

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

# Σύγχρονες απόψεις στη διάγνωση και στη θεραπεία του χολαγγειοκαρκινώματος

Το χολαγγειοκαρκίνωμα είναι επιθετικός όγκος με πτωχή επιβίωση. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, περιλαμβανομένων της πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας, των παρασιτώσεων και των ηπατολιθιάσεων, θεωρούνται προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η αιτία της νόσου είναι άγνωστη. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη Μοριακή Γενετική τονίζουν τη σημασία των γενετικών βλαβών στην παθογένεια της νόσου. Η διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος είναι δύσκολη, κυρίως για λόγους που αφορούν στην προσπέλαση του όγκου για τη λήψη βιοψιών. Η διαδερμική βιοψία, υπό την καθοδήγηση απεικονιστικής εξέτασης, είναι δυνατή μόνο για τα ενδοηπατικά χολαγγειοκαρκινώματα, τα οποία αποτελούν το 10% του συνόλου. Η κυτταρολογική εξέταση σε υλικό που λαμβάνεται με βούρτσισμα κατά την παλίνδρομη ενδοσκόπηση του χοληδόχου πόρου, παρά την πολύ υψηλή ειδικότητα (έως 100%), έχει χαμηλή ευαισθησία (περίπου 30%). Η θεραπεία του χολαγγειοκαρκινώματος αποτελεί πρόκληση, δεδομένου ότι η νόσος συνήθως διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο όταν η ριζική χειρουργική θεραπεία με εκτομή ή μεταμόσχευση του ήπατος δεν είναι δυνατή, οπότε και η πρόγνωση των ασθενών είναι κακή. Σκοπός της παρούσας ανασκόπησης είναι η παρουσίαση των σύγχρονων εξελίξεων των διαγνωστικών μεθόδων του χολαγγειοκαρκινώματος, από την κυτταρολογική εξέταση έως τις νεότερες τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, και ειδικότερα το φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) και την ψηφιακή ανάλυση της εικόνας (digital image analysis, DIA), καθώς και η περιγραφή της σύγχρονης θεραπείας, όποτε αυτή είναι δυνατή.

### 1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το χολαγγειοκαρκίνωμα αποτελεί παγκόσμια το 3% των καρκίνων του γαστρεντερικού συστήματος και είναι ο δεύτερος σε συχνότητα πρωτοπαθής όγκος του ήπατος μετά από τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο.<sup>1</sup> Η νόσος προσβάλλει ασθενείς με μέση ηλικία τα 70 έτη και είναι συχνότερη στους άνδρες.<sup>2</sup> Μολονότι πριν από μερικά χρόνια το χολαγγειοκαρκίνωμα αποτελούσε σπάνιο όγκο που προσέβαλε συνήθως τους ηλικιωμένους, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία αύξηση της επίπτωσής του<sup>3,4</sup> και η νόσος προσβάλλει όλο και νεότερες ηλικίες. Έτσι, ο πιο νέος ασθενής που έχει αναφερθεί τελευταία στη βιβλιογραφία ήταν μόλις 29 ετών και δεν είχε κάποιον προδιαθεσικό παράγοντα.<sup>5</sup> Στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρθηκε αύξηση της επίπτωσης μόνο του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος κατά 165% στη μελέτη που διενεργήθηκε την περίοδο 1975–1999, ενώ η

μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε μετά το 1985.<sup>6</sup> Τμήμα της αύξησης της επίπτωσης του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος μπορεί να οφείλεται σε τροποποίηση της ταξινόμησής του. Τα χολαγγειοκαρκινώματα, ανάλογα με την εντόπιση, κατηγοριοποιούνται από τη διεθνή ογκολογική ταξινόμηση των νόσων (International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O) ως ενδοηπατικά ή εξωηπατικά. Αν και τα χολαγγειοκαρκινώματα των πυλών του ήπατος (όγκοι Klatskin) είναι εξωηπατικοί όγκοι, η δεύτερη έκδοση του συστήματος κατάταξης των νοσημάτων (International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O-2) ανέθεσε έναν κωδικό στην ιστολογία του Klatskin 8162/3, ο οποίος διασταυρωνόταν με τον αντίστοιχο κωδικό του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος. Πρόσφατες μελέτες στις Ηνωμένες Πολιτείες, που περιελάμβαναν αυτόν τον κωδικό (8162/3, Klatskin), ανέφεραν αυξανόμενη συχνότητα του ενδοηπατικού και μείωση της επίπτωσης του

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2012, 29(3):279–289  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2012, 29(3):279–289

Λ. Βασιλιεβα,<sup>1</sup>  
Σ.Ι. Παπαδημητρίου,<sup>2</sup>  
Σ.Π. Ντουράκης<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο», Αθήνα  
<sup>2</sup>Μονάδα Μοριακής Κυτταρογενετικής, Αιματολογικό Εργαστήριο, Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Γ. Γεννηματάς», Αθήνα

Current trends in the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Θεραπεία  
Φθορίζων *in situ* υβριδισμός  
Χολαγγειοκαρκίνωμα  
Ψηφιακή ανάλυση εικόνας

Υποβλήθηκε 1.10.2011  
Εγκρίθηκε 11.10.2011

εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος. Κατά τη διάρκεια των ετών 1992–2000, όταν χρησιμοποιήθηκε ο κωδικός αυτός, 91% (246 από 269) των χολαγγειοκαρκινωμάτων των πυλών του ήπατος είχαν κωδικοποιηθεί ως ενδοηπατικά χολαγγειοκαρκινώματα, με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση της επίπτωσης του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος κατά 13% και υποτίμηση των χολαγγειοκαρκινωμάτων εξωηπατικής επίπτωσης κατά 15%.<sup>7</sup>

## 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το 90% των χολαγγειοκαρκινωμάτων είναι αδενοκαρκινώματα.<sup>8</sup> Ανάλογα με την εντόπιση, το χολαγγειοκαρκίνωμα διακρίνεται σε ενδοηπατικό (5–10%) και εξωηπατικό. Το εξωηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα διακρίνεται σε όγκους των πυλών του ήπατος –όγκοι του Klatskin– (ποσοστό 60–70%) και του τελικού άκρου του χοληδόχου πόρου (20–30%).<sup>9</sup> Οι όγκοι των πυλών του ήπατος αφορούν στο διχασμό του κοινού ηπατικού πόρου.<sup>10</sup> Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά τους Bismuth et al,<sup>11</sup> οι όγκοι των πυλών του ήπατος διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες. Ο τύπος I αφορά μόνο στον κοινό ηπατικό πόρο, όπου ο όγκος είναι εντοπισμένος σε απόσταση τουλάχιστον 2 cm από τη συμβολή του δεξιού και του αριστερού ηπατικού πόρου, ενώ ο τύπος II προσβάλλει και τη συμβολή. Ο τύπος III προσβάλλει είτε το δεξιό είτε τον αριστερό ηπατικό πόρο, ενώ ο τύπος IV είτε επεκτείνεται και στους δύο πόρους είτε ο όγκος έχει πολυεστιακή εντόπιση.

## 3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Μείζονες προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη του χολαγγειοκαρκινώματος θεωρούνται η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα,<sup>12</sup> οι παρασιτώσεις των χολαγγείων (*Opisthorchis viverrini*,<sup>13</sup> *Clonorchis sinensis*<sup>14</sup>), η ινοπολυκυστική νόσος του ήπατος (νόσος Caroli, συγγενής ηπατική ίνωση και κύστες του χοληδόχου πόρου), οι ηπατολιθιάσεις<sup>15</sup> και τα χημικά καρκινογόνα (thorotrast,<sup>16</sup> διοξίνες,<sup>17</sup> νιτροσαμίνες, οινόπνευμα και κάπνισμα).

Οι ελάσσονες προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη χολαγγειοκαρκινώματος περιλαμβάνουν την ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ),<sup>18</sup> τις λοιμώξεις από τους ιούς της ηπατίτιδας Β (hepatitis B virus, HBV) και C (hepatitis C virus, HCV),<sup>19</sup> το σακχαρώδη διαβήτη, την παχυσαρκία, την κατάχρηση αιθυλικής αλκοόλης,<sup>20</sup> το κάπνισμα, την τοποθέτηση των παροχετεύσεων στα χοληφόρα για καλοήθεις παθήσεις, πιθανόν λόγω επαναλαμβανόμενων χολαγγειίτιδων, και κάποιους γενετικούς πολυμορφισμούς.<sup>21,22</sup>

Ωστόσο, σε ποσοστό έως και 90% των ασθενών με χολαγγειοκαρκίνωμα δεν έχει ανευρεθεί κάποιος προδιαθεσικός παράγοντας.<sup>23,24</sup>

## 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει μεγάλη πρόοδος στην κατεύθυνση της κατανόησης και της αποσαφήνισης των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία της χολαγγειοκαρκινογένεσης.

Οι μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας, όπως για παράδειγμα ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), έχουν συνεισφέρει σημαντικά σε αυτή την πρόοδο. Η κακοήθης εξαλλαγή των χολαγγειοκυττάρων πιθανολογείται ότι προέρχεται από μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων και εξελίσσεται μέσω της χρόνιας φλεγμονής των χοληφόρων οδών. Η χολόσταση και η χρόνια φλεγμονή προκαλούν απελευθέρωση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως ιντερλευκίνης-6 (interleukin-6, IL-6), IL-8, μετατρέπτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor beta, TGF-β), παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α), αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (platelet derived growth factor, PDGF),<sup>25,26</sup> τα οποία προάγουν την παραγωγή του νιτρικού οξειδίου. Το νιτρικό οξύ προκαλεί βλάβη και απορρύθμιση των επιδιορθωτικών μηχανισμών του δεσοξυριβοζονουκλεϊνικού οξέος (deoxyribonucleic acid, DNA), με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι μεταλλάξεις των γονιδίων που είναι κρίσιμα για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (π.χ. των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των ογκογονιδίων).<sup>27,28</sup> Έχει αναφερθεί υπερέκφραση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR),<sup>29</sup> του υποδοχέα οιστρογόνων β-2 (estrogen receptor beta-2, erb-2),<sup>30</sup> του ογκογονιδίου *K-ras* (*K-ras* oncogene),<sup>31</sup> του πρωτο-ογκογονιδίου *BRAF* (proto-oncogene *BRAF*)<sup>32</sup> και του παράγοντα αύξησης των ηπατοκυττάρων c-met (hepatocyte growth factor, HGF c-met),<sup>33</sup> καθώς και μεταλλάξεις των γονιδίων *p53*, *APC* (adenomatous polyposis coli), *DPC4* (ογκοκατασταλτικού γονιδίου) και του *p16<sup>INK4a</sup>*.<sup>34,35</sup> Στη συνέχεια, μειώνεται η διαδικασία της απόπτωσης και αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, που έχει ως αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Η παθογένεια του χολαγγειοκαρκινώματος απεικονίζεται στην εικόνα 1.

## 5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Τα αρχικά συμπτώματα εξαρτώνται από την εντόπιση του χολαγγειοκαρκινώματος. Το ενδοηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα συνήθως εκδηλώνεται σε προχωρημένα στάδια με



**Εικόνα 1.** Η παθογένεια του χολαγγειοκαρκινώματος (τροποποιημένο).<sup>27-35,103</sup>

IL-6: Ιντερλευκίνη-6 (interleukin-6), IL-8: Ιντερλευκίνη-8 (interleukin-8), TGF-β: Μεταρρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor beta), TNF-α: Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (tumor necrosis factor-α), PDGF: Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet derived growth factor), NO: Νιτρικό οξείδιο, EGFR: Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor receptor), K-ras: Ογκογονίδιο K-ras (K-ras oncogene), HGF c-met: Παράγοντας αύξησης των ηπατοκυττάρων c-met (hepatocyte growth factor), APC: Adenomatous polyposis coli

μη ειδικά συμπτώματα, όπως κοιλιακό άλγος, ανορεξία και κοιλιακή μάζα.<sup>36</sup> Στο 90% των περιπτώσεων του εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος ο ασθενής παρουσιάζει ανώδυνο ίκτερο, κνησμό, σκουρόχρωμα ούρα («σαν κονιάκ») και αποχρωματισμό κοπράνων.<sup>37</sup>

## 6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Ιστολογική τεκμηρίωση στο χολαγγειοκαρκίνωμα δεν επιτυγχάνεται συνήθως, λόγω δύσκολης προσπέλασης του όγκου. Έτσι, η διάγνωση του όγκου συνήθως επιτυγχάνεται με απεικονιστικές μεθόδους. Οι δυνατότητες των απεικονιστικών μεθόδων παρατίθενται στον πίνακα 1.

Νέες μεθόδους στη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος αποτελούν η διά του φύματος του Vater χολαγγειοσκόπηση και η αναρρόφηση με λεπτή βελόνη, καθοδηγούμενη με ενδοσκοπικούς υπερήχους (endoscopic ultrasound with fine needle aspiration, EUS-FNA). Η διά του φύματος του Vater χολαγγειοσκόπηση, όπως απεικονίζεται στον πίνακα 1, παρέχει τη δυνατότητα επισκόπησης της εσωτερικής επιφάνειας του χοληφόρου συστήματος και της δειγματοληψίας ιστού για βιοψία. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει πολύ υψηλή ευαισθησία (89–92%) και ειδικότητα (93–96%) στη διάγνωση του εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου αυξάνουν ακόμη πιο πολύ (71% και 100%, αντίστοιχα) όταν χρησιμοποιείται χολαγγειοσκόπιο τύπου Spyglass system.<sup>38</sup>

**Πίνακας 1.** Απεικονιστικές μέθοδοι διάγνωσης του χολαγγειοκαρκινώματος (τροποποιημένο).<sup>103</sup>

Μέθοδοι	Στόχος	Δειγματοληψία
ERCP	Εντόπιση όγκου Διάταση χοληφόρων	Κυτταρολογική εξέταση
MRCP	Εντόπιση όγκου Ηπατικό παρέγχυμα Διάταση χοληφόρων	–
MRI	Εντόπιση όγκου Ηπατικό παρέγχυμα Διάταση χοληφόρων Διογκωμένοι λεμφαδένες	–
CT	Εντόπιση όγκου Ηπατικό παρέγχυμα Διάταση χοληφόρων Διογκωμένοι λεμφαδένες	–
MRA	Αγγείωση όγκου	–
CTA	Αγγείωση όγκου	–
EUS-FNA	Εντόπιση όγκου Ηπατικό παρέγχυμα Διάταση χοληφόρων Διογκωμένοι λεμφαδένες Λήψη υλικού	Αναρρόφηση διά λεπτής βελόνης
Διά του φύματος Vater χολαγγειοσκόπηση	Επισκόπηση εσωτερικής επιφάνειας χοληφόρων	Βιοψία

ERCP: Ενδοσκοπική παλίνδρομη χολαγγειοπαγκρεατογραφία (endoscopic retrograde cholangiopancreatography) με ή χωρίς κυτταρολογική εξέταση, MRCP: Μαγνητική χολαγγειοπαγκρεατογραφία (magnetic resonance cholangiopancreatography), MRI: Μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging), CT: Αξονική τομογραφία (computerized tomography), MRA: Μαγνητική αγγειογραφία (MR angiography), CTA: Αξονική αγγειογραφία (CT angiography), EUS-FNA: Αναρρόφηση με λεπτή βελόνη, με τη βοήθεια ενδοσκοπικών υπερήχων (endoscopic ultrasound with fine needle aspiration)

Σε μελέτη προσπέλασης του χολαγγειοκαρκινώματος με EUS-FNA,<sup>39</sup> οι ασθενείς με νεοπλασμάτα των πυλών του ήπατος με αρνητική κυτταρολογική εξέταση υποβλήθηκαν σε EUS-FNA, που απέδωσε ακρίβεια 91%, ευαισθησία 89% και ειδικότητα 100%. Φαίνεται ότι η EUS-FNA είναι αποτελεσματική και λιγότερο επεμβατική μέθοδος για τη διάγνωση των νεοπλασμάτων των πυλών του ήπατος.<sup>40</sup>

Επικουρική θέση στη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος έχουν οι ορολογικοί δείκτες. Οι καρκινικοί δείκτες CA-125 (cancer antigen 125, καρκινικό αντιγόνο 125) και CEA (carcinoembryonic antigen, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο) μπορεί να είναι αυξημένοι στο χολαγγειοκαρκίνωμα, αν και είναι μη ειδικοί, ενώ ενδέχεται να αυξηθούν και σε άλλα γαστρεντερικά ή γυναικολογικά νεοπλασμάτα.<sup>41</sup> Το CA 19-9 (cancer antigen 19-9, καρκινικό αντιγόνο 19-9) είναι σημαντικός, αν και μη ειδικός, ορολογικός δείκτης. Έχει ευαισθησία 89% και ειδικότητα 86% –όταν η τιμή του υπερβαίνει τα 100 U/mL– σε ασθενείς με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα, αλλά η ευαισθησία μειώνεται έως και 53% όταν πρόκειται για ασθενείς χωρίς πρωτοπαθή



σκληρυντική χολαγγειίτιδα.<sup>42</sup> Επίσης, το CA 19-9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης, σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική εκτομή του όγκου. Έτσι, τιμές CA 19-9 που ήταν >1.000 U/mL σχετίστηκαν με χειρότερη πρόγνωση και πτωχότερη επιβίωση των εν λόγω ασθενών.<sup>43</sup>

Η κυτταρολογική εξέταση που λαμβάνεται με «βούρτσισμα» (brushing) κατά τη διάρκεια ενδοσκοπικής παλίνδρομης χολαγγειοπαγκρεατογραφίας (ERCP) συνεισφέρει στη διάγνωση. Η κυτταρολογική εξέταση έχει ευαισθησία 9–24% και ειδικότητα 61–100%.<sup>44</sup>

## 7. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι σημαντικές γνώσεις που έχουν αποκτηθεί για τη γενετική βάση του καρκίνου έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για την ανίχνευση των νεοπλασιών. Καινοτομίες, όσον αφορά στη διαγνωστική προσέγγιση, αποτελούν η κυτταρομετρία ροής, ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) και η ψηφιακή ανάλυση εικόνας (digital image analysis, DIA).

### 7.1. Φθορίζων *in situ* υβριδισμός

Στις μεθόδους της Μοριακής Βιολογίας που έχουν εξελιχθεί σε χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση και την παρακολούθηση των κακοήθων νεοπλασιών περιλαμβάνεται και η τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (fluorescent *in situ* hybridization, FISH), η οποία αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Κατ' ουσία, πρόκειται για σήμανση χρωμοσωμικών περιοχών με ανιχνευτές (probes), δηλαδή συνθετικές ως επί το πλείστον αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικές ως προς το στόχο τους, επισημασμένες άμεσα ή έμμεσα με φθορίζουσες ουσίες.

Το χολαγγειοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, οι οποίες αποτελούν πεδίο εφαρμογής της FISH. Η εξέταση πραγματοποιείται σε δείγματα, τα οποία λαμβάνονται με «βούρτσισμα» κατά τη διάρκεια ERCP. Για την ανίχνευση του χολαγγειοκαρκινώματος συνήθως χρησιμοποιείται μίγμα ανιχνευτών για τα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων 3, 7, 17, καθώς και για το γονίδιο *p16* στην περιοχή 9p21. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα, όταν τουλάχιστον πέντε κύτταρα στο παρασκευάσμα παρέχουν ενδείξεις υπερεκπροώπησης των χρωμοσωμάτων (ή περιοχών) που ελέγχονται.<sup>45,46</sup>

Σύμφωνα με μελέτες, η ειδικότητα της FISH στην ανίχνευση του χολαγγειοκαρκινώματος είναι περίπου ίδια με αυτή της κυτταρολογικής εξέτασης, ενώ η ευαισθησία

της είναι σημαντικά μεγαλύτερη. Η ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης βρέθηκε 15%, της FISH 34%, ενώ η ειδικότητα ανήλθε σε 98% και 91%, αντίστοιχα.<sup>50</sup> Σε άλλη ανασκόπηση, η ευαισθησία της FISH ήταν 67% και η ειδικότητα 75% για τη διάγνωση χολαγγειοκαρκινώματος σε ασθενείς με πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα και αρνητική κυτταρολογική εξέταση.<sup>47</sup> Η υψηλή ευαισθησία της FISH έγκειται κατά βάση στη δυνατότητα εντοπισμού μικρού αριθμού κακοήθων κυττάρων.<sup>50,51</sup>

Μέχρι σήμερα, η εφαρμογή της FISH στη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος βασίστηκε αποκλειστικά στην ανίχνευση ανευπλοειδίας (δηλαδή αριθμητικών χρωμοσωμικών ατυπιών) και ακολούθησε την αντίστοιχη προσέγγιση για τους όγκους του ουροποιητικού, με χρήση συστημάτων πολλαπλών κεντρομεριδιακών ανιχνευτών.<sup>45,51</sup> Ωστόσο, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των πρώτων μελετών, η μεθοδολογία παρουσιάζει και σημαντικούς περιορισμούς. Συγκεκριμένα:

Από το σύνολο των περιπτώσεων χολαγγειοκαρκινώματος, που έχουν μελετηθεί έως σήμερα με συμβατική κυτταρογενετική, προκύπτει ότι αρκετοί όγκοι δεν εμφανίζουν ουσιώδη ανευπλοειδία, με ισότιμη συμμετοχή όλων των χρωμοσωμάτων<sup>48</sup>

Από άλλες ειδικές μελέτες συνάγεται ότι στην πλειονότητα των ασθενών διαπιστώνονται μικρής κλίμακας χρωμοσωμικές ατυπίες (συχνά, μη ανιχνεύσιμες με τις συμβατικές μεθόδους και χωρίς αριθμητικές εκτροπές του «χρωμοσώματος φορέα»), οι οποίες συνεπάγονται είτε τον «πολλαπλασιασμό» (amplification) ογκογονιδίων, είτε απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων<sup>49,50</sup>

Η ταυτόχρονη χρήση «ανεξάρτητων ανιχνευτών» (δηλαδή, ανιχνευτών οι οποίοι αποσκοπούν στη σήμανση θέσεων επί διαφορετικών χρωμοσωμάτων, ακόμη και των κεντρομεριδίων) αποκλείει τη δυνατότητα μελέτης των συγκυτίων, αφού περιορίζεται σε μεμονωμένα κύτταρα, που μπορεί να είναι σπάνια στο σύνηθες κυτταρολογικό υλικό.

Για τους παραπάνω λόγους, η εφαρμογή της FISH στο πλαίσιο της κυτταρολογικής διάγνωσης του χολαγγειοκαρκινώματος θα μπορούσε να αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματική, εάν, παράλληλα με την αναζήτηση ανευπλοειδίας, αποσκοπούσε και στη διαπίστωση του επιπέδου εκπροώπησης συγκεκριμένων χρωμοσωμικών περιοχών, ιδιαίτερα εκείνων επί των οποίων εδράζονται ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Στο πλαίσιο της προσέγγισης αυτής, μια προφανής επιλογή θα ήταν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, στην περιοχή 17p13. Ελλείμματα ή αδρανιστικές μεταλλάξεις του *p53* έχουν διαπιστωθεί σε ευρύτατο φάσμα αιματολογικών

και συμπαγών κακοηθειών και έχουν ενοχοποιηθεί τόσο για την ογκογένεση όσο και για την κλινική συμπεριφορά της νόσου. Ωστόσο, στο χολαγγειοκαρκίνωμα, ο ρόλος των αλλοιώσεων του γονιδίου, παρά την πληθώρα των βιβλιογραφικών αναφορών,<sup>51-56</sup> δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Για παράδειγμα, εκτός από τα ελλείμματα και τις σημειακές μεταλλάξεις του 17p13,<sup>57</sup> με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις με υπερέκφραση της περιοχής 17p13, οι οποίες μάλιστα φαίνεται ότι προσδίδουν καλύτερη πρόγνωση.<sup>58</sup>

Τα γονίδια *p16/p14* και *p15* στην περιοχή 9p21 έχουν μελετηθεί διεξοδικά στα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Στα νοσήματα αυτά, η απώλεια ή η αδρανοποίηση, ειδικά του γονιδίου *p16*, αποτελεί ισχυρό αρνητικό προγνωστικό παράγοντα, ικανό να ανατρέψει την ευμενή πρόγνωση άλλων γενετικών ατυπιών.<sup>59</sup> Στα συμπαγή κακοήθη νεοπλάσματα, το γονίδιο *p16* εμφανίζεται επίσης συχνά ελλειμματικό ή αδρανοποιημένο.<sup>60,61</sup> Επίσης, βρέθηκε ότι μετάλλαξη του γονιδίου *p53* συμμετέχει στην καρκινογένεση του χοληφόρου δένδρου.<sup>62</sup> Στο χολαγγειοκαρκίνωμα, το γονίδιο *p16* εμφανίζεται επίσης συχνά ελλειμματικό ή αδρανοποιημένο στην εξέταση με τη μέθοδο PCR, ανεξάρτητα από την κατάσταση του *p53*.<sup>63</sup> Ωστόσο, η ερμηνεία των διαθέσιμων δεδομένων δεν είναι απλή, εφ' όσον τα ευρήματα προκύπτουν από περιορισμένο αριθμό περιστατικών και αφορούν σε διάφορες αλλοιώσεις, όπως το έλλειμμα των γονιδίων ή οι μικρής κλίμακας μεταβολές που οδηγούν σε αδρανοποίηση των ενεργοποιητών τους (promoters).

Τελείως ενδεικτικά μπορεί να αναφερθεί η συσχέτιση των ελλειμμάτων του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7 με τους όγκους του πεπτικού. Εξ άλλου, η υπερεκπροσώπηση της χρωμοσωμικής περιοχής 11q13 δεν αφορά μόνο στους γυναικολογικούς όγκους, όπως είχε θεωρηθεί αρχικά, αλλά και διάφορα άλλα νεοπλάσματα, περιλαμβανομένου και του γαστρεντερικού.<sup>64</sup>

Συμπερασματικά, οι δομικές αλλαγές στο χρωμόσωμα 7 (χρωμοσωμική περιοχή 7q31), στο χρωμόσωμα 11 (περιοχή 11q13), στο χρωμόσωμα 9 (περιοχή 9p21) και στο χρωμόσωμα 17 (περιοχή 17p13) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της καρκινογένεσης και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα γονίδια *p16* (9p21) και *p53* (17p13) σχετίζονται με την παθογένεια του χολαγγειοκαρκινώματος.

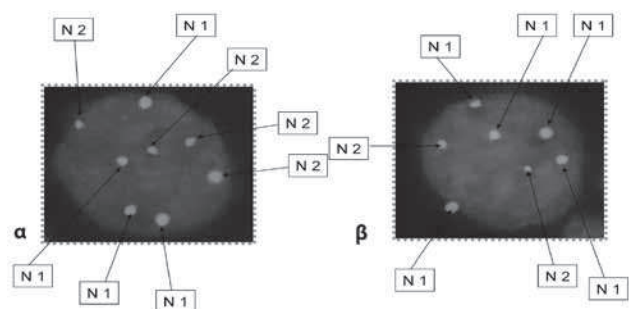
Σε μελέτη από την Κλινική μας έγινε τροποποίηση της τεχνικής FISH, ενώ επιχρίσματα κάθε ασθενούς μελετήθηκαν με 4 ζεύγη άμεσα σεσημασμένων ανιχνευτών (Vysis), για τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα. Κάθε ζεύγος περιελάμβανε κεντρομεριδιακό ανιχνευτή και, επί πλέον, ανιχνευτή για συγκεκριμένη περιοχή στο ίδιο το

χρωμόσωμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη για το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7 και την περιοχή 7q31, για το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 9 και την περιοχή 9p21 (κάλυψη των θέσεων των γονιδίων *p16/p14* και *p15*), για το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 17 και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* και για το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 11 και το γονίδιο *CCND1*. Η μελέτη εκπονήθηκε σε 32 ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα, που υποβλήθηκαν σε ERCP και λήψη υλικού από τα χοληφόρα με βούρτσα. Η ευαισθησία της FISH ήταν 90,6%.<sup>65</sup> Εφαρμογή της FISH στο κυτταρικό επίχρισμα του χολαγγειοκαρκινώματος εμφανίζεται στην εικόνα 2.

Ασφαλώς, ο κατάλογος των γονιδίων που ενδέχεται να εμπλέκονται στην παθογένεια και στην κλινική συμπεριφορά του χολαγγειοκαρκινώματος θα μπορούσε να είναι ευρύτατος, ιδιαίτερα εάν ληφθούν υπ' όψη τα σχετικά δεδομένα από άλλες συμπαγείς νεοπλασίες του γαστρεντερικού ή αλλού.

## 7.2. Συγκριτικός γενετικός υβριδισμός

Η μεθοδολογία του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (comparative genomic hybridization, CGH) διαφέρει σε τεχνικά σημεία από τη μεθοδολογία της FISH. Για τη μέθοδο CGH χρησιμοποιούνται ανιχνευτές, οι οποίοι παρασκευάζονται εκείνη τη στιγμή στο εργαστήριο με χρήση φυσιολογικού DNA αναφοράς, ενώ για τη FISH χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμοι ανιχνευτές. Έτσι, με τη FISH διενεργείται έλεγχος συγκεκριμένων περιοχών, ενώ με την CGH επιτρέπεται η χαρτογράφηση ελλείψεων και προσθηκών σε όλο το γονιδίωμα, δίνοντας την εικόνα του γονιδιωματικού προφίλ. Επίσης, επειδή η CGH είναι τεχνικά δύσκολη μέθοδος δεν χρησιμοποιείται σε καθη-



**Εικόνα 2.** Εφαρμογή της FISH στα μεμονωμένα κύτταρα.<sup>70</sup> (α) Ο αριθμός των σημάτων για τον κεντρομεριδιακό ανιχνευτή (17 cen, σήματα N1) είναι παθολογικός (τέσσερα σήματα), αλλά είναι ίδιος με τον αριθμό των σημάτων για το σημειακό ανιχνευτή (17p13, σήματα N2) και ως αποτέλεσμα εμφανίζεται υπερδιπλοειδία χωρίς έλλειμμα. (β) Ο αριθμός των σημάτων για τον κεντρομεριδιακό ανιχνευτή (17 cen, σήματα N1) είναι παθολογικός (πέντε σήματα N1), αλλά είναι διαφορετικός από τον αριθμό των σημάτων για το σημειακό ανιχνευτή (17p13, σήματα N2) (δύο σήματα N2) και ως αποτέλεσμα εμφανίζεται υπερδιπλοειδία με έλλειμμα.

μερινή κλινική πράξη, αλλά είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μελέτη της καρκινογένεσης.

### 7.3. Ψηφιακή ανάλυση εικόνας

Η ψηφιακή ανάλυση εικόνας (digital image analysis, DIA) είναι σχετικά νέα εφαρμογή της κυτταρολογικής εξέτασης, που προσδιορίζει ποσοτικά τα συστατικά, χρησιμοποιώντας φασματομετρικά στοιχεία.

Η DIA έχει αποτελέσει το αντικείμενο έρευνας, με σκοπό τη βελτίωση της ευαισθησίας της κυτταρολογικής εξέτασης από «βούρτσισμα» από στενώσεις των χοληφόρων κατά τη διάρκεια της ERCP και παρουσιάζει ευαισθησία περίπου 40%<sup>66</sup> για τη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος. Όταν όμως συνδυάζεται με τη FISH, η ευαισθησία αυξάνει στο 97%, διατηρώντας την υψηλή ειδικότητα (σχεδόν 100%).<sup>67</sup>

Συμπερασματικά, οι μέθοδοι και οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, FISH και DIA, όταν συνδυάζονται με την κυτταρολογική εξέταση, αυξάνουν σημαντικά την ειδικότητα της τελευταίας, ενώ η ευαισθησία παραμένει υψηλή. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν και άλλες μελέτες όσον αφορά στην DIA και στη FISH. Ειδικά για την τελευταία τεχνική, είναι βάσιμο να αναμένεται ότι η χρησιμότητά της μπορεί να διευρυνθεί με την παράλληλη αναζήτηση αριθμητικών και δομικών ατυπιών, όπως η απώλεια θέσεων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ο πολλαπλασιασμός ογκογονιδίων. Η CGH είναι ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος στη μελέτη της καρκινογένεσης του χολαγγειοκαρκινώματος. Έτσι, εκτός από τη δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης της νόσου, ενδέχεται να προκύψουν νέα δεδομένα σχετικά με τη μοριακή παθογένεια, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στο μέλλον με νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές καινοτομίες, για μια νόσο η οποία, με τα σημερινά δεδομένα, εξακολουθεί να παραμένει ανίατη.

## 8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διαφορική διάγνωση του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος περιλαμβάνει τους καλοήθεις και τους κακοήθεις όγκους του ήπατος. Βασίζεται σε απεικονιστικές εξετάσεις, και κυρίως στην ιστολογική εξέταση διαδερμικής βιοψίας υπό την καθοδήγηση απεικονιστικής εξέτασης (υπέρηχοι ή αξονική τομογραφία). Η διαφορική διάγνωση του εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος (το οποίο είναι και συχνότερο) πραγματοποιείται από καλοήθεις στενώσεις του χοληφόρου δένδρου, όπως φλεγμονώδεις στενώσεις απότοκες της χοληδοχολιθίασης, σύνδρομο Mirizzi, εξωηπατικές μορφές της PSC και «ιδιοπαθείς» καλοήθεις στενώσεις.<sup>68</sup> Πρόσφατα, στη διαφορική διάγνωση του εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος έχει συμπεριληφθεί και η IgG4 χολαγγειίτιδα,

καλοήθης οντότητα που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα στον ορό ανοσοσφαιρίνης IgG4 και μιμείται το χολαγγειοκαρκίνωμα. Η IgG4 χολαγγειίτιδα ανταποκρίνεται καλά στη θεραπεία με κορτικοειδή,<sup>69</sup> ενώ η χειρουργική θεραπεία της μπορεί να έχει καταστρεπτικά αποτελέσματα.<sup>70</sup> Η διαφορική διάγνωση είναι εξαιρετικά δύσκολη και, δυστυχώς, τα αυξημένα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης G4 (sIgG4) δεν μπορούν από μόνα τους να αποκλείσουν τη διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος.

Όπως προκύπτει από τα προηγούμενα, η διάγνωση του χολαγγειοκαρκινώματος βασίζεται κυρίως σε κλινικά και απεικονιστικά ευρήματα, ενώ η διάκριση από τις καλοήθεις στενώσεις των χοληφόρων είναι αρκετές φορές προβληματική. Από τους ασθενείς που παρουσίασαν κλινική και απεικονιστική εικόνα συμβατή με χολαγγειοκαρκίνωμα των πυλών του ήπατος και υποβλήθηκαν σε χειρουργική αντιμετώπιση, σε ποσοστό 10–15% ανευρέθηκε καλοήθης πάθηση (π.χ. χρόνια ίνωση ή φλεγμονή, σκληρυντική χολαγγειίτιδα, καλοήθεις όγκοι) στη μετεγχειρητική ιστολογική εξέταση.<sup>71–73</sup> Παρόμοιο ποσοστό (13%) ανεύρεσης καλοήθους πάθησης παρουσιάστηκε στους ασθενείς που χειρουργήθηκαν για υποψία χολαγγειοκαρκινώματος του τελικού άκρου του χοληδόχου πόρου.<sup>74</sup> Η κυτταρολογικά τεκμηριωμένη διάγνωση αφορά στη μειοψηφία των ασθενών (15–30%).<sup>46</sup>

## 9. ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η θνητότητα της νόσου είναι υψηλή, επειδή ο όγκος ανευρίσκεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο κατά τη διάγνωση.<sup>75</sup> Στους ασθενείς που είχαν χειρουργηθεί, η πενταετής επιβίωση για το ενδοηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα ήταν 27–48%, για το χολαγγειοκαρκίνωμα των πυλών του ήπατος ανερχόταν σε 30–40%<sup>77</sup> και για το χολαγγειοκαρκίνωμα του τελικού άκρου του χοληδόχου πόρου έφθανε στο 37%.<sup>47</sup> Η επιβίωση για το εξωηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα στους ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση (εκτομή) ήταν 43% στον 1ο χρόνο, 27% στον 3ο χρόνο, 27% στον 5ο χρόνο, ενώ σε αυτούς που είχαν υποβληθεί σε τοποθέτηση ενδοπρόθεσης (stent) ήταν 23% στον 1ο χρόνο, 7% στον 3ο χρόνο, 0% στον 5ο χρόνο και σε όσους δεν έγινε παρέμβαση 18% στον 1ο χρόνο και 0% στον 3ο χρόνο.<sup>77</sup> Η επιβίωση στους ασθενείς με ανεγχείρητο χολαγγειοκαρκίνωμα που υποβλήθηκαν σε παρακαμπτήρια επέμβαση ήταν 53% στον 1ο χρόνο, 19% στο 2ο χρόνο, 9% στον 3ο χρόνο και 4% στον 5ο χρόνο.<sup>78</sup> Σε αναδρομική μελέτη στην Κλινική μας, σε 34 ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα η επιβίωση ήταν 46% στον 1ο χρόνο, 20% στο 2ο χρόνο, 7% στον 3ο χρόνο, ενώ η συνολική επιβίωση ήταν μόλις 8,7 μήνες. Πρέπει να σημειωθεί



ότι στην εν λόγω μελέτη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της επιβίωσης μεταξύ των ασθενών που χειρουργήθηκαν και εκείνων οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ενδοσκοπική παροχέτευση χοληφόρων.<sup>79</sup>

## 10. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

Η χειρουργική θεραπεία των όγκων των πυλών του ήπατος εξαρτάται από τον τύπο του χολαγγειοκαρκινώματος σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά τους Bismuth et al.<sup>77</sup> Οι τύποι I και II θεραπεύονται με γενικευμένη (*en bloc*) εκτομή των εξωηπατικών χοληφόρων και της χοληδόχου κύστης, ενώ στη συνέχεια εφαρμόζεται τοπικός λεμφαδενικός καθαρισμός και ηπατο-ειλεοαναστόμωση κατά Roux-Y.<sup>80</sup> Δυστυχώς, οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν τοπικές μικρομεταστάσεις.<sup>81</sup> Γ' αυτόν το λόγο, έχει προταθεί η πρωτεΐνη S100A4 (S100A4 calcium binding protein Ca<sup>2+</sup>, δεσμευτική του ασβεστίου πρωτεΐνη) ως προγνωστικός δείκτης της πιθανότητας των μικρομεταστάσεων πριν από την επέμβαση.<sup>82</sup> Για τον ίδιο λόγο, διεξάγονται μελέτες με διάφορα είδη συμπληρωματικής ακτινο- και χημειοθεραπείας, που έπονται της χειρουργικής επέμβασης.<sup>83</sup> Πρόσφατη ανασκόπηση και μετα-ανάλυση έδειξε ότι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε συμπληρωματική θεραπεία μετά από την επέμβαση είχαν καλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με εκείνους οι οποίοι αντιμετώπιστηκαν μόνο χειρουργικά.<sup>84</sup> Σε περίπτωση ανεγχείρητου εξωηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος, συνήθως εφαρμόζεται ενδοσκοπική παροχέτευση των χοληφόρων με τοποθέτηση πλαστικής ή μεταλλικής ενδοπρόθεσης κατά τη διάρκεια της ERCP.<sup>85</sup>

Επίσης, έχουν δοκιμαστεί άλλα πρωτόκολλα συμπληρωματικής –στους ασθενείς που χειρουργήθηκαν– ή συστηματικής θεραπείας με γεμισιταβίνη ή 5-φθοριοουρακίλη (5-FU), ως μονοθεραπεία, καθώς και σε συνδυασμό με σισπλατίνη και ο συνδυασμός της καπεσιταβίνης με σισπλατίνη/5-FU. Η χημειοθεραπεία χορηγείται μόνο σε ανικτερικούς ασθενείς. Εκτός από την εφαρμογή των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τελευταία έχουν δοκιμαστεί και επεμβατικές διαδικασίες, όπως για παράδειγμα διαρτηριακός χημειοεμβολισμός (transarterial chemoembolisation, TACE).<sup>86</sup> Ωστόσο, αναδρομική ανάλυση των 125 ασθενών με χολαγγειοκαρκίνωμα που χειρουργήθηκαν, και από τους οποίους στη συνέχεια οι μισοί υποβλήθηκαν σε TACE, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της επιβίωσης μεταξύ της ομάδας που υποβλήθηκε σε TACE και εκείνης η οποία δεν υποβλήθηκε.<sup>87</sup>

Άλλη θεραπεία για τους ανεγχείρητους ασθενείς είναι η φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy, PDT). Στην αρχή, ο ασθενής λαμβάνει το φωτοευαίσθητο παρά-

γοντα (για παράδειγμα Photofrin), ο οποίος συσσωρεύεται σε όλο το σώμα, αλλά περισσότερο στα κακοήγη κύτταρα. Στη συνέχεια, διά του φύματος Vater ή διαθερμικά χορηγείται ακτινοβολία με δέση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος (Laser), που ενεργοποιεί την ευαισθητοποίηση της Photofrin και δημιουργεί ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες οδηγούν σε καταστροφή των κυττάρων του όγκου. Η πρώτη επιτυχής εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας για τη θεραπεία του καρκίνου του χοληφόρου πόρου διενεργήθηκε από τον McCaughan στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Από τότε, υπάρχουν πολλές μελέτες που επιβεβαιώνουν την ανταπόκριση του χολαγγειοκαρκινώματος στην PDT.<sup>88</sup> Ωστόσο, δεν πρέπει να λησμονείται ότι, εφαρμόζοντας αυτή τη θεραπεία, ο ασθενής στερείται για αρκετό διάστημα το φως (φυσικό-της ημέρας και τεχνητό-ηλεκτρικό).

Οι Knüppel et al συνέκριναν αναδρομικά την επίδραση της χημειοθεραπείας με το συνδυασμό της είτε με την PDT είτε με την TACE σε ασθενείς με ενδοηπατικό και εξωηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα. Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν υποβληθεί προηγουμένως σε χειρουργική επέμβαση είχαν μακρύτερη επιβίωση συγκριτικά με εκείνους οι οποίοι υποβλήθηκαν μόνο σε συστηματική θεραπεία. Η χημειοθεραπεία επιμήκυνε την επιβίωση κατά 9,2 μήνες, ενώ οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε συνδυασμένη θεραπεία με χημειοθεραπεία και PDT ή με χημειοθεραπεία και TACE είχαν κατά μέσο όρο 1,8 και 9,8 μήνες, αντίστοιχα, μακρύτερη επιβίωση σε σχέση με αυτούς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία.<sup>85</sup>

Η αναφορά στη θεραπεία του χολαγγειοκαρκινώματος δεν θα ήταν πλήρης χωρίς τη μεταμόσχευση του ήπατος. Αναφέρονται μεμονωμένα περιστατικά, που είχαν έως και 8 χρόνια ελεύθερα της νόσου, μετά από την παγκρεατοδωδεκαδακτυλεκτομή και τη μεταμόσχευση ήπατος, ακολουθούμενη από συμπληρωματική θεραπεία.<sup>89</sup> Το μεγαλύτερο πρόβλημα αποτελούν η νοσηρότητα της επέμβασης και η συχνή υποτροπή της νόσου μετά από τη μεταμόσχευση.<sup>90</sup>

Σήμερα, ζούμε στην εποχή της μοριακής στοχεύουσας θεραπείας των νεοπλασιών. Μετά από πολλές προσπάθειες εξερεύνησης του μοριακού υποστρώματος του χολαγγειοκαρκινώματος, μελέτες με μεθόδους Μοριακής Βιολογίας –περιλαμβανομένης και της FISH– έδειξαν πολλαπλασιασμό (amplification) και μεταλλάξεις του γονιδίου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR).<sup>91</sup> Έτσι, υπερέκφραση του EGFR και της πρωτεΐνης του αγγειακού αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGFR) ανευρέθηκε στο χολαγγειοκαρκίνωμα σε ποσοστό 20–40%<sup>92</sup> και 50%,<sup>93</sup> αντίστοιχα. Το μονοπάτι του EGFR σχετίστηκε με

την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων,<sup>94</sup> ενώ για τον VEGFR ανακαλύφθηκε ότι κατέχει ρόλο-κλειδί στη νεοαγγειογένεση, από την οποία εξαρτάται η οξυγόνωση, η θρέψη και η δυνατότητα μετάστασης του όγκου.<sup>95</sup> Η υπερέκφραση του EGFR θεωρήθηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος, ενώ η υπερέκφραση του VEGFR σχετίστηκε με ενδοηπατικές μεταστάσεις του όγκου.<sup>96</sup> Με βάση την παραπάνω έρευνα, ακολούθησαν προσπάθειες θεραπείας του χολαγγειοκαρκινώματος με ανασταλτές των VEGFR και EGFR *in vitro* σε κυτταρικές σειρές με βαντετανίμη (ανασταλτής των VEGFR και EGFR)<sup>97</sup> και με

λαπατινίμη (διπλός ανασταλτής του EGFR, ErbB1/ErbB2).<sup>98</sup> Η ερλοτινίμη (ανασταλτής της κινάσης EGFR) μελετήθηκε σε φάση II σε ασθενείς με χολαγγειοκαρκίνωμα προχωρημένου σταδίου.<sup>99</sup> Επίσης, σε φάση II της μελέτης ευρίσκεται και η σοραφενίμη, που είναι ανασταλτής των πολλαπλών κινασών VEGFR-2/-3, PDGFR-beta, B-Raf και C-Raf,<sup>100</sup> η οποία ήδη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκίνου.<sup>101,102</sup> Η συνεχής βελτίωση που σημειώνεται στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν το χολαγγειοκαρκίνωμα και, ενδεχομένως, μας φέρνουν πιο κοντά σε ένα νέο κόσμο εξατομικευμένης Ιατρικής.<sup>103</sup>

## ABSTRACT

### Current trends in the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma

L. VASILIEVA,<sup>1</sup> S.I. PAPADHIMITRIOU,<sup>2</sup> S.P. DOURAKIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Second Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Medical School, "Hippokratation" Regional General Hospital, Athens, <sup>2</sup>Unit of Molecular Cytogenetics, Laboratory of Hematology, "G. Genimatas" Regional General Hospital, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine* 2012, 29(3):279–289

Cholangiocarcinoma (CCA) is a very aggressive tumor with poor survival, the diagnosis of which is increasing. Although its cause is still unknown in most cases it is attributed to inflammatory conditions, including primary sclerosing cholangitis, liver fluke infestation, and hepatolithiasis, but progress in molecular pathogenesis has revealed the importance of genetic alterations. The diagnosis of CCA is difficult, mainly because access to the tumor is not easy. Biopsy is possible only for intrahepatic CCA, which accounts for 10% of cases. Routine brush cytology from endoscopic retrograde cholangiography has high specificity (100%) but unfortunately it is of low sensitivity (in the range of 30%). The treatment of CCA is challenging as it is usually difficult to determine when radical surgical treatment, local resection or liver transplantation is possible, and its prognosis is still dismal. This is a review of the evolution of diagnostic techniques for CCA from routine brush cytology to modern molecular techniques, and in particular fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and digital image analysis (DIA), and of its treatment.

**Key words:** Cholangiocarcinoma, Digital image analysis (DIA), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Treatment

## Βιβλιογραφία

1. VAUTHEY JN, BLUMGART LH. Recent advances in the management of cholangiocarcinomas. *Semin Liver Dis* 1994, 14:109–114
2. KHAN SA, DAVIDSON BR, GOLDIN R, PEREIRA SP, ROSENBERG WM, TAYLOR-ROBINSON SD ET AL. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: Consensus document. *Gut* 2002, 51(Suppl 6):V11–V19
3. PATEL T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001, 33:1353–1357
4. PATEL T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies. *BMC Cancer* 2002, 2:10
5. SUEHIRO T, MATSUMATA T, IGUCHI T, SANEFUJI K, NOMOTO KI, TAKE-TOMI A ET AL. Immunohistochemical examination of a resected advanced hilar cholangiocarcinoma arising in a 29-year-old male without primary sclerosing cholangitis. *Case Rep Gastroenterol* 2010, 4:144–152
6. SHAIB YH, DAVILA JA, McGLYNN K, EL-SERAG HB. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: A true increase? *J Hepatol* 2004, 40:472–477
7. WELZEL TM, McGLYNN KA, HSING AW, O'BRIEN TR, PFEIFFER RM. Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:873–875
8. ISHAK KG, ANTONY PP, SOBIN LH. *Histological typing of tumours of the liver*. 2nd ed. WHO International Histological Classification of Tumors. Springer-Verlag, Berlin, 1994
9. KHAN SA, THOMAS HC, DAVIDSON BR, TAYLOR-ROBINSON SD. Chol-



- angiocarcinoma. *Lancet* 2005, 366:1303–1314
10. KLATSKIN G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am J Med* 1965, 38:241–256
  11. BISMUTH H, MAJNO PE. Hepatobiliary surgery. *J Hepatol* 2000, 32(Suppl 1):208–224
  12. BURAK K, ANGULO P, PASHA TM, EGAN K, PETZ J, LINDOR KD. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2004, 99:523–526
  13. KURATHONG S, LERDVERASIRIKUL P, WONGPAITON V, PRAMOOLSINSAP C, KANJANAPITAK A, VARAVITHYA W ET AL. *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology* 1985, 89:151–156
  14. VENNERVALD BJ, POLMAN K. Helminths and malignancy. *Parasite Immunol* 2009, 31:686–696
  15. KIM YT, BYUN JS, KIM J, JANG YH, LEE WJ, RYU JK ET AL. Factors predicting concurrent cholangiocarcinomas associated with hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2003, 50:8–12
  16. RUBEL LR, ISHAK KG. Thorotrast-associated cholangiocarcinoma: An epidemiologic and clinicopathologic study. *Cancer* 1982, 50:1408–1415
  17. WALKER NJ, CROCKETT PW, NYSKA A, BRIX AE, JOKINEN MP, SELLS DM ET AL. Dose-additive carcinogenicity of a defined mixture of “dioxin-like compounds”. *Environ Health Perspect* 2005, 113:43–48
  18. LICHTENSTEIN DR. Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2011, 13:495–505
  19. KOBAYASHI M, IKEDA K, SAITOH S, SUZUKI F, TSUBOTA A, SUZUKI Y ET AL. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer* 2000, 88:2471–2477
  20. BERGQUIST A, GLAUMANN H, PERSSON B, BROOMÉ U. Risk factors and clinical presentation of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: A case-control study. *Hepatology* 1998, 27:311–316
  21. TYSON GL, EL-SERAG HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011, 54:173–184
  22. BETTSCHART V, CLAYTON RA, PARKS RW, GARDEN OJ, BELLAMY CO. Cholangiocarcinoma arising after biliary-enteric drainage procedures for benign disease. *Gut* 2002, 51:128–129
  23. LAZARIDIS KN, GORES GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005, 128:1655–1667
  24. RUSTAGIT, DASANU CA. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: Similarities, differences and updates. *J Gastrointest Cancer* 2011 (in press)
  25. MENG F, YAMAGIWA Y, UENO Y, PATEL T. Over-expression of interleukin-6 enhances cell survival and transformed cell growth in human malignant cholangiocytes. *J Hepatol* 2006, 44:1055–1065
  26. ISOMOTO H, KOBAYASHI S, WERNEBURG NW, BRONK SF, GUICCIARDI ME, FRANK DA ET AL. Interleukin-6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005, 42:1329–1338
  27. FAVA G. Molecular mechanisms of cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010, 1:12–22
  28. SANDHU DS, SHIRE AM, ROBERTS LR. Epigenetic DNA hypermethylation in cholangiocarcinoma: Potential roles in pathogenesis, diagnosis and identification of treatment targets. *Liver Int* 2008, 28:12–27
  29. XU L, HAUSMANN M, DIETMAIER W, KELLERMEIER S, PESCH T, STIEBER-GUNCKEL M ET AL. Expression of growth factor receptors and targeting of EGFR in cholangiocarcinoma cell lines. *BMC Cancer* 2010, 10:302
  30. LAI GH, ZHANG Z, SHEN XN, WARD DJ, DEWITT JL, HOLT SE ET AL. erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer. *Gastroenterology* 2005, 129:2047–2057
  31. OHASHI K, NAKAJIMA Y, KANEHIRO H, TSUTSUMI M, TAKI J, AOMATSU Y ET AL. Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: Relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology* 1995, 109:1612–1617
  32. TANNAPFEL A, SOMMERER F, BENICKE M, KATALINIC A, UHLMANN D, WITZIGMANN H ET AL. Mutations of the *BRAF* gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003, 52:706–712
  33. MIYAMOTO M, OJIMA H, IWASAKI M, SHIMIZU H, KOKUBU A, HIRAKA N ET AL. Prognostic significance of overexpression of c-met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011, 105:131–138
  34. TANIAI M, HIGUCHI H, BURGART LJ, GORES GJ. *p16<sup>INK4a</sup>* promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2002, 123:1090–1098
  35. LEE S, KIM WH, JUNG HY, YANG MH, KANG GH. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2002, 161:1015–1022
  36. YANG J, YAN LN. Current status of intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008, 14:6289–6297
  37. OLNES MJ, ERLICH R. A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology* 2004, 66:167–179
  38. TISCHENDORF J, KRÜGER M, TRAUTWEIN C, DUCKSTEIN N, SCHNEIDER A, MANNS MP ET AL. Cholangioscopic characterization of dominant bile duct stenosis in patients with primary sclerosing cholangitis. *Endoscopy* 2006, 38:665–669
  39. ROSS WA, WASAN SM, EVANS DB, WOLFF RA, TRAPANI LV, STAERKEL GA ET AL. Combined EUS with FNA and ERCP for the evaluation of patients with obstructive jaundice from presumed pancreatic malignancy. *Gastrointest Endosc* 2008, 68:461–466
  40. FRITSCHER-RAVENS A, BROERING DC, KNOEFEL WT, ROGIERS X, SWAIN P, THONKE F ET AL. EUS-guided fine-needle aspiration of suspected hilar cholangiocarcinoma in potentially operable patients with negative brush cytology. *Am J Gastroenterol* 2004, 99:45–51
  41. CHEN CY, SHIESH SC, TSAO HC, LIN XZ. The assessment of biliary CA 125, CA 19-9 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma – the influence of sampling time and hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2002, 49:616–620
  42. PATEL AH, HARNOIS DM, KLEE GG, LaRUSSO NF, GORES GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000, 95:204–207
  43. JUNTERMANN S, RADUNZ S, HEUER M, HERTEL S, REIS H, NEUHAUS JP ET AL. Tumor markers as a diagnostic key for hilar cholangiocarcinoma. *Eur J Med Res* 2010, 15:357–361
  44. SELVAGGI SM. Biliary brushing cytology. *Cytopathology* 2004, 15:74–79

45. CHAHAL P, BARON TH. Endoscopic palliation of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006, 22:551–560
46. KIPP BR, STADHEIM LM, HALLING SA, POCHRON NL, HARMSSEN S, NAGORNEY DM ET AL. A comparison of routine cytology and fluorescence *in situ* hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *Am J Gastroenterol* 2004, 99:1675–1681
47. MALHI H, GORES GJ. Review article: The modern diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 23:1287–1296
48. MITELMAN F, JOHANSSON B, MERTENS F. *Mitelman database of chromosome aberrations in cancer (2007)*. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
49. SUGIMACHI K, AISHIMA S, TAGUCHI K, TANAKA S, SHIMADA M, KAJIYAMA K ET AL. The role of overexpression and gene amplification of cyclin D<sub>1</sub> in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2001, 35:74–79
50. KOO SH, IHM CH, KWON KC, PARK JW, KIM JM, KONG G. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001, 130:22–28
51. WANG J, WANG X, XIE S, YAN Z, LI Z, LI Y ET AL. *p53* status and its prognostic role in extrahepatic bile duct cancer: A meta-analysis of published studies. *Dig Dis Sci* 2011, 56:655–662
52. NAKANUMA Y, SASAKI M, SATO Y, REN X, IKEDA H, HARADA K. Multistep carcinogenesis of perihilar cholangiocarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. *World J Hepatol* 2009, 1:35–42
53. FURUBO S, HARADA K, SHIMONISHI T, KATAYANAGI K, TSUI W, NAKANUMA Y. Protein expression and genetic alterations of *p53* and *ras* in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1999, 35:230–240
54. ARORA DS, RAMSDALE J, LODGE JP, WYATT JI. *p53* but not *bcl-2* is expressed by most cholangiocarcinomas: A study of 28 cases. *Histopathology* 1999, 34:497–501
55. WASHINGTON K, GOTTFRIED MR. Expression of *p53* in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* 1996, 16:99–104
56. TULLO A, D'ERCHIA AM, HONDA K, KELLY MD, HABIB NA, SACCONI C ET AL. New *p53* mutations in hilar cholangiocarcinoma. *Eur J Clin Invest* 2000, 30:798–803
57. DING SF, DELHANTY JD, BOWLES L, DOOLEY JS, WOOD CB, HABIB NA. Loss of constitutional heterozygosity on chromosomes 5 and 17 in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 1993, 67:1007–1010
58. CHUENSUMRAN U, WONGKHAM S, PAIROJKUL C, CHAUI S, PETMITR S. Prognostic value of DNA alterations on chromosome 17p13.2 for intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2007, 13:2986–2991
59. PAPADHIMITRIOU SI, POLYCHRONOPOULOU S, TSAKIRIDOU AA, ANDROUTSOS G, PATERAKIS GS, ATHANASSIADOU F. *p16* inactivation associated with aggressive clinical course and fatal outcome in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005, 27:675–677
60. YOSHIDA S, TODOROKI T, ICHIKAWA Y, HANAI S, SUZUKI H, HORI M ET AL. Mutations of *p16<sup>ink4</sup>/CDKN2* and *p15<sup>ink4B</sup>/MTS2* genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 1995, 55:2756–2760
61. DeHAAN RD, KIPP BR, SMYRK TC, ABRAHAM SC, ROBERTS LR, HALLING KC. An assessment of chromosomal alterations detected by fluorescence *in situ* hybridization and *p16* expression in sporadic and primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinomas. *Hum Pathol* 2007, 38:491–499
62. MATSUBARA T, FUNABIKI T, JINNO O, SAKURAI Y, HASEGAWA S, IMAZU H ET AL. *p53* gene mutations and overexpression of *p53* product in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999, 6:286–293
63. TANNAPFEL A, SOOMMERER F, BENICKE M, WEINANS L, KATALINIC A, GEISLER F ET AL. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma. *J Pathol* 2002, 197:624–631
64. HESKETH R. The oncogene and tumour suppressor gene facts. In: Hesketh R (ed) *FactsBook*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, 1997
65. VASILIEVA LE, PAPADHIMITRIOU SI, ALEXOPOULOU A, PAVLIDIS D, ROMANOS A, XYNOPOULOS D ET AL. An extended fluorescence *in situ* hybridization (FISH) approach for the diagnosis and cytogenetic study of cholangiocarcinoma on cytology smears from ERCP brushing. The Liver Meeting 2010 of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, 2010, poster 1712
66. BARON TH, HAREWOOD GC, RUMALLA A, POCHRON NL, STADHEIM LM, GORES GJ ET AL. A prospective comparison of digital image analysis and routine cytology for the identification of malignancy in biliary tract strictures. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, 2:214–219
67. LEVY MJ, CLAIN JE, CLAYTON A, HALLING KC, KIPP BR, RAJAN E ET AL. Preliminary experience comparing routine cytology results with the composite results of digital image analysis and fluorescence *in situ* hybridization in patients undergoing EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2007, 66:483–490
68. VERBEEK PC, VAN LEEUWEN DJ, DE WIT LT, REEDERS JW, SMITS NJ, BOSMA A ET AL. Benign fibrosing disease at the hepatic confluence mimicking Klatskin tumors. *Surgery* 1992, 112:866–871
69. GHAZALE A, CHARI ST, ZHANG L, SMYRK TC, TAKAHASHI N, LEVY MJ ET AL. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: Clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology* 2008, 134:706–715
70. GAMBLIN TC, KRASINSKAS AM, SLIVKA AS, TUBLIN ME, DEMETRIS J, SHUE E ET AL. Fibroinflammatory biliary stricture: A rare bile duct lesion masquerading as cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2009, 13:713–721
71. GERHARDS MF, VOS P, VAN GULIK TM, RAUWS EA, BOSMA A, GOUMA DJ. Incidence of benign lesions in patients resected for suspicious hilar obstruction. *Br J Surg* 2001, 88:48–51
72. JUNTERMANN B, KAISER GM, REIS H, SANER FH, RADUNZ S, VERNADAKIS S ET AL. Klatskin-mimicking lesions: Still a diagnostic and therapeutic dilemma? *Hepatogastroenterology* 2011, 58:265–269
73. UHLMANN D, WIEDMANN M, SCHMIDT F, KLUGE R, TANNAPFEL A, BERR F ET AL. Management and outcome in patients with Klatskin-mimicking lesions of the biliary tree. *J Gastrointest Surg* 2006, 10:1144–1150
74. NAKAYAMA A, IMAMURA H, SHIMADA R, MIYAGAWA S, MAKUUCHI M, KAWASAKI S. Proximal bile duct stricture disguised as malignant neoplasm. *Surgery* 1999, 125:514–521
75. AHRENDT SA, NAKEEB A, PITT HA. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis* 2001, 5:191–218
76. CHAUHAN A, HOUSE MG, PITT HA, NAKEEB A, HOWARD TJ, ZYROMSKI NJ ET AL. Post-operative morbidity results in decreased long-

- term survival after resection for hilar cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 2011, 13:139–147
77. SHI QF, LIANG TB, QIN YS, WANG WL, SHEN Y, ZHANG M ET AL. Evaluation of surgical approach for extrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007, 6:622–626
  78. FARLEY DR, WEAVER AL, NAGORNEY DM. “Natural history” of unresected cholangiocarcinoma: patient outcome after noncurative intervention. *Mayo Clin Proc* 1995, 70:425–429
  79. ALEXOPOULOU A, SOULTATI A, DOURAKIS SP, VASILIEVA L, ARCHIMANDRITIS AJ. Cholangiocarcinoma: A 7-year experience at a single center in Greece. *World J Gastroenterol* 2008, 14:6213–6217
  80. KNÜPPEL M, KUBICKA S, VOGEL A, MALEK NP, SCHNEIDER M, PAPENDORF FA ET AL. Combination of conservative and interventional therapy strategies for intra- and extrahepatic cholangiocellular carcinoma: A retrospective survival analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2012, 2012:190708
  81. YAMAGUCHI K, CHIJIIWA K, SAIKI S, SHIMIZU S, TAKASHIMA M, TANAKA M. Carcinoma of the extrahepatic bile duct: Mode of spread and its prognostic implications. *Hepatogastroenterology* 1997, 44:1256–1261
  82. FABRIS L, CADAMURO M, MOSERLE L, DZIURA J, CONG X, SAMBADO L ET AL. Nuclear expression of S100A4 calcium binding protein increases cholangiocarcinoma invasiveness and metastasization. *Hepatology* 2011 (in press)
  83. BONET BELTRÁN M, ROTH AD, MENTHA G, ALLAL AS. Adjuvant radio-chemotherapy for extrahepatic biliary tract cancers. *BMC Cancer* 2011, 11:267
  84. BONET BELTRÁN M, ALLAL AS, GICH I, SOLÉ JM, CARRIÓ I. Is adjuvant radiotherapy needed after curative resection of extrahepatic biliary tract cancers? A systematic review with a meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev* 2011 (in press)
  85. ECKEL F, SCHMID RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: A pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer* 2007, 96:896–902
  86. KIRCHHOFF T, ZENDER L, MERKESDAL S, FRERICKS B, MALEK N, BLECK J ET AL. Initial experience from a combination of systemic and regional chemotherapy in the treatment of patients with non-resectable cholangiocellular carcinoma in the liver. *World J Gastroenterol* 2005, 11:1091–1095
  87. SHEN WF, ZHONG W, LIU Q, SUI CJ, HUANG YQ, YANG JM. Adjuvant transcatheter arterial chemoembolization for intrahepatic cholangiocarcinoma after curative surgery: Retrospective control study. *World J Surg* 2011, 35:2083–2091
  88. ZOEPF T, JAKOBS R, ARNOLD JC, APEL D, RIEMANN JF. Palliation of nonresectable bile duct cancer: Improved survival after photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol* 2005, 100:2426–2430
  89. GRINGERI E, BASSI D, D’AMICO FE, BOETTO R, POLACCO M, LODO E ET AL. Neoadjuvant therapy protocol and liver transplantation in combination with pancreatoduodenectomy for the treatment of hilar cholangiocarcinoma occurring in a case of primary sclerosing cholangitis: Case report with a more than 8-year disease-free survival. *Transplant Proc* 2011, 43:1187–1189
  90. STAUFFER JA, STEERS JL, BONATTI H, DOUGHERTY MK, ARANDA-MICHEL J, DICKSON RC ET AL. Liver transplantation and pancreatic resection: A single-center experience and a review of the literature. *Liver Transpl* 2009, 15:1728–1737
  91. GWAK GY, YOON JH, SHIN CM, AHN YJ, CHUNG JK, KIM YA ET AL. Detection of response-predicting mutations in the kinase domain of the epidermal growth factor receptor gene in cholangiocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, 131:649–652
  92. SHAFIZADEH N, GRENERT JP, SAHAI V, KAKAR S. Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder. *Hum Pathol* 2010, 41:485–492
  93. TANG D, NAGANO H, YAMAMOTO H, WADA H, NAKAMURA M, KONDO M ET AL. Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: Expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep* 2006, 15:525–532
  94. YARDEN Y, SLIWKOWSKI MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:127–137
  95. TABERNEO J. The role of VEGF and EGFR inhibition: Implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 2007, 5:203–220
  96. YOSHIKAWA D, OJIMA H, IWASAKI M, HIRAOKA N, KOSUGET, KASAI S ET AL. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008, 98:418–425
  97. YOSHIKAWA D, OJIMA H, KOKUBU A, OCHIYA T, KASAI S, HIROHASHI S ET AL. Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2009, 100:1257–1266
  98. ZHANG Z, OYESANYA RA, CAMPBELL DJ, ALMENARA JA, DEWITT JL, SIRICA AE. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology* 2010, 52:975–986
  99. PHILIP PA, MAHONEY MR, ALLMER C, THOMAS J, PITOT HC, KIM G ET AL. Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24:3069–3074
  100. EL-KHOUEIRY AB, RANKIN CJ, BEN-JOSEF E, LENZ HJ, GOLD PJ, HAMILTON RD ET AL. SWOG 0514: A phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs* 2011 (in press)
  101. BAEK KK, KIM JH, UHM JE, PARK SH, LEE J, PARK JO ET AL. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: A retrospective comparison with previously known prognostic models. *Oncology* 2011, 80:167–174
  102. PANG RW, POON RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: The future is now. *Oncology* 2007, 72(Suppl 1):30–44
  103. KUMAR M, ZHAO X, WANG XW. Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: One step closer to personalized medicine? *Cell Biosci* 2011, 1:5

Corresponding author:

S.P. Dourakis, 28 Achaia street, GR-115 23 Athens, Greece  
e-mail: spdour@med.uoa.gr