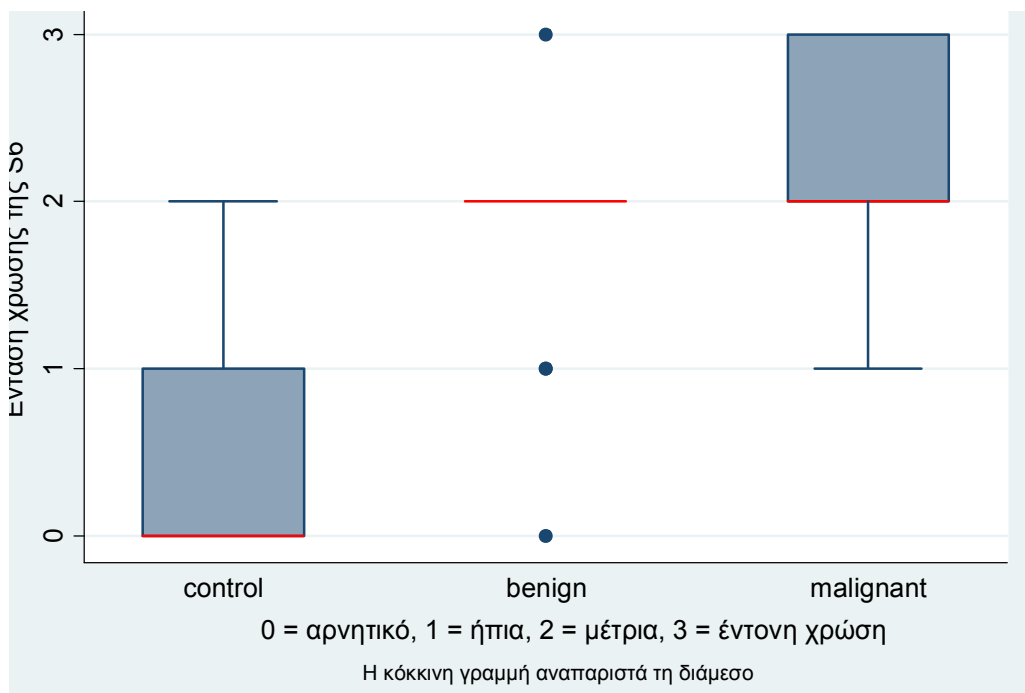
Γράφημα 12. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της S6



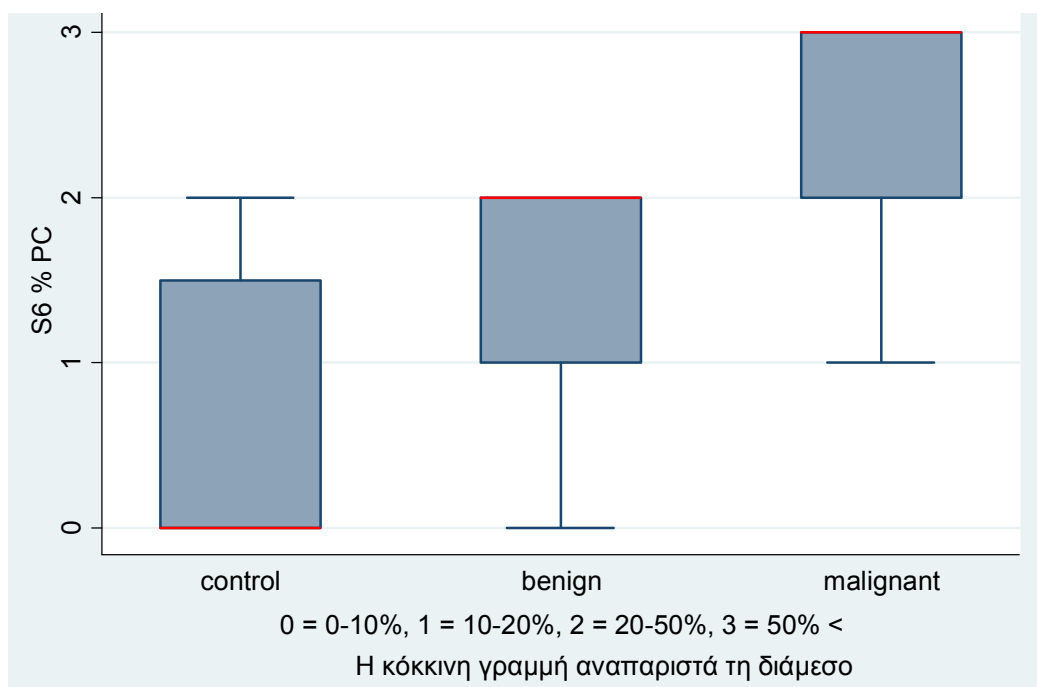
Γράφημα 13. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων της S6



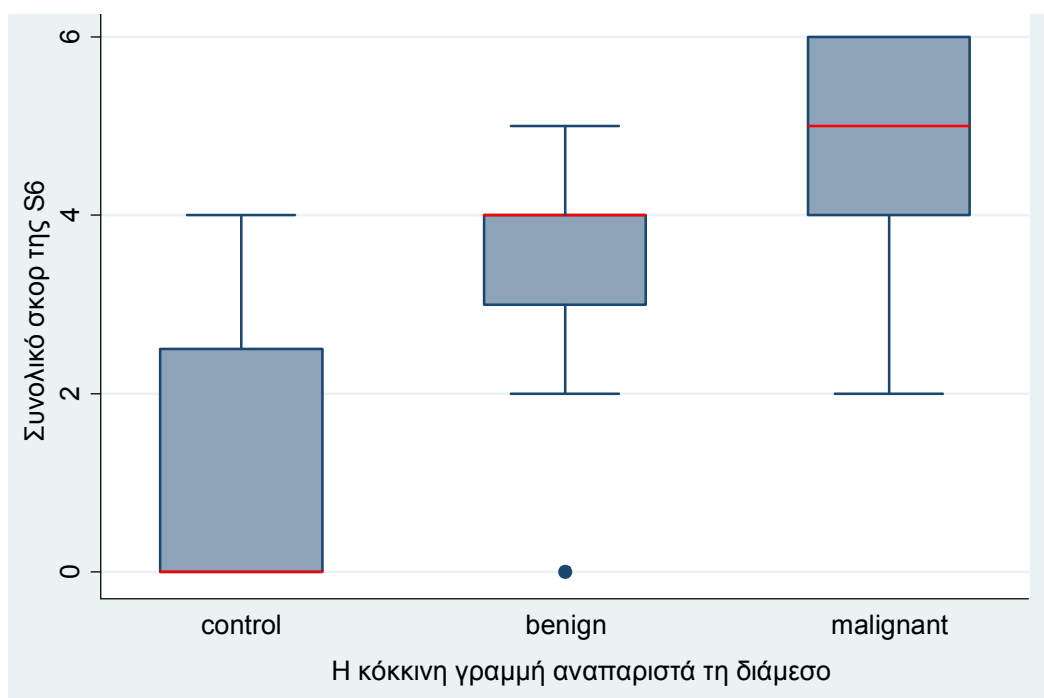
Γράφημα 14. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το συνολικό άθροισμα της S6



Ιστόγραμμα 7. Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της S6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 8: Ιστόγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων της S6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 9. Ιστόγραμμα συνολικού αθροίσματος της S6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.

8. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της pS6 στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της pS6 υπήρξε θετική σε ποσοστό 95%, (37/39) με ποικίλη έκφραση σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Παρατηρήθηκαν 2 περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων NOS με αρνητική έκφραση της pS6.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pS6 ήταν κυτταροπλασματική. (Εικ. 20 D-F)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι 20/39 περιπτώσεις δηλαδή το **51,28% των περιπτώσεων των κακοήθων νεοπλασμάτων**

εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50%, το 87,45% των περιπτώσεων (34/39) εμφάνισε έντονη και μέτριας έντασης χρώση (46% των περιπτώσεων εμφάνισε έντονη χρώση και 41,03% των περιπτώσεων μέτρια χρώση) και τέλος το **56,41% των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στα υψηλότερα επίπεδα του συνολικού άθροισμα** (το 41,03% σε άθροισμα 6, και 15,38% σε άθροισμα 5). Επίσης η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,31, η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,28 και η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,59. (Πίνακας 21, 22)

Παρατηρήθηκε ότι τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος παρουσίαζαν υψηλής έντασης χρώση. Συγκεκριμένα 3/5 περιπτώσεις δηλαδή το **60%** των περιπτώσεων παρουσίασε **έντονη χρώση** και το υπόλοιπο **40% μέτριας** έντασης χρώση. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,6.

Σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι 4/5 περιπτώσεις (**80%**) **ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 1 μόνο περίπτωση (**20%**) **ταξινομήθηκε στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,2.

Επίσης για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε, σε 1 περίπτωση (20%) η μέγιστη τιμή 6, σε 2/5 περιπτώσεις (40%) η τιμή 5, και στο υπόλοιπο 40% η τιμή 4. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 23)

Στα αδενοκαρκινώματα NOS παρατηρήθηκε ίδια κατανομή στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και στην ένταση της χρώσης. Στο **50%** (5/10) των περιπτώσεων παρατηρήθηκε **ένταση χρώσης 3 (έντονη) και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων)**, σε 1/10 περιπτώσεις (10%) παρατηρήθηκε μέτρια χρώση (2) και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων), σε 2/10 περιπτώσεις (20%) παρατηρήθηκε ήπια

χρώση (1) και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων) και τέλος και υπήρξαν και 2 περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε αρνητική έκφραση της pS6.

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,9 για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν επίσης 1,9 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 3,8. (Πίνακας 23)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα παρατηρήθηκε ότι 3/9 περιπτώσεις **(33.3%)** εμφάνισαν **έντονη χρώση** και μέτριας έντασης χρώση το υπόλοιπο 66.7%. Επίσης 6/9 περιπτώσεις **(66.7%)** εμφάνισαν **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων), και 2/9 περιπτώσεις **(22.2%)** εμφάνισαν **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,55, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,33 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,88. (Πίνακας 23)

Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα παρατηρήθηκε ότι 5/10 περιπτώσεις **(50%)** εμφάνισαν **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων), το 40% των περιπτώσεων εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 1 περίπτωση εμφάνισε ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων). Σε ό,τι αφορά την ένταση της χρώσης 6/10 περιπτώσεις **(60%)** εμφάνισαν **μέτριας έντασης χρώση** και το υπόλοιπο **40% έντονης έντασης χρώση**. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,4 αντίστοιχα και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 23)

Τέλος, όσον αφορά στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα στο **75%** των περιπτώσεων (3/4) παρατηρήθηκε **έντονη χρώση (3)** και **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3**

(>50% ποσοστό θετικών κυττάρων), ενώ σε 1/4 περίπτωση παρατηρήθηκε μέτριας έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2.

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,75 αντίστοιχα και για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,5. (Πίνακας 23)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων τα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα έλαβαν το υψηλότερο συνολικό άθροισμα και ακολουθούν τα αδενοειδή κυστικά, τα αδενοκαρκινώματα NOS και τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος.

Καλοήγη Νεοπλάσματα

Η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της pS6 υπήρξε θετική σε ποσοστό 76,9% και στα καλοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων (παρατηρήθηκαν 3/13 περιπτώσεις όπου η έκφραση της pS6 ήταν αρνητική).

Παρατηρήθηκε ότι 8/13 περιπτώσεις (61,54%) εμφάνισαν ήπιας έντασης χρώση και 2/13 (15,38%) εμφάνισαν μέτριας έντασης χρώση. Σχετικά με το ποσοστό θετικών κυττάρων 9/13 περιπτώσεις (69,23%), εμφάνισαν < 20% θετικά κύτταρα (τιμή 1). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 0,91 για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 0,75 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 1,66. (Πίνακας 21, 22)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες αδένες η έκφραση της pS6 υπήρξε αρνητική σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις (100%). (Πίνακας 21, 22)

Πίνακας 21. Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της pS6 για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήθη, κακοήθη)

pS6						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	8	100,00	3	23,08	2	5,13
Ήπια	0	00,00	8	61,54	3	7,69
Μέτρια	0	00,00	2	15,38	16	41,03
Έντονη	0	0,00	0	0,00	18	46,15
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Αρνητική		Ήπια		Μέτρια	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	8	100,00	3	23,08	2	5,13
<20%	0	00,00	9	69,23	4	10,26
20-50%	0	00,00	1	7,69	13	33,33
>50%	0	0,00	0	0,00	20	51,28
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0%		<20%		>50%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	8	100,00	3	23,08	2	5,13
2	0	00,00	8	61,54	2	5,13
3	0	00,00	1	7,69	3	7,69
4	0	00,00	1	7,69	10	25,64
5	0	00,00	0	0,00	6	15,38
6	0	0,00	0	0,00	16	41,03
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0		2		5	

Πίνακας 22. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για pS6.

pS6	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλοήγη (A = 13)	Κακοήγη (A = 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	0 (0,0%)	10 (76,9%)	37 (94,9%)
Ένταση Χρώσης - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	0,92 (±0,64)	2,28 (±0,83)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	0,85 (±0,55)	2,31 (±0,86)
Συνολικό Άθροισμα - MT (±SD)	0,00 (±0,00)	1,77 (±1,17)	4,59 (±1,62)

Πίνακας 23. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της pS6 στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων.

pS6		A, % Θετικών Περιπτώσεων	Διάμεσος Έντασης Χρώσης	Διάμεσος Ποσοστού Θετικών Κυττάρων	Διάμεσος Συνολικού Αθροίσματος
Κακοήγη Νεοπλάσματα		37/39, 94.9%	2	3	5
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	5/5, 100%	3	2	5
	Αδενοκαρκίνωμα NOS	8/10, 80%	2,5	2,5	5
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	2	3	5
	Βλεννοεπιδερμοειδές	10/10, 100%	2	2,5	4,5
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	4/4, 100%	3	3	6
	Διαυγοκυτταρικό	1/1, 100%	1	2	3

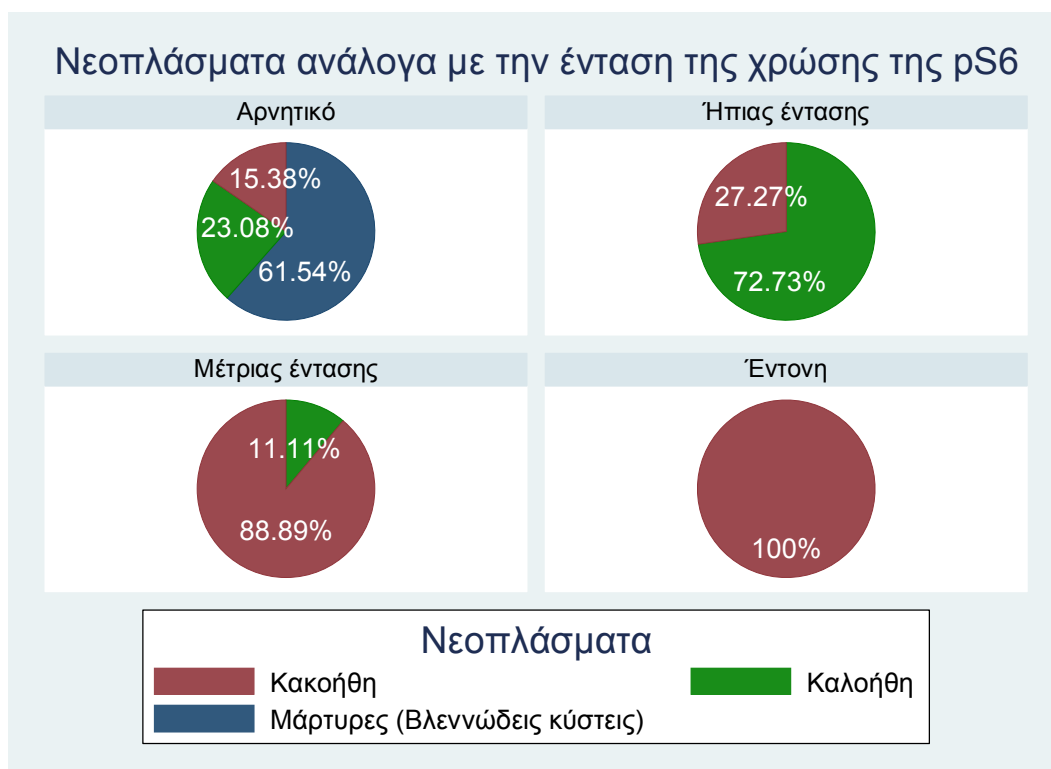
Στατιστική Αξιολόγηση

Ο στατιστικός έλεγχος για την pS6, απέδειξε ότι οι διαφορές στο ποσοστό θετικών κυττάρων, στην ένταση της χρώσης και στο συνολικό άθροισμα μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων είναι στατιστικά σημαντικές ($p\text{-value}=0,001<0,05$ αντίστοιχα) όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,001<0,05$ αντίστοιχα), καθώς και μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,001<0,05$ αντίστοιχα). (Πίνακας 24, Γράφημα 15,16,17, Ιστόγραμμα 10,11,12)

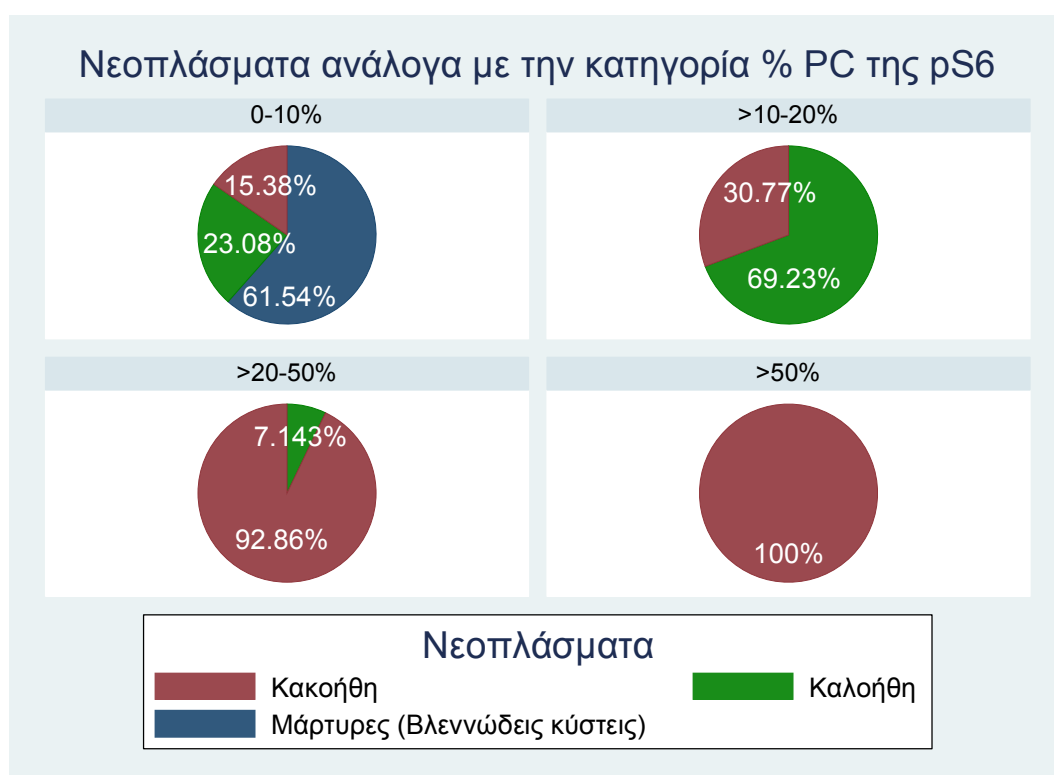
Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων μεταξύ των ιστολογικών τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,69>0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,52>0,05$), καθώς και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,65>0,05$). (Πίνακας 12)

**Πίνακας 24. Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test
(Mann-Whitney U test) για pS6**

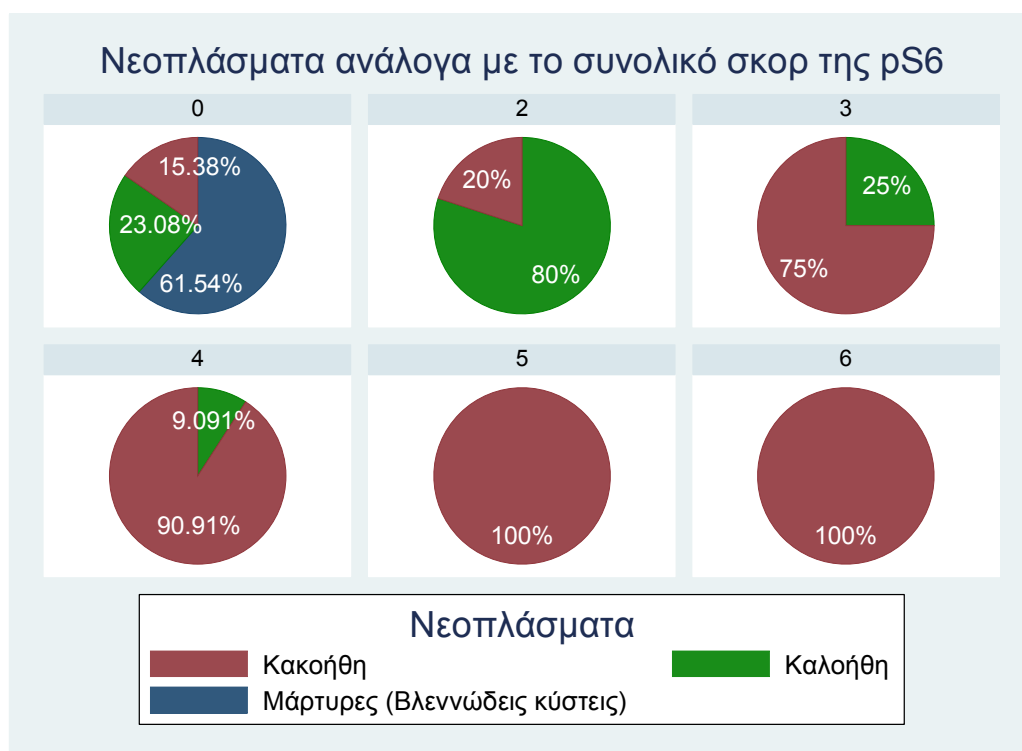
pS6		Mann- Whitney- Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήθη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήθη		Καλοήθη vs Κακοήθη	
		Z- statistic	p- value	Z- statistic	p- value	Z- statistic	p- value
	Ένταση Χρώσης	-3,235	0,0012	-4,429	<0,001	-4,360	<0,001
	% Θετικών Κυττάρων	-3,282	0,0010	-4,436	<0,001	-4,481	<0,001
	Συνολικό Άθροισμα	-3,234	0,0012	-4,323	<0,001	-4,527	<0,001



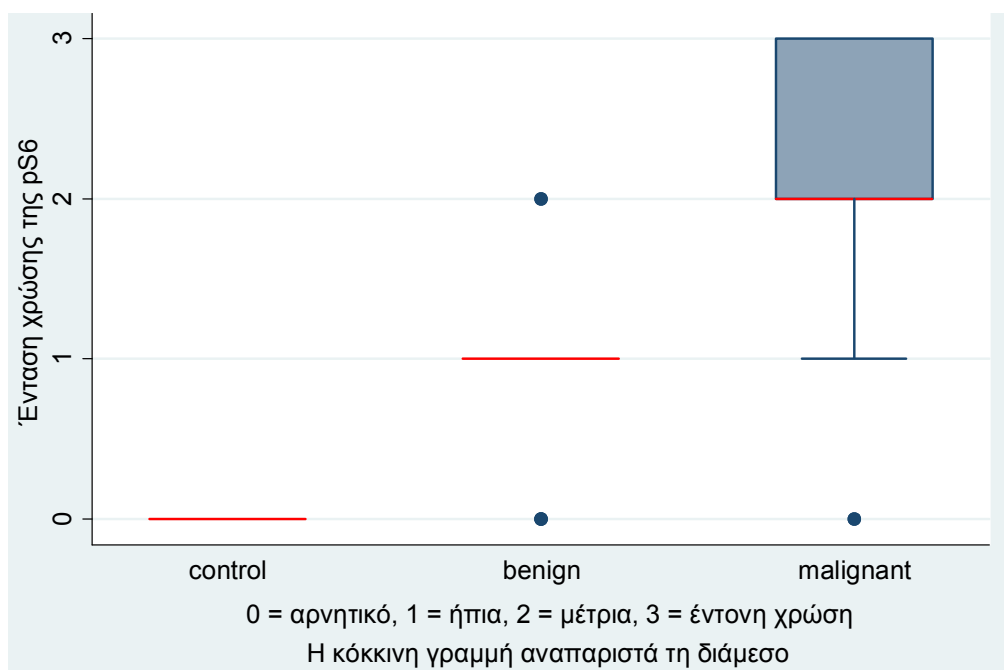
Γράφημα 15. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της pS6



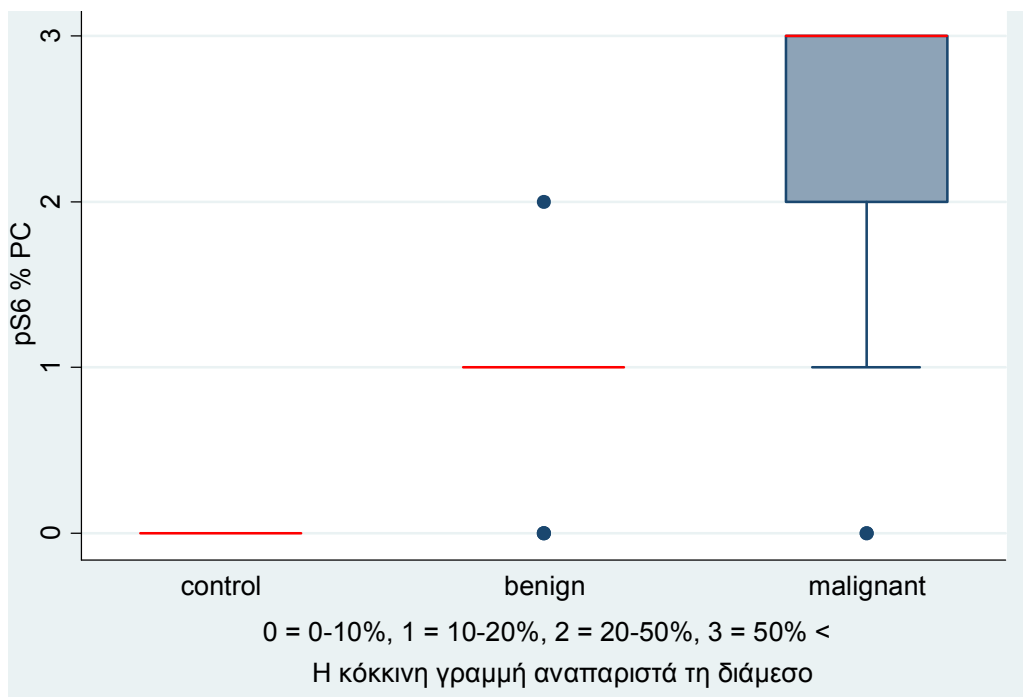
Γράφημα 16. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το ποσοστό θετικών κυττάρων της pS6



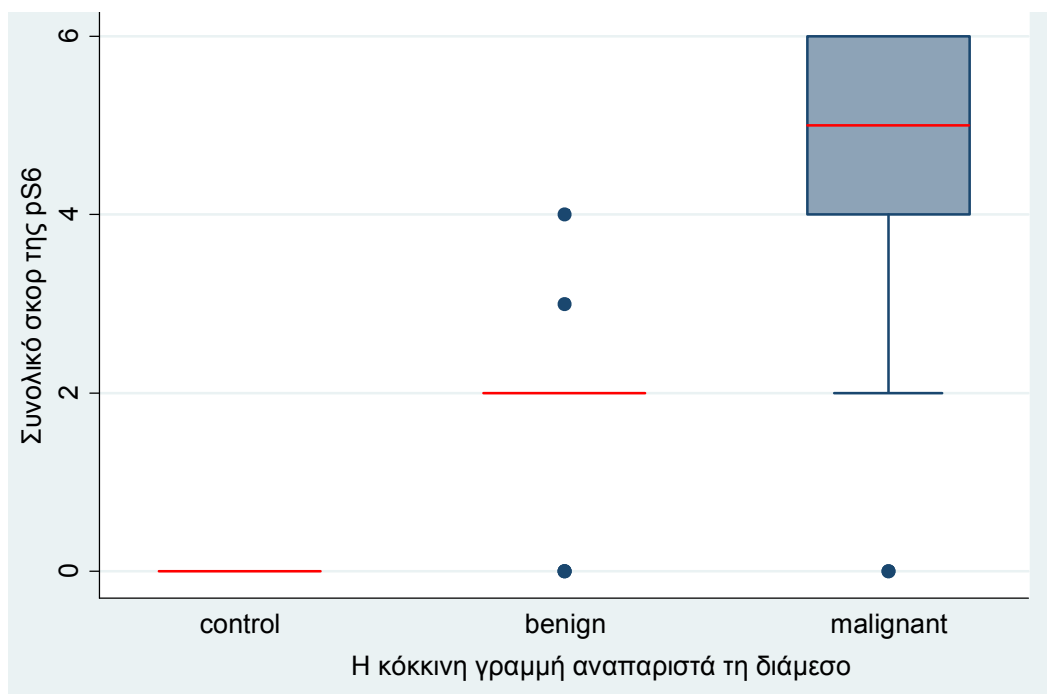
Γράφημα 17. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το συνολικό άθροισμα της pS6



Ιστόγραμμα 10. Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της pS6 στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 11. Ιστόγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων της pS6 στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου



Ιστόγραμμα 12. Ιστόγραμμα του συνολικού αθροίσματος της pS6 στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.

9. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της pAKT υπήρξε θετική σε ποσοστό 100%, με ποικίλη έκφραση σε ό,τι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT ήταν κυρίως κυτταροπλασματική. (Εικ. 19 A-C)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι 21/39 περιπτώσεις δηλαδή το **53,8% των περιπτώσεων των κακοήθων νεοπλασμάτων εμφάνισαν έντονη χρώση** και 30/39 περιπτώσεις δηλαδή το **76,9% εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50%**, ενώ τέλος το **74,3% των περιπτώσεων ταξινομήθηκε στα υψηλότερα επίπεδα του συνολικού άθροισμα** (53,8% σε άθροισμα 6, και 20,5% σε άθροισμα 5). Επίσης η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων στα κακοήθη νεοπλάσματα ήταν 2,69, η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,38 και η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,08. (Πίνακας 25, 26)

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος παρουσίαζαν υψηλό ποσοστό θετικών κυττάρων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι 4/5 περιπτώσεις (**80%**) **ταξινομήθηκαν στην κατηγορία 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων) και 1 μόνο περίπτωση (**20%**) ταξινομήθηκε στην κατηγορία 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,8.

Σε ότι αφορά την ένταση της χρώσης, 3/5 περιπτώσεις (**60%**) παρουσίασαν **μέτριας έντασης χρώση**, 1/5 (**20%**) περιπτώσεις παρουσίασε **έντονης** έντασης χρώση και ήπιας έντασης χρώση άλλη 1/5 περιπτώσεις. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2. Επίσης για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε, σε 1 περίπτωση (**20%**) η μέγιστη τιμή **6**, ενώ σε 3/5 περιπτώσεις (**60%**) παρατηρήθηκε η τιμή **5**, και στο υπόλοιπο **20%** η τιμή **3**. Η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,8. (Πίνακας 27)

Στα αδενοκαρκινώματα NOS παρατηρήθηκε παρόμοια κατανομή στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και στην ένταση της χρώσης. Στο **50%** των περιπτώσεων των αδενοκαρκινωμάτων NOS (5/10) παρατηρήθηκε **ένταση χρώσης 3 (έντονη)** και στο **60%** (6/10) **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων)**. Σε 3/10 περιπτώσεις (30%) παρατηρήθηκε μέτρια χρώση (2), σε 2/10 περιπτώσεις (20%) ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων), και τέλος σε 2/10 περιπτώσεις (20%) παρατηρήθηκε ήπια χρώση (1) και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,3 για το ποσοστό των θετικών κυττάρων επίσης 2,4 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,7. (Πίνακας 27)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα παρατηρήθηκε ότι 6/9 περιπτώσεις (**66,7%**) εμφάνισαν **έντονη χρώση** ενώ μέτριας έντασης χρώση εμφάνισαν το 22,2%. Επίσης 8/9 περιπτώσεις (**88,9%**) εμφάνισαν **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων)** και μόνο 1 περίπτωση εμφάνισε **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων)**.

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,55, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,77 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,32. (Πίνακας 27)

Στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα παρατηρήθηκε ότι 7/10 περιπτώσεις (**70%**) εμφάνισαν **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων)**, και το 30% των περιπτώσεων εμφάνισαν ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Σε ό,τι αφορά την ένταση της χρώσης 6/10 περιπτώσεις (**60%**) εμφάνισαν **έντονη χρώση (3)** το 30% μέτριας έντασης χρώση και το υπόλοιπο 10% ήπιας έντασης χρώση. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,5, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,7 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,2. (Πίνακας 27)

Ενώ τέλος όσον αφορά στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα στο **75%** των περιπτώσεων (3/4) παρατηρήθηκε **έντονη χρώση (3)** και σε 1 περίπτωση (25%) παρατηρήθηκε μέτριας έντασης χρώση. Στο **100%** των περιπτώσεων (4/4) παρατηρήθηκε **ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων)**,

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,75, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 3 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 5,75. (Πίνακας 27)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων τα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδενοκαρκινώματα, τα αδενοειδή κυστικά και τα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα έλαβαν το υψηλότερο συνολικό άθροισμα.

Καλοήθη Νεοπλάσματα

Η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της pAKT υπήρξε θετική σε ποσοστό 100% στα καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 2,00 για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 2,23 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 4,23. (Πίνακας 25, 26)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες η έκφραση της pAKT υπήρξε θετική σε ποσοστό 75% (6/8). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,00, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,10 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 2,10. (Πίνακας 25, 26)

Πίνακας 25. Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της pAKT για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήγη, κακοήγη)

pAKT						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	2	25,00	0	0,00	0	0,00
Ήπια	4	50,00	3	23,08	6	15,38
Μέτρια	2	25,00	7	53,85	12	30,77
Έντονη	0	0,00	3	23,08	21	53,85
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Ήπια		Μέτρια		Έντονη	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	2	25,00	0	0,00	0	0,00
<20%	4	50,00	1	7,69	3	7,69
20-50%	1	12,50	8	61,54	6	15,38
>50%	1	12,50	4	30,77	30	76,92
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	<20%		20-50%		>50%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	2	25,00	0	0,00	0	0,00
2	3	37,50	1	7,69	3	7,69
3	1	12,50	2	15,38	2	5,13
4	2	25,00	5	38,46	5	12,82
5	0	0,00	3	23,08	8	20,51
6	0	0,00	2	15,38	21	53,85
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	2		4		6	

Πίνακας 26. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για pAKT

pAkt	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλοήγη (A = 13)	Κακοήγη (A = 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	6 (75,0%)	13 (100,0%)	39 (100,0%)
Ένταση Χρώσης - MT (±SD)	1,00 (±0,76)	2,00 (±0,71)	2,38 (±0,75)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - MT (±SD)	1,10 (±1,00)	2,23 (±0,60)	2,69 (±0,61)
Συνολικό Άθροισμα - MT (±SD)	2,10 (±1,56)	4,23 (±1,17)	5,08 (±1,26)

Πίνακας 27. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της pS6 στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων.

pAKT		A, % θετικών περιπτώσεων	MT Έντασης χρώσης	MT Ποσοστού θετικών κυττάρων	MT Συνολικού Αθροίσματος
Κακοήγη Νεοπλάσματα		39/39, 100%	2,38	2,7	5,08
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	5/5, 100%	2	2,8	4,8
	Αδενοκαρκίνωμα NOS	10/10, 100%	2,3	2,4	4,7
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	2,55	2,77	5,32
	Βλεννοεπιδερμοειδές	10/10, 100%	2,5	2,7	5,2
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	4/4, 100%	2,75	3	5,57
	Διαυγοκυτταρικό	1/1, 100%	1	3	4

Στατιστική Αξιολόγηση

Ο στατιστικός έλεγχος για την pAKT, απέδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ένταση της χρώσης μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,08>0,05$). Αντίθετα όμως οι διαφορές στο ποσοστό θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,0064<0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,0164<0,05$) των παραπάνω νεοπλασμάτων είναι στατιστικά σημαντικές, με το ποσοστό των θετικών κυττάρων να λαμβάνει από τις χαμηλότερες τιμές του δείγματος. (Πίνακας 28, Γράφημα 18,19, 20, Ιστόγραμμα 13,14,15)

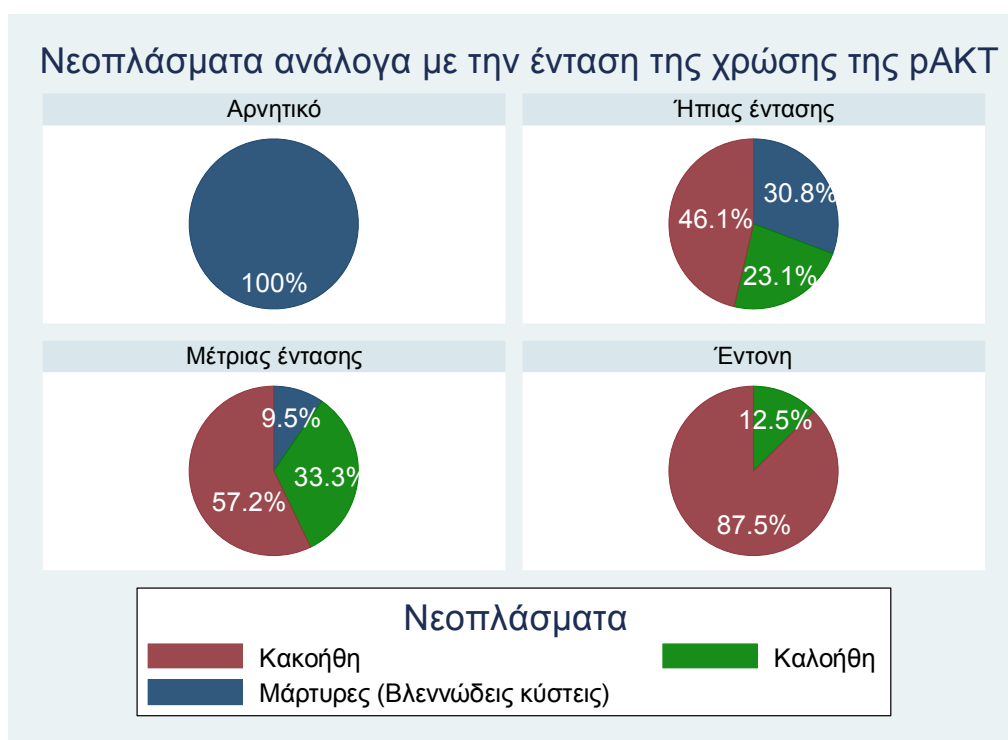
Επίσης συγκρίνοντας τα κακοήθη νεοπλάσματα με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,001<0,05$), στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,001<0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,001<0,05$).

Παρόμοια στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα λαμβάνουμε συγκρίνοντας και τα κακοήθη νεοπλάσματα με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες σε ότι αφορά στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,011<0,05$), στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,009<0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,005<0,05$). (Πίνακας 28, Γράφημα 18,19, 20, Ιστόγραμμα 13,14,15)

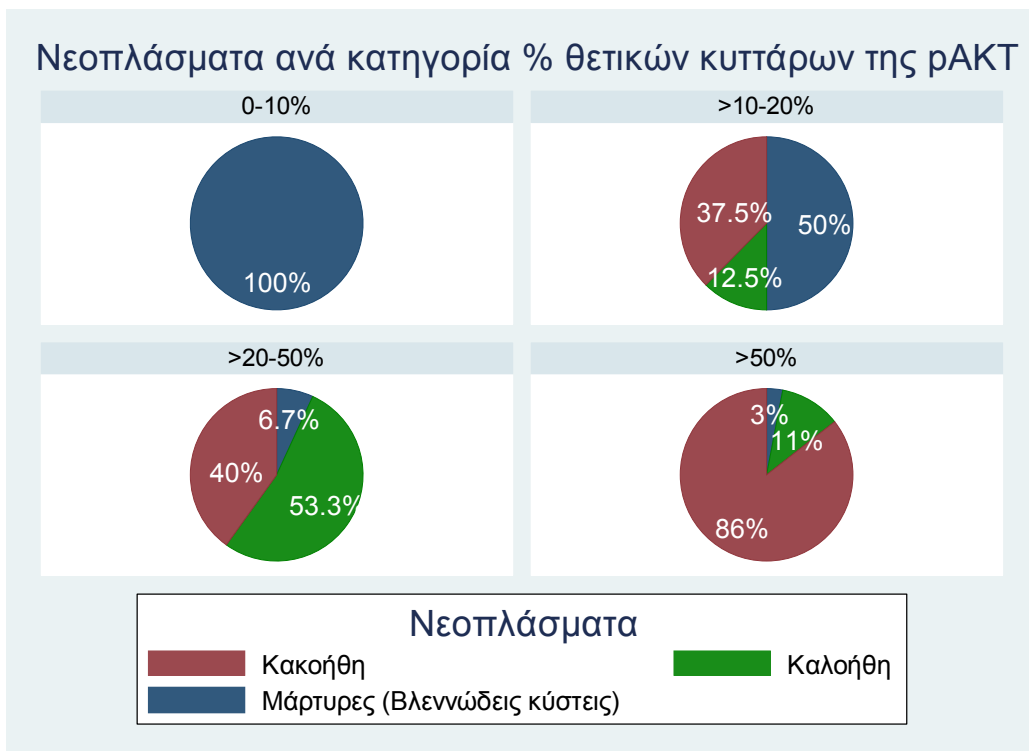
Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,82>0,05$) στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,42>0,05$) καθώς και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,58>0,05$) μεταξύ των ιστολογικών τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. (Πίνακας 12)

**Πίνακας 28. Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test
(Mann-Whitney U test) για pAKT**

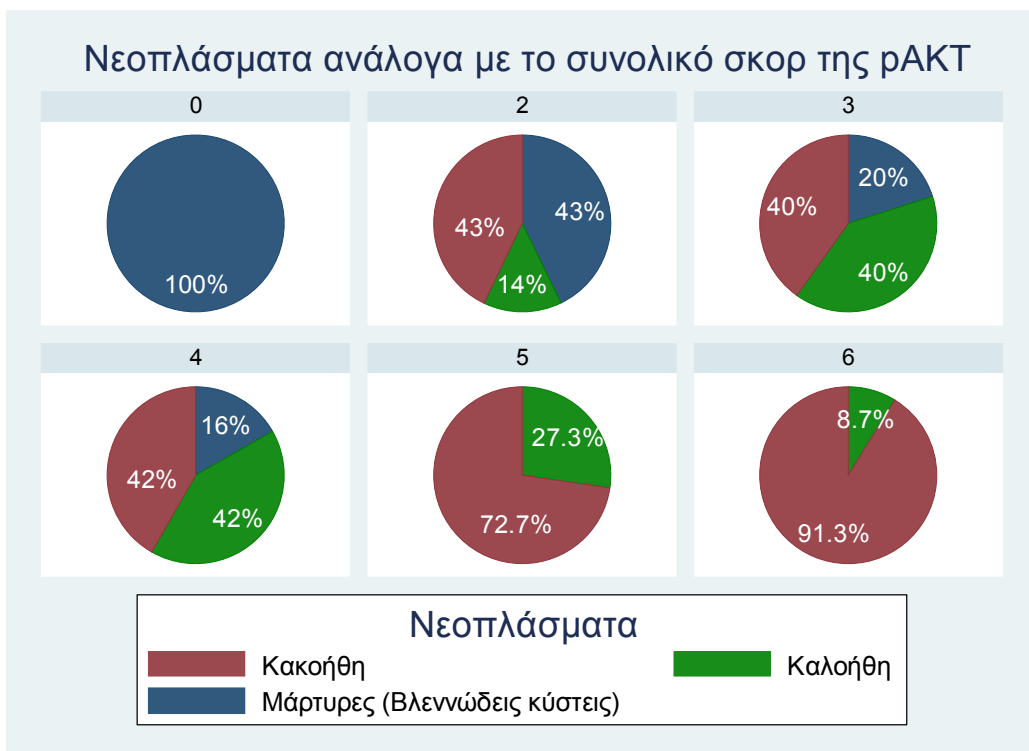
pAKT		Mann-Whitney-Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήθη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήθη		Καλοήθη vs Κακοήθη	
		Z- statistic	p- value	Z- statistic	p- value	Z- statistic	p- value
	Ένταση Χρώσης	-2,544	0,0110	-3,631	<0,001	-1,721	0,0852
	% Θετικών Κυττάρων	-2,602	0,0093	-4,041	<0,001	-2,726	0,0064
	Συνολικό Άθροισμα	-2,785	0,0053	-3,952	<0,001	-2,400	0,0164



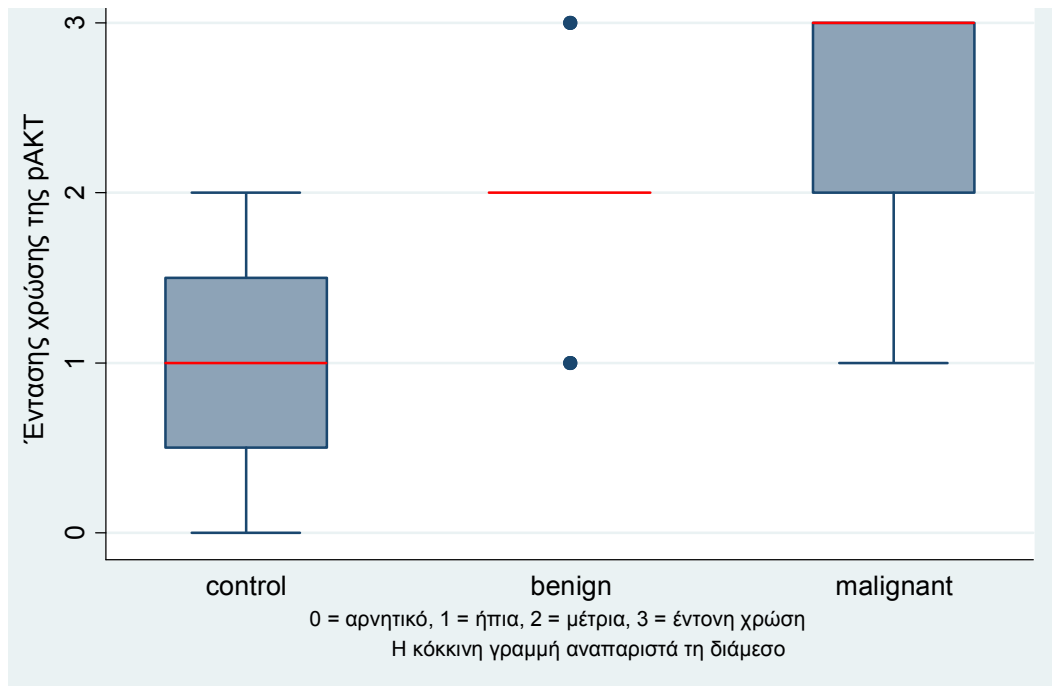
Γράφημα 18. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της pAKT



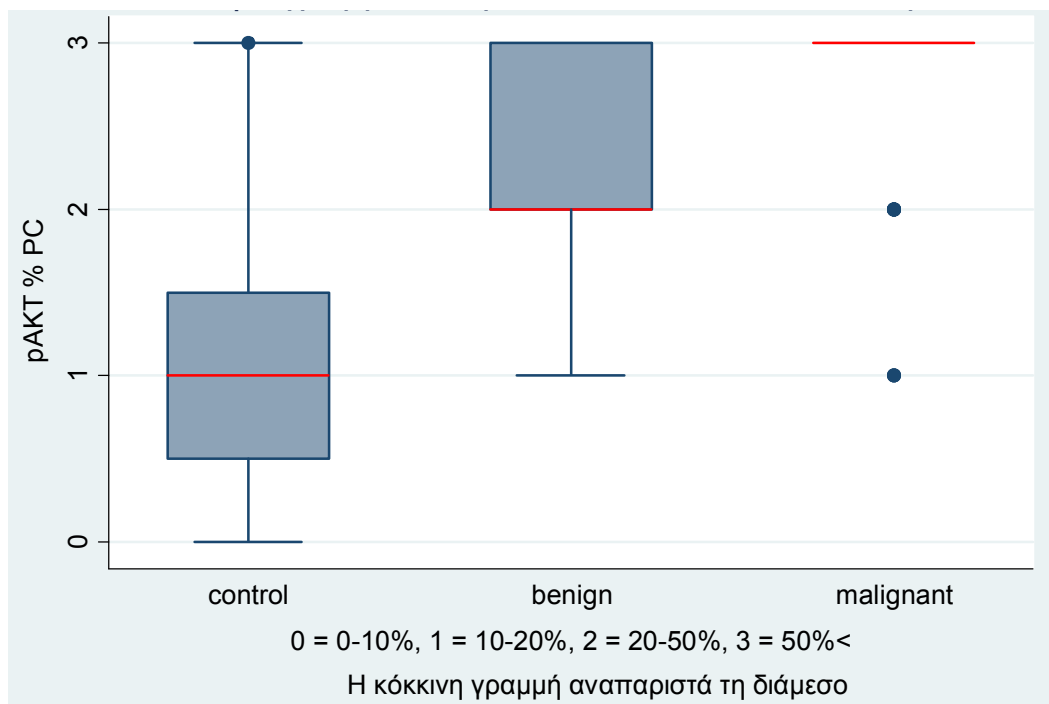
Γράφημα 19. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το ποσοστό θετικών κυττάρων της pAKT



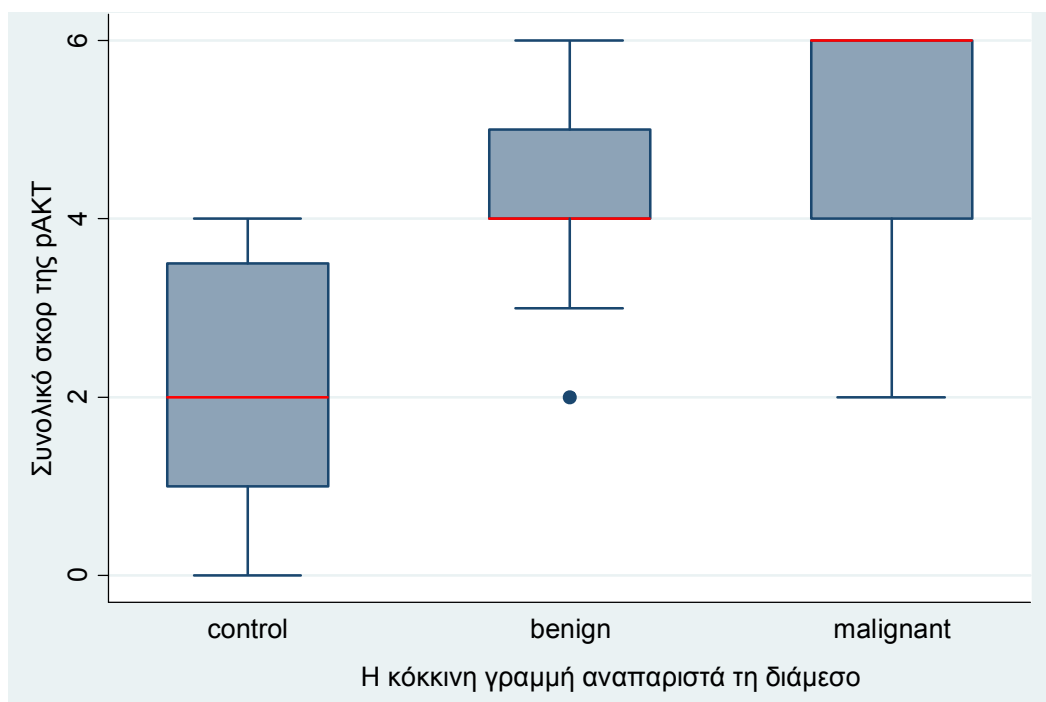
Γράφημα 20. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με συνολικό άθροισμα της pAKT



Ιστόγραμμα 13. Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της pAKT στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλασμάτα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 14. Ιστόγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων της pAKT στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλασμάτα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 15. Ιστόγραμμα συνολικού αθροίσματος της pAKT στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου

10. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της eIF4E στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες.

Κακοήθη Νεοπλάσματα

Στο σύνολο των 39 κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της eIF4E υπήρξε θετική σε ποσοστό 76,9% (30/39) με ποικίλη έκφραση σε ότι αφορά το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα. Παρατηρήθηκαν 9 περιπτώσεις όπου η έκφραση της eIF4E υπήρξε αρνητική.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της eIF4E ήταν κυτταροπλασματική. (Εικ. 20 G-I). Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,18 η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,23 και η μέση τιμή για το συνολικό άθροισμα ήταν 2,41. (Πίνακας 29 ,30)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο 3/39 περιπτώσεις δηλαδή το **7,7% των περιπτώσεων των κακοήθων νεοπλασμάτων εμφάνισαν έντονη χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων άνω του 50%.**

Το **69,23%** των περιπτώσεων παρουσίασε **ήπιας και μέτριας έντασης χρώση** (38,46% και 30,77% αντίστοιχα) καθώς και **ποσοστό θετικών κυττάρων των κατηγοριών 1 και 2** (43,59% και 25,64% αντίστοιχα). Για το συνολικό άθροισμα παρατηρήθηκε ότι το **12,82%** των περιπτώσεων παρουσίασε τις **υψηλότερες τιμές 5 και 6** (10,26% και 2,56% αντίστοιχα) ενώ το 38,46% (15/39) παρουσίασε την τιμή 2. (Πίνακας 29,30)

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στα καρκινώματα εκ πλειομόρφου αδενώματος 1/5 περιπτώσεις (**20%**) ήταν **αρνητική** και 2/5 περιπτώσεις (**40%**) εμφάνισαν **μέτριας έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Μόνο 1/5 περιπτώσεις (**20%**) παρουσίασε **έντονη έντασης χρώση.**

Η μέση τιμή για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 0,5, για την ένταση της χρώσης ήταν 0,8 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 1,3. (Πίνακας 31)

Στο **50%** των περιπτώσεων των αδενοκαρκινωμάτων NOS (5/10) παρατηρήθηκε **αρνητική έκφραση στην ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων.** Το **40%** των περιπτώσεων **παρουσίασε ήπιας και μέτριας έντασης χρώση και ποσοστό των θετικών κυττάρων των κατηγοριών 1 και 2** (2/5 περιπτώσεις αντίστοιχα) και μόνο 1/5 περιπτώσεις (**10%**) παρουσίασε **έντονης έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3 (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων).**

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 0,9 αντίστοιχα και για το συνολικό άθροισμα ήταν 1,8. (Πίνακας 31)

Στα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα παρατηρήθηκε επίσης παρόμοια κατανομή στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και στην ένταση της χρώσης. Στο **89%** των περιπτώσεων (8/9) παρατηρήθηκε **ήπιας έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1** (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων) και στο 11% των περιπτώσεων (1/9) παρατηρήθηκε **μέτριας έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων 1,1 αντίστοιχα και για το συνολικό άθροισμα ήταν 2,2. (Πίνακας 31)

Όσον αφορά στα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα στο 80% των περιπτώσεων (8/10) παρατηρήθηκε **ήπιας (4/10) και μέτριας (4/10) έντασης χρώση καθώς και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1** (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων) και **2** (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων). Στο 10% των περιπτώσεων (1/10) παρατηρήθηκε **έντονης έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 3** (>50% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,5, και για το συνολικό άθροισμα ήταν 3. (Πίνακας 31)

Τέλος και στα πολύμορφα χαμηλής κακοήθειας αδeno-καρκινώματα παρατηρήθηκε επίσης παρόμοια κατανομή στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και στην ένταση της χρώσης.

Στο 50% των περιπτώσεων (2/4) παρατηρήθηκε **αρνητική έκφραση στην ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων** και στο υπόλοιπο 50% (2/4) των περιπτώσεων παρατηρήθηκε

μέτριας έντασης χρώση καθώς και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 2 (20-50% ποσοστό θετικών κυττάρων).

Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1 και για το συνολικό άθροισμα ήταν 2. (Πίνακας 31)

Από την παραπάνω ανάλυση καταδεικνύεται ότι μεταξύ των τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων το διαυγοκυτταρικό και τα βλεννοεπιδερμοειδή καρκινώματα έλαβαν το υψηλότερο συνολικό άθροισμα.

Καλοήθη Νεοπλάσματα

Η αξιολόγηση ως προς την έκφραση της eIF4E υπήρξε θετική σε ποσοστό 69,2% (9/13) και στα καλοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Παρατηρήθηκαν 4/13 περιπτώσεις όπου η αξιολόγηση της έντασης της χρώσης και του ποσοστού των θετικών κυττάρων ήταν αρνητική. Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης ήταν 1,15, για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 1,08, και για το συνολικό άθροισμα ήταν 2,23. (Πίνακας 29, 30)

Φυσιολογικοί Ελάσσονες Σιαλογόνοι Αδένες

Στους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες η έκφραση της eIF4E υπήρξε αρνητική σε ποσοστό 87,5% (7/8.) Μόνο σε μια περίπτωση (1/8) παρατηρήθηκε ήπιας έντασης χρώση και ποσοστό θετικών κυττάρων της κατηγορίας 1 (<20% ποσοστό θετικών κυττάρων). Η μέση τιμή για την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών κυττάρων ήταν 0,13 αντίστοιχα και για το συνολικό άθροισμα ήταν 0,25. (Πίνακας 29, 30)

Πίνακας 29. Συχνότητες και Σχετικές Συχνότητες της eIF4E για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα σε κάθε κατηγορία νεοπλασμάτων (ομάδα ελέγχου, καλοήγη, κακοήγη)

eIF4E						
	Νεοπλάσματα					
Ένταση Χρώσης	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
Αρνητική	7	87,50	4	30,77	9	23,08
Ήπια	1	12,50	4	30,77	15	38,46
Μέτρια	0	0,00	4	30,77	12	30,77
Έντονη	0	0,00	1	7,69	3	7,69
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	Αρνητική		Ήπια		Μέτρια	
% Θετικών Κυττάρων	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0%	7	87,50	4	30,77	9	23,08
<20%	1	12,50	4	30,77	17	43,59
20-50%	0	0,00	5	38,46	10	25,64
>50%	0	0,00	0	0,00	3	7,69
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0%		<20%		<20%	
Συνολικό Άθροισμα	Ομάδα Ελέγχου		Καλοήθη		Κακοήθη	
	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.	Freq.	Rel. freq.
0	7	87,50	4	30,77	9	23,08
2	1	12,50	3	23,08	15	38,46
3	0	0,00	2	15,38	2	5,13
4	0	0,00	3	23,08	8	20,51
5	0	0,00	1	7,69	4	10,26
6	0	0,00	0	0,00	1	2,56
Σύνολο	8	100,00	13	100,00	39	100,00
Μέσος Όρος	0		2		2	

Πίνακας 30. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) στα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων καθώς και στην ομάδα ελέγχου για eIF4E

eIF4E	Νεοπλάσματα		
	Ομάδα Ελέγχου (A = 8)	Καλοήγη (A = 13)	Κακοήγη (A= 39)
A (%) Θετικών Περιπτώσεων	1 (12,5%)	9 (69,2%)	30 (76,9%)
Ένταση Χρώσης - ΜΤ(±SD)	0,13 (±0,35)	1,15 (±0,99)	1,23 (±0,90)
Ποσοστό Θετικών Κυττάρων - ΜΤ (±SD)	0,13 (±0,35)	1,08 (±0,86)	1,18 (±0,88)
Συνολικό Άθροισμα - ΜΤ (±SD)	0,25 (±0,71)	2,23 (±1,79)	2,41 (±1,74)

Πίνακας 31. Κατανομή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (αριθμός, % θετικών περιπτώσεων, και μέση τιμή για ένταση χρώσης, ποσοστό θετικών κυττάρων και συνολικό άθροισμα) της στους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων της eIF4E

eIF4E		A,% Θετικών Περιπτώσεων	ΜΤ Έντασης Χρώσης	ΜΤ Ποσοστού Θετικών Κυττάρων	ΜΤ Συνολικού Άθροίσματος
Κακοήγη Νεοπλάσματα		30/39, 76,9%	1,15	1,12	2,27
	Εκ Πλειομόρφου Αδενώματος	4/5, 80%	0,8	0,5	1,3
	Αδενοκαρκινώματα NOS	5/10,50%	0,9	0,9	1,8
	Αδενοειδές Κυστικό	9/9, 100%	1,1	1,1	2,2
	Βλεννοεπιδερμοειδές	9/10, 90%	1,5	1,5	3
	Πολύμορφο Χαμηλής Κακοήθειας	2/4, 50%	1	1	2
	Διαυγοκυτταρικό	1/1, 100%	2	3	5

Στατιστική Αξιολόγηση

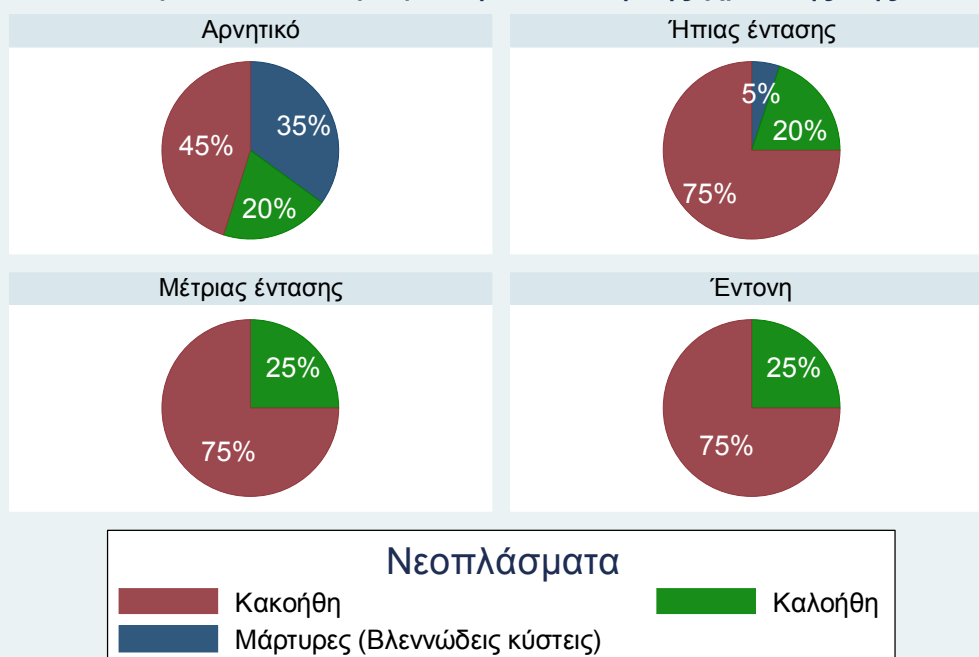
Ο στατιστικός έλεγχος απέδειξε ότι οι διαφορές στο ποσοστό θετικών κυττάρων, στην ένταση της χρώσης και στο συνολικό άθροισμα μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}=0,81>0,05$, $p\text{-value}=0,79>0,05$, $p\text{-value}=0,82>0,05$ αντίστοιχα). Είναι όμως στατιστικά σημαντική μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,0110<0,05$ και $p\text{-value}=0,0113<0,05$, $p\text{-value}=0,0106<0,05$ αντίστοιχα) όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p\text{-value}=0,0014<0,05$ και $p\text{-value}=0,0013<0,05$, $p\text{-value}=0,0014<0,05$ αντίστοιχα). (Πίνακας 32, Γράφημα 21, 22, 23, Ιστόγραμμα 16,17,18)

Οι παραπάνω παρατηρήσεις κατέδειξαν ότι στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι υπάρχει διαφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p\text{-value}=0,39>0,05$), στην ένταση της χρώσης ($p\text{-value}=0,39>0,05$) καθώς και στο συνολικό άθροισμα ($p\text{-value}=0,42>0,05$) μεταξύ των ιστολογικών τύπων των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. (Πίνακας 12)

Πίνακας 32. Αποτελέσματα του Wilcoxon rank-sum test (Mann-Whitney U test) για eIF4E

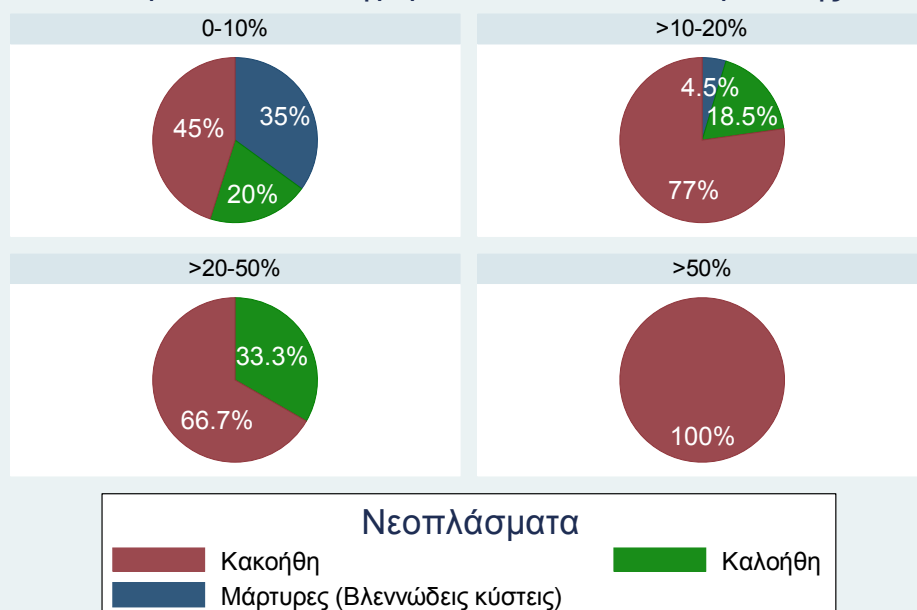
eIF4E		Mann-Whitney-Wilcoxon test					
		Ομάδα Ελέγχου vs Καλοήθη		Ομάδα Ελέγχου vs Κακοήθη		Καλοήθη vs Κακοήθη	
		Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value	Z- statistic	p-value
	Ένταση Χρώσης	-2,532	0,0113	-3,214	0,0013	-0,266	0,7900
	% Θετικών Κυττάρων	-2,542	0,0110	-3,202	0,0014	-0,235	0,8145
	Συνολικό Άθροισμα	-2,557	0,0106	-3,194	0,0014	-0,219	0,8268

Νεοπλάσματα ανάλογα με την ένταση της χρώσης της eIF4E

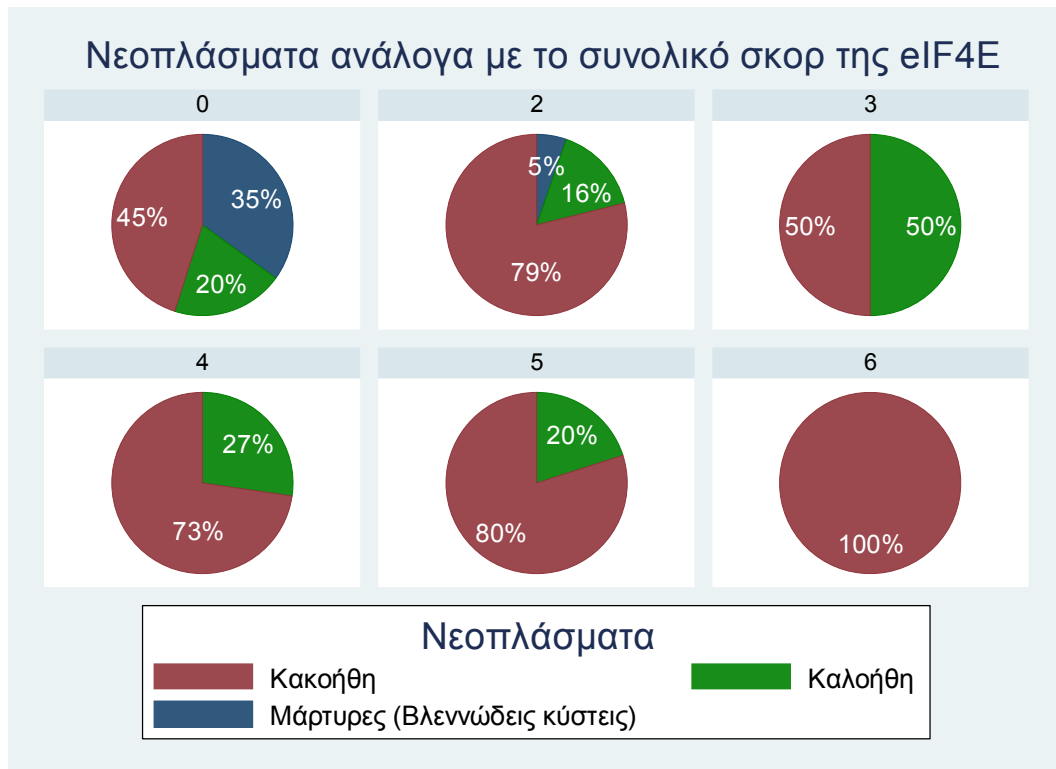


Γράφημα 21. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με την ένταση χρώσης της eIF4E

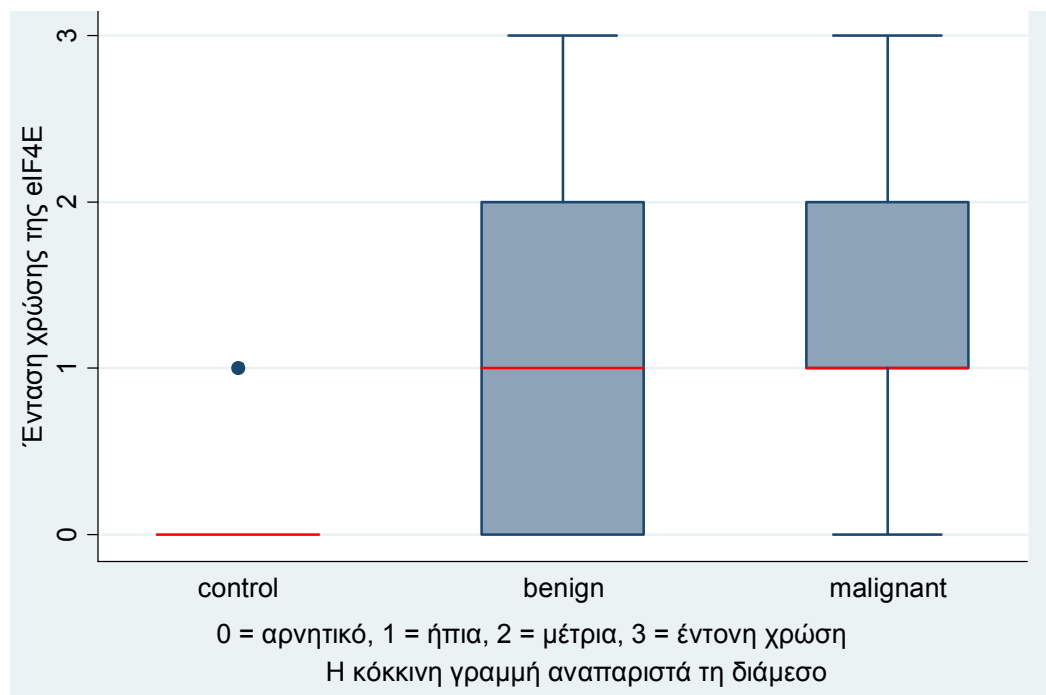
Νεοπλάσματα ανά κατηγορία % θετικών κυττάρων της eIF4E



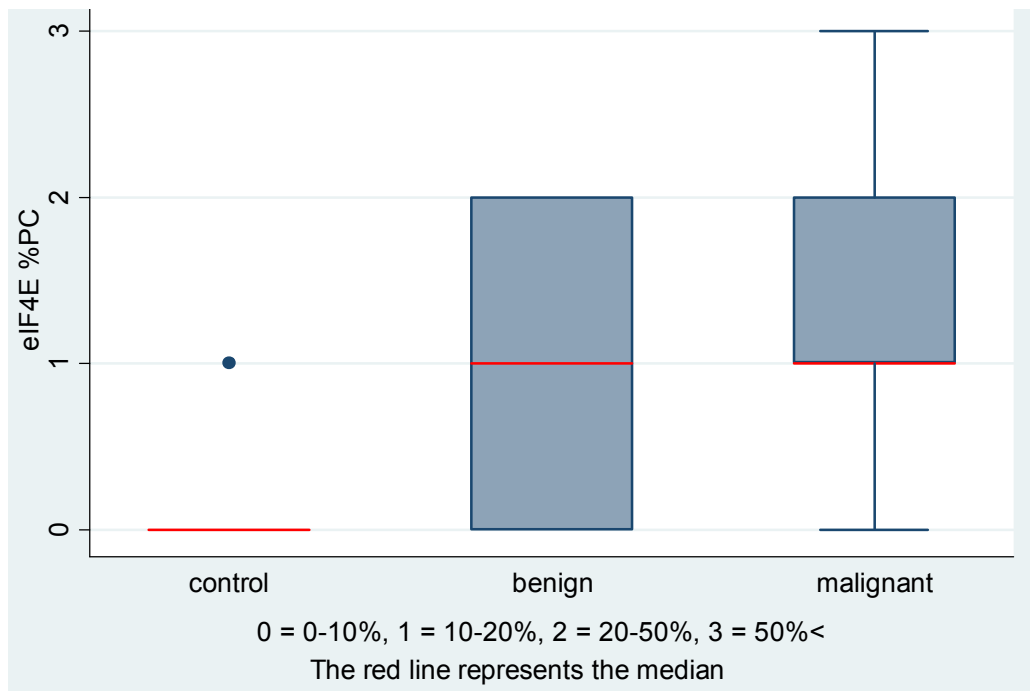
Γράφημα 22. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το ποσοστό θετικών κυττάρων της eIF4E



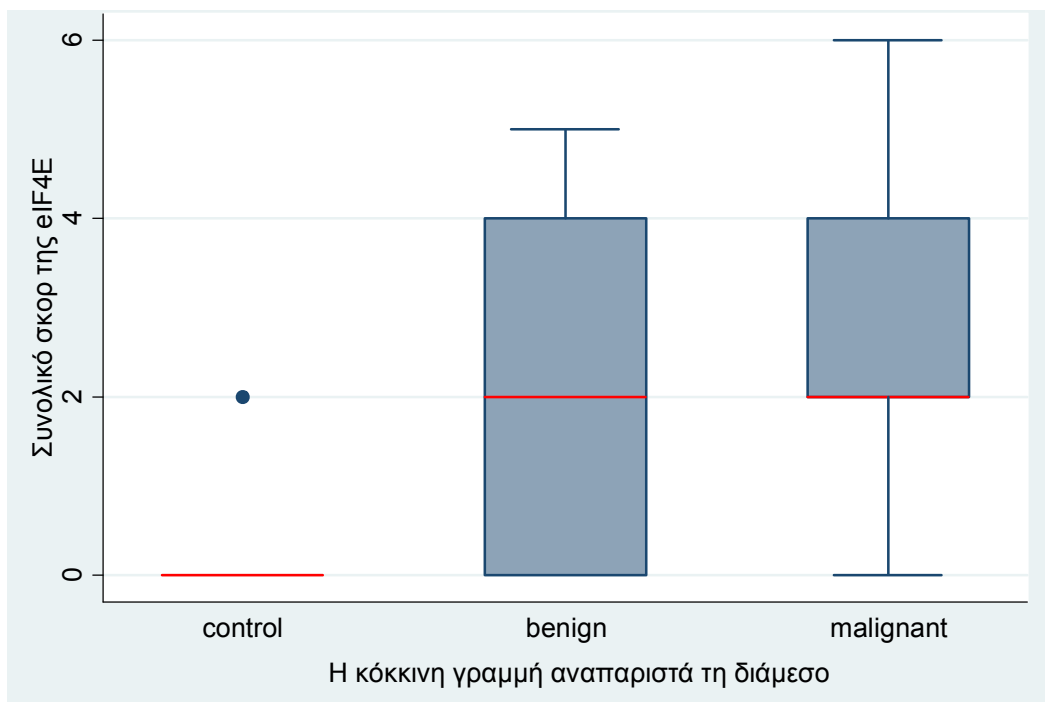
Γράφημα 23. Πιθανότητα Νεοπλασματος ανάλογα με το συνολικό άθροισμα της eIF4E



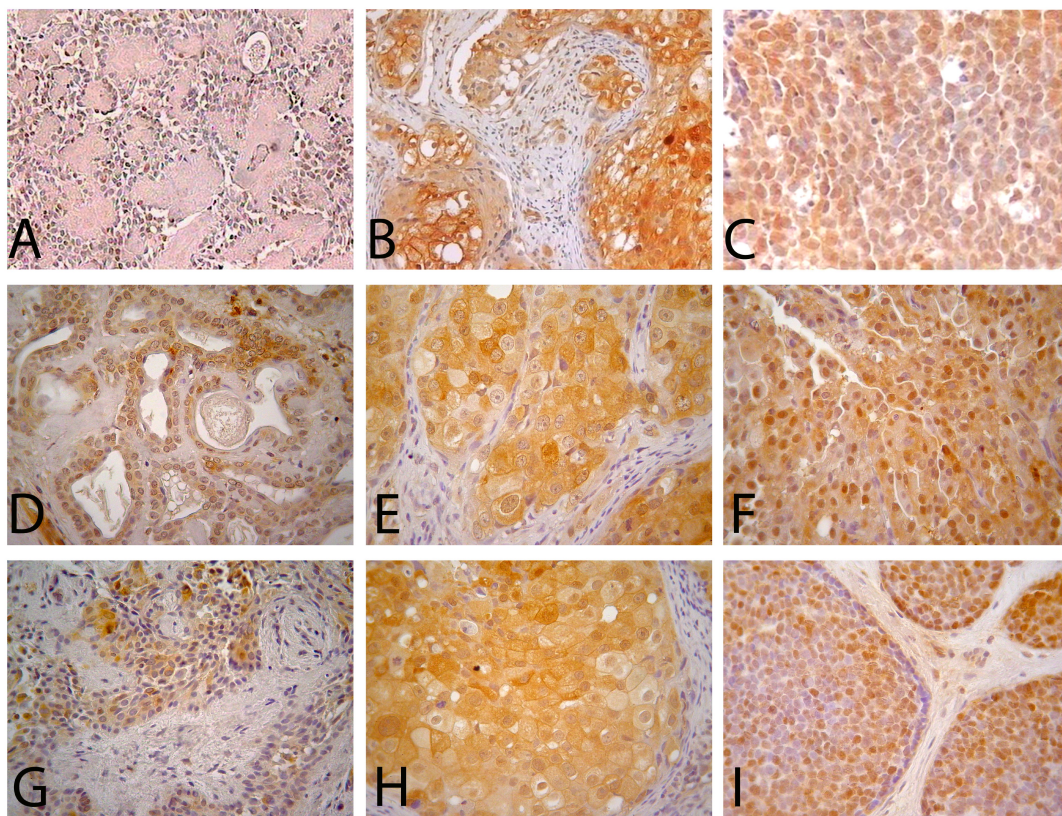
Ιστόγραμμα 16. Ιστόγραμμα έντασης χρώσης της eIF4E στα κακοήθη, καλοήθη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



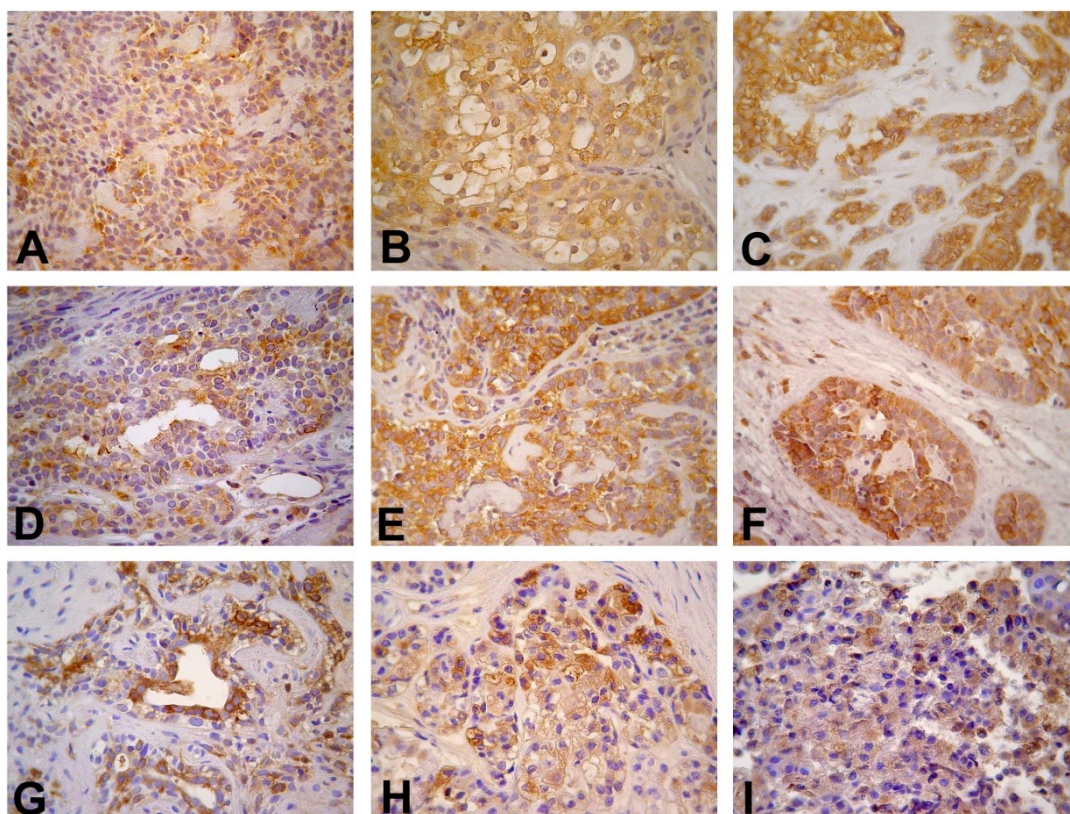
Ιστόγραμμα 17. Ιστόγραμμα ποσοστού θετικών κυττάρων της eIF4E στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Ιστόγραμμα 18. Ιστόγραμμα συνολικού αθροίσματος της eIF4E στα κακοήγη, καλοήγη νεοπλάσματα και στην ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 19. Ανοσοϊστοχημική χρώση για pAkt (A-C), 4EBP1 (D-F) και p4EBP1 (G-I) σε καλοήγη νεοπλάσματα σιαλογόνων αδένων (πλειόμορφα αδενώματα - A, D, G), και κακοήγη νεοπλάσματα σιαλογόνων αδένων (B: βλεννοεπιδερμοειδές Ca, C: αδενοκαρκίνωμα NOS, E: βλεννοεπιδερμοειδές Ca, F: αδενοκαρκίνωμα NOS, H: βλεννοεπιδερμοειδές Ca, I: αδενοειδές κυστικό Ca). (Μεγένθυση: A and B: 200X, C-I: 400X).



Εικόνα 20. Ανοσοϊστοχημική χρώση για S6 (A-C), pS6 (D-F) and eIF4E (G-I) καλοήγη νεοπλάσματα σιαλογόνων αδένων (πλειόμορφα αδενώματα - A, D, G), και κακοήγη νεοπλάσματα σιαλογόνων αδένων (B: βλεννοεπιδερμοειδές Ca, C: αδενοειδές κυστικό Ca, E: πολύμορφο χαμηλής κακοήθειας, F: αδενοκαρκίνωμα NOS, H: διαυγοκυτταρικό, I: αδενοκαρκίνωμα NOS). (Μεγένθυση: A-I: 400X).

11. Ανάλυση των συσχετίσεων των πρωτεϊνών μεταξύ τους

Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman, οποίος είναι ένα μη-παραμετρικό μέτρο της στατιστικής εξάρτησης μεταξύ δύο μεταβλητών, αξιολογεί το πόσο καλά μπορεί να περιγραφεί η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών χρησιμοποιώντας μια μονότονη συνάρτηση.

Το πρόσημο της συσχέτισης Spearman δείχνει την κατεύθυνση της σχέσης μεταξύ των δύο μεταβλητών.

Χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Spearman εξετάσαμε αν τα επίπεδα έκφρασης των μελετώμενων μορίων στο σύνολο των νεοπλασμάτων (καλοήθων και κακοήθων), αλλά και στα κακοήθη μόνο, σχετίζονται μεταξύ τους.

Από τον πίνακα (Πίνακας 33) φαίνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταβλητές δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Πάντως όπου βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις η σχέση μεταξύ των μελετώμενων μορίων, ήταν θετική, δηλαδή, όταν αυξάνεται η μία μεταβλητή, αυξάνεται και η άλλη και το αντίστροφο. Ακόμη και στις περιπτώσεις όπου η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική η σχέση μεταξύ των μελετώμενων μορίων, ήταν πάντα θετική. Επίσης προκειμένου να ερμηνεύσουμε την ένταση της συσχέτισης θεωρήσαμε ότι όταν η συσχέτιση λαμβάνει τιμές από: 0-0,19 είναι πολύ ασθενής, 0,2-0,39 είναι ασθενής, 0,4-0,59 είναι μέτρια, 0,6-0,79 είναι ισχυρή και 0,8-1 είναι πολύ ισχυρή.

Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι η μόνη σχέση που είναι στατιστικά σημαντική στο σύνολο των νεοπλασμάτων (καλοήθων και κακοήθων), αλλά και στα κακοήθη μόνο, σε ότι αφορά στην ένταση της χρώσης, στο ποσοστό των θετικών κυττάρων και στο συνολικό άθροισμα είναι αυτή των pS6 ~ pAKT. Όταν λοιπόν αυξάνεται η pAKT αυξάνεται και η pS6.

Συγκεκριμένα, άλλες θετικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ ζευγών μορίων είναι οι εξής:

pS6 ~ p4EBP1: Ασθενής στατιστικά σημαντική συσχέτιση για ένταση χρώσης σε καλοήθη – κακοήθη νεοπλασμάτα.

pS6 ~ p4EBP1: Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για % θετικών κυττάρων σε καλοήθη – κακοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα.

pS6 ~ p4EBP1 Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για συνολικό άθροισμα σε καλοήθη – κακοήθη νεοπλασμάτα

pS6 ~ pAKT: Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για ένταση χρώσης σε καλοήθη – κακοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα.

pS6 ~ pAKT: Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για % θετικών κυττάρων σε καλοήθη – κακοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα.

pS6 ~ pAKT: Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για συνολικό άθροισμα σε καλοήθη – κακοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα.

pAKT ~ p4EBP1: Ασθενής στατιστικά σημαντική συσχέτιση για ένταση χρώσης σε καλοήθη – κακοήθη και κακοήθη νεοπλασμάτα.

pAKT ~ p4EBP1: Μέτρια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για % θετικών κυττάρων σε καλοήθη – κακοήθη νεοπλασμάτα.

pAKT ~ p4EBP1: Ασθενής στατιστικά σημαντική συσχέτιση για συνολικό άθροισμα σε καλοήθη – κακοήθη νεοπλασμάτα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης και τα αποτελέσματα της συσχέτισης των συνολικών επιπέδων των μορίων με τις φωσφορυλιωμένες τους μορφές. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το Kendall's tau b test. Ο στατιστικός αυτός έλεγχος είναι ίδιος με του Spearman, αλλά πλεονεκτεί έναντι αυτού στο ότι είναι πιο αποτελεσματικός σε μικρά μεγέθη. Οι δυο στατιστικοί έλεγχοι έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα. Όπως φαίνεται από τον πίνακα (Πίνακας 34)

οι μεταβλητές συσχετίζονται μεταξύ τους και μάλιστα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο για όλα τα μόρια. Η σχέση μεταξύ των μελετώμενων μορίων, ήταν θετική, δηλαδή όταν αυξάνεται η μία μεταβλητή, αυξάνεται και η άλλη και το αντίστροφο.

Πίνακας 33. Αποτελέσματα του Spearman's rho correlation coefficient για νεοπλάσματα (καλοήγη - κακοήγη) και μόνο κακοήγη

	Ένταση Χρώσης			
	Καλοήγη – Κακοήγη		Κακοήγη	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value
pS6 ~ p4EBP1	0,3654	0,0077	0,2355	0,1489
pS6 ~ pAKT	0,4933	<0,001	0,4287	0,0065
pS6 ~ eIF4E	0,2122	0,1309	0,1841	0,2618
pAKT ~ p4EBP1	0,3020	0,0296	0,3274	0,0419
pAKT ~ eIF4E	0,1373	0,3318	0,1858	0,2574
p4EBP1 ~ eIF4E	0,0124	0,9307	0,0323	0,8451
	% Θετικών Κυττάρων			
	Καλοήγη – Κακοήγη		Κακοήγη	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value
pS6 ~ p4EBP1	0,5541	<0,001	0,3437	0,0322
pS6 ~ pAKT	0,4678	<0,001	0,3288	0,0410
pS6 ~ eIF4E	0,1319	0,3515	0,0790	0,6327
pAKT ~ p4EBP1	0,4004	0,0033	0,2827	0,0812
pAKT ~ eIF4E	0,2041	0,1467	0,1971	0,2291
p4EBP1 ~ eIF4E	0,0657	0,6433	0,1013	0,5396
	Συνολικό Άθροισμα			
	Καλοήγη – Κακοήγη		Κακοήγη	
	coefficient	p-value	coefficient	p-value
pS6 ~ p4EBP1	0,4608	<0,001	0,2185	0,1813
pS6 ~ pAKT	0,5430	<0,001	0,4666	0,0027
pS6 ~ eIF4E	0,1316	0,3523	0,0560	0,7348
pAKT ~ p4EBP1	0,3620	0,0084	0,2699	0,0966
pAKT ~ eIF4E	0,1745	0,2159	0,1963	0,2311
p4EBP1 ~ eIF4E	0,0153	0,9141	0,0362	0,8269

Πίνακας 34. Αποτελέσματα του Spearman's rho correlation coefficient για συνολικό άθροισμα και φωσφορυλιωμένες μορφές μορίων

	Staining intensity			
	Spearman's rho		Kendall's tau b	
	coefficient	p-value	T _b	p-value
pS6 ~ S6	0,5994	<0,001	0,5280	<0,001
pEBP1 ~ EBP1	0,7631	<0,001	0,6908	<0,001
	% positive cells			
	Spearman's rho		Kendall's tau b	
	coefficient	p-value	T _b	p-value
pS6 ~ S6	0,6352	<0,001	0,5661	<0,001
pEBP1 ~ EBP1	0,6583	<0,001	0,6052	<0,001
	Συνολικό Άθροισμα			
	Spearman's rho		Kendall's tau b	
	coefficient	p-value	T _b	p-value
pS6 ~ S6	0,6660	<0,001	0,5559	<0,001
pEBP1 ~ EBP1	0,7482	<0,001	0,6369	<0,001

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες έχει αναγνωρισθεί ο σημαντικός ρόλος της σηματοδοτικής οδού mTOR στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των κυττάρων. Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι η οδός mTOR συμμετέχει στην ανάπτυξη νεοπλασιών και ειδικότερα του καρκίνου.^{166,167,114} Ποικίλες δυσλειτουργίες της σηματοδοτικής οδού mTOR έχουν αναγνωρισθεί σε καρκινικά κύτταρα. Οι πιο συχνές είναι η ενίσχυση της p110 υπομονάδας του PI3K και της AKT2, η απώλεια του PTEN, οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις των TSC1 και TSC2 και η υπερέκφραση ή ενίσχυση των eIF4E και S6K1. Τα μόρια PI3K και AKT θεωρούνται πρωτοογκογονίδια και η λειτουργία τους ελέγχεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN. Επίσης, τα μόρια TSC1 και TSC2 ασκούν ογκοκατασταλτική δράση, ενώ τα eIF4E και S6K1 αποτελούν τελικά μόρια-στόχους και διαμεσολαβητές της ογκογόνου mTOR σηματοδότησης.^{166,168,114,169}

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PTEN είναι από τις συχνότερες διαταραχές που παρατηρούνται σε ένα μεγάλο αριθμό κακοηθειών, όπως σε καρκίνο προστάτη, μαστού, ουροδόχου κύστης, θυρεοειδούς, εγκεφάλου, νεφρού, μελάνωμα κλπ., καθιστώντας το PTEN ένα από τα συχνότερα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια.^{168,114,170,171} Επίσης, πέραν της συμμετοχής τους σε ογκογόνες διεργασίες, αναφέρεται ότι η δυσλειτουργία των σχετιζόμενων με τη σηματοδοτική οδό mTOR μορίων, όπως PI3K, AKT, S6K1, 4EBP-1 και eIF4E, σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση σε διάφορα κακοήγη νεοπλάσματα.¹⁷¹⁻¹⁷³

Η ενεργοποίηση της οδού PI3K/Akt/mTOR στην καρκινογένεση την καθιστά έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Για το λόγο αυτό, οι αναστολείς mTOR και ειδικότερα τα ανάλογα της Rapamycin, έχουν δοκιμασθεί ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε διάφορα στάδια προκλινικών και κλινικών μελετών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.¹⁷⁴

Συγκεκριμένα, αναστολείς της mTOR έχουν μελετηθεί στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως σε αιματολογικές κακοήθειες αλλά και σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι, λόγω κάποιας μετάλλαξης που επηρεάζει το σημείο σύνδεσης αναστολέα-όγκου, οι κακοήθειες όγκοι μετά από 6 μήνες θεραπείας αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στους αναστολείς mTOR. Ωστόσο, η έρευνα για την ανακάλυψη νέων πιο αποτελεσματικών αναστολέων συνεχίζεται με ελπιδοφόρα αποτελέσματα για τη θεραπεία του καρκίνου.¹⁷⁹

Παρά τον αποδεδειγμένο ογκογενετικό ρόλο της mTOR σηματοδότησης, λίγες δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες αναφέρονται στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής αυτής οδού σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων.^{167,180,181} Ευρήματα προηγούμενων μελετών για την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού του mTOR σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων απορρέουν κυρίως από τη μελέτη ανιόντων ρυθμιστών, όπως του Ras. Ενεργοποίηση του H-ras φαίνεται ότι εμπλέκεται στη ανάπτυξη και/ή στην εξέλιξη του βλεννοεπιδερμοειδούς καρκινώματος και του πλειόμορφου αδενώματος.¹⁸² Επίσης, μεταλλάξεις του γονιδίου K-ras έχουν παρατηρηθεί σε πλειόμορφα αδενώματα, αν και δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των κακοηθιών των σιαλογόνων αδένων.¹⁶⁷ Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη, οι Clauditz et al (2013)¹⁶⁷ μελέτησαν την έκφραση του phospho-mTOR (p-mTOR) σε ιστικές μικροσυστοιχίες συμπεριλαμβάνοντας έναν μεγάλο αριθμό διαφόρων ιστολογικών τύπων κακοήθων νεοπλασμάτων και αδενωμάτων των σιαλογόνων αδένων. Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση για p-mTOR παρατηρήθηκε στο 51% των αδενωμάτων και στο 47% των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων. Συγκεκριμένα, κυτταροπλασματική εντόπιση του p-mTOR ανιχνεύθηκε στους 4 μελετώμενους υποτύπους αδενωμάτων σε ποσοστά

κυμαινόμενα από 25,6% έως και 41,2%, όπως και στους 11 υπό μελέτη ιστολογικούς τύπους καρκινωμάτων με ποσοστιαία διακύμανση από 36,8% έως 61,6%. Οι περισσότεροι όγκοι (καλοήθεις και κακοήθεις) κατέδειξαν ασθενούς ως μέτριας έντασης ανοσοϊστοχημική χρώση, ενώ η έντονη χρώση ήταν σπάνια. Το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα παρουσίασε την εντονότερη έκφραση του p-mTOR σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς τύπους, αλλά δεν βρέθηκε συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Βάσει των ευρημάτων τους, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το p-mTOR παίζει έναν λειτουργικό ρόλο στους όγκους των σιαλογόνων αδένων και μπορεί να αποτελέσει δυνητικό στόχο ογκολογικών θεραπειών με ανταγωνιστές του mTOR.¹⁶⁷

Στην παρούσα μελέτη, έγινε αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ζωτικής σημασίας μορίων της οδού mTOR. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τόσο ανιόντες ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού mTOR (pAKT), όσο και κατιόντα μόρια-στόχοι (4EBP1, S6 και eIF4E) σε καλοήθη και κακοήθη νεοπλάσματα των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων διαφόρων ιστολογικών τύπων. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι σημαντικά μόρια της οδού mTOR εκφράζονται και ενεργοποιούνται στους όγκους των σιαλογόνων αδένων και ενδεχομένως λαμβάνουν μέρος στην ογκογένεση. Διαπιστώθηκε ότι τα μελετώμενα μόρια εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα νεοπλάσματα (καλοήθη και κακοήθη) των σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες, όπως επίσης και στα κακοήθη νεοπλάσματα σε σύγκριση με τα καλοήθη. Η προοδευτική αυτή αύξηση της έκφρασης και ενεργοποίησης της mTOR σηματοδότησης από τους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες προς τα καλοήθη και τα κακοήθη νεοπλάσματα αποτελεί ισχυρή ένδειξη συμμετοχής στις ογκογόνες διεργασίες του αδενικού επιθηλίου.

Η AKT είναι μια ογκογόνος πρωτεϊνική κινάση. Όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί βασικό μόριο της σηματοδοτικής οδού PI3K-PTEN και μετά από κατάλληλα ερεθίσματα ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης στο C-τελικό υδροφοβικό άκρο στη θέση Ser473. Η AKT ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής της απόπτωσης, καθώς επίσης και το μεταβολισμό και τη μετανάστευσή τους, μέσω φωσφορυλίωσης διαφορετικών υποστρωμάτων, κυρίως στο κυτταρόπλασμα.^{181,183,184}

Ενεργοποίηση της AKT (και συνακόλουθη αυξημένη έκφραση pAKT) έχει ανιχνευθεί σε διάφορες προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες στον άνθρωπο.¹⁸⁵

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε έκφραση της pAKT σε όλα τα μελετώμενα καλοήγη και κακοήγη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων και μάλιστα σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον φυσιολογικό αδενικό ιστό. Επιπλέον, οι κακοήθεις όγκοι εξέφραζαν την pAKT σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους καλοήθεις. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή της pAKT στην ογκογένεση και ιδιαίτερα στην καρκινογένεση.¹⁸⁵ Σε προηγούμενη μελέτη ενός σημαντικού αριθμού κακοηθειών των σιαλογόνων αδένων (272 περιπτώσεις), οι Ettl et al (2012)¹⁸¹ ανέφεραν ότι πυρηνική και κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT (Ser473) παρατηρήθηκε σε 59% και 18,2% των περιπτώσεων, αντίστοιχα.¹⁸¹ Σε άλλη μελέτη των Suzuki et al (2012)¹⁸⁰ θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT (Ser473) βρέθηκε στο 51% (24/47) των κακοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων και οι ιστολογικοί τύποι στους οποίους παρατηρήθηκε συχνότερα ήταν το βλεννοεπιδερμοειδές (6/7) και το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα (3/5).¹⁸⁰ Επιπλέον, οι ίδιοι συγγραφείς (Suzuki et al, 2012)¹⁸⁰ ανέφεραν ότι στο 58% των περιπτώσεων τους παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του EGFR και στο 50%

ενεργοποίηση του HER2, πιθανολογώντας ότι η ενεργοποίηση της AKT προκαλείται από την ανιούσα σηματοδότηση μέσω EGFR/HER2.¹⁸⁰

Οι de Lima Mde et al (2009)¹⁸⁶ έδειξαν ότι η pAKT εκφράζεται μέτρια ή και ισχυρά σε 19 από τα 22 μελετώμενα αδενοειδή κυστικά καρκινώματα. Οι συγγραφείς πιθανολογούν ότι η ενεργοποίηση της pAKT στο αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα μπορεί να επάγει τη μεταφορά του MDM2 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με αποτέλεσμα την αποδόμηση του p53.¹⁸⁶

Παρόμοιος μηχανισμός δράσης έχει προταθεί και για τα καλοήγη νεοπλασμάτα των σιαλογόνων αδένων. Σε μελέτη των Marques et al (2008)¹⁸⁷ έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της pAKT στο 70% των πλειόμορφων αδενωμάτων και σε όλα τα μυοεπιθηλιώματα.¹⁸⁷ Ενδείξεις για το λειτουργικό ρόλο της pAKT στην ογκογένεση των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων έχουν προέλθει επίσης από πειράματα των Hara et al (2008)¹⁸⁸ όπου η αναστολή της AKT καταργεί την προκαλούμενη από EGF ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων.¹⁸⁸

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει τη φωσφορυλίωση της AKT στη θέση Ser473, διαπιστώθηκε ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT εντοπιζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων των σιαλογόνων αδένων. Από τους διάφορους ιστολογικούς τύπους των κακοήθων νεοπλασμάτων, το πολύμορφο χαμηλής κακοήθειας αδenoκαρκίνωμα, το αδενοειδές κυστικό και το βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα έλαβαν το υψηλότερο συνολικό άθροισμα.

Είναι αξιοσημείωτο ότι διαφορετική εντόπιση της pAKT, πυρηνική έναντι κυτταροπλασματικής, έχει αναφερθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της λειτουργίας της.¹⁸⁹⁻¹⁹¹

Στη μελέτη των Suzuki et al (2012) ¹⁸⁰ η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAkt ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και σπανίως πυρηνική. ¹⁸⁰ Οι Ettl et al (2012) ¹⁸¹ υποστηρίζουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της τοπογραφικής ανίχνευσης της pAKT και του βαθμού κακοήθειας του νεοπλασματος. ¹⁸¹ Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι η κυτταροπλασματική έκφραση της pAKT ήταν συχνότερη σε υψηλής κακοήθειας τύπους νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων, όπως στο πορογενές καρκίνωμα (28,6%), στο αδеноκαρκίνωμα NOS (24,2%) και στο αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα (22,9%). Αντίθετα, πυρηνική εντόπιση της pAKT διαπιστώθηκε συχνότερα σε χαμηλής κακοήθειας ιστολογικούς υποτύπους, όπως στο πολύμορφο αδеноκαρκίνωμα χαμηλής κακοήθειας (80,0%), στο κυψелоκυτταρικό καρκίνωμα (74,3%) και στο βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα (70,6%). Στην ίδια μελέτη (Ettl et al 2012) ¹⁸¹ η κυτταροπλασματική εντόπιση της pAKT αναγνωρίστηκε επίσης ως δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση (ποσοστό πενταετούς επιβίωσης σε 61,7%). Αντίθετα, η πυρηνική εντόπιση συσχετίστηκε με ευνοϊκότερους προγνωστικούς παράγοντες (μικρότερη ηλικία, πρώιμο στάδιο όγκου, απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων) και υψηλότερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης (83,6%). Βάσει των παραπάνω ευρημάτων, οι συγγραφείς προτείνουν ότι η κυτταροπλασματική εντόπιση της pAKT μπορεί να αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης καθώς και εξέλιξης του όγκου, σε αντίθεση με την πυρηνική εντόπιση η οποία φαίνεται να σχετίζεται με υψηλότερη διαφοροποίηση και χαμηλότερο μεταστατικό δυναμικό. ¹⁸¹ Γενικά υπάρχουν αντικρουόμενα στοιχεία στη βιβλιογραφία σε ό,τι αφορά την προγνωστική αξία της pAKT σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Είναι πιθανό οι διαφορές αυτές να σχετίζονται με παραλλαγές στη λειτουργία και στην εντόπιση της pAKT, ανάλογα με τον τύπο της κακοήθειας.

181,192,193

Ένα από τα σημαντικότερα μόρια της σηματοδοτικής οδού mTOR είναι η πρωτεϊνική κινάση S6K1. Η S6K1 ενεργοποιείται μετά από τη φωσφορυλίωση της και στη συνέχεια επάγει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της. Η περισσότερο μελετημένη S6K1- επαγόμενη ενεργοποίηση υποστρώματος είναι η φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (συστατικό της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S).^{112,194} Η φωσφορυλιωμένη S6 (pS6) παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάφραση του mRNA, επηρεάζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Υψηλά επίπεδα της pS6 έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου.¹⁹⁵ Συγκεκριμένα, οι παραπάνω συγγραφείς ανίχνευσαν υψηλά επίπεδα της pS6 στο 88% των περιπτώσεων ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής – τραχήλου, καθώς και σε όλες τις μελετώμενες επιθηλιακές δυσπλασίες της στοματικής κοιλότητας, προτείνοντας ότι η ενεργοποίηση της S6 είναι ένα πρώιμο γεγονός κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.¹⁹⁵

Στην παρούσα μελέτη, ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 ανευρέθηκε στη συντριπτική πλειοψηφία των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων, με τα πρώτα να εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών κυττάρων και να λαμβάνουν το υψηλότερο συνολικό ανοσοϊστοχημικό άθροισμα, ενώ η έκφρασή της στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες ήταν ελάχιστη. Επιπλέον, η ενεργοποιημένη (φωσφορυλιωμένη) μορφή του μορίου (pS6) ανευρέθηκε στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων με υψηλότερη έκφραση στα κακοήθη νεοπλάσματα, ενώ στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες η έκφραση της ήταν μηδενική. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την ενεργοποίηση του άξονα σηματοδότησης mTOR/pS6 σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων,

ο ρόλος της οποίας φαίνεται να είναι ισχυρότερος σε περιπτώσεις κακοήθων όγκων.

Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας είναι οι παρατηρήσεις των Diegel et al (2012)¹⁹⁶ οι οποίοι διαπίστωσαν υψηλά επίπεδα pS6 σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις κυψελοκυτταρικών καρκινωμάτων που συσχετίστηκαν με υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένου mTOR.¹⁹⁶ Επίσης, οι Ettl et al (2012)¹⁸¹ αναφέρουν υπερέκφραση της pS6 σε περιπτώσεις καρκίνου των σιαλογόνων αδένων, η οποία ήταν συχνότερη σε υψηλής κακοήθειας τύπους, όπως πορογενές καρκίνωμα και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.¹⁸¹ Επιπλέον, η υπερέκφραση της pS6 συσχετίστηκε με δυσμενείς προγνωστικές παραμέτρους, όπως μεγάλη ηλικία, προχωρημένο στάδιο όγκου, λεμφαδενική μετάσταση, αλλά και τάση για χαμηλά ποσοστά επιβίωσης.¹⁸¹ Ανάλογες συσχετίσεις της υπερέκφρασης της pS6 με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης αναφέρονται και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως νεφρού και εγκεφάλου.^{197,198}

Ένα άλλος σημαντικός στόχος της mTOR είναι η 4EBP1, που ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών κατασταλτικών της μετάφρασης. Η mTOR φωσφορυλιώνει εκτός από την S6K1 και την 4EBP1 για συντονισμένη ρύθμιση και επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η φωσφορυλίωση της 4EBP1, η οποία δρα ως καταστολέας της μετάφρασης, επάγει την απελευθέρωσή της από τον eIF4E, επιτρέποντας στον τελευταίο να εκκινήσει τη μετάφραση. Συγκεκριμένα, όταν η 4EBP1 είναι υποφωσφορυλιωμένη ενώνεται με ισχυρό δεσμό με τον eIF4E, ενώ η φωσφορυλίωσή της αποτρέπει αυτή την ένωση αποδεσμεύοντας τον eIF4E για να ξεκινήσει η μεταφράση. Η φωσφορυλίωση του 4EBP1 γίνεται σε τέσσερις θέσεις Ser/Thr, δύο εκ των οποίων είναι ευαίσθητες στη rapamycin.^{199,200}

Στην παρούσα μελέτη, η οποία για πρώτη φορά διερεύνησε την ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 σε νεοπλάσματα σιαλογόνων αδένων, η 4EBP1 ανιχνεύθηκε σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, με τα υψηλότερα επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης να παρατηρούνται στα κακοήθη σε σύγκριση με τα καλοήθη νεοπλάσματα και τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες. Επιπλέον, η p4EBP1 (φωσφορυλιωμένη στη θέση Thr37/46) δεν παρατηρήθηκε στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες, αλλά ανιχνεύθηκε στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους κακοήθεις όγκους.

Η εντόπιση της p4EBP1 όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα των νεοπλασματικών κυττάρων στη μελέτη μας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η πυρηνική παρουσία της p4EBP1 έχει αναφερθεί και σε άλλους όγκους, όπως γαστροπαγκρεατικούς,²⁰¹ ωοθηκών,²⁰² μαστού²⁰³ και στο οφθαλμικό μελάνωμα.²⁰⁴ Έχει προταθεί ότι η πυρηνική εντόπιση της 4EBP1 μπορεί να ελέγχει την απελευθέρωση του παράγοντα eIF4E από τον πυρήνα, ο οποίος σχετίζεται με την κυτταροπλασματική έξοδο RNAs και τη συγκέντρωση τους στη μικρή ριβοσωμική μονάδα 40S για την έναρξη της μετάφρασης.²⁰¹ Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση της p4EBP1 έχει συσχετισθεί με την κακοήθη εξαλλαγή και κακή πρόγνωση ποικίλων νεοπλασμάτων.^{171,202,203} Για παράδειγμα, οι Rojo et al (2007)²⁰³ έδειξαν ότι η p4EBP1 εκφράζεται σε φτωχά διαφοροποιημένους καρκίνους μαστού και συσχετίζεται με δυσμενείς προγνωστικές παραμέτρους, όπως μέγεθος όγκου, τοπικοπεριοχική νόσο και λεμφαδενική μετάσταση.²⁰³ Επίσης, σε μελέτη των Clark et al (2010)²⁰⁵ υπερέκφραση της p4EBP1 παρατηρήθηκε στις μισές περίπου περιπτώσεις ακανθοκυτταρικού καρκίνου κεφαλής – τραχήλου, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στη ζώνη διήθησης.²⁰⁵ Επίσης, για να

περιγράφει ο ρόλος της p4EBP1 έχει προταθεί ο όρος "funnel factor", δηλαδή θεωρείται ότι η p4EBP1 αποτελεί έναν παράγοντα σύγκλισης αρκετών ανιόντων ογκογόνων σημάτων ώστε να αποτελεί έναν ιδιαίτερα χρήσιμο μοριακό δείκτη του κακοήθους δυναμικού των κυττάρων.²⁰⁶

Τέλος, σε ό,τι αφορά την eIF4E, χρησιμοποιώντας αντίσωμα που ανιχνεύει τα συνολικά ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης, διαπιστώθηκε έκφραση του μορίου στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων των σιαλογόνων αδένων, σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους φυσιολογικούς σιαλόγονους αδένες. Οι διαφορές στην έκφραση της eIF4E μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων δεν ήταν σημαντικές. Δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες που να έχουν διερευνήσει την έκφραση της eIF4E στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Όμως, υψηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της eIF4E έχουν αναφερθεί σε διάφορους συμπαγείς όγκους, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και όγκοι κεφαλής-τραχήλου, αλλά και σε κακοήγη νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού.^{199,207,208} Σε συμφωνία με τις δικές μας παρατηρήσεις, οι De Benedetti and Graff (2004)¹⁹⁹ αναφέρουν ότι τα επίπεδα της eIF4E είναι ελαττωμένα σε φυσιολογικό ιστό μαστού, αλλά είναι ιδιαίτερα αυξημένα σε καρκίνο του μαστού.¹⁹⁹ Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της eIF4E σε καρκίνο μαστού και προστάτη συσχετίζονται με φτωχή πρόγνωση και μειωμένα ποσοστά ελεύθερης νόσου και συνολικής επιβίωσης.²⁰⁸⁻²¹⁰

Επίσης, σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου η ανεύρεση αυξημένων επιπέδων eIF4E στα όρια του όγκου θεωρείται ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για υποτροπή.²¹¹ Γενικά, έχει προταθεί ότι η αξιολόγηση των επιπέδων της eIF4E μπορεί να έχει προγνωστική αξία στον καρκίνο.²⁰⁸

Υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένης eIF4E έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα, αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο η eIF4E συμμετέχει στην έναρξη και εξέλιξη της καρκινογένεσης δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.²¹²⁻²¹⁴ Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση της eIF4E έχει ως αποτέλεσμα δυσανάλογη μετάφραση συγκεκριμένων mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ογκογόνες ιδιότητες.^{212,215}

Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας δείχνουν αυξημένη έκφραση της eIF4E τόσο στα καλοήθη όσο και στα κακοήθη νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων, η οποία υποδηλώνει ότι η eIF4E συμμετέχει στην ογκογένεση των σιαλογόνων αδένων, ανεξάρτητα από την καλοήθη ή κακοήθη συμπεριφορά τους. Ωστόσο, όπως έχει προταθεί για το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής- τραχήλου, είναι δυνατόν τα αυξημένα επίπεδα της eIF4E σε συνδυασμό με τα επίπεδα της 4EBP1 να παρέχουν ακριβέστερη πρόγνωση της εξέλιξης του όγκου συγκριτικά με την αξιολόγηση της έκφρασης μόνο της eIF4E. Είναι πιθανό λοιπόν μια συνδυαστική ανάλυση των επιπέδων της eIF4E και της 4EBP1 να είναι περισσότερο χρήσιμη για τον καθορισμό της κλινικής συμπεριφοράς του όγκου.²¹⁶ Περισσότερες ερευνητικές μελέτες είναι όμως απαραίτητες προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος της eIF4E στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων.

Συνοπτικά, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να αξιολογηθούν διάφορα ανιόντα και κατιόντα μόρια της σηματοδοτικής οδού του mTOR, συγκρίνοντας κακοήθη νεοπλάσματα με καλοήθεις όγκους και φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες. Λαμβάνοντας υπόψη τη σπανιότητα των μελετώμενων νεοπλασμάτων και το συνακόλουθα σχετικά μικρό μέγεθος του εξεταζόμενου δείγματος, τα ευρήματα της παρούσας έρευνας θα πρέπει να θεωρηθούν ενδεικτικά και όχι αποδεικτικά της ενεργοποίησης της οδού mTOR στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Επίσης, δεν κατέστη δυνατή η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των διαφόρων μελετώμενων μορίων με

κλινικοπαθολογικές παραμέτρους και προγνωστικούς παράγοντες, δεδομένου ότι τα δείγματα της μελέτης προήλθαν από μερικές βιοψίες του Εργαστηρίου της Στοματολογίας και ως εκ τούτου δεν υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία για τη σταδιοποίηση και πορεία της νόσου και τα ποσοστά επιβίωσης. Με βάση όμως τις παρατηρήσεις που υποδεικνύουν σημαντική ενεργοποίηση των μορίων της σηματοδοτικής οδού του mTOR, κυρίως στην ομάδα των κακοήθων νεοπλασμάτων, προτείνεται ότι η οδός αυτή πιθανώς εμπλέκεται στην ογκογένεση των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων και συστήνεται η περαιτέρω διερεύνηση για τον καθορισμό προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα δεδομένα της ερευνητικής μας εργασίας εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η υπερέκφραση της pAKT, η οποία αποτελεί ανιόντα ενεργοποιητή της σηματοδοτικής οδού mTOR, στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων, συγκριτικά με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες, υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της στην ογκογένεση. Ειδικότερα, τα υψηλότερα επίπεδα σε κακοήθεις όγκους υποδεικνύουν την εμπλοκή της pAKT σε καρκινογόνες διεργασίες.

2. Τα αυξημένα επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των μορίων-στόχων της σηματοδοτικής οδού mTOR, συγκεκριμένα των 4EBP1 και S6 και των ενεργοποιημένων (φωσφορυλιωμένων) μορφών τους, στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες, αποτελούν ισχυρές ενδείξεις της ενεργοποίησης της οδού PI3K-AKT-mTOR. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των μορίων αυτών σε κακοήθη νεοπλάσματα υποστηρίζουν έναν πιο ενεργό ρόλο των μορίων αυτών στην καρκινογένεση.

3. Αυξημένη έκφραση της eIF4E, ενός επιπλέον κατιόντος μορίου της σηματοδοτικής οδού mTOR, σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων, είναι επίσης ενδεικτική συμμετοχής της οδού στην ογκογένεση του αδενικού επιθηλίου, πιθανώς ανεξάρτητα της κλινικής συμπεριφοράς.

4. Λαμβάνοντας υπόψη τη σπανιότητα των μελετώμενων νεοπλασμάτων και το συνακόλουθα σχετικά μικρό μέγεθος του εξεταζόμενου δείγματος, τα ευρήματα της παρούσας έρευνας θα πρέπει να θεωρούν

ενδεικτικά και όχι αποδεικτικά της ενεργοποίησης της οδού mTOR στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων.

5. Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοιχειοθετεί επαρκώς την ανάγκη για διεξοδικότερη μελέτη των μορίων της οδού PI3K-AKT-mTOR σε μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων, ιδανικά μέσω πολυκεντρικών μελετών, με σκοπό να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα για τη χρησιμότητα τους ως προγνωστικών δεικτών ή ως στόχων εξατομικευμένων μοριακών θεραπειών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων προσβάλλουν τους μείζονες ή τους ελάσσονες αδένες και αποτελούν το 3.0-6.5% του συνόλου των νεοπλασμάτων της κεφαλής και του τραχήλου. Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων με άγνωστη αιτιοπαθογένεια, ευρύ φάσμα ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών και ποικίλη βιολογική συμπεριφορά.

Η οδός σηματοδότησης mTOR ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και άλλες σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Η mTOR ενεργοποιείται από ανιόντα μόρια, όπως το Akt, και με τη σειρά της ενεργοποιεί σημαντικά μόρια στόχους, όπως η S6K1 και η 4EBP1. Η φωσφορυλίωση της S6K1 οδηγεί στην φωσφορυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6 (συστατικού της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S), ενώ η φωσφορυλίωση της 4EBP1 επάγει την απελευθέρωσή του παράγοντα eIF4E, επιτρέποντας την εκκίνηση της μετάφρασης.

Η σηματοδοτική οδός mTOR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ποικίλων νεοπλασμάτων, καθιστώντας το μόριο mTOR ελκυστικό αντικαρκινικό θεραπευτικό στόχο. Έχουν εντοπισθεί αρκετές δυσλειτουργίες των μορίων της σηματοδοτικής οδού mTOR σε διάφορα είδη καρκίνου, όπως μαστού, προστάτη, πνεύμονα, ουροδόχου κύστεως, ωοθηκών, παγκρέατος και κεφαλής- τραχήλου. Παρά τον αποδεδειγμένο ογκογενετικό της ρόλο, η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού mTOR σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού mTOR στα νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική

έκφραση σημαντικών κομβικών ανιόντων και κατιόντων μορίων της οδού mTOR σε καλοήθεις όγκους (πλειόμορφα αδενώματα) και σε διάφορους τύπους κακοηθειών των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικοί ελάσσονες σιαλογόνοι αδένες).

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 39 περιπτώσεις κακοήθων νεοπλασμάτων των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων ποικίλων ιστοπαθολογικών υποτύπων, οι οποίες συγκρίθηκαν με 13 περιπτώσεις καλοήθων όγκων (πλειομόρφων αδενωμάτων) των ελασσόνων σιαλογόνων αδένων και 8 περιπτώσεις φυσιολογικών ελασσόνων σιαλογόνων αδένων. Όλες οι παραπάνω περιπτώσεις συλλέχθηκαν από το Αρχείο του Ιστοπαθολογικού Εργαστήριο της Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Καταγράφηκαν οι διαθέσιμες πληροφορίες από τα τα παραπεμπτικά και τις ιστοπαθολογικές εκθέσεις, συμπεριλαμβάνοντας τα δημογραφικά (ηλικία, φύλο) και κλινικά στοιχεία όλων των περιπτώσεων και έγινε επιβεβαίωση της ιστοπαθολογικής διάγνωσης με επανεξέταση - επαναξιολόγηση των πλακιδίων αιματοξυλίνης- ηωσίνης, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του WHO 2005 για την ταξινόμηση των όγκων των σιαλογόνων αδένων.

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης συγκεκριμένων μορίων της οδού mTOR σε τομές από τους κύβους παραφίνης όλων των περιπτώσεων, χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοϊστοχημείας και τα παρακάτω αντισώματα: phospho-AKT (Ser473), 4E-BP1, phospho-4E-BP1 (Thr37/46), S6 Ribosomal Protein, phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) και eIF4E. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση όλων των αντισωμάτων

αξιολογήθηκε με ημιποσοτικό τρόπο, σύμφωνα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων: (0) 0%, (1) <20%, (2) 20-50% and (3) >50%, και την ένταση της χρώσης: (0), καθόλου χρώση, (1) ασθενής χρώση, (2) μέτρια χρώση, (3) έντονη χρώση. Επιπλέον υπολογίσθηκε το συνολικό άθροισμα (0, 2-6), ως το άθροισμα των βαθμών του ποσοστού και της έντασης.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων (ποσοστό, ένταση, συνολικό άθροισμα) για όλα τα μόρια στο σύνολο των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων και της ομάδας ελέγχου με τις μη παραμετρικές δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Mann-Whitney's. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Spearman's test για τη συσχέτιση της έκφρασης των μορίων. Όλα τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $p \leq 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 και της p4EBP1

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της 4EBP1 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και σπανίως πυρηνική και παρατηρήθηκε στο 100% των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων και στο 87,5% της ομάδας ελέγχου.

Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 2,67, 2,31 και 4,97 στα κακοήθη νεοπλάσματα, 1,77, 1,54 και 3,31 στα καλοήθη νεοπλάσματα και 1,38, 0,88 και 2,25 στην ομάδα ελέγχου. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων ($p < 0,05$), κακοήθων νεοπλασμάτων και ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$) και καλοήθων νεοπλασμάτων και ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p4EBP1 ήταν κυτταροπλασματική και πυρηνική και παρατηρήθηκε στο 97,4% των κακοήθων νεοπλασμάτων και στο 100% των καλοήθων νεοπλασμάτων, ενώ ήταν αρνητική σε όλες τις περιπτώσεις της ομάδας ελέγχου. Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 2,59, 2,05 και 4,64 στα κακοήθη νεοπλάσματα και 1,69, 1,38 και 3,08 στα καλοήθη νεοπλάσματα. Ο στατιστικός έλεγχος έδειξε υψηλότερες τιμές στα κακοήθη νεοπλάσματα συγκρινόμενα με τα καλοήθη ($p<0,05$) και τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες ($p<0,05$), όπως επίσης και στα καλοήθη σε σχέση με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες ($p<0,05$).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 και της pS6

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της S6 ήταν κυτταροπλασματική και παρατηρήθηκε σε ποσοστό 100% στα κακοήθη νεοπλάσματα, 92,3% στα καλοήθη και 37,5% στους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες. Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 2,46, 2,15 και 4,62 στα κακοήθη νεοπλάσματα, 1,54, 1,77 και 3,31 στα καλοήθη και 0,63, 0,50 και 1,13 στους φυσιολογικούς αδένες.

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων ($p<0,05$) και το συνολικό άθροισμα ($p<0,05$) μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για όλες τις παραμέτρους (ποσοστό, ένταση και συνολικό άθροισμα) μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p<0,05$), όπως επίσης και μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p<0,05$).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pS6 ήταν κυτταροπλασματική και ανιχνεύθηκε στο 95% των κακοήθων και 76,9% των καλοήθων

νεοπλασμάτων. Στους φυσιολογικούς ελάσσονες αδένες, η έκφραση της pS6 υπήρξε αρνητική σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις.

Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 2,31, 2,8 και 4,59 στα κακοήθη και 0,92, 0,85 και 1,77 στα καλοήθη νεοπλάσματα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων ($p < 0,05$), όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p < 0,05$) και μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p < 0,05$).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της pAKT ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και διαπιστώθηκε σε ποσοστό 100% των κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων και σε ποσοστό 75% των φυσιολογικών ελασσόνων σιαλογόνων αδένων. Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 2,69, 2,38 και 5,08 στα κακοήθη νεοπλάσματα, 2,23, 2,00 και 4,23 στα καλοήθη νεοπλάσματα και 1,10, 1,00 και 2,10 στους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων όσο αφορά στο ποσοστό θετικών κυττάρων ($p < 0,05$) και στο συνολικό άθροισμα ($p < 0,05$), όπως και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών αδένων ($p < 0,05$) ή καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών αδένων ($p < 0,05$) για όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της eIF4E

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της eIF4E ήταν κυτταροπλασματική. Διαπιστώθηκε θετική στο 76,9% των κακοήθων νεοπλασμάτων, στο

69,2% των καλοήθων νεοπλασμάτων και σε μία μόνο περίπτωση (12,5%) της ομάδας ελέγχου. Οι μέσες τιμές για το ποσοστό των θετικών κυττάρων, την ένταση της χρώσης και το συνολικό άθροισμα ήταν 1,18, 1,23 και 2,41 στα κακοήθη νεοπλάσματα, 1,08, 1,15 και 2,23 στα καλοήθη νεοπλάσματα και 0,13, 0,13 και 0,25 στους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ κακοήθων και καλοήθων νεοπλασμάτων. Αντίθετα, στατιστικά σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ καλοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p<0,05$), όπως επίσης και μεταξύ κακοήθων νεοπλασμάτων και φυσιολογικών σιαλογόνων αδένων ($p<0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρά τον αποδεδειγμένο ογκογενετικό ρόλο της mTOR σηματοδότησης, λίγες δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες αναφέρονται στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού mTOR σε νεοπλάσματα των σιαλογόνων αδένων. Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση κομβικής σημασίας συστατικών της οδού mTOR σε κακοήθη και καλοήθη νεοπλάσματα ελασσόνων σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους αδένες. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα τόσο ανιόντων ρυθμιστών (pAKT), όσο και κατιόντων μορίων-στόχων (4EBP1, S6 και eIF4E) και διαπιστώθηκε η έκφραση και ενεργοποίησή τους σε όγκους των σιαλογόνων αδένων. Παρατηρήθηκε ότι τα μελετώμενα μόρια εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα νεοπλάσματα (καλοήθη και κακοήθη) των σιαλογόνων αδένων σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς σιαλογόνους αδένες, όπως επίσης και στα κακοήθη νεοπλάσματα σε σύγκριση με τα καλοήθη. Η προοδευτική αυτή αύξηση της έκφρασης και ενεργοποίησης της mTOR σηματοδότησης από τους φυσιολογικούς ελάσσονες σιαλογόνους

αδένες προς τα κακοήθη νεοπλάσματα αποτελεί ισχυρή ένδειξη συμμετοχής στις ογκογόνες διεργασίες του αδενικού επιθηλίου. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τον καθορισμό mTOR-σχετιζόμενων προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων που ενδεχομένως λαμβάνουν μέρος στην ογκογένεση των νεοπλασμάτων των σιαλογόνων αδένων.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Summary

INTRODUCTION

Salivary gland tumors (SGTs) affect major or minor salivary glands (SGs), and represent 3.0-6.5% of all head and neck tumors. SGTs are a heterogeneous group of neoplasms with unknown etiology and pathogenesis, broad histopathologic spectrum and variable biological behavior. mTOR signaling pathway controls cell growth, survival, proliferation and other important cell functions. mTOR is activated by upstream molecules, such as Akt, and in turn activates important target molecules, such as S6K1 and 4EBP1. mTOR-induced S6K1 phosphorylation leads to phosphorylation of S6 (40S ribosomal protein component), whereas 4EBP1 phosphorylation causes dissociation of 4EBP1 from eIF4E, thus allowing for initiation of the protein translation machinery.

The mTOR signaling pathway plays an important role in tumorigenesis of several neoplasms, making mTOR an attractive target for cancer therapy. Dysregulation of the mTOR signaling pathway has been documented in a variety of human cancers, such as breast, prostate, lung, urinary bladder, ovarian, pancreatic and head and neck. Despite the confirmed role of mTOR signaling pathway in carcinogenesis, there is limited information about the involvement of this pathway in SG neoplasms.

The aim of this study was to investigate the activation of mTOR signaling pathway in SG neoplasms. In particular, the immunohistochemical expression of important upstream and downstream mTOR molecules was studied in benign (pleomorphic

adenomas) and malignant SGTs (of several histopathologic subtypes), compared to control group (normal minor SGs).

MATERIALS AND METHODS

This study's material consisted of 39 malignant minor SGTs of various histologic subtypes, which were compared with 13 benign minor SGTs (pleomorphic adenomas) and 8 control cases of normal minor SGs. All cases were collected from the archives of the Department of Oral Medicine and Pathology, Dental School, University of Athens. Patient available information from biopsy submission forms and histopathological reports were reviewed and information on demographics (age, sex) and clinical features were recorded. H&E sections of each tumor were reviewed to confirm the histopathological diagnosis, according to the criteria of WHO 2005 for SGT classification.

Immunohistochemical protein expression of specific molecules of mTOR pathway was assessed in sections of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using an automated immunohistochemistry system by applying the following antibodies: phospho-AKT (Ser473), 4E-BP1, phospho-4E-BP1 (Thr37/46), S6 Ribosomal Protein, phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) and eIF4E.

Immunohistochemical reactivity for all stains was graded in a semi-quantitative manner according to the percentage of positive cells: (0) 0%, (1) <20%, (2) 20-50% and (3) >50%, and the intensity of staining: (0) no staining, (1) weak, (2) moderate, or (3) strong. Moreover, a combined score of immunohistochemical positivity (0, 2-6) was calculated by adding the individual scores for percentage of positive cells and intensity of staining.

Statistical analysis was performed: immunohistochemical scores (intensity, positivity and total scores) for all molecules were evaluated

and compared among malignant and benign neoplasms and normal SG tissues using the non-parametric Kruskal Wallis and Mann Whitney tests. Moreover, nonparametric Spearman's test was used for correlation of the expression of various molecules. All statistical differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Immunohistochemical Expression of 4EBP1 and p4EBP1

4EBP1 exhibited mainly cytoplasmic and occasionally nuclear immunoreactivity and was observed in 100% of malignant and benign SGTs and in 87.5% of control cases. The mean positivity, intensity and total scores for 4EBP1 were 2.67, 2.31, 4.97 in malignant cases, 1.77, 1.54, 3.31 in benign cases and 1.38, 0.88 and 2.25 in control cases, respectively.

Statistical analysis revealed significant differences between malignant and benign neoplasms ($p < 0.05$), malignant and control cases ($p < 0.05$), and benign and control cases ($p < 0.05$).

Immunohistochemical expression of p4EBP1 was both cytoplasmic and nuclear and was found in 97.4% of malignant cases and in 100% of benign cases, while it was negative in all control cases. The mean positivity, intensity, and total scores for p4EBP1 were 2.59, 2.05, 4.64 in malignant neoplasms, and 1.69, 1.38, and 3.07 in benign tumors, respectively.

Statistical analysis revealed significant higher levels in malignant SGTs compared to benign SGTs ($p < 0.05$) and normal SGs ($p < 0.05$), as well as in benign SGTs compared to normal SGs ($p < 0.05$).

Immunohistochemical Expression of S6 and pS6

S6 immunohistochemical expression was cytoplasmic, observed in 100% of malignant SGTs, 92.3% of benign SGTs and 37.5% of normal SGs.

The mean positivity, intensity, and total scores for S6 were 2.46, 2.15 and 4.61 in malignant cases, 1.54, 1.77, and 3.31 in benign tumors and 0.63, 0.50, and 1.13 in normal SGs, respectively.

Statistical analysis revealed significant differences between malignant and benign cases regarding positivity ($p<0.05$) and total score ($p<0.05$). Significant differences were also observed between malignant SGTs and normal SGs regarding intensity, positivity and total score ($p<0.05$), as well as between benign SGTs and normal SG ($p<0.05$).

pS6 immunohistochemical expression was cytoplasmic, detected in 95% of malignant tumors and 76.9% of benign cases. All studied normal SG were negative. The mean scores for positivity, staining intensity and total score were 2.31, 2.28 and 4.59 in malignant cases and 0.92, 0.85 and 1.77 in benign tumors, respectively.

Statistical significant differences were noticed between malignant and benign tumors ($p<0.05$), between malignant cases and normal SGs ($p<0.05$), as well as between benign tumors and normal SG ($p<0.05$).

Immunohistochemical Expression of pAKT

Immunohistochemical expression of pAKT was predominantly cytoplasmic and was detected in 100% of all benign and malignant tumors and in 75% of normal SGs.

The mean positivity, intensity, and total scores for pAKT were 2.69, 2.38 and 5.07 in malignant cases, 2.23, 2.00, and 4.23 in benign SGTs, and 1.10, 1.00 and 2.10 in normal SGs, respectively.

Statistical significant differences were found regarding positivity ($p<0.05$) and total scores ($p<0.05$) between malignant and benign SGTs, as well as between malignant and normal SG ($p<0.05$) and between benign and normal SG ($p<0.05$) in all studied cases.

Immunohistochemical Expression of eIF4E

eIF4E was expressed in the cytoplasm. Positive immunostaining was expressed in 76.9% of malignant tumors, 69.2% of benign cases and in a single control case (12.5%). The mean positivity, intensity, and total scores were 1.18, 1.23, and 2.41 in malignant cases, 1.08, 1.15 and 2.23 in benign tumors, and 0.13, 0.13 and 0.25 in normal SGs, respectively.

Statistical analysis revealed no significant differences between malignant and benign tumors. In contrast, there were significant differences between benign tumors and normal SG ($p<0.05$), as well as between malignant cases and normal SG ($p<0.05$).

DISCUSSION – CONCLUSIONS

Despite the evidence in favor of mTOR signaling pathway involvement in various oncogenic processes, only a few published studies have investigated mTOR signaling activation in SGTs. In this study, the immunohistochemical expression of crucial components of the mTOR pathway was investigated in benign and malignant SGTs compared to normal SGs. Specifically, the levels of the upstream activator (pAKT) and the downstream substrates (4EBP1, S6 and eIF4E) were assessed and found to be expressed and activated in SGTs.

Higher expression levels were observed for all studied molecules in neoplastic tissues (benign and malignant) compared to normal SGs, as well as in malignant compared to benign tumors. This progressive increased expression and activation of mTOR-related molecules from normal minor salivary glands to malignant tumors strongly suggests their involvement in oncogenic processes of glandular epithelium. Further

investigation is needed to determine mTOR-related prognostic markers and therapeutic targets that may take part in SG tumorigenesis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pires FR, Pringle GA, de Almeida OP, Chen SY. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol.* 2007;43:463-70.
2. Toida M1, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi A, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases.. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34:528-32.
3. Pons Vicente O, Almendros Marqués N, Berini Aytés L, Gay Escoda C. Minor salivary gland tumors: A clinicopathological study of 18 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:582-588
4. Otoh EC, Johnson NW, Olasoji H, et al. Salivary gland neoplasms in Maiduguri, north-eastern Nigeria. *Oral Dis.* 2005;11:386–391.
5. Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;74:134-48.
6. Ten Cate A.R: Salivary glands. In: Ten Cate A.R, *Oral Histology*: Mosby 1998:319-326
7. Ellis GL, Auclair PL: The normal salivary gland. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, ed. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*, Philadelphia: WB Saunders; 1991:1-26.
8. Stenens A., Lowe J. Μετάφραση Κίττας Χ. Πεπτική Οδός. In: *Human Histology* 2η έκδοση Αθήνα 1998: 188-120
9. Copelli C, Bianchi B, Ferrari S, Ferri A, Sesenna E. Malignant tumors of intraoral minor salivary glands. *Oral Oncol.* 2008;44: 658-63.
10. RJ Bensadoun, MP Blanc-Vincent, P Chauvel, O Dassonville, G Gory-Delabaere and F Demard: Malignant tumours of the salivary glands *British Journal of Cancer* 2001; 84(Supplement 2): 42–48
11. Stenman G, Persson F, Andersson MK. Diagnostic and therapeutic implications of new molecular biomarkers in salivary gland cancers. *Oral Oncol* 2014;50:683-90.

12. Stenner M, Klusmann JP. Current update on established and novel biomarkers in salivary gland carcinoma pathology and the molecular pathways involved. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266: 333-41
13. Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, Vencio EF. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol*. 2009;3:271-5.
14. Satko I, Stanko P, Longauerová I. Salivary gland tumours treated in the stomatological clinics in Bratislava. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000;28:56–61.
15. Lima SS, Soares AF, Amorim RF, et al. Epidemiologic profile of salivary gland neoplasms: analysis of 245 cases. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005;71:335–340.
16. Williams NP, Boyd DL, Choy L, et al. Salivary gland lesions: a Jamaican perspective. *West Indian Med J*. 2001;50:62–65.
17. Vargas PA, Gerhard R, Araujo Filho VJ, et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57:271–276.
18. Ito FA, Ito K, Vargas PA, et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;34:533–536.
19. Ansari MH. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:2187–2194.
20. Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, Homøe P, Sørensen CH, Andersen E, Bundgaard T, Primdahl H, Lambertsen K, Andersen LJ, Godballe C. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA).
21. Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39:235-42
22. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol*. 1985 ;146:51-8.

23. Waldron CA, el-Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;66:323-33.
24. Ellis GL, Wiscovitch JG Basal cell adenocarcinomas of the major salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:461-9.
25. Lukšić I, Virag M, Manojlović S, Macan D. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011 Jun 3. *Oral Oncol.* 2011;47:677-82.
26. Seifert G, Sobin LH. The World Health Organization's histological classification of salivary gland tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1992;70:379–385.
27. Eveson JW, Auclair PL, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumours of the salivary glands. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, (eds). *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours.* Lyon: IARC pp 209-81. *Maxillofac Surg.* 2005;34:528-32.
28. Ellis GL, Auclair PL, editors. Tumors of the salivary glands. *AFIP atlas of tumor pathology, 4th series, fascicle 9.* Silver Spring, MD: ARP Press; 2008
29. Hocwald E, Yoo GH, Adsay V, et al. Prognostic factors in major salivary gland cancer. *Laryngoscope* 2001;111:1434–9.
30. Lima RA, Tavares MR, Dias FL, et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133:702–8.
31. Batsakis JG, editor. Tumours of the head and neck. Clinical and pathological considerations. 2nd ed. Baltimore/London: Williams & Wilkins; 1982
32. Gondivkar, S.M.; Gadgail, A.R.; Chole, R.; Parikh, R.V. Adenoid cystic carcinoma: A rare clinical entity and literature review *Oral Oncology* 2011;47:231-236
33. Khan AJ, DiGiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter D, Son YH, et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001;96:149–58.

34. Chummun S, McLean NR, Kelly CG, Dawes PJD, Meikle D, Fellows S, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Br J Plast Surg* 2001;54:476–80.
35. Wiseman SM, Popat SR, Rigual NR, Hicks WL, Orner JB, Wein RO, et al. Adenoid cystic carcinoma of the paranasal sinuses or nasal cavity: a 40-year review of 35 cases. *Ear Nose Throat J* 2002;81:510–8.
36. van der Wal JE, Becking AG, Snow GB, van der Waal I. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck* 2002;24:779–83.
37. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma: factors influencing survival. *Am J Surg* 1979;138:579–83.
38. Bradley PJ. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12:127–32.
39. Jones AS, Hamilton JW, Rowley H, Husband D, Helliwell TR. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 1997;22:434–43.
40. Spiro RH. Distant metastases in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. *Am J Surg* 1997;174:495–8.
41. Seethala RR, Hunt JL, Baloch ZW, Livolsi VA, Leon Barnes E. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1683–94.
42. Huang M, Ma D, Sun K, Yu G, Guo C, Gao F. Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26:435–9.
43. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW. Adenoid cystic carcinoma of salivary origin: a clinicopathologic study of 242 cases. *Am J Surg* 1974;128:512–20.
44. Eby LS, Johnson DS, Baker HW. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1972;29:1160–8.
45. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar A, Goepfert H. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:

149–52.

46. Hashimoto S, Takahashi H, Okamoto M, Yao K, Nakayama M, Makoshi T, et al. Prognostic factors of head and neck adenoid cystic carcinoma: quantitative morphological analysis of 19 cases. *Acta Otolaryngol* 2002;547(S):93–6.
47. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands. *Cancer* 1978;42:265–82.
48. Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg* 1992;164:623–8.
49. Batsakis JG, Luna MA, El-Naggar A. Histopathological grading of salivary gland neoplasms: III. Adenoid cystic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:1007–9.
50. Garden AS, Weber RS, Morrison WH, Kian Ang KK, Peters LJ. The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32(3): 619–26.
51. Spiers A., Esseltine D., Ruckdeschel J., Davies J. And Horton J. Metastatic adenoid cystic carcinoma of salivary glands: Case report and review of the literature. *Cancer Control* 1996;3:336–342
52. Stell PM., Cruickshank AH., Stoney PJ., McCormick MS. Lymph node metastases in adenoid cystic carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 1985;6:433–6
53. Cai Q, Zhang R2, Wu G, Dong X. Adenoid cystic carcinoma of submandibular salivary gland with late metastases to lung and choroid: a case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Sep; 72:1744–55
54. Oplatek A., Ozer E., Agrawal A., Bapna S., Schuller D.E. Patterns of recurrence and survival of head and neck adenoid cystic carcinoma after definitive resection. *Laryngoscope*. 2010;120:65–70.
55. Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncol*. 2006 ; 42:759–69.

56. Stewart F., Foote F.J. and Becker W. Mucoepidermoid tumors of the salivary glands. *Ann. Surg.* 1945;122:820-840
57. Mario A. Luna, MD. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: Revisited *Adv Anat Pathol* 2006;13:293-307
58. Jakobsson PA, Blanck C, Encroth CM. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Cancer.* 1968;22:111-124.
59. Healey WV, Perzin KH, Smith L. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. *Cancer.* 1970;26:368-388.
60. Spiro RH, Huvos AG, Berk R, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin. A clinicopathologic study of 367 cases. *Am J Surg.* 1978;136:461-468.
61. Fonseca I, Clode AL, Soares J. Mucoepidermoid carcinomas. A survey of 43 cases. *Int J Surg Pathol.* 1993;1:3-12.
62. Plambek K, Friedrich RE, Heller D, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinical data and follow-up of 52 cases. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122:177-180.
63. Guzzo M, Andreola S, Sirizotti G, et al. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol.* 2002;9:688-695.
64. Foote FW, Frazell EI. Tumors of the major salivary glands. *Cancer.* 1953;6:1065-1133.
65. Ellis GL, Auclair PL. Tumor of the Salivary Glands. In *Atlas of Tumor Pathology*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996;155-175, 353-355.
66. Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, eds. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia: WB Saunders; 1991;269-298.
67. Saku T, Hayashi Y, Takahara O, et al. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors. *Cancer.* 1997;79:1465-1475.
68. Whatley WS, Thompson JW, Rao B. Salivary gland tumors in survivors of childhood cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;134:385-388.

69. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A et al (2001). Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol* 25: 835–845.
70. Triantafyllidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis*. 2006;12:364-70.
71. Kolokythas A, Connor S, Kingsoo D, Fernandes RP, Ord RA. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary glands with cervical metastasis: report of 2 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68:1396-9.
72. Saku T, Hayashi Y, Takahara O, et al. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors. *Cancer*. 1997;79:1465–1475.
73. Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol*. 2006;13:293-307.
74. Evans HL. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a study of 69 cases with special attention to Histologic grading. *Am J Clin Pathol*. 1984;81:696–701.
75. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA, Katsilieris I, Patsouris E. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol*. 2007;43:130-6.
76. Boahene DK, Olsen KD, Lewis JE, Pinheiro AD, Pankratz VS, Bagniewski SM. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: the Mayo clinic experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 ; 130:849-56.
77. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*. 1992 15;69:2021-30.
78. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, Urken ML, Gnepp DR, Huvos A, Lumerman H, Mills SE. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80

patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:835-45.

79. Clode AL, Fonseca I, Santos JR, Soares J. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a reappraisal of the influence of tumor differentiation on prognosis. *J Surg Oncol* 1991;46: 100–6.

80. Guimaraes DS, Amaral AP, Prado LF, et al: Acinic cell carcinoma of salivary glands: 16 cases with clinicopathologic correlation. *J Oral Pathol Med* 1989;18:396-399.

81. Hamper K, Mausch HE, Caselitz J, et al: Acinic cell carcinoma of the salivary glands: The prognostic relevance of DNA cytophotometry in a retrospective study of long duration (1965–1987). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69:68-75.

82. Ellis GL, Auclair PL: Acinic cell adenocarcinoma. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, ed. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*, Philadelphia: WB Saunders; 1992:81-90.

83. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW: Acinic cell carcinoma of salivary origin: A clinicopathologic study of 67 cases. *Cancer* 1978;41:924-935.

84. Ellis GL, Corio RL: Acinic cell carcinoma: A clinicopathologic analysis of 294 cases. *Cancer* 1983;52:542-549

85. Angeles-Angeles A, Caballero-Mendoza E, Tapia-Rangel B, et al: Giant acinic cell adenocarcinoma with papillary-cystic pattern of the parotid gland. *Rev Invest Clin* 1998;50:245-248.

86. Abrams AM, Cornyn J, Scofield LS: Acinic cell adenocarcinoma of the major salivary glands: A clinicopathologic study of 77 cases. *Cancer* 1965; 18:1145-1162.

87. Perzin KH, LiVolsi VA: Acinic cell carcinomas arising in salivary glands: A clinicopathologic study. *Cancer* 1979;44:1434-1457.

88. Lewis JE, Olsen KD, Weiland LH: Acinic cell carcinoma: Clinicopathologic review. *Cancer* 1991;67:172-179.

89. Freedman PD, Lumerman H: Lobular carcinoma of intraoral minor salivary gland origin: Report of twelve cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56:157-165.

90. Batsakis JG, Pinkston GR, Luna MA, et al: Adenocarcinomas of the oral cavity: A clinicopathologic study of terminal duct carcinomas. *J Laryngol Otol* 1983; 97:825-835.
91. Castle JT, Thompson LDR, Frommelt RA, et al: Polymorphous low grade adenocarcinoma (PLGA): A clinicopathologic study of 164 cases. *Cancer* 1999;86:207-219.
92. Gnepp DR, Chen JC, Warren C: Polymorphous low grade adenocarcinoma of minor salivary gland: A immunohistochemical and clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol* 1988;12:461-468.
93. Simpson RHW, Reis-Filho JS, Pereira EM, et al: Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands with transformation to high-grade carcinoma. *Histopathology* 2002;41:250-259.
94. Paleri V, Robinson M, Bradley P. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;16:163-9.
95. Evans HL, Luna MA: Polymorphous low-grade adenocarcinoma a study of 40 cases with long-term follow up and an evaluation of the importance of papillary areas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1319-1328.
96. Vincent SD, Hammond HL, Finkelstein MW: Clinical and therapeutic features of polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:41-47.
97. Nagao T, Gaffey TA, Kay PA, et al: Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the major salivary glands: Report of three cases in an unusual location. *Histopathology* 2004;44:164-171.
98. Kumar M, Stivaros N, Barrett AW, et al: Polymorphous low-grade adenocarcinoma a rare and aggressive entity in adolescence. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;42:195-199.
99. Eveson JW, Cawson RA. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. *J Oral Pathol*. 1985;14:500-9.
100. Spiro RH, Huvos AG, Strong EW: Adenocarcinoma of salivary origin. Clinicopathologic study of 204 patients. *Am J Surg* 1982;144:423-431.

101. Auclair PL, Ellis GL: Adenocarcinoma, not otherwise specified. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR, ed. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*, Philadelphia: WB Saunders; 1991:318-332.
102. Matsuba HM, Mauney M, Simpson JR, et al: Adenocarcinomas of major and minor salivary gland origin: A histopathologic review of treatment failure patterns. *Laryngoscope* 1988;98:784-788.
103. Ellis GL, Auclair PL: Malignant epithelial neoplasms. In: Ellis GL, Auclair PL, ed. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Salivary Glands*, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996:337-343.
104. Li J, Wang BY, Nelson M, et al: Salivary adenocarcinoma, not otherwise specified: A collection of orphans. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1385-1394.
105. Skalova A, Sima R, Kaspirkova-Nemcova J, Simpson RH, Elmberger G, Leivo I, Di Palma S, Jirasek T, Gnepp DR, Weinreb I, Perez-Ordoñez B, Mukensnabl P, Rychly B, Hrabal P, Michal M. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin principally affecting the tongue: characterization of new entity. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:1168-76.
106. Wahlberg P, Anderson H, Björklund A, et al: Carcinoma of the parotid and submandibular glands a study of survival in 2465 patients. *Oral Oncol* 2002; 38:706-713.
107. Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Res*. 2007;17:666-81
108. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991;253:905-909.
109. Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 1993;73:585-596 .
110. Brown, E.J., Beal, P.A., Keith, C.T., Chen, J., Shin, T.B., and Schreiber, S.L. 1995. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995;377: 441–446.
111. Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. 1994. RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in

a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994;78: 35–43.

112. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004;18:1926-45

113. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3:371-7

114. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.

115. David A. Guertin and David M. Sabatini. Defining the Role of mTOR in Cancer *Cell* 2007;12:9-22.

116. Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res.* 2011;2011:329098.

117. B. N. Desai, B. R. Myers, and S. L. Schreiber. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002 ; 99:4319-24.

118. R. M. Drenan, X. Liu, P. G. Bertram, and X. F. S. Zheng. FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 2004;279:772-8.

119. X. Liu and X. F. S. Zheng. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol Biol Cell.* 2007;18:1073-82.

120. Bachmann, R.A., Kim, J.H., Wu, A.L., Park, I.H., and Chen, J. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2006;281: 7357–7363.

121. Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M.C., Rafii, S., and Pandolfi, P.P. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 2006; 442:779–785.

122. Andrade, M.A. and Bork, P. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* 1995;11:115-6.
123. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:5834–5845
124. Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L.. FAT: A novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 2000;25:225–22
125. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* 2010;38:768-74
126. Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S. and Sabatini, D. M. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009;137:873-886.
127. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J. and Yonezawa, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-189
128. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A. and Lawrence, J. C., Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 2007;282:20036-20044
129. Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A. and Sabatini, D. M. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* 2006;16:1865-1870.
130. Thedieck, K., Polak, P., Kim, M. L., Molle, K. D., Cohen, A., Jeno, P., Arriemerlou, C. and Hall, M. N. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. 2007;2: e1217.
131. Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard, and D. M. Sabatini. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* 2006;22:159-168.
132. Shomit Sengupta, Timothy R. Peterson, David M. Sabatini

Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*. 2010;40:310–322.

133. Ekim B, Magnuson B, Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Feener EP, Fingar DC. mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2011;31:2787-801.

134. Irantzu Tato, Ramon Bartrons, Francesc Ventura, and Jose Luis Rosa. Amino Acids Activate Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt Signaling. *The journal of biological chemistry* 2011;286:6128–6142.

135. K G. Foster and D C. Fingar. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony. *J Biol Chem*. 2010;285:14071–14077.

136. Harrington, L. S., Findlay, G. M. and Lamb, R. F. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem. Sci*. 2005;30:35-42.

137. Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L. and Sabatini, D. M. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008;320:1496-1501

138. Vander Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J. and Kim, D. H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol*. 2007;9:316-323.

139. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009;136:521-534.

140. Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P. Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L. et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:14238-1424

141. Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:362-9.

142. Thomas, G.. An encore for ribosome biosynthesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol*. 2000;2:71–72.

143. Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Julich K, Blenis J. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*. 2008;133:303–313.
144. Richter, J. D. and Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005;433:477–480
145. Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Dev*. 2001;15:807–826.
146. Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:913–963.
147. Miron, M., Verdu, J., Lachance, P.E., Birnbaum, M.J., Lasko, P.F., and Sonenberg, N. The translational inhibitor 4EBP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell. Biol* 2001;3: 596–601
148. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwieka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieczyska A, Aebersold R, and Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 2001;15:2852–2864.
149. Codogno, P. and Meijer, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12:1509–1518.
150. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN .TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;12:471–84.
151. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol Cell*. 2010;39:171–183
152. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1993; 75:187–197.
153. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature*.2007;450:736–740.

154. Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:79-90.
155. Manning, B. D. and Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-1274.
156. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-1101.
157. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 2004;14:1296-1302.
158. Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10:479-98.
159. David A. Guertin. An expanding role for mTOR in cancer *Trends in Molecular Medicine* 2005;11:353-361
160. David O., Jett, J., LeBeau, H., Dy, G., Hughes, J., Friedman, M. and Brody, A.R. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10:6865-6871.
161. Zhou, X., Tan, M., Stone Hawthorne, V., Klos, K.S., Lan, K.H., Yang, Y., Yang, W., Smith, T.L., Shi, D. and Yu, D. Activation of the Akt/ mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:6779- 6788.
162. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 2005;65:9953-61.
163. H. Populo, J M Lopes and P Soares. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:1886-1918
164. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:729-34

165. Wang X, Proud CG. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J Mol Cell Biol.* 2011;3:206-20
166. Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther* 2015;146:53-60.
167. Clauditz TS, Gontarewicz A, Bokemeyer C, Sauter G, Knecht R, Münscher A, Wilczak W. Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors - potentials as therapy target? *J Oral Pathol Med* 2013;42:769-773.
168. Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:169-176.
169. Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther* 2014;142:164-175.
170. Tang KD, Ling MT. Targeting drug-resistant prostate cancer with dual PI3K/mTOR inhibition. *Curr Med Chem* 2014;21:3048-3056.
171. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, Adamopoulos C, Fragkou P, Boviatsis E, Thymara I, Trigka EA, Sakellariou S, Kavantzias N, Patsouris E, Saetta AA. Phosphorylated 4E-binding protein 1 (p-4E-BP1): a novel prognostic marker in human astrocytomas. *Histopathology* 2012;61:293-305.
172. Bagrodia A, Krabbe LM, Gayed BA, Kapur P, Bernstein I, Xie XJ, Wood CG, Karam JA, Weizer AZ, Raman JD, Remzi M, Rioux-Leclercq N, Haitel A, Roscigno M, Bolenz C, Bensalah K, Sagalowsky AI, Shariat SF, Lotan Y, Margulis V. Evaluation of the prognostic significance of altered mammalian target of rapamycin pathway biomarkers in upper tract urothelial carcinoma. *Urology* 2014;84:1134-1140.
173. Haddad AQ, Kapur P, Singla N, Raman JD, Then MT, Nuhn P, Buchner A, Bastian P, Seitz C, Shariat SF, Bensalah K, Rioux-Leclercq N, Sagalowsky A, Lotan Y, Margulis V. Validation of mammalian target of rapamycin biomarker panel in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2015;121:43-50.
174. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016;109:314-341.

175. Van der Broek R, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies. *Oral Diseases* 2015;21:815-825.
176. Grzybowska- Izydorczyk O, Smolewski P. mTOR kinase inhibitors as a treatment strategy in hematological malignancies. *Future Med Chem* 2012;4: 487-504.
177. Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P, Germa C, Quadt C, Trandafir L, Aimone P, Fretault N, Dharan B, Tavorath R, Hirawat S. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *Onco Targets and Therapy* 2016;9:203-210.
178. Drakos E, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway signalling in lymphomas. *Expert Rev Mol Med.* 2008;4:10: e4.
179. Meng LH, Zheng XF. Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2015;36:1163-1169.
180. Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A. EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. *Virchows Arch* 2012;461:271-282.
181. Ettl T, Schwarz-Furlan S, Haubner F, Müller S, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Zeitler K. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. *Oral Oncol.* 2012;48:822-830.
182. Yoo J, Robinson RA. H-ras gene mutations in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Cancer* 2000;88:518–523.
183. Carnero A . The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16: 34-44.
184. Crowell JA, Steele VE, Fay JR .Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2139-2148.
185. Altomare DA, Testa JR . Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;24:7455-7464.
186. de Lima Mde D, Marques YM, Alves Sde M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. MDM2, P53, P21WAF1

and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiol* 2009;33:142-146.

187. Marques YM, de Lima Mde D, de Melo Alves Sde M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. Mdm2, p53, p21 and pAKT protein pathways in benign neoplasms of the salivary gland. *Oral Oncol* 2008;44:903-908.

188. Hara S, Nakashiro K, Goda H, Hamakawa H. Role of Akt isoforms in HGF-induced invasive growth of human salivary gland cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:123-128.

189. Prodromidis G, Nikitakis NG, Sklavounou A. Immunohistochemical analysis of the activation status of the Akt/mTOR/pS6 signaling pathway in oral lichen planus. *Int J Dent*. 2013;2013: 743456.

190. Badve S, Collins NR, Bhat-Nakshatri P, Turbin D, Leung S, Thorat M, Dunn SE, Geistlinger TR, Carroll JS, Brown M, Bose S, Teitell MA, Nakshatri H. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *Am J Pathol* 2010;176:2139-2149.

191. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T, Burman KD, De Micco C, Ringel MD. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 2004;41:161-170.

192. Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Hong SP. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1199-1205.

193. Baba Y, Nosho K, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer* 2011;117:1399-1408.

194. Ruvinsky I and Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 31: 342-348.

195. Chaisuparat R, Rojanawatsirivej S, Yodsanga S (2013). Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Pathol Oncol Res* 2006;19:189-193.

196. Diegel CR, Cho KR, El-Naggar AK, Williams BO, Lindvall C. Mammalian target of rapamycin-dependent acinar cell neoplasia after inactivation of Apc and Pten in the mouse salivary gland: implications for human acinic cell carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:9143-9152.
197. McBride SM, Perez DA, Polley MY, Vandenberg SR, Smith JS, Zheng S, Lamborn KR, Wiencke JK, Chang SM, Prados MD, Berger MS, Stokoe D, Haas-Kogan DA. Activation of PI3K/mTOR pathway occurs in most adult low-grade gliomas and predicts patient survival. *J Neurooncol* 2010;97:33-40.
198. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS, Figlin RA. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* 2007;109:2257-2267.
199. De Benedetti A and Graff JRV. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004;23:3189-3199.
200. Zhou H and Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci* 2010;11:409-424.
201. Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Röcken C, Wiedenmann B, Weichert W. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:181-192.
202. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramon y Cajal S. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 2006;107:1801-1811.
203. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jiménez J, Guzmán M, Sabadell MD, Baselga J, Ramon y Cajal S. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* 2007;13:81-89.
204. Populo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes JM. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res* 2010;20:107-117.
205. Clark C, Shah S, Herman-Ferdinand L, Ekshyyan O, Abreo F, Rong X, McLarty J, Lurie A, Milligan EJ, Nathan CO. Teasing out the best

molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. *Laryngoscope* 2010;120:1159-1165.

206. Armengol G, Rojo F, Castellví J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J, Ramón y Cajal S. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 2007; 67:7551-7555.

207. Pettersson F, Del Rincon SV, Miller WH Jr. Eukaryotic translation initiation factor 4E as a novel therapeutic target in hematological malignancies and beyond. *Expert Opin Ther Targets* 2014;18: 1035-1048.

208. Hsieh AC and Ruggero D. Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4914-4920.

209. Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, Dumstorf CA, Dowless MS, McNulty AM, Parsons SH, Brail LH, Colligan BM, Koop JW, Hurst BM, Deddens JA, Neubauer BL, Stancato LF, Carter HW, Douglass LE, Carter JH. eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res* 2009;69: 3866-3873.

210. Coleman LJ, Peter MB, Teall TJ, Brannan RA, Hanby AM, Honarpisheh H, Shaaban AM, Smith L, Speirs V, Verghese ET, McElwaine JN, Hughes TA. Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *Br J Cancer* 2009;100: 1393-1399.

211. Nathan CO, Amirghahari N, Abreo F, Rong X, Caldito G, Jones ML, Zhou H, Smith M, Kimberly D, Glass J Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res* 2004;10:5820-5827.

212. Jia Y, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR. Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. *Med Res Rev* 2012;32:786-814.

213. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:254-266.

214. Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Teruya-Feldstein J, Pelletier J, Lowe SW. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21:3232-3237.
215. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25: 6416-6122.
216. Sunavala-Dossabhoy G, Palaniyandi S, Clark C, CO, Abreo FW, Caldito G (2011). Analysis of eIF4E and 4EBP1 mRNAs in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2006;121:2136-2141.