
**Σύγκριση ανίχνευσης της ALK με τις τεχνικές
FISH, IHC και NGS σε προχωρημένο μη
μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα**

Όνομα: Φωτίου Δημήτρης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μοριακής ογκολογίας της εταιρείας Genekor.

Ευχαριστώ πολύ την αγαπητή συνάδελφο Δρ. Τζένη Μπούρκουλα, υπεύθυνη του τμήματος Κυτταρογενετικής και τα μέλη των ομάδων Somatic και Extraction οι οποίοι υποστήριξαν το έργο. Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω βαθιά την υπεύθυνη του τμήματος Δρ. Ειρήνη Παπαδοπούλου καθώς και τον επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου μας Δρ. Γεώργιο Νασιούλα που μου έδωσαν την ευκαιρία να εργαστώ στο πεδίο της κυτταρογενετικής και παράλληλα να ολοκληρώσω την παρούσα μελέτη.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη.....	4
Abstract	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
2.1 Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος.....	20
2.3 Αναδιάταξη ALK σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).....	22
2.4 Crizotinib (κριζοτινίμπη) ένας αναστολέας ALK στην κλινική πράξη	24
2.5 Άλλοι αναστολείς ALK στην κλινική πράξη	26
2.6 Μεθοδολογία για την εκτίμηση των αναδιατάξεων της ALK σε καρκίνους του πνεύμονα	29
3. Πειραματική Μεθοδολογία.....	31
3.2 Επιλογή ιστού	31
Σε τομές βιοψιών όγκων μονιμοποιημένων με φορμαλίνη και ενσωματωμένων σε παραφίνη (FFPE) πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, εξετάστηκε η περιεκτικότητα τους σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα και η περιοχή του όγκου επισημάνθηκε από παθολογοανατόμο. Για τις εξετάσεις απαραίτητη είναι η ύπαρξη μιας περιοχής τουλάχιστον 50 ζωντανών καρκινικών κυττάρων.....	31
3.3 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH).....	32
3.4 Ανοσοϊστοχημεία	37
3.5 Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS).....	39
4. Αποτελέσματα	41
Συζήτηση.....	44
Βιβλιογραφικές Αναφορές	47

Περίληψη

Αναδιατάξεις του γονιδίου ALK συμβαίνουν σε περίπου 3~7% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Οι συγχωνεύσεις που συμβαίνουν στο γονίδιο ALK εντοπίζονται συνήθως σε ασθενείς με ιστορικό μη καπνίσματος ή ελαφρού καπνίσματος και ιστολογία αδenoκαρκινώματος. Οι αναστολείς ALK που αναπτύχθηκαν πρόσφατα, όπως το Crizotinib, το Ceritinib και το Alectinib, χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για τη θεραπεία ασθενών με ΜΜΚΠ, θετικών στις συντήξεις των γονιδίων ALK. Οι τρέχουσες διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση της σύντηξης ALK περιλαμβάνουν υβριδισμό φθορισμού *in situ* (FISH), ανοσοϊστοχημεία (IHC) και αναλύσεις αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS). Η μέθοδος FISH θεωρείται η πρότυπη μέθοδος για την ανίχνευση ανακατατάξεων ALK. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει αρκετούς περιορισμούς. Είναι επίπονη διεργασία, χρονοβόρα και τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον χειριστή τόσο και τη διαδικασία προετοιμασίας όσο και στη ερμηνεία. Επιπλέον, προηγμένες μοριακές τεχνικές όπως η NGS έχουν επιτρέψει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών βιοδεικτών του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των συγχωνεύσεων ALK. Η συχνά ανεπαρκής ποσότητα δείγματος ιστού καλής ποιότητας, σε συνδυασμό με τον αυξανόμενο αριθμό εγκεκριμένων στοχευόμενων παραγόντων, καθιστούν επιτακτική την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών βιοδεικτών χρησιμοποιώντας πολυγονιδιακά πάνελ. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορίσει το ποσοστό θετικών κρουσμάτων ALK μεταξύ ασθενών με ΜΜΚΠ στην Ελλάδα. Θα διερευνηθεί το ποσοστό θετικότητας με χρήση διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης ALK καθώς και η συμφωνία μεταξύ διαφορετικών τεχνικών.

Abstract

ALK rearrangements occur in approximately 3~7% of patients with NSCLC (Nonsmall Cell Lung Cancer). ALK fusions are commonly found in patients with never smoking or light smoking history and adenocarcinoma histology. Recently developed ALK inhibitors such as crizotinib, ceritinib and alectinib are currently used to treat ALK fusion positive NSCLC patients. The current diagnostic methods for detection of ALK fusion include fluorescence in situ hybridization (FISH), immunohistochemistry (IHC), and next-generation sequencing (NGS) analyses. FISH is considered the gold standard method for the detection of ALK rearrangements. However, this method has several well-known limitations. It is labor-intensive, time-consuming and operator-dependent in both preparation and interpretation processes. Furthermore, advanced molecular techniques such as NGS have permitted simultaneous analysis of multiple tumor biomarkers, including ALK fusions. The frequently insufficient amount of good quality tissue specimens, coupled with the increasing number of approved targeted agents, make the simultaneous analysis of multiple biomarkers using multigene panels imperative. The aim of this study is to determine the percentage of ALK positive cases among NSCLC patients in Greece. The positivity rate using different ALK analysis methods as well as the concordance among different techniques will be investigated.

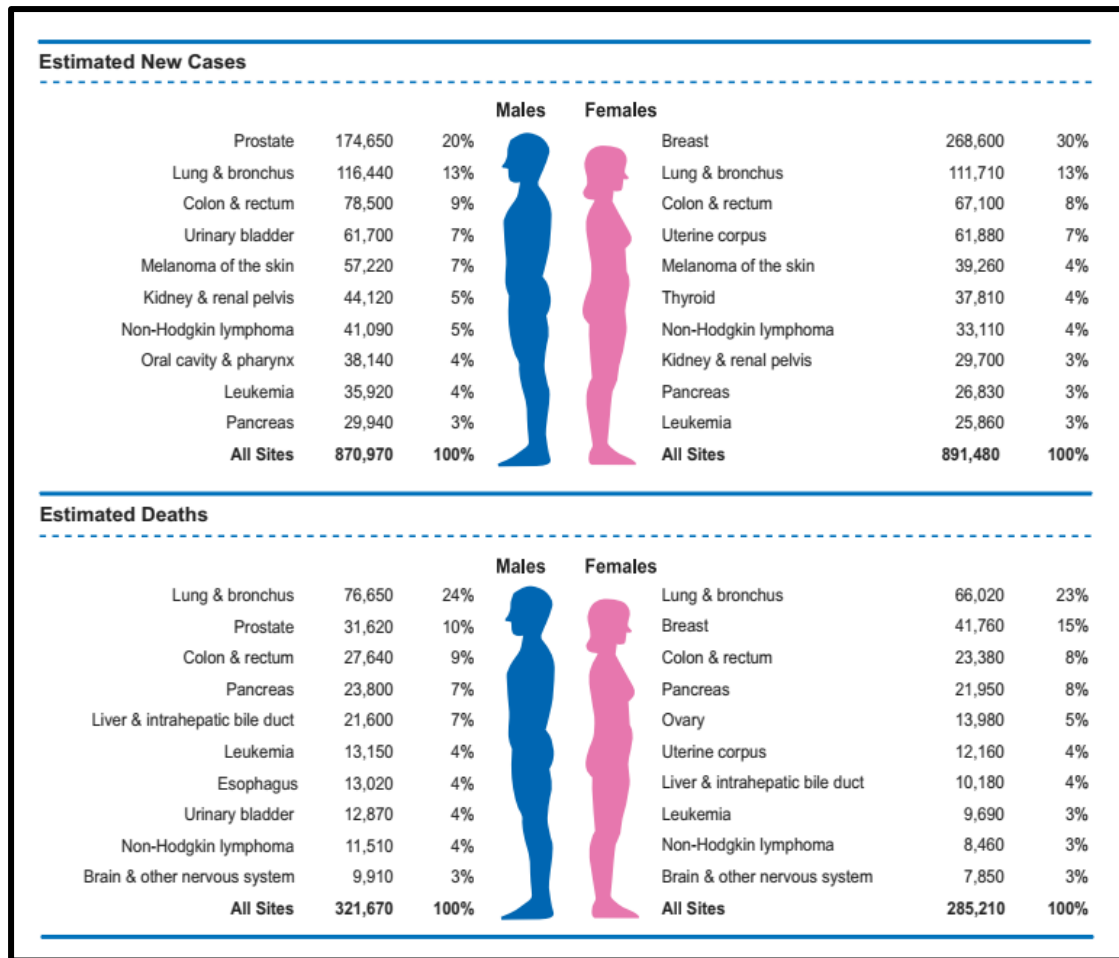
~ΕΙΣΑΓΩΓΗ~

1. Ο καρκίνος του πνεύμονα – Χαρακτηριστικά, Επιδημιολογία και το Μικροπεριβάλλον του Όγκου

1.1 Επιδημιολογία του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που προκύπτει από διάφορες μεταλλάξεις του DNA των κυττάρων, οι οποίες παρεμβαίνουν σε μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και της επιβίωσης και γενικά με τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (de Visser *et al.*, 2006). Τα κύτταρα που προκύπτουν μπορούν να πολλαπλασιάζονται συνεχώς και αδιακρίτως. Όταν αυτό συμβαίνει σε περιορισμένο χώρο, οδηγεί στο σχηματισμό μιας τοπικής μάζας ιστού, που ονομάζεται «όγκος». Οι όγκοι ορίζονται συνήθως ως «συμπαγείς» και αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών τύπων καρκίνου. Ωστόσο, υπάρχει και η περίπτωση αιματολογικών καρκίνων που δεν σχηματίζουν όγκους και τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Οι όγκοι περιγράφονται επίσης ως «καλοήθεις» ή «κακοήθεις». Στην περίπτωση των καλοήθων όγκων, δεν παρατηρείται εξάπλωση του καρκίνου σε γειτονικούς ιστούς (μετάσταση) και γι' αυτό συνήθως συνδέονται με καλή πρόγνωση. Αντιθέτως, οι κακοήθεις όγκοι παρουσιάζουν έντονη μεταστατική δραστηριότητα, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να εξαπλωθούν σε γειτονικούς ιστούς, ακόμη και σε μεγάλη απόσταση από τον όγκο και γι' αυτό συχνά συνδέονται με κακή πρόγνωση (Dela Cruz *et al.*, 2011).



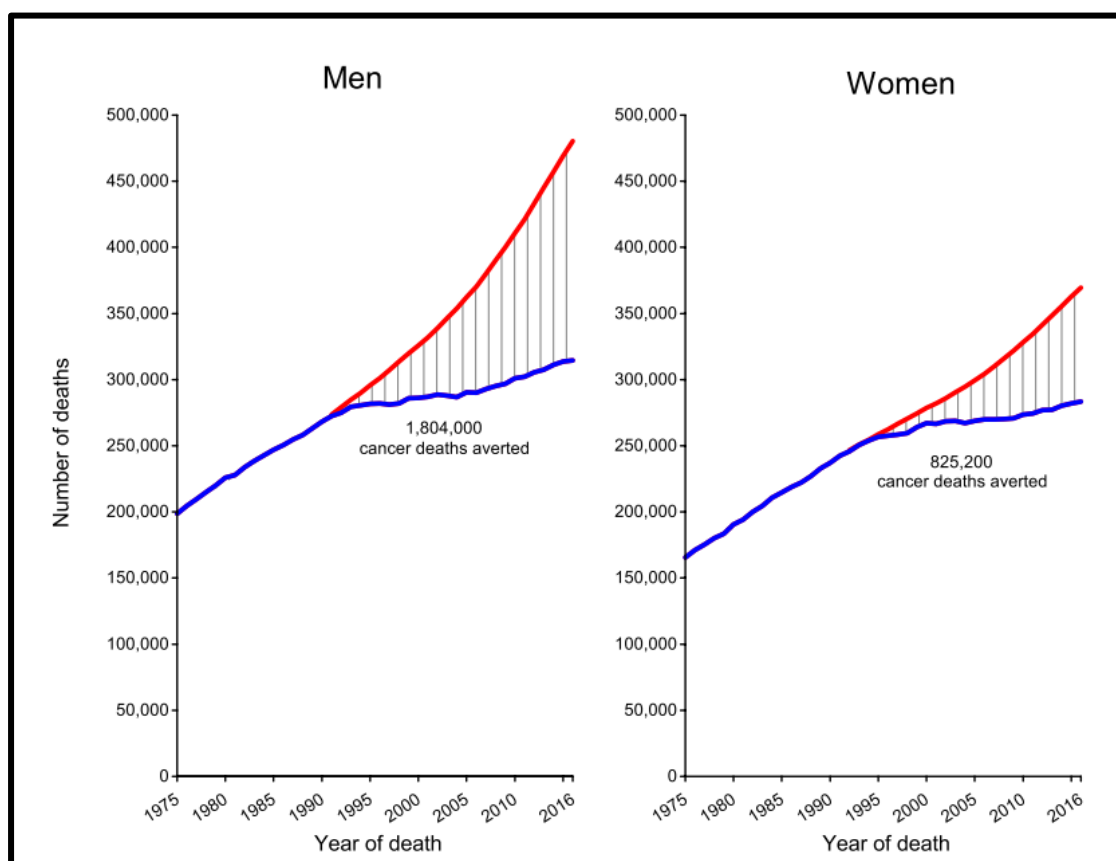
Εικόνα 1 – Στατιστικές εκτιμήσεις νέων περιστατικών καρκίνου και θανάτων, βάσει του φύλου στις ΗΠΑ το έτος 2019 (Siegel et al., 2019)

Σύμφωνα με τους Siegel *et al.*, σε μια μελέτη της American Cancer Society στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, για το έτος 2019, εκτιμάται ότι ο δεύτερος πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου είναι ο καρκίνος του πνεύμονα ακολουθούμενος από τον καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού που και οι δύο εμφανίζονται σε περίπου το ίδιο ποσοστό τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες (Siegel *et al.*, 2019).

Όσον αφορά την θνησιμότητα, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου σε άνδρες και γυναίκες με ποσοστό περίπου 25% σε κάθε περίπτωση. Αυτό είναι σύμφωνο με τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, τα οποία τοποθετούν τον καρκίνο του πνεύμονα ως την κύρια αιτία θανάτου, μετρώντας 1,76 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως το 2018. Ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού στους άνδρες και τις γυναίκες αντίστοιχα ακολουθούν, με ποσοστό θνησιμότητας σχεδόν το

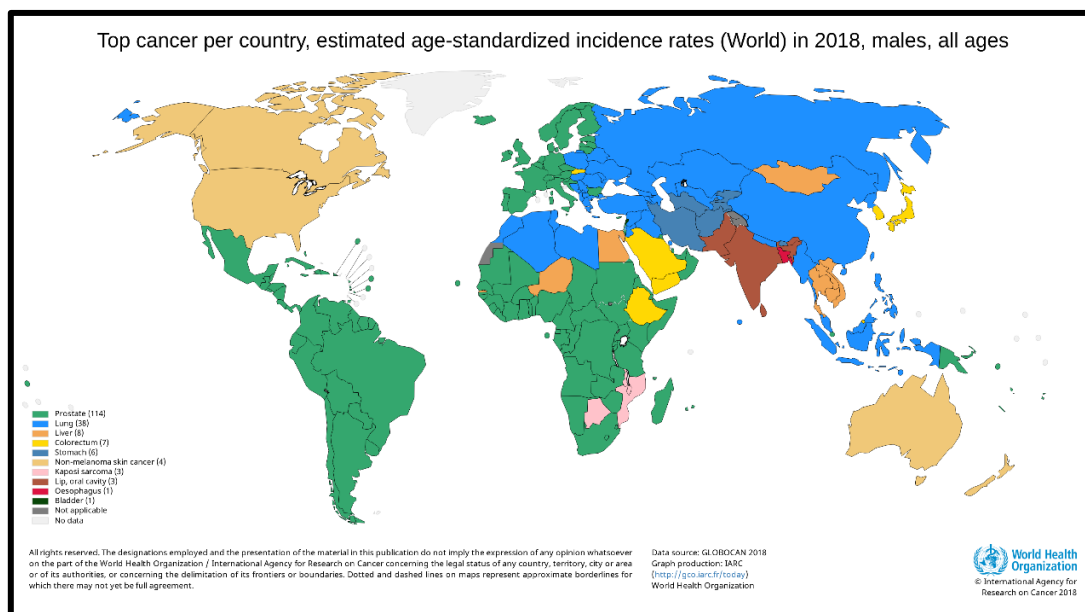
μισό από αυτό του καρκίνου του πνεύμονα. Στην τρίτη θέση βρίσκεται ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού, με το ποσοστό θνησιμότητας του να είναι σχεδόν ίσο και στα δύο φύλα (Siegel *et al.*, 2019).

Σύμφωνα με την έκθεση του ΠΟΥ για τον καρκίνο, 1 στους 6 θανάτους παγκοσμίως προκαλείται από καρκίνο με 18,1 εκατομμύρια νέα κρούσματα το 2018, τα οποία αναμένεται να αυξηθούν το 2040 με 29,4 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις εκείνο το έτος. Τα καλά νέα είναι ότι μεταξύ των ετών 1975 – 2016, ο αριθμός των θανάτων έχει μειωθεί σημαντικά σε σύγκριση με το αναμενόμενο ποσοστό θνησιμότητας, τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες, κυρίως λόγω της ανάπτυξης νέων μεθόδων και τεχνολογιών για τη διάγνωση αλλά και θεραπεία του καρκίνου. Οι γιατροί είναι πλέον σε θέση να κάνουν έγκαιρη διάγνωση της νόσου και μαζί με την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων και πρωτοκόλλων, είναι σε θέση να καταπολεμήσουν την ασθένεια πιο αποτελεσματικά (Siegel *et al.*, 2019).



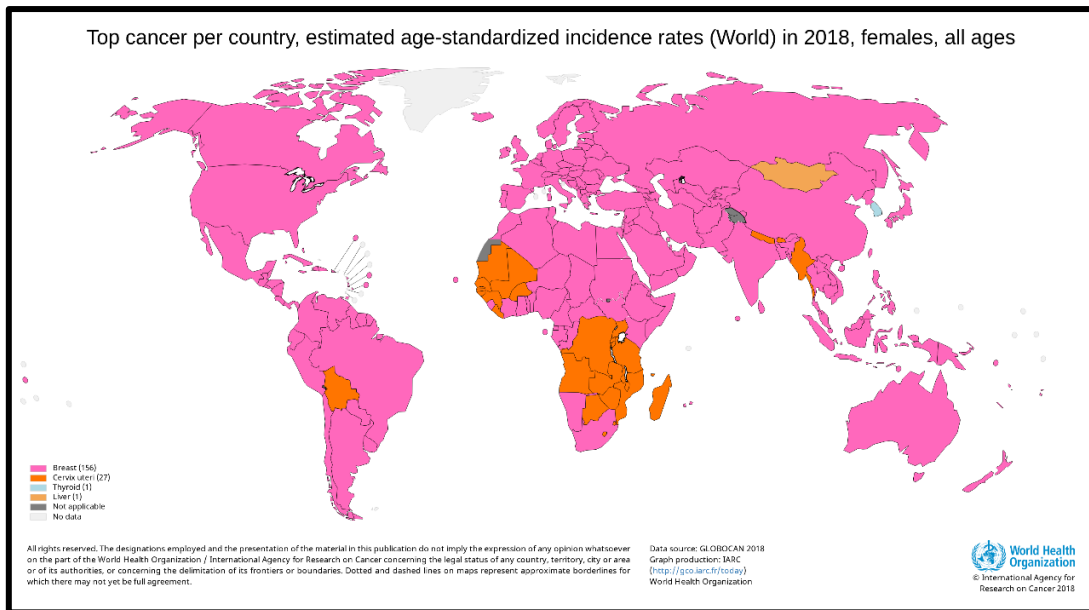
Εικόνα 2 – Εκτιμώμενοι αποτρεπταίοι θάνατοι από καρκίνο για τα χρόνια 1975 - 2016 (Siegel *et al.*, 2019)

Αν και τα δεδομένα που παρουσιάζονται παραπάνω αφορούν τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, δεν αποκλίνουν πολύ από την παγκόσμια εικόνα της νόσου. Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Παρατηρητηρίου Καρκίνου του ΠΟΥ, το έτος 2018, οι περισσότεροι καρκινοπαθείς ασιατικής καταγωγής (άνδρες) διαγνώστηκαν με καρκίνο του πνεύμονα, ενώ οι αντίστοιχοι στην Ευρώπη, την Αφρική και τη Νότια Αμερική διαγνώστηκαν κυρίως με καρκίνο του προστάτη (World Health Organization, 2018b).



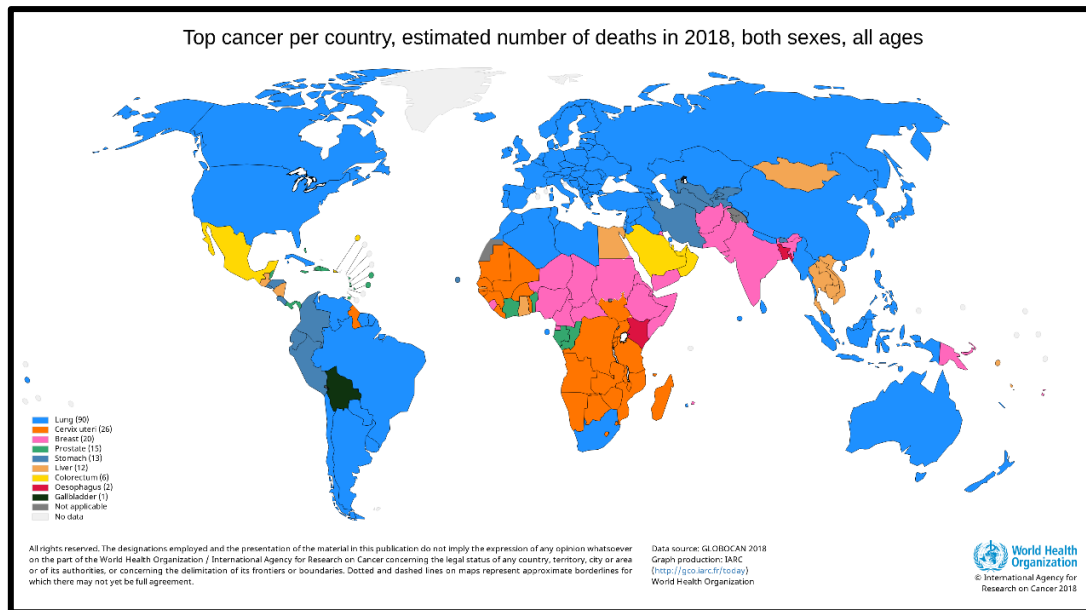
Εικόνα3 – Περιστατικά καρκίνου σε άνδρες σε παγκόσμιο επίπεδο, το 2018 (World Health Organization, 2018b)

Στην περίπτωση των γυναικών, παρατηρείται λιγότερη εθνοτική διαφοροποίηση καθώς σχεδόν σε όλες τις χώρες του κόσμου ο πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου είναι ο καρκίνος του μαστού, με μόνη εξαίρεση μερικές χώρες στην Αφρική, τη Νότια Αμερική και την Ασία όπου τα περισσότερα κρούσματα του καρκίνου είχε να κάνει με τον τράχηλο της μήτρας (World Health Organization, 2018b).



Εικόνα 4 - Περιστατικά καρκίνου σε γυναίκες σε παγκόσμιο επίπεδο, το 2018 (World Health Organization, 2018b)

Η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως εξακολουθεί να είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και στα δύο φύλα. Υπάρχει μια γενική ομοιομορφία στην Ασία, την Ευρώπη και της Αμερική όσον αφορά την αιτιολόγηση των θανάτων, ενώ στην Αφρική παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλομορφία όσον αφορά στους τύπους καρκίνου που οδηγούν σε θάνατο, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις οι θάνατοι αποδίδονται σε καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας, υποδηλώνοντας ότι σε αυτήν την ήπειρο πεθαίνουν από καρκίνο περισσότερο οι γυναίκες παρά οι άνδρες.



Εικόνα 5 - Περιστατικά καρκίνου σε άνδρες και γυναίκες σε παγκόσμιο επίπεδο, το 2018 (World Health Organization, 2018b)

1.2 Καρκίνος του πνεύμονα-Υπότυποι

Οι πνεύμονες, όπως και κάθε άλλο όργανο του σώματος είναι επιρρεπείς στην καρκινογένεση. Το κάπνισμα έχει επισημανθεί ότι είναι μια από τις κύριες αιτίες καρκίνου του πνεύμονα, τόσο σε ενεργούς όσο και σε παθητικούς καπνιστές. Η έκθεση σε ραδόνιο, αμιάντο, αρσενικό και άλλους παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (Sirzén *et al.*, 2003), όπως στην περίπτωση της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Φυσικά, το γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου έχει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της προδιάθεσης για τη νόσο, του τύπου καρκίνου που θα αναπτυχθεί, καθώς και της ανταπόκρισης του ασθενούς σε διάφορες θεραπείες (Dela Cruz *et al.*, 2011).

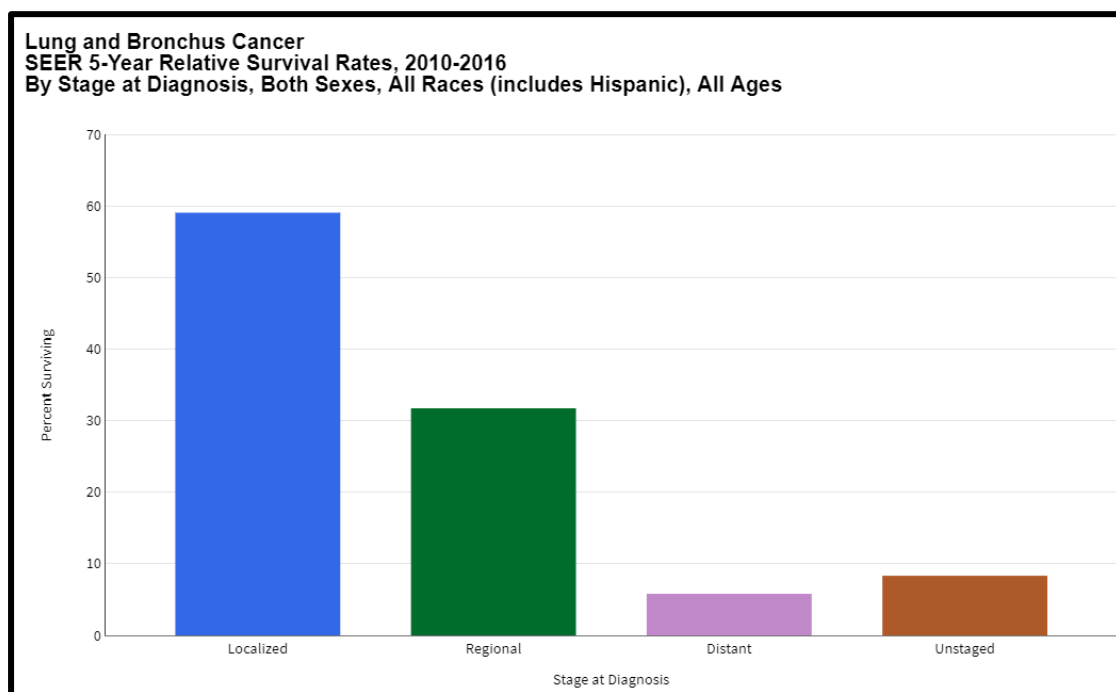
Τα μεταλλαγμένα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από το αναπνευστικό επιθήλιο και γενικά δίνουν δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα (Dela Cruz *et al.*, 2011). Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) χαρακτηρίζεται από όγκους που αποτελούνται από νευροενδοκρινικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν ορμόνες στην κυκλοφορία του αίματος, ως απόκριση σεερέθισμα του νευρικού συστήματος. Σε αυτόν τον τύπο καρκίνου του πνεύμονα, ο όγκος είναι συνήθως κακοήθης. Περίπου το 15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι τύπου SCLC. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα παρουσιάζει υψηλότερη αγγειοποίηση σε σύγκριση με τους άλλους τύπους καρκίνου του

πνεύμονα (Rosti *et al.*, 2006). Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στις οποίες φαίνεται να ανταποκρίνεται η SCLC είναι η ακτινοθεραπεία θώρακος σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία (Dela Cruz *et al.*, 2011).

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) αποτελεί το 85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: αδenoκαρκίνωμα (38,5% των περιπτώσεων), το πλακώδες (ακανθοκυτταρικό) καρκίνωμα (20% των περιπτώσεων) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (2,9%) καθώς, ωστόσο, υπάρχουν πολλοί περισσότεροι υποτύποι που αποτελούν το υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων (Sverre *et al.*, 2001; Dela Cruz *et al.*, 2011). Βασικά, το NSCLC αντιπροσωπεύει όλους τους τύπους καρκίνου του πνεύμονα εκτός από τον SCLC. Δυστυχώς, οι συνήθεις θεραπείες (χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία) φαίνεται να μην έχουν σημαντική επίδραση σε αυτόν τον τύπο όγκου (Sirzén *et al.*, 2003).

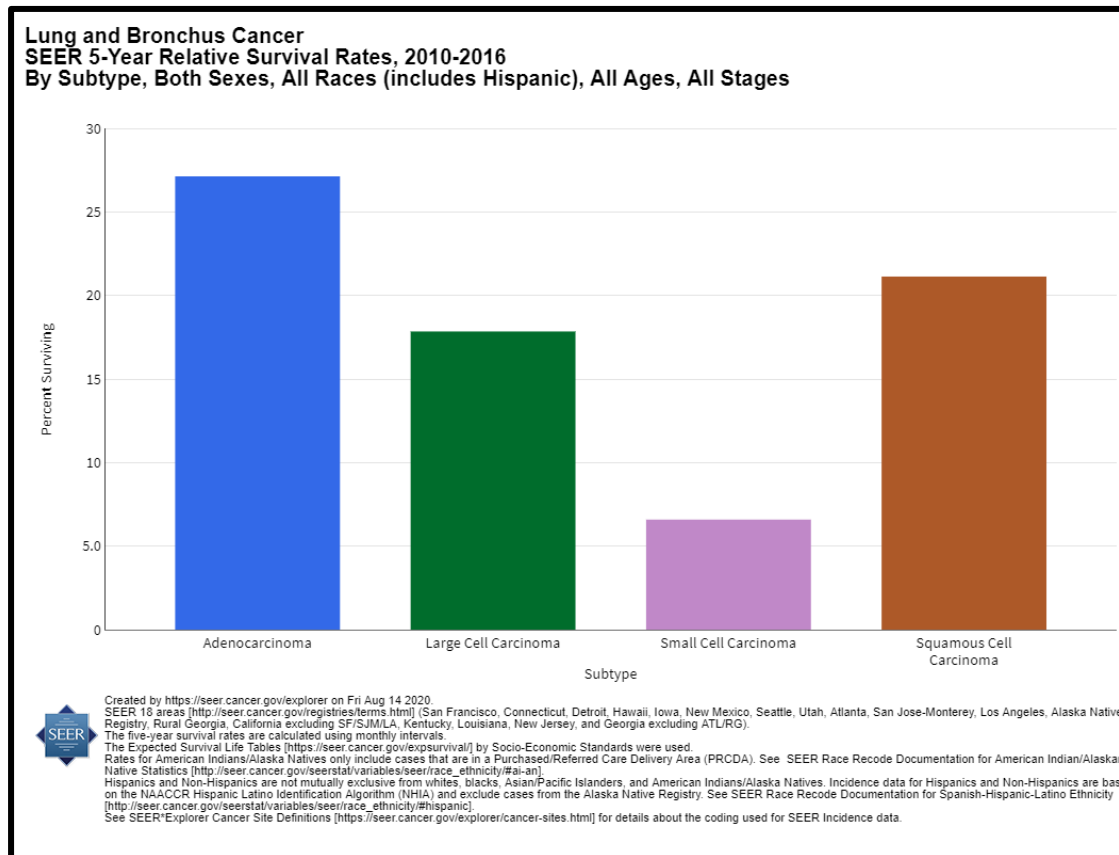
1.3 Καρκίνος του πνεύμονα-Θνησιμότητα

Όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης 5 ετών, τα ποσοστά ποικίλλουν μεταξύ των ασθενών, καθώς η επιβίωση εξαρτάται κυρίως από το στάδιο της νόσου τη στιγμή της διάγνωσης και τον υποτύπο του καρκίνου. Σύμφωνα με στοιχεία που εξήχθησαν από την εφαρμογή SEER*Explorer του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου, για τα έτη 2010 – 2016, το υψηλότερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης παρατηρήθηκε σε ασθενείς με εντοπισμένο καρκίνο του πνεύμονα (σχεδόν 60%), αλλά εάν γίνει η διάγνωση πολύ αργότερα, και εκδηλωθούν μεταστάσεις το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης μειώνεται δραματικά σε περίπου 30% στην περίπτωση μετάστασης στους παρακείμενους (περιφερειακούς) λεμφαδένες και λιγότερο από 10% στην περίπτωση απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλα όργανα (D'Incecco *et al.*, 2014).



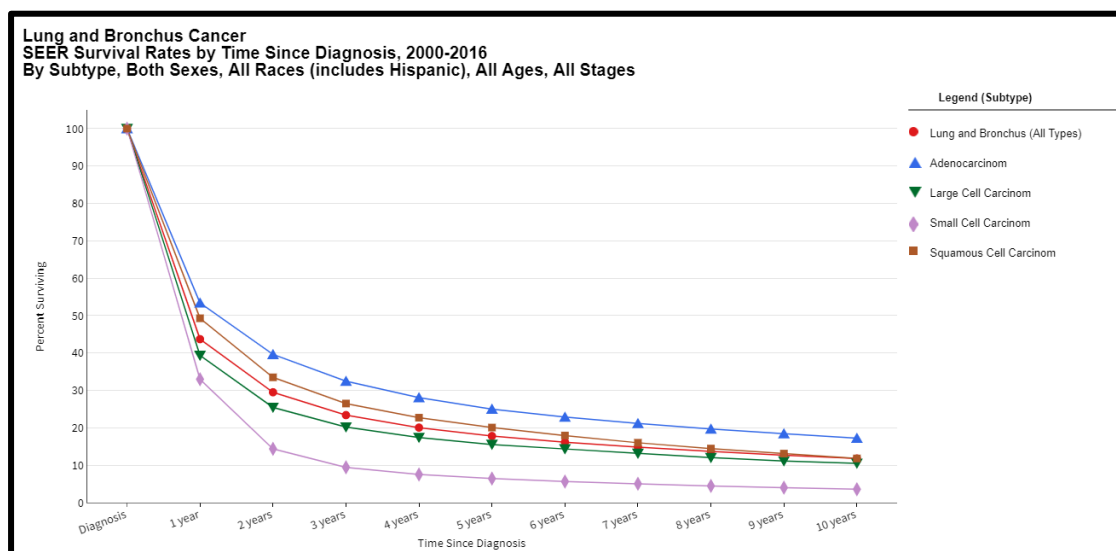
Εικόνα 6- Πενταετής επιβίωση βασισμένη στη σταδιοποίηση της διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα για τα έτη 2010 - 2016 (National Cancer Institute, 2019)

Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ του υποτύπου καρκίνου και του ποσοστού 5ετούς επιβίωσης, υπάρχει καλύτερη πρόγνωση για τους ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με αδενοκαρκίνωμα, οι οποίοι έχουν και το υψηλότερο ποσοστό 5ετούς επιβίωσης, (πάνω από 25%), ακολουθούμενο από το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ασθενείς με ποσοστό λίγο πάνω από 20% και ασθενείς με μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα με ποσοστό λίγο κάτω από 20%. Το λιγότερο αισιόδοξο αποτέλεσμα αντιπροσωπεύει ασθενείς με SCLC, οπότε το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης είναι λίγο πάνω από 5%.



Εικόνα 7 - Πενταετής επιβίωση βασισμένη στον υπότυπο του καρκίνου του πνεύμονα για τα έτη 2010 - 2016 (National Cancer Institute, 2019)

Δυστυχώς, η κλινική έκβαση του καρκίνου του πνεύμονα παραμένει ζοφερή, καθώς σχεδόν το 50% των διαγνωσμένων ασθενών πεθαίνουν μέσα σε ένα χρόνο. Φυσικά, τα ποσοστά επιβίωσης διαφέρουν ανάλογα με τον υποτύπο του καρκίνου του πνεύμονα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αλλά αυτό δεν αλλάζει το γεγονός ότι λιγότερο από το 30% των ασθενών επιτυγχάνουν 5ετή επιβίωση και λιγότερο από το 20% των ασθενών επιβιώνει για μια δεκαετία.

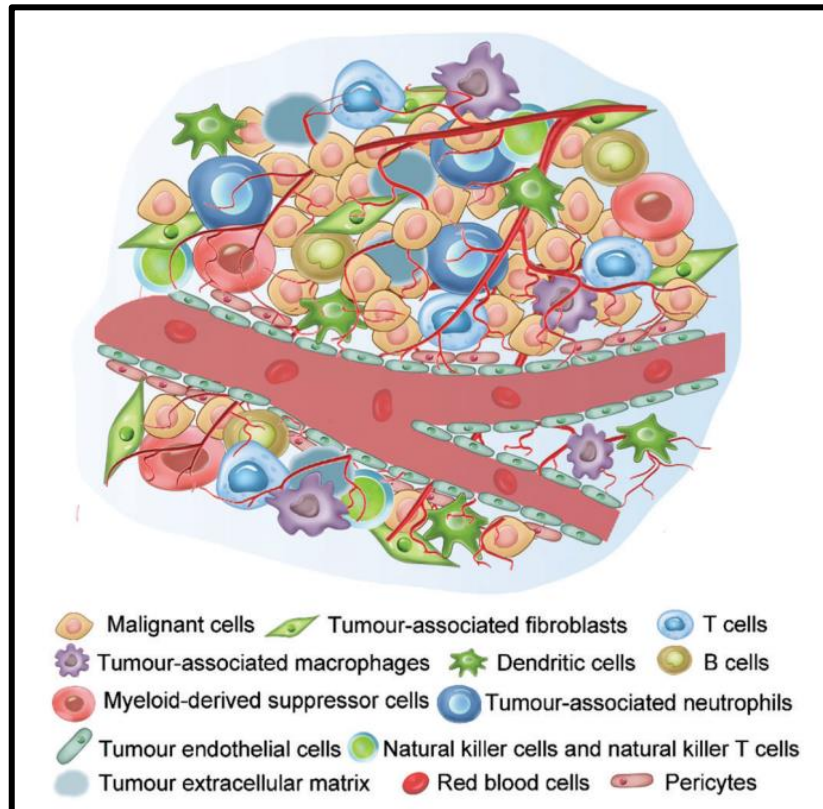


Εικόνα 8- –Συνολική επιβίωση σε περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα και υποτύπων αυτού –Έτη 2010-2016 (National Cancer Institute, 2019)

1.4 Καρκίνος του πνεύμονα- Μικροπεριβάλλον

Ένας όγκος δεν αποτελείται μόνο από καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, περιβάλλεται από ένα μικροπεριβάλλον που περιέχει μια πληθώρα τύπων κυττάρων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους άμεσα ή έμμεσα, συμβάλλοντας συνολικά στην ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου και επομένως στην κλινική έκβαση της νόσου (Petrova *et al.*, 2018). Στην πραγματικότητα, περισσότερο από το 50% της μάζας του όγκου μπορεί να αντιστοιχεί σε μη κακοήγη κύτταρα (Balkwill *et al.*, 2012).

Ένα από τα βασικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας, συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα B και T, φυσικά φονικά



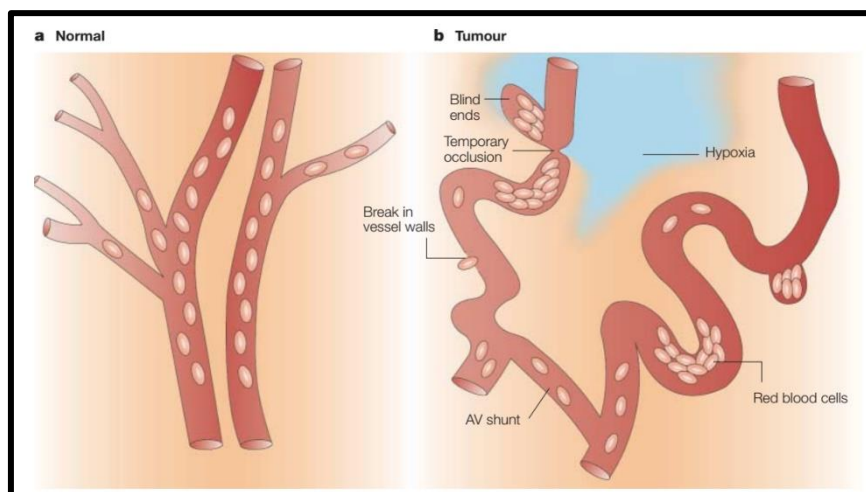
Εικόνα 9 - Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Dai et al., 2017)

κύτταρα (natural killer cells), μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (TAMs), κατασταλτικά κύτταρα που προέρχονται από μυελοειδή και δενδριτικά κύτταρα. Η συνολική παρουσία ανοσολογικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, δηλαδή ο αριθμός, ο τύπος, η κατανομή και η θέση τους, ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή και από όγκο σε όγκο, ενώ μπορεί επίσης να παρέχει χρήσιμα δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση της ασθένειας και την πρόβλεψη της κλινικής έκβασης (Fridman et al., 2012· Whiteside, 2008). Αυτό είναι ένα σημάδι ότι ο οργανισμός προσπαθεί να καταπολεμήσει τα μη-φυσιολογικά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο αυτή η προσπάθεια είναι ανεπιτυχής, καθώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς που τα βοηθούν να ξεφύγουν από την αναγνώριση και την καταπολέμηση τους από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα περισσότερα από τα προαναφερθέντα κύτταρα είναι «ελαττωματικά», που σημαίνει ότι δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν την κανονική τους δραστηριότητα (π.χ. T κυτταροτοξικά κύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα ενώ μερικές φορές τα καρκινικά

κύτταρα μέσω της έκκρισης κυτοκινών, χημειοκινών και άλλων μορίων παρεμβαίνουν στην φυσιολογική λειτουργία των ανοσολογικών κυττάρων και τα ανακατευθύνουν προς όφελός τους, αναγκάζοντάς τα βασικά να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του όγκου όπως στην περίπτωση των TAM, (Yu *et al.*, 2007; Whiteside, 2008). Οι συνδεδεμένοι με τον καρκίνο ινοβλάστες, γνωστοί επίσης ως CAFs ή μυοϊνοβλάστες, συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη του όγκου, αλλά και στην διήθηση του όγκου σε γειτονικούς ιστούς εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες (Franco *et al.*, 2010). Μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά κύτταρα, όπως μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, μυοεπιθηλιακά ή ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι ένας από τους λόγους που παρουσιάζουν τέτοια ετερογένεια ως προς τον φαινότυπό τους (Balkwill *et al.*, 2012). Τα σχετιζόμενα με τον καρκίνο λιπώδη κύτταρα (CAAs) μπορεί επίσης να βρεθούν στο μικροπεριβάλλον ορισμένων όγκων. Αυτά τα κύτταρα προέρχονται από φυσιολογικά λιπώδη κύτταρα που ήρθαν σε επαφή με καρκινικά κύτταρα, γεγονός που τα ανάγκασε να τροποποιήσουν την φυσιολογική λειτουργία τους, ώστε να παρέχουν μεταβολίτες και λιπίδια, και τα δύο απαραίτητα συστατικά για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, με την έκκριση λιποκινών, τα CAA βοηθούν στη μετάσταση κακοηθών κυττάρων (Balkwill *et al.*, 2012; Nieman *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019).

Η εξωκυτταρική μήτρα (ECM) υπάρχει σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς και ο κύριος σκοπός της είναι να εξασφαλίσει τη σωστή διαμόρφωση και λειτουργία του ιστού, με κύρια συστατικά τους πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και φυσικά νερό. Ωστόσο, η σύσταση κάθε ECM εξαρτάται από τον τύπο του ιστού. Οι πρωτεογλυκάνες και οι ινώδεις πρωτεΐνες είναι ο πιο συχνά απαντώμενος τύπος πρωτεϊνών στην ECM, συγκεκριμένα το κολλαγόνο, η ελασματίνη, η ινονεκτίνη και η ελαστίνη (Frantz *et al.*, 2010). Οι όγκοι χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη εναπόθεση τέτοιων πρωτεϊνών, κυρίως κολλαγόνου, και έτσι η καρκινική ECM διαφοροποιείται από την κανονική. Οι CAF συμμετέχουν ενεργά στη διαμόρφωσή του μέσω έκκρισης ενζύμων και συστατικών αναδιαμόρφωσης ECM. Οι αλλαγές του ECM κατά την ογκογένεση συμβάλλουν περαιτέρω στην ανάπτυξη του όγκου, αλλά και στη μετάσταση (Petrova *et al.*, 2018). Η αγγειογένεση είναι ένα φαινόμενο που συνοδεύει την ανάπτυξη του όγκου από την αρχή της ογκογένεσης, καθώς είναι απαραίτητο για τον όγκο να έχει πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος και επομένως σε οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και μεταβολίτες. Ωστόσο, τα αγγεία του όγκου διαφέρουν από

αυτά του φυσιολογικού ιστού, καθώς δεν υπάρχει εμφανές μοτίβο σχηματισμού στο χώρο του όγκου, η διάμετρος τους είναι ιδιαίτερα ακανόνιστη, τα τοιχώματά τους είναι αρκετά λεπτά και αδιακρίτως διαπερατά (Ruoslahti, 2002; De Palma *et al.*, 2017). Επιπλέον, η εκτεταμένη αγγείωση είναι ένας άλλος μηχανισμός που συμβάλλει στη μετάσταση (Franses *et al.*, 2011).



Εικόνα 10- Σύγκριση αγγείωσης σε φυσιολογικό ιστό (αριστερά) και ιστό όγκου (δεξιά) (Brown *et al.*, 2004)

Τα περιαγγειακά κύτταρα ή περικύτταρα είναι είναι αγγειακά μυϊκά κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια των αγγείων και εισφέρουν στην ακεραιότητα και σταθερότητα του αγγειακού αυλού και συμμετέχουν στην ωρίμανση των αιμοφόρων αγγείων, στη ρύθμιση της διαπερατότητάς τους και στη ροή του αίματος (Garza Treviño *et al.*, 2019). Υπάρχει μεγάλη ποικιλία περικυτταρων ως προς τη μορφολογία και την έκφραση των δεικτών τους, η οποία εξαρτάται πάντα από τον γειτονικό ιστό. Ο αριθμός των περικυτταρων μπορεί να διαφέρει μεταξύ της τοποθεσίας?? του όγκου ή του σταδίου ανάπτυξης του όγκου. Μια υψηλή συγκέντρωση περικυτταρων μπορεί να εμποδίσουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να φτάσουν στα καρκινικά κύτταρα αλλά και τις διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Από την άλλη πλευρά, η έλλειψη περικυτταρων μπορεί να διευκολύνει τη μετάσταση και να προωθήσει περαιτέρω τη διαδικασία της αγγειογένεσης (Meng *et al.*, 2015).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου, εκτός από την αγγειογένεση, λαμβάνει χώρα και η λεμφαγγειογένεση, δηλαδή ο σχηματισμός νέων λεμφικών

αγγείων, η οποία είναι απλώς μια άλλη οδός διαφυγής για τα καρκινικά κύτταρα από την αρχική περιοχή ανάπτυξης σε άλλα μέρη του σώματος, ενώ επηρεάζει επίσης τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού, είτε μειώνοντάς το είτε αναστέλλοντάς το πλήρως (Wang *et al.*, 2017).

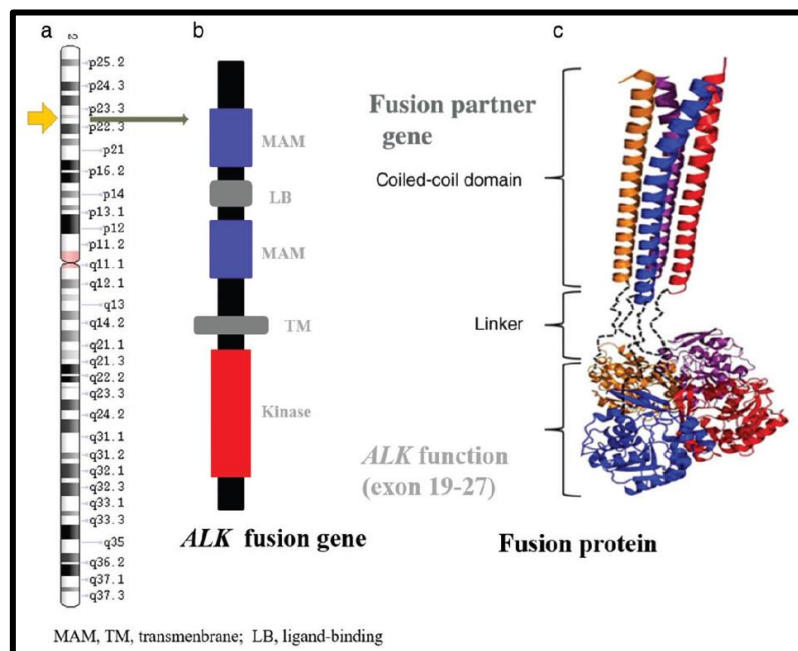
Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου είναι η έλλειψη οξυγόνου, επομένως η δημιουργία υποξικών συνθηκών. Αυτό είναι το αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής διάταξης των αγγείων στην περιοχή του όγκου, η οποία οδηγεί σε ανεπαρκή οξυγόνωση των τμημάτων του όγκου που βρίσκονται μακριά από τα αιμοφόρα αγγεία (Wilson *et al.*, 2011). Όταν η συγκέντρωση οξυγόνου στους ιστούς φτάσει περίπου το 5%, υπάρχει ενεργοποίηση μιας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, που ονομάζονται HIFs (Παράγοντες που προκαλούνται από την υποξία) (Pouysségur *et al.*, 2006). Η υποξία έχει συσχετιστεί με την προώθηση της αγγειογένεσης, την ικανότητα του όγκου να κάνει μετάσταση ή να υποτροπιάσει (Tatum *et al.*, 2006), καθώς και την αντίσταση σε καθιερωμένες θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία (Wilson *et al.*, 2011).

Υπάρχει μια ενδιαφέρουσα διαφοροποίηση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, σε σχέση με αυτόν των φυσιολογικών κυττάρων. Ο όρος «φαινόμενο Warburg», γνωστός και ως αερόβια γλυκόλυση, περιγράφει ένα φαινόμενο όπου η αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό μετά τη γλυκολυτική διαδικασία και στη συνέχεια σε γαλακτικό, αντί να μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA και να εισέρχεται στον κύκλο του Krebs. Το γαλακτικό εκκρίνεται από το κύτταρο και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του pH του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, ένα φαινόμενο που ονομάζεται οξέωση (Levine *et al.*, 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η μεταβολική αλλαγή που οδηγεί σε οξέωση προκαλείται από υποξία μέσω HIF, μεταξύ άλλων παραγόντων, ενώ έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένη αγγειογένεση και αντίσταση στη θεραπεία (Chiche *et al.*, 2010).

2. Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) και ο ρόλος της στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

2.1 Η κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος

Το γονίδιο ALK βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 2 (2p23), ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων ινσουλίνης και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ALK. Η ALK είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας κινάσης τυροσίνης και όπως και άλλοι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, διαθέτει μια εξωκυτταρική περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα τμήμα κινάσης κυτταροπλασματικού υποδοχέα. Η έκφραση της ALK εμφανίζεται στο νευρικό σύστημα κατά τη γένεση του εμβρύου και μειώνεται στη μεταγεννητική ζωή. Επομένως, σε ενήλικες ανθρώπους, χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης ALK παράγονται μόνο σπάνια, σε διάσπαρτα νευρικά και ενδοθηλιακά κύτταρα και σε κύτταρα του εγκεφάλου (Motegi *et al.*, 2004; Iwahara *et al.*, 1997).



Εικόνα 11 - (a) Η θέση του γονιδίου ALK στο χρωμόσωμα 2, (b) το γονίδιο σύντηξης, (c) δομική οργάνωση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης (Xue Du *et al.* 2018)

2.2 Τύποι ογκογένεσης στην ALK

Υπάρχουν τρεις τύποι μεταλλάξεων αναδιάταξης του γονιδίου ALK: η αναδιάταξη ALK-R, η ALK-A και σημειακές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του γονιδίου ALK έχουν τη μορφή αμοιβαίας μετατόπισης με άλλο γονίδιο που οδηγεί στο σχηματισμό ενός ογκογονιδίου σύντηξης. Αυτό το γονίδιο σύντηξης βρέθηκε να υπερεκφράζεται στους καρκίνους (Morris *et al.*, 1994). Το 1994, η ALK εντοπίστηκε αρχικά σε αναπλαστικό λέμφωμα ως προϊόν σύντηξης με τη νουκλεοφωσμίνη (NPM-ALK) (Barreca *et al.*, 2011). Στη συνέχεια, η αναδιάταξη ALK (ALK-R) εντοπίστηκε σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των φλεγμονωδών μυοϊνοβλαστικών όγκων, του διάχυτου λεμφώματος μεγάλων Β-κυττάρων, του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), του καρκίνου των πλακωδών κυττάρων οισοφάγου, του παχέος εντέρου και του μαστού (Barreca *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2013; Chiarle *et al.*, 2008). Επιπρόσθετοι γονιδιακοί εταίροι έχουν ανακαλυφθεί σε ογκογονίδια σύντηξης με το γονίδιο ALK, συμπεριλαμβανομένων των TPM3, TFG, CLTCL1 και ATIC. Ένας άλλος τύπος μετάλλαξης του γονιδίου ALK είναι η ALK-A. Ο ογκογόνος μηχανισμός της ALK-A περιγράφηκε για πρώτη φορά στις κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος NB το 2002. Η μελέτη έδειξε ότι η ALK-A οδηγεί σε ιδιοσύστατη ενεργοποίηση, με αποτέλεσμα την επιλεκτική ενεργοποίηση της SHcC, μιας πρωτεΐνης προσάρτησης στον υποδοχέα του γονιδίου ALK (Miyake *et al.*, 2002). Αρκετές μελέτες έχουν επίσης αναφέρει πρόσθετα αντίγραφα του γονιδίου ALK να εντοπίζονται σε περιπτώσεις όπως αυτής του φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού, του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, το αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα και πνευμονικό σαρκωματοειδές καρκίνωμα.

Τελευταίος τύπος μετάλλαξης του γονιδίου ALK είναι οι σημειακές μεταλλάξεις. Έχει βρεθεί ότι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο ALK, σε έναν όγκο ο οποίος έχει ήδη εκτεθεί σε αναστολέα ALK, έχουν ως αποτέλεσμα την απόκτηση

δευτερογενούς αντίστασης από τον όγκο σε αναστολείς της κινάσης τυροσίνης (Toyokawa & Seto, 2015; Choi *et al.*, 2010). Οι πρώτες σημειακές μεταλλάξεις αντίστασης στα φάρμακα που εντοπίστηκαν ήταν οι C1156Y και L1196M (Toyokawa & Seto, 2015; Choi *et al.*, 2010). Στη συνέχεια, έχουν εντοπιστεί αρκετές άλλες σημειακές μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε φάρμακα, όπως: G1269A, F1174L, 1151Tins, L1152R, V1110Y (Toyokawa & Seto, 2015; Choi *et al.*, 2010).

2.3 Αναδιάταξη ALK σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC)

Η αναδιάταξη του γονιδίου ALK (Jemal *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2016; Siegel *et al.*, 2016) είναι μια μετάλλαξη εκκίνησης του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και έχει εντοπιστεί στο 5-6% των περιπτώσεων (Devarakonda *et al.*, 2015). Όμως παρά τα στοιχεία που συνδέουν την ενεργοποιημένη ALK με την ανάπτυξη του όγκου σε αυτό το χαμηλό ποσοστό περιπτώσεων, είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι το ενδιαφέρον για την ALK ως θεραπευτικό στόχο του καρκίνου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε πρόσφατα ευρήματα που δείχνουν την ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης ALK αναδιάταξης σε ένα υποσύνολο περιπτώσεων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Toyokawa & Seto, 2014; Shaw *et al.*, 2013).

Η αναδιάταξη του γονιδίου της ALK φαίνεται να είναι πιο συχνή σε νεότερους ασθενείς και σε καπνιστές που δεν έχουν διαγνωστεί με αδenoκαρκίνωμα. Δεδομένα από διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η διάμεση ηλικία των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα θετικών για ALK μεταλλάξεις είναι τα 55 έτη και περίπου το 70% αυτών των ασθενών δεν είναι ποτέ καπνιστές. Η συχνότητα εμφάνισης του ALK θετικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι παρόμοια σε όλο τον κόσμο (Shaw & Engelman, 2013; Shaw *et al.*, 2009). Μεταλλάξεις του γονιδίου ALK περιγράφηκαν για πρώτη φορά στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα το 2007, όταν ένα υποσύνολο (7%) Ιαπώνων ασθενών βρέθηκε να έχει επαναδιατάξεις EML4 με ALK που οδηγούν στο σχηματισμό του ογκογονιδίου σύντηξης EML4-ALK (Soda *et al.*, 2007). Έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα της αναδιάταξης ALK κυμαίνεται από περίπου 3% έως

13% σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Shaw & Engelman, 2013).

Η σύντηξη EML4-ALK μπορεί να οδηγήσει σε συνεχή δραστικότητα κινάσης της τυροσίνης και αντιπροσωπεύει μια ογκογόνο οδό στον καρκίνο του πνεύμονα. Η ογκογένεση λόγω της παρουσίας του γονιδίου EML4-ALK βρέθηκε επίσης και σε πειραματικά μοντέλα ανοσοκατεσταλμένων μυών (Soda *et al.*, 2007). Το EML4-ALK διαθέτει ισχυρή ογκογόνο δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, και ο όγκος μπορεί γρήγορα να μειωθεί μετά τη χορήγηση αναστολέων ALK - tyrosine kinase (TKIs) (Soda *et al.*, 2007). Η πρωτεΐνη σύντηξης EML4-ALK χρησιμεύει ως θεραπευτικός στόχος και για άλλα προϊόντα σύντηξης όπως για την ALK-TKI και έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που φέρουν αναδιάταξεις ALK (Kwak *et al.*, 2010). Τα τελευταία χρόνια, οι αναστολείς ALK έχουν δείξει σημαντικά οφέλη στη διαχείριση του θετικού κατά ALK NSCLC σε σύγκριση με τη συμβατική χημειοθεραπεία (Kwak *et al.*, 2010). Έχουν περιγραφεί σε NSCLC ανακατατάξεις του γονιδίου ALK με άλλα γονίδια εκτός του EML4, συγκεκριμένα, KIF5B, KLC1, TFG, TPR, HIP1, STRN, DCTN1, SQSTM1, NPM1, BCL11A, και BIRC6 (Kwak *et al.*, 2010)

2.4 Crizotinib (κριζοτινίμπη) ένας αναστολέας ALK στην κλινική πράξη

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Διεθνούς Ένωσης για τη Μελέτη του Καρκίνου του Πνεύμονα (IASLC) και της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (ESMO) όλοι οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα προχωρημένου σταδίου, ανεξάρτητα από τα κλινικά χαρακτηριστικά θα πρέπει να ελέγχονται γενετικά για ALK μεταλλάξεις (βλ. <http://www.iaslc.org> και <http://www.esmo.org>). Επιπλέον, τουλάχιστον 27 παραλλαγές της κλασσικής σύντηξης έχουν ταυτοποιηθεί (Sasaki *et al.*, 2010). Οι αρχές και οι πρακτικές της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου επηρέασαν σημαντικά την ταχεία έγκριση του αναστολέα ALK πρώτης γενιάς, *Crizotinib*, από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) το 2011 (Gerber & Minna, 2010 ; Ou, 2012), και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) στο 2012.

Το *Crizotinib* είναι μικρό μόριο,-αναστολέας που στοχεύει τις κινάσες τυροσίνης ALK, ROS1 και MET και χορηγείται από το στόμα, (Bergethon *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2012) και έδειξε σημαντικά (~60%) ποσοστά συνολικής απόκρισης (ORRs) σε δοκιμές φάσης I (Kwak *et al.*, 2010) και φάσης II (Crinò *et al.*, 2011). Τα αποτελέσματα της δοκιμής φάσης III επιβεβαίωσαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης και μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) με το *Crizotinib* (65% και 7,7 μήνες, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία (20% και 3,0 μήνες, αντίστοιχα) ως δεύτερης γραμμής θεραπεία για ALK θετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Shaw *et al.*, 2013).

Επιπλέον, η κριζοτινίμπη έχει αποδειχθεί ανώτερη από την τυπική χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με πλατίνα/πεμετρεξίδη σε προχωρημένο ALK θετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Τα ποσοστά συνολικής απόκρισης ήταν 74% στην περίπτωση του *Crizotinib* και 45% στην περίπτωση της χημειοθεραπείας. Τα ποσοστά ανταπόκρισης και μεγαλύτερης επιβίωσης χωρίς εξέλιξη ήταν σημαντικά στην περίπτωση του *Crizotinib* (Solomon *et al.*, 2014). Δυστυχώς, όπως φαίνεται με άλλες στοχευμένες θεραπείες, όπως με αναστολείς πρώτης γενιάς του μεταλλαγμένου υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε EGFR θετικό NSCLC , παρά την αρχική σημαντική ανταπόκριση στο

Crizotinib, η πλειοψηφία των ασθενών ανέπτυξε αντοχή σε αυτό μέσα στους πρώτους 12 μήνες (Camidge *et al.*, 2012).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα αρχικά ποσοστά ανταπόκρισης στο *crizotinib* είναι περίπου 60%, γεγονός που υποδηλώνει πρωτογενή αντίσταση σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων. Ορισμένα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι διαφορές σε συγκεκριμένα γονιδιακά προϊόντα σύντηξης ALK ενδέχεται να ευθύνονται εν μέρει για ετερογενείς αποκρίσεις στη θεραπεία (Heuckmann *et al.*, 2012). Επίσης, ορισμένες ανακατατάξεις της ALK ενδέχεται να μην δημιουργούν λειτουργικές ανακατατάξεις σε όλους τους ασθενείς. Μέχρι σήμερα όμως οι κύριοι μηχανισμοί επίκτητης αντοχής στο *Crizotinib* περιλαμβάνουν δευτερογενείς μεταλλάξεις στο ALK, για παράδειγμα η L1196M, η μετάλλαξη «gate-keeper» και η μετάλλαξη C1156Y (Choi *et al.*, 2010). Πολλές άλλες μεταλλάξεις αντοχής έχουν περιγραφεί (Sasaki *et al.*, 2011; Katayama *et al.*, 2012; Doebele *et al.*, 2012; Ou *et al.*, 2014).

Οι περισσότεροι μικρομοριακοί αναστολείς κινάσης τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένου του *Crizotinib* (Costa *et al.*, 2011; Metro *et al.*, 2015), του *Imatinib* (Motl *et al.*, 2006), *Gefitinib* (Jackman *et al.*, 2006) και *Erlotinib* (Clarke *et al.*, 2010) έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο ΕΝΥ σε σχέση με το πλάσμα. Κατά συνέπεια, το ΚΝΣ συνιστά ένα «καταφύγιο» για τα ALK θετικά καρκινικά μεταστατικά κύτταρα τα οποία από εκεί μπορεί να μεταναστεύσουν σε άλλους ιστούς. (Gainor *et al.*, 2013).

2.5 Άλλοι αναστολείς ALK στην κλινική πράξη

Το *Ceritinib* είναι, μικρομοριακός αναστολέας της τυροσινικής κινάσης της ALK, 20 φορές πιο ισχυρός από το *Crizotinib* όσον αφορά την επιλεκτικότητα της ALK που επίσης χορηγείται από το στόμα (Friboulet *et al.*, 2014; Marsilje *et al.*, 2013). Σε αντίθεση με το *Crizotinib*, το *Ceritinib* δεν αναστέλλει τη δραστηριότητα της MET κινάσης, αλλά αναστέλλει τη δράση του IGF-R1, του υποδοχέα ινσουλίνης (InsR) και του ROS1 (Shaw *et al.*, 2013β).

Ωστόσο, το *Ceritinib* δεν ήταν αποτελεσματικό έναντι μεταλλάξεων ανθεκτικών στο *Crizotinib* (Friboulet *et al.*, 2014). Η κύρια πηγή κλινικών δεδομένων ήταν η πρώτη σε άνθρωπο, πολυκεντρική δοκιμή ASCEND-1 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01283516) του *Ceritinib* σε ασθενείς με προχωρημένους όγκους ALK θετικού NSCLC. Συνολικά 59 ασθενείς εντάχθηκαν σε κλιμακοτές δόσεις. Η μέγιστη ανεκτή δόση (MTD) ήταν 750 mg μία φορά την ημέρα και συμβάντα περιοριστικής δόσης τοξικότητας (DLT) εμφανίστηκαν σε έξι ασθενείς κατά τη διάρκεια του 1^{ου} κύκλου, σε δόσεις 400 mg ή περισσότερο ημερησίως. Αυτά τα συμβάντα περιελάμβαναν διαρροϊκές διαταραχές τρίτου βαθμού (σε ημερήσια δόση \geq 600 mg), εμετούς τρίτου βαθμού (σε 750 mg ημερησίως), αφυδάτωση τρίτου βαθμού (στα 600 mg ημερησίως), αυξημένες τρανσαμινασαιμίες τρίτου βαθμού, αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) δευτέρου βαθμού (σε 400 mg ημερησίως) και υποφωσφαταιμία τρίτου βαθμού (στα 400 mg ημερησίως). Αυτές οι τοξικότητες επιλύθηκαν μετά τη διακοπή της θεραπείας. Η κλινική δοκιμή επεκτάθηκε σε 71 επιπλέον ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία μέγιστης ανεκτής δόσης. Η πλειοψηφία των ασθενών είχαν προχωρημένο NSCLC, και είχαν λάβει προηγουμένως κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Συνολικά 83 από τους 122 ασθενείς με NSCLC, (68%) υποβλήθηκαν σε προηγούμενη θεραπεία με *Crizotinib*. Μεταξύ των 78 ασθενών που έλαβαν θεραπεία με 750mg *Ceritinib* ημερησίως, το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης (ORR) ήταν 59%. Τον Απρίλιο του 2014, ο FDA χορήγησε ταχεία έγκριση στο *Ceritinib* για τη θεραπεία ασθενών με ALK θετικό NSCLC, ή που εμφανίζουν δυσανεξία στο *Crizotinib* (βλ. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/2057551bl.pdf). Τον Φεβρουάριο του 2015, η Επιτροπή Φαρμάκων για Ανθρώπινη Χρήση (CHMP) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA) εξέδωσε θετική εισήγηση, προτείνοντας

τη χορήγηση άδειας κυκλοφορίας υπό όρους για την κερτινίμη σε ασθενείς με προχωρημένο ALK θετικό NSCLC. που είχαν προηγουμένως λάβει θεραπεία με κριζοτινίμη.

Σε πρόσφατη ενημερωμένη έκθεση σχετικά με την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του *Ceritinib* σε ημερήσια δόση 750 mg, στην οποία συνολικά συμμετείχαν 246 ασθενείς με ALK θετικό MMKΠ, εκ των οποίων 163 είχαν υποβληθεί σε προθεραπεία με αναστολέα της ALK (κριζοτινίμη ή αλεκτινίμη) και 83 ασθενείς με ανασταλτικούς παράγοντες ALK, αναφέρθηκε συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 56,4%, 72,3% και 61,8%, στους ασθενείς που δεν είχαν λάβει αναστολέα ALK και στο συνολικό πληθυσμό, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, παρουσιάστηκαν πρόσφατα τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δύο μελετών φάσης II για το *Ceritinib* σε ασθενείς με ALK θετικό MMKΠ. Η κλινική δοκιμή ASCEND-2 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01685060) πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που είχαν λάβει κυτταροτοξική χημειοθεραπεία (μία έως τρεις σειρές θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης μιας με τη χρήση πλατίνας), και μετά με *Crizotinib*, ενώ ακολούθησε και η δοκιμή ASCEND-3 σε ασθενείς με απλή αγωγή με *Crizotinib* (ClinicalTrials.gov: NCT01685138). Στην πρώτη δοκιμή συμμετείχαν 140 ασθενείς, το 71,4% με εγκεφαλικές μεταστάσεις, το 28% των οποίων δεν είχε λάβει προηγουμένως ακτινοβολία εγκεφάλου (BRT). Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 38,6% (95% CI 30,5-47,2%). Στη δεύτερη δοκιμή συμμετείχαν 124 ασθενείς, το 40,3% με μεταστάσεις στον εγκέφαλο, από τους οποίους το 46% δεν έλαβε BRT. Το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 63,7% (95% CI 54,6–72,2%).

Σε μια άλλη μελέτη φάσης II που στοχεύει στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του *Ceritinib* σε ασθενείς με ALK θετικό μεταστατικό MMKΠ στον εγκέφαλο και/ή στις λεπτομηνίγγειες στρατολογεί επί του παρόντος συμμετέχοντες για να επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα του *Ceritinib* σε ασθενείς με ALK θετικές νόσους του ΚΝΣ (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01685060). Δύο τυχαιοποιημένες δοκιμές φάσης III είναι επί του παρόντος σε εξέλιξη για την αξιολόγηση του *Ceritinib* έναντι της χημειοθεραπείας πρώτης και της δεύτερης γραμμής. Δεδομένων των θετικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την σύγκριση *Crizotinib* με τη χημειοθεραπεία πλατίνας/πεμετρεξίδης στο πλαίσιο πρώτης γραμμής θεραπείας, σήμερα, η χημειοθεραπεία τίθεται σε αμφισβήτηση για

τις συγκεκριμένες περιπτώσεις και , επομένως θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω δοκιμές του *Crizotinib* σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών .

2.6 Μεθοδολογία για την εκτίμηση των αναδιατάξεων της ALK σε καρκίνους του πνεύμονα

Σε αρκετές μελέτες, ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σταδίου IV αξιολογούνται για αναδιατάξεις γονιδίων ALK, ανεξάρτητα από το ιστορικό καπνίσματος. Αυτή συνιστά μία κλινική πρακτική ρουτίνας. Πραγματοποιούνταν επίσης μοριακός έλεγχος σε μη καπνιστές με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα και ιστολογία μη αδενοκαρκινώματος. Αναδιατάξεις γονιδίου ALK ή οι προκύπτουσες πρωτεΐνες σύντηξης δύνανται να ανιχνευθούν σε δείγματα όγκου ή πλάσματος (Solomon & Lovly, 2020). Εάν δεν ανιχνευθούν αναδιατάξεις ALK σε δείγμα πλάσματος, ο ιστός όγκου θα πρέπει να εξετάζεται, εάν είναι εφικτό. Οι διαθέσιμες μέθοδοι περιλαμβάνουν αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), υβριδισμό φθορισμού *in situ* (FISH), και ανοσοϊστοχημεία (IHC) (Weickhardt *et al.*, 2013).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, εκτελούνται προσδιορισμοί NGS, οι οποίοι μπορούν ταυτόχρονα να αξιολογήσουν πολλαπλούς βιοδείκτες. Άλλες μέθοδοι επιβεβαίωσης της θετικότητας ALK περιλαμβάνουν τη μέθοδο FISH με τη χρήση της εγκεκριμένης από την FDA δοκιμής (Vysis Probes) και την IHC με τη χρήση της εγκεκριμένης από την FDA δοκιμασίας συνοδευτικής διάγνωσης Ventana ALK (D5F3) (CDx). Στην Ευρώπη, η ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση αναδιατάξεων της ALK.

1. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - NGS – Οι πολυγονιδιακές αναλύσεις NGS έχουν αναδειχθεί γρήγορα ως προτιμώμενη επιλογή σε σχέση με τη FISH ή την IHC. Σε μια μελέτη ενός κέντρου με 55 ασθενείς με θετικό σε ALK NSCLC., δείγματα αξιολογήθηκαν είτε μέσω FISH, ή IHC ή NGS (στους περισσότερους έγιναν και οι τρεις εξετάσεις), όπου το θετικό ποσοστό με IHC ήταν 95 τοις εκατό, ακολουθούμενο από το NGS στο 93 τοις εκατό, και το FISH στο 82 τοις εκατό, με την IHC και το NGS να έχουν το υψηλότερο ποσοστό συμφωνίας 87% (Lin *et al.*, 2019). Σε μια άλλη μελέτη, το ολοκληρωμένο γονιδιωματικό προφίλ ανίχνευσε αναδιατάξεις ALK σε μια υποομάδα ασθενών με MMΚΠ με ALK αρνητικούς κατά FISH όγκους. Αυτοί οι ασθενείς έδειχναν θετική ανταπόκριση στους αναστολείς ALK, συγκρίσιμη με την ανταπόκριση ασθενών με θετικούς κατά FISH ALK όγκους (Ali *et al.*, 2016)..

2. FISH – Η FISH ήταν το πρώτο κλινικό τεστ που χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ανίχνευση αναδιατάξεων ALK στο NSCLC. (Perner *et al.*, 2008). Τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ περιλαμβάνουν δύο διαφορετικού χρώματος (κόκκινο και πράσινο) ιχνηθέτες οι οποίοι μέσω υβριδισμού πλαισιώνουν τα εξαιρετικά διατηρημένα σημεία μετατόπισης του γονιδίου της ALK. Έχουν επίσης εντοπιστεί άτυπα μοτίβα αναδιάταξης τα οποία επίσης ανταποκρίνονται σε αναστολείς της ALK (Li *et al.*, 2017). Η υπερέκφραση του γονιδίου ALK από μόνη της δεν είναι προγνωστική της ανταπόκρισης σε ανασταλτικούς παράγοντες και δεν έχει την ίδια σημασία με την αναδιάταξη.
3. Ανοσοϊστοχημεία - IHC – Έχουν αναπτυχθεί πολλαπλά μονοκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση της ογκοπρωτεΐνης σύντηξης ALK και η IHC που χρησιμοποιεί αυτά τα αντισώματα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική (Conklin *et al.*, 2013). Έτσι, η IHC είναι μια κατάλληλη μέθοδος για τον έλεγχο και τον εντοπισμό της παρουσίας θετικότητας ALK και η δοκιμασία CDx Ventana ALK (D5F3) έχει εγκριθεί για χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες από τον FDA (Schroeder, 2020).

3. Πειραματική Μεθοδολογία

3.1 Προετοιμασία δειγμάτων (γίνεται σε παθολογοανατομικά εργαστήρια)

- ✓ Μονιμοποίηση σε 10% ουδέτερα ρυθμισμένη φορμαλδεΐδη για 24 ώρες σε θερμοκρασία (18-25°C).
- ✓ Προτεινόμενο μέγεθος δείγματος $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- ✓ Η ενσωμάτωση πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 65°C.
- ✓ Χρήση τομών μικροτόμου πάχους 2-4 μm .
- ✓ Χρήση θετικά φορτισμένες πλακών μικροσκοπίου.
- ✓ Ενσωμάτωση για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

3.2 Επιλογή ιστού

Σε τομές βιοψιών όγκων μονιμοποιημένων με φορμαλίνη και ενσωματωμένων σε παραφίνη (FFPE) πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, εξετάστηκε η περιεκτικότητά τους σε ζωντανά καρκινικά κύτταρα και η περιοχή του όγκου επισημάνθηκε από παθολογοανατόμο. Για τις εξετάσεις απαραίτητη είναι η ύπαρξη μιας περιοχής τουλάχιστον 50 ζωντανών καρκινικών κυττάρων.

3.3 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Το kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με ανιχνευτές ZytoLight FISH για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών, π.χ. μετατοπίσεις, διαγραφές, ενισχύσεις και χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες, σε προδιαγραφές χρήσης πρωτοκόλλων με παραφίνη και φορμαλδεΰδη. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού του ασθενούς σε σχέση με περαιτέρω κλινικά και παθολογικά δεδομένα του ασθενούς από εξειδικευμένο παθολόγο. Γενετικές μεταλλάξεις, π.χ. μετατοπίσεις, διαγραφές και/ή ενισχύσεις, που σχετίζονται με διάφορες ανθρώπινες νεοπλασίες και χρωμοσωμικές ανευπλωδίες παρατηρούνται σε πολλές συγγενείς διαταραχές.

3.3.1 Προπαρασκευαστικά βήματα πρώτης μέρας

- I. Προετοιμασία αιθανόλης (διαλύματα 70%, 90% και 100% αιθανόλης), αραιωμένης με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- II. Προετοιμασία διαλύματος Θερμικής Προεπεξεργασίας Κιτρικού (PT1), στους 98°C.
- III. Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης SSC (WB1) σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- IV. Προετοιμασία διαλύματος ZytoLight FISH Probe σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση, προστατευμένου το από το φως.

3.3.2 Προεπεξεργασία

- I. Πραγματοποίηση τομών των 3μm σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες μάρκας TOMO.
- II. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών για 60 λεπτά στους 65°C (π.χ. σε θερμαινόμενη πλάκα).
- III. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών για 10 λεπτά σε ξυλόλη.
- IV. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών διαδοχικά σε 100%, 100%, 90% και 70% αιθανόλη, στην κάθε μία για 5 λεπτά.
- V. Διπλή πλύση έκαστη για 2 λεπτά σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.

- VI. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών για 15 λεπτά σε προθερμασμένο διάλυμα Προεπεξεργασίας Θερμότητας Κιτρικού (PT1) στους 98°C.
- VII. Μεταφορά αντικειμενοφόρων πλακών αμέσως σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- VIII. Διπλή πλύση έκαστη για 2 λεπτά σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Αφήνουμε τις πλάκες να αποστραγγιστούν.
- IX. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών σε διάλυμα πεψίνης και επώαση για 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
- X. Πλύση αντικειμενοφόρων πλακών για 5 λεπτά σε Wash Buffer SSC (WB1).
- XI. Πλύση αντικειμενοφόρων πλακών για 1 λεπτό σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- XII. Αφυδάτωση αντικειμενοφόρων πλακών διαδοχικά σε διαλύματα 70%, 90% και 100% αιθανόλης, 1 λεπτό έκαστο.
- XIII. Αφυδάτωση σε θάλαμο ξηρού αέρα.

3.3.4 Υβριδοποίηση

- I. Προσθήκη 10 μl του ανιχνευτή ZytoLight FISH σε κάθε προεπεξεργασμένο δείγμα.
- II. Κάλυψη δειγμάτων με καλυπτρίδα 22 mm x 22 mm με αποφυγή παγίδευσης φυσαλίδων και επισφράγιση κάθε καλυπτρίδας.
- III. Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών σε θερμή πλάκα και μετουσίωση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους 75°C.
- IV. Μεταφέρετε των αντικειμενοφόρων πλακών σε θάλαμο υγρασίας και ολονύκτια υβριδοποίηση στους 37°C.

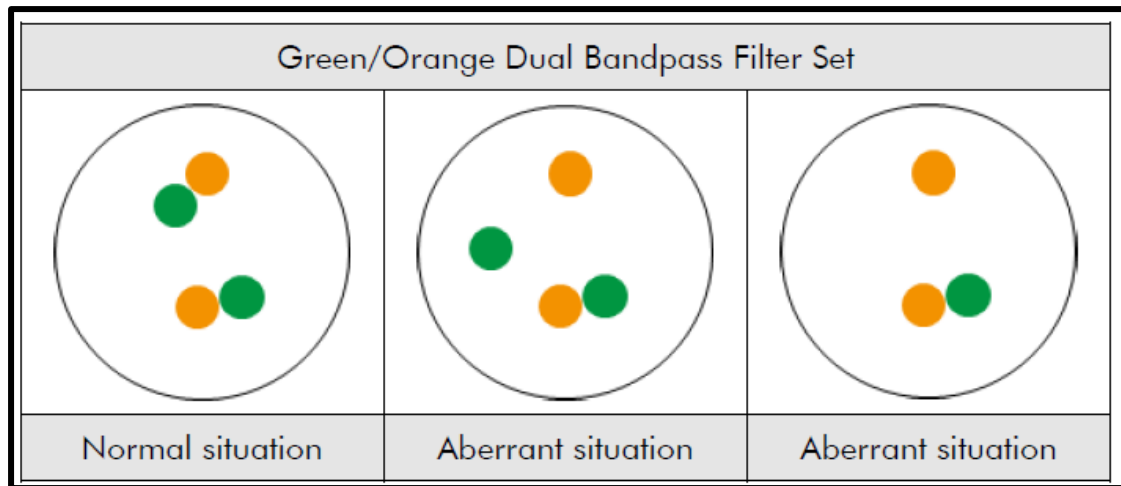
3.3.5 Προπαρασκευαστικά βήματα δευτερης μέρας

- ✓ Παρασκευή 1x ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης A: αραιώση 1 μέρος 25x ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης A (WB2) με 24 μέρη απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού και προθέρμανσή του στους 37°C.
- ✓ Προετοιμασία DAPI/DuraTect διαλύματος (MT7), προσαρμογή σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση και προστασία του από το φως.

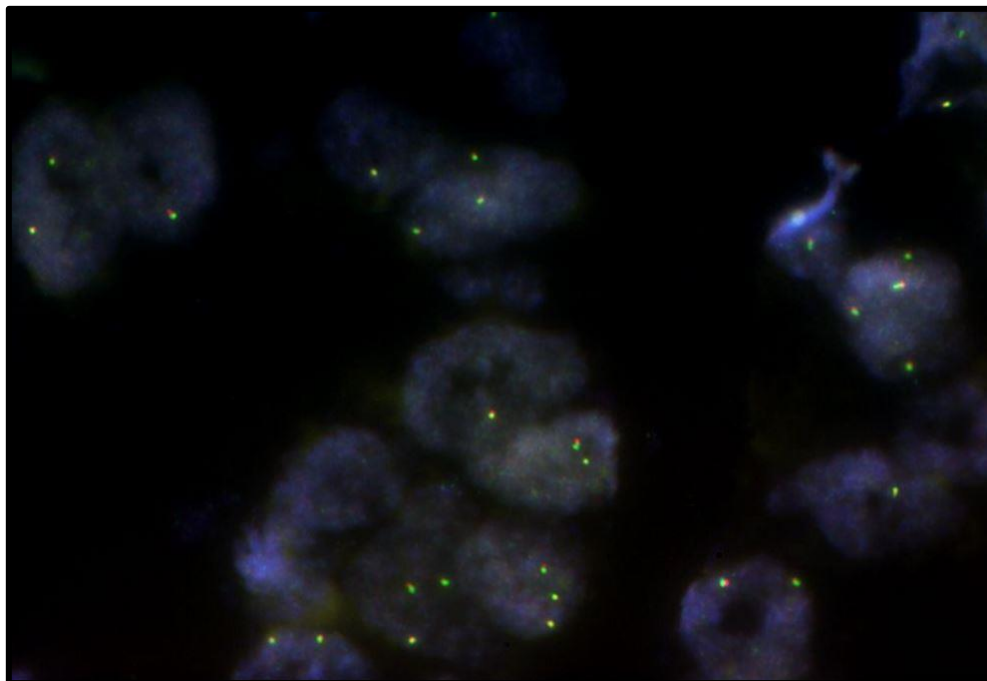
3.3.6 Ανίχνευση

- I. Αφαίρεση καλυπτρίδας βυθίζοντάς την σε 1 x Wash Buffer A στους 37°C για 1-3 λεπτά.
- II. Πλύση αντικειμενοφόρων πλακών χρησιμοποιώντας 1x ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης A για 2x 5 λεπτά στους 37°C.
- III. Επώαση αντικειμενοφόρων πλακών διαδοχικά σε διαλύματα 70%, 90% και 100% αιθανόλης, στην καθεμία για 1 λεπτό.
- IV. Αποστράγγιση δειγμάτων στον αέρα προστατευμένα από το φως.
- V. Προσθήκη 10 μl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) στις αντικειμενοφόρες πλάκες.
- VI. Κάλυψη δειγμάτων με καλυπτρίδα 22 mm x 22 mm με αποφυγή παγίδευσης φυσαλίδων και επισφράγιση κάθε καλυπτρίδας.
- VII. Διατήρηση δείγματος στο σκοτάδι. Για μεγαλύτερες περιόδους αποθήκευσης, θα πρέπει η διαδικασία να πραγματοποιείται στους 2-8°C.
- VIII. Αξιολόγηση του υλικού του δείγματος με μικροσκοπία φθορισμού. Τα σετ φίλτρων για τις ακόλουθες περιοχές μηκών κύματος που απαιτούνται είναι τα εξής ακόλουθα, σύμφωνα με την εταιρεία/ κατασκευαστή:

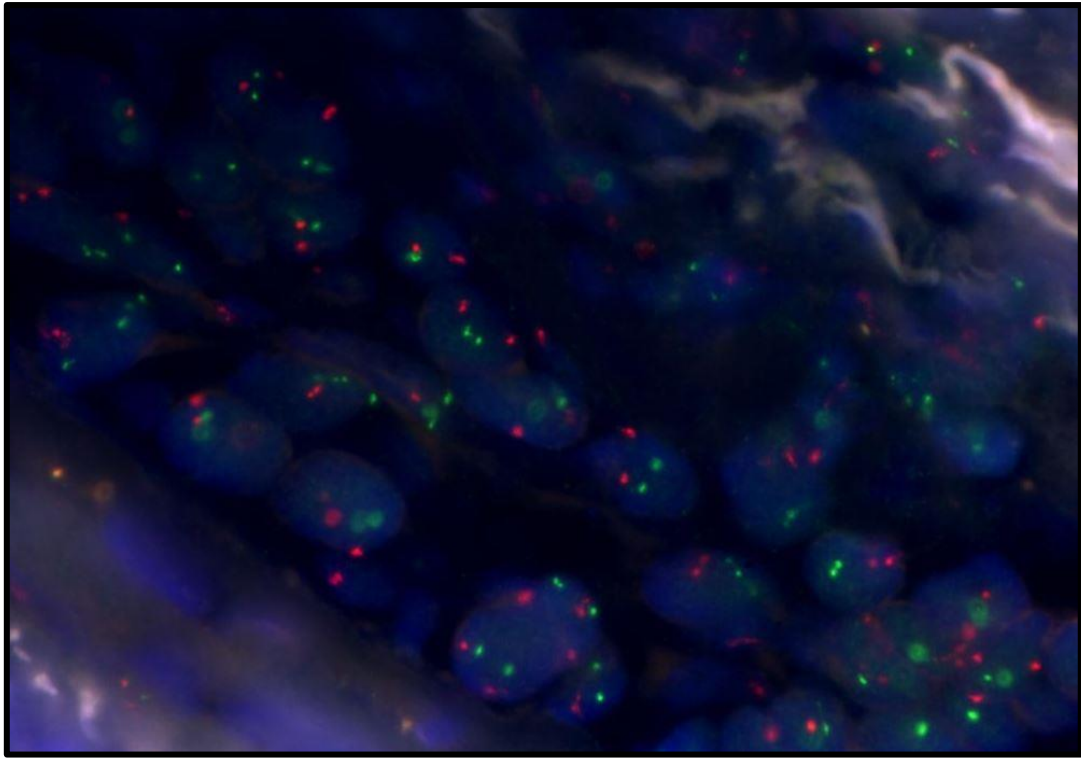
Fluorescent dye	Excitation	Emission
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm



Εικόνα 12 - Αναμενόμενα αποτελέσματα, φυσιολογικού(αριστερά) και φέροντος την αναδιάταση (δύο απόμενες εικόνες)



Εικόνα 13 - Φυσιολογικό δείγμα



Εικόνα 14 - Δείγμα που φέρει την αναδιάταξη

3.4 Ανοσοϊστοχημεία

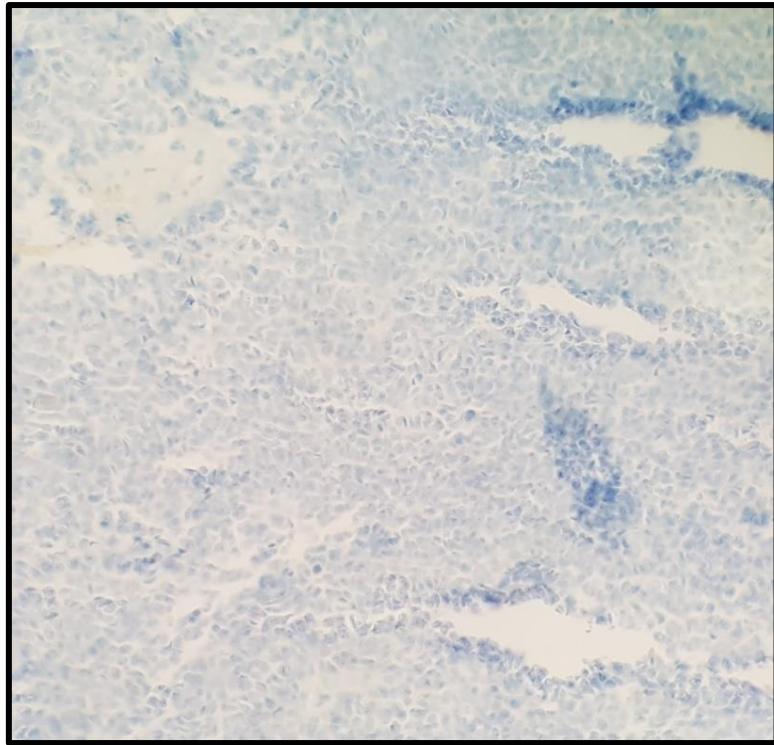
3.4.1 Επεξεργασία

Μία τομή των 3μm τοποθετήθηκε σε θετικά φορτισμένη αντικειμενοφόρο πλακά μάρκας TOMO μαζί με ιστό μάρτυρα σκωληκοειδούς απόφυσης.

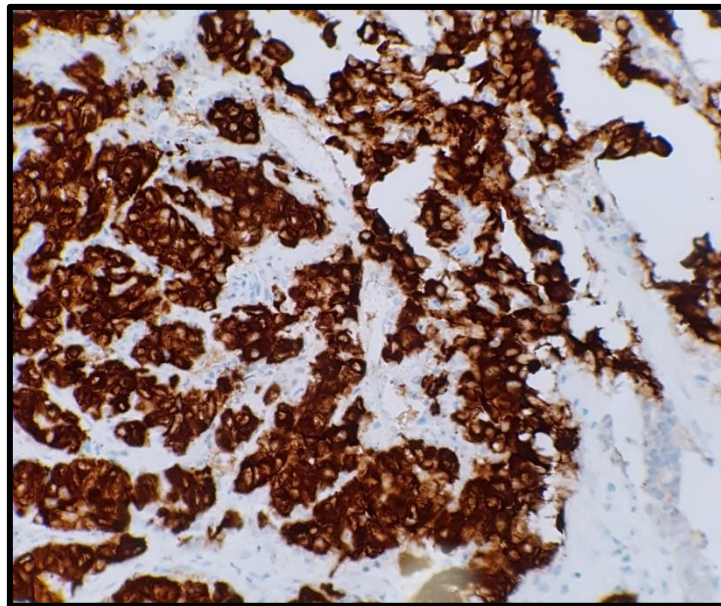
Το πλακάκι τοποθετήθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 65° C για μία ώρα ώστε να λιώσει η παραφίνη.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στον αυτόματο αναλυτή VENTANA BENCHMARK GX στον οποίο ολοκληρώθηκε η αποπαραφινποίηση του ιστού και πραγματοποιήθηκε η ανοσοϊστοχημική αντίδραση με κλειστό πρωτόκολλο και τη χρήση του VENTANA anti-ALK (D5F3) μονοκλωνικού αντισώματος της εταιρίας ROCHE (CE-IVD) και συνδυασμό των OPTIVIEW DAB IHC Detection kit και OPTIVIEW Amplification kit.

Με το τέλος της διαδικασίας έγινε καθαρισμός του πλακιδίου, αφυδάτωση σε αιθανόλη, επικάλυψη με καλυπτρίδα και στη συνέχεια η αξιολόγησή του από παθολογοανατόμο.



Εικόνα 15 – Φυσιολογικό δείγμα



Εικόνα 15 - Δείγμα που φέρει την αναδιάταξη

3.5 Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS)

3.5.1 Επιλογή ιστού και εξαγωγή DNA

Τομές βιοψιών όγκων, μονιμοποιημένων με φορμαλίνη και ενσωματωμένων σε παραφίνη (FFPE), στις οποίες πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη για κάθε δείγμα, εξετάστηκαν για να διασφαλιστεί η περιεκτικότητα σε κύτταρα όγκου >75%, όταν ήταν δυνατόν, και η περιοχή του όγκου επισημάνθηκε από παθολογοανατόμο. Από το επισημασμένο σημείο αφαιρέθηκε υλικό με τη βοήθεια νυστεριού και εκχυλίστηκε γονιδιωματικό RNA χρησιμοποιώντας το QIA Symphony RNA Kit (Qiagen, Antwerp, Belgium). Μετά την εκχύλιση, η συγκέντρωση όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific).

3.5.2 Αλληλουχία επόμενης γενιάς Ion AmpliSeq

Η ανάλυση των RNA μεταγράφων σύντηξης διεξήχθη χρησιμοποιώντας το Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel (Thermo Fisher Scientific).

Το Ion AmpliSeq RNA Fusion Lung Cancer Research Panel στοχεύει πάνω από 70 μετάγραφα σύντηξης που σχετίζονται με την έρευνα για τον καρκίνο του πνεύμονα. Επιτρέπει την ανάλυση των κύριων μεταγράφων σύντηξης ALK, RET, ROS1 και NTRK1, επιπλέον των στόχων που έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων 5' και 3' ALK. Το πάνελ περιλαμβάνει επίσης 5 γονίδια θετικού ελέγχου (control genes).

3.5.3 Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Οι συγκεντρώσεις RNA μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το φθοριόμετρο Qubit™ 2.0 σε συνδυασμό με το κιτ δοκιμασίας Qubit dsDNA HS (Thermo Fischer Scientific). Το cDNA δημιουργήθηκε με το κιτ σύνθεσης cDNA SuperScript® VILO™ (Thermo Fischer Scientific) από 10 ng ολικού RNA. Μια βιβλιοθήκη αμπλικονίων δημιουργήθηκε έτσι από το συνολικό cDNA χρησιμοποιώντας το κιτ βιβλιοθήκης Ion AmpliSeq 2.0 (Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με αμπλικόνια χρησιμοποιώντας Ion AmpliSeq HiFi Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Στη

συνέχεια, τα αμπλικόνια υπέστησαν πέψη με αντιδραστήριο FUPA και κωδικοποιήθηκαν με το κιτ IonCode™ Barcode Adapters 1–384 (Thermo Fisher Scientific). Στη συνέχεια, τα ενισχυμένα προϊόντα καθαρίστηκαν από τα άλλα συστατικά της αντίδρασης χρησιμοποιώντας Agencourt AMPure XP PCR σύστημα καθαρισμού (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

Οι βιβλιοθήκες RNA ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το φθοριόμετρο Qubit 2.0 και το κιτ προσδιορισμού Qubit dsDNA HS. 20 pM κάθε βιβλιοθήκης RNA συνδυάστηκαν και ενισχύθηκαν κλωνικά σε σωματίδια Ion Sphere™ (ISP) με προϊόν PCR που πραγματοποιήθηκε στο συσκευή Ion One Touch™ 2 με το κιτ Ion 540 OT2 (Thermo Fisher Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κιτ ποιοτικού ελέγχου Ion Sphere (Thermo Fisher Scientific) για να διασφαλιστεί ότι το 10–30% του θετικού ISP του προτύπου δημιουργήθηκε στο προϊόν PCR. Τέλος, τα θετικά στο πρότυπο Ion Sphere™ Particles εμπλουτίστηκαν χρησιμοποιώντας το όργανο Ion OneTouch™ ES, φορτώθηκαν σε ένα τσιπ Ion 540 και αναλύθηκαν σε έναν Sequencer Ion GeneStudio S5 Prime System (Thermo Fisher Scientific) με το Ion S5 Sequencing σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή οδηγίες.

Οι μετρήσεις εκτέλεσης είναι προσβάσιμες στο λογισμικό Torrent Suite™. Η ανάλυση δεδομένων NGS ολοκληρώθηκε με το λογισμικό Ion Reporter™ 5.16.0.2 (Thermo Fisher Scientific) χρησιμοποιώντας την παρεχόμενη ροή εργασιών του κατασκευαστή. Η ενίσχυση NGS για κάθε βιβλιοθήκη θεωρήθηκε επιτυχής όταν επιτεύχθηκε τουλάχιστον 20.000 συνολικές αναγνώσεις.

4. Αποτελέσματα

Στην εταιρεία GENEKOR μεταξύ 2017-2021 αναλύθηκαν συνολικά 2924 δείγματα για την αναδιάταξη της ALK. Προσωπική συμμετοχή είχα στο πειραματικό μέρος και τις αξιολογήσεις των δειγμάτων της FISH καθώς και μόνο στο πειραματικό μέρος της ανοσοϊστοχημείας καθώς η αξιολόγηση γίνεται μόνο από παθολογοανατόμο. Η συμμετοχή μου στον τομέα του NGS περιορίστηκε στο κομμάτι της απομόνωσης και προετοιμασίας του γεννητικού υλικού για την πειραματική διαδικασία.

Η κατανομή των παραπάνω ασθενών στις μεθόδους NGS, FISH, IHC φαίνεται στο πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συνολικά στατιστικά των τριών μεθόδων

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	ΘΕΤΙΚΑ	ΣΥΝΟΛΟ	ΘΕΤΙΚΑ %
FISH	1311	72	1383	5,20%
IHC	732	41	773	5,30%
NGS	881	19	900	2,11%

Συνολικά, ανεξαρτήτως μεθόδου, βρέθηκαν 132 θετικά δείγματα. Σε αυτά τα δείγματα, όπου το υλικό ήταν επαρκές, επιχειρήθηκε ο περαιτέρω έλεγχος με διαφορετική μέθοδο για επιβεβαίωση της μετάλλαξης. Τελικά σε 27 δείγματα πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος με τουλάχιστον δύο μεθόδους, πίνακας 2.

Πίνακας 2. Ασθενείς με αποτέλεσμα με δύο τουλάχιστον μεθόδους

A/A	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΑΠΑΝΤΗΣΗ	FISH/NGS	FISH/IHC	NGS/IHC	FISH	ALK-NGS	ALK-IHC
1	67	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
2	38	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
3	65	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	N/A	ΝΑΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
4	55	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
5	39	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
6	38	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΟΧΙ	N/A	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
7	34	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
8	80	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	N/A	ΝΑΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
9	62	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	N/A	ΟΧΙ	N/A	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
10	64	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
11	65	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
12	56	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΝΑΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
13	62	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΝΑΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
14	54	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
15	44	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΟΧΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
16	42	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
17	73	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
18	66	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
19	39	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
20	50	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
21	74	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΝΑΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
22	83	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
23	59	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
24	46	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
25	83	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
26	64	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	N/A	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
27	63	A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΟΧΙ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Από τους 27 ασθενείς οι 14 ήταν άντρες (52%) με μέσο όρο ηλικίας τα 57 έτη και οι 13 γυναίκες (48%) με μέσο όρο ηλικίας 57,7 έτη. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν θετικό αποτέλεσμα κι επομένως θεραπεία με αναστολείς της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος.

Αναδρομικά έγινε προσπάθεια ελέγχου της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με τα αποτελέσματα να φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Ανταπόκριση στη θεραπεία, 9 ασθενείς

A/A	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΑΠΑΝΤΗΣΗ	FISH	ALK-NGS	ALK-IHC
15	44	A	ΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
16	42	Θ	19 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
18	66	A	11 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
20	50	A	48 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
21	74	A	30 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A	ΘΕΤΙΚΟ
22	83	Θ	27 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
23	59	Θ	26 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A
24	46	A	25 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
26	64	Θ	24 ΜΗΝΕΣ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	N/A

Κατέστη δυνατό να ενημερωθούμε για την εξέλιξη της νόσου σε 9 ασθενείς από τους οποίους μόλις ένας δεν ανταποκρίθηκε ενώ παράλληλα ήταν και ο μόνος που το θετικό του αποτέλεσμα στη FISH δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη μέθοδο (αρνητικός στην ανοσοϊστοχημεία).

Επίσης υπήρξαν εννέα δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν και με τις τρεις μεθόδους

Πίνακας 4. Δείγματα με αποτελέσματα και με τις τρεις μεθόδους

A/A	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	ΑΠΑΝΤΗΣΗ	FISH/NGS	FISH/IHC	NGS/IHC	FISH	ALK-NGS	ALK-IHC
1	67	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
4	55	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
7	34	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
11	65	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
14	54	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
16	42	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
17	73	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
19	39	Θ	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
24	46	A	ΘΕΤΙΚΟ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ

Η συμφωνία μεταξύ των τριών μεθόδων, με βάση όσα αποτελέσματα είχαμε από τα δείγματα των 27 ασθενών, ήταν η εξής:

FISH – NGS, 15/17 ασθενείς, 88%

FISH – IHC , 9/15 ασθενείς, 60%

NGS – IHC , 8/11 ασθενείς, 72%

Συζήτηση

Παρόλο που τα θετικά στην σύντηξη EML4-ALK καρκινώματα αποτελούν μόλις το 5-7% όλων των περιπτώσεων NSCLC, αντιπροσωπεύουν μια πολύ σημαντική υποκατηγορία όσον αφορά την θεραπεία της. Καρκινώματα αυτού του τύπου επιδεικνύουν εντυπωσιακή ανταπόκριση σε αναστολείς κινάσης της τυροσίνης της ALK όπως το crizotinib (Kwak *et al.*, 2010)

Η ακριβής ταυτοποίηση ασθενών από τη συγκεκριμένη υποκατηγορία NSCLC απαιτεί μεθόδους με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Προς το παρόν, διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται, όπως οι FISH, IHC και το NGS.

Η FISH θεωρείται η πρότυπη μέθοδος επιλογής, όμως οι απαιτήσεις της σε εξειδικευμένο εξοπλισμό, υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς και η μη αντικειμενικότητα των αξιολογήσεων από ελεγκτή σε ελεγκτή δημιουργούν ίσως την ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων (Camidge *et al.*, 2010). Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας συγκεντρώνει αρκετά επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως χαμηλό κόστος, ευκολία, οικονομία χρόνου και θεωρητικά την δυνατότητα αναγνώρισης όλων των παραλλαγών EML4-ALK (Martelli *et al.*, 2009). Η RT-PCR είναι τεχνική υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας όμως χρειάζονται πολλαπλά σετ εκκινητών ώστε να ανιχνευθούν όλες οι παραλλαγές EML4-ALK. Το NGS στοχεύει πάνω από 70 μετάγραφα σύντηξης που σχετίζονται με την έρευνα για τον καρκίνο του πνεύμονα. Επιτρέπει την ανάλυση των κύριων μεταγράφων σύντηξης ALK, RET, ROS1 και NTRK1, επιπλέον των στόχων που έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση της έκφρασης γονιδίων 5' και 3' ALK.

Στην εταιρεία Genekor χρησιμοποιούμε τις μεθόδους FISH, IHC, NGS και παλαιότερα την RT-PCR για την ανίχνευση της σύντηξης EML4-ALK.

Τα ανεξάρτητα ποσοστά θετικότητας της κάθε μεθόδου είναι 5,2% για τη FISH, 5,3% για την IHC και μόλις 2,11% για το NGS (πίνακας 1).

Συνολικά βρέθηκαν 132 ασθενείς θετικοί στη μεταλλαγή, από τους οποίους οι 27 ελέγχθηκαν με τουλάχιστον δύο μεθόδους και 9 ελέγχθηκαν και με τις τρεις μεθόδους.

Στην παρούσα μελέτη η συμφωνία μεταξύ των μεθόδων ήταν η εξής (πίνακας 2), δεκαπέντε ασθενείς ελέγχθηκαν με FISH και IHC από τους οποίους οι εννέα, ποσοστό 60%, ήταν θετικοί και με τις δύο μεθόδους. Έντεκα ασθενείς ελέγχθηκαν με NGS και IHC από τους οποίους οι οχτώ, ποσοστό 72%, ήταν θετικοί και με τις δύο μεθόδους. Δεκαεπτά ασθενείς ελέγχθηκαν με FISH και NGS από τους οποίους οι δεκαπέντε, ποσοστό 88%, ήταν θετικοί και με τις δύο μεθόδους.

Παρατηρούμε πως παρά το γεγονός ότι η FISH και η IHC εμφανίζουν κοντινά ποσοστά θετικότητας (5,2% έναντι 5,3%) στη μεταξύ τους σύγκριση έχουν χαμηλό ποσοστό συμφωνίας. Αντίθετα η σύγκριση FISH με NGS εμφανίζει ποσοστό συμφωνίας 88% ενώ τα αναξάρτητα ποσοστά θετικότητας διαφέρουν σημαντικά (5,2% έναντι 2,11%).

Παράλληλα από τους εννέα ασθενείς που ελέγχθηκαν και με τις τρεις μεθόδους μόλις οι πέντε, ποσοστό 55%, ήταν θετικοί και στις τρεις (πίνακας 4).

Τέλος, έγινε προσπάθεια να ελεγχθεί η πορεία των ασθενών και η εξέλιξη της νόσου σε βάθος χρόνου. Τα στοιχεία που μπορέσαμε να συλλέξουμε αφορούν εννέα ασθενείς των οποίων η αρχική μέθοδος ελέγχου ήταν η FISH. Παρατηρούμε πως 8 από τους 9 ασθενείς ανταποκρίθηκαν πολύ καλά στην θεραπεία ενώ παράλληλα η συμφωνία με τις άλλες μεθόδους (είτε IHC, είτε NGS, είτε και οι δύο μαζί) ήταν 100%. Αντίθετα ένας ασθενής με θετική FISH, αρνητική IHC και μη επαρκές υλικό για NGS δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία (τελικό στάδιο)

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μας δείχνουν πως ενώ κάθε μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανεξάρτητα για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής EML4-ALK, υπάρχουν αποκλίσεις μεταξύ τους. Η FISH όταν πραγματοποιείται από έμπειρο αξιολογητή μπορεί να θεωρηθεί εξαιρετικά ευαίσθητη ως μέθοδος επιλογής. Ταυτόχρονα η IHC, η οποία αξιολογείται από έμπειρο παθολογοανατόμο, είναι μια οικονομική και εύκολη μέθοδος που μπορεί να σταθεί επάξια και να δώσει σαφές θετικό αποτέλεσμα για την εμφάνιση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Όμως οι δύο μέθοδοι αποκλίνουν αρκετά. Τέλος έρχεται το NGS που παρόλο το σχετικά χαμηλότερο ποσοστό θετικότητας (2,11%) εμφανίζει υψηλή συμφωνία με τη FISH σε όσα δείγματα ελέγχθηκαν ταυτόχρονα με τις δύο μεθόδους. Δεν ισχύει το ίδιο όμως και με τη σύγκριση με την IHC.

Θα πρέπει ίσως λοιπόν για την ταυτοποίηση της μεταλλαγής EML4-ALK να δοκιμάζονται παραπάνω από μια μέθοδοι, ειδικά αν το αποτέλεσμα είναι μερικώς αμφίσημο στην αρχική μέθοδο. Η ανταπόκριση των 8 από τους 9 ασθενείς (πίνακας 3) στη θεραπεία υποδεικνύει πως όταν υπάρχει συμφωνία ως προς τη θετικότητα, με δύο ή παραπάνω μεθόδους, τότε μπορούμε να είμαστε ακόμα πιο σίγουροι πως ο ασθενής θα ανταποκριθεί θετικά, σε ποσοστό που μπορεί να φτάνει ακόμα και το 100%.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Ali, S. M., Hensing, T., Schrock, A. B., Allen, J., Sanford, E., Gowen, K., ... & Salgia, R. (2016). Comprehensive genomic profiling identifies a subset of crizotinib-responsive ALK-rearranged non-small cell lung cancer not detected by fluorescence in situ hybridization. *The oncologist*, *21*(6), 762.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, *125*(23), 5591–5596.
- Barreca, A., Lasorsa, E., Riera, L., Machiorlatti, R., Piva, R., Ponzoni, M., ... & Inghirami, G. (2011). Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *Journal of molecular endocrinology*, *47*(1), R11-R23.
- Bergethon, K., Shaw, A. T., Ou, S. H. I., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., ... & Iafrate, A. J. (2012). ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology*, *30*(8), 863.
- Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, *4*(6), 437–447.
- Camidge, D. R., Bang, Y. J., Kwak, E. L., Iafrate, A. J., Varella-Garcia, M., Fox, S. B., ... & Shaw, A. T. (2012). Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *The lancet oncology*, *13*(10), 1011-1019.
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. (2010). Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.*,*16*(22), 5581–5590.

Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., & Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(1), 11-23.

Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 771–794.

Choi, Y. L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., ... & Mano, H. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 363(18), 1734-1739.

Choi, Y. L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., ... & Mano, H. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 363(18), 1734-1739.

Clarke, J. L., Pao, W., Wu, N., Miller, V. A., & Lassman, A. B. (2010). High dose weekly erlotinib achieves therapeutic concentrations in CSF and is effective in leptomeningeal metastases from epidermal growth factor receptor mutant lung cancer. *Journal of neuro-oncology*, 99(2), 283-286.

Conklin, C. M., Craddock, K. J., Have, C., Laskin, J., Couture, C., & Ionescu, D. N. (2013). Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non–small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(1), 45-51.

Costa, D. B., Kobayashi, S., Pandya, S. S., Yeo, W. L., Shen, Z., Tan, W., & Wilner, K. D. (2011). CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), e443-e445.

Crino, L., Kim, D., Riely, G. J., Janne, P. A., Blackhall, F. H., Camidge, D. R., ... & Shaw, A. T. (2011). Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive

non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15_suppl), 7514-7514.

D’Incecco, A., Andreozzi, M., Ludovini, V., Rossi, E., Capodanno, A., Landi, L., Tibaldi, C., Minuti, G., Salvini, J., Coppi, E., Chella, A., Fontanini, G., Filice, M. E., Tornillo, L., Incensati, R. M., Sani, S., Crinò, L., Terracciano, L., & Cappuzzo, F. (2014). PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *British Journal of Cancer*, 112(1), 95–102.

Dai, Y., Xu, C., Sun, X., & Chen, X. (2017). Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. *Chemical Society Reviews*, 46(12), 3830–3852.

De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 457–474.

de Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 24–37.

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605–644.

Devarakonda, S., Morgensztern, D., & Govindan, R. (2015). Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *The lancet oncology*, 16(7), e342-e351.

Doebele, R. C., Pilling, A. B., Aisner, D. L., Kutateladze, T. G., Le, A. T., Weickhardt, A. J., ... & Camidge, D. R. (2012). Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*, 18(5), 1472-1482.

Franco, O. E., Shaw, A. K., Strand, D. W., & Hayward, S. W. (2010). Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 33–39.

Franco, R., Rocco, G., Marino, F. Z., Pirozzi, G., Normanno, N., Morabito, A., ... & Caraglia, M. (2013). Anaplastic lymphoma kinase: a glimmer of hope in lung cancer treatment?. *Expert review of anticancer therapy*, 13(4), 407-420.

Franses, J. W., Baker, A. B., Chitalia, V. C., & Edelman, E. R. (2011). Stromal Endothelial Cells Directly Influence Cancer Progression. *Science Translational Medicine*, 3(66), 66ra5-66ra5.

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195–4200.

Friboulet, L., Li, N., Katayama, R., Lee, C. C., Gainor, J. F., Crystal, A. S., ... & Engelman, J. A. (2014). The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non–small cell lung cancer. *Cancer discovery*, 4(6), 662-673.

Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 298–306.

Gainor, J. F., Ou, S. H. I., Logan, J., Borges, L. F., & Shaw, A. T. (2013). The central nervous system as a sanctuary site in ALK-positive non–small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(12), 1570-1573.

Garza Treviño, E. N., González, P. D., Valencia Salgado, C. I., & Martinez Garza, A. (2019). Effects of pericytes and colon cancer stem cells in the tumor microenvironment. *Cancer Cell International*, 19(1).

Gerber, D. E., & Minna, J. D. (2010). ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer cell*, 18(6), 548-551.

Global Cancer Observatory, World Health Organization (2018b), Retrieved on 13 September 2021 from <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>

Heuckmann, J. M., Balke-Want, H., Malchers, F., Peifer, M., Sos, M. L., Koker, M., ... & Thomas, R. K. (2012). Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. *Clinical Cancer Research*, *18*(17), 4682-4690.

Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., ... & Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, *14*(4), 439-449.

Jackman, D. M., Holmes, A. J., Lindeman, N., Wen, P. Y., & Kesari, S. (2006). Response and resistance in a non-small-cell lung cancer patient with an epidermal growth factor receptor mutation and leptomeningeal metastases treated with high-dose gefitinib. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(27), 4517-4520.

Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., & Ward, E. M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *19*(8), 1893-1907.

Katayama, R., Khan, T. M., Benes, C., Lifshits, E., Ebi, H., Rivera, V. M., ... & Shaw, A. T. (2011). Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(18), 7535-7540.

Kwak, E. L., Bang, Y. J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., ... & Iafrate, A. J. (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, *363*(18), 1693-1703.

Levine, A. J., & Puzio-Kuter, A. M. (2010). The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science*, *330*(6009), 1340-1344.

Li, W., Zhang, J., Guo, L., Chuai, S., Shan, L., & Ying, J. (2017). Combinational analysis of FISH and immunohistochemistry reveals rare genomic events in ALK

fusion patterns in NSCLC that responds to crizotinib treatment. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), 94-101.

Lin, C., Shi, X., Yang, S., Zhao, J., He, Q., Jin, Y., & Yu, X. (2019). Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 131, 62-68.

Marsilje, T. H., Pei, W., Chen, B., Lu, W., Uno, T., Jin, Y., ... & Michellys, P. Y. (2013). Synthesis, structure–activity relationships, and in vivo efficacy of the novel potent and selective anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 5-Chloro-N 2-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl) phenyl)-N 4-(2-(isopropylsulfonyl) phenyl) pyrimidine-2, 4-diamine (LDK378) currently in phase 1 and phase 2 clinical trials. *Journal of medicinal chemistry*, 56(14), 5675-5690.

Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, et al. EML4-ALK rearrangement in non–small cell lung cancer and non–tumor lung tissues. *Am J Pathol*. 2009;174(2):661–670.

Meng, M.-B., Zaorsky, N. G., Deng, L., Wang, H.-H., Chao, J., Zhao, L.-J., Yuan, Z.-Y., & Ping, W. (2015). Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncology*, 11(1), 169–179.

Metro, G., Lunardi, G., Floridi, P., Pascali, J. P., Marcomigni, L., Chiari, R., ... & Gori, S. (2015). CSF concentration of crizotinib in two ALK-positive non–small-cell lung cancer patients with CNS metastases deriving clinical benefit from treatment. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(5), e26-e27.

Miyake, I., Hakomori, Y., Shinohara, A., Gamou, T., Saito, M., Iwamatsu, A., & Sakai, R. (2002). Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene*, 21(38), 5823-5834.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkins-lymphoma. *Science* 1994; 263: 1281–4 (Published erratum appears in *Science* 1995;267:316–7).

Motegi, A., Fujimoto, J., Kotani, M., Sakuraba, H., & Yamamoto, T. (2004). ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth. *Journal of cell science*, 117(15), 3319-3329.

Motl, S., Zhuang, Y., Waters, C. M., & Stewart, C. F. (2006). Pharmacokinetic considerations in the treatment of CNS tumours. *Clinical pharmacokinetics*, 45(9), 871-903.

Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., Romero, I. L., Carey, M. S., Mills, G. B., Hotamisligil, G. S., Yamada, S. D., Peter, M. E., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature Medicine*, 17(11), 1498–1503.

Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version, National Cancer Institute (2020), Retrieved on 13 August 2020 from <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>

Ou, S. H. I. (2012). Crizotinib: a drug that crystallizes a unique molecular subset of non-small-cell lung cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 12(2), 151-162.

Ou, S. H. I., Ahn, J. S., De Petris, L., Govindan, R., Yang, J. C. H., Hughes, B. G. M., ... & Kim, D. W. (2015). Efficacy and safety of the ALK inhibitor alectinib in ALK+ non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients who have failed prior crizotinib: An open-label, single-arm, global phase 2 study (NP28673).

Perner, S., Wagner, P. L., Demichelis, F., Mehra, R., LaFargue, C. J., Moss, B. J., ... & Rubin, M. A. (2008). EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*, 10(3), 298-302.

- Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Amelio, I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*, 7(1).
- Pouyssegur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092), 437–443.
- Rosti, G., Bevilacqua, G., Bidoli, P., Portalone, L., Santo, A., & Genestreti, G. (2006). Small cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 17, ii5–ii10.
- Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 83–90.
- Sasaki, T., Koivunen, J., Ogino, A., Yanagita, M., Nikiforow, S., Zheng, W., ... & Jänne, P. A. (2011). A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer research*, 71(18), 6051-6060.
- Sasaki, T., Koivunen, J., Ogino, A., Yanagita, M., Nikiforow, S., Zheng, W., ... & Jänne, P. A. (2011). A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer research*, 71(18), 6051-6060.
- Schroeder, W. (2020, April). Risks at the Intersection of Research and Oncology Nursing. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 36, No. 2, p. 151002). WB Saunders.
- SEER*Explorer Application, National Cancer Institute (2019), Retrieved on 14 October 2021 from <https://seer.cancer.gov/explorer/application.html>
- Shaw, A. T., & Engelman, J. A. (2013). ALK in lung cancer: past, present, and future. *Journal of clinical oncology*, 31(8), 1105.
- Shaw, A. T., Bauer, T. M., Felip, E., Besse, B., James, L. P., Clancy, J. S., ... & Solomon, B. J. (2015). Clinical activity and safety of PF-06463922 from a dose escalation study in patients with advanced ALK+ or ROS1+ NSCLC.
- Shaw, A. T., Kim, D. W., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M. J., ... & Jänne, P. A. (2013). Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(25), 2385-2394.

Shaw, A. T., Mehra, R., Kim, D. W., Felip, E., Chow, L. Q. M., Camidge, D. R., ... & Engelman, J. A. (2013). Clinical activity of the ALK inhibitor LDK378 in advanced, ALK-positive NSCLC.

Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S. R., Costa, D. B., Heist, R. S., ... & Iafrate, A. J. (2009). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of clinical oncology*, 27(26), 4247.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34.

Sirzén, F., Kjellén, E., Sörenson, S., & Cavallin-ståhl, E. (2003). A Systematic Overview of Radiation Therapy Effects in Non-Small Cell Lung Cancer. *Acta Oncologica*, 42(5–6), 493–515.

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., ... & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566.

Solomon, B. J., Mok, T., Kim, D. W., Wu, Y. L., Nakagawa, K., Mekhail, T., ... & Blackhall, F. (2014). First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 371, 2167-2177.

Solomon, B., & Lovly, C. (2020). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion oncogene positive non-small cell lung cancer. *Uptodate. Waltham, MA: UpToDate. Accessed July, 5.*

Sverre Sörenson, Bengt Glimelius, P. (2001). A Systematic Overview of Chemotherapy Effects in Non-Small Cell Lung Cancer. *Acta Oncologica*, 40(2–3), 327–339.

Tatum, J. L. (2006). Hypoxia: Importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *International Journal of Radiation Biology*, 82(10), 699–757.

Toyokawa, G., & Seto, T. (2014). ALK inhibitors: what is the best way to treat patients with ALK+ non-small-cell lung cancer?. *Clinical lung cancer*, 15(5), 313-319.

Toyokawa, G., & Seto, T. (2015). Updated evidence on the mechanisms of resistance to ALK inhibitors and strategies to overcome such resistance: clinical and preclinical data. *Oncology research and treatment*, 38(6), 291-298.

Xue Du, Yun Shao, Hai-Feng Qin, Yan-Hong Tai1 & Hong-Jun Gao (2018)
ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC) *Thoracic Cancer* 9
(2018) 423–430

Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773.

Weickhardt, A. J., Aisner, D. L., Franklin, W. A., Varella-Garcia, M., Doebele, R. C., & Camidge, D. R. (2013). Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Cancer*, 119(8), 1467-1477.

Wen, M., Wang, X., Sun, Y., Xia, J., Fan, L., Xing, H., ... & Li, X. (2016). Detection of EML4-ALK fusion gene and features associated with EGFR mutations in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy*, 9, 1989.

Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904–5912.

Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 393–410.

Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1).

Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 41–51.