



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**RUOLO DELLA
COLANGIOSCOPIA NELLA
DIAGNOSI DEL
COLANGIOCARCINOMA
EXTRAEPATICO**

Relatore:
Prof. Luca Maroni

Tesi di Laurea di:
Pierpaolo Lattanzi

A.A. 2022/2023

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.0 ANATOMIA DELLE VIE BILIARI.....	4
1.1 LESIONI STENOSANTI DELLE VIE BILIARI.....	5
1.2 COLANGIOCARCINOMA.....	5
1.3 FATTORI DI RISCHIO.....	7
1.4 PATOGENESI.....	8
1.5 ANATOMIA PATOLOGICA.....	9
1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE.....	12
1.7 ANALISI DI LABORATORIO.....	12
1.8 DIAGNOSI STRUMENTALE.....	13
Eco addome (US):.....	13
Tomografia computerizzata con/senza contrasto (TC/TCMC):.....	13
Risonanza magnetica colangiopancreatografica (MRCP):.....	13
Colangiopancreatografia endoscopica retrograda (ERCP):.....	15
Ecografia endoscopica (EUS):.....	15
Colangiografia percutanea transepatica (PTC):.....	16
Colangioscopia con sistema Digital single-operator Cholangioscopy (D-SOC):.....	17
1.9 TERAPIA.....	18
Terapia Chirurgica.....	18
Terapia adiuvante.....	19
Chemioterapia palliativa.....	20
Target therapy.....	20
Immunoterapia.....	20
2.SCOPO DELLO STUDIO.....	22
3.MATERIALI E METODI.....	22
4. RISULTATI.....	24
RISULTATI D-SOC GUIDED BIOPSY vs D-SOC.....	26
RISULTATI D-SOC e D-SOC guided biopsy pre e post 2020.....	27
RISULTATI CA19.9.....	28
RISULTATI ESTENSIONE CCA CON D-SOC.....	29
5.CONCLUSIONI.....	32
BIBLIOGRAFIA.....	35

1. INTRODUZIONE

Criticità diagnostiche nelle lesioni stenosanti dell'albero biliare

Le lesioni stenosanti dell'albero biliare sono delle condizioni patologiche che necessitano sempre un approfondimento diagnostico al fine di escludere la presenza di un colangiocarcinoma (CCA), patologia maligna associata spesso ad una prognosi infausta.

La differenziazione tra lesioni maligne e benigne è spesso una sfida tutt'altro che semplice per la medicina odierna; infatti la presentazione clinica e le indagini radiologiche spesso non portano ad una diagnosi definitiva, per questo la maggior parte delle lesioni viene classificata come di natura indeterminata. A testimonianza di tale difficoltà diagnostica circa un 24% delle stenosi operate in realtà ha origine benigna¹.

La necessità di una diagnosi puntuale ha portato allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche sempre più avanzate, tra cui la colangioscopia, la quale ha assunto un ruolo rilevante nella valutazione delle lesioni della via biliare extraepatica. L'avanzamento tecnologico oltre ad aver diminuito l'errore diagnostico ha anche permesso un aumento delle capacità stadiatriche dei tumori, favorendo lo sviluppo di tecniche operatorie radicali ma allo stesso tempo sempre più conservative.

Lo scopo primario di questo lavoro sarà quello di valutare la capacità diagnostica dell'aspetto colangioscopico alla Digital Single-Operator Cholangioscopy (D-SOC) e delle D-SOC guided biopsies nella diagnosi dei colangiocarcinomi extraepatici. La D-SOC è una tecnica endoscopica avanzata utilizzata per l'esplorazione delle vie biliari e delle vie pancreatiche. Consiste nell'utilizzo di un endoscopio flessibile di piccolo diametro, che consente al medico di visualizzare direttamente l'interno delle vie biliari. La particolarità della D-SOC è che viene eseguita da un unico operatore, quindi il medico può controllare sia l'avanzamento che la direzione dell'endoscopio senza l'assistenza di un secondo operatore. Questo rende la procedura più efficiente e permette una maggiore manovrabilità all'interno del sistema biliopancreatico.

Gli obiettivi secondari che verranno perseguiti sono: il confronto dell'accuratezza della procedura prima e dopo la data del 01/01/2020, per valutare quanto l'acquisizione di esperienza influisca sulla resa di tale procedura; la valutazione dell'accuratezza

diagnostica della D-SOC guided biopsy nel definire l'estensione di malattia; e la valutazione della capacità diagnostica del Ca19.9.

1.0 ANATOMIA DELLE VIE BILIARI

Le vie biliari sono costituite da un complesso sistema duttale; la cui funzione principale è quella di drenare la bile dal fegato, dove è prodotta, alla seconda porzione del duodeno, dove svolge il suo compito di digestione dei nutrienti liposolubili. L'albero biliare si divide in una porzione intra-epatica, una extra-epatica e colecisti.

- Le vie biliari intraepatiche hanno origine dal polo biliare degli epatociti, i quali delimitano i canalicoli biliari. In periferia del lobulo i canalicoli si continuano nei dotti di Hering i quali sono delimitati dai colangiociti, cellule importanti in quanto possono andare incontro a proliferazione e rigenerazione in seguito a danno epatico, gradualmente il diametro dei dotti aumenta fino ad arrivare ai grandi dotti delle vie biliari extraepatiche.
- Le vie biliari extraepatiche sono la continuazione di quelle intraepatiche a partire dai dotti epatici di destra e sinistra, questi si uniscono a formare il dotto epatico comune nella regione ilare, questa è la sede maggiormente interessata dai tumori delle vie biliari extraepatiche.

Il dotto cistico a livello della regione ilare si fonde con il dotto epatico comune andando a formare il coledoco che drena la bile verso la papilla duodenale maggiore.

- La colecisti è un organo piriforme di piccole dimensioni (lunghezza 8-9 cm, larghezza 2-3 cm), localizzata al di sotto del fegato, collegata tramite il dotto cistico alle vie biliari extraepatiche. Tramite flusso retrogrado la bile viene immagazzinata all'interno della cistifellea, successivamente in seguito ad opportuno stimolo essa si contrae favorendo il rilascio di bile nell'intestino.

1.1 LESIONI STENOSANTI DELLE VIE BILIARI

Varie condizioni possono causare un restringimento delle vie biliari e portare ad un aumento dei livelli di bilirubina nel sangue. Le cause possono essere di natura benigna come ad esempio: calcoli, patologie autoimmuni (colangiopatia sclerosante primitiva), colangiti, pancreatiti, iatrogene (post-trapianto di fegato o post colecistectomia). In alternativa, la stenosi può essere prodotta da un processo patologico maligno. Le lesioni tumorali che causano stenosi delle vie biliari più frequentemente sono: colangiocarcinomi extraepatici, neoplasie pancreatiche; altre cause meno comuni possono essere tumori intraepatici, carcinoma della colecisti o dell'ampolla del Vater.

La problematica principale delle lesioni stenosanti è di natura diagnostica differenziale, infatti non sempre si riesce ad individuare l'eziologia della lesione, inoltre possono essere presenti limitazioni nella stadiazione della patologia. L'errore diagnostico può favorire di conseguenza un errore terapeutico, ad esempio si potrebbe intraprendere un percorso chirurgico in un soggetto in cui la lesione tumorale sia inoperabile o, addirittura, in un soggetto in cui vi sia una semplice stenosi di natura benigna.

1.2 COLANGIOCARCINOMA

Il CCA può essere classificato in base alla localizzazione all'interno delle vie biliari in CCA intraepatico (CCAi) ed extraepatico (CCAe). Il CCAe inoltre si differenzia in peridilare (CCAp), il quale è comunemente conosciuto come tumore di Klatskin, e distale (CCAd).

Per quanto riguarda il CCAp è stata elaborata una classificazione basata sull'estensione longitudinale del tumore, in particolare vengono differenziati 4 tipi di CCAp: tipo I, tumore confinato al dotto epatico comune; tipo II, tumore limitato alla confluenza dei dotti epatici, senza interessamento dei dotti secondari; tipo III, tumore che interessa la confluenza con estensione al dotto epatico di destra (III A) o di sinistra (III B); tipo IV, tumore che interessa la confluenza biliare con coinvolgimento dei dotti intraepatici secondari su entrambi i lati². La differente localizzazione del CCA sottende anche una differente epidemiologia, eziologia, iter diagnostico e terapia.

I	Tumore del dotto epatico comune che giunge che non interessa la confluenza
II	Tumore del dotto epatico comune che interessa la confluenza
III A	Tumore del dotto epatico comune con interessamento della confluenza ed esteso al dotto epatico di destra
III B	Tumore del dotto epatico comune con interessamento della confluenza ed esteso al dotto epatico di sinistra
IV	Tumore che coinvolge la confluenza ed entrambi i dotti epatici di destra e sinistra

Tab. 1 Classificazione Bismuth-Corlette².

A livello epidemiologico il CCA peri-ilare si presenta con maggiore frequenza, infatti risulta essere il 50/60 % dei tumori delle vie biliari, a seguire abbiamo il CCA distale 20/30 % ed infine il CCA intraepatico³. Negli ultimi anni la frequenza dei CCAp si è stabilizzata mentre sembrerebbe essere in aumento quella dei CCAi⁴, inoltre anche la mortalità di quest'ultimo sembrerebbe essere aumentata⁵.

In Italia il CCA rappresenta l'1% delle nuove diagnosi di neoplasia, la mortalità oncologica si attesta all'1% nel sesso maschile mentre al 3% nel sesso femminile⁶. Indipendentemente dalla sede, la prognosi è infausta, con tassi di sopravvivenza di circa il 15% a 2 anni dalla diagnosi di tumori extraepatici⁷.

Le fasce di età al di sotto dei 40 anni sono scarsamente interessate da questo tumore, mentre l'incidenza aumenta all'aumentare dell'età con picco massimo intorno ai 65 anni.

A livello globale l'area con maggior incidenza di CCA è sicuramente il sud-est asiatico, in particolare la Thailandia dove l'incidenza standardizzata per età risulta essere di 100 su 100.000 individui maschi e 50 su 100.000 individui di sesso femminile. Nelle regioni occidentali del globo terrestre, l'incidenza di CCA si attesta intorno a 0,5/2 ogni 100.000 individui, questa discrepanza sembra essere dovuta all'esposizione a differenti fattori di rischio quali infezioni epatiche endemiche nelle aree orientali⁸.

1.3 FATTORI DI RISCHIO

La maggior parte dei CCA sono sporadici, però sono presenti dei fattori di rischio che presentano una certa correlazione con l'insorgenza di questi tumori. Essi variano in base alla regione del mondo in cui ci si trova ed in base alla localizzazione del CCA. Condizioni che causano infiammazione cronica, colangite sclerosante primitiva e colestasi possono favorire l'insorgenza di mutazioni, un esempio potrebbe essere la presenza di cisti del coledoco che sembrerebbero essere correlate sia con CCAi che con CCAe. La cirrosi epatica è in relazione maggiore con i CCAi, mentre la litiasi del coledoco ha maggior legame con CCAe⁹.

A seconda della regione terrestre in cui ci troviamo i fattori di rischio possono essere diversi e più o meno forti, ad esempio in oriente sono più frequenti infezioni da HBV e cirrosi. Un'altra condizione che favorisce la degenerazione maligna sembrerebbe essere l'infestazione da fasciole epatiche.

FATTORI DI RISCHIO	Associazione con CCAi	Associazione con CCAe
Cisti delle vie biliari	++++	++++
Malattia di Caroli	++++	++++
Colangiti	++++	++++
Cirrosi	+++ /++++	++ /+++
Epatolitiasi	+++ /++++	NO
Colelitiasi/coledoco litiasi	++ /+++	++++
HBV	++ /+++	+
HCV	++ /+++	+ /++
Emocromatosi	++	NO
Pancreatiti croniche	++	+++
Obesità	+	+
Alcool	++	NO
Fumo di sigaretta	+	+

Tab. 2 Associazione tra fattori di rischio e CCAi o CCAe.

+, debole o modesta associazione; **++**, moderata associazione; **+++**, forte associazione; **++++**, associazione molto forte¹⁰.

1.4 PATOGENESI

Nel processo patogenetico dei CCA, vari fattori possono assumere un ruolo importante:

- L'infiammazione è uno di questi, essa favorisce l'aumento di citochine, acidi biliari e fattori di crescita, i quali vanno ad agire alterando processi apoptotici, di senescenza e di regolazione del ciclo cellulare, favorendo la proliferazione. In particolare le citochine infiammatorie inducono un aumento dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintetasi con conseguente aumento dell'ossido nitrico, importante mediatore del danno al DNA a singolo e doppio filamento, inoltre altera la funzione di riparazione del DNA di alcuni enzimi. L'interleuchina 6 (IL-6) prodotta sia dalle cellule infiammatorie attivate che dalle cellule tumorali, svolge un ruolo importante nella carcinogenesi in maniera diretta ma agisce anche indirettamente stimolando la produzione di mediatori antiapoptotici come MCL1. Altri mediatori dell'infiammazione coinvolti nel processo tumorale sono: EGFR, che favorisce la colangiocarcinogenesi; HGF, mediatore paracrino che presenta un ruolo rilevante nello sviluppo di invasività e metastasi tumorali; infine, gli acidi biliari i quali sono coinvolti nell'attivazione di altre vie importanti per lo sviluppo della lesione maligna.
- La genetica è uno degli aspetti su cui si sta indagando, non ci sono dei risultati definitivi ma si è visto che alcune alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico di oncogeni ed oncosoppressori sono correlate ai CCA, ad esempio si è osservato che i CCAp sono maggiormente associati a mutazioni attivanti KRAS rispetto ai CCAi¹¹. Un altro gene strettamente associato ai CCA è il TP53, ultimamente si sta anche indagando sulle mutazioni dei geni IDH 1 e 2 importanti nel glioma, ma anche nei CCAi.
- Il pathway di sviluppo dei CCA è legato al gene NOTCH, esso fisiologicamente regola lo sviluppo embriogenetico e la proliferazione delle vie biliari, in caso di mutazioni o alterazioni epigenetiche vi può essere una deviazione dalla sua normale funzione con conseguente attivazione del processo patologico maligno.
- L'ultimo fattore correlato allo sviluppo del CCA è il microambiente, in particolare la carcinogenesi porta a un'alterazione dello stroma, richiamo di fibroblasti, modificazione della matrice extracellulare, alterazione del pattern di migrazione delle cellule immuni ed un aumento della neoangiogenesi. Nei CCA è presente uno stroma desmoplastico denso e reattivo associato alla presenza di fibroblasti cancro-associati¹².

1.5 ANATOMIA PATOLOGICA

A livello macroscopico i CCA possono essere classificati in mass forming (esofitico), periductal infiltrating ed intraduttale¹³. La forma periductal infiltrating è caratterizzata da una crescita infiltrativa lungo i dotti di medio e grande calibro, mentre la forma intraduttale presenta uno sviluppo polipoide all'interno del lume delle vie biliari. In ultimo possiamo valutare il pattern di crescita mass forming che presenta uno sviluppo nodulare, esso in assenza di invasione intraduttale e linfovaskolare tende ad avere una prognosi migliore.

I CCA a livello istologico sono per il 90% adenocarcinomi, il restante 10% si divide tra varie forme minori come: squamosa, adenosquamosa, mucinosa, papillare, colloide, a piccole cellule, cellule squamose indifferenziato (pleiomorfo, sarcomatoide, cellule giganti). Un tipo particolare è l'adenocarcinoma fenotipo a ghiandola pilorica che tende ad interessare una fascia di età giovane, solitamente meno colpita dai CCA, esso di solito è ben differenziato, con pattern di crescita stellare ed estensione perineurale, importanti marker sono MUC6+ e MUC5AC¹⁴.

Le lesioni delle vie biliari non sono solo di natura invasiva. Esse infatti possono essere anche di tipo riparativo o delle forme preinvasive come le neoplasie intraepiteliali (BillN).

Le modificazioni iperplastiche o rigenerative possono essere di natura micropapillare o non papillare, in esse si potrà riscontrare un'aumentata cellularità ma assenza di atipie suggestive di malignità.

Le lesioni intraepiteliali possono essere divise in displasia di basso grado (BillN-1) e displasia di alto grado (BillN-2), oppure potremmo avere un carcinoma in situ (BillN3), inoltre ciascuna categoria può essere a sua volta divisa in lesioni micropapillari o non papillari. Valutando le lesioni intraepiteliali si è dimostrato che la displasia di alto e basso grado presentano oltre a differenti aspetti fenotipici anche differenti alterazioni genetiche correlate al diverso processo di carcinogenesi¹⁵. Ciascuna lesione intraepiteliale presenta caratteristiche ben definite. La displasia di basso grado interessa tipicamente piccole aree senza il coinvolgimento di ghiandole peribiliari con atipie cellulari e nucleari: nucleo ipercromatico, aumento rapporto nucleo/citoplasma, polarità nucleare preservata, membrana nucleare relativamente regolare, medio aumento dell'indice di proliferazione Ki67. La displasia di alto grado invece tende ad interessare un'area più ampia e a

raggiunge le ghiandole peribiliari. Le alterazioni nucleari e citologiche sono aumentate rispetto a quella di basso grado, in particolare avremo un nucleo ipercromatico con membrana nucleare irregolare, il rapporto nucleo/citoplasma sarà aumentato, inoltre si può osservare un ampio grado di polimorfismo, stratificazione nucleare complessa con assenza di polarità ed infine l'indice di proliferazione cellulare Ki67 aumentato. Nel carcinoma in situ le atipie saranno simili a quelle presenti nella lesione maligna e la polarità cellulare sarà alterata diffusamente o focalmente¹⁶.

A livello microscopico i CCA possono essere nodulari o diffusamente infiltrativi con marcato stroma desmoplastico, la maggior parte sono bene o moderatamente differenziati con molte ghiandole, ma anche nell'ambito di un tumore differenziato si possono presentare dei foci poco differenziati. Le cellule tumorali tendono ad avere una forma cuboidale o colonnare con nuclei vescicolari e nucleoli prominenti, inoltre la mucina è presente nel tumore e all'interno del lume delle ghiandole. Altri aspetti che si possono individuare sono la presenza di necrosi, infiltrato infiammatorio e possibile metaplasia intestinale o pilorica. La lesione maligna può andare incontro ad invasione linfovaskolare e invasione perineurale (PNI), esse sono delle possibili vie tramite le quali il tumore metastatizza. Le sedi più frequenti di metastasi sono linfonodi regionali, fegato, polmoni e peritoneo.

La PNI ha un'alta relazione con la ricorrenza post operatoria di malattia e quindi anche con una peggior prognosi. La PNI sembrerebbe essere un evento relativamente precoce nell'ambito del CCA che però è diagnosticato solo tardivamente, essa non è correlata con fattori come età o sesso del soggetto ma è legata ad altre variabili quali: volume tumorale, localizzazione, profondità, angiogenesi e interessamento linfonodale¹⁷. Nella PNI le cellule tumorali vanno a circondare le fibre nervose ed entrano nel perinervio, questo fenomeno è legato all'elevato neurotropismo riscontrato nei CCA. Il meccanismo di invasione ancora non è chiaro; un'ipotesi potrebbe essere quella della 'minor resistenza', ovvero le cellule tumorali presentano una maggior capacità diffusiva lungo il nervo che per questo viene considerato come via preferenziale. Il sistema nervoso autonomo si divide in simpatico e parasimpatico, quest'ultimo oltre ad innervare gli organi interni sembrerebbe innervare anche i tumori solidi. Questo aspetto è legato allo sviluppo dei nervi nel microambiente tumorale, infatti circa il 75% dei CCA presentano PNI¹⁸. Il tumore e il sistema nervoso, secondo gli ultimi studi, potrebbero interagire fra di loro

tramite neurotrasmettitori i quali svolgono la propria azione su appositi recettori, questo favorirebbe la deregolazione e l'accelerazione del processo di invasione perineurale. I principali neurotrasmettitori di interesse sono:

- Norepinefrina, che ha un ruolo nella migrazione delle cellule tumorali e nello sviluppo delle metastasi tramite recettori β_2 adrenergici.
- Acetilcolina, importante nello sviluppo del CCA.
- Nerve growth factor (NGF), che agisce sia sui nervi che sul microambiente tumorale, in particolare sulle cellule immunitarie e sui colangiociti.

Il cross talk tra tumore e sistema nervoso sta diventando un importante aspetto da indagare, infatti il neurone potrebbe favorire la crescita e la metastasi tumorale, mentre la lesione maligna a sua volta faciliterebbe l'angiogenesi neuronale, la neurogenesi e la PNI¹⁹.

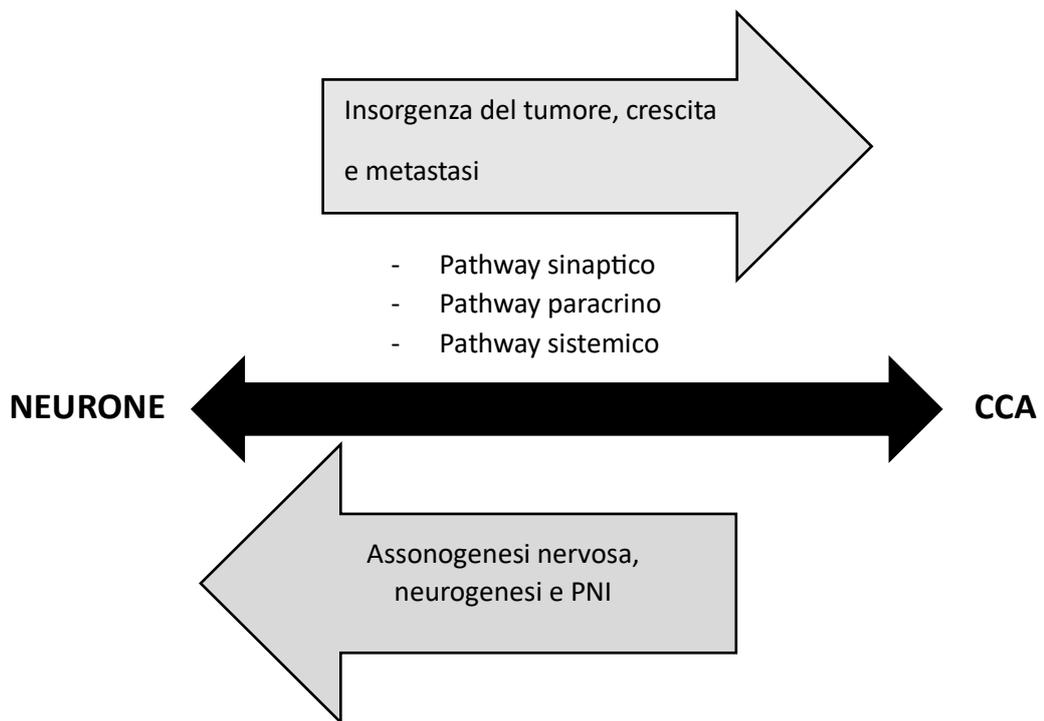


FIG. 1 Interazione tra sistema nervoso e tumore

1.6 MANIFESTAZIONI CLINICHE

La diagnosi di CCA il più delle volte è tardiva, in particolare nei CCAi, in quanto le manifestazioni cliniche si presentano in fase avanzata di malattia, questo aspetto favorisce una prognosi infausta.

Le presentazioni cliniche si differenziano tra CCAe e CCAi, nel primo caso i segni di colestasi dominano il quadro sintomatologico, di conseguenza vi saranno ittero, feci acoliche, urine scure e possibile prurito, altri segni di accompagnamento meno specifici sono: malessere generale, perdita di peso ed astenia. Il CCAi invece il più delle volte è paucisintomatico, può presentarsi come massa addominale associata a sintomi aspecifici.

1.7 ANALISI DI LABORATORIO

Nell'iter diagnostico delle lesioni stenotiche delle vie biliari è importante anche la valutazione di marker tumorali, il CA19.9 è una glicoproteina presente sulla superficie cellulare, essa è formata da un tetrasaccaride con una parte transmembrana e una parte extracellulare glicosilata. Tale marker è prodotto dalle cellule pancreatiche, dai dotti biliari, ma anche da cellule dello stomaco, colon, utero e dalle ghiandole salivari. Il Ca 19.9 risulta elevato nel 85% dei pazienti, tuttavia avendo scarsa specificità può innalzarsi anche in altre situazioni come tumori del pancreas, pancreatiti croniche e cirrosi.

Un valore di Ca 19.9 > 100U/mL in una stenosi della via biliare è molto sospetto di CCA²⁰. Si è visto inoltre che un cut off di 100U/mL in una stenosi della via biliare ha una sensibilità del 53% e un valore predittivo negativo del 92% nel predire un CCA²¹. Ulteriori studi hanno valutato la capacità del Ca 19.9 nel distinguere tra CCA ed epatocarcinoma; questo marker però sembra avere un'accuratezza moderata (63%-67%)²².

Un altro marker che è stato preso in considerazione nel CCA è il CEA, anche esso però presenta scarsa specificità, motivo per cui un suo innalzamento non è patognomonico di malattia. Nei CCAe può essere presente un aumento dei livelli di bilirubina coniugata, gamma-GT e fosfatasi alcalina. Inoltre potremmo valutare i livelli di IgG4, per escludere una possibile colangite IgG4 positiva.

1.8 DIAGNOSI STRUMENTALE

Nell'ipotesi di lesione stenotomica delle vie biliari gli approfondimenti diagnostici strumentali sono essenziali al fine di confermare una stenosi, delineare la natura della lesione ed eventualmente stadare la patologia maligna.

- **Eco addome (US):**

L'ecografia dell'addome è un esame economico, per questo spesso è uno dei primi esami utilizzati per indagare dilatazioni delle vie biliari intraepatiche e per valutare possibili CCAi.

Nella valutazione delle vie biliari extraepatiche l'US può essere utile per escludere la possibile presenza di calcoli, ma presenta come limite principale il fatto di essere operatore-dipendente. Inoltre in caso di lesioni stenotomiche sospette CCAe, l'US ha scarsa sensibilità e specificità, per questo motivo sono necessari altri approfondimenti diagnostici⁶.

- **Tomografia computerizzata con/senza contrasto (TC/TCMC):**

La TC è una tecnica diagnostica più accurata dell'US, ci permette di valutare sia lesioni da CCAi che da CCAe, inoltre l'aggiunta del mezzo di contrasto (mdc) dà ulteriori informazioni sulla lesione.

Al valore diagnostico della tecnica si aggiunge anche la funzione stadativa in quanto in grado di indicarci sede, estensione, invasione locale, invasione vascolare arteriosa e venosa, metastasi linfonodali e a distanza, informazioni utili per definire la resecabilità della lesione⁶.

Tipicamente i CCAi appaiono come masse ipodense a margini irregolari, con intenso enhancement periferico in fase arteriosa e successivo enhancement centripeto in fase tardiva²³.

- **Risonanza magnetica colangiopancreatografica (MRCP):**

L'MRCP è una delle indagini diagnostiche con maggior sensibilità e specificità nella diagnosi di CCA, ci permette di ottenere dei piani di taglio distanti fra loro 3-4 mm in modo tale da visualizzare anche piccole anomalie delle vie biliari, in particolare in caso di stenosi delle vie biliari riesce a differenziare con accuratezza

simile all'ERCP cause benigne da cause maligne, nel primo caso la stenosi sarà simmetrica e liscia, mentre nell'altro caso sarà di forma irregolare con uno spessore di parete maggiore di 5 mm.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: ridotta invasività, visualizzazione delle vie biliari sia sotto che sopra l'ostruzione, si possono inoltre visualizzare i dotti nei casi in cui essi siano esclusi dalla comunicazione con il sistema biliare per un danno anatomico e valutazione dell'anatomia delle vie biliari nei casi in cui non si possa applicare l'ERCP.

Oltre allo scopo diagnostico l'MRCP viene utilizzata anche per valutare la resecabilità dei CCAP, i criteri di esclusione per la chirurgia sono: l'interessamento estensivo delle vie biliari e l'interessamento vascolare.

Esclusa la non resecabilità si potrà procedere alla stadiazione per definire in maniera puntuale l'estensione dell'ostruzione, coinvolgimento intraepatico e invasione vascolare. Molto spesso però vi è discrepanza tra imaging e risultato della chirurgia in quanto vi possono essere diffusioni microscopiche sulla mucosa e nello spazio perineurale²⁴.

Un limite di questa tecnica riguarda la sovrastima dell'estensione del tumore, ciò nei CCAP potrebbe causare un'esclusione di soggetti eleggibili a trattamento chirurgico curativo. Inoltre vi potrebbe essere anche una sottostima dell'estensione del tumore legata principalmente alla mancata valutazione dell'infiltrazione submucosa che può non essere rilevata sia con tecniche non invasive che con le tecniche invasive.

La valutazione dell'invasione dei vasi nella fase preoperatoria, principalmente arteria epatica e vena porta, può essere studiata sia con arteriografia con mezzo di contrasto iodato che con risonanza magnetica.

Nella fase di pianificazione l'RM è importante anche per individuare possibili linfadenopatie di linfonodi portocavali, i quali sono interessati nel 73% dei CCAP²⁵.

- **Colangiopancreatografia endoscopica retrograda (ERCP):**

L'ERCP è una tecnica sia diagnostica che terapeutica applicata in caso di sospetto di CCAp o CCAAd; tramite un endoscopio per via orale si raggiunge la seconda porzione del duodeno dove si trova la papilla maggiore, la quale viene incannulata con un catetere tramite il quale viene iniettato contrasto all'interno, che permette la visualizzazione delle vie biliari e pancreatiche per via endoscopica. Nell'iter diagnostico questo approccio è preceduto dalla diagnostica per immagini, TC e RMN, le quali indicano una possibile necessità di approfondimenti.

Oltre alla valutazione fluoroscopica, tramite l'ERCP possiamo reperire dei campioni della lesione stenotica direttamente tramite tecniche quali: brushing, biopsie o spybite. Molto spesso la valutazione citologica ottenuta dal brushing ha scarso valore diagnostico, perché pur essendo una tecnica altamente specifica essa ha scarsa sensibilità. Infatti, il CCA è un tumore desmoplastico con scarsa rappresentazione cellulare. Le tecniche di campionamento citologico e istologico che possiamo utilizzare includono il citobrushing, con una sensibilità di circa il 45%, e la biopsia, che presenta una sensibilità del 48,1%. Quando queste tecniche vengono combinate, la sensibilità raggiunta è del 59,4%²⁶.

Ulteriore vantaggio dell'ERCP è la possibilità di drenare possibili ostruzioni biliari e posizionare all'interno della via biliare degli stent, utili come intervento terapeutico sintomatico. La complicanza principale di questa tecnica diagnostica è sicuramente la pancreatite, la maggior parte delle volte essa va incontro a risoluzione spontanea, raramente può essere severa.

- **Ecografia endoscopica (EUS):**

Sempre per via endoscopica è possibile raggiungere il duodeno e tramite una sonda ecografica valutare possibili stenosi delle vie biliari.

In uno studio retrospettivo l'accuratezza dell'EUS nel valutare stenosi maligna sembrerebbe essere simile a quella ottenuta con TC²⁷.

L'EUS permette una visualizzazione sia trasversale che longitudinale delle vie biliari distali, per questo sono stati stilati dei criteri utili per evidenziare delle stenosi che sono sospette di malignità, in particolare le caratteristiche spesso associate sono: interruzione della continuità dei tre strati della parete delle vie

biliari, massa ipoecogena di dimensioni maggiori di 5mm, spessore di parete della via biliare maggiore di 3mm con bordo esterno irregolare²⁸.

Oltre alla visualizzazione ecografica delle vie biliari è possibile tramite l'EUS-FNA (fine needle aspiration) ottenere dei campioni citologici delle lesioni delle vie biliari, questa tecnica però presenta dei limiti nella capacità di stabilire la natura della lesione, se maligna o benigna, ed inoltre a volte non riesce ad ottenere una quantità sufficiente di tessuto da essere analizzato tramite tecniche ancillari. Per questo motivo si è cercato di superare i limiti della FNA sviluppando l'EUS-FNB (fine needle biopsy), questa tecnica ci ha permesso di ottenere dei campioni istologici di tessuto intatto aumentando l'accuratezza diagnostica sia nei tumori solidi pancreatici che non pancreatici, tra i quali sono presenti i CCA. Un altro vantaggio apportato dall'FNB risulta essere legato al minor numero di tentativi di campionamento necessari per raggiungere la diagnosi, diminuendo quindi i costi e le tempistiche. Comparando gli eventi avversi relativi all'applicazione delle due tecniche risultano essere simili, motivo per cui spesso la FNB viene preferita²⁹.

L'EUS è una tecnica diagnostica molto studiata in quanto ha un'ottima applicazione nei CCA, in particolare è stata confrontata con l'ERCP, ritenuta il gold standard diagnostico per la diagnosi di CCA.

L'ERCP ha dimostrato di avere un potere diagnostico limitato nella valutazione della malignità delle lesioni stenotiche con brushing e con biopsia, anche combinando le due tecniche. Secondo gli ultimi dati la sensibilità diagnostica dell'EUS-FNA risulterebbe essere compresa tra 73,6% e 81,5%, la biopsia tramite ERCP da sola raggiungerebbe una sensibilità del 67%, per il solo brushing la sensibilità è del 56%, mentre combinando le due tecniche si ha un 70% di sensibilità^{26 28 30}.

- **Colangiografia percutanea transepatica (PTC):**

Una tecnica diagnostica maggiormente invasiva utilizzata per visualizzare le vie biliari è la PTC, tramite un ecografo il radiologo valuta le vie biliari dilatate, a questo punto si punge il fegato per via transcostale e si avvanza il catetere nelle vie biliari dove si inietta mezzo di contrasto. La valutazione radiologica permetterà di osservare presenza o assenza di ostruzione e possibile causa, inoltre questo

intervento può essere anche terapeutico in quanto è possibile derivare all'esterno la bile evitando l'iperbilirubinemia associata all'ittero ostruttivo.

La sua applicazione è limitata dall'invasività della tecnica, per questo si preferiscono indagini meno invasive quali ERCP e colangiogrammi.

- **Colangioscopia con sistema Digital single-operator
Cholangioscopy (D-SOC):**

La colangioscopia è una tecnica applicata nell'ambito dell'ERCP. All'interno della papilla viene inserita un'ottica che permette la visualizzazione diretta delle vie biliari. La visione diretta delle vie biliari è possibile sin dagli anni 70', ma solo ultimamente con l'avanzamento della tecnologia del sistema SpyGlass è stata possibile un'applicazione diagnostica e terapeutica.

Nel 2006 è stato introdotto il nuovo sistema SpyGlass DS, che sta per digital e simple, esso è formato da un controller (SpyDS) e da un catetere monouso (SpyScope).

Le innovazioni principali in questa tecnica di ultima generazione sono legate al numero di operatori necessari nella gestione del dispositivo. In passato erano necessari due operatori i quali controllavano uno il duodenoscopio e l'altro il colangioscopio, oggi invece il sistema può essere gestito da un solo endoscopista. L'obiettivo principale della colangioscopia nelle lesioni stenotiche delle vie biliari è la valutazione della malignità e degli aspetti macroscopici suggestivi di lesioni tumorali, come ad esempio: presenza di neovascolarizzazione, papille aggettanti nel lume e vasi tortuosi. Il limite della valutazione diretta della lesione è l'assenza di criteri standardizzati utili per classificarle.

Il ridotto valore diagnostico legato alla valutazione ottica rende necessario l'approfondimento biptico, il quale essendo guidato tramite visione diretta della lesione ha maggiore sensibilità (69%) e specificità (98%) nel determinare lesioni stenotiche maligne³¹.

Un aspetto limitante della biopsia delle vie biliari è rappresentato dalla difficoltà nel processare il materiale biopsiato, per questo sono state sviluppate nuove tecniche come quella cell block, la quale sembrerebbe diminuire il numero di

artefatti pur presentando sempre problemi dettati dalla scarsa cellularità e da sezioni subottimali.

Ulteriore applicazione della colangioscopia, nella fase successiva alla diagnosi del CCA, è la valutazione dell'estensione della lesione. La scelta del trattamento dipenderà dall'estensione del CCAp, poiché le opzioni terapeutiche variano significativamente a seconda del tipo di coinvolgimento delle vie biliari³².

1.9 TERAPIA

Terapia Chirurgica

La chirurgia ad oggi è una delle più importanti opzioni terapeutiche per i soggetti affetti da CCA, uno studio della Mayo Clinic of Florida ha dimostrato un aumento della sopravvivenza mediana dopo chirurgia sia in pazienti affetti da CCAi che CCAe rispetto ai non trattati (21,9 mesi vs 6,8 mesi)³³.

Il limite principale delle tempistiche di intervento è rappresentato dal ritardo diagnostico causato dalla scarsa sintomatologia, per questo non sempre è possibile perseguire questo percorso terapeutico e sarà necessario intraprendere un trattamento di tipo palliativo. Si è visto che la maggior parte dei CCAi presentano un ampio diametro tumorale alla diagnosi con una mediana intorno ai 6cm³⁴. La terapia chirurgica non può essere sempre perseguita per questo sono stati stilati dei criteri di non resecabilità: metastasi epatiche, polmonari, peritoneali e ai linfonodi extraregionali (paraortici ed extraperitoneali).

L'obiettivo della chirurgia è, per quanto possibile, ottenere margini completamente negativi (R0) con un adeguato volume di fegato residuo funzionante (future liver remnant, FLR). Nei CCAi resecabili, la resezione R0 è raccomandata in quanto migliora la prognosi, inoltre in corso di chirurgia è necessaria anche la linfadenectomia regionale di almeno 6 linfonodi, non tanto per migliorare la prognosi, quanto per aumentare le capacità stadiative e quindi per un miglior management terapeutico. Anche nei CCAe quando possibile la terapia di scelta è di tipo chirurgico con margini R0 associata a linfadenectomia.

Il tipo di intervento chirurgico dipende dalla localizzazione tumorale. In particolare, se è interessato il terzo medio e distale della via biliare principale, l'intervento di scelta sarà la duodenocefalopancreasectomia. Nei CCAP oltre alla resezione dell'ilo epatico si dovrà asportare il lobo caudato ed a seconda che il tumore interessi il dotto epatico di destra o di sinistra sarà necessaria un'epatectomia, successivamente sarà necessario ricostituire la continuità delle vie biliari confezionando un'anastomosi bilio-digestiva. I casi di CCAP di tipo 4 secondo la classificazione di Bismuth Chorlette non sono più una controindicazione assoluta alla resezione in quanto si è visto che la chirurgia è associata ad una sopravvivenza simile a pazienti con estensione minore alle vie biliari. La resezione e la ricostruzione della vena porta e dell'arteria epatica sono procedure chirurgiche che stanno aumentando favorendo anche un aumento di soggetti elegibili a terapia, il limite per la ricostruzione di questi vasi è di un interessamento maggiore di 180° (abutment). Prima di praticare la laparotomia in sala operatoria si procede ad una laparoscopia esplorativa a scopo stadiativo per escludere possibili metastasi che possono interessare circa un 15% dei pazienti candidati ad intervento³⁵. I pazienti affetti da metastasi a distanza ed interessamento aortocavale o dei linfonodi non risultano beneficiare di resezione chirurgica³⁶.

Il futuro della terapia chirurgica è pertanto correlato alle capacità stadiative preoperatorie, finalizzate ad un minor numero di interventi R1. Inoltre un altro fattore importante è la capacità di definire il FLR in maniera più precisa per evitare possibili insufficienze epatiche⁶.

Terapia adiuvante

La terapia adiuvante è stata valutata in svariati studi (BCAT, PRODIGE-12, BILCAP), l'unico in cui sono stati ottenuti dati significativi è il BILCAP, dove i pazienti affetti da CCA sono stati sottoposti a trattamento con capecitabina, per questo dal 2019 tale trattamento adiuvante è entrato nelle linee guida³⁷.

Chemioterapia palliativa

In soggetti in cui la terapia chirurgica non può essere percorsa, si potrà scegliere la chemioterapia a scopo palliativo, essa deve essere praticata tenendo conto di alcuni dati:

- Valutazione dello stato del paziente tramite scale come la ECOG-PS, se maggiore o uguale a 3 è poco probabile che il soggetto benefici di questa opzione terapeutica.
- Distribuzione di malattia.
- Accessibilità del tumore.

La terapia di prima linea maggiormente applicata in pazienti con malattia avanzata è un'associazione di gemcitabina e cisplatino³⁸.

Negli ultimi tempi si stanno valutando chemioterapie più intense con 3 farmaci associati come cisplatino e, gemcitabina combinate con nab paclitaxel³⁹; un'alternativa potrebbe essere il regime terapeutico folfirinox (5-fluorouracile, irinotecano, oxaliplatino).

Target therapy

La valutazione del profilo molecolare del tessuto tumorale sta diventando sempre più importante in quanto ci permette di applicare alcune terapie personalizzate come gli inibitori dell'IDH1 e del IDH2 utili nei CCAi⁴⁰.

Altra terapia target che si sta valutando nell'ambito dei CCA sono gli inibitori del FGFR⁴¹.

Immunoterapia

I dati clinici sull'immunoterapia nei CCA sono ancora limitati ma sta aumentando l'interesse della comunità scientifica verso questo tipo di terapia, in particolare verso i farmaci inibitori del checkpoint (ICIs), i vaccini e la terapia cellulare adottiva. Nei pazienti con CCA inoltre si sta lavorando per identificare biomarker utili per definire i pazienti che possono beneficiare di tale terapia, i principali sono: l'instabilità microsatellitare (MSI), il tumor mutational burden (TMB), l'espressione di PD-1/PD-L1, il fenotipo immunologico ed altri aspetti genetici⁴².

Gli studi KEYNOTE 158 e KEYNOTE 028 hanno valutato l'efficacia terapeutica degli ICI nei CCA, nel primo caso si è avuto una risposta nel 5,8% dei soggetti con un aumento di sopravvivenza mediana globale di 7,5 mesi (95%, IC), nel secondo studio invece la risposta alla terapia è stata riscontrata nel 13% dei casi e l'aumento della sopravvivenza mediana è stato di 6,2 mesi (95%, IC). La tossicità del farmaco è gestibile ma l'evento avverso peggiore riscontrato nella popolazione tratta è stata l'insufficienza renale⁴³. Sono stati condotti altri studi su un altro ICI, il nivolumab, dai quali è emerso che la risposta terapeutica a questo farmaco è dettata principalmente dall'espressione di PD-L1⁴⁴. Un altro ICI su cui si è indagato è il durvalumab, in particolare si è visto che in pazienti asiatici con CCA trattati con tale farmaco la mediana di sopravvivenza aumentava di 8,1 mese tuttavia gli effetti avversi erano presenti nel 19% della casistica⁴⁵.

Oltre alla monoterapia con ICI si sta valutando anche l'efficacia della terapia di associazione degli ICI con inibitori delle tirosinchinasi (TKI), chemioterapia, terapia con cellule T e radioterapia. Si è valutata l'efficacia del regorafenib (ICI) associato con avelumab (TKI), dallo studio è emerso che la mediana di sopravvivenza della popolazione era aumentata di 11,8 mesi (95%, IC)⁴⁶.

La vaccinazione per il CCA è ancora in fase di studio, il razionale di questa terapia è legato alla stimolazione dell'attività immunitaria dell'individuo contro le cellule tumorali. I vaccini a mrna sono un importante strumento da sviluppare nella terapia dei CCA in quanto facilmente modificabili ed efficaci nel promuovere la difesa immunitaria contro il tumore, ma la notevole eterogeneità dei CCA può essere un limite, per questo si sta ancora valutando l'efficacia di questo approccio terapeutico.

Un'ulteriore alternativa è la terapia di trasferimento delle cellule, l'efficacia della terapia CAR-T nei CCA deve essere ancora confermata, mentre la sua applicazione è stata confermata nella leucemia linfoblastica acuta⁴⁷.

2.SCOPO DELLO STUDIO

Endpoint primario

- Valutazione della capacità diagnostica della D-SOC e delle biopsie guidate da D-SOC nella diagnosi dei colangiocarcinomi extraepatici

Endpoint secondario

- Confronto della capacità diagnostica della D-SOC e delle biopsie guidate da D-SOC nella diagnosi dei colangiocarcinomi extraepatici tra i pazienti sottoposti a questa procedura prima e dopo il 2020.
- Capacità diagnostica del Ca 19.9 tra soggetti affetti da patologia benigna e quelli affetti da patologia maligna
- Capacità delle D-SOC guided biopsies nella definizione dell'estensione di malattia

3.MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto uno studio osservazionale retrospettivo su una popolazione di 93 pazienti (63 uomini, 30 donne; età media 67 anni e range di età 39-84 anni) sottoposti a ERCP presso la Clinica di Gastroenterologia e la SOD di Gastroenterologia di Ancona tra il 20/04/2016 e il 12/04/2022. I dati sono stati ricavati dai database della Clinica di Gastroenterologia e della SOD di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche.

I pazienti avevano differente provenienza, sia dall'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche che da altri ospedali. Nello studio sono stati inclusi pazienti con stenosi delle vie biliari, pazienti con aumento dei marker oncologici, soggetti con sintomatologia clinica riconducibile a stenosi delle vie biliari e soggetti con CCA noto. I pazienti inclusi nello studio sono stati valutati per sintomatologia clinica, esami di laboratorio specifici

per ostruzioni delle vie biliari, ERCP con valutazione colangiografica e colangioscopica ed infine ad approfondimenti citologici ed istologici, ove disponibili.

La popolazione è stata divisa in due gruppi, a seconda della data in cui è stato svolto l'ERCP. Il primo gruppo conteneva persone con ERCP precedente al 01/01/2020 mentre l'altro gruppo era formato da pazienti con ERCP svolto successivamente. Tale data coincide con l'adozione di un nuovo colangioscopio con migliorate caratteristiche ottiche. Prima del 2020 si è utilizzato come strumento lo Spyglass DS System (Boston Scientific) che successivamente è stato sostituito dallo strumento Spyglass DSII System (Boston Scientific). Inoltre, nello stesso periodo, per la valutazione dei campioni prelevati durante gli esami, ci si è avvalsi di un citopatologo dedicato. Le procedure endoscopiche sono state eseguite in condizioni di sedazione cosciente, ottenuta tramite infusione e.v. di midazolam e petidina. Durante le D-SOC, in sala endoscopica, oltre al gastroenterologo, erano presenti due infermieri e, per la maggior parte degli esami, un anatomopatologo.

Inoltre, sono stati analizzati in maniera retrospettiva i pazienti affetti da CCAp che sono stati sottoposti a D-SOC e D-SOC guided biopsy tra il 2017 e 2021 al fine di valutare l'estensione intraduttale del tumore in fase pre-operatoria in modo da ottenere una migliore definizione dei tumori potenzialmente resecabili. L'accuratezza della valutazione endoscopica e del campionamento istologico sono state comparate con il pezzo chirurgico.

I dati raccolti saranno riassunti tramite un'appropriata statistica descrittiva. I risultati saranno forniti come numeri (percentuali) per le variabili discrete e mediana (intervallo) per le variabili continue e come frequenze e percentuali per le variabili categoriche.

Criteri di inclusione:

- Età maggiore di 18 anni.
- Pazienti sottoposti a ERCP tra il 2016 e 2022

Criteri di esclusione:

- Impossibilità all'incannulazione della papilla
- Instabilità emodinamica

4. RISULTATI

La popolazione analizzata presentava un'età media di 67 anni, mentre la mediana si attestava intorno ai 70 anni, fascia di età tipica dove si presentano più frequentemente i tumori delle vie biliari. Nel campione preso in esame vi era prevalenza di soggetti maschi (n=63; 67,7%) ed una minoranza di pazienti femmine (n=30; 32,3%), di questi la maggior parte erano già stati sottoposti a ERCP in precedenza.



FIG 2. Età dei pazienti

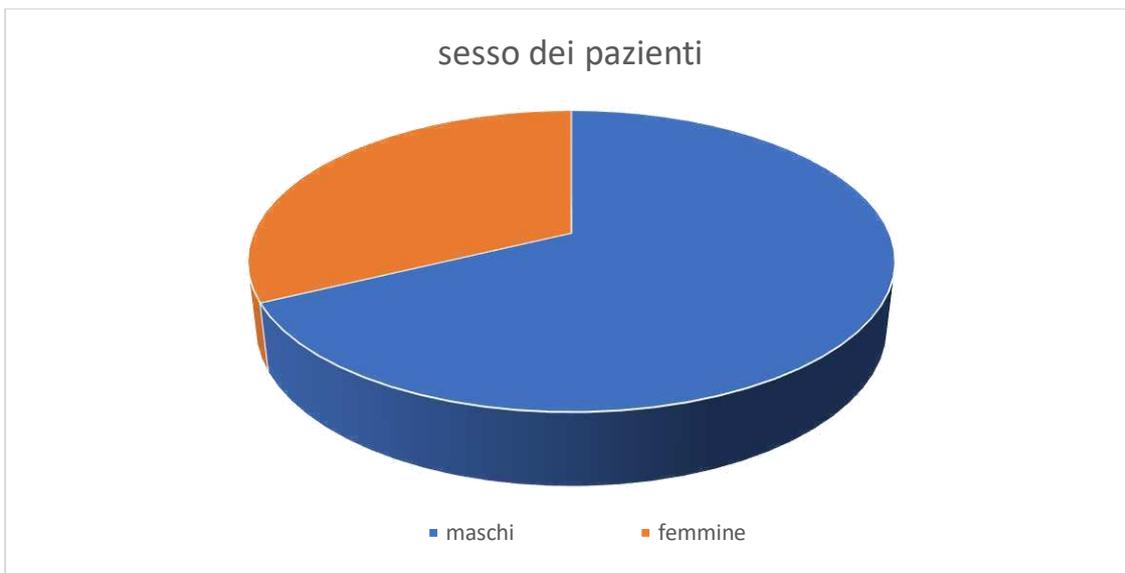


FIG 3. Sesso dei pazienti

In 41 soggetti l'indicazione è risultata essere la valutazione di stenosi indeterminata mentre in altri 27 pazienti l'esame aveva uno scopo stadiativo; nella restante sottopopolazione il quesito clinico riguardava la valutazione di sintomi legati all'innalzamento della bilirubina, innalzamento marker oncologici e sostituzione protesi biliari.

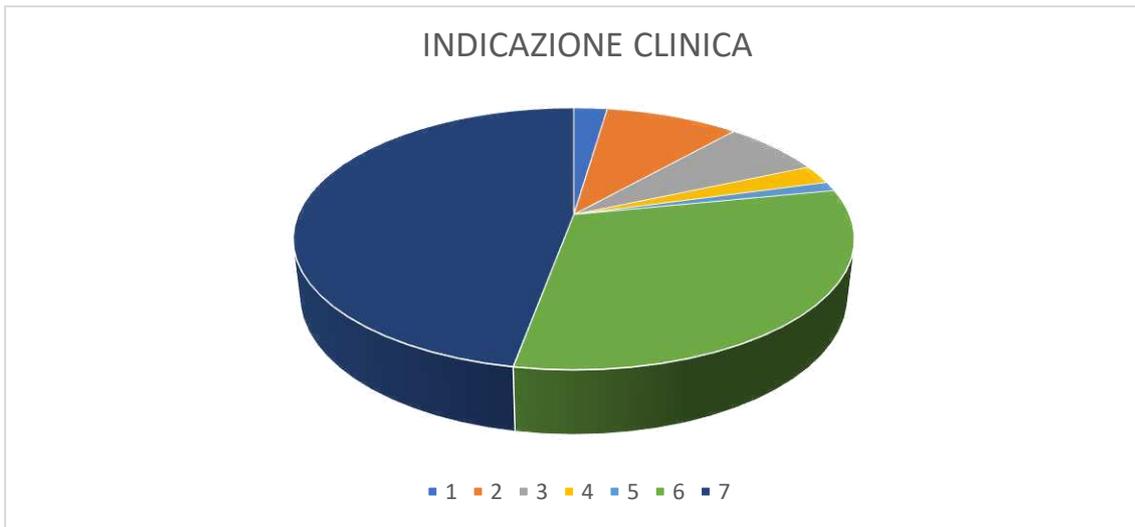


FIG 4. Indicazione clinica all'approfondimento diagnostico con D-SOC

1. Sintomatologia clinica, 2. stenosi del coledoco, 3. stenosi dell'ilo epatico, 4. Stenosi dei dotti epatici, 5. Protesi biliare, 6. Stadiazione, 7. stenosi indeterminata.

I pazienti presenti nello studio presentano differente provenienza:

1. Clinica di Gastroenterologia e la Gastroenterologia di Ancona
2. Chirurgia Epato-biliare e dei Trapianti
3. Reparto di Oncologia
4. Reparto di Clinica Medica
5. Ospedale di Jesi
6. Ospedale di Fano



FIG 5. Provenienza pazienti inclusi nello studio

RISULTATI D-SOC GUIDED BIOPSY vs D-SOC

Sensibilità e specificità della D-SOC guided biopsy valutata nell'intera popolazione risultano essere 30% e 100%, mentre per quanto riguarda l'aspetto colangioscopico alla D-SOC si sono ottenuti valori di sensibilità e specificità pari a 94% e 63%.

RISULTATI D-SOC e D-SOC guided biopsy pre e post 2020

Nel gruppo di pazienti sottoposti a D-SOC guided biopsy prima del 2020 la sensibilità e la specificità sono risultate pari a 16% e 100%, in tale gruppo la valutazione colangioscopica con D-SOC presenta una sensibilità del 91% e specificità del 33%.

Nel campione di popolazione sottoposti a D-SOC guided biopsy dopo il 2020 la sensibilità è risultata essere del 70% e la specificità del 100%. Invece per quanto riguarda i soggetti sottoposti a valutazione colangioscopica tramite D-SOC la sensibilità e la specificità risultano ambedue pari al 100%.

VARIABILI	SENSIBILITÀ	SPECIFICITÀ
D-SOC guided biopsy su popolazione totale	30%	100%
D-SOC guided biopsy su popolazione prima del 2020	16%	100%
D-SOC guided biopsy su popolazione dopo il 2020	70%	100%
D-SOC su popolazione totale	94%	63%
D-SOC su popolazione prima del 2020	91%	33%
D-SOC su popolazione dopo il 2020	100%	100%

Tab. 3 Sensibilità e specificità della D-SOC e D-SOC guided biopsy nei vari campioni

RISULTATI CA19.9

I valori di Ca19.9 sono stati confrontati tra la popolazione affetta da patologia benigna e quella affetta da patologia maligna, non sono emersi dati statisticamente significativi utili per differenziare le due popolazioni (p-value=0,21, IC 95%). L'unico aspetto da sottolineare è che in soggetti affetti da CCA il Ca 19.9 si attestava su valori maggiori.

RISULTATI ESTENSIONE CCA CON D-SOC

Tra i 48 pazienti sottoposti a intervento chirurgico per CCAp, i casi di 6 pazienti, con una dubbia estensione di malattia a livello delle vie biliari, sono stati discussi multidisciplinariamente per valutare la resecabilità del tumore. Sono stati pertanto valutati l'aspetto colangioscopico tramite D-SOC e le D-SOC guided biopsy utili a questa finalità (M:F 5:1, Età media alla diagnosi di 67 anni). L'estensione di malattia è stata valutata in 12 casi tramite l'aspetto colangioscopico mediante D-SOC (7 del dotto epatico comune, 2 del dotto epatico destro e 3 del dotto epatico sinistro).

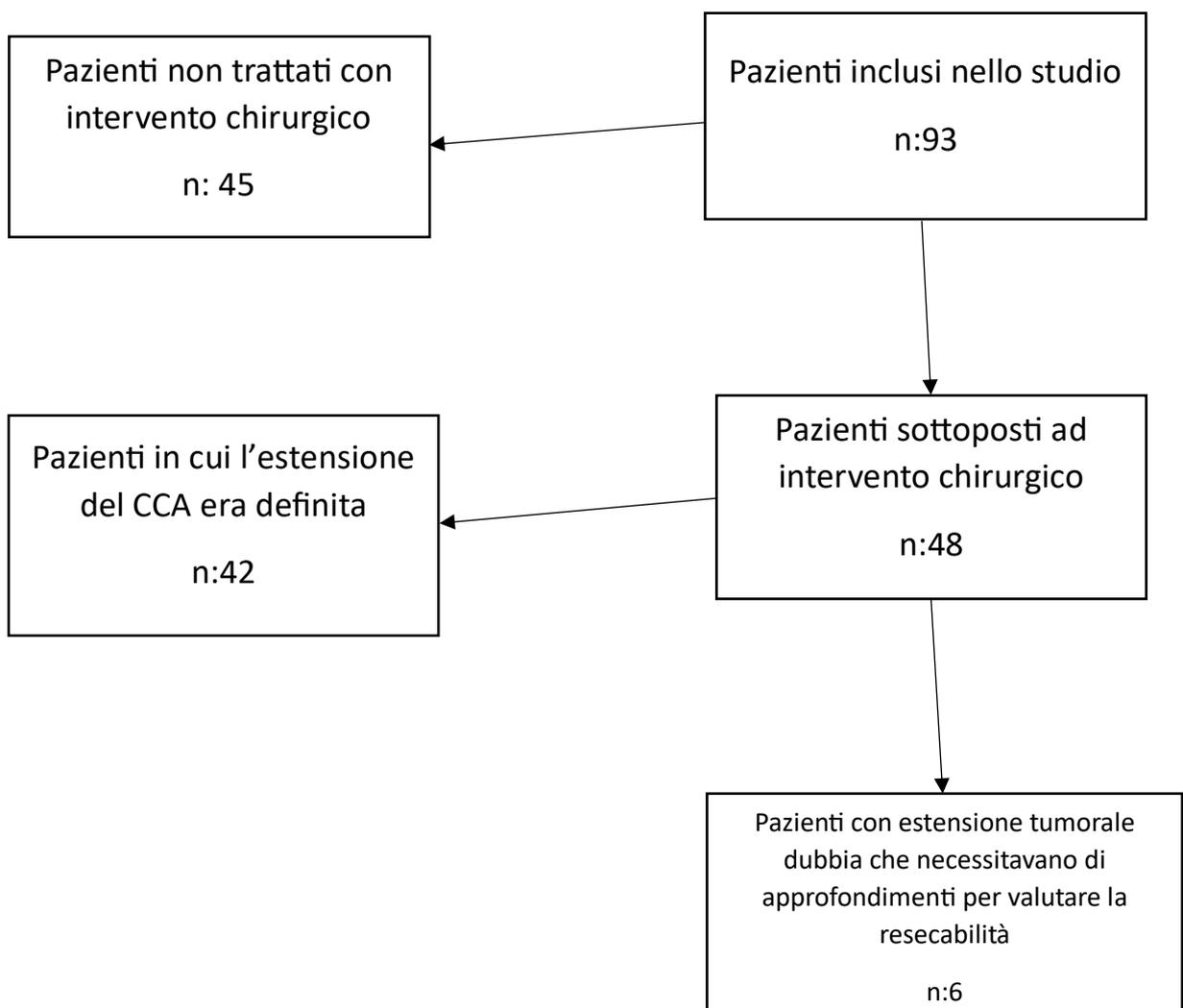


FIG. 6 Flow chart per la selezione dei pazienti che richiedono un ulteriore approfondimento diagnostico a causa di un'estensione incerta del carcinoma colangiocellulare (CCA).

La concordanza fra la D-SOC guided biopsy e la valutazione istologica del pezzo chirurgico è pari all'83% (10/12) con 6/6 veri positivi, 4/6 veri negativi e 2/6 falsi negativi. Tra i falsi negativi istologici, il primo caso presentava un aspetto colangioscopico compatibile con estensione di CCA, quindi il risultato del D-SOC guided biopsy non ha influenzato la scelta terapeutica. Nel secondo falso negativo istologico, la valutazione del campione chirurgico ha mostrato invasione perineurale e sviluppo del tumore periduttale. La chirurgia radicale è stata raggiunta in tutti e 6 i pazienti.

In 11 soggetti è stato eseguito un brushing delle vie biliari, quindi solo il 12,7% della popolazione ha eseguito questa procedura, 4 di essi presentavano una citologia C1, 3 avevano atipie cellulari di tipo C2, mentre il resto sono stati classificati come C5.

Le biopsie sono state praticate in 55 soggetti dei 93 considerati, 39 dei quali presentavano come risultato del referto istologico assenza di displasia, mentre in 9 casi la diagnosi è stata di CCA. I rimanenti 7 pazienti valutati avevano un grado di alterazioni istologiche insufficienti per definire il tessuto come maligno, perciò in 5 casi le atipie sono state considerate come displasia di basso grado mentre in 2 casi di alto grado.

In 72 dei 93 pazienti presi in considerazione sono state eseguite D-SOC guided biopsy. In 54 pazienti il referto definiva un'assenza di displasia, mentre in 1 paziente la displasia era di basso grado ed in 3 di alto grado. Infine nei rimanenti 14 pazienti il referto descriveva la presenza di CCA.

variabili	N° pazienti
Brushing	11
C1	4 (36,4%)
C2	3 (27,2%)
C3	0
C4	0
C5	4 (36,4%)
Biopsie	55
Assenza di displasia	39 (70,9%)
Displasia di basso grado	5 (9%)
Displasia di alto grado	2 (3,7%)
CCA	9 (16,4%)
D-SOC guided biopsy	72
Assenza di displasia	54 (75%)
Displasia di basso grado	1 (1,4%)
Displasia di alto grado	3 (4,2%)
CCA	14 (19,4%)

Tab. 4 Risultati ottenuti con le tecniche di Brushing, Biopsia e D-SOC guided biopsy.

5.CONCLUSIONI

L'endpoint primario dello studio è stato il confronto tra D-SOC guided biopsy e l'aspetto colangioscopico alla D-SOC in termini di accuratezza diagnostica nell'intera popolazione in esame. Ciò è stato fatto confrontando i risultati delle due metodiche con la diagnosi finale. In particolare, la D-SOC guided biopsy è risultata essere scarsamente sensibile ma molto specifica, mentre la valutazione dell'aspetto colangioscopico alla D-SOC al contrario è maggiormente sensibile ma meno specifico. Nel primo caso la diminuita sensibilità correla con un aumentato numero di falsi negativi, mentre nel secondo caso la diminuita specificità favorisce un aumento di falsi positivi. Confrontando i risultati ottenuti nello studio per sensibilità e specificità con quelli della letteratura si può osservare una concordanza. Per quanto riguarda l'aspetto colangioscopico alla D-SOC l'intervallo di sensibilità e specificità nella diagnosi di stenosi maligne secondo la letteratura è rispettivamente di 83,3% - 100% e 64,2% - 82,6%^{48 49 50}.

La maggiore sensibilità della D-SOC nella valutazione rispetto alla D-SOC guided biopsy potrebbe essere attribuita alla maggior soggettività nella valutazione macroscopica delle lesioni indeterminate, che potrebbe essere influenzata anche dalla presenza di criteri classificativi imperfetti. In relazione alla D-SOC guided biopsy la letteratura afferma che la sensibilità si attesta tra il 71% e il 100%, mentre la specificità si aggira tra il 96,7% e il 100%^{48 49 51 52}.

Successivamente è stata fatta una valutazione nella popolazione sottoposta a D-SOC e D-SOC guided biopsy prima del 2020 e dopo al fine di valutare l'impatto dell'esperienza acquisita dagli operatori sulle capacità diagnostiche delle metodiche considerate. Da questa valutazione è emerso un risultato interessante; infatti nella popolazione sottoposta a D-SOC guided biopsy prima del 2020, pur riscontrando un'alta specificità, le biopsie erano estremamente poco sensibili con un alto tasso di falsi negativi. Confrontando invece i pazienti sottoposti a D-SOC guided biopsy dopo il 2020 si è visto un aumento notevole della sensibilità e quindi un aumento dell'accuratezza diagnostica. Gli stessi risultati sono stati ottenuti confrontando l'aspetto colangioscopico alla D-SOC prima e dopo il 2020 con un miglioramento dell'accuratezza diagnostica a tal punto che in quasi tutti i casi post 2020 la diagnosi finale corrispondeva con il referto colangioscopico. I risultati ottenuti sembrerebbero essere dovuti principalmente al cambio di strumento ottico utilizzato per

la visualizzazione delle vie biliari, il quale ha permesso un campionamento istologico più puntuale delle aree ad alto significato diagnostico. Un altro fattore che ha contribuito alla differente capacità diagnostica nelle due popolazioni sembrerebbe essere legato al cambio di anatomopatologo e alla formazione sviluppata da quest'ultimo. Infine, un fattore importante è sicuramente rappresentato dall'aumentato training endoscopico degli operatori della Clinica e della Divisione di Gastroenterologia di Ancona che coadiuvati da una migliore strumentazione tecnologica hanno potuto raggiungere questi risultati positivi in ambito diagnostico per patologie complesse come i CCA.

Nella popolazione sottoposta a D-SOC e biopsia guidata con D-SOC dopo il 2020, i valori di sensibilità e specificità rientrano nell'intervallo riportato nella letteratura scientifica. Tuttavia, per la popolazione sottoposta a procedure precedenti al 2020, non vi è concordanza nei valori di specificità riguardanti l'aspetto colangioscopico con D-SOC (33%), i quali risultano leggermente inferiori nel nostro studio.

Un altro dato che non coincide con quanto riportato nella letteratura riguarda la sensibilità della biopsia guidata con D-SOC (16%), anch'essa inferiore rispetto ai dati documentati nella letteratura (71%-100%)^{48 49 50 51 52}.

Nella valutazione finale è stato possibile prendere in considerazione 93 pazienti in cui è stato valutato il Ca 19.9, importante marker tumorale delle patologie maligne della via biliare, che però non ha dimostrato livelli significativamente differenti tra pazienti affetti da CCAP e soggetti con stenosi benigne delle vie biliari. Infatti valori elevati di questo marker possono essere presenti anche in soggetti privi di tumore, motivo per cui valori elevati di Ca 19.9, come anche dai dati di letteratura, non permettono singolarmente una diagnosi di malignità⁵³.

Per quanto riguarda la valutazione pre operatoria dell'estensione di malattia, pur avendo un campione di dimensioni limitate a disposizione, i risultati suggeriscono che l'aspetto colangioscopico alla D-SOC e D-SOC guided biopsy hanno un'alta sensibilità e specificità. Per questo la loro applicazione oltre alla diagnosi di malattia è stata estesa alla stadiazione della malattia, in quanto ci permettono di definire i pazienti con CCAP potenzialmente resecabile elegibili a chirurgia.

I risultati ottenuti nel nostro studio sono coerenti con quanto riportato nella letteratura scientifica, la quale sostiene l'alta capacità dell'aspetto colangioscopico alla D-SOC e della D-SOC guided biopsy nel determinare l'estensione tumorale. Questi risultati confermano l'importante ruolo di queste procedure nel trattamento chirurgico curativo dei pazienti affetti da colangiocarcinoma (CCA), dove la resezione R0 rappresenta un fattore chiave per la sopravvivenza a lungo termine ⁵⁴.

BIBLIOGRAFIA

1. Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Maruyama T, Ohashi T, Korira PV, Ajioka Y, Hatakeyama K. Clinicopathological features of benign biliary strictures masquerading as biliary malignancy. *Am Surg*. 2012 Dec;78(12):1388-91. PMID: 23265129.
2. Bismuth H, Corlette MB. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140:170-178.
3. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int*. 2019 May;39 Suppl 1:19-31. doi: 10.1111/liv.14095. Epub 2019 Mar 24. PMID: 30851228.
4. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020 Jan;72(1):95-103. doi: 10.1016/j.jhep.2019.09.007. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31536748.
5. Vithayathil M, Khan SA. Current epidemiology of cholangiocarcinoma in Western countries. *J Hepatol*. 2022 Dec;77(6):1690-1698. doi: 10.1016/j.jhep.2022.07.022. Epub 2022 Aug 14. PMID: 35977611.
6. Linee Guida Tumori Delle Vie Biliari. AIOM-Associazione Italiana Oncologia Medica. Edizione 2019.
7. Robbins and Cotran: le basi patologiche delle malattie.
8. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb;15(2):95-111. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.157. Epub 2017 Oct 10. PMID: 28994423; PMCID: PMC5819599.
9. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020 Jan;72(1):95-103. doi: 10.1016/j.jhep.2019.09.007. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31536748.
10. Khan SA, Tavolari S, Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int*. 2019 May;39 Suppl 1:19-31. doi: 10.1111/liv.14095. Epub 2019 Mar 24. PMID: 30851228.

11. Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, Conner EA, Gillen MC, Roskams T, Roberts LR, Factor VM, Thorgeirsson SS. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):1021-1031.e15. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.005. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22178589; PMCID: PMC3413201.
12. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013 Dec;145(6):1215-29. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.013. Epub 2013 Oct 15. PMID: 24140396; PMCID: PMC3862291.
13. Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoie KD, Yeo CJ, Cameron JL. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg*. 1996 Oct;224(4):463-73; discussion 473-5. doi: 10.1097/00000658-199610000-00005. PMID: 8857851; PMCID: PMC1235406.
14. Albores-Saavedra J, Chablé-Montero F, Méndez-Sánchez N, Mercado MÁ, Vilatoba-Chapa M, Henson DE. Adenocarcinoma with pyloric gland phenotype of the extrahepatic bile ducts: a previously unrecognized and distinctive morphologic variant of extrahepatic bile duct carcinoma. *Hum Pathol*. 2012 Dec;43(12):2292-8. doi: 10.1016/j.humpath.2012.04.003. Epub 2012 Jul 15. PMID: 22795356.
15. Terada T, Nakanuma Y, Ohta T, Nagakawa T. Histological features and interphase nucleolar organizer regions in hyperplastic, dysplastic and neoplastic epithelium of intrahepatic bile ducts in hepatolithiasis. *Histopathology* 1992; 21: 233– 40.
16. . Zen Y, Aishima S, Ajioka Y, Haratake J, Kage M, Kondo F, Nimura Y, Sakamoto M, Sasaki M, Shimamatsu K, Wakasa K, Park YN, Chen MF, Atomi Y, Nakanuma Y. Proposal of histological criteria for intraepithelial atypical/proliferative biliary epithelial lesions of the bile duct in hepatolithiasis with respect to cholangiocarcinoma: preliminary report based on interobserver agreement. *Pathol Int*. 2005 Apr;55(4):180-8. doi: 10.1111/j.1440-1827.2005.01816.x. PMID: 15826244.

17. Duraker N, Sisman S, Can G: The significance of perineural invasion as a prognostic factor in patients with gastric carcinoma. *Surg Today*. 2003, 33: 95-100. doi: 10.1007/s005950300020.
18. Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, Pawlik TM. Treatment and Prognosis for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg*. 2014 Jun;149(6):565-74. doi: 10.1001/jamasurg.2013.5137. PMID: 24718873.
19. Tan X, Sivakumar S, Bednarsch J, Wiltberger G, Kather JN, Niehues J, de Vos-Geelen J, Valkenburg-van Iersel L, Kintsler S, Roeth A, Hao G, Lang S, Coolsen ME, den Dulk M, Aberle MR, Koolen J, Gaisa NT, Olde Damink SWM, Neumann UP, Heij LR. Nerve fibers in the tumor microenvironment in neurotropic cancer-pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2021 Feb;40(5):899-908. doi: 10.1038/s41388-020-01578-4. Epub 2020 Dec 7. PMID: 33288884; PMCID: PMC7862068.
20. Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver*. 2017 Jan 15;11(1):13-26. doi: 10.5009/gnl15568. PMID: 27928095; PMCID: PMC5221857.
21. 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 Jan;95(1):204-7. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01685.x. PMID: 10638584.
22. Tao LY, Cai L, He XD, Liu W, Qu Q. Comparison of serum tumor markers for intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Am Surg*. 2010 Nov;76(11):1210-3. PMID: 21140686.
23. Asayama Y, Yoshimitsu K, Irie H, Tajima T, Nishie A, Hirakawa M, Nakayama T, Kakihara D, Taketomi A, Aishima S, Honda H. Delayed-phase dynamic CT enhancement as a prognostic factor for mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Radiology*. 2006 Jan;238(1):150-5. doi: 10.1148/radiol.2381041765. Epub 2005 Nov 22. PMID: 16304089.
24. Isram J, Haider E, Khan RSA, Hafeez M, Hinna RE, Baig I, Shahid A, Chaudhry M. Diagnostic Accuracy of Magnetic Resonance Cholangiopancreatography in Comparison With Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography for

- Detection of the Etiology of Obstructive Jaundice. *Cureus*. 2023 Feb 1;15(2):e34484. doi: 10.7759/cureus.34484. PMID: 36874324; PMCID: PMC9982695.
25. Masselli G, Gualdi G. Hilar cholangiocarcinoma: MRI/MRCP in staging and treatment planning. *Abdom Imaging*. 2008 Jul-Aug;33(4):444-51. doi: 10.1007/s00261-007-9281-6. PMID: 17638040.
 26. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2015 Jan;81(1):168-76. doi: 10.1016/j.gie.2014.09.017. Epub 2014 Nov 1. PMID: 25440678; PMCID: PMC4824293.
 27. Heinzow H.S., Kammerer S., Rammes C., Wessling J., Domagk D., Meister T. Comparative analysis of ERCP, IDUS, EUS and CT in predicting malignant bile duct strictures. *World J. Gastroenterol*. 2014;20:10495–10503. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10495.
 28. Yoon S.B., Moon S.H., Ko S.W., Lim H., Kang H.S., Kim J.H. Brush Cytology, Forceps Biopsy, or Endoscopic Ultrasound-Guided Sampling for Diagnosis of Bile Duct Cancer: A Meta-Analysis. *Dig. Dis. Sci*. 2022;67:3284–3297. doi: 10.1007/s10620-021-07138-4.
 29. van Riet PA, Eler NS, Bruno MJ, Cahen DL. Comparison of fine-needle aspiration and fine-needle biopsy devices for endoscopic ultrasound-guided sampling of solid lesions: a systemic review and meta-analysis. *Endoscopy*. 2021 Apr;53(4):411-423. doi: 10.1055/a-1206-5552. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32583392.
 30. Orzan RI, Pojoga C, Agoston R, Seicean R, Seicean A. Endoscopic Ultrasound in the Diagnosis of Extrahepatic Cholangiocarcinoma: What Do We Know in 2023? *Diagnostics (Basel)*. 2023 Mar 8;13(6):1023. doi: 10.3390/diagnostics13061023. PMID: 36980331; PMCID: PMC10047764.
 31. Sun, X.; Zhou, Z.; Tian, J.; Wang, Z.; Huang, Q.; Fan, K.; Mao, Y.; Sun, G.; Yang, Y. Is single-operator peroral cholangioscopy a useful tool for the diagnosis of indeterminate biliary lesion? A systematic review and meta-analysis. *Gastrointest. Endosc*. 2015, 82, 79–87.

32. Yodice M, Choma J, Tadros M. The Expansion of Cholangioscopy: Established and Investigational Uses of SpyGlass in Biliary and Pancreatic Disorders. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Feb 29;10(3):132. doi: 10.3390/diagnostics10030132. PMID: 32121412; PMCID: PMC7151166.
33. Waseem D, Tushar P. Intrahepatic, perihilar and distal cholangiocarcinoma: Management and outcomes. *Ann Hepatol*. 2017 Jan-Feb 2017;16(1):133-139. doi: 10.5604/16652681.1226927. PMID: 28051802; PMCID: PMC5630455.
34. Doussot A, Groot-Koerkamp B, Wiggers JK, Chou J, Gonen M, DeMatteo RP, Allen PJ, Kingham TP, D'Angelica MI, Jarnagin WR. Outcomes after Resection of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: External Validation and Comparison of Prognostic Models. *J Am Coll Surg*. 2015 Aug;221(2):452-61. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.04.009. Epub 2015 Apr 24. PMID: 26206643; PMCID: PMC4784264.
35. Bird N, Elmasry M, Jones R, Elniel M, Kelly M, Palmer D, Fenwick S, Poston G, Malik H. Role of staging laparoscopy in the stratification of patients with perihilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg*. 2017 Mar;104(4):418-425. doi: 10.1002/bjs.10399. Epub 2016 Nov 8. PMID: 27861766.
36. Groot Koerkamp B, Wiggers JK, Allen PJ, Busch OR, D'Angelica MI, DeMatteo RP, Fong Y, Gonen M, Gouma DJ, Kingham TP, van Gulik TM, Jarnagin WR. American Joint Committee on Cancer staging for resected perihilar cholangiocarcinoma: a comparison of the 6th and 7th editions. *HPB (Oxford)*. 2014 Dec;16(12):1074-82. doi: 10.1111/hpb.12320. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25267346; PMCID: PMC4253330.
37. Shroff RT, Kennedy EB, Bachini M, Bekaii-Saab T, Crane C, Edeline J, El-Khoueiry A, Feng M, Katz MHG, Primrose J, Soares HP, Valle J, Maithel SK. Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019 Apr 20;37(12):1015-1027. doi: 10.1200/JCO.18.02178. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30856044.
38. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J; ABC-02 Trial Investigators. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for

- biliary tract cancer. *N Engl J Med.* 2010 Apr 8;362(14):1273-81. doi: 10.1056/NEJMoa0908721. PMID: 20375404.
39. Shroff RT, Javle MM, Xiao L, Kaseb AO, Varadhachary GR, Wolff RA, Raghav KPS, Iwasaki M, Masci P, Ramanathan RK, Ahn DH, Bekaii-Saab TS, Borad MJ. Gemcitabine, Cisplatin, and nab-Paclitaxel for the Treatment of Advanced Biliary Tract Cancers: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019 Jun 1;5(6):824-830. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0270. PMID: 30998813; PMCID: PMC6567834.
 40. Abou-Alfa, G. K., Mercade, T. M., Javle, M., Kelley, R. K., Lubner, S., Adeva, J., ... & Zhu, A. X. (2019). ClarIDHy: a global, phase III, randomized, double-blind study of ivosidenib (IVO) vs placebo in patients with advanced cholangiocarcinoma (CC) with an isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation. *Annals of Oncology*, 30, v872-v873.
 41. Javle M, Lowery M, Shroff RT, Weiss KH, Springfield C, Borad MJ, Ramanathan RK, Goyal L, Sadeghi S, Macarulla T, El-Khoueiry A, Kelley RK, Borbath I, Choo SP, Oh DY, Philip PA, Chen LT, Reungwetwattana T, Van Cutsem E, Yeh KH, Ciombor K, Finn RS, Patel A, Sen S, Porter D, Isaacs R, Zhu AX, Abou-Alfa GK, Bekaii-Saab T. Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2018 Jan 20;36(3):276-282. doi: 10.1200/JCO.2017.75.5009. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29182496; PMCID: PMC6075847.
 42. Walk EE, Yohe SL, Beckman A, Schade A, Zutter MM, Pfeifer J, Berry AB; College of American Pathologists Personalized Health Care Committee. The Cancer Immunotherapy Biomarker Testing Landscape. *Arch Pathol Lab Med.* 2020 Jun;144(6):706-724. doi: 10.5858/arpa.2018-0584-CP. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31714809.
 43. Ueno, M., et al. "Pembrolizumab for advanced biliary adenocarcinoma: Results from the multicohort, phase II KEYNOTE-158 study." *Annals of Oncology* 29 (2018): viii210.
 44. Ueno M, Ikeda M, Morizane C, Kobayashi S, Ohno I, Kondo S, Okano N, Kimura K, Asada S, Namba Y, Okusaka T, Furuse J. Nivolumab alone or in combination with cisplatin plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable or recurrent biliary tract cancer: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 1 study.

- Lancet Gastroenterol Hepatol. 2019 Aug;4(8):611-621. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30086-X. Epub 2019 May 17. PMID: 31109808.
45. Stewart R, Morrow M, Hammond SA, Mulgrew K, Marcus D, Poon E, Watkins A, Mullins S, Chodorge M, Andrews J, Bannister D, Dick E, Crawford N, Parmentier J, Alimzhanov M, Babcook JS, Foltz IN, Buchanan A, Bedian V, Wilkinson RW, McCourt M. Identification and Characterization of MEDI4736, an Antagonistic Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody. *Cancer Immunol Res.* 2015 Sep;3(9):1052-62. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0191. Epub 2015 May 5. PMID: 25943534.
 46. Cousin S, Cantarel C, Guegan JP, Mazard T, Gomez-Roca C, Metges JP, Bellera C, Adenis A, Korakis I, Poureau PG, Bourcier K, Toulmonde M, Kind M, Rey C, Auzanneau C, Bessedé A, Soubeyran I, Italiano A. Regorafenib-avelumab combination in patients with biliary tract cancer (REGOMUNE): a single-arm, open-label, phase II trial. *Eur J Cancer.* 2022 Feb;162:161-169. doi: 10.1016/j.ejca.2021.11.012. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34998048.
 47. . Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(1):5-18. doi: 10.2174/1389201019666180418095526. PMID: 29667553.
 48. Laleman W, Verraes K, Van Steenberghe W, Cassiman D, Nevens F, Van der Merwe S, Verslype C. Usefulness of the single-operator cholangioscopy system SpyGlass in biliary disease: a single-center prospective cohort study and aggregated review. *Surg Endosc.* 2017 May;31(5):2223-2232. doi: 10.1007/s00464-016-5221-2. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27604370.
 49. Woo YS, Lee JK, Oh SH, Kim MJ, Jung JG, Lee KH, Lee KT. Role of SpyGlass peroral cholangioscopy in the evaluation of indeterminate biliary lesions. *Dig Dis Sci.* 2014 Oct;59(10):2565-70. doi: 10.1007/s10620-014-3171-x. Epub 2014 May 1. PMID: 24788322.
 50. Navaneethan U, Hasan MK, Lourdasamy V, Njei B, Varadarajulu S, Hawes RH. Single-operator cholangioscopy and targeted biopsies in the diagnosis of indeterminate biliary strictures: a systematic review. *Gastrointest Endosc.* 2015 Oct;82(4):608-14.e2. doi: 10.1016/j.gie.2015.04.030. Epub 2015 Jun 10. PMID: 26071061; PMCID: PMC4826032.

51. Chen YK, Pleskow DK. SpyGlass single-operator peroral cholangiopancreatography system for the diagnosis and therapy of bile-duct disorders: a clinical feasibility study (with video). *Gastrointest Endosc.* 2007 May;65(6):832-41. doi: 10.1016/j.gie.2007.01.025. PMID: 17466202.
52. Manta R, Frazzoni M, Conigliaro R, Maccio L, Melotti G, Dabizzi E, Bertani H, Manno M, Castellani D, Villanacci V, Bassotti G. SpyGlass single-operator peroral cholangioscopy in the evaluation of indeterminate biliary lesions: a single-center, prospective, cohort study. *Surg Endosc.* 2013 May;27(5):1569-72. doi: 10.1007/s00464-012-2628-2. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23233008.
53. 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 Jan;95(1):204-7. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.01685.x. PMID: 10638584.
54. Nishikawa T, Tsuyuguchi T, Sakai Y, Sugiyama H, Kishimoto T, Ohtsuka M, Miyazaki M, Yokosuka O. Preoperative assessment of longitudinal extension of cholangiocarcinoma with peroral video-cholangioscopy: a prospective study. *Dig Endosc.* 2014 May;26(3):450-7. doi: 10.1111/den.12159. Epub 2013 Aug 25. PMID: 23981193.