ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΒΑΓΕΝΑΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΣΠ. ΜΠΟΝΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ

ΚΛΙΝΙΚΕΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ

**"ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ BCL-2, BAX, ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ KI-67 ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟΥ P53
ΣΕ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ
ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΚΛΑΣΣΙΚΟΥΣ
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ".**

ΘΩΜΑΣ ΜΑΚΑΤΣΩΡΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΤΡΑ 2005

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Χαράλαμπος Π. Καλόφωνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου

Πατρών

Επιβλέπων Καθηγητής

Απόστολος Γ. Βαγενάκης

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Διονύσιος Σπ. Μπονίκος

Καθηγητής Παθολογικής-Ανατομικής Πανεπιστημίου Πατρών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Χαράλαμπος Π. Καλόφωνος

Αναπλ. Καθηγητής Παθολογίας - Ογκολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Επιβλέπων Καθηγητής

Απόστολος Γ. Βαγενάκης

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Διονύσιος Σπ. Μπονίκος

Καθηγητής Παθολογικής - Ανατομικής Πανεπιστημίου Πατρών

Νικόλαος Ζούμπος

Καθηγητής Αιματολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Διονύσιος Καραβίας

Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Πατρών

Χρυσούλα Λαμπροπούλου - Καρατζά

Αναπλ. Καθηγήτρια Παθολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Θεόδωρος Πέτσας

Αναπλ. Καθηγητής Ακτινολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Kardamakis D, Tsamandas AC, Makatsoris T, Zolota V, Gogos C, Kalogeropoulou C, Karatza C, Petsas T, Karavias D, Bonikos D. The Potential Role of bcl-2 mRNA and protein expression in hepatocellular carcinomas, in Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas: Molecular Genetics, Liver Carcinoma and Pancreatic Carcinoma, Volume 3, ed MA Hayat, Elsevier Inc., San Diego, CA, USA, 2005.

Makatsoris T, Kourelis T, Tsamandas AC, Pagoni Z, Papathanassiou Z, Kardamakis D, Tepetes K, Petsas T, Karatza C, Karavias D, Kalofonos HP. Hepatocellular carcinomas in patients treated with hepatectomy: Biologic and therapeutic implications. Anticancer Res 24(5D):3541, 2004.

Makatsoris T, Kourelis T, Tsamandas AC, Pagoni Z, Papathanassiou Z, Kardamakis D, Tepetes K, Petsas T, Karatza C, Karavias D, Kalofonos HP. Hepatocellular carcinomas in patients treated with hepatectomy: Biologic and therapeutic implications. 7th International Conference of Anticancer Research, Corfu-Greece October 25-30, 2004.

Μακατσώρης Θ, Κουρέλης Θ, Τσαμαντάς ΑΧ, Παγώνη Ν, Παπαθανασίου Ζ, Καρδαμάκης Δ, Τεπετές Κ, Πέτσας Θ, Καρατζά Χ, Καραβίας Δ, Καλόφωνος Χ. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε ασθενείς που υπέστησαν ηπατεκτομή: βιολογικοί και θεραπευτικοί προγνωστικοί παράγοντες. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου, Αθήνα 26-28 Νοεμβρίου, 2004.

Makatsoris T, Petsas T, Tsamandas AC, Pagoni N, Papathanassiou Z, Karavias D, Karatza C, Kardamakis D, Kalofonos H. Hepatocellular carcinoma in hepatectomized patients: biologic and therapeutic implications. Anticancer Research 2005;25(4):3067-3073.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών κατά το χρονικό διάστημα 2000-2004 και αποτελεί μέρος μιας μεγαλύτερης μελέτης που έχει σκοπό τη διερεύνηση παραγόντων που συμμετέχουν στην ηπατική καρκινογένεση.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η πρόγνωση βασίζεται σε συστήματα σταδιοποίησης τα οποία κυρίως λαμβάνουν υπ' όψη το μέγεθος του όγκου και τη διασπορά του. Η ηπατική καρκινογένεση αποτελεί πολυκεντρική διεργασία η οποία διακρίνεται σε 3 στάδια: έναρξη, επαγωγή και εξέλιξη. Η έναρξη αποτελεί ένα μη αναστρέψιμο στάδιο το οποίο χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις και καταστροφή του DNA. Στη συνέχεια και μέσα στο κατάλληλο επαγωγικό περιβάλλον τα κύτταρα υφίστανται κλωνικό πολλαπλασιασμό λόγω της ελαττωμένης απόκρισης σε αρνητικούς ρυθμιστές της ανάπτυξης και αντίσταση στα κυτταροτοξικά και μιτο-ανασταλτικά αποτελέσματα των καρκινογόνων. Οι μεταλλαγμένες εστίες έχουν την ικανότητα της αυτόνομης ανάπτυξης αλλά η διατήρηση κοντά στα φυσιολογικά όρια της αναλογίας αποπτωτικού/μιτωτικό δείκτη, περιορίζει την ικανότητα ανάπτυξης αυτών των εστιών και έτσι σε αυτή τη φάση οι εστίες αυτές δεν είναι διακριτές από το περιβάλλον ήπαρ. Με την εξέλιξη του όγκου παρουσιάζονται πρόσθετες γενετικές ανωμαλίες οι οποίες μεταβάλλουν το ρυθμό ανάπτυξης και εξέλιξης του όγκου και ειδικότερα τη σχέση ανάμεσα στο μιτωτικό και τον αποπτωτικό δείκτη αλλά και την ικανότητα του όγκου για διήθηση και μετάσταση.

Η παρούσα μελέτη ερευνά τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά 35 κλασικών ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων μη ινοπεταλιώδους τύπου καθώς και την έκφραση των δεικτών απόπτωσης bcl-2, bax και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και του ογκογονιδίου p53 σε συσχέτιση με την επιβίωση ασθενών και τους κλασσικούς προγνωστικούς δείκτες.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Απόστολο Γ. Βαγενάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ογκολογίας κ. Χαράλαμπο Π. Καλόφωνο για την αμέριστη βοήθειά του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Διονύσιο Σπ. Μπονίκο για τη δυνατότητα που μου παρείχε να χρησιμοποιήσω το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, αλλά και το αρχειακό υλικό του Εργαστηρίου για την εκτέλεση της ανοσοϊστοχημείας.

Επίσης η παρούσα διατριβή θα ήταν δύσκολο να σχεδιασθεί και να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή του κ. Αθανασίου Χρ. Τσαμαντά, Λέκτορα Παθολογικής Ανατομικής, ο οποίος συμμετείχε ουσιαστικά τόσο στην κατανόηση του θεωρητικού τμήματος του θέματος, όσο και στην τεχνική της ανοσοϊστοχημείας και in situ υβριδισμού.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια Παθολογίας κ. Χρυσούλα Α. Λαμπροπούλου-Καρατζά, τον Καθηγητή Χειρουργικής κ. Διονύσιο Δ. Καραβία και τους χειρουργούς κυρίους Θεόδωρο Μ. Καρατζά και Κωνσταντίνο Ν. Τεπετέ για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να χρησιμοποιήσω υλικό και κλινικές πληροφορίες από το αρχείο τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	ΣΕΛ
1. Ήπαρ	
α. Ανατομία	8
β. Ηπατικές Παθήσεις	13
2. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	
α. Παράγοντες κινδύνου και πρόληψη	14
β. Παρακολούθηση και διαγνωστική προσέγγιση	16
γ. Φυσική Ιστορία και πρόγνωση	19
δ. Συστήματα σταδιοποίησης	24
ε. Θεραπεία του Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος	28
στ. Μοριακή παθογένεση του Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος	44
3. Απόπτωση και καρκινογένεση	50

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	ΣΕΛ
1. Σχεδιασμός της μελέτης	54
2. Ασθενείς και μέθοδοι	
α. Ασθενείς	55
β. Μέθοδοι	
I. Ιστοπαθολογικές μελέτες ρουτίνας	55
II. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας και in situ υβριδισμού	57
III. Μορφομετρική ανάλυση	71
IV. Στατιστική ανάλυση	72
3. Αποτελέσματα	
α. Μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των όγκων και του μη νεοπλασματικού ήπατος	73
β. Ευρήματα ανοσοϊστοχημικού ελέγχου για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση	82
γ. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και in-situ υβριδισμού	
1. Bcl-2	88
2. Bax	94
3. P53	102
4. Συζήτηση και συμπεράσματα	104
III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	117
IV. SUMMARY	120
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	123

1. ΗΠΑΡ

α. Ανατομία

Το ήπαρ είναι ο μεγαλύτερος αδένας του πεπτικού συστήματος και περιβάλλεται από κάψα συνδετικού ιστού, την κάψα του Glisson και ως έξω έκκριση παράγει τη χολή. Η χολή παράγεται από το ήπαρ και αθροίζεται στη χοληδόχο κύστη από όπου μεταφέρεται στο δωδεκαδάκτυλο ανάλογα με τις ανάγκες. Τα χολικά οξέα γαλακτωματοποιούν τα λίπη στο έντερο. Οι χολοχρωστικές είναι τελικά προϊόντα του καταβολισμού της αιμοσφαιρίνης. Η πιο σημαντική λειτουργία του ήπατος είναι η συμμετοχή του στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών. Για τη λειτουργία αυτή καταναλώνει 12% της συνολικής περιεκτικότητας του αίματος σε οξυγόνο. Η θερμοκρασία του αίματος στις φλέβες του ήπατος φτάνει τους 40°C. Το ήπαρ είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στις κακώσεις και μπορεί εύκολα να υποστεί ρήξη του μαλακού του παρεγχύματος.

Το πρόσθιο χείλος του ήπατος φέρεται προς τα έξω, κατά μήκος του πλευρικού τόξου, ενώ από τη θέση όπου χιάζονται η μεσοκλειδική γραμμή με την 8^η πλευρά το πρόσθιο χείλος φέρεται λοξά προς τα αριστερά μέχρι την 7^η αριστερή πλευρά. Το μεγαλύτερο μέρος του ήπατος βρίσκεται κάτω από το δεξιό θόλο του διαφράγματος. Στο ήπαρ διακρίνουμε δύο επιφάνειες, την άνω ή διαφραγματική και την κάτω ή σπλαγχνική. Η σπλαγχνική επιφάνεια φέρεται από το πρόσθιο χείλος προς τα άνω και πίσω όπου συναντάται με τη διαφραγματική επιφάνεια. Το μεγαλύτερο μέρος του ήπατος περιβάλλεται από περιτόναιο εκτός από τμήμα του οπισθίου μέρους της κάτω επιφάνειας που έρχεται σε άμεση επαφή με το τενόντιο κέντρο του διαφράγματος. Το τμήμα αυτό καλείται γυμνή (από περιτόναιο) επιφάνεια του ήπατος.

Η γυμνή επιφάνεια του ήπατος, τριγωνικού σχήματος αφορίζεται από τις ανακάμψεις του τοιχωματικού στο περισπλάγχνιο περιτόναιο, που αποτελούν το πρόσθιο και το οπίσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου. Τα δύο πέταλα συναντώνται στα δύο άκρα τους και αποτελούν το δεξιό και τον αριστερό τρίγωνο σύνδεσμο του ήπατος. Το πρόσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου στη μεσότητά του περίπου ανακάμπτει προς τα εμπρός επί της άνω επιφάνειας του ήπατος και σχηματίζει το δρεπανοειδή σύνδεσμο του ήπατος. Ο δρεπανοειδής σύνδεσμος υποδιαιρεί τη διαφραγματική επιφάνεια του ήπατος σε δεξιό και αριστερό ηπατικό λοβό. Ο δρεπανοειδής σύνδεσμος παρουσιάζει και ένα προσπεφυκός χείλος που προσφύεται στην οπίσθια επιφάνεια του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος μέχρι τον ομφαλό. Το ελεύθερο χείλος του δρεπανοειδούς συνδέσμου, από τον ομφαλό μέχρι το ήπαρ, περιέχει το στρογγυλό σύνδεσμο του ήπατος που είναι η αποφραχθείσα αριστερή ομφαλική φλέβα του εμβρύου. Ο αριστερός τρίγωνος σύνδεσμος καταλήγει σε μία ταινία ινώδους ιστού, την ινώδη απόφαση του ήπατος. Το οπίσθιο πέταλο του στεφανιαίου συνδέσμου ανακάμπτει και σχηματίζει τον ηπατονεφρικό σύνδεσμο. Η κάτω κοίλη φλέβα διέρχεται πίσω από τη γυμνή επιφάνεια του ήπατος για να περάσει στη συνέχεια από το τρήμα της κάτω κοίλης φλέβας του διαφράγματος.

Η πύλη του ήπατος συνδέει δύο οβελιαίες αύλακες της κάτω επιφάνειας του ήπατος και με αυτές σχηματίζεται το γράμμα "H". Η αριστερή οβελιαία αύλακα φιλοξενεί υπολείμματα εμβρυϊκών αγγείων όπως το στρογγυλό σύνδεσμο του ήπατος (αποφραχθείσα ηπατική φλέβα) και το φλεβώδη σύνδεσμο, που είναι ο αποφραχθείς φλεβώδης πόρος. Η δεξιά οβελιαία αύλακα στο πρόσθιο μέρος εμφανίζεται διευρυσμένη και σχηματίζει τον κυστικό βόθρο, που

φιλοξενεί τη χοληδόχο κύστη. Το πίσω μέρος της αύλακας υποδέχεται τη διερχόμενη κάτω κοίλη φλέβα. Μεταξύ των δύο αυλάκων, μπροστά από την πύλη του ήπατος σχηματίζεται ο τετράπλευρος λοβός του ήπατος και πίσω από την πύλη ο κερκοφόρος λοβός του ήπατος. Στην κάτω επιφάνεια του αριστερού ηπατικού λοβού σχηματίζεται το γαστρικό εντύπωμα και στην κάτω επιφάνεια του δεξιού λοβού σχηματίζονται το δωδεκαδακτυλικό εντύπωμα, το νεφρικό εντύπωμα και το κολικό εντύπωμα. Ο ηπατοδωδεκαδακτυλικός σύνδεσμος μεταφέρει στην πύλη του ήπατος τα αγγεία του ήπατος (ηπατική αρτηρία και πυλαία φλέβα).

Υφή του ήπατος

Η κάψα του Glisson η οποία, κάτω από το περισπλάγχνιο πέταλο του περιτοναίου, περιβάλλει το ήπαρ, εκπέμπει μέσα στο παρέγχυμα του ήπατος προσεκβολές που σχηματίζουν ένα σπογγώδες δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού (έλυτρα του Glisson). Κάθε ένα από τα έλυτρα αυτά περιβάλλει κλάδο της ηπατικής αρτηρίας, κλάδο της πυλαίας φλέβας, ένα χοληφόρο πόρο και λεμφαγγεία. Στα μεσοδιαστήματα του δικτύου αυτού υπάρχουν τα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, που σχηματίζουν τα ηπατικά λόβια. Έχουν μέγεθος χιλιοστομέτρου, πολυγωνικό σχήμα και φαίνονται στην επιφάνεια του ήπατος. Κάθε ηπατικό λόβιο διελαύνεται από την κεντρική (ή ενδολόβια) φλέβα του. Οι κεντρικές φλέβες γειτονικών λοβίων, αφού δεχθούν το αίμα της πυλαίας φλέβας, εξέρχονται από τη βάση του λοβίου τους και εκβάλλουν σε εμβόλιμες φλέβες οι οποίες στη συνέχεια αθροίζονται στις υπολόβιες και τις αθροιστικές φλέβες που σχηματίζουν τις ηπατικές φλέβες.

Το ηπατικό λόβιο, σχήματος πυραμίδας, έχει πολυγωνική επιφάνεια. Η διάμετρός του είναι 1-1,5 mm και το μήκος του 2 mm περίπου. Μεταξύ των λοβίων υπάρχουν μεσολόβια διαστήματα, τα οποία αντίστοιχα προς τις πλάγιες επιφάνειες των κυττάρων, είναι σχισμοειδή (μεσολόβιες σχισμές του Kierman), που περιέχουν ελάχιστο συνδετικό ιστό και αιμοφόρα τριχοειδή των οποίων κλάδοι εισέρχονται μέσα στο ηπατικό λόβιο μεταφέροντας αίμα από την πυλαία φλέβα και αρτηριακό αίμα της ηπατικής αρτηρίας στα κολποειδή τριχοειδή (sinusoids) του ηπατικού λοβίου. Η περιφέρεια του λοβίου έχει καλύτερη οξυγόνωση από την κεντρική μοίρα του. Η κεντρική φλέβα του ηπατικού λοβίου αναδύεται από τη βάση του. Αντίστοιχα προς τις γωνίες των πολυγωνικών περιοχών τα μεσολόβια διαστήματα γίνονται ευρύτερα και ο συνδετικός ιστός τους διελαύνεται από τη λεγόμενη πυλαία τριάδα (του Glisson), ήτοι κλάδο της ηπατικής αρτηρίας, κλάδο της πυλαίας φλέβας και ένα χοληφόρο πόρο. Οι μεταξύ των λοβίων υπάρχουσες μεμονωμένες φλέβες είναι εμβόλιμες, υπολόβιες ή αθροιστικές φλέβες. Στο κέντρο του λοβίου υπάρχει η κεντρική φλέβα. Τα επιθηλιακά ηπατικά κύτταρα σχηματίζουν αναστομούμενες δοκίδες, πάχους ενός-δύο κυττάρων, που φέρονται ακτινωτά από το κέντρο του λοβίου προς την περιφέρεια. Μεταξύ των δοκίδων υπάρχουν τα μήκους 350-500 μm κολποειδή τριχοειδή του ήπατος, τα οποία αποτελούν την οδό ανταλλαγής της ύλης του ήπατος.

Μεταξύ του αγγειακού τοιχώματος των κολποειδών τριχοειδών και της επιφάνειας των παρακείμενων ηπατικών κυττάρων σχηματίζεται ο χώρος του Disse που περιέχει μεμονωμένες δικτυωτές ίνες. Το τοίχωμα του τριχοειδούς αποτελείται από ατελές ενδοθήλιο το οποίο στερείται βασικού υμένα. Η επιφάνεια του ηπατικού κυττάρου εμφανίζει μικρολάχνες, που έρχονται σε

άμεση επαφή με το υλικό το οποίο από το αίμα εισέρχεται στο χώρο του Disse δια μέσου των χασμάτων του ενδοθηλίου. Μεταξύ των κυττάρων του ενδοθηλίου υπάρχουν τα αστεροειδή κύτταρα του Kupffer, που έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και πιθανώς μετέχουν στη διάσπαση της αιμοσφαιρίνης. Η ανταλλαγή της ύλης γίνεται στη μεριά του κυττάρου που είναι στραμμένη προς το αγγείο.

Τα χοληφόρα τριχοειδή σχηματίζονται μεταξύ δύο συνεχόμενων ηπατικών κυττάρων και δε διαθέτουν δικό τους τοίχωμα. Η κυτταρική μεμβράνη είναι πτυχωτή σε αυτή τη θέση και έτσι το χοληφόρο τριχοειδές μπορεί να διευρύνεται όταν υπάρχει συμφόρηση του χοληφόρου συστήματος. Η χολή φέρεται από το κέντρο προς την περιφέρεια του λοβίου, στους μεσολόβιους χοληφόρους πόρους, που έχουν επιθηλιακό τοίχωμα. Αυτοί συνενώνονται διαρκώς με τους παρακείμενους και φερόμενοι προς τις πύλες του ήπατος σχηματίζουν το δεξιό και αριστερό ηπατικό πόρο από τους οποίους αρχίζει η εξωηπατική χοληφόρος οδός.

Τα αγγεία και τα νεύρα που διέρχονται από την πύλη του ήπατος πορεύονται μεταξύ των δύο πετάλων του ηπατοδωδεκαδακτυλικού συνδέσμου. Τα αγγεία είναι η ιδίως ηπατική αρτηρία, η πυλαία φλέβα και ο κοινός ηπατικός πόρος, που περιέχει την αποχετευόμενη από το ήπαρ χολή. Η ιδίως ηπατική αρτηρία χορηγεί τη χολοκυστική αρτηρία για τη χοληδόχο κύστη. Δεξιά από την ιδίως ηπατική αρτηρία πορεύεται ο κοινός ηπατικός πόρος και ανάμεσά τους, στο βάθος, η πυλαία φλέβα.

β. Ηπατικές Παθήσεις

Στον επόμενο πίνακα αναφέρονται οι κύριες κατηγορίες των ηπατικών παθήσεων

Νοσήματα παιδικής ηλικίας
Μεταβολικά νοσήματα
Οξεία και Χρονία ηπατίτις
Στεάτωση και στεατοηπατίτις
Ίνωση και κίρρωση
Παθήσεις ενδοηπατικών και εξωηπατικών χοληφόρων
Λοιμώξεις
Αγγειακές διαταραχές
Νοσήματα φαρμακευτικής αιτιολογίας
Νεοπλάσματα ήπατος

2. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το πρωτοπαθές καρκίνωμα του ήπατος (ΗΚΚ) αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Είναι η πέμπτη πιο συχνή κακοήθεια και η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο (Parkin DM, et al, 2001). Περισσότερες από 500.000 νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται παγκόσμια ετησίως με επίπτωση 5,5-14,9 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Σε μερικές περιοχές της Ασίας, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ υπάρχει έντονο ενδιαφέρον λόγω της σχετικά αυξημένης επίπτωσης της νόσου την τελευταία δεκαετία. Η επίπτωση του ΗΚΚ στις ΗΠΑ και την Ευρώπη συνδέεται κυρίως με την ηπατίτιδα C και προβλέπεται ότι θα αυξηθεί στις επόμενες δεκαετίες σε επίπεδα ανάλογα της Ιαπωνίας (Tanaka Y, et al, 2002). Το ΗΚΚ είναι η πρώτη αιτία θανάτου σε

ασθενείς με κίρρωση στην Ευρώπη, για αυτό η πρόληψη και η θεραπεία του ΗΚΚ αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας (Fattovich G et al, 1997).

α. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ

Το ΗΚΚ είναι από τα λίγα καρκινώματα με καλά καθορισμένους προδιαθεσικούς παράγοντες. Σε 80% των περιπτώσεων το ΗΚΚ εμφανίζεται σε κίρρωτικό ήπαρ και η κίρρωση είναι ο σημαντικότερος προδιαθεσικός παράγοντας (Colombo M, 2003). Οι γεωγραφικές διαφορές στην επίπτωση της νόσου οφείλονται σε διαφοροποιήσεις στους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες. Στην Ασία και στην Αφρική η λοίμωξη από ηπατίτιδα Β είναι συχνή, όπως και η πρόσληψη αφλατοξίνης Β με την τροφή. Στις Δυτικές χώρες και στην Ιαπωνία η λοίμωξη από ηπατίτιδα C είναι ο κύριος προδιαθεσικός παράγοντας καθώς επίσης και άλλα αίτια κίρρωσης όπως το αλκοόλ και η αιμοχρωμάτωση. Ο ρόλος άλλων καρκινογόνων όπως το κάπνισμα δεν έχει τεκμηριωθεί.

Συχνά, το ΗΚΚ είναι αποτέλεσμα χρόνιας ιογενούς λοίμωξης. Σε αναπτυσσόμενες χώρες, το ΗΚΚ εμφανίζεται σε νεαρούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (χωρίς κίρρωση σε 40% των περιπτώσεων) (Zhou XD, et al, 2001), ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες εμφανίζεται σε μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς με κίρρωση σχετιζόμενη με ηπατίτιδα C (Colombo M, et al, 1991). Παγκοσμίως, υπάρχουν 380 εκατομμύρια άνθρωποι φορείς της ηπατίτιδας Β και σε ενδημικές περιοχές οι φορείς αποτελούν το 10-20% του πληθυσμού (Thorgeirsson S, et al, 2002). Οι χρόνιοι φορείς της ηπατίτιδας Β έχουν 100 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν ΗΚΚ σε σύγκριση με μη φορείς, ο κίνδυνος δε μειώνεται αν η λοίμωξη συμβεί στην ενήλικη ζωή. Οι κίρρωτικοί

ασθενείς έχουν υψηλότερο κίνδυνο, η ετήσια επίπτωση σε κίρρωτικούς είναι 2-6,6%, ενώ είναι 0,4% στους μη κίρρωτικούς (Beasley RP, et al, 1981). Περιβαλλοντικά καρκινογόνα όπως η αφλατοξίνη Β αυξάνουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης 3 φορές η οποία έχει διαπιστωθεί ότι συνδυάζεται με μία συγκεκριμένη μετάλλαξη στο κοδικόνιο 249 στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (Sun Z, et al, 1999). Χαρακτηριστικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, το ΗΚΚ που σχετίζεται με ηπατίτιδα Β είναι συνήθως αποτέλεσμα λοίμωξης που συμβαίνει κατά τη γέννηση ή νωρίς στη ζωή και εμφανίζεται σε ασθενείς ηλικίας 40 ετών ή νεώτερους, με παρουσία συμπτωμάτων και δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία. Αυτή η κατάσταση μπορεί να προληφθεί με εμβολιασμό, όπως στην Taiwan όπου πανεθνικός εμβολιασμός των νεογνών από το 1984 έως το 1986 ελάττωσε τη συχνότητα των φορέων ηπατίτιδας Β στην παιδική ηλικία από 15% στο 1% και ταυτόχρονα μειώθηκε η επίπτωση του ΗΚΚ κατά 60% συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα παιδιά (Chang MH, et al, 1997).

Στις ανεπτυγμένες χώρες το ΗΚΚ αναπτύσσεται σε ασθενείς με κίρρωση λόγω ηπατίτιδας C ή κατάχρησης αλκοόλ με ετήσια επίπτωση της νόσου 3-5%. Συγκεκριμένα, περίπου 170 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί με τον ιό της ηπατίτιδας C και δυστυχώς δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο. Η πρόληψη της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας C βασίζεται στην αποφυγή λοίμωξης μέσω της μετάγγισης προϊόντων αίματος, αλλά επιπλέον απαιτούνται μέτρα για την πρόληψη νοσοκομειακών λοιμώξεων και λοίμωξης σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου. Η χρήση των νέων αντιικών φαρμάκων όπως της πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης και της ριβαμπρίνης μπορεί να εμποδίσει την πρόοδο από τη χρόνια λοίμωξη με ηπατίτιδα C σε εκτεταμένη

ίνωση ή κίρρωση σε ποσοστό 40% των ασθενών που ανταποκρίνονται σε αυτές τις θεραπείες (Manns MP, et al, 2001). Η αποφυγή κίρρωσης θα προφυλάξει και από την εμφάνιση ΗΚΚ. Αντίθετα, όταν υπάρχει εγκατεστημένη κίρρωση, ο προφυλακτικός ρόλος αυτών των φαρμάκων δεν έχει αποδειχθεί.

β. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Σε ασθενείς με τεκμηριωμένη κίρρωση συνιστάται παρακολούθηση για την πρώιμη διάγνωση του ΗΚΚ με σκοπό τη μείωση των θανάτων από καρκίνο (Bruix J, et al, 2001). Παρά την έλλειψη τυχαιοποιημένων μελετών, έχει διαπιστωθεί σε πληθυσμιακές μελέτες ότι με τον προληπτικό έλεγχο αυξάνεται η συχνότητα πρώιμης διάγνωσης καρκινώματος ήπατος καθώς και η εφαρμογή αποτελεσματικών θεραπειών. Επίσης στις Δυτικές χώρες δεν φαίνεται πιθανό στο άμεσο μέλλον να πραγματοποιηθούν τυχαιοποιημένες μελέτες ώστε να αποδειχθεί η βελτίωση της επιβίωσης μετά από προληπτικό έλεγχο (Bolondi L, et al, 2001). Οι συστάσεις περιλαμβάνουν τη χρήση υπερηχογραφήματος ήπατος και τη μέτρηση της α-φετοπρωτεΐνης στον ορό ανά 6 μήνες. Μόνο ασθενείς με κίρρωση που θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με ριζική θεραπεία θα πρέπει να υποβάλλονται σε προληπτικό έλεγχο. Σε αυτούς τους ασθενείς περιλαμβάνονται αυτοί με κίρρωση σταδίου Α κατά Child-Pugh ή σταδίου Β όταν όμως υπάρχει δυνατότητα μεταμόσχευσης. Αντίθετα, οι ασθενείς σταδίου C θα πρέπει να θεωρούνται υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος λόγω της ηπατικής ανεπάρκειας επομένως, αν δεν υπάρχει αυτή η δυνατότητα, η εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης δεν θεωρείται σκόπιμη διότι δεν καλύπτει τη σχέση κόστους - οφέλους.

Η παρακολούθηση των ασθενών και η βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων έχουν καταστήσει την πρώιμη διάγνωση της νόσου εφικτή αλλά οι διαγνωστικές εξετάσεις έχουν αυξημένο κόστος και εγκυμονούν πιθανούς κινδύνους. Στο κίρρωτικό ήπαρ μπορεί να αναπτυχθούν συχνά διάφοροι όζοι όπως αναγεννητικοί όζοι και χαμηλού κακοήθους δυναμικού δυσπλαστικοί όζοι (Mion F, et al, 1996). Υψηλού κακοήθους δυναμικού δυσπλαστικοί όζοι είναι λιγότερο συχνοί μπορεί όμως να μεταλλαχθούν σε κακοήθεις στο 1/3 των περιπτώσεων (Takayama T, et al, 1990). Άλλοι όγκοι, όπως άτυπα αιμαγγειώματα μπορεί να μοιάζουν με κακοήθεια. Επίσης, κακοήθεις όγκοι μπορεί να εμφανισθούν μονοεστιακά ή ως πολυεστιακή νόσος (20-60% των περιπτώσεων) που είναι αποτέλεσμα ενδοηπατικών μεταστάσεων ή σύγχρονης ανάπτυξης πολλαπλών όγκων.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση για τη μελέτη του ήπατος πρότεινε τον ακόλουθο αλγόριθμο στα πλαίσια της διαγνωστικής προσέγγισης της νόσου (Bruix J, et al, 2001). Σε όζους μικρότερου μεγέθους από 1 cm στους οποίους η πιθανότητα κακοήθειας είναι μικρότερη από 50%, η ακριβής διάγνωση της κακοήθειας με ιστολογική ταυτοποίηση της νόσου είναι δύσκολη και συνιστάται προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών και επανέλεγχος. Σε όζους 1-2 cm η ιστολογική ταυτοποίηση της νόσου χρειάζεται βιοψία με λεπτή βελόνη αλλά υπάρχει ένα ποσοστό 30-40% ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Επομένως, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την ύπαρξη κακοήθειας. Μη επεμβατικά διαγνωστικά κριτήρια έχουν προταθεί για ασθενείς με κίρρωση και όζους μεγαλύτερους των 2 cm. Η διάγνωση του ΗΚΚ επιβεβαιώνεται με το εύρημα της αρτηριακής υπεραγγείωσης του όγκου με δύο διαφορετικές απεικονιστικές μεθόδους ή με την εύρεση υπεραγγείωσης με

απεικονιστική μέθοδο συνοδευόμενη με αυξημένο επίπεδο α-φετοπρωτεΐνης, υψηλότερο από 400 µg/L.

Τα τελευταία χρόνια οι απεικονιστικές μέθοδοι έχουν εξελιχθεί σημαντικά. Το υπερηχογράφημα του ήπατος έχει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση του ΗΚΚ, αλλά η ευαισθησία του είναι σχετικά μικρή ιδιαίτερα σε μικρού μεγέθους όζους. Νέες σκιαγραφικές ουσίες μπορεί να βελτιώσουν την ακρίβεια αυτής της διαγνωστικής μεθόδου και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της ανταπόκρισης μετά από θεραπεία. Οι καλύτερες διαγνωστικές μέθοδοι είναι η σπειροειδής αξονική τομογραφία (spiral CT) και η μαγνητική τομογραφία (MRI) με σκιαγραφική ουσία, με ακρίβεια που ξεπερνά το 80% (Choi D, et al, 2001). Η ευαισθησία του CT και της MRI μειώνεται όταν εκτιμάται η έκταση της νόσου. Σε μία σύγκριση CT έναντι της MRI και της παθολογοανατομικής εξέτασης αφαιρεθέντος ήπατος διαπιστώθηκε ότι η MRI αγγειογραφία ήταν περισσότερο ακριβής στην διαπίστωση όζων μεγέθους 1-2 cm συγκριτικά με το CT (Burrel M, et al, 2003). Όμως, ποσοστό 20-30% των ενδοηπατικών όγκων, ιδίως αυτών που είναι μικρότεροι από 10 mm, δεν διαγιγνώσκεται προεγχειρητικά με καμία απεικονιστική μέθοδο. Οι πρώτες ενδείξεις με τη χρήση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) δεν είναι ενθαρρυντικές για τη διάγνωση μικρών όζων. Εξωηπατική επέκταση της νόσου πρέπει να αποκλεισθεί σε κάποιους επιλεγμένους ασθενείς όπως στους υποψήφιους για μεταμόσχευση ήπατος ή για συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα με CT θώρακος και σπινθηρογράφημα οστών.

γ. ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πρόγνωση του ΗΚΚ πριν από δύο δεκαετίες ήταν απογοητευτική και οι περισσότεροι ασθενείς απεβίωναν εντός έτους από τη διάγνωση της νόσου ανεξάρτητα από τη θεραπευτική αντιμετώπιση (Okuda K, et al, 1985). Ωστόσο, στις αναπτυγμένες χώρες τα δεδομένα έχουν αλλάξει διότι σε ποσοστό 30-40% των ασθενών η νόσος διαγιγνώσκεται στα αρχικά στάδια όταν μπορούν να εφαρμοστούν αποτελεσματικές θεραπείες που συχνά επιφέρουν ίαση. Για αυτό το λόγο στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψη το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση.

ΑΡΧΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΗΚΚ

Η φυσική ιστορία του ΗΚΚ αρχικού σταδίου δεν είναι γνωστή διότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς λαμβάνουν κάποια θεραπεία. Η καλύτερη επιβίωση που είχε ανακοινωθεί πριν μία δεκαετία ήταν 65% τριετής επιβίωση σε ασθενείς με κίρρωση σταδίου Α κατά Child-Pugh με μονήρη όγκο (Barbara L, et al, 1992). Από τότε όμως, με την χρήση "ριζικών" θεραπειών διαπιστώθηκε πενταετής επιβίωση σε ποσοστό 50-70% των ασθενών (Llovet JM, et al, 1999). Η πρόγνωση της νόσου στα αρχικά στάδια εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του όγκου, την ηπατική λειτουργία και το είδος της θεραπείας. Το κύριο χαρακτηριστικό του όγκου είναι το μέγεθος του καρκινώματος και η πολυκεντρικότητα της νόσου (όζος < 2 cm, όζος 2-5 cm, 3 όζοι < 3 cm) όλα δε τα συστήματα σταδιοποίησης συμφωνούν στη διαφορετική πρόγνωση μεταξύ αυτών των κατηγοριών (Arii, et al, 2000).

Η ηπατική λειτουργία αποτελεί το βασικότερο παράγοντα για τη χειρουργική αφαίρεση ή για διαδερμική θεραπευτική αντιμετώπιση του όγκου. Για την

εκτίμηση της ηπατικής λειτουργίας χρησιμοποιείται η κατάταξη κατά Child-Pugh η οποία φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κατάταξη ηπατικής λειτουργίας κατά Child-Pugh

	Child-Pugh Κατάταξη*		
	1 Βαθμός	2 Βαθμοί	3 Βαθμοί
Χολερυθρίνη (mg/dl)	< 2	2-3	> 3
Ασθενείς με PBC ή PSC	< 4	4-10	> 10
Αλβουμίνη (g/dl)	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
Παράταση PT (sec)	< 3	4-6	> 6
INR	< 1,7	1,7-2,3	> 2,3
Ασκίτης	Καθόλου	Μικρός, ελεγχόμενος φαρμακευτικά	Μέτριος ή σοβαρός
Εγκεφαλοπάθεια	Καθόλου	Στάδιο 1-2	Στάδιο 3

PBC = ιδιοπαθής χολική κίρρωση, PSC = ιδιοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα, PT = χρόνος προθρομβίνης, INR = international normalized ratio

*Child-Pugh στάδιο : A = 5-6 βαθμοί, B = 7-9 βαθμοί, C = 10-15 βαθμοί

Σε ασθενείς με κίρρωση σταδίου A κατά Child-Pugh που υποβάλλονται σε χειρουργική αφαίρεση οι καλύτεροι προγνωστικοί δείκτες της επιβίωσης είναι το επίπεδο χολερυθρίνης (< 1 mg/dl), η απουσία σημαντικής πυλαίας υπέρτασης (κλίση πίεσης ηπατικής φλέβας < 10 mmHg) και κάθαρση ινδοκυανίνης στα 15' μικρότερη από 20% (Llovet, et al, 1999β, Bruix J, et al, 1996, The Liver Cancer Study Group of Japan, 1994) .

Ο ορισμός του ΗΚΚ αρχικού σταδίου ποικίλλει. Πριν 2 δεκαετίες οριζόταν ως όγκος μικρότερος από 5 cm. Αργότερα, έγινε αποδεκτή η ύπαρξη πολλαπλών (2-3) όζων μικρότερων από 3 cm, αντανakλώντας τα εξαιρετικά αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν μετά από μεταμόσχευση ήπατος. Όμως, παθολογοανατομικά και κλινικά δεδομένα αμφισβητούν αυτόν τον ορισμό. Η

ανταπόκριση και τα αποτελέσματα μετά από την αντιμετώπιση πρώιμων καρκίνων ποικίλουν. Για παράδειγμα, η πλήρης ύφεση της νόσου μετά από διαδερμική θεραπεία ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του όγκου, από 90-100% για όγκους 2 cm σε 50% για όγκους 5 cm (Livraghi T, et al, 1995α). Επίσης, διαφορά υπάρχει και στην επιβίωση. Επομένως, ο όρος ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αρχικού σταδίου περιλαμβάνει διαφορετικά στάδια της νόσου με διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά.

ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΡΩΙΜΟ (VERY EARLY) Ή ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ IN SITU

Το καρκίνωμα in situ είναι η πιο πρώιμη κλινική οντότητα που αναγνωρίζεται και αποδίδει καλύτερα την έννοια του 'ελάχιστου' ή υποκλινικού ΗΚΚ που προτάθηκε από ερευνητές από την Ασία και είναι συμβατό με τη νόσο σταδίου 0 όπως ορίζεται από τους Takayama και συνεργάτες (Takayama T, et al, 1998).

Από παθολογοανατομικής πλευράς, το καρκίνωμα in situ είναι ένα καλά διαφοροποιημένο ΗΚΚ που περιέχει χολαγγεία και πυλαία αγγεία, έχει ασαφή οζώδη εμφάνιση και δεν παρουσιάζει διήθηση κάποιας δομής. Διήθηση από τον όγκο μπορεί να εμφανισθεί σε όγκους με μέγεθος < 2 cm, έτσι μερικοί όγκοι μικρότεροι των 2 cm έχουν ήδη διασπαρεί, ενώ άλλοι συμπεριφέρονται ως καρκινώματα in situ. Ο Kojiro ανέλυσε 106 αφαιρεθέντα καρκινώματα και διαχώρησε τα καλούμενα "indistinct" (μέση διάμετρος 1.2 cm) χωρίς τοπική διήθηση, από τα "distinct" τύπου (μέση διάμετρος 1.6 cm) τα οποία εμφάνιζαν τοπική διήθηση. Στον "distinct" τύπο υπήρχαν τοπικές μεταστάσεις γύρω από τον όγκο στο 10% και μικροσκοπική διήθηση της πυλαίας φλέβας σε ποσοστό 25%. Αν και οι δύο τύποι απεικονίζονταν σε υπερηχογραφική μελέτη ο

“indistinct” τύπος φαινόταν με μειωμένη αγγείωση σε CT, ενώ ο “distinct” φαινόταν με αυξημένη αγγείωση (Kojiro M, 2002).

Το εξαιρετικά πρώιμο ΗΚΚ χαρακτηρίζεται από την καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία και τη διάγνωση του καρκινώματος *in situ*. Στην Ιαπωνία αυτοί οι ασθενείς έχουν τα καλύτερα αποτελέσματα μετά από εκτομή της νόσου (πενταετής επιβίωση 89-93%) ή μετά από διαδερμική θεραπεία (πενταετής επιβίωση 71%) (Sakamoto M, et al, 1998). Τα αποτελέσματα αυτά είναι καλύτερα από τα αποτελέσματα για τα τυπικά καρκινώματα με διάμετρο νόσου μικρότερη από 2 cm και πενταετή επιβίωση 71% μετά από εκτομή και 54% με διαδερμική θεραπεία. Επίσης, σύμφωνα με τον Takayama και συνεργάτες οι όγκοι αυτοί συνήθως δεν υποτροπιάζουν μετά τη θεραπευτική αντιμετώπιση σε αντίθεση με πιο προχωρημένα τυπικά καρκινώματα και μέγεθος < 2 cm (8% έναντι 74% στα 3 έτη). Προφανώς αυτοί οι όγκοι πρέπει να διαφοροποιηθούν από τους δυσπλαστικούς όζους για τους οποίους δεν υπάρχει συμφωνία σχετικά με τα διαγνωστικά κριτήρια που πρέπει να εφαρμόζονται. Η μικροσκοπική διήθηση των πυλαίων αγγείων από τον όγκο μπορεί να υποδηλώνει την κακοήγη φύση αυτών των πρώιμων περιπτώσεων αλλά στο μέλλον η μοριακή ανάλυση μπορεί να αποδειχθεί η καλύτερη μέθοδος για την ακριβή πρόγνωση.

“ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ” ΚΑΙ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΟ ΗΚΚ

Οι περισσότεροι ασθενείς με ΗΚΚ διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο που δεν επιτρέπει τη χρήση ριζικών θεραπειών. Η φυσική ιστορία της νόσου και οι προγνωστικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν αυτό το στάδιο είναι πλέον γνωστά, σε αντίθεση με ό,τι συνέβαινε πριν από δύο δεκαετίες όταν η

επιβίωση των ασθενών μετά τη διάγνωση ήταν μικρότερη του έτους. Σε 25 τυχαιοποιημένες μελέτες, η μονοετής και διετής επιβίωση των ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία ήταν 10-72% και 8-50%, αντίστοιχα (Llovet JM, et al, 2003). Το μεγάλο εύρος υποδηλώνει την ετερογένεια της νόσου στους μη χειρουργήσιμους ασθενείς με ΗΚΚ και την ανάγκη κατάταξής τους σε διαφορετικές προγνωστικές ομάδες. Σε μία ομάδα 102 ασθενών που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία σε 2 τυχαιοποιημένες μελέτες έγινε ανάλυση των προγνωστικών παραγόντων. Η επιβίωση στα 1, 2, 3 έτη ήταν αντίστοιχα 54%, 40% και 28% και οι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες ήταν η παρουσία συμπτωμάτων από τη νόσο (φυσική κατάσταση ασθενούς: 1-2 της κλίμακας ECOG) και ενδείξεις διηθητικού όγκου, οριζόμενου ως αγγειακή διήθηση ή εξωηπατική επέκταση. Η επιβίωση ασθενών ενδιάμεσου σταδίου (ασυμπτωματικοί ασθενείς, χωρίς διήθηση) ήταν 80%, 65% και 50% στα 1, 2, 3 έτη, αντίστοιχα. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (συμπτωματικοί ή διηθητικοί όγκοι, ή και τα δύο) η επιβίωση ήταν 29%, 16% και 8% στα 1,2,3 έτη, αντίστοιχα (Llovet JM, et al, 1999α). Η συνεκτίμηση του επιπέδου της α-φετοπρωτεΐνης και της αλκαλικής φωσφατάσης, του σταδίου κατά Child-Pugh και της παρουσίας ασκίτη μπορεί να συμβάλλουν στον πιο ακριβή καθορισμό της πρόγνωσης.

ΗΚΚ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

Σε μεγάλο αριθμό ασθενών, ιδίως στην Ασία και Αφρική, η διάγνωση της νόσου τίθεται μετά την εμφάνιση έντονων συμπτωμάτων τελικού σταδίου της νόσου. Η πρόγνωση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πολύ πτωχή με προσδόκιμο επιβίωσης μικρότερο των 6 μηνών και χωρίς βελτίωση της

επιβίωσης με θεραπεία. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ασθενείς σταδίου III κατά Okuda ή με φυσική κατάσταση 3 ή 4 της κλίμακας ECOG. Επίσης, ασθενείς με κίρρωση σταδίου C κατά Child-Pugh και ΗΚΚ που δεν είναι υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος χαρακτηρίζονται ως ασθενείς τελικού σταδίου.

δ. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα συστήματα σταδιοποίησης πρέπει να διαχωρίζουν τους ασθενείς σε ομάδες με παρόμοια πρόγνωση και διευκολύνουν στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Το στάδιο της νόσου είναι ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας, αλλά στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα το προγνωστικό μοντέλο είναι πολύπλοκο. Η επιβίωση των ασθενών εξαρτάται επίσης και από την ηπατική λειτουργία, η οποία επηρεάζει τη δυνατότητα εφαρμογής των διάφορων θεραπειών. Για τη σταδιοποίηση του ΗΚΚ χρησιμοποιούνται δύο κύρια συστήματα (πίνακες 2 και 3) : η κατά όγκο-λεμφαδένες-μετάσταση σταδιοποίηση (TNM) και η κατά Okuda σταδιοποίηση. Η TNM σταδιοποίηση στο ΗΚΚ έχει τροποποιηθεί πολλές φορές γιατί δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής. Η σταδιοποίηση κατά Okuda περιέχει μεταβλητές που σχετίζονται με το φορτίο του όγκου και την ηπατική λειτουργία (χολερυθρίνη, λευκωματίνη, ασκίτης) και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς. Όμως, δεν δύναται να διαχωρίσει τους ασθενείς μεταξύ πρώιμης και προχωρημένης νόσου και είναι περισσότερο χρήσιμη για την αναγνώριση ασθενών τελικού σταδίου. Πέντε νέα συστήματα σταδιοποίησης έχουν επιχειρήσει να ξεπεράσουν αυτά τα μειονεκτήματα : Ιαπωνικό (The Liver Cancer Study Group of Japan, 1994), Γαλλικό (Chevret S, et al, 1999), Ιταλικό (CLIP, 2000), Κινεζικό (Leung TW, et

al, 2002) και της Βαρκελώνης (Llovet JM, et al, 1999γ). Η σταδιοποίηση με το σύστημα της Βαρκελώνης (πίνακας 4) είναι χρήσιμη για την επιλογή της θεραπείας σε ασθενείς αρχικού σταδίου, ενώ τα άλλα συστήματα φαίνεται να είναι χρήσιμα για την πρόγνωση των ασθενών προχωρημένου σταδίου. Η Ιατρική κοινότητα έχει ανάγκη δημιουργίας ενός κοινά αποδεκτού συστήματος σταδιοποίησης.

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση ΗΚΚ κατά Okuda

Σταδιοποίηση κατά Okuda	
Κριτήριο	
Μέγεθος όγκου*	>5% = "+", <5% = "-"
Ασκίτης	Κλινικά εμφανής = "+", Κλινικά μη εμφανής = "-"
Αλβουμίνη ορού	< 3 g/dl = "+", > 3 g/dl = "-"
Χολερυθρίνη ορού	> 3 mg/dl = "+", < 3 mg/dl = "-"
Στάδιο	
I	Κανένα θετικό
II	1 ή 2 θετικά
III	3 ή 4 θετικά

*Ο λόγος της μεγαλύτερης διάστασης του όγκου προς την μεγαλύτερη διάσταση του ήπατος

Πίνακας 3. Σταδιοποίηση ΗΚΚ κατά TNM**Πρωτοπαθής όγκος (T)**

- TX Δεν μπορεί να εκτιμηθεί
 T0 Χωρίς ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
 T1 Μονήρης όγκος χωρίς αγγειακή διήθηση
 T2 Μονήρης όγκος με αγγειακή διήθηση ή πολλαπλοί όγκοι χωρίς κανείς να είναι μεγαλύτερος από 5 cm
 T3 Πολλαπλοί όγκοι μεγαλύτεροι των 5 cm ή όγκος που διηθεί μείζονα κλάδο της πυλαίας ή ηπατικής φλέβας
 T4 Όγκος(-οι) με διήθηση παρακείμενων οργάνων εκτός από την χοληδόχο κύστη ή διάτρηση του περιτοναίου

Περιοχικοί Λεμφαδένες (N)

- NX Δεν μπορούν να εκτιμηθούν
 N0 Χωρίς μετάσταση στους περιοχικούς λεμφαδένες
 N1 Ύπαρξη μεταστάσεων στους περιοχικούς λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

- MX Δεν μπορούν να εκτιμηθούν
 M0 Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
 M1 Ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Σταδιοποίηση κατά TNM			
Στάδιο	TNM	Περιοχικοί λεμφαδένες	Απομακρυσμένες μεταστάσεις
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T4	N0	M0
IIIC	Όποιο T	N1	M0
IV	Όποιο T	Όποιο N	M1

Πίνακας 4. Σταδιοποίηση ΗΚΚ με το σύστημα της Βαρκελώνης

ε. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Οι θεραπείες για το ΗΚΚ διαχωρίζονται στις επιθετικές, που στοχεύουν στην ίαση, και στις ανακουφιστικές θεραπείες. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, η μεταμόσχευση ήπατος και η διαδερμική καταστροφή του όγκου έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη ύφεση της νόσου σε μεγάλο ποσοστό ασθενών και θεωρείται ότι βελτιώνουν την επιβίωση. Οι ανακουφιστικές θεραπείες δεν αποσκοπούν στην ίαση, αλλά σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να παρουσιάσουν ανταπόκριση της νόσου και ίσως να βελτιώσουν και την επιβίωση.

ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΘΕΤΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Στις Δυτικές χώρες "επιθετικές" θεραπείες εφαρμόζονται σε ειδικά κέντρα στο 30-40% των ασθενών, ενώ στην Ιαπωνία ποσοστό 60-90% των ασθενών υποβάλλονται σε "επιθετική" θεραπευτική αντιμετώπιση λόγω του εκτεταμένου προγράμματος πρόληψης του ΗΚΚ και της ευρείας εφαρμογής αυτών των θεραπειών.

Ωστόσο, οι τρεις κύριοι τρόποι αντιμετώπισης της νόσου δεν έχουν αξιολογηθεί σε τυχαιοποιημένες μελέτες λόγω του μεγάλου αριθμού ασθενών και των κατάλληλων υποδομών που απαιτούνται. Προσπάθειες να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της χειρουργικής θεραπείας έναντι της διαδερμικής απέτυχαν στην Ιταλία και στην Ιαπωνία, γι' αυτό δεν υπάρχει τεκμηρίωση της καλύτερης θεραπείας σε ασθενείς με πρώιμο ΗΚΚ και καλή ηπατική λειτουργία. Ενδείξεις για το σχετικό όφελος αναδεικνύονται από αρκετές μη τυχαιοποιημένες μελέτες. Η χειρουργική αφαίρεση της νόσου και η μεταμόσχευση ήπατος επιτυγχάνουν τα καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα

σε προσεκτικά επιλεγμένους ασθενείς (5ετής επιβίωση 60-70%) και φαίνεται ότι αποτελούν την καλύτερη επιλογή (Mazzaferro V, et al, 1996, Fong Y, et al, 1999). Οι διαδερμικές θεραπείες παρουσιάζουν καλά αποτελέσματα (5ετής επιβίωση 40-50%), αλλά δεν έχουν τα ίδια ποσοστά ανταπόκρισης σε σύγκριση με τις χειρουργικές θεραπείες ως πρώτης γραμμής θεραπεία. Η μεταμόσχευση ήπατος θεωρείται η καλύτερη θεραπεία για ασθενείς με μονήρη όγκο και μη αντιρροπούμενη κίρρωση ή με πολυκεντρικούς μικρούς όγκους.

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΦΑΙΡΕΣΗ

Η ηπατεκτομή είναι η θεραπεία εκλογής για το ΗΚΚ σε μη κίρρωτικούς ασθενείς (5% των περιπτώσεων στη Δύση, 40% στην Ασία) όπου μπορούν να γίνουν εκτεταμένες εκτομές με μικρό ποσοστό επικίνδυνων για τη ζωή επιπλοκών. Αντίθετα, σε ασθενείς που έχουν κίρρωση, απαιτούνται αυστηρά κριτήρια επιλογής για να αποφευχθούν επιπλοκές όπως η ηπατική ανεπάρκεια. Οι σύγχρονες απαιτήσεις για τη χειρουργική θεραπεία περιλαμβάνουν τη χρήση μετάγγισης αίματος σε ποσοστό μικρότερο από 10% των ασθενών, θνησιμότητα από τη θεραπεία μικρότερη από 1-3% και πενταετή επιβίωση υψηλότερη από 50% (Bruix J, et al, 2002). Για ασθενείς με μονήρες ΗΚΚ και κίρρωση σταδίου Α κατά Child-Pugh δεν πληρούνται πάντα αυτά τα κριτήρια. Προσεκτική επιλογή των υποψηφίων ασθενών για εκτομή της νόσου επιτρέπει 5ετή επιβίωση σε ποσοστό 70%, εφόσον οι ασθενείς έχουν μονήρη όγκο και πολύ καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία (Child-Pugh hyper A). Στην Ιαπωνία χρησιμοποιείται η διερεύνηση με indocyanine-green ώστε να προσδιοριστούν οι καταλληλότεροι ασθενείς. Στην Ευρώπη

χρησιμοποιείται η πίεση της πυλαίας φλέβας και η χολερυθρίνη. Κλινικά σημαντική πυλαία υπέρταση ορίζεται ως η ύπαρξη διαφοράς πίεσης στην ηπατική φλέβα μεγαλύτερη από 10 mmHg, η παρουσία κισμών οισοφάγου ή σπληνομεγαλίας με αριθμό αιμοπεταλίων χαμηλότερο από $100 \times 10^9/L$. Ασθενείς χωρίς σημαντική πυλαία υπέρταση και με φυσιολογική χολερυθρίνη, παρουσιάζουν 70% πενταετή επιβίωση, ενώ ασθενείς με πυλαία υπέρταση έχουν πενταετή επιβίωση σε ποσοστό 50% που γίνεται ακόμα μικρότερη αν συνυπάρχουν και οι δύο αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες. Με την εφαρμογή και των δύο αυτών κριτηρίων η εγχειρησιμότητα είναι 5-10%.

Υποτροπή του όγκου στα 5 έτη εμφανίζεται σε ποσοστό 70% των περιπτώσεων, συνδυάζοντας υποτροπή του αρχικού όγκου αλλά και νεοεμφανιζόμενους όγκους. Η διήθηση αγγείων, η χαμηλή διαφοροποίηση του όγκου και η ύπαρξη δορυφόρων οζιδίων αυξάνουν της πιθανότητες υποτροπής της νόσου (Nagasue N, et al, 1993). Η χρήση συμπληρωματικής θεραπείας με χημειοεμβολισμό ή με χημειοθεραπεία δεν προσθέτουν όφελος, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρήση ραδιοεπισημασμένης λιπιοδόλης ή ιντερφερόνης μπορεί να ωφελεί (Schwartz JD, et al, 2002, Lau WY, et al, 1999). Επίσης, σε κλινική μελέτη με 150 ασθενείς διαπιστώθηκε ότι η χρήση ανοσοθεραπείας με ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα ελάττωσε σημαντικά το ποσοστό υποτροπών της νόσου και παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν σε τυχαioποιημένη μελέτη με 89 ασθενείς με τη χρήση ρετινοειδών (Takayama T, et al 2000, Muto Y, et al, 1996). Ωστόσο, χρειάζεται επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων με πρόσθετες μελέτες.

ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΗΠΑΤΟΣ

Το ΗΚΚ είναι ο μόνος συμπαγής όγκος στον οποίο η μεταμόσχευση έχει σημαντικό ρόλο. Η μεταμόσχευση ήπατος έχει αλλάξει πλήρως την θεραπευτική στρατηγική του ΗΚΚ. Στη Δύση η μεταμόσχευση ήπατος αποτελεί πολύ σημαντική εξέλιξη, αλλά στην Ασία η εφαρμογή της είναι ακόμη περιορισμένη. Θεωρητικά η μεταμόσχευση ήπατος θα μπορούσε να θεραπεύσει τη νόσο αλλά και την υποκείμενη κίρρωση. Πριν από δύο δεκαετίες τα κριτήρια για μεταμόσχευση ήταν ελαστικά και τα αποτελέσματα ήταν περιορισμένα τόσο ως προς την υποτροπή της νόσου (32-54%) όσο και την επιβίωση των ασθενών (5ετής επιβίωση < 40%), βοήθησαν όμως στο να καθορισθούν οι καλύτεροι υποψήφιοι για αυτή τη θεραπευτική προσέγγιση (Ringe B, et al, 1991). Από τα μέχρι σήμερα δεδομένα ως καταλληλότεροι ασθενείς με ΗΚΚ για μεταμόσχευση θεωρούνται όσοι έχουν μονήρη όγκο < 5 cm ή μέχρι 3 όζους < 3 cm, περιστατικά που όταν αντιμετωπισθούν σε εξειδικευμένα κέντρα παρουσιάζουν πενταετή επιβίωση 70%, με υποτροπή της νόσου σε ποσοστό μικρότερο από 15%. Η έλλειψη δότου είναι ο κύριος παράγοντας που περιορίζει το όφελος από τη μεταμόσχευση. Ένα κρίσιμο σημείο είναι ότι υπάρχει ουσιαστικό όφελος μόνο στους ασθενείς όπου ο χρόνος αναμονής είναι μικρότερος των 6 μηνών. Στις Δυτικές χώρες ο χρόνος αναμονής μπορεί να υπερβεί τους 12 μήνες και έτσι ποσοστό 20-50% των ασθενών τελικά δεν υποβάλλεται σε μεταμόσχευση ήπατος. Αυτό είναι ένα μείζον πρόβλημα για τα περισσότερα προγράμματα μεταμόσχευσης (Yao FY, et al, 2002). Περισσότεροι από 18000 ασθενείς στις ΗΠΑ αναμένουν μεταμόσχευση ήπατος, ενώ ο αριθμός των διαθέσιμων οργάνων παραμένει σταθερός στα 5000/έτος. Στα περισσότερα κέντρα χρησιμοποιούνται

συμπληρωματικές θεραπείες ενώ οι ασθενείς είναι στη λίστα αναμονής. Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα από τυχαιοποιημένες μελέτες, επομένως το πιθανό όφελος από διαδερμική αντιμετώπιση της νόσου, χημειοεμβολισμό ή χημειοθεραπεία αξιολογείται από περιγραφικές μελέτες ή μελέτες κόστους-ωφέλειας. Χρήση διαφόρων μεθόδων μεταμόσχευσης δε φαίνεται να έχει βοηθήσει σημαντικά.

Η μεταμόσχευση από εν ζωή δότη είναι η πλέον προσιτή εναλλακτική λύση (Trotter J, et al, 2002). Αυτή η μέθοδος ξεκίνησε στην Ασία λόγω νομικών και κοινωνικών περιορισμών για τη χρήση πτωματικών μοσχευμάτων. Περίπου 3000 μεταμοσχεύσεις έχουν πραγματοποιηθεί παγκοσμίως με τη χρήση δεξιού ηπατικού λοβού. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί μόνο μικρές κλινικές μελέτες σε ασθενείς με ΗΚΚ και τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα είναι αβέβαια. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αποφεύγεται ο μακρός χρόνος αναμονής ενώ το μειονέκτημα είναι ότι η χειρουργική επέμβαση είναι εξαιρετικά περίπλοκη και απαιτείται ειδικά εκπαιδευμένη ομάδα χειρουργών (Cronin D, et al, 2001). Η χειρουργική νοσηρότητα φτάνει το 20-40%, ενώ υπάρχει μικρή πιθανότητα θνητότητας του δότη (0,3-0,5%). Η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου είναι χαμηλή και τελικά μόνο το 35% των υποψηφίων ασθενών υποβάλλονται σε μεταμόσχευση.

ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Η διαδερμική θεραπεία είναι η πλέον ενδεδειγμένη αντιμετώπιση για το ανεγχείρητο ΗΚΚ αρχικού σταδίου. Σε μερικά κέντρα της Ιαπωνίας εφαρμόζεται ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική πρόοδος σε νέες τεχνολογίες που επιτρέπουν την αντιμετώπιση του όγκου. Η

καταστροφή των καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται επίσης με τη χρήση χημικών ουσιών, όπως η αλκοόλη ή το οξικό οξύ ή με υπερθερμία, τροποποίηση της θερμοκρασίας του όγκου με ραδιοκύματα, μικροκύματα, laser, και κρυοπηξία (Okada S, 1999). Η διαδερμική έγχυση αλκοόλης είναι η κλασσική τεχνική της οποίας τα πλεονεκτήματα και οι δυνατότητες έχουν εκτενώς δημοσιευθεί. Το κόστος είναι μικρό, είναι εύκολη τεχνική και οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιορισμένες. Οι ανταποκρίσεις μετά από διαδερμική έγχυση αλκοόλης είναι 90-100% σε όγκους μικρότερους από 2 cm, 70% σε όγκους 3 cm και 50% σε όγκους με διάμετρο 5 cm. Επιλεγμένοι ασθενείς με ηπατική λειτουργία σταδίου A κατά Child-Pugh σε πλήρη ύφεση μετά από διαδερμική έγχυση αλκοόλης έχουν πενταετή επιβίωση 50% (Livraghi T, et al, 1995β). Η μέθοδος αυτή θεωρείται θεραπεία εκλογής για όγκους μικρότερους των 3 cm, αλλά για μεγαλύτερους όγκους αναζητούνται εναλλακτικές προσεγγίσεις.

Αντιμετώπιση του όγκου με ραδιοκύματα αποτελεί την εναλλακτική θεραπεία που έχει μελετηθεί περισσότερο από τις άλλες μεθόδους (Rossi S, et al, 1996, Buscarini L, et al, 2001). Διάφορες συσκευές είναι διαθέσιμες: με μονά ή πολλαπλά ηλεκτρόδια με ψυχρά άκρα ή μονά ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με βελόνες σχήματος J. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί διαδερμικά, λαπαροσκοπικά ή μετά από λαπαροτομία και θεωρείται ότι επιτυγχάνονται ίδιες ανταποκρίσεις με τη διαδερμική έγχυση αλκοόλης αλλά σε σημαντικά λιγότερες συνεδρίες ενώ επιτυγχάνονται καλύτερες ανταποκρίσεις σε όγκους μεγέθους μεγαλύτερους των 3 cm. Η πενταετής επιβίωση με τη χρήση ραδιοκυμάτων είναι 30-40% αλλά αναμένεται ότι τα αποτελέσματα θα βελτιωθούν στο μέλλον. Σε τυχαioποιημένη μελέτη έγινε σύγκριση των δύο

μεθόδων σε 102 ασθενείς και δε διαπιστώθηκε διαφορά στην επιβίωση των ασθενών αν και η χρήση ραδιοκυμάτων προσέφερε καλύτερο τοπικό έλεγχο της νόσου (Lencioni R, et al, 2003). Σε ανασκόπηση 3670 ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με ραδιοκύματα, η θνησιμότητα ήταν 0.5% και οι επιπλοκές 8.9% (Mulier S, et al, 2002). Η υποκάψια εντόπιση του όγκου και η χαμηλή διαφοροποίηση έχουν συνδεθεί με τη διασπορά καρκινικών κυττάρων στην οδό της βελόνας, γεγονός που δεν παρατηρείται σε ενδοηπατικούς καλά διαφοροποιημένους όγκους. Άλλες θεραπευτικές τεχνικές όπως η κρυοπηξία είτε συνοδεύονται από σημαντικές επιπλοκές είτε δεν έχουν δείξει κάποιο πλεονέκτημα (μικροκύματα), ή είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο.

Οι προβλεπτικοί παράγοντες για ανταπόκριση της νόσου είναι το μέγεθος του όγκου και η μορφολογία του (εγκυστωμένος ή διηθητικός). Ακόμα και όγκοι 2 cm μπορεί να έχουν δορυφόρα οζίδια κοντά στον κύριο όζο, το οποίο δικαιολογεί την ανάγκη δημιουργίας ζώνης εξαλείψεως (ablation) 1 cm γύρω από τον όγκο. Ο έλεγχος της ανταπόκρισης γίνεται με τη χρήση αξονικής τομογραφίας ένα μήνα μετά την εφαρμογή της θεραπείας. Στο μέλλον η υπερηχογραφία με σκιαγραφικό μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση. Στην εικόνα 1 φαίνεται παράδειγμα αντιμετώπισης ενός ΗΚΚ με ραδιοκύματα.

Εικόνα 1. Νέκρωση του όγκου μετά από εφαρμογή θεραπείας με ραδιοκύματα

ΑΝΑΚΟΥΦΙΣΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι ανακουφιστικές θεραπείες εφαρμόζονται σε ασθενείς με όγκους προχωρημένου σταδίου. Διάφοροι θεραπευτικοί χειρισμοί έχουν διερευνηθεί στα πλαίσια τυχαιοποιημένων μελετών και αναλύσεις της αποτελεσματικότητάς τους έχουν δημοσιευθεί. Στις θεραπείες αυτές περιλαμβάνονται ο εμβολισμός ή ο χημειοεμβολισμός, η ενδοαρτηριακή ή συστηματική χημειοθεραπεία, τοπική ακτινοβολήση με ενδοογκική χορήγηση ραδιοεπισημασμένης λιπιοδόλης, ορμονοθεραπεία, ανοσοθεραπεία κ.α. Σε μετα-αναλύσεις διαπιστώθηκε βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με εμβολισμό ή χημειοεμβολισμό σε καλά επιλεγμένους ασθενείς και η μέθοδος αυτή αποτελεί πλέον μία καθιερωμένη θεραπεία. Με τη χρήση ταμοξιφαίνης δεν διαπιστώθηκε βελτίωση της επιβίωσης. Άλλες μέθοδοι που έχουν ανταποκρίσεις μεγαλύτερες από 20%, όπως η χρήση λιπιοδόλης επισημασμένης με ^{131}I ή η χρήση λιπιοδόλης μαζί με χημειοθεραπεία, χρήζουν διερεύνησης με τυχαιοποιημένες μελέτες. Η αρχική αισιοδοξία με τη χρήση της ιντερφερόνης και του οκτρεοτιδίου δεν επιβεβαιώθηκε από επόμενες μελέτες (Lai CL, et al, 1993, Kouroumalis E, et al, 1998, Yuen M, et al, 2002).

ΑΡΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΜΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο αρτηριακός εμβολισμός είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για την αντιμετώπιση του ανεγχείρητου ΗΚΚ. Στα αρχικά στάδια της νόσου, ίσως να μην ενδείκνυται ως θεραπεία ^{125}I γραμμής όπως φαίνεται από μία μελέτη από την Ιαπωνία η οποία αναφέρει χειρότερα αποτελέσματα με εμβολισμό συγκριτικά με χειρουργική αντιμετώπιση ή διαδερμική θεραπεία. Η απόφραξη της ηπατικής αρτηρίας έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη νέκρωση των

μεγάλων ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων με καλή αγγείωση. Ο παράγοντας που χρησιμοποιείται για εμβολισμό είναι κυρίως η ζελατίνη που μπορεί να χορηγηθεί σε συνδυασμό με περιοχική χημειοθεραπεία αναμεμιγμένη με λιπιοδόλη (χημειοεμβολισμός). Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι η δοξορουβικίνη, η μιτομυκίνη και η σισπλατίνη. Με τον αρτηριακό εμβολισμό επιτυγχάνονται ανταποκρίσεις σε ποσοστό 15-55% των ασθενών, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται σημαντική καθυστέρηση στην επιδείνωση του όγκου και της διήθησης των αγγείων. Σε ανάλυση 7 τυχαιοποιημένων μελετών με 516 συνολικά ασθενείς, ο εμβολισμός συγκρίθηκε με υποστηρικτική θεραπεία και στις 5 μελέτες χρησιμοποιήθηκε χημειοεμβολισμός με δοξορουβικίνη ή σισπλατίνη. Βελτίωση της επιβίωσης διαπιστώθηκε στις δύο από τις επτά μελέτες ενώ σε μία από αυτές διαπιστώθηκε ότι η ανταπόκριση στη θεραπεία ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση των ασθενών (Llovet JM, et al, 2002). Η μετα-ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε σημαντική βελτίωση της επιβίωσης με τη χρήση χημειοεμβολισμού έναντι της συντηρητικής θεραπείας (Llovet J, et al, 2003). Η βελτίωση της επιβίωσης διαπιστώθηκε μόνο με τον χημειοεμβολισμό και όχι με τον απλό εμβολισμό. Επίσης, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το ποιά είναι η αποτελεσματικότερη χημειοθεραπευτική ουσία και η καλύτερη θεραπευτική στρατηγική. Στις δύο θετικές για τον χημειοεμβολισμό τυχαιοποιημένες μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη δοξορουβικίνη και στη δεύτερη σισπλατίνη. Η επιλογή των ασθενών για χημειοεμβολισμό είναι εξαιρετικής σημασίας και το όφελος από τη θεραπεία δεν θα πρέπει να αναιρεθεί από την πρόκληση ηπατικής ανεπάρκειας που δύναται να προκληθεί από αυτή. Οι

καλύτεροι υποψήφιοι για θεραπεία με χημειοεμβολισμό είναι ασθενείς με καλά διατηρημένη ηπατική λειτουργία και ασυμπτωματικούς πολυοζώδεις όγκους χωρίς διήθηση αγγείων ή εξωηπατική επέκταση. Αντίθετα, ασθενείς με ηπατική δυσλειτουργία ή ηπατική ανεπάρκεια (Child-Pugh στάδιο B και C), πρέπει να αποκλείονται διότι η ισχαιμία του ήπατος μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Πολλαπλά χημειοθεραπευτικά σχήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του ΗΚΚ με συστηματική διασπορά με απογοητευτικά όμως αποτελέσματα (ποσοστά ανταποκρίσεων 0-39%). Το ΗΚΚ είναι ανθεκτικό στη χημειοθεραπεία και αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους. Ιστολογική ανάλυση έχει δείξει ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση του ενζύμου δεϋδροπυριμιδική δεϋδρογονάση (DPD), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στην 5-φθοριο-ουρακίλη (Jiang W, et al, 1997). Επίσης, στο ΗΚΚ υπάρχει αυξημένη έκφραση του γονιδίου πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα (MDR-multidrug resistance) και του προϊόντος του, της γλυκοπρωτεΐνης P (Soini Y, et al, 1996).

Η δοξορουμπικίνη είναι το φάρμακο που έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί πιο συχνά. Υπάρχει μόνο μία τυχαιοποιημένη μελέτη όπου συγκρίθηκε η χορήγηση δοξορουμπικίνης έναντι μόνο υποστηρικτικής αγωγής (Lai CL, et al, 1988). Η διάμεση επιβίωση με τη δοξορουμπικίνη ήταν 10.6 εβδομάδες έναντι 7.5 εβδομάδων ($p=0.036$) ενώ μόνο 3% των ασθενών παρουσίασαν μερική ανταπόκριση της νόσου (συρρίκνωση της νόσου $> 50\%$). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας όμως ήταν σοβαρές με τοξικούς

θανάτους σε ποσοστό 25% που περιελάμβαναν σηψαιμία και καρδιοτοξικότητα. Τα αποτελέσματα από 13 δημοσιευμένες μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση της δοξορουμπικίνης ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμένη θεραπεία παρουσιάζει ανταποκρίσεις σε ποσοστό μικρότερο από 20% των ασθενών και η διάμεση επιβίωση ήταν μικρότερη από 4 μήνες (Nerenstone SR et al, 1988, Lai CL et al, 1988). Επιπλέον οι ανταποκρίσεις της νόσου έχουν σύντομη διάρκεια.

Σε συστηματική ανασκόπηση (Simonneti RG, et al, 1997) και σε μετα-ανάλυση (Mathurin P, et al, 1998), φαίνεται ότι ούτε η δοξορουμπικίνη ούτε κάποιο άλλο κυτταροτοξικό φάρμακο επιφέρει βελτίωση της επιβίωσης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χημειοθεραπεία έχει μηδαμινή συμβολή στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με ΗΚΚ.

ΠΕΡΙΟΧΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το γεγονός ότι η συστηματική χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του ΗΚΚ, οδήγησε τους ερευνητές στη χρησιμοποίηση της περιοχικής χορήγησης χημειοθεραπείας. Οι θεραπείες αυτές βασίζονται στη διπλή αιμάτωση του ήπατος μέσω της ηπατικής αρτηρίας αλλά και της πυλαίας φλέβας. Οι όγκοι του ήπατος όμως αιματώνονται από την ηπατική αρτηρία. Η χορήγηση χημειοθεραπείας στην ηπατική αρτηρία επιτρέπει την αυξημένη έκθεση του όγκου στο φάρμακο με λιγότερες συστηματικές επιπτώσεις.

Η χορήγηση της θεραπείας μπορεί να γίνει μέσω διαδερμικού καθετήρα αγγειογραφίας, μέσω εμφυτευμένης συσκευής που τοποθετείται μετά από λαπαροτομή και συνδέεται με εξωτερική συσκευή έγχυσης, ή μέσω

υποδορίων συσκευών που τοποθετούνται χειρουργικά. Τα φάρμακα που προτιμούνται για έγχυση μέσω της ηπατικής αρτηρίας είναι οι φθοριοπυριμιδίνες (5-FU και 5-FUDR), η σισπλατίνη, η δοξορουμπικίνη και η επιρουμπικίνη. Αρκετές μελέτες φάσης II έχουν δημοσιευθεί με μικρό αριθμό ασθενών και οι περισσότερες δεν έχουν ομάδα ελέγχου. Η ενδοαρτηριακή χορήγηση δοξορουμπικίνης φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική από τη συστηματική χορήγηση (Tzoracoleftherakis EE, et al, 1999). Σε κλινική μελέτη με 10 ασθενείς διαπιστώθηκε ανταπόκριση του όγκου σε ποσοστό 50% με τη χρήση μιτομυκίνης C και FUDR και υποδόριας χορήγησης ιντερφερόνης (Atia OT, et al, 1992). Η σισπλατίνη έχει παρουσιάσει ανταποκρίσεις σε ποσοστό 20-40%.

Αν και τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά δεν θεωρείται πιθανό ότι η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση θα έχει στο μέλλον σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του ΗΚΚ. Σημαντική τοξικότητα, όπως οξεία χολαγγειίτιδα και μυελοτοξικότητα μπορεί να εμφανισθούν και επιπλέον, χρειάζεται εγχείρηση για την τοποθέτηση της συσκευής έγχυσης, ενώ η πλειοψηφία των ασθενών με ανεγχείρητο ΗΚΚ έχει αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας μετά τη χειρουργική επέμβαση λόγω της υποκείμενης κίρρωσης και της ηπατικής ανεπάρκειας.

ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων και ανδρογόνων στο ΗΚΚ αποτελεί τη βάση για τη χορήγηση ορμονοθεραπείας (Boix L, et al, 1993). Από τα αντιοιστρογόνα, η ταμοξιφαίνη είναι το πλέον μελετημένο φάρμακο και σε *in vitro* πειράματα διαπιστώθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του ΗΚΚ. Ο

μηχανισμός δράσης όμως μπορεί να μη σχετίζεται με την αντιοιστρογονική δράση της ταμοξιφαίνης. Τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την P-γλυκοπρωτεΐνη, που είναι το προϊόν του γονιδίου MDR και έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντίστασης σε πολλαπλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Huang CC, et al, 1992). Η ταμοξιφαίνη φαίνεται ότι μπορεί να αντιστρέψει αυτή τη δράση της P-γλυκοπρωτεΐνης (Berman E, et al, 1991). Συνολικά, οι μελέτες με τη χρήση ταμοξιφαίνης έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Τρεις μικρές τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν βελτίωση της επιβίωσης συγκριτικά με την υποστηρικτική θεραπεία ή τη χρήση placebo. Δύο άλλες μελέτες με 120 και 496 ασθενείς δεν έδειξαν όφελος με τη χρήση ταμοξιφαίνης. Σε μετα-ανάλυση επτά τυχαιοποιημένων μελετών με συνολικά 898 ασθενείς δε βρέθηκε σημαντική δραστηριότητα της ταμοξιφαίνης ούτε βελτίωση της επιβίωσης συγκριτικά με την υποστηρικτική αντιμετώπιση (Llovet JM, et al, 2003). Επομένως, δε θεωρείται ότι η ταμοξιφαίνη από μόνη της έχει ιδιαίτερη θέση στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ΗΚΚ.

Σε μερικές μελέτες έγινε συνδυασμός της ταμοξιφαίνης με χημειοθεραπεία, όπως ετοποσίδη ή δοξορουμπικίνη αλλά και πάλι δε διαπιστώθηκε κάποιο επιπρόσθετο όφελος.

Αντιανδρογόνα όπως η κετοконаζόλη και η κυπροτερόνη έχουν επίσης δοκιμασθεί αλλά ακόμα τα αποτελέσματα είναι πρώιμα για να εκτιμηθεί η χρησιμότητά τους. Σε μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη η χρήση αντιανδρογόνων ή ενός LHRH αγωνιστή είχε επίσης απογοητευτικά αποτελέσματα (Grimaldi C, et al, 1998). Σε άλλη τυχαιοποιημένη μελέτη όμως, η χρήση σωματοστατίνης βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση συγκριτικά

με placebo από 4 στους 13 μήνες (Kouroumalis E, et al, 1998) αποτέλεσμα που όμως δεν επιβεβαιώθηκε σε επόμενη μελέτη (Yuen M, et al, 2002).

ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ανοσοθεραπεία με τη χρήση κυρίως ιντερφερόνης-α και ιντερφερόνης-β έχει μελετηθεί στο ΗΚΚ. Η θεωρητική βάση αυτών των θεραπειών είναι ότι η ιντερφερόνη-α παρουσιάζει ανοσοτροποποιητική, αντιϊκή, αντιαγγειογενετική και άμεση κυτταροτοξική δράση και θα μπορούσε να παρουσιάσει αξιόλογη αντινεοπλασματική δράση στο ΗΚΚ. Ανάμεικτα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν με τη χρήση IFN-α ως μονοθεραπείας σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ. Σε μία μελέτη στην Κίνα διαπιστώθηκε βελτίωση της επιβίωσης (Lai CL, et al, 1993), ενώ σε άλλη μελέτη από την Ισπανία δεν διαπιστώθηκε βελτίωση της επιβίωσης και η ιντερφερόνη δεν ήταν καλά ανεκτή (Llovet J, et al, 2000). Ο συνδυασμός ιντερφερόνης με χημειοθεραπεία βελτίωσε την επιβίωση σε ασθενείς με ανεγχείρητο ΗΚΚ, αλλά προκάλεσε σημαντική τοξικότητα, κυρίως μυελοτοξικότητα και βλεννογονίτιδα (Kountouras et al, 1995, Chung YH, et al, 2000).

Η ιντερφερόνη-β μελετήθηκε ως δευτερογενής προφύλαξη σε ασθενείς με ΗΚΚ λόγω κίρρωσης από ηπατίτιδα C που αντιμετωπίστηκαν με ηπατεκτομή ή διαδερμική έγχυση αλκοόλης και κατόπιν έλαβαν ή όχι IFN-β. Διαπιστώθηκε ότι ένας ασθενής (10%) στην ομάδα της ιντερφερόνης υποτροπίασε, έναντι επτά ασθενών (70%) στην ομάδα placebo (Ikeda K, et al, 2000).

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η γονιδιακή θεραπεία αυτή τη στιγμή περιορίζεται σε προκλινικά και πειραματικά μοντέλα. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ξένων γονιδίων σε κύτταρα στόχους με τη χρήση διαφόρων φορέων όπως ιοί. Πολλές θεραπευτικές στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε προκλινικά μοντέλα και περιλαμβάνουν αντιαγγειογενετική δραστηριότητα, γενετική ανοσοθεραπεία, αντικατάσταση ογκοκατασταλτικών γονιδίων κ.α. Ωστόσο, πολλά τεχνικά προβλήματα πρέπει να ξεπεραστούν μέχρι να εφαρμοσθεί κλινικά η γονιδιακή θεραπεία, όπως η βελτίωση της μεταφοράς γονιδίων, χρήση ειδικών γονιδίων για κάθε όγκο, σταθερή γονιδιακή έκφραση, βελτίωση του θεραπευτικού παραθύρου (Sangro B, et al, 2002).

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ

Δεδομένα για την αντιμετώπιση του ΗΚΚ έχουμε από περίπου 100 τυχαιοποιημένες και από πολλές περιγραφικές μελέτες. Επιπλέον, οι γεωγραφικές διαφορές στην επίπτωση της νόσου, την κλινική εικόνα και τις διαθέσιμες θεραπείες έχουν συμβάλλει σε διαφορετικές απόψεις για την καταλληλότερη θεραπευτική στρατηγική. Διάφορες θεραπευτικές συστάσεις έχουν δημοσιευθεί (Llovet JM, et al, 1999γ, Makuch M, et al, 1993, Mor E, et al, 1998, Poon RT, et al, 2002). Το σύστημα σταδιοποίησης της Βαρκελώνης (Barcelona-Clinic Liver Cancer Staging System) (πίνακας 4) συνδυάζει το στάδιο του όγκου με τη θεραπευτική στρατηγική και σκοπό έχει να ενοποιήσει την πρόγνωση και την αντιμετώπιση σε μία ενότητα (Bruix J, et al, 2002,

Llovet JM, et al, 1999). Αυτό το σύστημα μπορεί να εφαρμοσθεί στους περισσότερους ασθενείς με ΗΚΚ.

Οι ασθενείς με πολύ πρώιμο (στάδιο 0) ή αρχικού σταδίου (στάδιο A) ΗΚΚ είναι υποψήφιοι για ριζική θεραπεία και αντιμετωπίζονται με ηπατεκτομή αν ο όγκος είναι μονήρης, δεν υπάρχει κλινικά σημαντική πυλαία υπέρταση και η χολερυθρίνη είναι φυσιολογική. Η μεταμόσχευση ήπατος προτείνεται σε ασθενείς με 3 όζους με μέγεθος μικρότερο των 3 cm ή με μονήρη όγκο μικρότερο από 5 cm και διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Διαδερμικές θεραπείες (έγχυση αλκοόλης ή καυτηριασμός με ραδιοσυχνότητες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μικρούς ανεγχείρητους όγκους.

Ασυμπτωματικοί ασθενείς με πολλαπλούς μη διηθητικούς όγκους (στάδιο B) είναι υποψήφιοι για χημειοεμβολισμό, ιδίως αν υπάρχει αντιρροπούμενη κίρρωση κατηγορίας A κατά Child-Pugh.

Οι ασθενείς με προχωρημένους όγκους (στάδιο C) με διήθηση αγγείων ή εξωηπατική επέκταση ή με επηρεασμένη γενική κατάσταση (φυσική κατάσταση ασθενούς 1-2 κατά ECOG) είναι υποψήφιοι για συμμετοχή σε κλινικές μελέτες με νέους αντινεοπλασματικούς παράγοντες. Τέλος, ασθενείς με ΗΚΚ τελικού σταδίου (στάδιο D), με επηρεασμένη γενική κατάσταση (φυσική κατάσταση > 2) ή μεγάλο φορτίο νόσου (Okuda στάδιο III) αντιμετωπίζονται συμπτωματικά.

στ. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Περίπου το 75% των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων σχετίζονται με την ύπαρξη κίρρωσης. Οι περισσότεροι παράγοντες που σχετίζονται αιτιολογικά με την ανάπτυξη ΗΚΚ, όπως ιογενής ηπατίτιδα, χρήση αλκοόλ, μεταβολικά νοσήματα και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες επίσης προκαλούν κίρρωση. Δεν είναι σαφές αν αυτοί οι παράγοντες προκαλούν ΗΚΚ άμεσα ή αν δρουν έμμεσα προκαλώντας χρόνια ηπατική βλάβη. Η χρόνια ηπατική φλεγμονή σχετίζεται με πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων και με αύξηση των γενετικών μεταλλάξεων και αποτελεί πιθανώς κοινή οδό για την κίρρωση και το ΗΚΚ (Huang SN et al, 1995).

Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Αλλαγές σε διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν παρατηρηθεί στο ΗΚΚ. Το p53 έχει μελετηθεί πιο εκτενώς και παρατηρούνται αλλοιώσεις στο 30-60% των περιπτώσεων. Η πιο συχνή αλλοίωση είναι εστιακή μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο και εξάλειψη στο άλλο γονίδιο. Περισσότερες από 100 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στο p53 (Nishida N, et al, 1993). Η μετάλλαξη στο p53 φαίνεται να είναι ένα όψιμο γεγονός στην παθογένεση του ΗΚΚ (Teramoto T, et al, 1994). Αυτό υποστηρίζεται από τις ακόλουθες παρατηρήσεις: 1) Σε μία μελέτη δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις του p53 σε καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα ενώ διαπιστώθηκαν σε αδιαφοροποίητα (Murakami Y, et al, 1991) και 2) Σε μικρό αριθμό ασθενών με πολυεστιακό ΗΚΚ ανευρέθησαν μεταλλάξεις του p53 σε μόνο μία από τις εστίες του όγκου (Oda T, et al, 1992).

Οι μεταλλάξεις του p53 είναι συχνές σε περιοχές όπου υπάρχει υψηλή έκθεση στην αφλατοξίνη B₁ (AFB₁). Η AFB₁ παράγεται από τους μύκητες *aspergillus flavus* και *aspergillus parasiticus* και μεταβολίζεται προς ένα εποξειδίο το οποίο προκαλεί γενετικές μεταλλάξεις, συνήθως μεταθέσεις από G σε T (Bailey EA, et al, 1996). Η έκθεση γίνεται με την κατανάλωση μολυσμένου ρυζιού, καλαμποκιού, φιστικιών ή προϊόντων από ζώα που έχουν καταναλώσει μολυσμένα τρόφιμα. Ο κίνδυνος εμφάνισης ΗΚΚ είναι ανάλογος με την πρόσληψη AFB₁. Η μέση τοξική δόση εκτιμάται να είναι 132 μg/kg/ημέρα. Η μεγαλύτερη έκθεση σε αφλατοξίνη διαπιστώθηκε στις νότιες περιοχές της Αφρικής και της Κίνας. Σε αυτές τις περιοχές έχει διαπιστωθεί μία συγκεκριμένη μετάλλαξη στο p53 που αφορά το κοδικόνιο 249 και είναι αλλαγή από γουανίνη σε θυμίνη (G σε T) που οδηγεί σε αντικατάσταση μιας αργινίνης από σερίνη στην πρωτεΐνη (Ozturk M, 1991). Στις ΗΠΑ όπου η έκθεση στην αφλατοξίνη δεν είναι υψηλή, οι μεταλλάξεις στο p53 δεν αφορούν το κοδικόνιο 249. Η μετάλλαξη αυτή θεωρείται πρώιμο γεγονός στην παθογένεση του ΗΚΚ. Οι επιπτώσεις από την έκθεση στην αφλατοξίνη έχουν συνέργεια με τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ αυξάνει σημαντικά όταν συνυπάρχουν και οι δύο παράγοντες (Ross RK, et al, 1992, Qian GS, et al, 1994).

Υπάρχουν και άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια που σχετίζονται με το ΗΚΚ. Κυτταρογενετική ανάλυση έχει δείξει απώλεια της ετεροζυγότητας (LOH) σε διάφορα χρωμοσώματα : 1p, 4, 5q, 8p, 10q, 11p, 13q, 16, 17p, 22q. Σε πολλά από αυτά τα σημεία βρίσκονται γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια: το APC στο 5q, το p16 στο 9p, το RB στο 13q, το p53 στο 17q. Είναι επίσης πιθανό

ότι και άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να βρίσκονται σε αυτές τις χρωμοσωμικές θέσεις.

Ογκογονίδια

Αντίθετα με τους άλλους καρκίνους, η ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων δεν φαίνεται να έχει μεγάλο ρόλο στην παθογένεια του ΗΚΚ. Οι μεταλλάξεις του *ras* είναι σπάνιες στο ΗΚΚ (< 10%) (Tsuda H, et al, 1989). Το γονίδιο *c-myc* συχνά υπερεκφράζεται, όμως σπάνια είναι μεταλλαγμένο. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί για το *c-fos*. Υπερέκφραση του *c-erbB-2* βρέθηκε μόνο σε 2 από 26 ασθενείς με ΗΚΚ σε μία μελέτη. Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-met* υπερεκφράζεται σε λιγότερο από 50% των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων αλλά οι ασθενείς με όγκους που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα *c-met* έχουν συχνότερα ενδοηπατικές μεταστάσεις και χειρότερη πρόγνωση (Ueki T, et al, 1997).

Ηπατίτιδα Β (HBV)

Ο ιός της ηπατίτιδας Β είναι ένας *hepadna* ιός με DNA γονιδίωμα 3,2 kb και αναπαράγεται μέσω ενός RNA ενδιάμεσου. Υπάρχουν πειστικές ενδείξεις ότι η λοίμωξη με HBV προκαλεί ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Περισσότερα από 80% των περιστατικών ΗΚΚ παρουσιάζονται σε άτομα που έχουν μολυνθεί από HBV. Επίσης, η γεωγραφική κατανομή του ΗΚΚ ταιριάζει με την κατανομή της ηπατίτιδας Β. Η λοίμωξη με HBV αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ περισσότερο από 100 φορές (Beasley RP, et al, 1981). Υπάρχουν όμως και μερικά στοιχεία εναντίον αυτής της σχέσης όπως σε περιοχές της Χιλής όπου η επίπτωση της ηπατίτιδας Β είναι πολύ υψηλή ενώ

η επίπτωση του ΗΚΚ είναι χαμηλή. Επίσης, πρέπει να τονισθεί ότι οι περισσότεροι ασθενείς με λοίμωξη από HBV δεν αναπτύσσουν ΗΚΚ. Ο HBV δεν έχει διευκρινισθεί αν προκαλεί άμεσα ΗΚΚ ή έχει έμμεσο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις υπέρ της άμεσης πρόκλησης ΗΚΚ από τον ίδιο τον ιό: 1) Ο HBV ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή στο 80% των ασθενών με ΗΚΚ (Matsubara K, et al, 1990) 2) Μπορεί να αναπτυχθεί ΗΚΚ σε ασθενείς με λοίμωξη από HBV χωρίς να συνυπάρχει κίρρωση (Okuda K, et al, 1982) 3) Ηπατοκύτταρα ποντικών μπορούν να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή μετά την εισαγωγή DNA του HBV στο γονιδίωμά τους (Hohne M, et al, 1990). Ο HBV επίσης μπορεί να έχει άμεσο ρόλο στην παθογένεση του ΗΚΚ μέσω της πρωτεΐνης X του ιού η οποία ενεργοποιεί τα ογκογονίδια c-jun και c-fos, αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται μέσω του p53, αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor). Σε 84% διαγονιδιακών ποντικών στους οποίους εκφραζόταν η πρωτεΐνη X, αναπτύχθηκε ΗΚΚ χωρίς να υπάρχει ηπατική φλεγμονή ή κίρρωση (Koike K, et al, 1994).

Ο HBV μπορεί επίσης να προκαλέσει ΗΚΚ με έμμεσο μηχανισμό. Η υπόθεση είναι ότι η λοίμωξη από τον ιό προκαλεί χρόνια ηπατική βλάβη με αποτέλεσμα φλεγμονή και ηπατική αναγέννηση. Αυτό προκαλεί κίρρωση η οποία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ΗΚΚ. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στις ακόλουθες παρατηρήσεις: 1) Η έκταση της ηπατικής φλεγμονής είναι ανάλογη με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ. Το 80% των καρκινωμάτων που σχετίζονται με τον HBV εμφανίζονται σε κίρρωτικούς 2) Το 20% αυτών των ασθενών δεν παρουσιάζουν ενσωμάτωση του DNA του ιού στο γονιδίωμα. Ακόμα και όταν υπάρχει ενσωμάτωση του ιού, αυτή σπάνια συμβαίνει κοντά σε κυτταρικά

γονίδια 3) Διαγονιδιακοί ποντικοί όπου υπάρχει έκφραση του HBsAg εμφανίζουν ηπατική φλεγμονή και κατόπιν υπάρχει εξέλιξη σε κίρρωση και ΗΚΚ (Chisari FV, et al, 1989) 4) Το ΗΚΚ μπορεί να αναπτυχθεί σε αναγεννητικούς όζους και αυτοί οι όγκοι είναι γενετικά ταυτόσημοι με τη συνυπάρχουσα αδενωματώδη υπερπλασία (Tsuda H, et al, 1988).

Ηπατίτιδα C (HCV)

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ένας RNA φλαβοϊός 9,6 kb. Στους περισσότερους από τους μισούς ασθενείς η λοίμωξη εξελίσσεται σε χρόνια λοίμωξη και στο 25% υπάρχει εξέλιξη σε κίρρωση και υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ (Heintges T, et al, 1997). Η λοίμωξη από HCV έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά από τη λοίμωξη από HBV. Ο HCV προκαλεί σοβαρότερη φλεγμονή και περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν κίρρωση (70% έναντι 50% για τον HBV). Μέσα σε 15 χρόνια, 75% των ασθενών με κίρρωση σχετιζόμενη με HCV εμφανίζουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Ikeda K, et al, 1993).

Η μοριακή παθογένεση του ΗΚΚ που σχετίζεται με τον HCV δεν έχει καλά κατανοηθεί. Το γονιδίωμα του ιού δεν ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή και δεν υπάρχει δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase) στον μολυσμένο ιστό. Όμως, RNA του ιού και αντιγραφή του ιού έχει βρεθεί σε δείγματα από ΗΚΚ (Kobayashi S, et al, 1994). Οι περισσότεροι ασθενείς με ΗΚΚ λόγω HCV έχουν ενεργό λοίμωξη με ανιχνεύσιμο RNA του ιού στον ορό. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η πυρηνική πρωτεΐνη του HCV έχει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Σε *in vitro* πειράματα έχει φανεί ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να ρυθμίσει επαγωγείς (promoters) ογκογονιδίων. Μπορεί επίσης σε συνδυασμό με το *ras* να

προκαλέσει κακοήγη εξαλλαγή σε ινοβλάστες και σε άλλα πειραματικά μοντέλα να καταστείλει την απόπτωση που προκαλείται από σισπλατίνη ή από την υπερέκφραση του c-myc (Ray RB, et al, 1996).

ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Διάφορα κληρονομούμενα μεταβολικά νοσήματα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κίρρωσης και ΗΚΚ. Η αιμοχρωμάτωση ανήκει σε αυτή την κατηγορία, κληρονομείται με σωματικά υπολειπόμενο τρόπο και 40-60% των ασθενών θα αναπτύξουν ΗΚΚ (Niederau C, et al, 1985). Η εμφάνιση ΗΚΚ είναι σπάνια πριν την ανάπτυξη κίρρωσης αλλά όταν υπάρχει κίρρωση ο κίνδυνος εμφάνισης ΗΚΚ αυξάνει κατά 200 φορές.

Η έλλειψη της α1 αντιθρυψίνης επίσης κληρονομείται με το σωματικό υπολειπόμενο τρόπο. Οι ομοζυγώτες έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ αλλά οι ετεροζυγώτες έχουν τον ίδιο κίνδυνο με το γενικό πληθυσμό.

Η τυροσιναιμία είναι σωματικά υπολειπόμενη νόσος. Περίπου 40% των ασθενών θα εμφανίσουν ΗΚΚ γι'αυτό το λόγο αυτοί οι ασθενείς συχνά υποβάλλονται σε μεταμόσχευση ήπατος.

Άλλα κληρονομούμενα νοσήματα που σχετίζονται με την ανάπτυξη ΗΚΚ είναι η νόσος Wilson, η ηπατική πορφυρία, η οικογενής πολυποδίαση, η αταξία-τηλαγγειεκτασία, η οικογενής χολοστατική κίρρωση, η ατρησία των χοληφόρων, η νευροϊνωμάτωση, το σύνδρομο Budd-Chiari, κ.α.

3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Η ανάπτυξη ενός νεοπλασματος εξαρτάται μεταξύ άλλων από το βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και το βαθμό απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί μορφολογικώς διακριτή, γενετικώς κατευθυνόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική κατάντηση και πυρηνική συμπύκνωση και αποτελεί μέρος φυσιολογικών ή/και παθολογικών διεργασιών (Patel T, et al, 1995, Terada T, et al, 1995). Σε αντίθεση με την κυτταρική νέκρωση, η απόπτωση εμφανίζεται σε μεμονωμένα κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από άλλα υγιά και δεν συνοδεύεται από την παρουσία φλεγμονωδών στοιχείων (Cohen JJ, 1993, Kerr JF, et al, 1994, Steller H, 1995, Cummings, et al, 1997). Η ανίχνευση των αποπτωτικών σωμάτων σε ιστούς γίνεται με τη χρήση της μεθόδου in situ υβριδισμού TUNEL.

Το ογκογονίδιο bcl-2 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη των 26KD (Cleary ML, et al, 1985, Korsmeyer SJ, et al, 1992) που εντοπίζεται στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλλά και στο πυρηνικό περίβλημα, την περιπυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δικτυωτό (Hockenbery D, et al, 1990, Hockenbery D, et al, 1991), και αναστέλλει την αποπτωτική διεργασία χωρίς να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Bissonnette RP, et al, 1992). Το γονίδιο αυτό πιστεύεται ότι παρεμβαίνει σε "κεντρικό σημείο" στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης ή/και προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά που αποτελούν στόχο της αποπτωτικής διαδικασίας, διαδραματίζοντας τελικά κατασταλτικό ρόλο στην αποπτωτική διεργασία (Reed JC, 1994). Το bcl-2 έχει ανιχνευθεί σε διάφορα νεοπλασматы (αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού, προστάτη, νεφρού, πνεύμονος, γαστρεντερικού και στο μελάνωμα) (Zutter M, et al, 1991, Colombel M, et al,

1993, Pezzella F, et al, 1993, Lu QL, et al, 1993, Bhargava V, et al, 1994, Bronner MP, et al, 1995). Επιπλέον, το bcl-2 έχει ανιχνευθεί σε θυμώματα μυελοειδούς τύπου και θυμικά καρκινώματα υψηλής βαθμίδος κακοήθειας και περιπτώσεις υπερπλασίας του θύμου (Tateyama H, et al, 1997, Onodera J, et al, 1996, Salakou S, et al, 2001, Salakou S, et al, 2002).

Η πρωτεΐνη bax αποτελεί ομόλογο του γονιδίου bcl-2 που έχει αναγνωριστεί πρόσφατα και αποτελεί επαγωγέα της απόπτωσης. Ένα μόριο bax μπορεί να συνδέεται με ένα μόριο bcl-2 και να σχηματίζει το ετεροδιμερές bcl-2/bax ή να συνδέεται με ένα άλλο μόριο bax και να σχηματίζει ομοδιμερή bax/bax. Η αναλογία bax/bcl-2 καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στην διαδικασία της απόπτωσης. Σε κύτταρα με υπερέκφραση bax επικρατούν τα ομοδιμερή bax/bax και μεγενθύνεται η ευαισθησία των συγκεκριμένων κυττάρων στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Τα ετεροδιμερή bcl-2/bax επικρατούν σε κύτταρα που υπερεκφράζουν το bcl-2 με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ευαισθησία τους σε αποπτωτικά ερεθίσματα (Oltvai Z, et al 1993, Yang E, et al, 1996). Η πρωτεΐνη bax έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ιστούς περιλαμβανομένων του πνεύμονος, στομάχου και θύμου (Oltvai Z, et al 1993, Penault-Llorca F, et al, 1998, Salakou S, et al, 2001, Scopa CD, et al, 2001, Salakou S, et al, 2002, Scopa CD, et al, 2003).

Η έκφραση των Bcl-2 και Bax ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Το p53 επάγει την παραγωγή του γονιδίου Bax με απευθείας μεταγραφική ενεργοποίηση του επαγωγέα του γονιδίου Bax. Από την άλλη πλευρά το p53 αποδομεί το γονίδιο Bcl-2 διότι συνδέεται με ένα αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο (μεταγραφικώς σιωπηρό) έξω από τον επαγωγέα του γονιδίου Bcl-2 (Miyashita T, et al, 1994α, Miyashita T, et al, 1994β, Miyashita

T, et al, 1995). Έτσι, η απώλεια της λειτουργίας του p53 ελαττώνει την ευαισθησία του κυττάρου στην αποπτωτική διαδικασία. Η απώλεια της λειτουργικότητας του p53 έχει συνδεθεί με την εμφάνιση καρκινώματος του παχέος εντέρου (Baker SJ, et al, 1990, Fearon ER and Vogelstein B, 1990, Kikuchi-Yanoshita R, et al, 1992, Kaklamanis L, et al, 1993). Επιπλέον εξαλείφεις στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 όπου βρίσκεται το p53 καθώς και σημειακές μεταλλάξεις μέσα στο ίδιο το γονίδιο έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με την παρουσία αγγειακής διήθησης, απομακρυσμένων μεταστάσεων και μικρότερης επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (Iino H, et al, 1994, Kern SE, et al, 1989, Oookawa K, et al, 1993, Kastrinakis WV, et al, 1995, Laurent-Puig P, et al, 1992, Offrhaus GJ, et al, 1992, Hamelin R, et al, 1994, Pricolo VE, et al, 1996). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι, στον καρκίνο του παχέος εντέρου το γονίδιο p53 εμφανίζει μεταλλάξεις, και επειδή αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται μέσα στο DNA, είναι πιθανό ότι η πρωτεΐνη του μεταλλαγμένου p53 δεν ενεργοποιεί το γονίδιο bax, ούτε αποδομεί το γονίδιο bcl-2 (Friedlander P, et al, 1996).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε ο ρόλος της απόπτωσης καθώς και η ανοσοϊστοχημική έκφραση των γονιδίων bcl-2, bax, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και του ογκογονιδίου p53 σε υλικό ηπατεκτομών από ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και η σχέση τους με τη μετεγχειρητική επιβίωση των ασθενών και άλλους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες. Το υλικό προήλθε από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη Παθολογική και Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Πάτρας και υποβλήθηκαν σε ηπατεκτομή στα πλαίσια της θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου.

2) ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Ασθενείς

Στη διατριβή συμπεριλήφθηκαν 35 παρασκευάσματα ηπατεκτομών που ελήφθησαν από 35 ασθενείς μετά από χειρουργική αντιμετώπιση τη χρονική περίοδο από το 1994-2000. Από τη μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς με τον ινοπεταλιώδη τύπο του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Όταν υπήρχαν περισσότεροι του ενός όγκοι δεν ήταν πάντοτε δυνατόν να διαχωριστεί εάν πρόκειται για ανεξάρτητους πρωτοπαθείς όγκους ή για ενδοηπατικές μεταστάσεις. Κάθε συνυπάρχουσα νόσος ταξινομήθηκε με βάση καθιερωμένα κριτήρια. Όλα τα δημογραφικά και κλινικοεργαστηριακά στοιχεία των ασθενών ελήφθησαν από τους ιατρικούς φακέλους. Το μέγεθος του όγκου και ο αριθμός των όγκων ανά ασθενή ελήφθησαν με βάση τις ιστοπαθολογικές εκθέσεις του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Πατρών.

β. Μέθοδοι

I. Ιστοπαθολογικές μελέτες ρουτίνας

Η μακροσκοπική και μικροσκοπική επεξεργασία και εξέταση των παρασκευασμάτων έγινε με βάση συγκεκριμένα πρωτόκολλα (Demetris AJ, et al, 1990, Demetris AJ, et al, 1996). Πιο συγκεκριμένα οι χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης εκτιμήθηκαν για τον επικρατούντα και χειρότερο βαθμό διαφοροποίησης, τον τρόπο ανάπτυξης, μικροσκοπική ή αγγειολεμφική διήθηση και μακροσκοπική διήθηση ή διήθηση μεγάλου αγγείου, νέκρωση, γιγαντοκύτταρα και κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα. Η παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, λεμφαδενικών μεταστάσεων, διηθημένα ή ελεύθερα εγχειρητικά όρια και παρουσία ή απουσία διήθησης

άλλων οργάνων ελήφθησαν από τα κλινικά ιστορικά και τις ιστοπαθολογικές εκθέσεις. Η διαφοροποίηση του όγκου ταξινομήθηκε με βάση το σύστημα Edmondson (Craig et al, 1988) ως υψηλή (grade I), μέση (grade II), χαμηλή (grade III). Για τη μέτρηση των μιτώσεων και τον υπολογισμό του μιτωτικού δείκτη σε κάθε όγκο επιλέχθηκαν οι περιοχές με το χειρότερο βαθμό διαφοροποίησης. Το ίδιο έγινε για τη μέτρηση των αποπτωτικών σωματίων και τον υπολογισμό του αποπτωτικού δείκτη. Πάντως περιοχές νέκρωσης δεν υπολογίσθηκαν καθόλου. Ο μιτωτικός και ο αποπτωτικός δείκτης υπολογίσθηκαν μετρώντας τον συνολικό αριθμό μιτώσεων ή αποπτωτικών σωματίων αντιστοίχως, σε 10 τυχαία ΜΟΠ (x400). Η παρουσία αγγειακής διήθησης διαχωρίστηκε σε μικροσκοπική ή αγγειολεμφική (διήθηση μικρών αγγείων με λεπτό τοίχωμα) και μακροσκοπική ή μεγάλου αγγείου (διήθηση τυπικών αρτηριών ή φλεβών). Η ύπαρξη νέκρωσης, γιγαντοκυττάρων και κυττάρων με διαυγές κυτταρόπλασμα μέσα στον όγκο, ταξινομήθηκε ως παρούσα ή απύουσα αλλά δεν βαθμολογήθηκε. Το περιβάλλον μη νεοπλασματικό ηπατικό παρέγχυμα εκτιμήθηκε για την ύπαρξη ή όχι αλλοιώσεων χρόνιας ηπατίτιδας και θρόμβωσης της πυλαίας φλέβας. Η διάγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας έγινε με βάση καθιερωμένα κριτήρια (Lee, RG, 1994) και η ηπατιδική δραστηριότητα (νεκροφλεγμονώδης δραστηριότητα) και ο βαθμός (στάδιο) ίνωσης υπολογίσθηκαν με βάση το σύστημα Ishak (Ishak K, et al, 1995).

II. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας και in-situ υβριδισμού

Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο αντιπροσωπευτικοί κύβοι παραφίνης από τους οποίους ελήφθησαν πολλαπλές (10) συνεχόμενες τομές πάχους 4μm. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με λεπτό στρώμα πολυ-L-λυσίνης (MB>150000, SIGMA), ώστε να αποφευχθεί η αποκόλληση των τομών. Το διάλυμα της πολύ-L-λυσίνης και η επίστρωσή της έγιναν σύμφωνα με τη μεθοδολογία και τον τρόπο που περιγράφεται από τις Polak και van Noorden (1984).

Ανοσοϊστοχημική τεχνική για την ανίχνευση των πρωτεϊνών bcl-2, bax, Ki-67, p53 και CD34

I. Υλικά

1. Μονιμοποιητικό υλικό: 10% ουδέτερη φορμόλη.
2. Μικροσκοπικά πλακίδια (Polylysine, microscopic slides, US Pat. 4481246, 4624882, Menzel-Glaser, Germany).
3. Απεσταγμένο νερό.
4. Καλυπτρίδες, (Knittel Glaser, Germany).
5. Ξυλόλη.
6. Αιθανόλη.
7. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris.
8. Υπεροξειδίο του υδρογόνου 30%.
9. Κιτρικό νάτριο.
10. Βόειος αλβουμίνη, κλάσμα V, σε λυοφιλοποιημένη μορφή και ελεύθερη από λιπαρά οξέα (13257, Serva, Germany).

11. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-bcl2 εναντίον του ποντικού, (DAKO, Carpinteria, CA, USA).
12. Πολυκλωνικό αντίσωμα anti-bax εναντίον του κουνελιού, (SantaCruz, USA).
13. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Ki-67 εναντίον του ποντικού, (DAKO, Carpinteria, CA, USA).
14. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-p53 εναντίον του ποντικού, (Biogenex, USA).
15. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD34 εναντίον ποντικού, (Biogenex, USA).
16. Super sensitive Ready-to-Use Detection kit, (Catalog No QP900-CL, Biogenex, San Ramon, CA, USA).
17. Χρωμογόνο: Ταμπλέτες DAB (Sigma Fast DAB, St Louis, MO, USA).
18. Αιματοξυλίνη Harris, διάλυμα Papanikolaou 1a, (1.09253.2500, Merck).
19. Υλικό επικάλυψης των τομών: Entellan®, neu, rapid mounting media for microscopy, (1.07961.0500, Merck).

II. Προετοιμασία των διαλυμάτων

1. Διάλυμα κιτρικού νατρίου (pH6): 500 ml απεσταγμένο νερό και 1.05 γρ. κιτρικό νάτριο.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (pH: 7.6): 6.1 γρ. Tris σε 1000 ml απεσταγμένο νερό και 37 ml 1N HCl
3. Ρυθμιστικό διάλυμα TBS: 1800 ml NaCl και 200 ml Tris.
4. Διάλυμα για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης: 98 ml μεθανόλη και 2 ml H₂O₂.

5. Διαλύματα αραίωσης (για τα πρωτογενή αντισώματα και τους άλλους παράγοντες) και blocking serum: 30 ml TBS και 0.3 γρ. αλβουμίνη.
6. Αντίσωμα εναντίον bcl-2, αραίωση 1:80, σε διάλυμα TBS/BSA.
7. Αντίσωμα εναντίον bax αραίωση 1:1000, σε διάλυμα TBS/BSA.
8. Αντίσωμα εναντίον p53 έτοιμο προς χρήση.
9. Αντίσωμα εναντίον Ki-67 αραίωση 1:80, σε διάλυμα TBS/BSA.
10. Αντίσωμα εναντίον του αντιγόνου CD34, αραίωση 1:50 σε διάλυμα TBS/BSA.
11. Διάλυμα χρωμογόνου: 100 ml Tris, 2 ml DAB, 100 μl H₂O₂

III. Πρωτόκολλο (Μέθοδοι)

Προετοιμασία των ιστών και ανοσοϊστοχημική μέθοδος για τα ανωτέρω αντιγόνα

1. Μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλίνης για 16 ώρες.
2. Εμπέδωση του ιστού σε παραφίνη.
3. Λήψη τομών από το μικροτόμο, πάχους 4 μm και τοποθέτηση αυτών σε υδατόλουτρο το οποίο δεν περιέχει πρωτεΐνη.
4. Τοποθέτηση των τομών στα πλακίδια που είναι επιστρωμένα με πολυλυσίνη.
5. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο (16 ώρες στους 37°C).
6. Αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
7. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών.
 - a. 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
 - b. 100% αιθανόλη για 2 λεπτά

- c. 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - d. 80% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - e. 70% αιθανόλη για 1 λεπτό
8. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
 9. Αποκάλυψη αντιγόνων: Οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα κιτρικού οξέως και στη συνέχεια επωάζονται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 750 W, τρεις φορές, 5 λεπτά τη φορά. Κάθε 5 λεπτά ελέγχουμε το επίπεδο του διαλύματος και προσθέτουμε διάλυμα αν αυτό είναι αναγκαίο.
 10. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
 11. Επώαση των τομών με το διάλυμα H_2O_2 για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης, για 20 λεπτά.
 12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
 13. Σκουπίζουμε το διάλυμα με προσοχή γύρω από τον ιστό.
 14. Προσθέτουμε φυσιολογικό ορό επάνω σε κάθε τομή και επωάζουμε τις τομές σε υγρό περιβάλλον για 20 λεπτά.
 15. Στη συνέχεια αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το φυσιολογικό ορό γύρω από κάθε τομή και χωρίς να ξεπλύνουμε τις τομές, τοποθετούμε το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος. Επωάζουμε τις τομές στους $37^{\circ}C$ για 1 ώρα.
 16. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
 17. Στη συνέχεια σκουπίζουμε με προσοχή το διάλυμα γύρω από κάθε τομή, προσέχοντας να μην καταστρέψουμε την τομή και τοποθετούμε το διάλυμα του βιοτυνιλιωμένου αντισώματος (biotynilated anti-immunoglobulins - Super sensitive Ready-to-Use Detection kit). Επωάζουμε τις τομές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
19. Στη συνέχεια σκουπίζουμε με προσοχή το διάλυμα γύρω από κάθε τομή, προσέχοντας να μην καταστρέψουμε την τομή και τοποθετούμε το διάλυμα στρεπταβιδίνης (enzyme-conjugated streptavidin- Super sensitive Ready-to-Use Detection kit). Επωάζουμε τις τομές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
20. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
21. Τοποθέτηση των τομών στο διάλυμα χρωμογόνου.
22. Παρατηρούμε την εμφάνιση του χρώματος με φωτονικό μικροσκόπιο. Σε κάθε περίπτωση δεν επωάζουμε τις τομές περισσότερο από 7 λεπτά.
23. Έκπλυση με νερό βρύσης για 1 λεπτό.
24. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
25. Εναντιοχρωμασία με αιματοξυλίνη Harris για 2 λεπτά.
26. Έκπλυση με νερό βρύσης.
27. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.
28. Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη 2 φορές από 1 λεπτό.
29. Επικόλληση των καλυπτρίδων με Entellan.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από φυσιολογικό αμυγδαλικό ιστό και φυσιολογικούς λεμφαδένες. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές των ηπατωμάτων με την ίδια μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης αλλά το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε από διάλυμα 1% BSA σε PBS. Η κυτταροπλασματική χρώση για το bcl-2, η κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση για το bax,

η κυτταροπλασματική χρώση για το αντιγόνο CD34, η πυρηνική για τα p53, και Ki-67 θεωρήθηκαν ως θετικές.

Μέθοδος In situ υβριδισμού TUNEL (κατακερματισμένου DNA) για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων.

Για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA και κατ' επέκταση των αποπτωτικών κυττάρων, εφαρμόστηκε η μέθοδος in situ υβριδισμού TUNEL σε τομές παραφίνης. Χρησιμοποιήθηκε το In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Boeringer Mannheim USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού ως ακολούθως:

1. Αποπαραφίνωση τομών: Η αποπαραφίνωση των τομών έγινε σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C για 16 ώρες.
2. Ενυδάτωση τομών: Οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε διαφορετικά διαλύματα ως ακολούθως:
 - a. Ξυλόλη για 20 λεπτά.
 - b. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών.
 - i. 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
 - ii. 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
 - iii. 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - iv. 80% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - v. 70% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - vi. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
3. Επώαση των τομών σε διάλυμα πρωτεΐνης K (Roche) για 30 λεπτά στους 37°C.
4. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό 2 φορές.

5. Επώαση των τομών σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 2% για 20 λεπτά για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης.
6. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό επί 5 λεπτά, 2 φορές.
7. Επώαση των τομών με το μείγμα TUNEL (TdT-terminal deoxynucleotidyl transferase και digoxigenin-dUTP) στους 37°C για 60 λεπτά.
8. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά σε διάλυμα PBS, 3 φορές.
9. Επώαση των τομών για 30 λεπτά στους 37° C με το peroxidase converter anti-fluorescein antibody.
10. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS 3 φορές.
11. Επώαση των τομών για 3 λεπτά περίπου σε διάλυμα που περιέχει διαμινοβενζιδίνη (Sigma Fast DAB tablets, D-4293) (2ml Dab σε 100 ml διάλυμα Tris).
12. Έκπλυση των τομών επί 1 λεπτό σε νερό βρύσης 2 φορές.
13. Εναντιοχρωμασία των τομών με αιματοξυλίνη Harris (2 λεπτά).
14. Έκπλυση με νερό βρύσης.
15. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.
16. Εμβάπτιση των τομών επί 1 λεπτό σε ξυλόλη 2 φορές.
17. Επικόλληση των καλυπτρίδων με Entellan.

Ως βιοχημικοί θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού) ορισμένες τομές οι οποίες επωάσθηκαν με διάλυμα 10μg/ml of DNase I (Sigma, UK). Ως φυσιολογικοί θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού) τομές από λεπτό έντερο επίμυος. Και σε αυτές τις τομές εφαρμόσθηκε η διαδικασία

που περιγράφηκε προηγουμένως. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ορισμένες τομές από τα παρασκευάσματα των ηπατεκτομών και σε αυτές εφαρμόσθηκε η ίδια διαδικασία όπου το διάλυμα TUNEL είχε αντικατασταθεί από άλλο διάλυμα που δεν περιείχε TdT.

Μέθοδος in situ υβριδισμού για την ανίχνευση του mRNA των ογκογονιδίων bcl-2, bax σε τομές παραφίνης

Σε αυτή τη μελέτη και για την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA των ογκογονιδίων bcl-2, bax, χρησιμοποιήσαμε μία μη-ραδιενεργό μέθοδο in-situ υβριδισμού με το kit: Hybridization/Detection Complete System (IH-60002 (IHD-0052): Ultra Sensitivity, MBI, CA, USA).

I. Υλικά

1. Μονιμοποιητικό υλικό: 10% ουδέτερη φορμόλη.
2. Υλικά που περιλαμβάνονται στο Hybridization/Detection Complete System (IH-60002)
 - a. Βιοτυνιλιωμένος ιχνηθέτης για το Housekeeping γονίδιο (GAPDH): μπλε φιαλίδιο 1 ml
 - b. Πρωτεΐνωση K: καφέ φιαλίδιο 4 mg
 - c. Διάλυμα αραίωσης ελεύθερο σε DNase και RNase: 1 φιαλίδιο 2 ml
 - d. Διάλυμα υβριδισμού: λευκό φιαλίδιο 6 ml
 - e. Protein Block (20X): 1 φιαλίδιο 50 ml
 - f. Διάλυμα Rnase A (15 µg/ml): Μωβ φιαλίδιο 6 ml
 - g. Mouse Anti-Biotin Linker 1: πράσινο φιαλίδιο 6 ml
 - h. Biotin-Goat Anti-Mouse Ig Linker 2: κίτρινο φιαλίδιο 6 ml

- i. Streptavidin-AP Conjugate: κόκκινο φιαλίδιο 6 ml
 - j. Καφέ υπόστρωμα: φιαλίδιο 1 vial 6 ml
 - k. Διάλυμα εκπλύσεων (20 X:) 1 φιαλίδιο 100 ml
3. Μικροσκοπικά πλακίδια (Polylysine, microscopic slides, US Pat. 4481246, 4624882, Menzel-Glaser, Germany).
 4. Ιστός που χρησιμοποιείται για θετικός μάρτυρας SP-10043 (bcl-1001/bcl-1002), Maxim Biotech, Inc., CA, USA].
 5. Απεσταγμένο ύδωρ
 6. Καλυπτρίδες, Knittel Glaser, Germany
 7. Ξυλόλη
 8. Αιθανόλη
 9. Διάλυμα Tris (pH: 7.6): Διάλυση 6.1g Tris σε 1000 ml απεσταγμένο ύδωρ και 37 ml 1 N HCl
 10. Διάλυμα TBS: 1800ml NaCl και 200ml TRIS (TR 0423, Scharlau, Germany)
 11. Χρώση: Nuclear Fast Red (S1963, DAKO, Carpinteria, CA, USA)
 12. Human bcl-2 biotinylated DNA probe: Cat. No.: SP-10043 (BCL-1001/BCL-1002), Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: M14745)
 13. Human bax biotinylated DNA probe: Cat. No.: SP-10043 (BCL-1001/BCL-1002), Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: M14745)
 14. Mounting medium: Entellan®, neu, rapid mounting media for microscopy, (1.07961.0500, Merck, Germany)

II. Προετοιμασία των διαλυμάτων (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού-“Hybridization/Detection Complete System (IH-60002 (IHD-0052): Ultra Sensitivity, MBI, CA, USA)”.

α. Πρωτεΐνωση Κ

Διάλυμα πρωτεΐνωσης Κ 10 Χ

1. Θερμαίνουμε το διάλυμα αραίωσης ελεύθερο από Dnase και Rnase) πριν τη χρήση για να αποφύγουμε τυχόν καθιζήσεις.
2. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του ανωτέρω διαλύματος στο φιαλίδιο που περιέχει τη λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνωση Κ (4 mg).
3. Αναμιγνύουμε ελαφρά.
4. Μοιράζουμε το περιεχόμενο του φιαλιδίου (πρωτεΐνωση Κ 10Χ) σε μικρά φιαλίδια τύπου errendorfs και τοποθετούμε αμέσως στην κατάψυξη (-20°C) τα errendorfs που δεν θα χρησιμοποιήσουμε.

Διάλυμα πρωτεΐνωσης 1Χ

1. Το διάλυμα πρωτεΐνωσης 10Χ ξεπαγώνει σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε στα διαλύματα απεσταγμένο νερό ως ακολούθως:
1 μέρος διαλύματος με συγκέντρωση 10Χ και 9 μέρη νερό.

β. Διάλυμα Protein Block:

1. Αναμιγνύουμε 50 ml του συμπυκνωμένου (20Χ) Protein Block διαλύματος σε 1000 ml απεσταγμένο νερό και αποθηκεύουμε το 1Χ Protein Block διάλυμα που δεν χρησιμοποιούμε στους 4°C.

γ. Διάλυμα έκπλυσης

1. Αναμιγνύουμε 50 ml του συμπυκνωμένου 20Χ διαλύματος έκπλυσης σε 1000 ml απεσταγμένο νερό.

2. Αποθηκεύουμε το διάλυμα έκπλυσης 1X, το οποίο δεν χρησιμοποιούμε, σε θερμοκρασία δωματίου.

III. Πρωτόκολλο (Μέθοδοι)

Προετοιμασία των ιστών

1. Μονιμοποιούμε τον ιστό σε 10% ουδέτερη φορμόλη για 16 ώρες.
2. Εμβαπτίζουμε τον ιστό σε παραφίνη.
3. Κόβουμε με προσοχή για να αποφύγουμε τη μόλυνση και τοποθετούμε τις τομές σε υδατόλουτρο που δεν περιέχει πρωτεΐνη.
4. Στη συνέχεια τοποθετούμε με προσοχή, για να αποφύγουμε τη μόλυνση, τις τομές στα πλακίδια πολυλυσίνης.
5. Αποπαραφίνωση των τομών στους 37°C για 16 ώρες.
6. Αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
7. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών ως ακολούθως:
 - a. 100% Αιθανόλη για 2 λεπτά
 - b. 100% Αιθανόλη για 2 λεπτά
 - c. 96% Αιθανόλη για 1 λεπτό
 - d. 80% Αιθανόλη για 1 λεπτό
 - e. 70% Αιθανόλη για 1 λεπτό
8. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό.
9. Στεγνώνουμε τις τομές επί 5 λεπτά στους 37°C.
10. Εμβαπτίζουμε τις τομές επί 15 λεπτά σε διάλυμα πρωτεΐνης K στους 37°C.
11. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά.
12. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό επί 1 λεπτό.
13. Αφυδάτωση των τομών ως ακολούθως:

- a. 70% Αιθανόλη επί 1 λεπτό
 - b. 80% Αιθανόλη επί 1 λεπτό
 - c. 96% Αιθανόλη επί 1 λεπτό
 - d. 100% Αιθανόλη επί 1 λεπτό
14. Στέγνωμα των τομών στους 37°C επί 5 λεπτά.

Πρωτόκολλο υβριδισμού

1. Τοποθετούμε 1 σταγόνα από το διάλυμα που έχουμε αναμιγνύοντας τον ιχνηθέτη στο διάλυμα υβριδισμού (αραίωση 1/10) στην τομή. Στη συνέχεια τοποθετούμε μία καλυπτρίδα επάνω από την τομή, με προσοχή ώστε να μην «παγιρευθούν» φυσαλίδες αέρα μεταξύ της καλυπτρίδας και της τομής.
2. Τοποθετούμε τα πλακίδια με τις καλυπτρίδες σε κλίβανο και σε θερμοκρασία 95°C για 10 λεπτά ώστε να υπάρξει αποδόμηση της δευτερογενούς δομής του RNA.
3. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 8 ώρες ώστε να συμπληρωθεί ο σχηματισμός υβριδίου (υβριδισμός) μεταξύ του ιχνηθέτη και του νουκλεϊνικού οξέως στόχου.
4. Στη συνέχεια ξεπλένουμε τα πλακίδια με το διάλυμα έκπλυσης 1X έως ότου αποπέσει η καλυπτρίδα προσέχοντας να μην καταστραφεί ο ιστός.
5. Στη συνέχεια τοποθετούμε πάνω στην τομή 1-2 σταγόνες RNase A (15 µg/ml).
6. Ακολούθως τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και τα επωάζουμε στους 37°C για 30 λεπτά.

7. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με Protein Block 3X στους 37°C για 3 λεπτά.
8. Επωάζουμε τα πλακίδια με Protein Block (2X) για 3-5 λεπτά στους 37°C.
9. Με προσοχή σκουπίζουμε το διάλυμα που περισσεύει γύρω από την τομή.
10. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες Linker 1 (πράσινο φιαλίδιο) στην τομή.
11. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 40 λεπτά.
12. Σκουπίζουμε προσεκτικά το πλακίδιο γύρω από την τομή και ξεπλένουμε τα πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.
13. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
14. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες από Linker 2 (κίτρινο φιαλίδιο) στην τομή.
15. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 20 λεπτά.
16. Σκουπίζουμε προσεκτικά το πλακίδιο γύρω από την τομή.
17. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.
18. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
19. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες του Conjugate (κόκκινο φιαλίδιο) στην τομή.
20. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 20 λεπτά.
21. Σκουπίζουμε προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
22. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.

23. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
24. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες από το υπόστρωμα (καφέ φιαλίδιο) στην τομή.
25. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και τα επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή έως ότου εμφανισθεί το χρώμα. Για αυτό το λόγο ελέγχουμε τις τομές στο φωτονικό μικροσκόπιο μέχρι η χρώση να είναι πλήρης (το χρώμα είναι έντονα κυανό).
26. Σκουπίζουμε προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
27. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με απεσταγμένο νερό (2-3 φορές).
28. Εναντιοχρωμασία και επικόλληση των καλυπτρίδων.
 - a. Εναντιοχρωμασία: Nuclear Fast Red για 10 λεπτά.
 - b. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
 - c. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70%, 80%, 96%, 100% (δύο φορές) για 1 λεπτό την κάθε φορά.
 - d. Εμβάπτιση επί 1 λεπτό σε ξυλόλη δύο φορές.
 - e. Επικόλληση καλυπτρίδων χρησιμοποιώντας Entellan.

Ως θετική χρώση θεωρείται η κοκκώδης κυτταροπλασματική χρώση για το κάθε ογκογονίδιο (bcl-2, bax). Ως θετικούς μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε τομές παραφίνης από αμυγδαλικό ιστό ανθρώπου. Για να πιστοποιήσουμε ότι η θετική χρώση ήταν ειδική επωάσαμε τα ίδια πλακίδια με ιχνηθέτες οι οποίοι είχαν συμπληρωματικές αλληλουχίες με αυτές στα πλακίδια των θετικών μαρτύρων (DNA ιχνηθέτες ανθρώπινου γονιδιώματος-θετικοί μάρτυρες ιχνηθέτες). Αυτοί οι μάρτυρες ιχνηθέτες είχαν ταυτόσημο μήκος και περιεχόμενο GC με τον ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε. Για την περίπτωση

των αρνητικών μαρτύρων τα πλακίδια επωάσθηκαν με τον ίδιο τρόπο αλλά χρησιμοποιήσαμε ετερόλογους ιχνηθέτες. Οι τελευταίοι δεν εμφάνισαν καμία συμπληρωματικότητα για καμία αλληλουχία με τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση έκφρασης του mRNA (DNA ιχνηθέτες φυτικού γονιδιώματος). Αυτοί οι αρνητικοί μάρτυρες ιχνηθέτες είχαν ταυτόσημο μήκος και περιεχόμενο GC με τον ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε.

III. Μορφομετρική ανάλυση

Η ποσοτικοποίηση των χρώσεων, η εκτίμηση του ποσοστού των διαφορετικών ειδών κυττάρων που παρουσίασαν i) θετική ανοσοϊστοχημική χρώση στα αντιγόνα bcl-2, bax, Ki-67 και p53, ii) θετική χρώση στη μέθοδο in-situ υβριδισμού (TUNEL) για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA και iii) θετική χρώση στη μέθοδο in-situ υβριδισμού για την ανίχνευση έκφρασης του mRNA των ογκογονιδίων bcl-2, bax (ενεργός παραγωγή των ογκογονιδίων) βασίσθηκε σε καλώς εφαρμοσμένη μέθοδο (Salakou S, et al, 2001, Salakou S, et al, 2002, Scopa CD, et al, 2001, Scopa CD, et al, 2003).

Όλες οι τομές εκτιμήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο σε μικρή μεγέθυνση και επιλέχθηκαν οι περιοχές σε κάθε τομή που εμφάνισαν θετική χρώση.

1. Στη συνέχεια επάνω σε κάθε τομή εφαρμόσθηκε ένα μικροσκοπικό πλέγμα 10x10 (121 σημεία).
2. Ακολούθως και σε μεγέθυνση x400 μετρήθηκαν τα κύτταρα που έδωσαν θετική ανοσοχρώση (για κάθε αντίσωμα ή ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε) αλλά και ο συνολικός αριθμός των συγκεκριμένων κυττάρων που περιέχονται στο πλέγμα

(τουλάχιστον 500 κύτταρα). Στη συνέχεια ο αριθμός των θετικών κυττάρων διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των κυττάρων και κατεγράφη ένα ποσοστό. Η εκτίμηση αυτή εφαρμόστηκε σε 6 διαφορετικά ΜΟΠ για κάθε τομή. Οι τιμές δεν διέφεραν μεταξύ τους περισσότερο από 10%. Στη συνέχεια υπολογίσθηκε η μέση τιμή που αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση. Στην περίπτωση των αποπτωτικών σωματίων το ποσοστό ονομάστηκε δείκτης αποπτωτικών σωματίων (ΔΑΣ).

3. Για τον υπολογισμό των Ki-67 (+) κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι περιοχές με τη χαμηλότερη διαφοροποίηση. Η κατανομή των Ki-67 (+) κυττάρων ταξινομήθηκε ως ομοιογενής ή μη ομοιογενής τόσο στο νεοπλασματικό όσο και στον παρακείμενο του όγκου μη νεοπλασματικό παρέγχυμα. Ο βαθμός νεοαγγειογένεσης εκτιμήθηκε με βάση προηγούμενη μέθοδο που έχει περιγραφεί λεπτομερώς αλλού (Zolota, et al, 1999).

IV. Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ SD, διάμεση τιμή και εύρος τιμών. Η σύγκριση μεταξύ των τιμών των διαφόρων ομάδων (π.χ. πιθανή σχέση μεταξύ των ιστοπαθολογικών ευρημάτων του ήπατος και των σταδίων του όγκου με τα αποτελέσματα των χρώσεων) έγινε με τη χρήση της μεθόδου ANOVA (ανάλυση απλής μεταβλητής), ενώ όπου ήταν απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis και ακολούθησε το Bonferroni t-test, ώστε να διευθετηθούν τα όποια προβλήματα από τις πολλαπλές συγκρίσεις. Η μέθοδος συσχέτισης κατά Spearman rank

χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ανιχνεύσει τις πιθανές σχέσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων χρώσεων, αλλά και των τελευταίων (αποτελεσμάτων των χρώσεων) με τα χαρακτηριστικά των όγκων αλλά και του παρακείμενου στον όγκο μη νεοπλασματικού ήπατος. Για στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (έκδοση για Windows 10.1) και κάθε τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε ως στατιστικώς σημαντική.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κλινικοεπιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΗΚΚ.

Οι ασθενείς της μελέτης ήσαν κυρίως άνδρες (21 άνδρες και 14 γυναίκες), ηλικίας από 43 έως 59 ετών. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς είχαν τουλάχιστον έναν παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη ΗΚΚ όπως φαίνεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Υποκείμενο αίτιο και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Ηπατίτις Β	16
Ηπατίτις C	3
Ηπατίτις Β + C	1
Αλκοόλ	7
Χωρίς υποκείμενο ηπατικό νόσημα	8
Συνυπάρχουσα κίρρωση	19
Μακροζώδης	6
Μικροζώδης	3
Μεικτή	10

α. Μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των όγκων και του μη νεοπλασματικού ήπατος

Η μορφή της κίρρωσης ήταν μεικτή σε 10 ασθενείς ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις ήταν μακροζώδης ή μικροζώδης. Ο δείκτης ηπατιδικής

δραστηριότητος (όταν αυτή υπήρχε) κυμάνθηκε από 3/18-8/18. Σε 8 περιπτώσεις υπήρχε θρόμβωση της πυλαίας φλέβας. Μονήρης όζος ανευρέθη σε 30 περιπτώσεις, 2 όζοι σε 3 περιπτώσεις και 3 όζοι σε 2 περιπτώσεις. Πολυεστιακή προσβολή των ηπατικών λοβών δεν κατεγράφη σε καμία περίπτωση. Σε όλες τις περιπτώσεις, και στις 35, τα εγχειρητικά όρια του ήπατος ήταν ελεύθερα όγκου. Σύμφωνα με την TNM ταξινόμηση 4 όγκοι ήσαν σταδίου 1, 11 σταδίου 2 και 20 σταδίου 3. Σύμφωνα με τα κριτήρια Edmondson (Craig, et al, 1988), 20 όγκοι ήσαν χαμηλής βαθμίδος κακοήθειας (grade I) (εικόνα 2A), 11 II και 4 III (εικόνα 2B). Σε 25 περιπτώσεις ο όγκος εμφάνιζε μικροδοκιδώδη / μικροαδενικό τρόπο ανάπτυξης και σε 10 συμπαγή.

Τα περισσότερα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα αρχίζουν ως καλώς διαφοροποιημένα νεοπλάσματα αλλά τελικώς με την πάροδο του χρόνου εμφανίζουν ετερογενή ιστολογική ανάπτυξη και τρόπο διαφοροποίησης το οποίο είναι συμβατό με τη θεωρία ανάπτυξης και εξέλιξης ενός κακοήθους όγκου. Για παράδειγμα οι μικρότεροι όγκοι ήσαν καλώς διαφοροποιημένοι και δεν εμφάνισαν αγγειακή διήθηση (αγγειολεμφική ή μεγάλου αγγείου). Από όλους τους όγκους με επικρατούντα τον υψηλό βαθμό διαφοροποίησης, στο 38% ο υψηλός αυτός βαθμός ήταν και ο χειρότερος βαθμός (δηλ. ο επικρατών βαθμός διαφοροποίησης ήταν και ο χειρότερος). Σε όλους τους όγκους με μεγίστη διάμετρο ≥ 3 cm ο επικρατών βαθμός διαφοροποίησης ήταν μέτριος ή χαμηλός και σε κανένα υψηλός. Όλοι οι όγκοι με επικρατούντα χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης είχαν μεγίστη διάμετρο ≥ 3 cm. Σε 25 περιπτώσεις ο όγκος εμφάνιζε μικροδοκιδώδη/μικροαδενικό τρόπο ανάπτυξης και σε 10 συμπαγή.

Περίπου το 1/3 των όγκων (n=11) έδειξε περιοχές νέκρωσης. Γιγαντοκύτταρα κατεγράφησαν σε 12/35 όγκους και κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα σε

14/35 όγκους (εικόνα 3). Αγγειολεμφική ή μικροσκοπική διήθηση κατεγράφη σε 16/35 όγκους και σε 6 από αυτούς (6/16) επιπλέον συνυπήρχε μακροσκοπική διήθηση μεγάλου αγγείου. Ο μιτωτικός δείκτης στις περιοχές χειρότερης διαφοροποίησης κυμάνθηκε από 1–42/10ΜΟΠ (μέση τιμή = 10.9, SD 8.9, διάμεσος τιμή = 9). Στις ίδιες περιοχές ο αποπτωτικός δείκτης όπως υπολογίσθηκε με τη μέθοδο TUNEL κυμάνθηκε από 4–69/10 ΜΟΠ (μέση τιμή = 32.2, SD 15.2, διάμεσος τιμή = 31). Η αναλογία του αποπτωτικού δείκτη προς το μιτωτικό δείκτη στις ίδιες περιοχές κυμάνθηκε από 1.09 έως 31 (μέση τιμή = 4.74, SD 4.12, διάμεσος τιμή = 3.63). Η εικόνα 4 απεικονίζει αποπτωτικά σωμάτια.

Εικόνα 2Α. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας I κατά Edmondson. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία ψευδοαδενίων (κεφαλές βελών) και ροζετών (βέλη) (H&E x250).

Εικόνα 2Β. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας III κατά Edmondson. Χαρακτηριστική είναι η ατυπία και η πλειομορφία των κυττάρων (βέλη) (H&E x400).

Εικόνα 3. Α. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαυγών κυττάρων (βέλη) (H&E x25).
 Β. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαυγών κυττάρων. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της τροφοφόρου νεοπλασματικής αρτηρίας (Α) (H&E x100).
 Γ. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαυγών κυττάρων (βέλη). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της τροφοφόρου νεοπλασματικής αρτηρίας (Α) (H&E x400).

Εικόνα 4Α. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας I κατά Edmondson. Πολυάριθμα αποπτωτικά σωμάτια (βέλη) (TUNEL περοξειδάση x250).

Εικόνα 4Β. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας III κατά Edmondson. Αραιά αποπτωτικά σωμάτια (βέλη) (TUNEL περοξειδάση x250).

Συσχέτιση μεταξύ των διαφόρων χαρακτηριστικών των όγκων

Η αναγνώριση αγγειακής διήθησης αποτελεί άμεση ένδειξη επιθετικότητας του όγκου και αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα υποτροπής του όγκου μετά την ηπατεκτομή (Iwatsuki et al, 2000, Marsh W, et al, 1997). Η μικροσκοπική ή αγγειολεμφική διήθηση συσχετίζεται σημαντικά με την ύπαρξη γιγαντοκυττάρων και διαυγών κυττάρων, όπως επίσης και με την παρουσία νέκρωσης στον όγκο (Πίνακας 6). Επιπλέον κατεγράφη σημαντική συσχέτιση μεταξύ αγγειολεμφικής διήθησης και του επικρατούντος και χειρότερου βαθμού διαφοροποίησης ($P<0.01$) (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Συσχέτιση μεταξύ αγγειακής διήθησης (μακροσκοπική ή μικροσκοπικής) και μακροσκοπικών και ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων.

	Αγγειακή διήθηση απύουσα	Αγγειακή διήθηση παρούσα	P
Τρόπος ανάπτυξης Μικροδοκιδώδης /μικροαδενικός	17	8	0.028
Συμπαγής	2	8	
Γιγαντοκύτταρα OXI	17	6	0.004
NAI	2	10	
Διαυγή κύτταρα OXI	15	6	0.032
NAI	4	10	
Νέκρωση όγκου OXI	17	7	0.011
NAI	2	9	
Αριθμός όγκων 1	18	12	0.192
2	1	2	
3	0	2	

Πίνακας 7. Συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της αγγειακής διήθησης και του βαθμού διαφοροποίησης.

	Αρνητική	Μικροσκοπική	Μακρο+Μικρο	Σύνολο
Επικρατών βαθμός διαφοροποίησης				
I	14	6	0	20
II	5	2	4	11
III	0	2	2	4
Χειρότερος βαθμός διαφοροποίησης				
I	3	4	0	7
II	15	5	4	24
III	0	2	2	4
Σύνολο	19	10	6	35

Καλύτερη συσχέτιση με την αγγειολεμφική διήθηση εμφανίζει ο επικρατών βαθμός διαφοροποίησης στις περιπτώσεις χαμηλής διαφοροποίησης (grade III), ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις (π.χ. επικρατούσα η υψηλή διαφοροποίηση) ο χειρότερος βαθμός διαφοροποίησης. Όταν η επικρατούσα διαφοροποίηση ήταν χαμηλή όλες οι περιπτώσεις (n=4) εμφάνισαν κάποιο βαθμό αγγειακής διήθησης. Αντιθέτως όταν η περιοχή του όγκου με τη χειρότερη ή επικρατούσα διαφοροποίηση εμφάνιζε υψηλή διαφοροποίηση τότε κανένας από αυτούς τους όγκους δεν εμφάνισε μακροαγγειακή διήθηση (πίνακας 7). Επιπλέον δεν κατεγράφη σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των όγκων και της παρουσίας ή όχι αγγειακής διήθησης (πίνακας 6). Περαιτέρω κατεγράφησαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της αναλογίας αποπτωτικού δείκτη / μιτωτικού δείκτη και των άλλων ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων. Οι 20 όγκοι με βαθμό κακοήθειας I και 5 όγκοι με βαθμό κακοήθειας II εμφάνισαν αναλογία αποπτωτικού/μιτωτικό δείκτη μεγαλύτερη του 3. Αντιθέτως οι υπόλοιποι 6 όγκοι βαθμού κακοηθείας II και οι 4 όγκοι βαθμού κακοηθείας III εμφάνισαν αναλογία αποπτωτικού/μιτωτικό

δείκτη μικρότερο του 3. Ο επικρατών και ο χειρότερος βαθμός διαφοροποίησης σχετίζονταν ισχυρά με την απόπτωση, το μιτωτικό δείκτη αλλά και την αναλογία αποπτωτικού δείκτη/μιτωτικό δείκτη ($p < 0.01$) ενώ η αναλογία ελαττώνεται με την αποδιαφοροποίηση. Υπήρξε πολύ ισχυρή συσχέτιση ($p < 0.0001$) μεταξύ της αναλογίας αποπτωτικού δείκτη/μιτωτικού δείκτη και της έκτασης της αγγειακής διήθησης (χαμηλότερες τιμές σε αυτά με αυξημένη έκταση αγγειακής διήθησης). Επιπλέον, η αναλογία αποπτωτικού δείκτη/μιτωτικό δείκτη ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε όγκους με διαυγοκυτταρικές αλλοιώσεις, γιγαντοκύτταρα και νέκρωση ($p < 0.05$, $p < 0.01$ και $p < 0.001$ αντιστοίχως). Από την άλλη πλευρά δεν κατεδείχθη σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ανωτέρω δεικτών και του αριθμού των όγκων σε κάθε περίπτωση. Η μέση τιμή με τα 95%CI για την αναλογία αποπτωτικού δείκτη/μιτωτικό δείκτη για τον επικρατούντα βαθμό διαφοροποίησης φαίνεται στη εικόνα 5.

Εικόνα 5. Σχέση μεταξύ της αναλογίας αποπτωτικού/μιτωτικό δείκτη και βαθμού διαφοροποίησης.

β. Ευρήματα ανοσοϊστοχημικού ελέγχου για τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση

Και στις 35 περιπτώσεις ο αριθμός των Ki-67 (+) ηπατοκυττάρων / 10ΜΟΠ ήταν σημαντικά υψηλότερος στις περιοχές του όγκου συγκρινόμενος με τις τιμές του περιβάλλοντος τον όγκο ηπατικού παρεγχύματος ($p < 0.0001$) (εικόνα 6). Σε όλες τις 35 περιπτώσεις, τα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα του περιβάλλοντος τον όγκο παρεγχύματος έδειξαν υψηλότερες τιμές Ki-67 θετικών κυττάρων σε σύγκριση με το μη νεοπλασματικό παρέγχυμα σε φυσιολογικό ήπαρ (μέση τιμή 4.81 ± 4.77 , εύρος 0–4, διάμεση τιμή 2.5) από τους ιστορικούς μάρτυρες (Ravazoula P, et al, 2002). Περιπτώσεις με σχετικά υψηλές τιμές Ki-67 στα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα στο παρακείμενο του όγκου παρέγχυμα, κατέδειξαν επίσης υψηλές τιμές Ki-67 και στον όγκο αλλά είχαν και στοιχεία ενεργού ηπατίτιδος. Επιπλέον κατεγράφησαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ αποπτωτικού δείκτη, μιτωτικού δείκτη και δείκτη Ki-67 ($p < 0.01$). Στις περιπτώσεις όπου συγκρίθηκαν η αναλογία αποπτωτικού δείκτη/μιτωτικό δείκτη με την έκφραση του αντιγόνου Ki-67, ευρέθη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p < 0.05$), η οποία όμως δεν ήταν τόσο ισχυρή όσο η σχέση που καταγράφηκε όταν συγκρίθηκε ο αποπτωτικός με το μιτωτικό δείκτη για κάθε όγκο ($p < 0.01$). Σχεδόν όλοι οι όγκοι έδειξαν ισχυρή έκφραση του αντιγόνου CD34, έκφραση η οποία ήταν πολύ πιο ισχυρή από το περιβάλλον τον όγκο μη νεοπλασματικό παρέγχυμα (εικόνα 7). Μέσα στον όγκο ο αριθμός των αγγείων (εύρος 3–39, μέση τιμή 10.2 ± 6.8 , διάμεσος 8) ήταν σημαντικά υψηλότερος από το περιβάλλον παρέγχυμα ($p < 0.01$). Επιπλέον κατεγράφη σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού της νεοαγγειογένεσης και του μιτωτικού δείκτη ($r = 0.63$, $p < 0.01$), του δείκτη Ki-67

($r=0.58$, $p<0.01$), της βαθμίδος κακοήθειας (βαθμός διαφοροποίησης) ($r=0.44$, $p,0.05$) και της παρουσίας ή όχι μακρο-αγγειακής διήθησης ($r=0.71$, $p<0.01$). Στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των ανέπαφων αγγείων εντός του όγκου ήταν παραπάνω από 5, τότε ο αποπτωτικός δείκτης ελαττωνόταν σημαντικά και η συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων ήταν στατιστικώς σημαντική ($r=-0.69$, $p<0.01$). Η αγγειοβρίθεια των όγκων αλλά και οι τιμές του δείκτη Ki-67 εμφάνισαν μεγάλη ετερογένεια μέσα στον ίδιο όγκο και συχνά αυτό οφειλόταν σε προφανείς διαφορές στη μορφολογία του όγκου (π.χ. διαφοροποίηση, ιστολογικός τρόπος ανάπτυξης). Από την άλλη πλευρά όμως οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των τιμών του δείκτη Ki-67 μέσα στον ίδιο όγκο δεν είχε σχέση με μορφολογικές διαφορές. Το πιο χαρακτηριστικό ήταν ότι οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην περιφέρεια του όγκου, πράγμα το οποίο εξηγείται από το ότι η περιφέρεια ενός κακοήθους νεοπλασματος περιλαμβάνει ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα σε σχέση με τα νεοπλασματικά κύτταρα που βρίσκονται σε ενδότερες περιοχές στον όγκο.

Εικόνα 6Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του αντιγόνου Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) σε νεοπλασματικό (άνω μέρος στη φωτογραφία) και μη-νεοπλασματικό ήπαρ (κάτω μέρος στη φωτογραφία). Υπάρχει μεγάλη διαφορά στον αριθμό κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο Ki-67 (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x25).

Εικόνα 6Β. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του αντιγόνου Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) σε νεοπλασματικό ιστό (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x400).

Εικόνα 7Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του αντιγόνου CD34 (δείκτης νεοαγγειογένεσης) σε νεοπλασματικό (δεξιά στη φωτογραφία) και μη-νεοπλασματικό ήπαρ (αριστερά στη φωτογραφία). Υπάρχει μεγάλη διαφορά στον αριθμό των νεοσχηματισμένων αγγείων (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x25).

Εικόνα 7Β. Τμήμα της προηγούμενης φωτογραφίας σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Φαίνεται ο σχηματισμός νεοαγγείων μέσα στον όγκο (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x400).

Συσχέτιση μεταξύ των χαρακτηριστικών του όγκου και της επιβίωσης.

Επειδή οι ασθενείς με μακροσκοπική αγγειακή διήθηση ή μικροσκοπική διήθηση μεγάλου αγγείου, εμφανίζουν πολύ συχνά υποτροπή της νόσου (Marsh JW, et al, 1997), η ιστοπαθολογική εξέταση του τμήματος του ήπατος που αφαιρείται κατά την ηπατεκτομή είναι πολύτιμη κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών χωρίς μακροσκοπική διήθηση ή χωρίς μικροσκοπική διήθηση μεγάλου αγγείου. Γι'αυτό το λόγο λοιπόν, για να ερευνήσουμε το δυνητικό ρόλο των χαρακτηριστικών του όγκου και τη σχέση αυτών για την μετεγχειρητική πορεία των όγκων, χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία Cox proportional hazard model. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέγεθος του όγκου ($p < 0.006$), το κλάσμα απόπτωσης προς μίτωση ($p < 0.03$), και ο αριθμός των όγκων ($p < 0.04$) αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για τον καθορισμό του διαστήματος επιβίωσης των ελεύθερων νόσου ασθενών. Αυτό, όπως προαναφέραμε συμβαίνει στις περιπτώσεις που δεν υπήρχε μακροσκοπική αγγειακή διήθηση ή μικροσκοπική διήθηση μεγάλου αγγείου. Ο κίνδυνος υποτροπής αυξάνει 3.3 φορές (95%CI:1.1-8.8), όταν η αναλογία απόπτωσης/μίτωση είναι μικρότερη του 3, συγκρινόμενος με τον κίνδυνο όταν η αναλογία είναι άνω του 3. Επιπλέον, η αναλογία απόπτωσης/μίτωση από μόνη της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγων υποτροπής. Οι ασθενείς με όγκους που η αναλογία ήταν άνω του 3 είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη μετεγχειρητική χρονική περίοδο ελεύθερη νόσου ($p < 0.01$), σε σύγκριση με τους ασθενείς οι οποίοι είχαν αναλογία μικρότερη του 3 (εικόνα 8). Βέβαια το εύρημα αυτό δεν προκαλεί έκπληξη διότι η έκταση της αγγειακής διήθησης που αποτελεί τον πλέον σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με τις τιμές της αναλογίας

απόπτωση/μίτωση ($p < 0.0001$). Επιπλέον, επί απουσίας μακροσκοπικής διήθησης ή μικροσκοπικής διήθησης μεγάλου αγγείου, κανένας από τους 6 ασθενείς με αναλογία απόπτωση/μίτωση άνω του 6 δεν εμφάνισε υποτροπή της νόσου κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης (4.6 ± 0.5 έτη).

Η τιμή της αναλογίας απόπτωση/μίτωση μπορεί να βοηθήσει και στη διάκριση της γένεσης του όγκου (δηλ. να διαχωρισθεί εάν οι πολλαπλοί όγκοι έχουν την ίδια ή διαφορετικές προελεύσεις- π.χ. στάδιο T4 έναντι T2 ή T1). Αυτό όμως χρειάζεται γενετική ανάλυση.

Εικόνα 8. Καμπύλες επιβίωσης που αφορούν το διάστημα ελεύθερο νόσου

γ. Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και in-situ υβριδισμού

1. Bcl-2

In situ υβριδισμός για την έκφραση του bcl-2 mRNA.

Ο πίνακας 8 δείχνει τον αριθμό των περιπτώσεων που έδωσαν θετική χρώση για το bcl-2 mRNA. Το bcl-2 mRNA εκφράσθηκε σε 25/35 (70%) των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων. Το mRNA εντοπίσθηκε στα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα και τα υπερπλαστικά χολαγγεία του περιβάλλοντος τον όγκο ινώδους ιστού (εικόνα 9A). Στο μη νεοπλασματικό ήπαρ (κίρρωτικό και μη κίρρωτικό) σε παρακείμενες του όγκου θέσεις, το bcl-2 mRNA εκφράσθηκε σε μικρότερο ποσοστό στα ηπατοκύτταρα πλησίον ινώδους ιστού αλλά και στα υπερπλαστικά χολαγγεία (εικόνα 9B). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε διαφωνία με προηγούμενη μελέτη (Fiorentino, et al, 1999) που αναφέρει ότι το bcl-2 mRNA δεν εκφράζεται καθόλου στα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, αλλά σε συμφωνία με άλλη μελέτη στην οποία κατεδείχθη ότι το bcl-2 mRNA εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα στις περιπυλαίες περιοχές και σε αυτές πλησίον των ινωδών διαφραγμάτων σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδος τύπου B και C σταδίου 5 και 6 κατά την ταξινόμηση Ishak (Tsamandas AC, et al, 2003).

Πίνακας 8. Κατανομή του bcl-2 mRNA στα ηπατοκύτταρα και σχέση με τους ιστοπαθολογικούς παράγοντες

Ιστοπαθολογικοί παράγοντες	#περ./ [#(+)]περ.]	Bcl-2 mRNA		
		Νεοπλασματικό ήπαρ	Μη νεοπλασματικό ήπαρ Κιρρωτικό	Μη κιρρωτικό
Μικροδοκιδώδες/ μικροαδενικό	25[18]	46±1.0 ^{a,b}	31±0.1 ^a	21±0.2 ^b
Συμπαγές	10[7]	42±0.8 ^{c,d}	29±0.4 ^c	20±0.1 ^d
Βαθμός κακοήθειας				
I	20[14]	44±0.9 ^{e,f}	32±0.3 ^e	22±0.3 ^f
II	11[8]	47±0.3 ^{g,h}	30±0.7 ^g	21±0.6 ^h
III	4[3]	41±0.6 ^{i,j}	31±0.2 ⁱ	20.5±0.4 ^j
Στάδιο όγκου				
I	4[3]	44±0.1 ^{k,l}	30.5±0.1 ^k	19±0.5 ^l
II	11[8]	46±0.2 ^{m,n}	31.5±0.4 ^m	22±0.7 ⁿ
III	20[14]	40±0.7 ^{o,p}	29±0.5 ^o	20±0.2 ^p
Σύνολο	35[25]			

Οι τιμές είναι mean ± SD.

Σημαντικές διαφορές στο επίπεδο $p < 0.01$ στα γράμματα b, d, f, h, j, l, n, p και στο επίπεδο $p < 0.05$ στα γράμματα a, c, e, g, i, k, m, o.

Εικόνα 9Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του bcl-2 mRNA σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Παχύ βέλος: νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, λεπτά βέλη : χολαγγεία (in situ υβριδισμός x250-αριστερά, x400-δεξιά)

Εικόνα 9Β. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του bcl-2 mRNA σε κίρρωτικό ήπαρ. Βέλος: χολαγγείο (in situ υβριδισμός x100-αριστερά, x400-δεξιά)

Εικόνα 9Γ. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στη μέθοδο in situ υβριδισμού που έχει χρησιμοποιηθεί ετερόλογος ιχνηθέτης (in situ υβριδισμός x400)

Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2.

Στις περιπτώσεις των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων η πρωτεΐνη του bcl-2 εκφράσθηκε μόνο στα υπερπλαστικά χολαγγεία του ινώδους συνδετικού ιστού αλλά και στα λεμφοκύτταρα του όγκου και των ινωδών διαφραγμάτων. Τα νεοπλασματικά και μη-νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα έδωσαν αρνητική ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη bcl-2 (εικόνα 10Α). Όσον αφορά το μη-νεοπλασματικό ήπαρ (κίρρωτικό και μη-κίρρωτικό), η πρωτεΐνη του bcl-2 ανιχνεύθηκε μόνο στα υπερπλαστικά χολαγγεία του αφοριστικού πετάλου και των ινωδών διαφραγμάτων αλλά και στα λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων, των ινωδών διαφραγμάτων και των κολποειδών. Τα ηπατοκύτταρα ήσαν αρνητικά (εικόνα 10Β).

Στατιστική ανάλυση. Η έκφραση του bcl-2 mRNA ήταν υψηλότερη στα νεοπλασματικά συγκρινόμενη με τα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα στους κίρρωτικούς και μη κίρρωτικούς ασθενείς ($p < 0.05$ και $p < 0.01$ αντίστοιχα). Όπως δε δείχνει ο πίνακας 8, δεν ανιχνεύθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του ιστολογικού τρόπου ανάπτυξης του όγκου, του βαθμού κακοήθειας και του σταδίου από τη μία πλευρά και του ποσοστού bcl-2 mRNA από την άλλη.

Εικόνα 10Α. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν εκφράζουν τη bcl-2 ογκοπρωτεΐνη σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα (τόσο εντός του όγκου όσο και στα ινώδη διαφράγματα-λεπτά βέλη) και τα χολαγγεία (παχιά βέλη) που δίνουν έντονη θετική ανοσοχρώση στην πρωτεΐνη bcl-2 (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x400).

Εικόνα 10Β. Μικροφωτογραφία από κίρρωτικό ήπαρ. Τα ηπατοκύτταρα δεν εκφράζουν τη bcl-2 ογκοπρωτεΐνη σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα (λεπτά βέλη) και τα χολαγγεία (παχιά βέλη) που δίνουν έντονη θετική ανοσοχρώση στην πρωτεΐνη bcl-2 (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x250-αριστερά, x400-δεξιά).

2. Bax

In situ υβριδισμός για την έκφραση του bax mRNA.

Ο πίνακας 9 δείχνει τον αριθμό των περιπτώσεων που έδωσαν θετική χρώση για το bax mRNA και την ογκοπρωτεΐνη. Το bax mRNA εκφράσθηκε σε όλα τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα. Το mRNA εντοπίσθηκε στα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα και τα υπερπλαστικά χολαγγεία του περιβάλλοντος τον όγκο ινώδους ιστού (εικόνα 11). Στο μη νεοπλασματικό ήπαρ (κίρρωτικό και μη κίρρωτικό) σε παρακείμενες του όγκου θέσεις, το bax mRNA εκφράσθηκε σε μικρότερο ποσοστό στα ηπατοκύτταρα πλησίον ινώδους ιστού αλλά και στα υπερπλαστικά χολαγγεία.

Πίνακας 9. Κατανομή του bax mRNA στα ηπατοκύτταρα και σχέση με τους ιστοπαθολογικούς παράγοντες

Ιστοπαθολογικοί παράγοντες	#περ./ [#(+)]περ.]	Bax mRNA		
		Νεοπλασματικό ήπαρ	Μη νεοπλασματικό ήπαρ Κίρρωτικό	Μη κίρρωτικό
Μικροδοκιδώδες/ μικροαδενικό	25[25]	52±1.0 ^{a, b}	30±0.1 ^a	22±0.2 ^b
Συμπαγές	10[10]	55±0.7 ^{c, d}	26±0.5 ^c	18±0.9 ^d
Βαθμός κακοήθειας				
I	20[20]	52±0.5 ^{e, f}	34±0.9 ^e	23±0.4 ^f
II	11[11]	37±0.8 ^{g, h}	33±0.6 ^g	25±0.5 ^h
III	4[4]	31±0.8 ⁱ	22±0.8 ⁱ	22±0.7 ⁱ
Στάδιο όγκου				
I	4[4]	43±0.4 ^{j, k}	30±0.7 ^j	19±0.8 ^k
II	11[11]	48±0.4 ^{l, m}	31±0.8 ^l	22±0.9 ^m
III	20[20]	41±0.5 ^{n, o}	29±0.6 ⁿ	20±0.1 ^o
Σύνολο	35[35]			

Οι τιμές είναι mean ± SD.

Σημαντικές διαφορές στο επίπεδο $p < 0.01$ στα γράμματα b, d, f, h, i, k, m, o και στο επίπεδο $p < 0.05$ στα γράμματα a, c, e, g, j, l, n.

Εικόνα 11Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του BAX mRNA σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. (in situ υβριδισμός x250).

Εικόνα 11Β. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση του bax mRNA σε κίρρωτικό ήπαρ. Σε αντίθεση με την εικόνα 9B τα ηπατοκύτταρα στη μεσότητα του οζιδίου (ζώνη 3) δίνουν έντονη θετική χρώση (in situ υβριδισμός x400).

Εικόνα 11Γ. Λεπτομέρεια από την προηγούμενη φωτογραφία (in situ υβριδισμός x400).

Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για την έκφραση της πρωτεΐνης bax.

Ο πίνακας 10 δείχνει την έκφραση της πρωτεΐνης bax. Στις περιπτώσεις των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων η πρωτεΐνη του bax εκφράσθηκε στα ηπατοκύτταρα, τα υπερπλαστικά χολαγγεία του ινώδους συνδετικού ιστού αλλά και στα λεμφοκύτταρα του όγκου και των ινωδών διαφραγμάτων. Όσον αφορά το μη-νεοπλασματικό ήπαρ (κίρρωτικό και μη-κίρρωτικό), η πρωτεΐνη του bax ανιχνεύθηκε στα ηπατοκύτταρα, τα υπερπλαστικά χολαγγεία του αφοριστικού πετάλου και των ινωδών διαφραγμάτων αλλά και στα λεμφοκύτταρα των πυλαίων διαστημάτων, των ινωδών διαφραγμάτων και των κολποειδών (εικόνα 12).

Η εικόνα 14 δείχνει τις διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 και bax.

Στατιστική ανάλυση. Η έκφραση του bax mRNA ήταν υψηλότερη στα νεοπλασματικά συγκρινόμενη με τα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα στους κίρρωτικούς και μη κίρρωτικούς ασθενείς ($p < 0.05$ και $p < 0.01$ αντίστοιχα). Όπως δε δείχνει ο πίνακας 9, η έκφραση του bax mRNA ήταν υψηλότερη στα καρκινώματα grade I σε σύγκριση με τα καρκινώματα grade II και III. Από την άλλη πλευρά δεν ανιχνεύθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του τρόπου ανάπτυξης (pattern) του όγκου και του σταδίου από τη μία πλευρά και του ποσοστού bax mRNA από την άλλη. Τα ίδια αποτελέσματα κατεγράφησαν και για την έκφραση της πρωτεΐνης bax (πίνακας 10).

Πίνακας 10. Κατανομή της πρωτεΐνης bax στα ηπατοκύτταρα και σχέση με τους ιστοπαθολογικούς παράγοντες.

Ιστοπαθολογικοί παράγοντες	#περ./ [#(+)]περ.]	Bax		
		Νεοπλασματικό ήπαρ	Μη νεοπλασματικό ήπαρ Κιρρωτικό	Μη κιρρωτικό
Μικροδοκιδώδες/ μικροαδενικό	25[25]	51±1.2 ^{a, b}	32±0.3 ^a	26±0.4 ^b
Συμπαγές	10[10]	53±0.67 ^{c, d}	29±0.4 ^c	21±0.3 ^d
Βαθμός κακοήθειας				
I	20[20]	54±0.8 ^{e, f}	35±0.5 ^e	24±0.5 ^f
II	11[11]	34±0.5 ^g	32±0.7	22±0.2 ^g
III	4[4]	33±0.7 ^h	24±0.5 ^h	23±0.6 ^h
Στάδιο όγκου				
I	4[4]	46±0.3 ^{i, j}	32±0.3 ⁱ	18±0.6 ^j
II	11[11]	47±0.9 ^{k, l}	34±0.7 ^k	23±0.5 ^l
III	20[20]	43±0.2 ^{m, n}	28±0.4 ^m	22±0.2 ⁿ
Σύνολο	35[35]			

Οι τιμές είναι mean ± SD.

Σημαντικές διαφορές στο επίπεδο $p < 0.01$ στα γράμματα b, d, f, g, h, j, l, n και στο επίπεδο $p < 0.05$ στα γράμματα a, c, e, g, i, k, m.

Εικόνα 12Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση της bax πρωτεΐνης σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε αντίθεση με την εικόνα 10Α τα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα δίνουν έντονη θετική ανοσοχρώση στη bax πρωτεΐνη. Παχιά βέλη: νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, λεπτά βέλη: χολαγγεία. Είναι χαρακτηριστική η ετερογένεια της ανοσοχρώσης στα νεοπλασματικά κύτταρα (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x100).

Εικόνα 12Β. Η προηγούμενη φωτογραφία σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Παχιά βέλη: νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, λεπτά βέλη: χολαγγεία. (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x250).

Εικόνα 13Α. Μικροφωτογραφία που δείχνει την έκφραση της bax πρωτεΐνης σε κίρρωτικό ήπαρ. Σε αντίθεση με την εικόνα 10B τα ηπατοκύτταρα δίνουν έντονη θετική ανοσοχρώση στη bax πρωτεΐνη. Παχιά βέλη: ηπατοκύτταρα, λεπτά βέλη: χολαγγεία. Είναι χαρακτηριστική η ετερογένεια της ανοσοχρώσης στα ηπατοκύτταρα (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x100).

Εικόνα 13Β. Η προηγούμενη φωτογραφία σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Παχιά βέλη: ηπατοκύτταρα, λεπτά βέλη: χολαγγεία. Είναι χαρακτηριστική η ετερογένεια της ανοσοχρώσης στα ηπατοκύτταρα (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x 250).

Εικόνα 14. Συγκριτική φωτογραφία που δείχνει τη διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2 (αριστερά) και bax (δεξιά), στα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα (παχιά βέλη) και τα χολαγγεία (λεπτά βέλη) (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x 250).

3. P53

Έκφραση του p53 σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου

Η έκφραση της πρωτεΐνης του p53 ήταν χαμηλότερη στους μικροδοκιδώδεις τύπους του ΗΚΚ σε σχέση με τους συμπαγείς ($p < 0.05$) (Πίνακας 11). Επιπλέον η έκφραση του p53 ήταν υψηλότερη στους όγκους χαμηλής διαφοροποίησης σε σχέση με αυτούς υψηλής ή μέσης διαφοροποίησης. Η σχέση μεταξύ του p53 και των υπολοίπων δεικτών φαίνεται στον πίνακα 12. Η εικόνα 15 δείχνει την έκφραση του p53.

Πίνακας 11. Κατανομή του p53 σε σχέση με τους ιστοπαθολογικούς παράγοντες.

Μικροδοκιδώδη/ Ψευδοαδενικά (N=25)	Συμπαγή (N=10)	Grade I	Grade II	Grade III
56.90±17.12*	74.79±16.18*	60.99±30.58 ^{+,¶}	67.22±15.53 ⁺	74.69±15.12 [¶]

*, ⁺ $p < 0.05$ [¶] $p < 0.01$

Πίνακας 12. Σχέση της έκφρασης του p53 με τα Ki-67, Bax, bcl-2 και ΔΑΣ

	Ki-67	Bcl-2	Bax	ΔΑΣ
p53	0.553 ^a	0.007	0.007	- 0.459 ^a

^a: $p < 0.05$

Εικόνα 15Α. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας I κατά Edmondson που δείχνει έκφραση του p53 (βέλη) (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x250).

Εικόνα 15Β. Μικροφωτογραφία από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας III κατά Edmondson που δείχνει έκφραση του p53 (βέλη) (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη-περοξειδάση x400).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διατριβή αυτή δείχνει ότι η πολυεστιακή και πολυπαραγοντική «αρχή» ή «φύση» της ηπατικής καρκινογένεσης η οποία έχει κυρίως καταδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στον άνθρωπο για την αναγνώριση των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης του όγκου και το σχεδιασμό των θεραπευτικών προσεγγίσεων σε αυτούς τους ασθενείς (Sirica AE, 1996, Farber E, 1991, Factor VM, et al, 2000). Καταδεικνύεται επίσης ότι η βιολογία των ηπατικών όγκων είναι παρόμοια με αυτή των όγκων του παχέος εντέρου (Fogt F, et al, 1998) και της ουροδόχου κύστεως (Reznikoff CA, et al, 1996, Cordon-Cardo C, et al, 2000, Farrow GM, 1992, Helpap B, et al, 2000). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα ΗΚΚ εμφανίζονται ως καλώς διαφοροποιημένα νεοπλάσματα χωρίς μακροσκοπική αγγειακή διήθηση, εύρημα το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες (Kojiro M, et al, 1999). Η διάκριση ανάμεσα στη δυσπλασία και στο καρκίνωμα σε τέτοιες περιπτώσεις σήμερα βασίζεται στην εμπειρία του παθολογοανατόμου ο οποίος συνδυάζει αρχιτεκτονικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά της βλάβης (Takayama T, et al, 1990, Okuda K, 2000, Kojiro M, et al, 1999, Nakanuma Y, et al, 1990). Η εγκυρότητα αυτής της διάκρισης αυξάνεται σημαντικά με τη χρήση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου για το αντιγόνο Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) το οποίο εκφράζεται σε πολύ υψηλότερα ποσοστά στα κύτταρα του όγκου σε σύγκριση με το περιβάλλον ηπατικό παρέγχυμα (Saito Y, et al, 1998, Nolte M, et al, 1998). Επιπλέον βασίζεται στο βαθμό επαγωγής της αγγειογένεσης στον όγκο όπως αυτός καταδεικνύεται από την ανοσοϊστοχημική χρώση για το αντιγόνο CD34 (Tanigawa N, et al, 1997, El-Assal ON, et al, 1998, Grigioni WF, et al, 1991).

Όπως και στην καρκινογένεση της ουροδόχου κύστεως (Cordon-Cardo C, et al, 2000), αυτά τα μικρά καλώς διαφοροποιημένα νεοπλάσματα εμφανίζουν αυξημένο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά η διαφοροποίηση και η αναλογία κυτταρικού πολλαπλασιασμού προς την απόπτωση παραμένουν κοντά στις φυσιολογικές τιμές, με αποτέλεσμα η αφαίρεση αυτών των μικρών και καλώς διαφοροποιημένων ογκιδίων να αποτελεί ουσιαστικά και μόνιμη θεραπεία για τον ασθενή.

Προηγούμενες μελέτες όσον αφορά την πειραματική και ανθρώπινη ηπατική καρκινογένεση έχουν δείξει ότι τα ΗΚΚ εξελίσσονται (Kojiro M, et al, 1999, Farber E, 1991). Κατά τη διαδικασία αύξησης του μεγέθους του όγκου οι νεοπλασματικές εστίες γίνονται λιγότερο διαφοροποιημένες και μόνο το 18% των όγκων παραμένει αποκλειστικά υψηλής διαφοροποίησης. Όπως και σε άλλες ερευνητικές μελέτες έτσι και στην παρούσα αναγνωρίζεται η εμφάνιση «νέων όγκων» μέσα σε ένα προϋπάρχοντα όγκο – η εμφάνιση αυτή πιστοποιείται ιστολογικά από τη χαμηλότερη διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πλειομορφισμό και τέλος τον αυξημένο βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Kojiro M, et al, 1999, Okuda K, 2000, Nakanuma Y, et al, 1990, Yamamoto K, et al, 1999, Tsuda H, et al, 1988). Σε αυτές τις περιπτώσεις οι λιγότερα διαφοροποιημένες εστίες περιβάλλονται πάντοτε από καλύτερα διαφοροποιημένα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Kojiro M, et al, 1999, Okuda K, 2000, Nakanuma Y, et al, 1990, Tsuda H, et al, 1988).

Τελικά, οι μη διαφοροποιημένες νεοπλασματικές εστίες παρουσιάζουν την ικανότητα να διηθούν παρακείμενους ιστούς και να μεθίστανται, όπως αυτό αποδεικνύεται από την συσχέτιση μεταξύ αγγειακής διήθησης και υποτροπής

της νόσου (Kojiro M, et al, 1999, Marsh JW, et al, 1997, Mor E, et al, 1998). Η εμφάνιση τέτοιας επιθετικής συμπεριφοράς αποδίδεται το πιθανότερο σε περαιτέρω γενετική αστάθεια και γενετικές διαταραχές, όπως αυτό αποδεικνύεται και από την παρουσία νεοπλασματικών γιγαντοκυττάρων και εστιών χαμηλής διαφοροποίησης, ευρήματα που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών στην ανάπτυξη (αναλογία απόπτωσης/μίτωση). Παρόμοια ευρήματα έχουν καταγραφεί σε πειραματικά μοντέλα (Farber E, 1991, Factor VM, et al, 2000, Schulte-Hermann R, et al, 1990) και σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο (Mommers EC, et al, 1999). Πιο συγκεκριμένα ο αυξημένος βαθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρείται στις μικρές σε μέγεθος και καλώς διαφοροποιημένες νεοπλασματικές εστίες μπορεί να επάγει την γενετική αστάθεια και την εξέλιξη του όγκου (Factor VM, et al, 2000). Έτσι τα ιστοπαθολογικά ευρήματα ρουτίνας, όπως η παρουσία ή απουσία αγγειακής διήθησης, η παρουσία ή όχι νεοπλασματικών γιγαντοκυττάρων, και η αναλογία αριθμού μιώσεων/αριθμό αποπτωτικών σωματίων πιθανότατα αποτελούν δείκτες που μπορούν να καθορίσουν τη βιολογική συμπεριφορά ενός ΗΚΚ.

Η ανεύρεση ετερογένειας ενός όγκου αποτελεί επίσης ένα σταθερό συμπέρασμα-εύρημα σε μοριακές και γενετικές αναλύσεις του ΗΚΚ (Okuda K, 2000, Hui AM, et al, 1999, Hussain SP, et al, 1998, Ozturk M, 1999). Οι μελέτες αυτές έχουν δείξει ότι γενετικές και επιγενετικές μεταβολές συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του φαινοτύπου του όγκου (Hui AM, et al, 1999, Hussain SP, et al, 1998, Hussain SP, et al, 2000, Ozturk M, 1999, Morin PJ, 1999, Sheu JC, 1997). Γονίδια με σωματικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το p53, τον υποδοχέα

mannose-6-phosphate/insulin-like factor 2 receptor, την β-κατενίνη, το p16 και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στον κυτταρικό κύκλο και τη διηθητική ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον μεταλλάξεις του p16, και του γονιδίου-2 του καρκίνου του μαστού ενοχοποιούνται ότι προκαλούν νεοπλασματική ενεργοποίηση σε διάφορα κυτταρικά γονίδια όπως η κυκλίνη D και η κυκλίνη A (Ozturk M, 1999).

Η ρύθμιση της μιτωτικής και της αποπτωτικής διαδικασίας διαμέσου πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο (όπως οι p16, p21, p27, και κυκλίνη D) αποτελεί μία σημαντική πλευρά της ηπατικής καρκινογένεσης (Yamamoto K, et al, 1999, Ozturk M, 1999, Ng IO, 1998, Ito Y, et al, 1999, Tannapfel A, et al, 1999). Επί παραδείγματι, η απενεργοποίηση του p16 λόγω μετα-μεταφραστικής ρύθμισης εμφανίζεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην πρώιμη εμφάνιση και εξέλιξη του όγκου (Ozturk M, 1999), ενώ η ελαττωμένη έκφραση του p21, η οποία προκαλείται από μεταλλάξεις του p53 συμβαίνει σε όψιμο στάδιο της βιολογικής πορείας του όγκου. Από την άλλη πλευρά συμβατό με το εύρημα της παρούσης μελέτης (ότι η μεταβολή της αναλογίας μίτωση/απόπτωση σχετίζεται με επιθετικότερη συμπεριφορά), τα οζίδια με χειρότερη διαφοροποίηση δείχνουν πιο συχνά μεταλλάξεις του p53 (Yamamoto K, et al, 1999, Ozturk M, 1999) και δυσλειτουργία του γονιδίου Rb, ευρήματα που συνοδεύουν πιο επιθετική μεταστατική συμπεριφορά (Hui AM, et al). Όμως απαιτούνται μελλοντικές μελέτες με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, οι οποίες θα προσπαθήσουν να συσχετίσουν τις γενετικές διαταραχές με τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης του όγκου. Αν και τα περισσότερα ΗΚΚ εμφανίζονται ως καλώς διαφοροποιημένα νεοπλάσματα τα οποία αυξάνουν σε μέγεθος αργά στην πορεία του χρόνου,

ένα μικρό ποσοστό (γύρω στο 15%) εμφανίζει επιθετική βιολογική συμπεριφορά από την αρχή και υπό αυτούς του όρους μιμείται τα επίπεδα νεοπλασμάτων της ουροδόχου κύστεως και του παχέος εντέρου (Farrow GM, 1992, Helrap B, et al, 2000, Fogt F, et al, 1998). Έτσι λόγω αυτής της «ιδιότυπης» βιολογικής συμπεριφοράς, η εκτίμηση της πρόγνωσης του όγκου, η οποία βασίζεται στο μέγεθος δεν είναι ορθή σε μία μειονότητα ΗΚΚ. Εδώ λοιπόν θα είναι ενδιαφέρον να καθορίσει κανείς εάν αυτοί οι πρώιμα επιθετικοί όγκοι ακολουθούν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια ανάπτυξης συγκρινόμενοι με την υπόλοιπη πλειοψηφία των ΗΚΚ, όπως συμβαίνει στους όγκους της ουροδόχου κύστεως (Cordon-Cardo C, et al, 2000) και του παχέος εντέρου (Fogt F, et al, 1998).

Η αγγειογένεση αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα της ηπατικής καρκινογένεσης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των όγκων. Στην παρούσα μελέτη καταδείχθηκε η ύπαρξη σχέσης μεταξύ νεοαγγειογένεσης και επιθετικότητας του όγκου (όπως αυτή αντιπροσωπεύεται από το μέγεθος, τη διαφοροποίηση, τον αριθμό μιτώσεων αλλά και την παρουσία ή απουσία αγγειακής διήθησης). Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Tanigawa N, et al, 1997, El-Assal ON, et al, 1998, Kimura H, et al, 1998, Ker CG, et al, 1999). Όταν ο αριθμός των καλώς σχηματισμένων αγγείων μέσα σε έναν όγκο ήταν άνω του 4, αυτό συνοδευόταν από ελάττωση του αποπτωτικού δείκτη-εύρημα που συνεισφέρει στην ανάπτυξη του όγκου λόγω μεταβολής της αναλογίας αριθμός μιτώσεων/αριθμό αποπτωτικών σωμάτων.

Τέλος πιθανόν να χρειάζεται αναθεώρηση και του συστήματος σταδιοποίησης κατά TNM καθώς καλύπτει το μέγεθος, τη μεταστατική προσβολή ή όχι των

λεμφαδένων και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις αλλά δεν αναφέρεται σε άλλους ιστοπαθολογικούς/βιολογικούς παράγοντες όπως η μικροσκοπική αγγειακή διήθηση και η αναλογία αριθμού μιτώσεων/αριθμό αποπτωτικών σωμάτων. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται πάνω σε αυτά τα πεδία.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη καταδείξαμε ότι, σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, το bcl-2 mRNA παράγεται από: α) νεοπλασματικά και μη-νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα και β) από τα επιθηλιακά κύτταρα των χολαγγείων (Ravazoula P, et al, 2002). Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία αυτή είναι η πρώτη φορά που καταδεικνύεται η ενεργός παραγωγή bcl-2 mRNA από μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, ενώ στο παρελθόν έχει δειχθεί ξανά η συγκεκριμένη έκφραση του bcl-2 mRNA σε νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα σε περιπτώσεις ΗΚΚ (Fiorentino M, et al, 1999).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το bcl-2 εκφράζεται στο ήπαρ στα επιθηλιακά κύτταρα των υπερπλαστικών χολαγγείων και όχι των ηπατοκυττάρων (Charlotte F, et al, 1994, Tsamandas AC, et al, 2002, Tsamandas AC, et al, 2003) και ότι το εύρημα αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια της διαφορικής διάγνωσης για τη διάκριση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και χολαγγειοκαρκινώματος (Charlotte F, et al, 1994). Όμως μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το bcl-2 εκφράζεται ενεργώς (ανίχνευση mRNA) τόσο στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα όσο και τα χολαγγειοκαρκινώματα και επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα στη διαφορική διάγνωση (Fiorentino M, et al, 1994). Επιπλέον ποτέ δεν έχει δειχθεί αξιόπιστα ότι στο ήπαρ, η έκφραση του bcl-2 έχει

προγνωστική σημασία και αποτελεί ένδειξη για χημειοθεραπεία (Fiorentino M et al, 1994).

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη του bcl-2 έχει ανιχνευθεί στα ΗΚΚ σε μικρά ποσοστά (3-20%). Ειδικότερα η μελέτη των Zhao et al (1994) έδειξε ότι η έκφραση του bcl-2 ήταν κυρίως κυτταροπλασματική, ενώ παρατηρήθηκε επίσης και περιπυρηνική αλλά και πυρηνική εντόπιση. Η πυρηνική εντόπιση του bcl-2 δεν είναι αναμενόμενη διότι η συγκεκριμένη ογκοπρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δικτυωτό και τις πυρηνικές μεμβράνες (Hockenbery D, et al, 1990, Krajewski S, et al, 1993). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία θετικότητα για την πρωτεΐνη του bcl-2 στα ηπατοκύτταρα. Η διαφορά με την προηγούμενη μελέτη θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορά της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου αλλά η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι καλά εφαρμοσμένη και από την άλλη πλευρά οι θετικοί μάρτυρες-ιστοί (λεμφοκύτταρα του όγκου) παρουσίασαν έντονα θετική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη του bcl-2.

Η διαφορά ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του bcl-2 που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη, μπορεί να αποδοθεί σε διαταραχή της μετα-μεταφραστικής διαδικασίας του bcl-2 γονιδίου. Ο μηχανισμός αυτός δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως (Harigai M, et al, 1996, Hsia CC, et al, 1992). Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης υποδηλώνουν ότι ενώ το mRNA του bcl-2 παράγεται ενεργώς από τα ηπατοκύτταρα η αντίστοιχη πρωτεΐνη δεν εκφράζεται καθόλου στα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα. Έτσι μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι υπάρχει μηχανισμός που δρα στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο (π.χ. μηχανισμός που σχετίζεται με την 3' αμετάφραστη περιοχή), ο οποίος εμποδίζει το mRNA να μεταφρασθεί σε πρωτεΐνη στις περιπτώσεις

των ΗΚΚ. Έτσι, σε αντίθεση με άλλα επιθηλιακά νεοπλάσματα, το γονίδιο bcl-2 δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης ήταν ότι η έκφραση του bcl-2 mRNA δεν συσχετίσθηκε με το βαθμό κακοήθειας των όγκων (grade) ή τον ιστολογικό τύπο των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων (μικροκυψελιδώδες, μικροδοκιδώδες, συμπαγές). Προηγούμενη μελέτη (Lee GH, 1997) έχει δείξει ότι η έκφραση του bcl-2 mRNA σε πειραματικώς επαγόμενα ΗΚΚ σχετιζόταν με βασεόφιλη εμφάνιση του κυτταροπλάσματος των νεοπλασματικών κυττάρων. Το τελευταίο δεν αποδείχθηκε στη δική μας μελέτη. Έτσι δεν μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα εάν οι όγκοι που εκφράζουν bcl-2 mRNA αποτελούν διακριτό υπότυπο των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων. Όμως, από την άλλη πλευρά η έκφραση του bcl-2 mRNA ήταν υψηλότερη στα νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα σε σχέση με τα μη νεοπλασματικά. Αυτή ή αύξηση στην ενεργό παραγωγή του bcl-2 mRNA από τα ηπατοκύτταρα μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος δεδομένου του αντιαποπτωτικού/ογκογόνου δυναμικού του γονιδίου bcl-2.

Επιπλέον η μελέτη έδειξε έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του bcl-2 στα υπερπλαστικά χολαγγεία στις περιοχές του αφοριστικού πετάλου και τα ινώδη διαφράγματα (Tsamandas AC, et al, 2002, Tsamandas AC, et al, 2003). Δεδομένου ότι το γονίδιο bcl-2 παρέχει πλεονέκτημα επιβίωσης (δηλ. αυξάνει την επιβίωση λόγω αντιαποπτωτικής δράσης) στα αρχέγονα και εκτελεστικά κύτταρα διαφόρων ιστών και οργάνων και κατ' επέκταση στο ήπαρ, η έκφρασή του στα επιθηλιακά κύτταρα των χολαγγείων οδηγεί σε αύξηση της επιβίωσης αυτών των κυττάρων. Επακόλουθο των

προηγούμενων είναι ότι η έκφραση του bcl-2 στα χολαγγεία του αφοριστικού πετάλου αποτελεί επιπρόσθετη ένδειξη για την παρουσία των ηπατικών αρχέγονων κυττάρων και κυρίως των ηπατικών αρχέγονων κυττάρων (hepatic progenitor cells ή oval cells) τα οποία αποτελούν ένα τμήμα του ηπατοκυτταρικού διαμερίσματος, το οποίο συνίσταται από τα κανάλια Herring με τα χοληφόρα σωληνάρια και/ή έναν διακριτό πληθυσμό από περιχολαγγειακά κύτταρα (Thorgeirsson SS, et al, 1993, Petersen BE, et al, 1998, Tsamandas AC, et al, 2001).

Στην παρούσα μελέτη η πρωτεΐνη και το mRNA του bax εκφράσθηκαν τόσο στα νεοπλασματικά και μη ηπατοκύτταρα, όσο και στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων. Το bax εκφράζεται σε μία μεγάλη ποικιλία κακοήθων νεοπλασμάτων όπως τα επιθηλιακά νεοπλάσματα της ωοθήκης και του στομάχου (Koshida Y, et al, 1997), σε γλοιώματα, νευροβλαστώματα και μυελοβλαστώματα (Krajewski S, et al, 1997) και σε θυμώματα (Salakou S, et al, 2001, Salakou S, et al, 2002).

Υψηλά επίπεδα bax (αυξημένη απόπτωση) σχετίζονται με αυξημένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία αλλά και αυξημένο διάστημα ελεύθερο νόσου στα επιθηλιακά νεοπλάσματα της ωοθήκης (Tai YT, et al, 1998). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του bax και αυξημένου διαστήματος ελεύθερου νόσου σε καρκινώματα ωοθήκης (Lohmann CM, et al, 2000). Η αυξημένη έκφραση του bax σχετίζεται με κακοήγη μετάλλαξη σε μία ποικιλία νεοπλασμάτων των ωοθηκών (Witty JP, et al, 1998). Επιπλέον η έκφραση του bax σχετίζεται με κακή πρόγνωση ειδικότερα όταν συνυπάρχει με απουσία έκφρασης του bcl-2 (Marx D, et al, 1997). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις ασθενών με

βαρειά μυασθένεια οι οποίοι υπέστησαν θυμεκτομή για θεραπευτικούς λόγους, όπου η αυξημένη έκφραση του bax σχετίσθηκε με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών ενώ χαμηλότερη έκφραση bax με καλύτερη πρόγνωση των ασθενών, οι οποίοι ήσαν ελεύθεροι συμπτωμάτων για τουλάχιστον 1 χρόνο, χωρίς φαρμακευτική αγωγή (Salakou S, et al, 2001).

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του bax σχετίσθηκε με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου. Αυτό ήταν λίγο πολύ αναμενόμενο αφού υψηλότερες τιμές του αποπτωτικού δείκτη σχετίσθηκαν με υψηλότερο διάστημα ελεύθερο νόσου.

Στην έρευνα αυτή διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα έκφρασης του p53 ήταν αυξημένη στα ΗΚΚ συμπαγούς τύπου και υψηλής βαθμίδος κακοήθειας (Edmondson III) ($p < 0.05$ και $p < 0.01$). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το ανθεκτικό σε διάφορα φάρμακα γονιδιακό προϊόν που αποτελεί την πρωτεΐνη Pgp ήταν σημαντικά αυξημένο σε περιπτώσεις ΗΚΚ που έλαβαν χημειοθεραπεία (Xiao E, et al, 2000), υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του p53 αυξάνει μετά την χημειοθεραπεία με εμφάνιση χημειοανθεκτικότητας. Το επίπεδο του p53 μπορεί να αποτελέσει σημαντικό καθοριστή της απάντησης του όγκου στη χημειοθεραπεία. Όγκοι με απουσία έκφρασης p53 μπορεί να ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία. Αντιστρόφως η χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική σε ΗΚΚ με έκφραση του p53 (Okumura H, et al, 2000).

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε επίσης ανάστροφη συσχέτιση μεταξύ του δείκτη αποπτωτικών σωματίων (ΔΑΣ) και της έκφρασης της πρωτεΐνης του p53. Η περισσότερη p53 πρωτεΐνη που μετρήθηκε ήταν ο μεταλλαγμένος τύπος. Ο ΔΑΣ εμφάνισε σε σημαντικό βαθμό θετική συσχέτιση με το μη μεταλλαγμένο p53 το οποίο επάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας την

προαποπτωτική πρωτεΐνη bax και αποδομώντας την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 (Sato S, et al, 1999).

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 σχετίσθηκε θετικά με την έκφραση του αντιγόνου Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Αυτό υποδηλώνει ότι η μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη μπορεί να επάγει την ανάπτυξη του ΗΚΚ. Μία προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι ή έκφραση του PCNA (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και της πρωτεΐνης p53 είχαν παράλληλη συσχέτιση, η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου p53 είχε ως αποτέλεσμα την "αθανασία" του όγκου, υψηλότερο ποσοστό υποτροπής της νόσου, επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά του όγκου και μικρότερη επιβίωση (Li JQ, et al, 1996). Σε μία άλλη μελέτη οι Kieser και συν έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη μορφή του p53 μπορεί να προσδώσει πλεονέκτημα στο βαθμό πολλαπλασιασμού του όγκου (Kieser A, et al, 1994). Οι Igarashi και συν έχουν αναφέρει στο παρελθόν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης του p53 μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη πρόβλεψης για το βαθμό πολλαπλασιασμού (Igarashi N, et al, 1999). Το μεταλλαγμένο p53 γονίδιο προσδίδει πλεονέκτημα στον πολλαπλασιασμό του όγκου όχι μόνο γιατί επιτρέπει τη «διαφυγή» από την απόπτωση αλλά επειδή οδηγεί και στη δημιουργία μικροπεριβάλλοντος πλούσιου σε μικρο-αγγεία (Matsuura T, et al, 2000). Από την άλλη πλευρά όμως, η έκφραση του μη μεταλλαγμένου p53 μπορεί να αναστέλλει την έκφραση του PCNA (Deb S, et al, 1992).

Το μη μεταλλαγμένο p53 αποτελεί θετικό μεταγραφικό ενεργοποιητή για το γονίδιο Bax και αρνητικό μεταγραφικό ενεργοποιητή για το γονίδιο bcl-2 στον άνθρωπο. Η ενεργοποίηση της οδού του p53 μπορεί να οδηγήσει σε

αποδόμηση του bcl-2 και επαγωγή του bax (Miyashita T, et al, 1994α, Miyashita T, et al, 1994β, Miyashita T, et al, 1995). Στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθη συσχέτιση της πρωτεΐνης p53 με την έκφραση του Bax ή την έκφραση του bcl-2. Όπως έχει αναφερθεί στο παρελθόν, το μεταλλαγμένο p53 στην πλειονότητα των περιπτώσεων μπορεί να αποδομήσει την έκφραση του bcl-2 και να επάγει την έκφραση του bax (Ioachim E, et al, 2000). Επιπλέον το bcl-2 και το p53 μπορεί να συνεργάζονται στη ρύθμιση των παθογενετικών οδών κατά τη διαδικασία της διήθησης και μετάστασης (Giatromanolaki A, et al, 1999).

Στη μελέτη μας βρήκαμε ότι η έκφραση του p53 ήταν χαμηλότερη στα καρκινώματα με μικροδοκιδώδη υφή σε σχέση με τα συμπαγή καρκινώματα. Οι Zhao και συν έχουν αναφέρει στο παρελθόν ότι η μετάλλαξη του p53 γονιδίου ποικίλει ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους και ότι η αναλογία των μεταλλάξεων ήταν 10,5% σε όγκους με δοκιδώδη τρόπο ανάπτυξης, 37,5% σε όγκους με ψευδοαδενικό τρόπο ανάπτυξης και 60.0% στα καρκινώματα με συμπαγή τρόπο ανάπτυξης ($P<0.05$) (Zhao P, et al, 1993). Μία άλλη προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι τα καρκινώματα που εμφανίζουν δοκιδώδη τρόπο ανάπτυξης αλλά περιέχουν και κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα είναι περισσότερο ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία σε σύγκριση με τα καρκινώματα που εμφανίζουν συμπαγή τρόπο ανάπτυξης και είναι πιο φτωχά διαφοροποιημένα (Xiao EH, et al, 2001). Επιπλέον οι Wang και συν έδειξαν ότι τα HKK που περιείχαν κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα ήταν περισσότερο ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία από τα φτωχά διαφοροποιημένα ή αδιαφοροποίητα HKK (Wang YP, et al, 1999). Από την άλλη πλευρά οι Yamashita και συν βρήκαν ότι τα περισσότερα HKK

ανταποκρίνονται καλώς στη χημειοθεραπεία (Yamashita Y, et al, 1995). Τα ευρήματα αυτά εισηγούνται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης του p53 μπορεί να επηρεάσει τη δράση της χημειοθεραπείας στα ΗΚΚ, εύρημα που απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Η έκφραση της πρωτεΐνης του p53 ήταν χαμηλότερη στα καρκινώματα grade I και II σε σχέση με τα καρκινώματα grade III. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι η έκφραση του p53 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Συμπερασματικά φαίνεται ότι η διαφορά στους ιστολογικούς τύπους και στο βαθμό κακοήθειας αντανάκλα τις διαφορές έκφρασης της πρωτεΐνης του p53 στα ΗΚΚ. Η έκφραση της πρωτεΐνης του p53 προάγει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών ηπατοκυττάρων σε περιπτώσεις ΗΚΚ και καταστέλλει την απόπτωση.

Συνοψίζοντας, αυτό που διαπιστώθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι ότι η αγγειακή διήθηση αποτελεί τον κυριότερο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών με ΗΚΚ. Τα καλά διαφοροποιημένα ΗΚΚ δεν συνοδεύονταν από αγγειακή διήθηση. Επίσης φάνηκε ότι η αγγειακή διήθηση σχετίζεται με την αναλογία αποπτωτικού /μιτωτικό δείκτη και ο μεγαλύτερος αποπτωτικός/μιτωτικό δείκτης σχετίζεται με καλύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση. Αυτό επιβεβαιώνεται με την υψηλότερη έκφραση της αποπτωτικής πρωτεΐνης bax στους όγκους που είχαν μορφολογικά χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με καλύτερη πρόγνωση. Η πρωτεΐνη αναστολέας της απόπτωσης bcl-2, δεν εκφράζεται ενώ εκφράζεται το mRNA, γεγονός που εισηγείται μετα-μεταφραστικό λάθος το οποίο δείχνει ότι το bcl-2 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν με ηπατεκτομή : βιολογικοί και θεραπευτικοί συσχετισμοί . Ο δυνητικός ρόλος της απόπτωσης.

Σκοπός: Αυτή η μελέτη ερεύνησε τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά 35 ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, μη ινοπεταλιώδους τύπου, που αφαιρέθηκαν με ηπατεκτομή από ίδιο αριθμό ασθενών, για θεραπευτικό σκοπό, και συσχέτισε αυτά τα ευρήματα με χαρακτηριστικά της διηθητικής ανάπτυξης των όγκων και το διάστημα ελεύθερο νόσου. Επιπρόσθετα διερευνήθηκαν η έκφραση του ογκογονιδίου bcl-2 (αναστολέας της απόπτωσης), του ογκογονιδίου bax (επαγωγέας της απόπτωσης) και του p53 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο).

Ασθενείς και Μέθοδοι: Η μελέτη περιέλαβε 35 παρασκευάσματα μερικών ηπατεκτομών από ισάριθμους ασθενείς. Σε αυτούς τους όγκους εκτιμήθηκαν διάφορα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά, διαβαθμίστηκαν και συσχετίστηκαν με το διάστημα ελεύθερο νόσου. Επιπρόσθετα, σε τομές παραφίνης εκτιμήθηκε η έκφραση του bcl-2 και του bax (ανοσοϊστοχημεία/mRNA in-situ υβριδισμός) και της πρωτεΐνης p53.

Αποτελέσματα: Τα περισσότερα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα ξεκινούν ως μικροί καλά διαφοροποιημένοι όγκοι που έχουν αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού σε σχέση με το περιβάλλον ήπαρ και προκαλούν νεοαγγειογένεση. Όμως σε αυτή τη φάση διατηρούν ένα σχεδόν φυσιολογικό αποπτωτικό/μιτωτικό δείκτη και σπάνια εμφανίζουν αγγειακή διήθηση. Καθώς οι όγκοι μεγαλώνουν, εμφανίζονται εστίες αποδιαφοροποίησης οι οποίες έχουν υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού και εμφανίζουν μεγαλύτερο

πλειομορφισμό από τις περιβάλλουσες καλύτερα διαφοροποιημένες περιοχές. Η αγγειακή διήθηση η οποία είναι ο ισχυρότερος προβλεπτικός παράγοντας υποτροπής της νόσου, σχετίζεται με το μέγεθος των όγκων, την ύπαρξη γιγαντοκυττάρων και νέκρωσης, τον επικρατούντα και το χειρότερο βαθμό διαφοροποίησης και τον αποπτωτικό/μιτωτικό δείκτη. Αν δεν υπάρχει αγγειακή διήθηση, το μέγεθος του όγκου ($p < 0.006$), ο αποπτωτικός /μιτωτικός δείκτης ($p < 0.03$) και ο αριθμός των όγκων ($p < 0.04$) ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το διάστημα ελεύθερο νόσου. Κανένας από τους 5 ασθενείς με όγκο που είχε αποπτωτικό/μιτωτικό δείκτη μεγαλύτερο από 6 δεν υποτροπίασε. Ο in-situ υβριδισμός ανέδειξε έκφραση του mRNA του bcl-2 σε 25 από τους 35 ασθενείς (70%) με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Επιπλέον το mRNA του bcl-2 ανιχνεύθηκε στα υπερπλαστικά χολαγγεία ανάμεσα στα ινώδη διαφράγματα στην περιφέρεια των όγκων. Η ανοσοϊστοχημική χρώση δεν ανέδειξε έκφραση της πρωτεΐνης του bcl-2 στα καρκινικά κύτταρα ενώ τα υπερπλαστικά χολαγγεία των ινωδών διαφραγμάτων στην περιφέρεια των όγκων και τα ενδοογκικά λεμφοκύτταρα έδειξαν έντονη κυτταροπλασματική (περιπυρηνική) χρώση. Δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του mRNA του bcl-2 και του τρόπου ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του σταδίου του όγκου. Αντίθετα, το bax mRNA και η πρωτεΐνη bax έδειξαν παρόμοιο τρόπο έκφρασης και ανευρέθηκαν μέσα στα ηπατοκύτταρα και στα χολαγγεία. Η έκφραση του bax mRNA ήταν υψηλότερη σε όγκους καλής διαφοροποίησης σε σύγκριση με καρκινώματα βαθμού κακοήθειας II ή III. Η έκφραση του p53 ήταν μικρότερη στον μικροδοκιδώδη τύπο από το συμπαγή τύπο και ήταν υψηλότερη σε

πτωχά διαφοροποιημένους όγκους από τους καλά ή μετρίως διαφοροποιημένους όγκους.

Συμπεράσματα: Η ηπατική καρκινογένεση στον άνθρωπο είναι μια πολυπαραγοντική και πολυεστιακή διαδικασία. Όπως και σε μελέτες με πειραματόζωα η επιθετική βιολογική συμπεριφορά (αγγειακή διήθηση και υποτροπή) σχετίζεται σημαντικά με εκσεσημασμένες διαταραχές του αποπτωτικού/μιτωτικού δείκτη και με αρχιτεκτονικές και κυτταρολογικές αλλοιώσεις που εισηγούνται την προοδευτική συσσώρευση πολλαπλών γενετικών ανωμαλιών. Η αγγειακή διήθηση σχετίζεται με τον αποπτωτικό/μιτωτικό δείκτη και υψηλότερος αποπτωτικός/μιτωτικός δείκτης σχετίζεται με καλύτερο ελεύθερο νόσου διάστημα. Αυτό υποστηρίζεται και από το ότι η έκφραση της πρωτεΐνης bax ήταν υψηλότερη σε όγκους με καλή διαφοροποίηση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη bcl-2 δεν εκφράζεται ενώ εκφράζεται το mRNA, το οποίο εισηγείται μετα-μεταφραστικό λάθος και δείχνει ότι το bcl-2 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

IV. SUMMARY

Hepatocellular carcinomas in patients treated with hepatectomy: biologic and therapeutic implications. The potential role of apoptosis.

Aim: This study investigates the gross and pathologic features of 35 nonfibrolamellar hepatocellular carcinomas (HCCs) removed at the time of hepatectomy from equal number of patients for therapeutic reasons and correlated these with features of invasive growth and disease-free survival. In addition the expression of bcl-2 oncogene (apoptosis inhibitor) and bax oncogene (apoptosis promoter) and p53 (tumor suppressor gene) were investigated.

Patients and Methods: The study included 35 partial hepatectomy specimens removed from equal number of patients. In these tumors several macroscopic and microscopic features were assessed, graded and correlated with disease free survival. In addition, in paraffin sections the expression of bcl-2 and bax (protein immunohistochemistry / mRNA-in situ hybridization) and p53 protein were assessed.

Results: Most HCCs begin as small well-differentiated tumors that have an increased proliferation rate compared with the surrounding liver and induce neovascularization. However, at this stage, they maintain a near-normal apoptosis/mitosis ratio and uncommonly show vascular invasion. As tumors enlarge, foci of dedifferentiation appear within the neoplastic nodules, which have a higher proliferation rate and show more pleomorphism than surrounding better-differentiated areas. Vascular invasion, which is the strongest predictor of disease recurrence, correlates significantly with tumor size, tumor giant cells and necrosis, the predominant and worst degree of

differentiation, and the apoptosis/mitosis ratio. In the absence of macroscopic or large vessel invasion, largest tumor size ($p < 0.006$), apoptosis/mitosis ratio ($p < 0.03$), and number of tumors ($p < 0.04$) were independent predictors of disease-free survival. None of the 5 patients with tumors having an apoptosis/mitosis ratio greater than 6 had recurrence. In situ hybridization, revealed bcl-2 mRNA expression in 25 out of 35 (70%) HCCs. In addition, bcl-2 mRNA was detected in hyperplastic cholangioles within fibrous septae in the periphery of the tumors. Immunohistochemical staining failed to reveal any bcl-2 protein expression in tumor cells of HCC, whereas hyperplastic cholangioles of the fibrous septae in the periphery of the tumors, and intratumoral lymphocytes displayed a strong-positive cytoplasmic (perinuclear) stain. No significant correlations were recorded between bcl-2 mRNA expression and tumor histological pattern and stage. In the contrary, bax mRNA and protein displayed somehow a similar pattern of expression. They were detected within hepatocytes, bile duct epithelial and cholangiolar epithelial cells. Higher bax mRNA expression was noted in grade I carcinomas as compared to grade II or III carcinomas. Expression of p53 protein was less in the microtrabecular type than in the solid type and it was higher in poorly differentiated tumors than in those that were well or moderately well differentiated.

Conclusions: Liver carcinogenesis in humans is a multistep and multifocal process. As in experimental animal studies, aggressive biologic behavior (vascular invasion and recurrence) correlates significantly with profound alterations in the apoptosis/mitosis ratio and with architectural and cytologic alterations that suggest a progressive accumulation of multiple genetic

abnormalities. Vascular invasion correlates with the apoptosis/mitosis ratio and a higher apoptosis/mitosis ratio correlates with improved disease free survival. This is supported by the higher expression of bax protein in well differentiated tumors. In addition, bcl-2 gene is frequently present but its protein product is absent. This suggests a post-translational mechanism of bcl-2 protein degradation, indicating that bcl-2 does not play a substantial role in the progress of hepatocellular carcinoma.

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. *Hepatology* 2000;32:1224–1229.
2. Atiq OT, Kemeny N, Niedzwiecki D, Botet J. Treatment of unresectable primary liver cancer with intrahepatic fluorodeoxyuridine and mitomycin C through an implantable pump. *Cancer* 1992;69:920-924.
3. Bailey EA, Iyer RS, Stone MP, et al: Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1535–1539.
4. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S and Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990;50:7717-7722.
5. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, et al. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992;16:132–137.
6. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129–1133.
7. Berman E, Adams M, Duigou-Osterndorf R, et al. Effect of tamoxifen on cell lines displaying the multidrug-resistant phenotype. *Blood* 1991;77(4):818-825.

8. Bhargava V, Kell DL, van de Rijn M, Warnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994;145:535-540.
9. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992;359:552-554.
10. Boix L, Bruix J, Castells A, et al. Sex hormone receptors in hepatocellular carcinoma: is there a rationale for hormonal treatment? *J Hepatol* 1993; 17: 187–191.
11. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost-effectiveness analysis. *Gut* 2001;48:251–259.
12. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 1995;146:20-26.
13. Bruix J, Castells A, Bosch J, et al. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996; 111:1018–1022.
14. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001;35:421–430.
15. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35:519–524.

16. Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, et al. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology* 2003;38:1034–1042.
17. Buscarini L, Buscarini E, Di Stasi M, et al. Percutaneous radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma: long-term results. *Eur Radiol* 2001;11:914–921.
18. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997;336:1855–1859.
19. Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M, Gaulard P, Zafrani ES. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* 1994;144:460-465.
20. Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999; 31:133–141.
21. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al: Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145–1156.
22. Choi D, Kim SH, Lim JH, et al. Detection of hepatocellular carcinoma: combined T2-weighted and dynamic gadolinium enhanced MRI versus combined CT during arterial portography and CT hepatic arteriography. *J Comput Assist Tomogr* 2001;25:777–785.

23. Chung YH, Song IH, Song BC, et al. Combined therapy consisting of intraarterial cisplatin infusion and systemic interferon-alpha for hepatocellular carcinoma patients with major portal vein thrombosis or distant metastasis. *Cancer* 2000;88:1986–1991.
24. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7439-7443.
25. CLIP. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology* 2000; 31:840–845.
26. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
27. Colombel M, Symmans F, Gil S et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory prostate cancers. *Am J Pathol* 1993;143:390-400.
28. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325:675–680.
29. Colombo M. Risk groups and preventive strategies. In: Berr F, Bruix J, Hauss J, Wands J, Wittekind Ch, eds. *Malignant liver tumors: basic concepts and clinical management*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers BV and Falk Foundation, 2003:67–74.
30. Cordon-Cardo C, Cote RJ, Sauter G. Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000;205:82-93.

31. Craig JR, Peters RL, Edmondson HA. Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. Washington, Armed Force Institute of Pathology (A.F.I.P.) Atlas, 1988.
32. Cronin D, Millis M, Siegler M. Transplantation of liver grafts from living donors into adults: too much, too soon. *N Engl J Med* 2001;344:1633–1637.
33. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:88-101.
34. Deb S, Jackson CT, Subler MA, Martin DW. Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol* 1992;66:6164-6170
35. Demetris AJ, Kakizoe S, Oguma S. Pathology of liver transplantation. In: Williams JW, ed. *Hepatic Transplantation*, Philadelphia: Saunders 1990; 60-113
36. Demetris AJ, Tsamandas AC, Delaney CP, Abu-Elmagd K, Fung JJ, Starzl TE. Pathology of Liver Transplantation in *Transplantation of the Liver*, eds RW Busuttil and GB Klintmalm, WB Saunders Co, New York, 1996;p681-723.
37. El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27:1554-1562.

38. Factor VM, Laskowska D, Jensen MR, Voitach JT, Popescu NC, Thorgeirsson SS. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2196-2201.
39. Farber E. Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell cancer. *Dig Dis Sci* 1991;36:973-978.
40. Farrow GM. Pathology of carcinoma in situ of the urinary bladder and related lesions. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16I: 39-43
41. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463–472.
42. Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
43. Fiorentino M, D' Errico A, Altimari A, Barozzi C, Grigioni WF. High levels of bcl-2 messenger RNA detected by in situ hybridization in human hepatocellular and cholangiocellular carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:189-194.
44. Fogt F, Vortmeyer AO, Stolte M, Mueller E, Mueller J, Noffsinger A, Poremba C, et al. Loss of heterozygosity of the von Hippel Lindau gene locus in polypoid dysplasia but not flat dysplasia in ulcerative colitis or sporadic adenomas. *Hum Pathol* 1998;29:961-964.
45. Fong Y, Sun RL, Jarnagin W, Blumgart LH. An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center. *Ann Surg* 1999; 229:790–99.

46. Friedlander P, Haupt Y, Prives C, et al. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 1996;16:4961-4971.
47. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;86:1421-1430.
48. Grigioni WF, Garbisa S, D'Errico A, Baccarini P, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Mancini AM. Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens. *Am J Pathol* 1991;138: 647-654.
49. Grimaldi C, Bleiberg H, Gay F, et al. Evaluation of antiandrogen therapy in unresectable hepatocellular carcinoma: results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer multicentric double-blind trial. *J Clin Oncol* 1998;16:411–417.
50. Hamelin R, Layrent-Puig P, Olschwang S, Jegou N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106:42-48.
51. Harigai M, Miyashita T, Hanada T, Reed JC. A cis-acting element in the Bcl-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene* 1996;12:1369-1374.
52. Helpap B, Kollermann J. [Revisions in the WHO histological classification of urothelial bladder tumors and flat urothelial lesions.] *Pathologe* 2000; 21:211-217.

53. Heintges T, Wands JR: Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology* 1997;26:521–526.
54. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336.
55. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-6965.
56. Hohne M, Schaefer S, Seifer M, et al: Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *Embo J* 1990;9:1137–1145.
57. Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B-virus associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1992;16:1327-1333.
58. Huang CC, Wu MC, Xu GW, et al. Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:262-264.
59. Huang SN, Chisari FV: Strong, sustained hepatocellular proliferation precedes hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic mice. *Hepatology* 1995;21:620–626.
60. Hui AM, Makuuchi M. Molecular basis of multistep hepatocarcinogenesis: genetic and epigenetic events. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 737-742.
61. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:22-36.

62. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 2000;462:311-322.
63. Igarashi N, Takahashi M, Ohkubo H, Omata K, Iida R, Fujimoto S. Predictive value of Ki-67, p53 protein, and DNA content in the diagnosis of gastric carcinoma. *Cancer* 1999;86:1449-1454.
64. Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S. Molecular genetics for clinical management of colorectal cancer. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994;73:1324-1331.
65. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al: A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993;18:47–53.
66. Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, et al. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor—a prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 2000;32:228–232.
67. Ioachim E, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000;20:4221-4226.
68. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995 Jun;22:696-699.

69. Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, et al. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81: 747-751.
70. Iwatsuki S, Dvorchik I, Marsh JW, Madariaga JR, Carr B, Fung JJ, Starzl TE. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a proposal for a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg* 2000;191:389-394.
71. Jiang W, Lu Z, He Y, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:395-399.
72. Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Baigrie RJ, Heryet A, Lane DP and Harris AL. p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 1993;142:87-93.
73. Kastrinakis WV, Ramchurren N, Rieger KM, Hess DT, Loda M, Steele G, Summerhayes IC. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995;11:647-652.
74. Ker CG, Chen HY, Juan CC, Lo HW, Shen YY, Chen JS, Lee KT, Sheen PC. Role of angiogenesis in hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:646-650.
75. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989;261:3099-3103.

76. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.
77. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9:963-969.
78. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T, Sakuraba H, Fukunari H, Iwama T, Miyaki M. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52:3965-3971.
79. Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kakusui M, Katagishi T, Okanoue T, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry. *Liver* 1998;18:14-19.
80. Kobayashi S, Hayashi H, Itoh Y, et al: Detection of minus-strand hepatitis C virus RNA in tumor tissues of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1994;73:48–52.
81. Koike K, Moriya K, Iino S, et al: High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810–819.
82. Kojiro M, Nakashima O. Histopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with special reference to small early stage tumors. *Semin Liver Dis* 1999;19:287-296.

83. Kojiro M. The evolution of pathologic features of hepatocellular carcinoma. In: Tabor E, ed. Viruses and liver cancer: perspectives in medical virology. Amsterdam: Elsevier Science, 2002:113–22.
84. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879-886.
85. Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of bcl-2 and bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 1997;75:367–373.
86. Kountouras J, Boura P, Karolides A, et al. Recombinant $\alpha 2$ interferon (α -IFN) with chemo-hormonal therapy in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatogastroenterology* 1995;42:31–36.
87. Kouroumalis E, Skordilis P, Thermos K, Vasilaki A, Moschandrea J, Manousos ON. Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study. *Gut* 1998; 42:442–447.
88. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993;53:4701-4714.
89. Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bcl-x, mcl-1, and bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* 1997; 150:805–14.
90. Lai CL, Wu PC, Chan GC, et al. Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. *Cancer* 1988;62:479–483.

91. Lai CL, Lau JY, Wu PC, et al. Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993;17:389–394.
92. Lau WY, Leung TW, Ho SK, et al. Adjuvant intra-arterial iodine-131-labelled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective randomised trial. *Lancet* 1999; 353:797–801.
93. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, Remvikos Y, Asselain B, Melot T, Validire P, Muleris M, Girodet J, Salmon RJ. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992;102:1136-1141.
94. Lee GH. Correlation between Bcl-2 expression and histopathology in diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular tumors. *Am J Pathol* 1997;151:957-961.
95. Lee RG. Chronic hepatitis. In : Lee RG, editor. *Diagnostic liver pathology*. 1st ed. St. Louis, MO: Mosby; 1994 p. 57-59.
96. Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, et al. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized controlled trial of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2003;228:235–240.
97. Leung TW, Tang AM, Zee B, et al. Construction of the Chinese University prognostic index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer* 2002;94:1760–1769.

98. Li JQ, Zhang CQ, Feng KT. PCNA,p53 protein and prognosis in primary liver cancer. *China Natl J New Gastroenterol* 1996; 2: 220-222
99. Livraghi T, Bolondi L, Buscarini L, et al. No treatment, resection and ethanol injection in hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of survival in 391 patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1995;22:522–526. α
100. Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995;197:101–108. β
101. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999;29:62–67. α
102. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30:1434–1440. β
103. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329–338. γ
104. Llovet JM, Sala M, Castells L, et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:54–58.
105. Llovet JM, Real MI, Montana X, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359:1734–1739.

106. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429–442.
107. Lohmann CM, League AA, Clark WS, et al. Bcl-2: Bax and Bcl-2:Bcl-x ratios by image cytometric quantitation of immunohistochemical expression in ovarian carcinoma: correlation with prognosis. *Cytometry* 2000;42:61–66.
108. Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993;169:431-437.
109. Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, et al. Surgery for small liver cancers. *Semin Surg Oncol* 1993;9:298–304.
110. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358: 958–965.
111. Marsh JW, Dvorchik I, Subotin M, Balan V, Rakela J, Popechitelev EP, Subbotin V, et al. The prediction of risk of recurrence and time to recurrence of hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation: a pilot study. *Hepatology* 1997;26:444-450.
112. Marx D, Binder C, Meden H, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997; 17:2233–2240.
113. Mathurin P, Rixe O, Carbonell N, et al. Review article: overview of medical treatments in unresectable hepatocellular carcinoma—an impossible meta-analysis? *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:111-126.

114. Matsubara K, Tokino T: Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol Biol Med* 1990;7:243–260.
115. Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, Nishisaka T, Sakatani T, Ito H. Preoperative treatment with tegafur suppositories enhances apoptosis and reduces the intratumoral microvessel density of human colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:1007-1015.
116. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–699.
117. Mion F, Grozel L, Boillot O, Paliard P, Berger F. Adult cirrhotic liver explants: precancerous lesions and undetected small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1996;111:1587–1592.
118. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, et al. Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994;54:3131-3135. α
119. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805. β
120. Miyashita T, Reed J. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-299.
121. Mommers EC, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijer CJ, Baak JP. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1999;58:163-169.

122. Mor E, Kasper RT, Sheiner P, Schwartz M. Treatment of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis in the era of liver transplantation. *Ann Intern Med* 1998;129:643-653.
123. Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21: 1021-1030.
124. Mulier S, Mulier P, Ni Y, et al. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg* 2002;89:1206–1222.
125. Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T: Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:5520–5525.
126. Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT et al. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polypropenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1996;334: 1561–1567.
127. Nagasue N, Uchida M, Makino Y, et al. Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1993;105:488–494.
128. Nakanuma Y, Terada T, Terasaki S, Ueda K, Nonomura A, Kawahara E, Matsui O. Atypical adenomatous hyperplasia in liver cirrhosis: low-grade hepatocellular carcinoma or borderline lesion? *Histopathology* 1990; 17:27-35.
129. Nerenstone SR, Ihde DC, Friedman MA. Clinical trials in primary hepatocellular carcinoma: current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 1988;15:1-31.

130. Ng IO. Prognostic significance of pathological and biological factors in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:666-670.
131. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, et al: Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985;313:1256–1262.
132. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, et al: Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:368–372.
133. Nolte M, Werner M, Nasarek A, Bektas H, von Wasielewski R, Klempnauer J, Georgii A. Expression of proliferation associated antigens and detection of numerical chromosome aberrations in primary human liver tumours: relevance to tumour characteristics and prognosis. *J Clin Pathol* 1998;51:47-51.
134. Oda T, Tsuda H, Scarpa A, et al: p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992;52:6358–6364.
135. Offerhaus GJ, de Feyter EP, Cornelisse CJ, Tersmette KWF, Floyd J, Kern SE, Vogelstein B, Hamilton SR. The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1992;102:1612-1619.
136. Okada S. Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:323–328.
137. Okuda K, Nakashima T, Sakamoto K, et al: Hepatocellular carcinoma arising in noncirrhotic and highly cirrhotic livers: a comparative study of histopathology and frequency of hepatitis B markers. *Cancer* 1982;49:450–455.

138. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:225-237.
139. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment: study of 850 patients. *Cancer* 1985;56:918–928.
140. Okumura H, Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Sakita H, Nakano S, Kusano C, Baba M, Takao S, Furukawa T, Akiyama SI, Aikou T. Apoptosis and cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma treated by chemotherapy. *Cancer Lett* 2000;158:211-216.
141. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
142. Onodera J, Nakamura S, Nagano I, Tobita M, Yoshioka M, Takeda A, Oouschi M, Itoyama Y. Upregulation of bcl-2 protein in the myasthenic thymus. *Ann Neurol* 1996;39:521-528.
143. Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S, Yoshida Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1993;53:382-387.
144. Ozturk M: p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338(8779):1356–1359.
145. Ozturk M. Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:235-242.
146. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153–56.

147. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-1741.
148. Penault-Llorca F, Bouabdallah R, Devilard E, Charton-Bain MC, Hassoun J, Birg F, Xerri L. Analysis of bax expression in human tissues using the anti-bax, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections. *Path Res Pract* 1998;194:457-464.
149. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 1998;27:1030-1038.
150. Pezzella F, Turley H, Kuzu I et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690-694.
151. Polak JM and Van Norden S: An introduction to immunohistochemistry: Current techniques and problems. Oxford University Press-Royal Microscopic Society, New York, 1984 pp;44-49.
152. Poon RT, Fan ST, Tsang FH, Wong J. Locoregional therapies for hepatocellular carcinoma: a critical review from the surgeon's perspective. *Ann Surg* 2002; 235: 466–486.
153. Pricolo VE, Finkelstein SD, Wu TT, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, Bland KI. Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of colon. *Am J Surg* 1996;171:41-46.
154. Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al: A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:3–10.

155. Ravazoula P, Tsamandas AC, Kardamakis D, Gogos C, Karatza C, Thomopoulos K, Tepetes K, Kourelis T, Petsas T, Bonikos DS, Karavias DD. The potential role of bcl-2 mRNA and protein expression in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2002;22:1799-1805.
156. Ray RB, Meyer K, Ray R: Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996;226:176–182.
157. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
158. Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blelloch RH, Puthenveetil JA, Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol* 1996;23:571-584.
159. Ringe B, Pichlmayr R, Wittekind C, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World J Surg* 1991;15:270–285.
160. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, et al: Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1992;339:943–946.
161. Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, et al. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *AJR Am J Roentgenol* 1996;167:759–768.
162. Saito Y, Matsuzaki Y, Doi M, Sugitani T, Chiba T, Abei M, Shoda J, Tanaka N. Multiple regression analysis for assessing the growth of small hepatocellular carcinoma: the MIB-1 labeling index is the most effective parameter. *J Gastroenterol* 1998;33:229-235.

163. Sakamoto M, Hirohashi S. Natural history and prognosis of adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma: multi-institutional analysis of 53 nodules followed up for more than 6 months and 141 patients with single early hepatocellular carcinoma treated by surgical resection or percutaneous ethanol injection. *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:604–608.
164. Salakou S, Tsamandas AC, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Dougenis D. The potential role of bcl-2, bax and Ki67 expression in thymus of patients with myasthenia gravis, and their correlation with clinicopathologic parameters. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:712-721.
165. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos DS, Papapetropoulos T. Bcl-2, bax and p53 expression in thymus of patients with myasthenia gravis, and their correlation with clinicopathologic parameters. *J Neurol Sci* 2002;199:S96.
166. Sangro B, Qian C, Schmitz V, Prieto J. Gene therapy of hepatocellular carcinoma and gastrointestinal tumors. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:6-12.
167. Sato S, Kigawa J, Minagawa Y, Okada M, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Terakawa N. Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1999;86:1307-1313.
168. Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Bursch W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res* 1990; 50: 5127-5135.

169. Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, Sung M. Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 2002;3:593–603.
170. Scopa CD, Vagianos C, Kardamakis D, Kourelis TG, Kalofonos HP, Tsamandas AC. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:329-334.
171. Scopa CD, Tsamandas AC, Zolota V, Kalofonos HP, Batistatou A, Vagianos C. Potential role of bcl-2 and ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma: a clinicopathologic study. *Dig Dis Sci* 2003;48:1990-1997.
172. Sheu JC. Molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S309-S313.
173. Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, Pagliaro L. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systemic review of randomised controlled trials. *Ann Oncol* 1997;8:117-136.
174. Sirica AE. Multistage carcinogenesis. In: Sirica AE , ed. *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996;283-320.
175. Soini Y, Virkajarvi N, Raunio H, Paakko P. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma: a potential marker of prognosis. *J Clin Pathol* 1996;49:470-473.
176. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267:1445-1449.

177. Sun Z, Lu P, Gail MH, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable aflatoxin metabolite M1. *Hepatology* 1999;30:379–383.
178. Tai YT, Lee S, Niloff E, et al. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2583–2590.
179. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1990; 336:1150–1153.
180. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with high rate of surgical cure. *Hepatology* 1998;28:1241–1246.
181. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:802–807.
182. Tanaka Y, Hanada K, Mizokami M, et al. A comparison of the molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:15584–15589.
183. Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, Miura S. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance. *Hepatology* 1997;26:1216-1223.
184. Tannapfel A, Geissler F, Kockerling F, Katalinic A, Hauss J, Wittekind C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 1999;187:439-445.

185. Tateyama H, Eimoto T, Tada T, Inagaki H, Hattori H, Takino H.
Apoptosis, bcl-2 protein and fas antigen in thymic epithelial tumors. *Mod Pathol* 1997;10:983-991.
186. Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of
apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile-duct
development. *Am J Pathol* 1995;146:67-74.
187. Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, et al: p53 gene abnormalities are
closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of
hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54:231–235.
188. The Liver Cancer Study Group of Japan. Predictive factors for long term
prognosis after partial hepatectomy for patients with hepatocellular
carcinoma in Japan. *Cancer* 1994;74:2272–2280.
189. Thorgeirsson SS, Grisham J. Molecular pathogenesis of human
hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002;31:339–346.
190. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* 1993;142:1331-1333.
191. Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation
of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* 2002;346:
1074–1082.
192. Tsamandas AC, Gogos C, Kourelis T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas
T, Karavias D. Oval hepatocytes express alpha-fetoprotein and correlate
with disease severity and presence of hepatocellular carcinoma in cases
of chronic hepatitis type B or C. *Hepatology* 2001;34:392A.

193. Tsamandas AC, Thomopoulos K, Gogos C, Tepetes K, Kourelis T, Ravazoula P, Petsas T, Bonikos DS, Karatza C, Karavias DD. Expression of bcl-2 oncoprotein in cases of acute and chronic viral hepatitis type B and type C. A clinicopathologic study. *Dig Dis Sci* 2002;47:1618-1624.
194. Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonikos DS, Gogos C. Potential role of bcl-2 and bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2003;16:1273-1288.
195. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al: Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988;95:1664–1666.
196. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al: Low incidence of point mutation of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in human hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:196–199.
197. Tzoracoleftherakis EE, Spiliotis JD, Kyriakopoulou T, Kakkos SK. Intra arterial versus systemic chemotherapy for non-operable hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1122-1125.
198. Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, et al: Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862–866.
199. Wang Y, Zhang J, Gao Y. Therapeutic efficacy of transcatheter arterial embolization of primary hepatocellular carcinoma: discrepancy in different histopathologic subtypes. *Chin Med J (Engl)* 1999;112:264-268.

200. Witty JP, Jensen RA, Johnson AL. Expression and localization of bcl-2 related proteins in human ovarian cancers. *Anticancer Res* 1998; 18:1223–1230.
201. Xiao E, Hu G, Liu P, Hu D, Liu S, Hao C. The effect of different interventional treatment on P-glycoprotein in different histopathological types and grades of primary hepatocellular carcinoma. *J Tongji Med Univ* 2000;20:231-234.
202. Xiao EH, Hu GD, Li JQ, Zhang YQ, Chen MS, Guo YP, Lin XG, Li SP, Shi M. The effect of transcatheter arterial chemoembolization on the different histopathological types of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gandanwaikexue Zazhi* 2001;7:411-414.
203. Yamamoto K, Takenaka K, Kajiyama K, Shimada M, Shirabe K, Taketomi A, Maeda T, et al. Cell proliferation and cell loss in nodule-in-nodule hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:813-819.
204. Yamashita Y, Matsukawa T, Arakawa A, Hatanaka Y, Urata J, Takahashi M. US-guided liver biopsy: Predicting the effect of interventional treatment of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 1995;196:799-804.
205. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
206. Yao FY, Bass NM, Nikolai B, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: analysis of survival according to the intention-to-treat principle and dropout from the waiting list. *Liver Transpl* 2002;8:873–883.

207. Yuen MF, Poon RT, Lai CL, et al. A randomized placebo-controlled study of long-acting octeotride for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;36:687–691.
208. Zhao M, Zhang NX, Economou M, Blaha I, Laissue JA, Zimmermann A. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. *Histopathology* 1994;25:237-245.
209. Zhao P, Yang GH, Mao X. A molecular pathological study of p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1993;22:16-18.
210. Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, et al. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001;91:1479–1486.
211. Zolota V, Gerokosta A, Melachrinou M, Kominea A, Aletra C, Scopa CD. Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in in situ ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res* 1999;19:3269-3274.
212. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991;78:1062-1068.